

(11) Número de Publicação: **PT 1555028 E**

(51) Classificação Internacional:

A61K 35/74 (2007.10) **A61P 11/02** (2007.10)
A61P 11/06 (2007.10) **A61P 17/00** (2007.10)
A61P 37/08 (2007.10) **A61P 43/00** (2007.10)

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

(22) Data de pedido: **2003.06.26**

(30) Prioridade(s): **2002.06.26 JP 2002185897**

(43) Data de publicação do pedido: **2005.07.20**

(45) Data e BPI da concessão: **2009.09.30**
002/2010

(73) Titular(es):

CALPIS CO., LTD.
4-1, EBISU-MINAMI 2-CHOME SHIBUYA-KU,
TOKYO 150-0022 **JP**

(72) Inventor(es):

NAOYUKI YAMAMOTO **JP**
YUU ISHIDA **JP**
IZUKI BANDO **JP**

(74) Mandatário:

ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
RUA DAS FLORES, N.º 74, 4.º AND 1249-235 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **AGENTE ANTIALÉRGICO, SUA UTILIZAÇÃO PARA REDUZIR A ALERGIA E MÉTODO DE REDUÇÃO DE ALERGIA**

(57) Resumo:

DESCRIÇÃO

"Agente antialérgico, sua utilização para reduzir a alergia e método de redução de alergia"

A presente invenção refere-se à utilização de bactérias de ácido láctico para a redução de alergia.

Os pacientes alérgicos têm vindo a aumentar em número todos os anos em muitos países incluindo o Japão e está relatada uma elevada ocorrência de adultos alérgicos, um em cada três no Japão. As doenças alérgicas são categorizadas em quatro tipos, tipo I a IV, dependendo do seu mecanismo de acção. Alguns tipos de rinite alérgica como polinose, asma brônquica e dermatite atópica são alergias de tipo I mediadas pela imunoglobulina E (IgE), em que o aumento do nível sérico do antigénio específico de IgE aumenta o risco de desenvolvimento de sintomas alérgicos.

O mecanismo de desenvolvimento de alergia de Tipo I é o seguinte. Quando um antigénio, como pólen, pó doméstico, ou ácaros, invade o corpo, é produzido um anticorpo IgE específico para esse antigénio e liga-se a mastócitos ou a receptores Fcε na superfície dos basófilos para sensibilizar o indivíduo. Quando o antigénio além disso invade o corpo, o antigénio liga-se ao anticorpo IgE para formar um complexo. Isto causa desgranulação, em que mediadores químicos nos grânulos, como a histamina e o leucotrieno, são libertados para desenvolver sintomas alérgicos.

Recentemente, as doenças alérgicas são tratadas principalmente com antagonistas de mediadores químicos, como anti-histamínicos e esteróides usados como agentes anti-inflamatórios. No entanto, ambos os agentes proporcionam meramente terapia sintomática e os esteróides inibem a resposta imunitária global, resultando em efeitos secundários. Alternativamente, são também usados agentes para a inibição da libertação de mediadores químicos por inibição da desgranulação, mas não foram encontrados nenhuns agentes terapêuticos fundamentais para reduzir especificamente o anticorpo IgE, que é o principal factor de desenvolvimento de alergia.

Adicionalmente, para a administração crónica necessária, são desejados agentes antialérgicos que sejam fáceis de tomar e altamente seguros. Consequentemente, são exigidos novos agentes antialérgicos com tais propriedades.

É um objecto da presente invenção proporcionar um agente antialérgico que seja capaz de melhorar a diátese alérgica por redução do nível de IgE, que contribui para o desenvolvimento da alergia do Tipo I, e que seja fácil de tomar e altamente seguro, assim como um método para a redução de alergia.

Por forma a atingir o objecto acima, os presentes inventores construíram um modelo de ratinho em que o nível de antigénio específico de IgE foi notavelmente elevado sem aumento substancial no nível de IgG. Utilizando este modelo, os inventores pesquisaram sobre o efeito repressivo no nível de IgE de várias de estirpes bacterianas de ácido láctico que podem afectar o sistema imunitário intestinal, para verificar que, entre as várias bactérias de ácido láctico testadas, determinadas bactérias têm um efeito inibidor particularmente excelente na produção de IgE, completando assim a presente invenção.

De acordo com a presente invenção, proporciona-se o uso da reivindicação 1.

De acordo com a presente invenção, proporcionam-se também as bactérias de ácido láctico da reivindicação 4.

Em algumas concretizações, as bactérias de ácido láctico reduzem, quando administradas por via oral, o nível sérico de antigénio específico de IgE num modelo de rinite em ratinhos em que o nível de antigénio específico de IgE no sangue foi elevado por exposição nasal do ratinho a estimulação contínua com antigénio.

A Fig. 1 mostra gráficos que indicam as alterações no nível sérico de imunoglobulina em ratinhos com nível elevado de IgE no Exemplo 1.

A Fig. 2 é um gráfico que mostra os resultados de experiências para suprimir o nível de OVA-IgE em

ratinhos com nível elevado de IgE por administração de leites fermentados, conduzidas no Exemplo 2.

A Fig. 3 é um gráfico que mostra os resultados de experiências para suprimir o nível de OVA-IgE em ratinhos com nível elevado de IgE por administração de leites fermentados, conduzidas no Exemplo 3.

A Fig. 4 é um gráfico que mostra os resultados de experiências para suprimir o nível de OVA-IgE em ratinhos com nível elevado de IgE por administração de leites fermentados, conduzidas no Exemplo 4.

A Fig. 5 é um gráfico que mostra os resultados de experiências para suprimir sintomas alérgicos em seres humanos por administração de leite fermentado, conduzidas no Exemplo 5.

A Fig. 6 é um gráfico que mostra os resultados de experiências para suprimir sintomas alérgicos em seres humanos por administração de leite fermentado, conduzidas no Exemplo 5.

O medicamento de acordo com a presente invenção contém, como um ingrediente activo, bactérias de ácido láctico das espécies *Lactobacillus acidophilus*, em que as referidas bactérias de ácido láctico das espécies *Lactobacillus acidophilus* são bactérias da estirpe *Lactobacillus acidophilus* CL92 (depositada no International Patent Organism Depositary sob o número de depósito FERM BP-4981 em 4 de Março, 1994).

Esta estirpe bacteriana foi depositada segundo as disposições do Tratado de Budapeste sobre o Reconhecimento Internacional do Depósito de Microrganismos para Efeitos do Procedimento em Matéria de Patentes.

A estirpe *Lactobacillus acidophilus* CL92 está já disponível ao público.

A estirpe *Lactobacillus acidophilus* CL92 tem as seguintes propriedades bacterianas:

(Propriedades morfológicas)

- 1) Forma da célula; bastonete,
- 2) Motilidade; nenhuma,
- 3) Formação de esporos; nenhuma,
- 4) Coloração de Gram; positiva

(Propriedades fisiológicas)

- 1) Produção de Catalase; negativa,
- 2) Produção de Indole; negativa,
- 3) Redução de nitrato; negativa,
- 4) Crescimento Aeróbio; anaeróbio facultativo,
- 5) Crescimento a 15°C; nenhum,
- 6) Formação de ácido DL-láctico a partir da glucose por fermentação homoláctica sem formação de gases,
- 7) Formação de Ácidos a partir de Hidratos de Carbono
 - glicose; + melibiose; -
 - lactose; + rafinose; +
 - manose; + manitol; -
 - frutose; + sorbitol; -
 - galactose; + esculina; +
 - sacarose; + salicina; +
 - arabinose; - N-acetilglicosamina; +
 - maltose; + amigdalina; +
 - xilose; - gentiobiose; +
 - ramnose; - melezitose; -
 - celobiose; + dextrina; -
 - trealose; + amido; -

O teor das supramencionadas bactérias de ácido láctico no medicamento da presente invenção não está particularmente limitado e pode ser adequadamente ajustado dependendo da facilidade de produção ou de uma dosagem diária preferida. Por exemplo, quando o medicamento está numa formulação líquida, um teor preferido de bactérias é de 1×10^7 células/ml a 1×10^{10} células/ml.

O medicamento da presente invenção pode conter opcionalmente outros componentes, além das bactérias de ácido láctico. Os exemplos desses outros componentes podem incluir aditivos como excipientes, ou componentes do meio a ser discutido mais tarde.

O medicamento da presente invenção pode ser preparado cultivando as bactérias de ácido láctico num meio.

Qualquer meio pode ser usado para cultura, desde que as supramencionadas bactérias de ácido láctico possam aí crescer e podem ser usados leites de animais, leite desnatado, soro de leite, meio MRS, meio GAM, meio BL, Caldo de Fígado de Briggs, ou outros meios sintéticos. A temperatura para a cultura pode ser de 25°C a 50°C, preferivelmente de 35°C a 42°C. O tempo de cultura pode ser de 3 horas a 48 horas, preferivelmente de 8 horas a 12 horas. O meio cultivado pode ser usado como medicamento da presente invenção com ou sem processamento adicional. Por exemplo, as células bacterianas colhidas do meio cultivado por centrifugação ou filtração, um produto a partir daí liofilizado, um produto a partir daí tratado com calor, ou células bacterianas trituradas, podem ser usados como o medicamento da presente invenção. Adicionalmente, as células bacterianas nas formas acima podem ainda ser formuladas, ou misturadas com vários materiais alimentares como bebidas, comprimidos, pastas ou pão, antes do uso como o medicamento da presente invenção.

O medicamento da presente invenção pode ser administrado por qualquer via, mas é preferida a administração oral. A dosagem pode ser não inferior a 2×10^9 células por dia, preferivelmente 2×10^{10} células por dia para administração oral a seres humanos. Esta dosagem do agente pode ser administrada numa dose única ou numa pluralidade de doses por dia.

O medicamento da presente invenção suprime eficazmente o nível de IgE como será demonstrado nos Exemplos, e é esperado que seja altamente seguro uma vez que o ingrediente activo deste agente são células bacterianas tomadas sob a forma de alimento.

Os indivíduos podem ser animais como seres humanos ou outros mamíferos.

O medicamento da presente invenção suprime eficazmente o nível de IgE em organismos vivos, e é fácil de tomar e altamente seguro. Assim, o presente agente é útil para suprimir alergias que envolvem níveis excessivos de IgE.

A presente invenção será agora explicada em maior detalhe com referência aos Exemplos, que são unicamente ilustrativos e não pretendem limitar a presente invenção.

Exemplo 1

(Preparação de Ratinhos com teor elevado de IgE)

Foram obtidos ratinhos BALB/c machos de Charles River Japan e criados com acesso livre a CE-2 (CLEA Japan, Inc.) como alimentação. Foram suspensos 10 µg de ovalbumina (abreviada como OVA a partir daqui, produzida por SIGMA CHEMICAL CO.) e 2 mg de hidróxido de alumínio (WAKO PURE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) como um adjuvante em 300 µl de solução salina. Dez dos ratinhos acima foram injectados intraperitonealmente às seis semanas de idade com esta suspensão no primeiro dia de sensibilização e no dia 4 para a sensibilização primária. Para a sensibilização secundária, embebeu-se o nariz de cada ratinho numa solução de antigénio de OVA contendo 25 mg de OVA/ml de solução salina durante três segundos e esta operação de impregnação foi repetida três vezes formando um ciclo. Foram realizados dois ciclos de operação de impregnação por dia e a impregnação diária foi realizada do dia 10 ao dia 16 para preparar ratinhos com teor elevado de IgE.

Foram obtidas amostras de sangue a partir das veias oftálmicas dos ratinhos com elevado teor de IgE no primeiro dia e no dia 17 de sensibilização e obtiveram-se amostras de soro. Mediram-se a IgE específica para OVA (abreviada como OVA-IgE a partir daqui), a IgE total e a IgG total nas amostras de soro de acordo com os métodos a serem discutidos abaixo. Apresentam-se os resultados nas Fig. 1(a) a 1(c).

Dos resultados apresentados nas Fig. 1(a) a 1(c), percebe-se que o aumento na IgE total e nos níveis séricos de OVA-IgE foi notavelmente maior do que no nível de IgG como resultado da sensibilização. Conseqüentemente, foi construído um modelo de alergia em ratinho, em que a IgE e o nível de antigénio específico de IgE no sangue foram elevados sem alteração de todo o sistema imunitário.

(Medição de OVA-IgE no sangue)

O nível sérico de OVA-IgE foi medido pela técnica ELISA em sanduíche. Adicionaram-se 100 µl de solução salina contendo 10 µg/ml de um anticorpo policlonal de ovelha anti-IgE de ratinho (denominação comercial AAM11, produzida por DAINIPPON PHARMACEUTICAL CO., LTD.) a cada poço de uma "imunoplaça" de 96 poços (produzida por CORNING INCORPORATED) e incubou-se durante a noite a 4°C. A placa foi lavada três vezes com um tampão de fosfato (contendo NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 8,1 mM e KH₂PO₄ 1,5 mM, abreviado como PBS a partir daqui), revestida com caseína-PBS a 0,5% e incubada durante 3 horas à temperatura ambiente. Após a placa ter sido lavada três vezes com PBS, foram adicionados 100 µl de uma diluição em PBS de 1/10 de uma amostra de soro a cada poço e deixou-se reagir durante a noite a 4°C. Após a placa ter sido lavada quatro vezes com PBS, adicionaram-se a cada poço 100 µl de solução de caseína-PBS a 0,5% contendo 10 µg/ml de OVA que tinha sido biotinilada utilizando um kit de biotinilação (produzido por AMERICAN QUALEX INTERNATIONAL INC.) (OVA marcada com biotina), e deixou-se reagir durante 2 horas à temperatura ambiente. Após a placa ter sido lavada cinco vezes com PBS, foram adicionados a cada poço 100 µl de uma solução de PBS contendo 1 µg/ml de estreptavidina-peroxidase (produzida por SIGMA CHEMICAL Co.) e caseína a 0,5% e deixou-se reagir durante 1 hora à temperatura ambiente. Após a placa ter sido lavada cinco vezes com Tween 20 a 0,1% em PBS, foram adicionados a cada poço 100 µl de tampão de ácido cítrico 0,2 M (preparado por mistura de ácido cítrico 0,2 M e citrato trissódico 0,2 M e ajustando o pH a 5) contendo 600 µg/ml de ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfónico) (abreviado como ABTS a partir daqui, produzido por BOEHRINGER MANNHEIM) e peróxido de hidrogénio a 0,006% e protegido durante 3 horas a 37°C para coloração. Após a reacção ter sido concluída, mediu-se a

D.O.₄₀₅ e a D.O.₄₉₂, e obteve-se a verdadeira densidade óptica por: valor de D.O.₄₀₅ - valor de D.O.₄₉₂.

Obteve-se uma amostra de sangue de um ratinho que tinha sido injectado intraperitonealmente cinco vezes com 25 mg/ml de OVA em solução salina (uma vez por semana). A partir das amostras de sangue, foi preparada uma amostra de soro como soro padrão. Este soro padrão foi diluído com PBS de 1/10 e a diluição resultante foi ainda diluída passo a passo para duas vezes com soro não imunizado para preparar as diluições de trabalho. Estas diluições de trabalho foram sujeitas a medições dos valores de coloração de acordo com os procedimentos acima, para obter uma curva de trabalho. Com base nessa curva de trabalho, foram obtidos os níveis de OVA-IgE nas amostras de soro como quantidades relativas com respeito ao nível de OVA-IgE no soro padrão como sendo 1.

(Medição de IgE Total no sangue)

Adicionaram-se 50 µl de solução salina contendo 10 µg/ml de um anticorpo policlonal de ovelha anti-IgE de ratinho (denominação comercial AAM11, produzida por DAINIPPON PHARMACEUTICAL CO., LTD.) a cada poço de uma "imunoplaça" de 96 poços (produzida por CORNING INCORPORATED), e incubou-se durante a noite a 4°C. A placa foi lavada três vezes com PBS, revestida com caseína-PBS a 0,5%, e incubada durante 3 horas à temperatura ambiente. Após a placa ter sido lavada três vezes com PBS, foram adicionados a cada poço 50 µl de uma diluição 1/25 de uma amostra de soro em caseína-PBS a 0,5% e deixou-se reagir durante a noite a 4°C. Após a placa ter sido lavada quatro vezes com PBS, adicionaram-se a cada poço 50 µl de uma solução de PBS contendo 2 µg/ml de um anticorpo anti-IgE de ratinho marcado com biotina (produzido por YAMASA CORPORATION) e 0,5% de caseína e deixou-se reagir durante 2 horas à temperatura ambiente. Após a placa ter sido lavada cinco vezes com Tween 20 a 0,1% em PBS, foram adicionados a cada poço 50 µl de uma solução de PBS contendo 1 µg/ml de estreptavidina-peroxidase e 0,5% de caseína e deixou-se reagir durante 1 hora à temperatura ambiente. Após a placa ter sido lavada cinco vezes com Tween 20 a 0,1% em PBS, foram adicionados a cada poço 50 µl de tampão de ácido cítrico 0,2 M (pH5) contendo 300 µg/ml de ABTS e 0,006% de peróxido de

hidrogénio e protegeu-se durante 20 a 30 minutos à temperatura ambiente durante a reacção. Foi então medida a D.O.₄₀₅.

Por outro lado, dissolveu-se anti-DNP-IgE de ratinho (produzido por YAMASA CORPORATION), em vez das amostras de soro, em caseína-PBS a 0,5% a várias concentrações e submeteu-se aos mesmos procedimentos acima para obtenção de uma curva de trabalho. Com base nesta curva de trabalho, foram calculados os níveis totais de IgE nas amostras de soro.

(Medição de IgG Total no Sangue)

Adicionaram-se 50 µl de solução salina contendo anticorpo de cabra anti-IgG de ratinho (H+L) a 1 µg/ml (denominação comercial 62-6500, produzida por ZYMED LABORATORIES, INC.) a cada poço de uma "imunoplaça" de 96 poços (produzida por CORNING INCORPORATED), e incubou-se durante a noite a 4°C. A placa foi lavada três vezes com PBS, revestida com caseína-PBS a 0,5% e incubada durante 3 horas à temperatura ambiente. Após a placa ter sido lavada três vezes com PBS, foram adicionados a cada poço 50 µl de uma diluição de 1/1000 de uma amostra de soro em caseína-PBS a 0,5% e deixou-se reagir durante a noite a 4°C. Após a placa ter sido lavada quatro vezes com PBS, adicionaram-se a cada poço 50 µl de uma solução de PBS contendo 2 µg/ml de um anticorpo anti-IgG de ratinho marcado com peroxidase (produzido por CAPPEL LABORATORIES, INC.) e 0,5% de caseína e deixou-se reagir durante 2 horas à temperatura ambiente. Após a placa ter sido lavada cinco vezes com Tween 20 a 0,1% em PBS foram adicionados a cada poço 50 µl de tampão de ácido cítrico 0,2 M (pH5) contendo 300 µg/ml de ABTS e 0,006% de peróxido de hidrogénio e protegeu-se durante 20 a 30 minutos à temperatura ambiente para a reacção. Foi então medida a D.O.₄₀₅.

Por outro lado, dissolveu-se IgG de ratinho purificada (produzida por CAPPEL LABORATORIES, INC.), em vez das amostras de soro, em caseína-PBS a 0,5% em várias concentrações e submeteu-se aos mesmos procedimentos acima para obtenção de uma curva de trabalho. Com base nesta curva de trabalho, foram calculados os níveis totais de IgE nas amostras de soro.

Exemplo 2**(Comparação do Efeito de Várias Bactérias de Ácido Láctico)**

Cada uma das estirpes de bactérias de ácido láctico mostradas na Tabela 1 foi pré-cultivada em meio MRS durante a noite a 37°C e as células foram colhidas por centrifugação a 3000 rpm durante 10 minutos. Fermentou-se leite desnatado reconstituído a 9% (P/V) (contendo 0,1% (P/V) de extracto de levedura (produzido por DIFCO)) com as células recolhidas a 37°C até o leite estar coagulado. Após a fermentação, foi medida a contagem de células totais de cada leite fermentado. Os resultados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1

Estirpe	Contagem de células totais (células/ml)
* <i>Lactobacillus acidophilus</i> CL92 (BP-4981)	1,9×10 ⁸
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> CPL812	1,5×10 ⁸
<i>Lactobacillus fermentum</i> CP34	5,3×10 ⁸
<i>Lactobacillus helveticus</i> CP790	2,4×10 ⁸
<i>Lactobacillus johnsonii</i> CP2551	2,7×10 ⁸
<i>Lactobacillus plantarum</i> CP2172	5,9×10 ⁸
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC53103	1,0×10 ⁸
* Exemplo da invenção.	

Seguidamente, ratinhos com elevado teor de IgE foram preparados da mesma maneira que no Exemplo 1 e o nível sérico de OVA-IgE foi medido no dia 18 de sensibilização da mesma maneira que no Exemplo 1. Os ratinhos foram divididos em grupos de 10 ratinhos por grupo com a mesma média de níveis séricos de IgE-OVA. Do dia 19 ao 21 de sensibilização, vários leites fermentados apresentados acima, leite desnatado reconstituído não fermentado a 9% (P/V), ou leite desnatado reconstituído não fermentado a 9% P/V contendo 750 µg de ciclofosfamida foram administrados por via gástrica a cada grupo de ratinhos em dosagens de 1 ml por dia durante três dias. No dia 22 de sensibilização, foram obtidas amostras de

sangue dos ratinhos a partir das veias oftálmicas e foram preparadas amostras de soro. Mediram-se os níveis séricos de OVA-IgE e de IgG total. Como controlo, obteve-se da mesma maneira uma amostra de sangue de um ratinho que tinha sido sensibilizado da mesma maneira mas ao qual não se deu leite fermentado ou similares e mediram-se os níveis séricos de OVA-IgE e de IgG total. Os resultados são apresentados na Fig. 2.

Como mostrado na Fig. 2, no grupo de ratinhos aos quais se deu leite fermentado com *Lactobacillus acidophilus* ou *Lactobacillus fermentum*, foi observado efeito inibidor significativo ($p < 0,01$) no nível de IgE-OVA, comparado com o grupo ao qual se deu leite desnatado não fermentado. Não foi observada diferença significativa no nível de IgG total no sangue (não apresentados).

Exemplo de referência 3

Foi seguido o procedimento no Exemplo 2 excepto que foram usadas as estirpes de bactérias de ácido láctico apresentadas na Tabela 2. Os resultados da medição de uma contagem de células totais em cada leite fermentado são apresentados na Tabela 2. Os resultados da medição do OVA-IgE sérico são apresentados na Fig. 3.

Tabela 2

Estirpe	Contagem de células totais (células/ml)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CL0062 (BP-4980)	$4,40 \times 10^8$
<i>Lactobacillus gasseri</i> CP2209	$4,30 \times 10^8$
<i>Lactobacillus reuteri</i> ATCC23272	$9,60 \times 10^8$
<i>Bifidobacterium breve</i> CP2425	$1,30 \times 10^8$

Como mostrado na Fig. 3, no grupo de ratinhos aos quais se deu leite fermentado com *Lactobacillus acidophilus*, foi observado efeito inibidor significativo ($p < 0,01$) no nível de IgE-OVA, comparado com o grupo ao qual se deu leite desnatado não fermentado. Não foi observada diferença significativa no nível de IgG total no sangue (não apresentado).

Exemplo 4**(Confirmação de Efeitos com Menor Dosagem)**

A estirpe *Lactobacillus acidophilus* CL92 e a estirpe *Lactobacillus fermentum* CP34 foram respectivamente pré-cultivadas em meio MRS durante a noite a 37°C e as células foram colhidas por centrifugação a 3000 rpm durante 10 minutos. As células recolhidas foram cultivadas em Meio MRS durante a noite a 37°C e as células foram colhidas por centrifugação a 3000 rpm durante 10 minutos. O número de células foi medido para cada estirpe e as células foram suspensas em leite desnatado a 9% numa concentração de 1×10^6 células por 1 ml para obter suspensões.

Seguidamente, ratinhos com nível elevado de IgE foram preparados da mesma maneira que no Exemplo 1 e mediu-se OVA-IgE sérica no dia 18 de sensibilização da mesma maneira que no Exemplo 1. Os ratinhos foram divididos em grupos de 10 ratinhos por grupo com a mesma média de níveis séricos de IgE-OVA. Do dia 19 ao 21 de sensibilização, as suspensões acima foram administradas por via gástrica a cada grupo de ratinhos em dosagens de 1 ml por dia durante três dias. No dia 22 de sensibilização, foram obtidas amostras de sangue dos ratinhos a partir das veias oftálmicas e foram preparadas amostras de soro. Mediram-se os níveis séricos de OVA-IgE e de IgG total. Os resultados são apresentados na Fig. 4.

Como mostrado na Fig. 4, em ambos os grupos de ratinhos aos quais foram dadas a estirpe *Lactobacillus acidophilus* CL92 ou a estirpe *Lactobacillus fermentum* CP34, foi observado efeito inibidor significativo no nível de IgE-OVA, comparado com o grupo ao qual se deu leite desnatado não fermentado. Não foi observada diferença significativa no nível de IgG total no sangue (não apresentado).

A taxa de redução "d" no nível de IgE-OVA quando cada suspensão foi administrada é obtida pela fórmula $d=1-(b/a)$, em que "a" representa a razão padrão do nível de IgE-OVA quando foi alimentado o leite desnatado não fermentado e "b" representa a razão padrão de OVA-IgE quando foi alimentada cada suspensão. Denotando a concentração de células da suspensão administrada aos ratinhos por "s" (células/ml), e

assumindo que "s" está na proporção da razão de redução "d", o número de células "x" (células/ml) na suspensão requerido para reduzir o nível de IgE-OVA para metade neste sistema experimental é obtido pela fórmula $x=(s \times 0,5)/d$. Utilizando esta fórmula, foi obtido o número de células "x" para cada estirpe bacteriana usada nos Exemplos 2 e 3. Os resultados são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3

Estirpe	Número de células necessárias (células/ml)
* <i>Lactobacillus acidophilus</i> CL92 (BP-4981)	$1,0 \times 10^6$
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> CP1812	$2,0 \times 10^8$
<i>Lactobacillus fermentum</i> CP34	$1,4 \times 10^6$
<i>Lactobacillus helveticus</i> CP790	$3,3 \times 10^8$
<i>Lactobacillus johnsonii</i> CP2551	$3,5 \times 10^8$
<i>Lactobacillus plantarum</i> CP2172	$7,0 \times 10^8$
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC53103	$2,9 \times 10^8$
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CL0062 (BP-4980)	$5,0 \times 10^8$
<i>Lactobacillus gasseri</i> CP2209	$3,1 \times 10^9$
<i>Lactobacillus reuteri</i> ATCC23272	$3,3 \times 10^9$
<i>Bifidobacterium breve</i> CP2425	$1,1 \times 10^9$
* Exemplo da invenção	

Exemplo 5

(Efeito Clínico em Seres Humanos)

Foram dados a treze indivíduos que sofrem de rinite alérgica perene (idade média de $22,9 \pm 6,1$ anos, 6 do sexo masculino e 7 do sexo feminino), após 2 semanas de período de observação, 100 ml/dia de leite fermentado contendo $8,0 \times 10^8$ a $1,3 \times 10^9$ células/ml da estirpe *Lactobacillus acidophilus* CL 92 durante 4 semanas. Questionários sobre os sintomas subjectivos foram emitidos em intervalos e, com base nas respostas, os sintomas foram classificados de acordo com a "Classificação de Gravidade de Rinite alérgica" fornecida pela

Sociedade Japonesa de Alergologia. Os sintomas de rinite foram diagnosticados em intervalos de acordo com a directriz da Sociedade Japonesa de Alergologia. Foram obtidas amostras de sangue dos indivíduos em intervalos e foram medidos os títulos de IgE no sangue. Adicionalmente, foi registada a temperatura mais baixa do dia durante o período de teste. A gravidade da congestão nasal dos indivíduos, a frequência de assoar o nariz e a menor temperatura do dia durante o período de teste são apresentados nas Fig. 5 e 6.

Durante o período de teste, a temperatura mais baixa do dia oscilou bastante entre 14°C no primeiro dia de consumo (15 de Novembro) até 3,7°C no último dia de consumo (13 de Dezembro) por mais de 10°C. Mesmo sob estas condições para deteriorar os sintomas de rinite, a congestão nasal apresentou uma tendência para melhorar duas semanas após o início de consumo (teste de Wilcoxon: $p < 0,1$) e foi observada melhoria significativa quatro semanas após o início (teste de Wilcoxon: $p < 0,05$). A frequência de assoar o nariz também mostrou uma tendência para diminuir três semanas após o início do consumo (teste de Wilcoxon: $p < 0,1$). Durante o período de consumo, foram observadas a tendência de diminuição da frequência de espirros, a remissão de inchaço da concha nasal inferior, e a diminuição do título de IgE total no sangue.

Lisboa, 2009-12-29

REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de bactérias de ácido láctico da espécie *Lactobacillus acidophilus* no fabrico de um medicamento destinado à redução de alergia; em que as referidas bactérias de ácido láctico da espécie *Lactobacillus acidophilus* são bactérias da estirpe *Lactobacillus acidophilus* CL92 (depositada no International Patent Organism Depository, FERM Bop-4981).

2. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o medicamento é destinado à redução de alergia no tratamento da rinite alérgica.

3. Utilização de acordo com a reivindicação 1 ou a reivindicação 2, em que o medicamento é destinado à administração a um ser humano.

4. Bactérias de ácido láctico da espécie *Lactobacillus acidophilus* para utilização na redução de alergia; em que as referidas bactérias de ácido láctico da espécie *Lactobacillus acidophilus* são bactérias da estirpe *Lactobacillus acidophilus* CL92 (depositada no International Patent Organism Depository, FERM BP-4981).

5. Bactérias de ácido láctico de acordo com a reivindicação 4, em que as bactérias de ácido láctico são destinadas à redução de alergia no tratamento da rinite alérgica

6. Bactérias de ácido láctico de acordo com a reivindicação 4 ou a reivindicação 5, em que as bactérias são destinadas à administração a um ser humano.

Lisboa, 2009-12-29

RESUMO

"Agente antialérgico, sua utilização para reduzir a alergia e método de redução de alergia"

A presente invenção proporciona um agente antialérgico contendo, como um ingrediente activo, bactérias de ácido láctico seleccionadas do grupo que consiste em bactérias de ácido láctico das espécies *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum* e suas combinações. O agente antialérgico é capaz de melhorar a diátese alérgica por redução do nível de IgE, o qual contribui para o desenvolvimento de alergia de Tipo I, e é fácil de tomar e altamente seguro. A presente invenção também proporciona a utilização do agente antialérgico para a redução de alergia e um método para a redução de alergia usando o agente antialérgico.

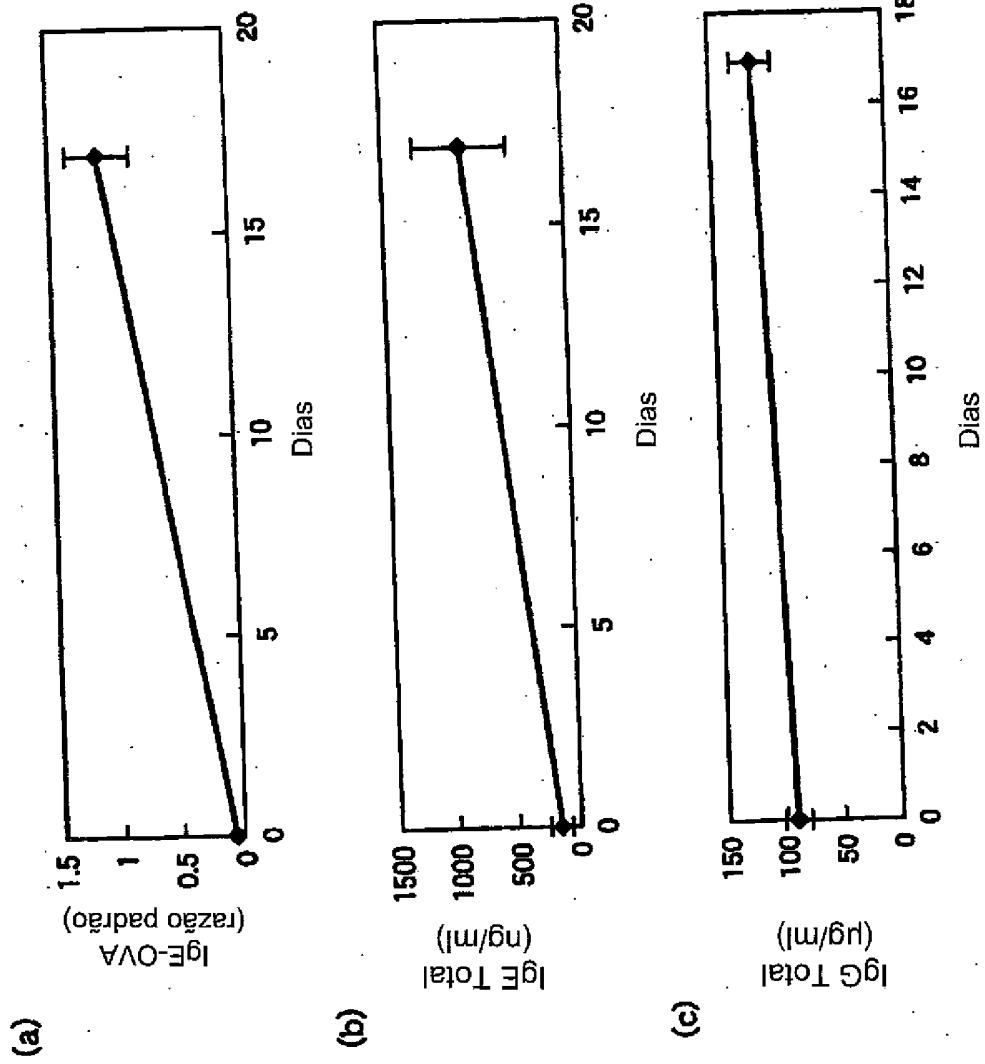
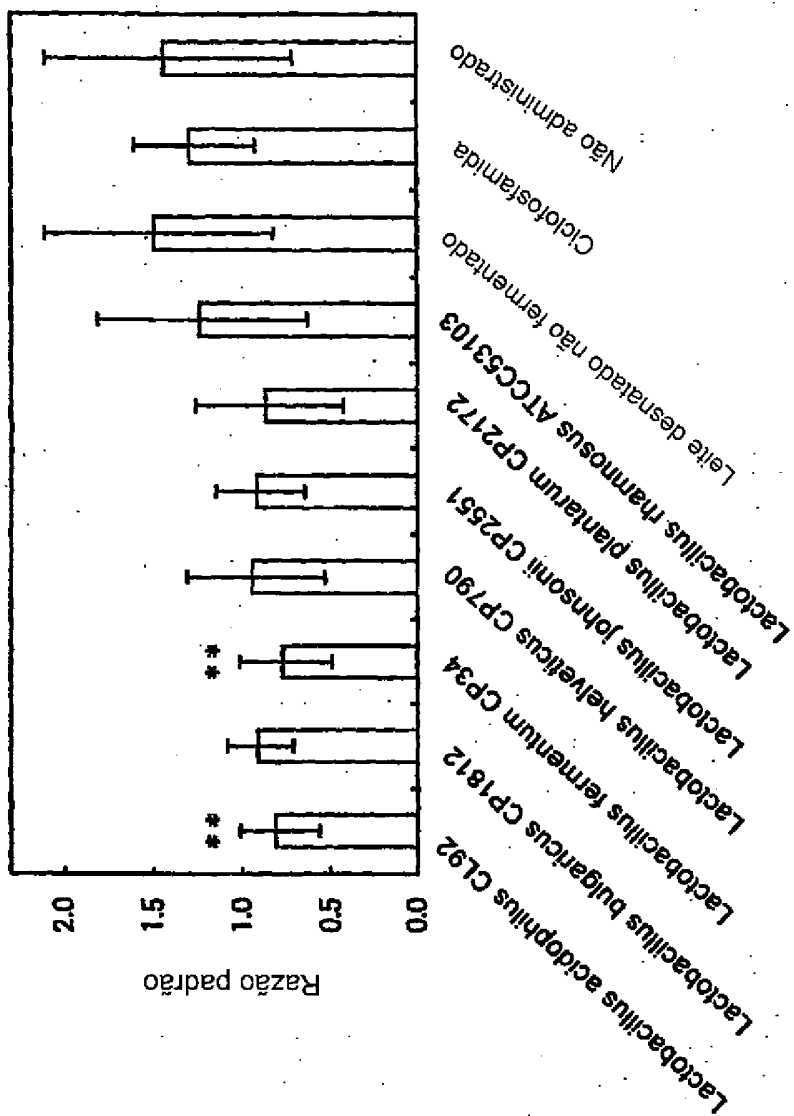
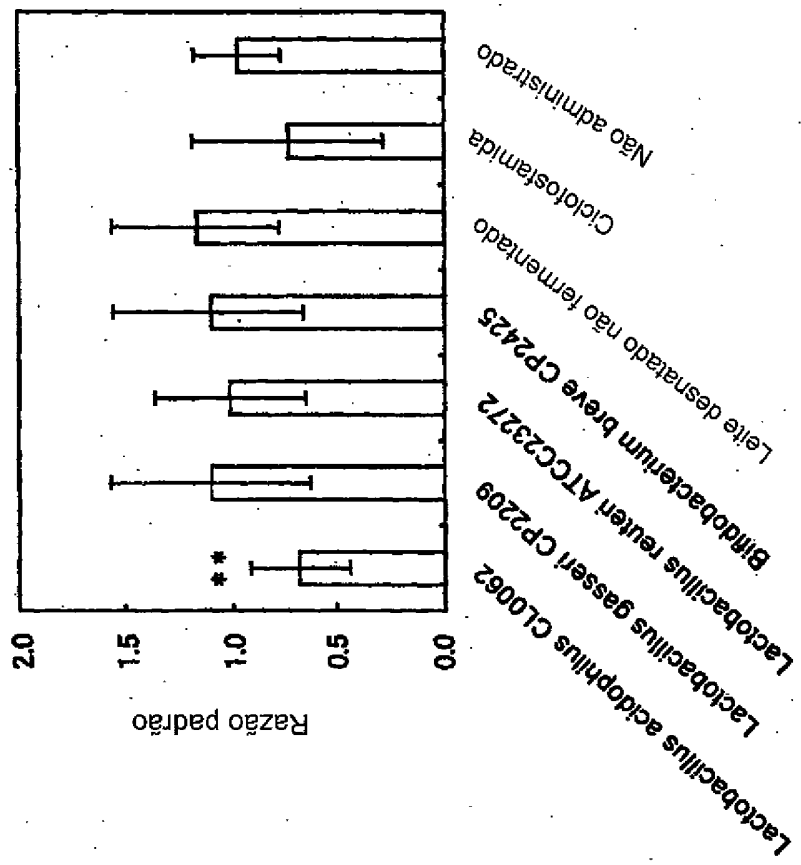


Fig. 1



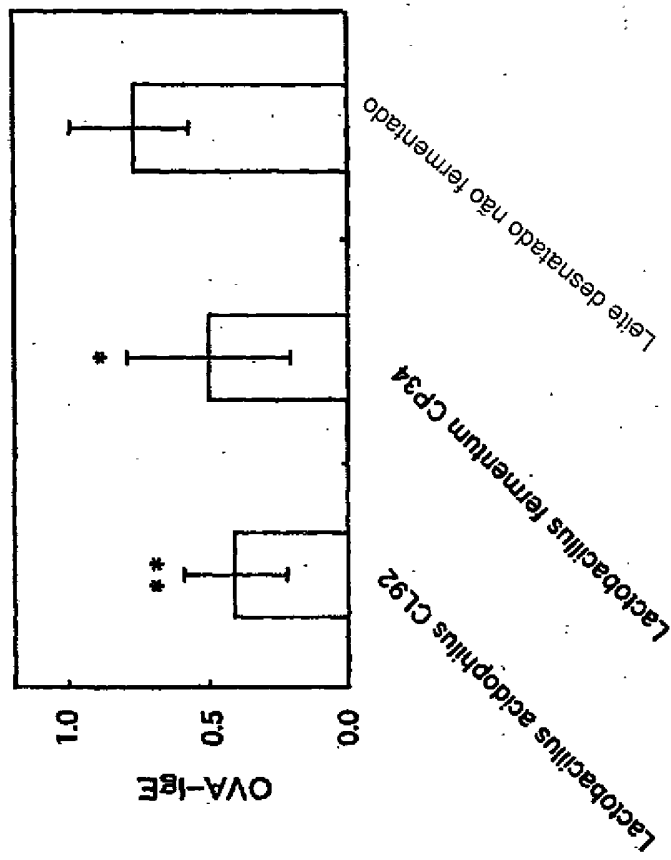
** p<0,01 relativamente ao leite desnatado não fermentado

Fig. 2



** p<0,01 relativamente ao leite desnatado não fermentado

Fig. 3



** p<0,5 relativamente ao leite desnatado não fermentado

** p<0,01 relativamente ao leite desnatado não fermentado

Fig. 4

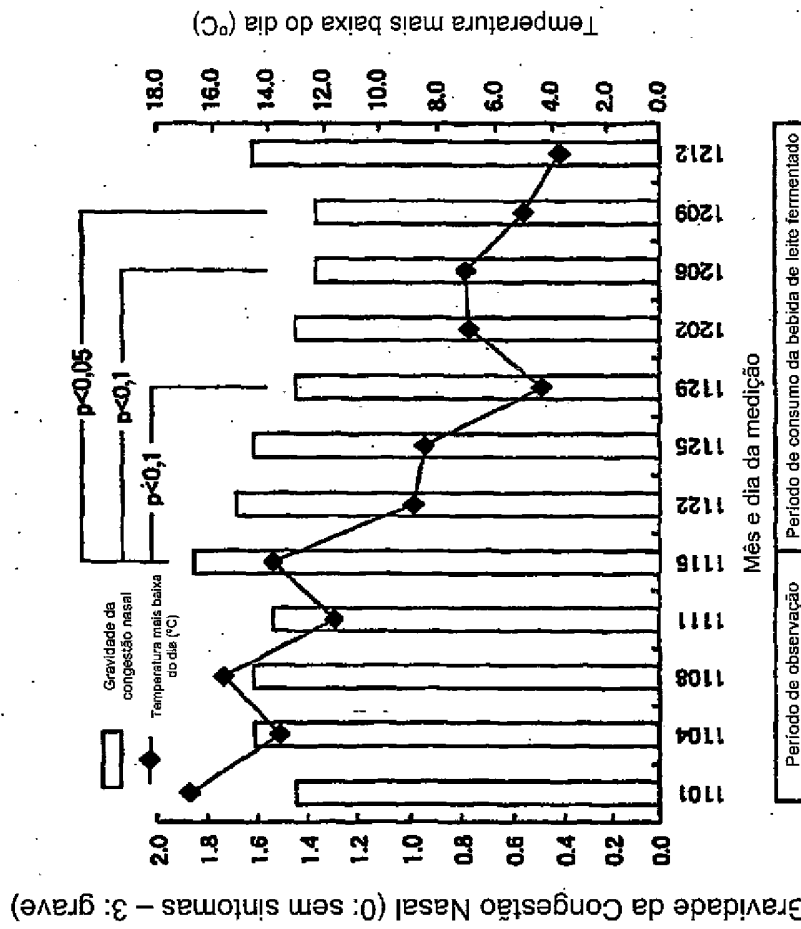


Fig. 5

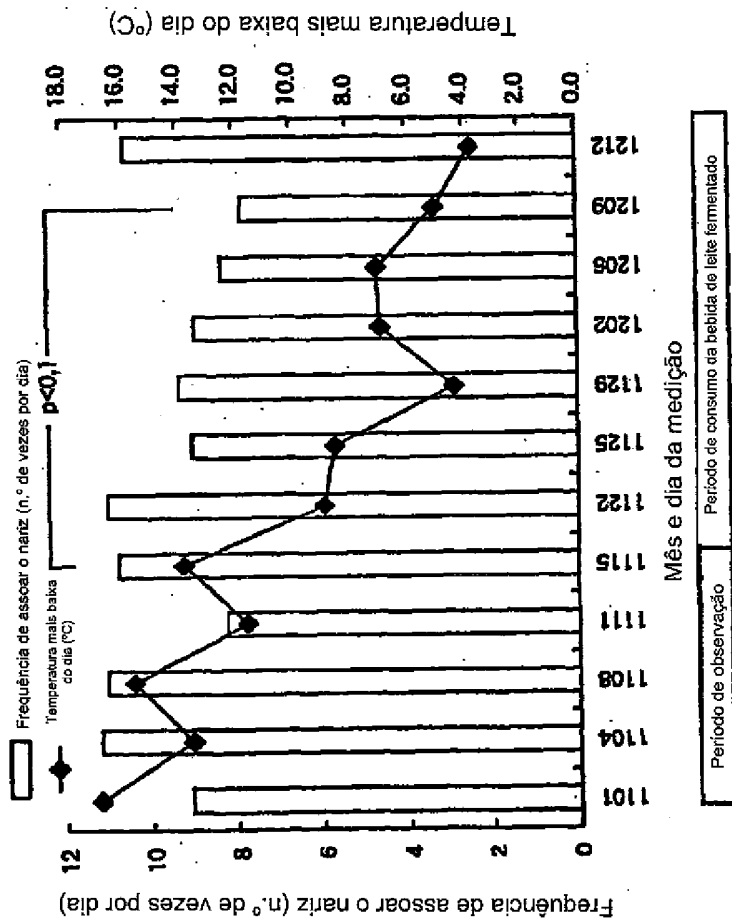


Fig. 6