



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

(11) PI 0017622-2 B1

(22) Data do Depósito: 16/06/2000

(45) Data de Concessão: 06/12/2016



(54) Título: COMPOSIÇÃO DE BACTÉRIA DE ÁCIDO LÁCTICO E USO DA COMBINAÇÃO DE BACTÉRIA DE ÁCIDO LÁCTICO PARA A PREVENÇÃO E/OU TRATAMENTO DE INFECÇÕES E CONDIÇÕES INFLAMATÓRIAS

(51) Int.Cl.: A61K 35/00

(30) Prioridade Unionista: 21/06/1999 IT RM99 A 000400

(73) Titular(es): VSL PHARMACEUTICALS, INC.

(72) Inventor(es): CLAUDIO DE SIMONE

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"COMPOSIÇÃO DE BACTÉRIA DE ÁCIDO LÁCTICO E USO DA COMBINAÇÃO DE BACTÉRIA DE ÁCIDO LÁCTICO PARA A PREVENÇÃO E/OU TRATAMENTO DE INFECÇÕES E CONDIÇÕES INFLAMATÓRIAS"**.

5 Dividido do PI 0011799-4, depositado em 16.06.2000.

A presente invenção refere-se a uma combinação de bactéria de ácido láctico e seu uso para produção de um suplemento alimentar, um produto de higiene ou uma preparação farmacêutica, para a prevenção e/ou tratamento de infecções e condições inflamatórias provocadas pela bactéria,
10 vírus ou fungos, especialmente na boca, vagina, uretra, nariz, olhos e ouvidos.

As bactérias de ácido láctico são bactérias Gram-positivas que produzem ácido láctico pela fermentação da glicose. O *Streptococcus thermophilus* é também incluído nessa definição por convenção.

15 É bem-conhecido que as cepas da bactéria de ácido láctico que produzem H_2O_2 podem atuar como reguladores da flora bacteriana em cavidades do corpo e nas membranas mucosas. Foi demonstrado que as bactérias de ácido láctico produtoras de H_2O_2 podem antagonizar *E. coli*, *N. gonorrhoea*, *G. vaginalis*, *C. trachomatis*, *U. urealyticum* e *B. bivius*. Entretanto,
20 essas bactérias são apenas de benefício limitado quando usadas na prática médica. Isso pode ser observado a partir do fato de que as preparações baseadas em bactérias de ácido láctico (por exemplo, pessários vaginais), idealizados para o tratamento de infecções causadas pelos microorganismos acima (por exemplo, vaginite), não são bem-consideradas pelos médicos,
25 que preferem tratar seus pacientes com antibióticos ou agentes quimioterapêuticos.

Dentro do melhor conhecimento do inventor, nenhuma ação antibacteriana ou reguladora da flora nas cavidades do corpo e nas membranas mucosas foi atribuída à bactéria de ácido láctico que utiliza arginina.

30 Foi agora surpreendentemente descoberto que a atividade da bactéria de ácido láctico produtora de H_2O_2 é consideravelmente potenciada pela adição de uma ou mais cepas de bactéria de ácido láctico que são ca-

pazes de utilizar a arginina. A arginina forma parte de diversos pequenos peptídios encontrados em fluidos biológicos e também ocorre como arginina livre. Diversas espécies de bactérias utilizam a arginina para sua própria nutrição e crescimento. As bactérias de ácido que utilizam a arginina podem, portanto, privar outras bactérias patogênicas ou potencialmente patogênicas de uma certa quantidade de arginina, que, embora não suficiente para terminar o seu crescimento, torna as mesmas mais suscetíveis à ação de H_2O_2 produzida pela bactéria de ácido láctico.

Portanto, a presente invenção fornece uma combinação de bactéria de ácido láctico compreendendo:

(a) um primeiro componente consistindo em pelo menos uma cepa de bactéria de ácido láctico produtora de H_2O_2 ; e

(b) um segundo componente consistindo em pelo menos uma cepa de bactéria de ácido láctico que utiliza arginina.

A cepa da bactéria de ácido láctico no componente (a) é preferencialmente escolhida de um grupo que consiste em cepas das espécies *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus salivarius* e *Lactobacillus casei*, enquanto a cepa da bactéria de ácido láctico no componente (b) é escolhida do grupo que consiste em espécies *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus gasseri* e *Lactobacillus fermentum*. Mais especialmente, a cepa da bactéria de ácido láctico no componente (b) é a cepa *Lactobacillus brevis* CD2, depositada no DSM - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemanha, em 6 de fevereiro de 1998, com protocolo de acesso No. DSM 11988 conforme o Tratado de Budapest, ou mutantes derivados da mesma.

A proporção do número de bactérias no componente (a) em relação ao número de bactérias no componente (b) é preferencialmente de 1:100 a 100:1 e mais preferencialmente de 1:5 a 5:1, sendo mais preferido de 1:1.

A combinação pode ser administrada na forma de dosagem única, compreendendo de 1×10^2 a 5×10^{11} bactérias do componente (a) e de 1×10^2 a 5×10^{11} bactérias do componente (b), preferencialmente de 1×10^9

bactérias do componente (a) e 3×10^9 bactérias do componente (b).

A combinação pode também ser administrada na forma de comprimidos, comprimidos para serem chupados, doces, goma de mascar, cápsulas de gelatina, pessários, supositórios e microenemas, assim como grânulos, cremes dentais e géis, pós de dentadura, agentes de lavagem de boca, dentifrícios, sprays, suspensões e pomadas.

De acordo com outra modalidade da invenção, a combinação adicionalmente compreende pelo menos uma outra cepa de bactéria de ácido láctico, escolhida de um grupo que consiste em: *Lactobacillus acidophilus*,
10 *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus cateniforme*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus leichmannii*, *Lactobacillus minutus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus fermentum*, *Bifidobacterium*
15 *adolescentis*, *Bifidobacterium angulatum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium dentium*, *Bifidobacterium eriksonii*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium plantarum* e *Streptococcus thermophilus*.

A combinação pode também compreender vitaminas, bases de amônio quaternário, sais minerais, antioxidantes e agentes antiplaca.

A invenção também se refere ao uso de uma combinação de bactéria de ácido láctico, compreendendo:

- (a) um primeiro componente consistindo em pelo menos uma cepa de bactéria de ácido láctico produtora de H_2O_2 ; e
- 25 (b) um segundo componente consistindo em pelo menos uma cepa de bactéria de ácido láctico que utiliza arginina, para produção de um suplemento alimentar, um produto de higiene ou uma preparação farmacêutica para a prevenção e/ou tratamento de infecções e condições inflamatórias provocadas por bactérias, vírus ou fungos, especialmente na boca, vagina, uretra, nariz, olhos e ouvidos. Essas infecções e condições inflamatórias incluem gengivite, periodontite, mucosite e estomatite, provocada por
- 30 drogas e/ou agentes físicos, síndrome de Behcet, diaceratose da cavidade

oral, glossite, feridas de garganta, sialadenite, sialolitíase, pênfigo, *Lichen planus*, síndrome de Sjögren, vaginose, vaginite, uretrite, prostatite, protite, otite, conjuntivite, rinite, sinusite, leucoplaquia, aftas, herpes e infecções causadas por *Helicobacter pylori* na cavidade oral.

5 A combinação pode também ser usada para vantajosamente tratar a cavidade oral com um desodorante oral, agente antiinflamatório, anticárie e/ou anti-placa.

Os exemplos seguintes servem para ilustrar em maiores detalhes os diversos aspectos da invenção, mas não devem ser considerados
10 como limitativos da mesma.

Exemplo 1

Foi avaliado o efeito inibidor da bactéria de ácido láctico produtora de H_2O_2 (componente A), bactéria de ácido láctico que utiliza arginina (componente B), e da combinação de duas cepas, especificamente na proporção de 1:1 (combinação AB), em relação ao crescimento de bactéria potencialmente patogênica.
15

Resumidamente, a cultura da bactéria de ácido láctico a ser testada foi primeiro ajustada em um pH neutro, pelo fato de que um pH ácido, por si só, inibe o crescimento bacteriano. A suspensão foi submetida à filtração estéril e o filtrado foi usado para impregnar um número de discos de papel absorvente (30 μ l de filtrado por disco). Os discos foram colocados sobre uma placa de meio de crescimento seletivo que foi inoculado com 0,1 ml de *Gardnerella vaginalis* (uma cepa que provoca vaginose e que foi isolada em laboratório) junto com um disco de controle, que foi impregnado apenas com
20 30 μ l de água destilada. Após incubação por 24 horas a 37°C, a inibição do crescimento dos patógenos foi avaliada mediante medição do diâmetro do halo em volta do disco em milímetros.

Foi realizada uma segunda série de testes com *Streptococcus mutans* como patógeno alvo, essa espécie sendo o agente causador de placas dentárias e cáries.
30

A caracterização da bactéria como produtora de H_2O_2 foi feita por meio de uma reação clássica de benzidina peroxidase, que revela as

colônias de bactérias produtoras de H_2O_2 através de uma coloração azul. A atividade da arginina desidrolase foi determinada para avaliar a capacidade da bactéria de ácido láctico de utilizar arginina (M.C. Manca de Nadra, *Milchwissenschaft*, 37 (1982), páginas 669-670).

- 5 A bactéria de ácido láctico foi obtida da American Type Collection (ATCC), Rockville, USA.

Cepa Bacteriana	Halo de Inibição (atividade anti- <i>G. vaginalis</i> , mm)
Produtora de H_2O_2 (componente A)	
<i>Lactobacillus crispatus</i> (ATCC 39197)	75
<i>Lactobacillus salivarius</i> (ATCC) 11741)	60
<i>Lactobacillus crispatus</i> + <i>Lactobacillus salivarius</i>	63
Utilizadora de Arginina (componente B)	
<i>Lactobacillus brevis</i> (ATCC 14869)	0
<i>Lactobacillus fermentum</i> (ATCC 14931)	2
<i>Lactobacillus brevis</i> + <i>Lactobacillus fermentum</i>	0
Combinação AB (proporção de A para B de 1:1)	
<i>Lactobacillus crispatus</i> + <i>Lactobacillus brevis</i>	112
<i>Lactobacillus crispatus</i> + <i>Lactobacillus fermentum</i>	100
<i>Lactobacillus salivarius</i> + <i>Lactobacillus brevis</i>	117
<i>Lactobacillus salivarius</i> + <i>Lactobacillus fermentum</i>	104

Cepa Bacteriana	Halo de Inibição (atividade anti- <i>S. mutans</i> , mm)
Produtora de H_2O_2 (componente A)	
<i>Lactobacillus crispatus</i> (ATCC 39197)	98
<i>Lactobacillus salivarius</i> (ATCC) 11741)	102
<i>Lactobacillus crispatus</i> + <i>Lactobacillus salivarius</i>	99
Utilizadora de Arginina (componente B)	
<i>Lactobacillus brevis</i> (ATCC 14869)	0
<i>Lactobacillus fermentum</i> (ATCC 14931)	1

<i>Lactobacillus brevis</i> + <i>Lactobacillus fermentum</i>	1
Combinação AB (proporção de A para B de 1:1)	
<i>Lactobacillus crispatus</i> + <i>Lactobacillus brevis</i>	118
<i>Lactobacillus crispatus</i> + <i>Lactobacillus fermentum</i>	126
<i>Lactobacillus salivarius</i> + <i>Lactobacillus brevis</i>	121
<i>Lactobacillus salivarius</i> + <i>Lactobacillus fermentum</i>	120

Exemplo 2

Foram preparados comprimidos para chupar com a seguinte composição unitária:

Combinação AB (<i>Lactobacillus salivarius</i> + <i>Lactobacillus brevis</i> , proporção de 1:1)	400 milhões
Manitol	400 mg
Sacarina	5 mg
Polioxietileno	50 mg
Estearato de Mg	15 mg
Talco	25 mg
Sílica	5 mg

Esses comprimidos foram administrados em quatro voluntários, que foram avisados para não limpar os dentes ou utilizar goma de mascar na semana anterior. As pessoas tomaram esses comprimidos durante um dia por uma semana, após as refeições, deixando os comprimidos se dissolverem na boca. As avaliações clínicas foram realizadas quanto ao índice de placa dentária e quanto ao índice de placa gengival.

Para a placa dentária o seguinte sistema de avaliação foi usado em seis dentes (primeiro molar superior à direita; incisivo superior central à esquerda; primeiro premolar superior à esquerda; primeiro molar inferior à esquerda; incisivo inferior central à direita; primeiro premolar inferior à direita):

- 0 – absolutamente nenhuma placa
- 1 – nenhuma placa visível
- 2 – placa visível
- 3 – diversas placas óbvias

O seguinte sistema de avaliação foi adotado para avaliar a placa gengival, usando a margem dos seis dentes mencionados acima:

- 0 – nenhuma inflamação
- 1 – pequena inflamação
- 5 2 – inflamação moderada, com sangramento ao ser contatada
- 3 – inflamação acentuada, com tendência de sangramento espontâneo.

Os dados combinados obtidos para os seis dentes dos quatro voluntários, foram como segue:

Pessoa	Índice de placa dental		Índice de placa gengival	
	0	7 dias	0	7 dias
Nº. 1	8	2	7	1
Nº. 2	9	3	10	3
Nº. 3	15	5	6	2
Nº. 4	15	7	8	3

10 Exemplo 3

Quatro pessoas com um diagnóstico clínico e histológico de úlceras de aftas recidivas foram tratados durante dez dias com seis comprimidos de chupar por dia, cuja composição é fornecida no Exemplo 2.

- 15 Todos os pacientes tratados mostraram uma cura completa das úlceras ao final do décimo dia e nenhum deles teve novas úlceras durante o mês seguinte.

- 20 Para aperfeiçoar o sabor e o aspecto da combinação bacteriana AB, adequados agentes de coloração e adoçantes, tal como sacarina, óleo de hortelã e xilitol podem ser adicionados, como é usual e bem conhecido para os versados na técnica.

- A combinação AB pode ser administrada na forma de péletes, balas, goma de mascar, cápsulas de gelatina, cremes dentais e géis, pós de dentaduras, agentes de lavagem de boca, dentifrícios, comprimidos, pessários, supositórios, sprays, suspensões e microenemas.

25 Exemplo 4

Preparação de uma Pasta de Dente

Pasta de Dente Básica

Composição percentual:

	Fosfato de cálcio diidratado:	37,5%
	Glicerol (85% em água):	30,0%
	Aromatizante (óleo de hortelã):	1,0%
5	Carboximetilcelulose de sódio:	1,0%
	Água purificada:	20,8%
	Sacarina de sódio (solução aq. 1%):	2,5%
	Sulfato de lauril sódio:	2,0%
	Água purificada:	<u>5,2%</u>
10		100,0%

Composição por peso:

	Fosfato de cálcio diidratado:	337,5 g
	Glicerol (85% em água):	270,0 g
	Aromatizante (óleo de hortelã):	9,0 g
15	Carboximetilcelulose de sódio:	9,0 g
	Água purificada:	187,2 g
	Sacarina de sódio (solução aq. 1%):	22,5 g
	Sulfato de lauril sódio:	18,0 g
	Água purificada:	<u>48,8 g</u>
20		900,0 g

O glicerol foi adicionado ao fosfato de cálcio diidratado, que foi moído e passado através de uma peneira de malha 50. A mistura foi deixada se submeter à hidratação, proporcionando uma pasta homogênea densa.

25 O aromatizante (1% de óleo de hortelã) foi adicionado nesse ponto.

A carboximetilcelulose de sódio foi hidratada em água durante a noite (concentração de 4,6% em água purificada).

A solução de sacarina de sódio foi adicionada ao gel espesso resultante.

30 O gel de polímero foi derramado em uma massa já contendo o fosfato de cálcio que já havia sido hidratado com glicerol e os componentes foram vigorosamente misturados.

Uma solução de aproximadamente 28% de sulfato de lauril sódio em água purificada, foi preparada separadamente.

A solução de sulfato de lauril sódio foi depois adicionada à pasta de fosfato de dicálcio espessa.

5 A pasta homogênea espessa resultante, que apresenta boas propriedades reológicas, foi misturada por poucos minutos e depois refinada mediante passagem da mesma através de um refinador com rolos. Isso proporcionou uma pasta homogênea na forma de neve, com um agradável aroma de hortelã.

10 38,5 g da bactéria de ácido láctico liofilizada (*L. salivarius* + *L. brevis*, 1:1; 10^{10} CFU/g) foram passados através de uma peneira de malha 50 e adicionados em pequenas porções ao restante (770 g) da pasta de dente básica acima. A pasta homogênea resultante apresentou uma cor ligeiramente marrom claro e um odor de hortelã.

15 Exemplo 5

Preparação de Comprimidos Vaginais de Liberação Rápida

Comprimidos vaginais revestidos com uma camada efervescente foram preparados por granulação a úmido. Os comprimidos pesavam 2100 mg cada um e continham 100 mg da combinação de bactéria de ácido láctico como substância ativa.

Cada comprimido vaginal apresentava a seguinte composição:

Bactéria de ácido láctico peneirada e liofilizada

(30×10^9 de *L. brevis*, 30×10^9 de *L. salivarius*

e 90×10^9 de *L. plantarum* por grama) 100,0 mg

25 Lactose 1368,0 mg

Amido de milho 246,0 mg

Ácido adípico 192,0 mg

Bicarbonato de sódio 150,0 mg

Estearato de magnésio 9,0 mg

30 Ácido esteárico 9,0 mg

Sílica coloidal 5,0 mg

2100,0 mg

REIVINDICAÇÕES

1. Composição de bactéria de ácido láctico, caracterizada pelo fato de que compreende:

5 (a) um primeiro componente consistindo em pelo menos uma cepa de bactéria de ácido láctico produtora de H_2O_2 ; e

(b) um segundo componente consistindo em pelo menos uma cepa de bactéria de ácido láctico que utiliza arginina, em que o componente (a) é selecionado do grupo consistindo em cepas das espécies *Lactobacillus salivarius* e *Lactobacillus plantarum*, e o componente (b) é a cepa *Lactobacillus brevis* CD2, depositada no DSM – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemanha, em 6 de fevereiro de 1998, com protocolo de acesso No. DSM 11988 conforme o Tratado de Budapeste;

e veículo farmaceuticamente aceitável.

15 2. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreende ainda pelo menos uma outra cepa de bactéria de ácido láctico escolhida de um grupo consistindo em: *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus salivarius* e *Lactobacillus plantarum*.

20 3. Uso de uma combinação de bactéria de ácido láctico, compreendendo:

(a) um primeiro componente consistindo em pelo menos uma cepa de bactéria de ácido láctico produtora de H_2O_2 ; e

(b) um segundo componente consistindo em pelo menos uma cepa de bactéria de ácido láctico que utiliza arginina, em que o componente (a) é selecionado do grupo consistindo em cepas das espécies *Lactobacillus salivarius* e *Lactobacillus plantarum*, e o componente (b) é a cepa *Lactobacillus brevis* CD2, depositada no DSM – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemanha, em 6 de fevereiro de 1998, com protocolo de acesso No. DSM 11988 conforme o Tratado de Budapeste,

o referido uso sendo caracterizado pelo fato de ser para produção de um suplemento alimentar, um produto de higiene ou uma preparação

farmacêutica com atividade inibitória no crescimento dos patógenos para prevenção e/ou tratamento de infecções e condições inflamatórias provocadas por bactérias, vírus ou fungos, especialmente na boca e vagina.

- 5 4. Uso de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que as infecções e condições inflamatórias incluem placa dentária, placa gengival, úlceras de aftas e vaginose.

5. Uso de acordo com a reivindicação 3 ou 4, caracterizado pelo fato de ser para o tratamento da cavidade oral como um agente antiinflamatório, anticárie e/ou antiplaca.

- 10 6. Uso de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de ser para o tratamento da cavidade oral como um desodorante.

RESUMO

Patente de Invenção: **"COMPOSIÇÃO DE BACTÉRIA DE ÁCIDO LÁCTICO E USO DA COMBINAÇÃO DE BACTÉRIA DE ÁCIDO LÁCTICO PARA A PREVENÇÃO E/OU TRATAMENTO DE INFECÇÕES E CONDIÇÕES INFLAMATÓRIAS"**.

A presente invenção divulga uma combinação de bactéria de ácido láctico, compreendendo:

(a) um primeiro componente consistindo em pelo menos uma cepa de bactéria de ácido láctico produtora de H_2O_2 ; e

(b) um segundo componente consistindo em pelo menos uma cepa de bactéria de ácido láctico que utiliza arginina. A divulgação refere-se também ao uso dessa combinação para produção de um suplemento alimentar, um produto de higiene ou uma preparação farmacêutica para a prevenção e/ou tratamento de infecções e condições inflamatórias provocadas por bactérias, vírus ou fungos, especialmente na boca, vagina, uretra, nariz, olhos e ouvidos.