



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2010154397/10, 19.05.2009

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
19.05.2009

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
11.06.2008 EP 08010641.2

(43) Дата публикации заявки: 20.07.2012 Бюл. № 20

(45) Опубликовано: 10.05.2014 Бюл. № 13

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: WO 2006022471 A1, 02.03.2006. WO 9907826 A1, 18.02.1999. BENTHIN S ET AL. Amino acid utilization by Lactococcus lactis subsp. cremoris FD1 during growth on yeast extract or casein peptone. // Journal of Applied Bacteriology, vol. 80, no. 1, pp. 65-72, 1996. GAUDREAU H. ET AL. The use of crude cellular extracts of Lactobacillus delbrueckii ssp. (см. прод.)

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 11.01.2011

(86) Заявка РСТ:
EP 2009/003586 (19.05.2009)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2009/149816 (17.12.2009)

Адрес для переписки:
105064, Москва, а/я 88, "Патентные поверенные
Квашнин, Сапельников и партнеры"

(72) Автор(ы):

БЕТТНЕР Мевес (DE),
ЛАНГ Кристине (DE),
ФЕЕН Маркус (DE),
ШИЛЛИНГ Михаэль (DE),
РАЙНДЛ Андреас (DE)

(73) Патентообладатель(и):
БАСФ СЕ (DE)

(54) СРЕДСТВО (ВАРИАНТЫ), КОМПОЗИЦИЯ (ВАРИАНТЫ) И ПРИМЕНЕНИЕ СРЕДСТВА (ВАРИАНТЫ) ДЛЯ СНИЖЕНИЯ НЕПРИЯТНОГО ЗАПАХА ИЗО РТА

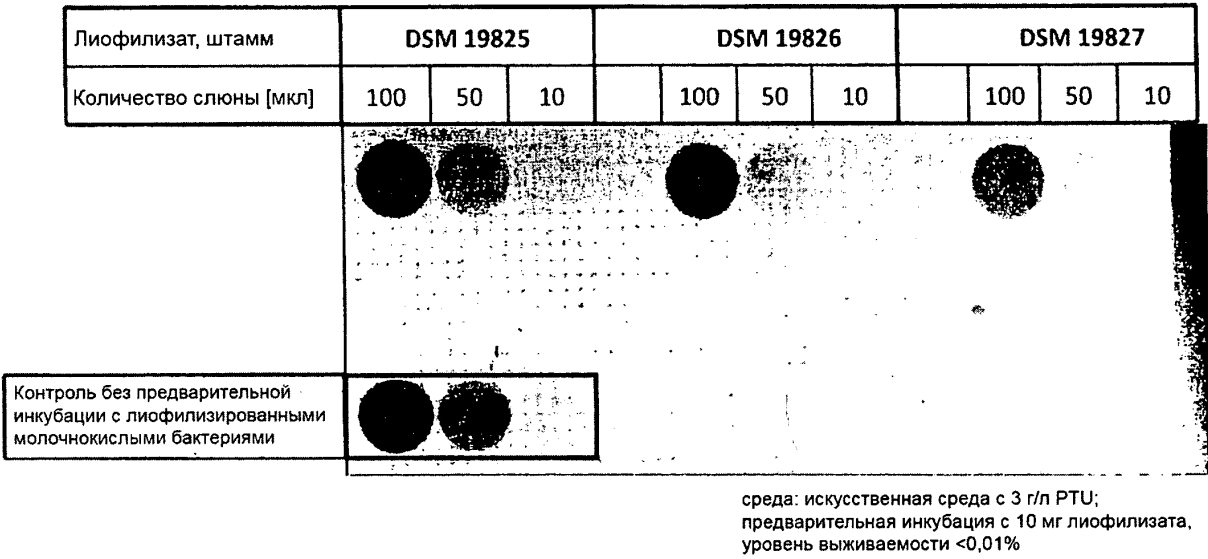
(57) Реферат:

Изобретение относится к вариантам средства для снижения неприятного запаха изо рта, вариантам композиций на основе указанных средств и вариантам применения указанных средств. Средство для снижения неприятного запаха изо рта представляет собой штаммы микроорганизмов Lactobacillus acidophilus, выбранные из группы Lactobacillus acidophilus

DSM 19825, Lactobacillus acidophilus DSM 19826 и Lactobacillus acidophilus DSM 19827. Вариант указанного средства представляет собой культуральный супернатант указанных штаммов. Также предложены композиции, содержащие указанные микроорганизмы, их применение для снижения неприятного запаха изо рта. Изобретение позволяет существенно снижать

концентрацию пептидов в слюне, тем самым исчерпывая субстрат, используемый анаэробными микроорганизмами микрофлоры полости рта,

которые являются агентами, вызывающими неприятный запах изо рта. 6 н. и 4 з.п. ф-лы, 7 ил., 19 пр.



Фиг. 1

(56) (продолжение):
bulgaricus 11842 to stimulate growth of a probiotic Lactobacillus rhamnosus culture in milk // Enzyme and Microbial Technology, vol. 36, no. 1, pp. 83-90, 2005. ШЕНДЕРОВ Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. Том II. Социально-экологические и клинические последствия дисбаланса микробной экологии человека и животных. М.: Издательство "ГРАНТЬ", 1998, с. 272-281

RU 2 5 1 5 1 1 3 C 2

RU 2 5 1 5 1 1 3 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 515 113** (13) **C2**

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

A61K 35/74 (2006.01)

A61K 8/99 (2006.01)

C12R 1/23 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: 2010154397/10, 19.05.2009

(24) Effective date for property rights:
19.05.2009

Priority:

(30) Convention priority:
11.06.2008 EP 08010641.2

(43) Application published: 20.07.2012 Bull. № 20

(45) Date of publication: 10.05.2014 Bull. № 13

(85) Commencement of national phase: 11.01.2011

(86) PCT application:
EP 2009/003586 (19.05.2009)

(87) PCT publication:
WO 2009/149816 (17.12.2009)

Mail address:

105064, Moskva, a/ja 88, "Patentnye poverennye
Kvashnin, Sapel'nikov i partnery"

(72) Inventor(s):

**BETTNER Meves (DE),
LANG Kristine (DE),
FEEN Markus (DE),
SHILLING Mikhaehl' (DE),
RAJNDL Andreas (DE)**

(73) Proprietor(s):

BASF SE (DE)

(54) MEDICATION (VERSIONS), COMPOSITION (VERSIONS) AND APPLICATION OF MEDICATION (VERSIONS) FOR REDUCTION OF HALITOSIS

(57) Abstract:

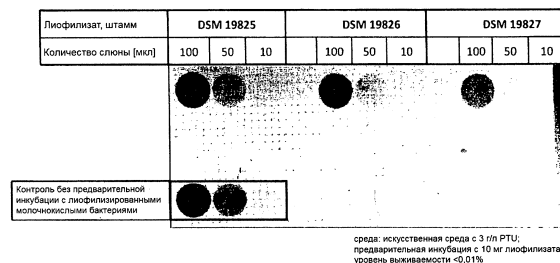
FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention relates to versions of medication for reduction of halitosis, versions of compositions based on said medications and versions of application of said medications. Device for reduction of halitosis represents strains of microorganisms *Lactobacillus acidophilus*, selected from group *Lactobacillus acidophilus* DSM 19825, *Lactobacillus acidophilus* DSM 19826 and *Lactobacillus acidophilus* DSM 19827. Version of said medication represents culture supernatant of said strains. Also claimed are compositions, which contain said microorganisms, and their application for reduction of halitosis.

EFFECT: invention makes it possible to consider-

ably reduce concentration of peptides in saliva, depleting in this way substrate, used by anaerobic microorganisms of oral cavity microflora, which are halitosis-causing agents.

10 cl, 7 dwg, 19 ex



Фиг. 1

Настоящее изобретение относится к микроорганизму, принадлежащему к группе молочнокислых бактерий, который способен существенно снижать концентрацию пептидов в слюне, тем самым исчерпывая субстрат, используемый анаэробными микроорганизмами микрофлоры ротовой полости, которые являются агентами, вызывающими неприятный запах изо рта. Более того, описанный микроорганизм принадлежит к группе молочнокислых бактерий, которая способна стимулировать рост *Streptococcus salivarius*, но не стимулирует рост *Streptococcus mutans* и/или *Porphyromonas gingivalis*.

Настоящее изобретение также относится к композициям, содержащим вышеупомянутые микроорганизмы, их применению для предотвращения и/или лечения неприятного запаха изо рта и/или халитоза, и способам предотвращения и/или лечения неприятного запаха изо рта и/или халитоза.

Обычной проблемой в области гигиены рта является хроническое плохое дыхание (дурной запах). Широко распространенный способ лечения халитоза заключается в маскировке или нейтрализации плохого запаха с помощью использования ополаскивателей для рта или жевательных резинок, которые содержат, например, ментол. Однако эти способы эффективны только на короткий период и не эффективны на длительный срок. Следовательно, существует необходимость в способах предотвращения или лечения халитоза, помогающих на длительный период. Эта проблема решалась в уровне техники различными способами, все из которых в большей или меньшей степени стремятся к уменьшению количества анаэробных бактерий, которые продуцируют «летучие соединения серы» (ЛСС), такие как сероводород и метил меркаптан, например.

Один описанный способ снижения указанных бактерий заключается в удалении налета с языка с помощью скребка, для того чтобы устранить с языка субстраты для размножения бактерий. Другой способ заключается в лечении языка солью металла, таким как хлорид цинка, или дезинфицирующим средством, таким как спирт или хлоргексидин. Однако недостаток этих способов в том, что соль металла и дезинфицирующее средство также ингибируют рост других безвредных или даже благотворных микроорганизмов полости рта.

Один подход к лечению и предотвращению халитоза, который был описан, заключается в поддержании pH слюны на физиологически нормальном уровне. Известно, что разновидности микробов, ассоциированные с кариесом и инфекциями слизистой оболочки, благоприятствуют развитию кислой среды; разновидности микробов, ассоциированные с развитием пародонтальной болезни, благоприятствуют развитию pH выше нормальной, в то время как разновидности микробов, ассоциированные с хорошим здоровьем полости рта, благоприятствуют развитию нейтральной pH. Композиции, содержащие пробиотические бактерии (например, *Lactobacillus* и *Streptococcus*), которые используют этот механизм, раскрыты в заявках на патент США US 200707137 и US 2006018843. Международная заявка на патент W0 2007/077210 раскрывает метод восстановления оральной микрофлоры, ассоциированной с хорошим здоровьем полости рта, который использует пробиотики, слабо продуцирующие или не продуцирующие кислоту, выбранные из группы быстро колонизирующих бактерий полости рта, которые в норме присутствуют в здоровой микрофлоре полости рта (например, *Streptococcus (oralis)*, *Eubacterium*, *Neisseria*, *Veillonella*) в совокупности с веществами, имеющими pH-поднимающие или pH-буферные вещества (например, бикарбонаты, карбамиды, фосфаты, белки и/или соли). Заявка на патент США US 2006045870 раскрывает живые кисломолочные бактерии, принадлежащие к

роду *Weisella*, которые ингибируют рост ЛСС-продуцирующих бактерий путем взаимодействия с ними и вырабатывания перекиси водорода в аэробных и анаэробных условиях. Заявка на патент США US 2006171901 раскрывает другой способ подавления роста аэробных бактерий, особенно бактерий, вызывающих халитоз, который включает

5 БПИВ (бактериоцин-подобные ингибирующие вещества) - продуцирующие штаммы *Streptococcus salivarius* и их экстракты.

Недостаток способов, доступных для предотвращения и лечения халитоза, заключается в том, что большинство из этих способов ингибируют не только рост ЛСС-продуцирующих бактерий, которые считаются главной причиной неприятного

10 запаха изо рта, но они также ингибируют рост других безвредных микроорганизмов полости рта.

Поэтому задача настоящего изобретения заключается в обеспечении альтернативных средств и способов профилактики и/или лечения неприятного запаха изо рта и/или халитоза.

15 Соответственно, первый объект настоящего изобретения относится к микроорганизму, принадлежащему к группе кисломолочных бактерий, характеризующему тем, что проявляет следующее свойство (б), когда подвергается следующему анализу (а):

Анализ (а):

20 (а) микроорганизм культивируют в течение 24 часов при 37°C в анаэробных условиях в искусственной среде, содержащей 15 г/л пептидов с исходной плотностью клеток $1 \cdot 10^7$ клеток/мл;

(б) клетки удаляют центрифугированием при 4000·g в течение 15 мин; и

(в) определяют концентрацию пептидов в получаемом супернатанте.

25 Свойство (б):

Микроорганизм приводит к снижению концентрации пептидов в культуральной среде настолько, что концентрация пептидов в супернатанте после инкубации в течение 24 часов снижается, по меньшей мере, на 20% по сравнению с исходной концентрацией 15 г/л, т.е. микроорганизм способен снижать концентрацию пептидов в среде в анализе

30 (а), по меньшей мере, на 20%.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения микроорганизм согласно изобретению дополнительно проявляет следующее свойство (Б), когда подвергается следующему анализу (А):

35 (а) микроорганизм культивируют в 100 мл искусственной среды при 37°C в течение 24 часов в анаэробных условиях с исходной плотностью клеток $1 \cdot 10^7$ клеток/мл;

(б) затем клетки центрифугируют при 4000·g в течение 15 мин и ресуспендируют в 20 мл H₂O;

40 (в) 10 мг лиофилизированных бактерий ресуспендируют в H₂O и центрифугируют при 4000·g в течение 10 мин;

(г) 1 мл искусственной среды, содержащей 7 г/л пептидов, добавляют к осадку, клетки ресуспендируют в среде и после 5 мин аэробной инкубации при 37°C клетки удаляют центрифугированием при 4000·g в течение 15 мин; и

(д) определяют концентрацию пептидов в получаемом супернатанте среды.

45 Свойство (Б): лиофилизированные бактерии приводят к снижению концентрации пептидов в получаемом супернатанте среды, по меньшей мере, на 20% по сравнению с концентрацией среды на момент начала инкубационного периода (7 г/л).

В предпочтительном варианте осуществления изобретения концентрация пептидов

в анализе (а) или (А) снижается с помощью микроорганизма согласно изобретению, по меньшей мере, на 30%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 40% и еще более предпочтительно, по меньшей мере, на 50%.

В особо предпочтительном варианте осуществления изобретения микроорганизм согласно изобретению способен снижать концентрацию пептидов в анализе (А), по меньшей мере, на 60% и еще более предпочтительно, по меньшей мере, на 70%.

Таким образом, настоящее изобретение обеспечивает микроорганизм, который может эффективно снижать концентрацию пептидов в окружающей его среде, в частности также в слюне, так как это описано в прилагаемых примерах. Как известно, неприятный запах изо рта вызван явлением, при котором отношение между здоровой флорой полости рта (сформированной, в основном, *Streptococcus salivarius*) и патогенной флорой полости рта (сформированной, в основном, анаэробными грамотрицательными бактериями) сдвинуто в сторону анаэробных грамотрицательных бактерий, которые разлагают белки, присутствующие в слюне, до летучих соединений. Это приводит к образованию летучих соединений серы, которые вызывают неприятный запах изо рта.

Микроорганизм настоящего изобретения способен уменьшать неприятный запах изо рта за счет снижения количества пептидов и, вследствие этого, истощения субстрата анаэробных грамотрицательных бактерий флоры ротовой полости.

Термин «искусственная среда» относится к химически заданной среде, то есть к среде, химический состав которой известен. Искусственная среда может быть любой искусственной средой, подходящей для культивирования данного микроорганизма. В одном предпочтительном варианте осуществления изобретения искусственная среда является такой искусственной средой, как раскрыта в патенте США US 6,340,585.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения искусственная среда является средой со следующим составом:

	Гуанин:	0,1 г/л
	Цитозин:	0,1 г/л
	Тимидин:	0,1 г/л
	2'-Деоксиаденозин:	0,1 г/л
30	2'-Деоксиуридин:	0,1 г/л
	K ₂ HPO ₄ :	2 г/л
	Натрия ацетат:	5 г/л
	MgSO ₄ -гептагидрат:	0,1 г/л
	Диаммония гидроцитрат:	2 г/л
	CaCl ₂ -дигидрат:	0,5 г/л
35	Олеиновая кислота:	0,1% (масса / объем)
	Цианокобаламин:	0,02 мг/л
	Рибофлавин:	10 мг/л
	Фолиевая кислота:	0,2 мг/л
	Пиридоксал-5-фосфат-моногидрат:	10 мг/л
	4-Аминобензойная кислота:	0,2 мг/л
40	D (+)-Биотин:	1 мг/л
	Аскорбиновая кислота:	500 мг/л
	Никотиновая кислота:	10 мг/л
	Са-пантотенат:	10 мг/л
	Тиамин:	1 мг/л
	Кобальт(II)-Нитрат-Гексагидрат:	500 мг/л
45	MnSO ₄ -моногидрат:	20 мг/л
	MnSO ₄ -гептагидрат:	500 мг/л
	Na ₂ MoO ₄ :	0,04 мг/л
	Экстракт PTU (Ohj, Deutsche	15 г/л (или как указано в данном

Hefewerke, Germany):
D-Глюкозы моногидрат:

случае)
10 г/л

Термин «содержащий 15 г/л пептидов» (или «содержащий 7 г/л пептидов») означает, что искусственная среда на момент начала инкубационного периода содержит 15 г/л пептидов (или 7 г/л пептидов соответственно). В принципе, пептиды могут быть любыми пептидами. В предпочтительном варианте осуществления изобретения пептиды, содержащиеся в искусственной среде, находятся в форме дрожжевого экстракта, предпочтительно экстракта PTU. Экстракт PTU (пептидный ультрафильтрованный экстракт) можно приобрести в Ohly, Deutsche Hefewerke, Germany. Это ультрафильтрованный низкосолевого дрожжевого экстракт с высоким содержанием легкодоступных пептидов и предпочтительно он обладает следующими характеристиками:

Усредненный анализ:

15	Сухой материал:	96%
	Белок (N×6,25) в сухом материале:	72,9%
	Полный азот в сухом материале:	11,7%
	NaCl:	≤ 1,0%
	Зола:	10%
	pH (в 2% растворе):	5,7

Витамины (типичные):

	Тиамингидрохлорид×HCl (B1):	1,2 мг/100 г
	Рибофлавин (B2):	7,0 мг/100 г
	Пиридоксин×HCl (B6):	5,9 мг/100 г
	Никотиновая кислота:	47,8 мг/100 г
25	Биотин:	0,022 мг/100 г
	Ca-D-Пантотенат:	17,9 мг/100 г
	Фолевая кислота:	3,7 мг/100 г
	Аминокислотный профиль (типичный):	как показано на Фигуре 7

Термин «исходная плотность клеток в клетках/мл» означает, что искусственная среда инокулируется в начале периода культивирования микроорганизмом, так чтобы в среде находилось $1 \cdot 10^7$ клеток/мл.

Концентрацию пептидов можно определить любым известным специалисту в данной области способом. Хорошо изученными способами являются, например, биуретовый способ, способ Лоури, способ Бредфорда. Более того, можно использовать любой имеющийся в продаже набор или другую систему для определения концентрации пептидов. Одним предпочтительным примером являются системы или наборы, основанные на флуоресцентных красителях, такие как набор Quant-it Protein фирмы Invitrogen.

Снижение концентрации пептидов в вышеупомянутых анализах (a) и/или (A) предпочтительно исследуется так, как описано в прилагаемых Примерах.

Как показано в прилагаемых Примерах, неожиданно было обнаружено, что молочнокислые бактерии могут проявлять способность существенно снижать в окружающей их среде концентрацию пептидов. Это эффект проявляется не только с живыми бактериями, но также с их лиофилизированными формами. Более того, в Примерах показано, что микроорганизмы согласно изобретению проявляют вышеупомянутый эффект не только в описанных выше анализах, но также в слюне, и что присутствие микроорганизма согласно изобретению приводит к значительному снижению продуцирования H_2S при добавлении в слюну.

В частности, в предпочтительном варианте осуществления изобретения микроорганизм согласно изобретению также проявляет следующее свойство (г), когда подвергается следующему анализу (в):

Анализ (в):

5 (а) микроорганизм культивируют в 100 мл искусственной среды при 37°C в течение 24 часов в анаэробных условиях с исходной плотностью клеток $1 \cdot 10^7$ клеток/мл;

(б) затем клетки центрифугируют при 4000·g в течение 15 мин и ресуспендируют в 20 мл H₂O;

10 (в) затем клетки замораживают до -80°C и лиофилизируют в вакууме в течение 16 часов;

(г) 10 мг лиофилизированных бактерий ресуспендируют в H₂O в глубоколоночном планшете и центрифугируют при 4000·g в течение 10 мин;

15 (д) 1 мл искусственной среды, содержащей 3 г/л пептидов, добавляют к осадку, образовавшемуся после центрифугирования, и после 5 мин инкубации при 37°C клетки удаляют центрифугированием при 4000·g в течение 15 мин;

(е) супернатант затем переносят в новый глубоколоночный планшет и далее инокулируют от 10 до 100 мкл, предпочтительно 50 мкл, нестерильной человеческой слюны и инкубируют в анаэробных условиях в течение 6 часов при 37°C, в то время как глубоколоночный планшет накрывают стерильной фильтровальной бумагой, пропитанной ацетатом свинца;

(ж) продуцирование микроорганизмами сероводорода в реакции контролируют отслеживанием почернения фильтровальной бумаги.

25 Свойство (г): в присутствии микроорганизма согласно изобретению почернение фильтровальной бумаги, пропитанной ацетатом свинца, снижается по сравнению с контролем, в котором среда не была предварительно инкубирована с указанным микроорганизмом. Сниженное почернение фильтровальной бумаги является показателем сниженного продуцирования H₂S бактериями, содержащимися в нестерильной человеческой слюне, используемой для инокуляции среды.

30 Термин «сниженное продуцирование H₂S» означает снижение продуцирования H₂S, по меньшей мере, на 10%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 20%, еще более предпочтительно, по меньшей мере, на 30% и особенно предпочтительно, по меньшей мере, на 40% или даже, по меньшей мере, на 50% по сравнению с контролем. Снижение можно измерить, например, с помощью денситометрического анализа почернения 35 фильтровальной бумаги. В альтернативном варианте, продуцирование сульфида водорода в шагах (е) и (ж) не определяют с использованием фильтровальной бумаги, а измеряют с помощью парофазного анализа, используя газовую хроматографию.

Второй объект настоящего изобретения также относится к микроорганизму, принадлежащему к группе молочнокислых бактерий, характеризующему тем, что 40 способен стимулировать рост *Streptococcus salivarius*, но не стимулировать рост *Streptococcus mutans* и/или *Porphyromonas gingivalis*.

Термин «стимулировать» в отношении роста микроорганизмов вида *Streptococcus salivarius* означает, что рост этих микроорганизмов увеличивается при контакте с микроорганизмом согласно изобретению. Увеличенный рост предпочтительно означает 45 рост пролиферации, т.е. клеточных делений в единицу времени. В качестве альтернативы, термин «стимулировать» также относится к росту отдельных клеток в размерах. Размер бактериальной клетки может быть оценен с помощью проточной цитометрии (например, проточный цитометр Becton-Dickinson FACSort, San Jose, CA) после окрашивания с

красителем SYBR Green I (Molecular Probes, USA). Размер бактериальной клетки оценивают в режиме Side-Angle Light Scatter (SSC). Увеличенный рост, таким образом, означает рост продуцирования биомассы в единицу времени.

5 Стимулирование роста соответствующего микроорганизма предпочтительно можно наблюдать *in vitro*, более предпочтительно в анализе, в котором микроорганизм согласно изобретению контактирует со *Streptococcus salivarius* и определяется рост *Streptococcus salivarius*. Рост можно определить с помощью подсчета количества клеток/колоний после различных интервалов времени инкубации и сравнить с контролем, который не содержит микроорганизм согласно изобретению, тем самым позволяя узнать, есть ли
10 увеличение роста.

Анализ *in vitro* для определения стимулирования роста описывается в Примерах и содержит так называемый «Фотометрический соинкубационный анализ». Вкратце такой анализ содержит следующие шаги:

(а) микроорганизм, принадлежащий к группе молочнокислых бактерий, который
15 будет тестироваться, смешивают со *Streptococcus salivarius* в соотношении клеток 1:100 (молочнокислые бактерии: *Streptococcus salivarius*) в $1/2$ триптиказосоевой среды с дрожжевым экстрактом (TSY среда, trypticase soy yeast extract);

(б) культуральную суспензию инкубируют в аэробных условиях в течение 12 часов при 37°C;
20

(в) в качестве контроля используют неизрасходованную $1/2$ среды TSY или облегченную среду MRS;

(г) определяют максимальную оптическую плотность ($OD_{600, \max}$) и/или определяют
25 максимальную скорость роста ($V_{\max}$) во время экспоненциального роста; и

(д) микроорганизм классифицируют как микроорганизм, способный стимулировать
30 рост *Streptococcus salivarius*, если максимальная оптическая плотность ($OD_{600, \max}$) и/или максимальная скорость роста ($V_{\max}$) увеличивается, по меньшей мере, на 10% по сравнению с контролем.

Термин « $1/2$ среды TSY» относится к TSY среде, которая разбавлена H_2O в соотношении 1:1 (об.: об.).

В предпочтительном варианте осуществления изобретения инкубация осуществляется в 96-луночной планшете. В другом предпочтительном варианте осуществления
35 изобретения инкубация осуществляется в микропланшетном спектрофотометре Bio Tek PowerWave (Biotek Instruments GmbH, Germany).

Предпочтительно $OD_{600, \max}$ и $V_{\max}$ определяют следующим образом.

Оптическую плотность OD при 600 нм измеряют в течение расширенного периода времени, предпочтительно около от 8 до 12 часов, после начала инкубации через
40 равномерные интервалы, например каждые 2,5 минуты. Для определения $OD_{600, \max}$ предпочтительно проводят инкубацию в течение 10 часов.

Для определения значения $OD_{600, \max}$ вычисляют среднее значение из трех наибольших измеренных значений.

Значение $V_{\max}$ предпочтительно определяют, выбирая 15 последовательных значений,
45 которые показывают самый крутой градиент. Единицей, показывающей $V_{\max}$, является мОП/мин (единиц миллиоптической плотности в минуту). Определение $OD_{600, \max}$ для вычисления $V_{\max}$ предпочтительно проводят в течение периода времени, которое

позволяет охватить фазу экспоненциального роста культивируемого микроорганизма.

Предпочтительно микроорганизм согласно изобретению приводит к росту максимальной оптической плотности ($OD_{600, \max}$) или максимальной скорости роста ($V_{\max}$) *Streptococcus salivarius* в описанном выше анализе, по меньшей мере, на 15%,
 5 более предпочтительно, по меньшей мере, на 20%, еще более предпочтительно, по меньшей мере, на 30% и особенно предпочтительно, по меньшей мере, на 40%, 50%, 60%, 70% и даже 80% по сравнению с контролем.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения описанный выше
 10 микроорганизм согласно изобретению не только стимулирует рост *Streptococcus salivarius*, но также стимулирует рост по меньшей мере одного другого микроорганизма здоровой микрофлоры полости рта. Примерами таких микроорганизмов являются *Streptococcus oralis* и *Streptococcus epidermidis*. Стимулирование этих бактерий можно измерить с помощью описанного выше анализа.

Описанный выше микроорганизм согласно изобретению также характеризуется тем,
 15 что не стимулирует рост *Streptococcus mutans* и/или *Porphyromonas gingivalis*.

Микроорганизм считается не стимулирующим рост микроорганизма транзитной патогенной микрофлоры, если он не приводит к увеличенному росту *Streptococcus mutans* и/или *Porphyromonas gingivalis* при контакте с ними. Стимулирование роста или его
 20 отсутствие можно исследовать *in vitro*. Анализ *in vitro* для определения стимулирования роста или его отсутствия описывается в Примерах и содержит так называемый «Фотометрический соинкубационный анализ». Вкратце, такой анализ в случае *Streptococcus mutans* содержит следующие шаги:

(а) микроорганизм, принадлежащий к группе молочнокислых бактерий, который
 25 будет тестироваться, культивируют в анаэробных условиях в 96-луночном планшете со 150 мкл искусственной среды в течение 24 часов при 37°C, клетки осаждают центрифугированием при 4000·g в течение 15 мин и восстанавливают супернатант;

(б) *Streptococcus mutans* культивируют в анаэробных условиях в 5 мл TSY среды в закрытых 15-миллилитровых пробирках Falcon в течение ночи при 37°C;

(в) культуру клеток *Streptococcus mutans* смешивают в объемном соотношении 2:1 с
 30 супернатантом с шага (а);

(г) культуральную суспензию инкубируют в аэробных условиях в течение 12 часов при 37°C;

(д) в качестве контроля используют неизрасходованную $1/2$ среды TSY или
 35 облегченную среду MRS;

(е) определяют максимальную оптическую плотность ($OD_{600, \max}$) и/или определяют максимальную скорость роста ($V_{\max}$) во время экспоненциального роста; и

(ж) микроорганизм классифицируют как микроорганизм, неспособный стимулировать
 40 рост *Streptococcus mutans*, если максимальная оптическая плотность ($OD_{600, \max}$) и/или максимальная скорость роста ($V_{\max}$) не увеличивается по сравнению с контролем.

В альтернативном варианте, такой анализ может содержать следующие шаги:

(А) тестируемый микроорганизм, принадлежащий к группе молочнокислых бактерий, смешивают со *Streptococcus salivarius* в соотношении клеток 1:100 (*lactobacillus*: *S. mutans*)
 45 в $1/2$ среды TSY;

(Б) культуральную суспензию инкубируют в аэробных условиях в течение 12 часов при 37°C;

(В) в качестве контроля используют неизрасходованную $1/2$ среды TSY или облебченную среду MRS;

(Г) определяют максимальную оптическую плотность ($OD_{600, \max}$) и/или определяют
5 максимальную скорость роста ($V_{\max}$) во время экспоненциального роста; и

(Д) микроорганизм классифицируют как микроорганизм, неспособный стимулировать рост *Streptococcus mutans*, если максимальная оптическая плотность ($OD_{600, \max}$) и/или максимальная скорость роста ($V_{\max}$) не увеличивается по сравнению с контролем.

В случае *Porphyromonas gingivalis* анализ содержит следующие шаги:

(з) тестируемый микроорганизм, принадлежащий к группе молочнокислых бактерий, культивируется в анаэробных условиях в 96-луночном планшете со 150 мкл искусственной среды в течение 24 часов при 37°C, клетки осаждают центрифугированием при 4000·g в течение 15 мин и восстанавливают супернатант;

(и) *Porphyromonas gingivalis* культивируют в анаэробных условиях в 5 мл среды FAB в закрытых 15-миллилитровых пробирках Falcon в течение ночи при 37°C;

(к) культуру клеток *Porphyromonas gingivalis* смешивают в объемном соотношении 2:1 с супернатантом с шага (з);

(л) культуральную суспензию инкубируют в аэробных условиях в течение 45 часов при 37°C;

(м) в качестве контроля используют неизрасходованную среду FAB;

(н) определяют оптическую плотность (OD_{600}) после 10, 15, 21, 39 и 45 часов инкубации; и

(о) микроорганизм классифицируют как микроорганизм, неспособный стимулировать рост *Porphyromonas gingivalis*, если оптическая плотность (OD_{600}) в каждый момент измерения не увеличивается по сравнению с контролем.

В альтернативном варианте, такой анализ содержит следующие шаги:

(З) тестируемый микроорганизм, принадлежащий к группе молочнокислых бактерий, смешивают с *Porphyromonas gingivalis* в соотношении клеток 1:100 (*lactobacillus*: *P. gingivalis*) в среде FAB;

(И) культуральную суспензию инкубируют в аэробных условиях в течение 45 часов при 37°C;

(К) в качестве контроля используют неизрасходованную среду FAB;

(Л) определяют максимальную оптическую плотность ($OD_{600, \max}$) и/или определяют
35 максимальную скорость роста ($V_{\max}$) во время экспоненциального роста; и

(М) микроорганизм классифицируют как микроорганизм, неспособный стимулировать рост *Porphyromonas gingivalis*, если максимальная оптическая плотность ($OD_{600, \max}$) и/или максимальная скорость роста ($V_{\max}$) не увеличивается по сравнению с контролем.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения инкубацию в шагах (г) и (Б) осуществляют в 96-луночном планшете. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения инкубацию осуществляют в микропланшетном спектрофотометре Bio Tek PowerWave (Fa Biotek Instruments GmbH, Germany).

В предпочтительном варианте осуществления изобретения инкубацию в шагах (л) и (И) осуществляют в 96-луночном планшете. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения инкубацию осуществляют в анаэробной рабочей станции Whitley DG250 (Meintrup-DWS, Germany).

По отношению к $OD_{600, \max}$ и $V_{\max}$ применяется то же самое, что было

сформулировано здесь выше.

Микроорганизм считается не стимулирующим рост микроорганизма *Streptococcus mutans* или *Porphyromonas gingivalis*, если рост не увеличивается или только слегка увеличивается при контакте с микроорганизмом. «Слегка увеличивается» означает, что рост увеличивается не более чем на 5% по сравнению с контролем, более предпочтительно не более чем на 2% по сравнению с контролем. Термин «не увеличивается» означает, что не может быть обнаружено никакого статистически значимого различия между ростом *Streptococcus mutans* или *Porphyromonas gingivalis* при контакте с микроорганизмом изобретения по сравнению с контролем, где отсутствует микроорганизм изобретения. Термин «не увеличивается» в предпочтительном варианте осуществления изобретения также включает те случаи, когда микроорганизм фактически приводит к снижению роста *Streptococcus mutans* или *Porphyromonas gingivalis*, т.е. когда он подавляет рост такого микроорганизма.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения микроорганизм настоящего изобретения не влияет негативно на рост *Streptococcus mutans* или *Porphyromonas gingivalis*. Термин «не влияет негативно» означает, что не может быть обнаружено никакого ингибирования роста *Streptococcus mutans* или *Porphyromonas gingivalis* при контакте с микроорганизмом изобретения по сравнению с контролем, где отсутствует микроорганизм изобретения.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения микроорганизм согласно изобретению не стимулирует не только рост *Streptococcus mutans* и/или *Porphyromonas gingivalis*, но также не стимулирует рост по меньшей мере одного другого патогенного микроорганизма микрофлоры полости рта. Представителями патогенных бактерий полости рта являются анаэробные, грамотрицательные бактерии. Другими примерами являются *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Actinomyces naeslundii*, *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium nucleatum polymorphum*, *Prevotella intermedia*, *Solobacterium moorei*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Tannerella forsythensis* и *Treponema denticola*.

Стимуляция или отсутствие стимуляции роста этих бактерий может быть измерено с помощью анализов, описанных выше для *S. Mutans* и *P. gingivalis*.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения описанные выше микроорганизмы согласно изобретению характеризуются тем, что они не только проявляют эффект стимуляции роста *Streptococcus salivarius* в виде живых клеток, но также в виде культурального супернатанта. Это означает, что также культуральный супернатант, полученный из микроорганизма согласно изобретению, проявляет эффект стимуляции роста *Streptococcus salivarius*. Предпочтительно этот эффект проявляется в следующем анализе:

- (а) *Streptococcus salivarius* культивируют в анаэробных условиях в 6-луночных планшетах с 8 мл TSY среды в течение ночи при 37°C;
- (б) тестируемый микроорганизм, принадлежащий к группе молочнокислых бактерий, культивируют в анаэробных условиях в 96-луночных планшетах со 150 мкл искусственной среды в течение 24 часов при 37°C, клетки осаждают центрифугированием при 4000·g в течение 15 мин и супернатант восстанавливают;
- (в) культуру клеток *Streptococcus salivarius* с шага (а) смешивают в объемном соотношении от 2:1 до 4:1 с супернатантом с шага (б) в 1/2 среды TSY;
- (г) культуральную суспензию инкубируют в аэробных условиях в течение 12 часов при 37°C;

(д) в качестве контроля используют неизрасходованную $1/2$ среды TSY или облегченную среду MRS;

(е) определяют максимальную оптическую плотность ($OD_{600, \max}$) и/или определяют максимальную скорость роста ($V_{\max}$) во время экспоненциального роста; и

(ж) микроорганизм классифицируют как микроорганизм, способный стимулировать рост *Streptococcus salivarius*, если максимальная оптическая плотность ($OD_{600, \max}$) и/или максимальная скорость роста ($V_{\max}$) увеличивается, по меньшей мере, на 10% по сравнению с контролем.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения инкубацию осуществляют в 96-луночной планшете. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения инкубацию осуществляют в спектрофотометре для микропланшета Bio Tek PowerWave (Fa Biotek Instruments GmbH, Germany).

По отношению к $OD_{600, \max}$ и $V_{\max}$ применяется то же самое, что было сформулировано здесь выше.

Предпочтительно микроорганизм согласно настоящему изобретению приводит к увеличению максимальной оптической плотности ($OD_{600, \max}$) или максимальной скорости роста ($V_{\max}$) *Streptococcus salivarius* в описанном выше анализе, по меньшей мере, на 15%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 20%, еще более предпочтительно, по меньшей мере, на 30% и особенно предпочтительно, по меньшей мере, на 40%, 50%, 60%, 70% или даже 80% по сравнению с контролем.

В особенно предпочтительном варианте осуществления изобретения стимуляция роста *Streptococcus salivarius*, проявляемая микроорганизмом согласно изобретению, устойчива к термической обработке, т.е. она также происходит, когда клетки (или их экстракты) или культуральный супернатант подвергаются термической обработке. Термическая обработка предпочтительно представляет собой термическую обработку при температуре между 60°C и 100°C, более предпочтительно между 70°C и 90°C, еще более предпочтительно между 75°C и 85°C и наиболее предпочтительно при температуре около 80°C или ровно 80°C.

Обычно термическая обработка должна длиться в течение по меньшей мере 1 минуты. Предпочтительно, термическая обработка длится в течение по меньшей мере n минут, где n представляет собой целое число в диапазоне от 2 до 60, где $n=10$, или 15, или 20 является особенно предпочтительным. Тем не менее, в принципе не существует верхнего предела для времени инкубации. Однако предпочтительно оно не должно быть больше чем 4, 3, 2 или 1 час. Наиболее предпочтительной термической обработкой является обработка в течение 10 минут при температуре 80°C в инкубаторе. Наиболее предпочтительной термической обработкой считается обработка, разрушающая любую функцию белка и любую функцию жизнеспособности клеток, и, таким образом, вышеупомянутый микроорганизм, принадлежащий к группе молочнокислых бактерий, отличается от другого микроорганизма тем, что он все еще способен стимулировать рост *Streptococcus salivarius*. Следовательно, он очень полезен для использования в любом продукте питания, кормовом продукте, напитке или композиции в контексте настоящего изобретения, если желательно, чтобы микроорганизм не являлся живым.

После остывания способность микроорганизма согласно изобретению (или его экстрактов) или его культурального супернатанта стимулировать рост *Streptococcus salivarius* определяется в анализе, как описано здесь выше или как описано в прилагаемых Примерах. Применительно к культуральному супернатанту микроорганизма согласно

изобретению соответствующий анализ предпочтительно содержит следующие шаги:

(з) *Streptococcus salivarius* культивируют в анаэробных условиях в 6-луночных планшетах с 8 мл TSY среды в течение ночи при 37°C;

(и) тестируемый микроорганизм, принадлежащий к группе молочнокислых бактерий, культивируют в анаэробных условиях в 96-луночных планшетах со 150 мкл искусственной среды в течение 24 часов при 37°C, клетки осаждают центрифугированием при 4000·g в течение 15 мин и супернатант восстанавливают;

(к) супернатант инкубируют при 80°C в течение 10 мин в инкубаторе и затем охлаждают до комнатной температуры;

(л) культуру клеток *Streptococcus salivarius* с шага (з) смешивают в объемном соотношении 2:1 с супернатантом с шага (к) в 1/2 среды TSY;

(м) культуральную суспензию инкубируют в аэробных условиях в течение 12 часов при 37°C;

(н) в качестве контроля используют неизрасходованную 1/2 среды TSY или облегченную среду MRS;

(о) определяют максимальную оптическую плотность ($OD_{600, \max}$) и/или определяют максимальную скорость роста ($V_{\max}$) во время экспоненциального роста; и

(п) микроорганизм классифицируют как микроорганизм, способный стимулировать рост *Streptococcus salivarius*, если максимальная оптическая плотность ($OD_{600, \max}$) и/или максимальная скорость роста ($V_{\max}$) увеличивается, по меньшей мере, на 10% по сравнению с контролем.

Более того, также свойство отсутствия стимуляции роста *Streptococcus mutans* и/или *Porphyromonas gingivalis* микроорганизмом согласно изобретению устойчиво к термической обработке. По отношению к определению времени термической обработки применяется то же самое, что было сформулировано выше.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения стимуляция роста *Streptococcus salivarius*, проявляемая микроорганизмом согласно изобретению, устойчива к лиофилизации, т.е. она также происходит, когда клетки подвергаются лиофилизирующей обработке. Лيوфилизирующая обработка предпочтительно представляет собой лиофилизирующую обработку, в которой клетки (или их экстракты) или клеточный супернатант сначала замораживают до -80°C и затем лиофилизируют в вакууме в течение 16 часов. После лиофилизирующей обработки способность микроорганизма согласно изобретению стимулировать рост *Streptococcus salivarius* может тестироваться с помощью анализов, уже описанных выше, или как описано в прилагаемых Примерах. Применительно к культуральному супернатанту микроорганизма согласно изобретению соответствующий анализ предпочтительно содержит следующие шаги:

(р) *Streptococcus salivarius* культивируют в анаэробных условиях в 6-луночных планшетах с 8 мл TSY среды в течение ночи при 37°C;

(с) тестируемый микроорганизм, принадлежащий к группе молочнокислых бактерий, культивируют в анаэробных условиях в 96-луночных планшетах с 50 мкл искусственной среды в закрытых 100-миллилитровых бутылках в течение ночи при 37°C, клетки осаждают центрифугированием при 4000·g в течение 15 мин и супернатант восстанавливают;

(т) 20 мл супернатанта с шага (с) замораживают до -80°C и лиофилизируют в вакууме в течение 16 часов;

(у) лиофилизированный супернатант ресуспендируют в 20 мл H_2O ;

(ф) культуру клеток *Streptococcus salivarius* с шага (р) смешивают в объемном соотношении 2:1 с супернатантом с шага (у) в $1/2$ среды TSY в 96-луночных планшетах;

(х) культуральную суспензию инкубируют в аэробных условиях в течение 12 часов при $37^\circ C$;

(ч) в качестве контроля используют неизрасходованную $1/2$ среды TSY или облегченную среду MRS;

(ш) определяют максимальную оптическую плотность ($OD_{600, max}$) и/или определяют максимальную скорость роста (V_{max}) во время экспоненциального роста; и

(щ) микроорганизм классифицируют как микроорганизм, способный стимулировать рост *Streptococcus salivarius*, если максимальная оптическая плотность ($OD_{600, max}$) и/или максимальная скорость роста (V_{max}) увеличивается, по меньшей мере, на 10% по сравнению с контролем.

Согласно особенно предпочтительному варианту осуществления изобретения микроорганизм согласно изобретению проявляет оба свойства, соответственно описанных для первого и второго объекта настоящего изобретения, т.е. он показывает свойства (б) и/или (Б), как описано для первого объекта (резкое снижение концентрации пептидов) и проявляет свойства, как описано для второго объекта (стимуляция роста *Streptococcus salivarius* и отсутствие стимуляции роста *Streptococcus mutans* и/или *Porphyromonas gingivalis*).

Микроорганизмы согласно изобретению, как описано здесь выше, благодаря их свойствам позволяют сдвинуть баланс микрофлоры полости рта в сторону *Streptococcus salivarius*, что приводит к оздоровлению с точки зрения развития меньшего количества неприятного запаха изо рта.

Как очевидно из изложенного, все вышеупомянутые характеристики делают вышеупомянутый микроорганизм, принадлежащий к группе молочнокислых бактерий, подходящим агентом для снижения неприятного запаха изо рта и/или халитоза или для предотвращения и/или лечения неприятного запаха изо рта и/или халитоза, особенно неприятного запаха изо рта и/или халитоза, вызываемых патогенными микроорганизмами микробной флоры полости рта, особенно анаэробными грамотрицательными бактериями. Соответственно, микроорганизм согласно изобретению оказывает влияние на снижение неприятного запаха изо рта и таким образом является полезным агентом для профилактики и/или лечения неприятного запаха изо рта и/или халитоза.

Термин «предотвращение неприятного запаха изо рта» включает профилактику неприятного запаха изо рта. Соответственно, субъект, который никогда не сталкивался с этими микроорганизмами, которые ответственны за развитие неприятного запаха изо рта, но может иметь риск столкнуться с ними, т.е. быть инфицированным такими микроорганизмами, или субъект, который пока имеет хорошо сбалансированную микрофлору полости рта, извлекает пользу от использования, например, микроорганизмов, композиций, применений и способов настоящего изобретения, в таком случае указанный субъект не будет страдать от неприятного запаха изо рта. Следовательно, микроорганизмы, композиции, применения и способы настоящего изобретения могут, например, использоваться детьми старшего и младшего возраста или молодыми животными для профилактики неприятного запаха изо рта, поскольку полость рта детей и молодых животных в норме свободна от микроорганизмов,

ответственных за развитие неприятного запаха изо рта. Однако микроорганизмы и композиции, использованные в соответствии с настоящим изобретением, не ограничены назначением детям младшего и старшего возраста или молодым животным.

Термины «лечение неприятного запаха изо рта» и «лечение халитоза» включают введение микроорганизмов или композиций, описанных здесь, субъектам, страдающим от неприятного запаха изо рта и/или халитоза, с целью снижения количества вырабатываемого неприятного запаха.

При желании, микроорганизм согласно настоящему изобретению является пробиотическим микроорганизмом, который кроме эффекта снижения неприятного запаха изо рта обладает благотворным действием на организм хозяина, в который он вводится. «Пробиотик», согласно общепринятому определению, является «живой добавкой к пище, которая благотворно влияет на животного-хозяина за счет улучшения его микробного баланса в кишечнике».

Соответственно, настоящее изобретение обеспечивает применение легко вводимых бактерий, которые являются организмами, пригодными для применения в пищу, которые вдобавок к эффекту снижения неприятного запаха изо рта могут быть полезными в качестве пробиотиков.

Удивительно, эффект микроорганизмов согласно изобретению эффективно удалять пептиды из среды и, таким образом, также из слюны, тем самым предотвращая другие микроорганизмы, присутствующие в микрофлоре полости рта, которые ответственны за продуцирование веществ, приводящих к образованию неприятного запаха изо рта, вырабатывать соответствующие вещества, может также наблюдаться с инактивированными формами микроорганизмов, такими как лиофилизированные формы или формы, возникающие в результате обработки УФ-излучением или радиацией.

Наиболее важно, что эффект также наблюдается в присутствии слюны, что делает микроорганизм согласно изобретению особенно подходящим для использования в пероральной форме или в качестве добавки в продукты питания, корм или напитки. Поразительно, термически инактивированные или лиофилизированные формы, особенно аналоги, производные или фрагмент(ы) указанных микроорганизмов, раскрытых здесь, все еще способны специфически эффективно снижать концентрацию пептидов в описанных выше анализах.

Аналогично, также свойство микроорганизма согласно настоящему изобретению, описанное для второго объекта настоящего изобретения, т.е. стимулировать рост *Streptococcus salivarius* и не стимулировать рост *Streptococcus mutans* и/или *Porphyromonas gingivalis*, проявляется не только с микроорганизмами самими по себе, но также с культуральным супернатантом микроорганизма и с инактивированными формами. В частности, свойство стимуляции роста *Streptococcus salivarius* и отсутствие стимуляции роста *Streptococcus mutans* и/или *Porphyromonas gingivalis* устойчиво к термической обработке и устойчиво к лиофилизирующей обработке.

Эти удивительные эффекты дают преимущества применению указанных инактивированных форм, культуральных супернатантов, аналога(ов) или фрагмента(ов) указанных микроорганизмов, также как их мутантов или производных в композициях для применения к животным, предпочтительно людям или млекопитающим, для предотвращения и/или лечения неприятного запаха изо рта и/или халитоза. В частности, указанные инактивированные формы, культуральные супернатанты, аналоги или фрагменты легко могут быть добавлены к любой композиции, например косметической или фармацевтической композиции, продукту питания, или кормовому продукту, или напитку и т.п. Кроме того, производство таких инактивированных форм,

культуральных супернатантов, аналогов или фрагментов является дешевым и легким и они могут храниться длительные периоды времени без потери их способности снижать концентрацию пептидов и/или стимулировать рост *Streptococcus salivarius* и не стимулировать рост *Streptococcus mutans* и/или *Porphyromonas gingivalis*. Особое
 5 преимущество микроорганизма согласно изобретению заключается в том, что он сохраняет свою способность снижать концентрацию пептидов и/или стимулировать рост *Streptococcus salivarius* и не стимулировать рост *Streptococcus mutans* и/или *Porphyromonas gingivalis*, если является лиофилизированным, или высушенным распылением, или просто высушенным. Более того, свойство стимулировать рост *Streptococcus salivarius*
 10 и не стимулировать рост *Streptococcus mutans* и/или *Porphyromonas gingivalis* сохраняется даже после термической обработки. Вышеупомянутые свойства делают микроорганизм согласно изобретению подходящим для использования в композициях, описанных здесь.

Кроме того, в предпочтительном варианте осуществления изобретения
 15 микроорганизм согласно настоящему изобретению проявляет описанные выше свойства (т.е. снижение концентрации пептидов и/или стимуляция роста *Streptococcus salivarius* и отсутствие стимуляции роста *Streptococcus mutans* и/или *Porphyromonas gingivalis*) также в присутствии слюны. Слюна представляет собой экзогенный секрет, который синтезируется слюнными железами. Она является сложной жидкостью, содержащей
 20 помимо около 99% воды множество органических и неорганических соединений. Физиологическими ингредиентами слюны являются, в том числе, ферменты, например муцины, лактоферрин, богатые пролином белки, цистатины, гистатины, или статерины, или растворимый IgA. Таким образом, хотя в слюне присутствует множество потенциально мешающих веществ, вышеупомянутым свойствам микроорганизма
 25 согласно изобретению не препятствует присутствие слюны.

Указанные выше характеристики вышеупомянутого микроорганизма, принадлежащего к группе молочнокислых бактерий, делают его надежным и эффективным агентом для предотвращения и/или лечения неприятного запаха изо рта и/или халитоза, поскольку он в основном вводится в разных формах в рот, включая
 30 ротовую полость и зубы, где, в том числе, присутствует слюна, включающая определенные протеазы и низкие значения pH после проглатывания углевода, содержащегося в продукте питания. Более того, устойчивость к нагреванию и/или лиофилизации имеет выгодные преимущества при добавлении вышеупомянутого микроорганизма согласно изобретению, принадлежащего к группе молочнокислых
 35 бактерий, в качестве добавки к продукту питания в течение приготовления указанного продукта питания. А именно продукт питания часто термически стерилизуется, предварительно готовится, пастеризуется и тому подобное, что наносит ущерб жизнеспособности микроорганизмов.

Другие варианты осуществления изобретения и преимущества изобретения
 40 сформулированы частично здесь в описании и частично могут быть очевидными из описания или могут быть узнаны из применения изобретения.

До того как изобретение будет подробно описано, следует понять, что это изобретение не ограничивается особенной методологией, регламентированными процедурами, бактериями, векторами и реагентами и т.д., описанными здесь, поскольку
 45 они могут варьироваться. Также следует понять, что использованная здесь терминология необходима с целью всего лишь описания частных вариантов осуществления изобретения и не предполагает ограничить объем настоящего изобретения, который будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения. Если не определено иначе, все технические

и научные термины, используемые здесь, имеют те же самые значения, которые обычно понимаются средним специалистом в данной области.

Предпочтительно, используемым здесь терминам дают определения, как описано в руководстве "A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)",
 5 Leuenberger, H.G.W. Naqel, B. and Kölbl. H. eds. (1995), Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basel, Switzerland).

Во всем описании и формуле изобретения, которая следует далее, если контекст не требует иначе, под словом «содержать» и вариациями, такими как «содержит» и «содержащий», будет подразумеваться включение установленного целого числа, или
 10 шага, или группы целых чисел или шагов, но не исключение любого другого целого числа или шага или группы целого числа или шага.

Несколько документов процитировано по всему тексту этого описания. Каждый из документов, процитированных здесь (включая все патенты, заявки на патент, научные публикации, технические требования изготовителя, инструкции и т.д.), или выше, или
 15 ниже, тем самым включен в качестве ссылки во всей полноте. Ничто здесь не должно толковаться как допущение того, что изобретение не обладает правом предшествовать такому раскрытию на основании предшествующего изобретения.

Нужно отметить, что как используется здесь и в прилагаемой формуле изобретения, единственные формы включают множественные объекты, если контекст ясно не
 20 указывает иначе. Таким образом, например, ссылка на «реагент» включает один или больше таких различных реагентов, и ссылка на «способ» включает ссылку на эквивалентные шаги и способы, известные среднему специалисту в данной области, которые могли бы быть модифицированы или заменены на способы, описанные здесь.

При использовании в контексте данного изобретения термин «микроорганизм, принадлежащий к группе молочнокислых бактерий» охватывает микроорганизм(ы),
 25 который(е) относится(ятся) к бактериям, особенно к грамположительным ферментирующим эубактериям, конкретнее к семейству lactobacteriaceae, включающему молочнокислые бактерии. Кроме того, указанный термин также охватывает производные, или мутанты, или аналоги, или фрагменты, такие как клеточные экстракты
 30 или мембранные фракции, описанные здесь, указанного(ых) микроорганизма(ов), которые сохраняют описанные выше свойства (т.е. снижать концентрацию пептидов и/или стимулировать рост *Streptococcus salivarius* и не стимулировать рост *Streptococcus mutans* и/или *Porphyromonas gingivalis*). Термины «производное», «мутанты», «аналоги» и «фрагменты» описаны здесь в другом месте. Молочнокислые бактерии с
 35 таксономической точки зрения разделены на подотделы *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* и *Lactobacillus*. Вышеупомянутый микроорганизм, принадлежащий группе молочнокислых бактерий, является предпочтительно видом *Lactobacillus*. Представители группы молочнокислых бактерий обычно испытывают недостаток в порфиринах и цитохромах, не осуществляют сопряженное с переносом электронов фосфорилирование
 40 и, следовательно, получают энергию только за счет субстратного фосфорилирования. То есть в молочнокислых бактериях АТФ синтезируется через ферментацию углеводов. Все молочнокислые бактерии растут в анаэробных условиях, однако в отличие от многих анаэробов большинство молочнокислых бактерий не чувствительны к кислороду и могут таким образом расти в его присутствии, так же как и в отсутствие.

Соответственно, вышеупомянутые микроорганизмы, принадлежащие к группе молочнокислых бактерий, предпочтительно являются аэротолерантными анаэробными молочнокислыми бактериями, предпочтительно принадлежащими к роду *Lactobacillus*.

Вышеупомянутые молочнокислые бактерии являются предпочтительно

палочковидными или сферическими, варьируя от длинных и удлинённых к коротким изогнутым палочкам, и, более того, предпочтительно являются неподвижными и/или аспорогенными и производят молочную кислоту как главный или единственный продукт ферментативного метаболизма. Род *Lactobacillus*, к которому принадлежит

5 вышеупомянутый микроорганизм, подразделяется на основании следующих характеристик на три главные подгруппы, в соответствии с чем предусматривается, что вышеупомянутые виды *Lactobacillus* могут принадлежать каждой из трех главных подгрупп:

(а) гомоферментативные молочнокислые бактерии

10 (i) продуцирующие молочную кислоту, предпочтительно L-, D-или DL-изомер(ы) молочной кислоты, в количестве по меньшей мере 85% из глюкозы через путь Эмбдена-Мейерхофа;

(ii) растущие при температуре 45°C, но не при температуре 15°C;

(iii) находящиеся в форме длинных палочек; и

15 (iv) имеющие глицеринтейхоевую кислоту в клеточной стенке;

(б) гомоферментативные молочнокислые бактерии

(i) продуцирующие молочную кислоту, предпочтительно L- или DL-изомер(ы) молочной кислоты, через путь Эмбдена-Мейерхофа;

(ii) растущие при температуре 15°C, показывающие переменный рост при температуре

20 45°C;

(iii) находящиеся в форме коротких палочек или коринеформные бактерии; и

(iv) имеющие рибит и/или глицеринтейхоевую кислоту в клеточной стенке;

(в) гетероферментативные молочнокислые бактерии

(i) продуцирующие молочную кислоту, предпочтительно DL-изомер молочной

25 кислоты, в количестве по меньшей мере 50% из глюкозы через пентозно-фосфатный путь;

(ii) продуцирующие диоксид углерода и этанол;

(iii) показывающие переменный рост при температуре 15°C или 45°C;

(iv) находящиеся в форме длинных или коротких палочек; и

30 (v) имеющие глицеринтейхоевую кислоту в клеточной стенке.

На основании описанных выше характеристик вышеупомянутые микроорганизмы могут быть отнесены к группе молочнокислых бактерий, в частности к роду *Lactobacillus*. При использовании классической систематики, например, придерживаясь подходящих описаний в публикации "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" (Williams & Wilkins

35 Co., 1984), может быть принято решение отнести микроорганизм к роду *Lactobacillus*. В альтернативном варианте, классифицирование микроорганизмов к роду *Lactobacillus* может осуществляться с помощью способов, известных в данной области, например, используя их метаболические карты, т.е. сопоставимые сведения о способности такого (их) микроорганизма(ов) метаболизировать сахара, или используя другие методы,

40 описанные, например, в публикации Schleifer et al., System. Appl. Microb., 18 (1995), 461-467 или Ludwig et al., System. Appl. Microb., 15 (1992), 487-501. Вышеупомянутые микроорганизмы способны метаболизировать источники сахара, что является типичным и известным в области техники для микроорганизмов, принадлежащих к роду *Lactobacillus*. Предпочтительно, однако, вышеупомянутый микроорганизм обладает

45 метаболической картой, выбранной из группы, состоящей из:

(i) микроорганизм метаболизирует D-лактозу, но не L-сорбозу, и/или D-сахарозу, и/или D-инулин,

(ii) микроорганизм метаболизирует инулин,

(iii) микроорганизм метаболизирует L-сорбозу, но не D-лактозу, и/или D-сахарозу, и/или инулин, и

(iv) микроорганизм метаболизирует L-сорбозу, D-лактозу и инулин.

Предпочтительно, вышеупомянутый микроорганизм обладает метаболической картой, выбранной из группы, состоящей из:

(i) микроорганизм метаболизирует D-лактозу, но не L-сорбозу, D-сахарозу и инулин,

(ii) микроорганизм метаболизирует L-сорбозу, D-лактозу и инулин, но не D-сахарозу,

(iii) микроорганизм метаболизирует L-сорбозу, но не D-лактозу, D-сахарозу и инулин,

и

(iv) микроорганизм метаболизирует L-сорбозу, D-лактозу, D-сахарозу, но не инулин.

Конечно, вышеупомянутый микроорганизм не ограничен метаболизированием сахаров, указанных в вышеупомянутой схеме метаболической карты, он может быть способным метаболизировать другие сахара, которые обычно метаболизируются видами *Lactobacillus*.

Принадлежность вышеупомянутых микроорганизмов к роду *Lactobacillus* также может определяться с помощью других методов, известных в данной области, например, используя SDS-PAGE гель-электрофорез суммарного белка конкретного вида микроорганизмов, принадлежность которого нужно определить, и затем сравнивая их с известными и уже охарактеризованными штаммами рода *Lactobacillus*. Описанные выше методики для того, чтобы подготовить профиль суммарного белка, так же как количественный анализ таких профилей, известны специалисту в данной области. Вместе с тем, результаты исключительно надежны, поскольку каждая стадия процесса достаточно стандартизирована. Сталкиваясь с требованием точности при отнесении микроорганизма к роду *Lactobacillus*, стандартизированные методики постоянно

доводятся до всеобщего сведения своими авторами, так как это сделали авторы Pot и др. во время семинара, организованного Европейским союзом, в Университете Гента, в Бельгии, 12-16 сентября, 1994 (Fingerprinting techniques for classification and identification of bacteria, SDS-PAGE of whole cell protein). Программное обеспечение, используемое в методике для анализа SDS-PAGE гель-электрофореза (гель-электрофорез в

полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия), имеет первостепенную важность, поскольку степень корреляции между видами зависит от параметров и алгоритмов, используемых этим программным обеспечением. Не вникая в подробности, количественное сравнение связей, измеренных денситометром и нормализованных компьютером, предпочтительно осуществляется с коэффициентом корреляции Пирсона.

Матрица подобия, полученная таким образом, может быть сформирована с помощью алгоритма UPGMA (метод невзвешенного попарного кластерирования с использованием средней связи), который не только позволяет группировать самые схожие профили, но также и создавать дендограммы (см. Kersters, Numerical methods in the classification and identification of bacteria by electrophoresis, in Computer-assisted Bacterial Systematics, 337-368, M. Goodfellow, A.G. O'Donnell Ed., John Wiley and Sons Ltd, 1985).

В альтернативном варианте, принадлежность указанных микроорганизмов к роду *Lactobacillus* может оцениваться относительно рибосомной РНК в так называемом Riboprinter.RTM. Более предпочтительно, принадлежность вышеупомянутых видов к роду *Lactobacillus* оценивается путем сравнения нуклеотидной последовательности 16S рибосомных РНК указанных бактерий, или их геномных ДНК, которые кодируют 16S рибосомные РНК, с таковыми из других родов и видов молочнокислых бактерий, известных до настоящего времени. Другой предпочтительной альтернативой для определения принадлежности видов к роду *Lactobacillus* является использование

видоспецифичных ПЦР-праймеров, которые нацелены на спейсерную область 16S-23S р-РНК. Другой предпочтительной альтернативой является RAPD-PCR (ПЦР со случайной амплификацией полиморфной ДНК) (Nigatu et al. in Antonie van Leeuwenhoek (79), 1-6, 2001), на основании этого нарабатывается штамм-специфичный набор ДНК, который позволяет определить принадлежность идентифицируемых микроорганизмов к роду *Lactobacillus*. Другими методиками, полезными для определения принадлежности микроорганизма к роду *Lactobacillus*, являются полиморфизм длины рестрикционных фрагментов (метод RFLP) (Giraffa et al. Int. J. Food Microbiol. 82 (2003), 163-172), «фингерпринтинг» повторяющихся элементов (Gevers et al., FEMS Microbiol. Lett. 205 (2001) 31-36) или анализ набор сложных метиловых эфиров жирной кислоты (fatty acid methyl ester, FAME) бактериальных клеток (Heyrman et al., FEMS Microbiol. Lett. 181 (1991), 55-62). В качестве альтернативы, молочнокислые бактерии могут определяться типированием лектина (Annuk et al., J. Med. Microbiol. 50 (2001), 1069-1074) или анализом белков их клеточной стенки (Gatti et al., Lett. Appl. Microbiol. 25 (1997), 345-348).

Вышеупомянутыми микроорганизмами предпочтительно являются молочнокислые бактерии, принадлежащие к роду *Lactobacillus*, более предпочтительно видами *Lactobacillus*, описанными здесь, в частности бактериями *Lactobacillus*, принадлежащими к видам, выбранным из группы, состоящей из *acidophilus*, *fermentum*, *lactis*, *delbrueckii*, *aligidus*, *brevis*, *buchneri*, *casei*, *camelliae*, *coelestis*, *crustorum*, *diolivorans*, *heterohiochii*, *hilgardii*, *kimchii*, *lindneri*, *oris*, *pantheris*, *parabuchneri* и *saerimneri*. Еще более предпочтительно указанные бактерии *Lactobacillus* являются *Lactobacillus acidophilus*. Тем не менее, виды *Lactobacillus* не ограничиваются указанным. Вышеупомянутые микроорганизмы предпочтительно могут быть «изолированными» или «очищенными». Термин «изолированный» означает, что материал изымается из исходной окружающей среды, например природной окружающей среды, если он есть в природном состоянии. Например, изолируется встречающийся в природе микроорганизм, предпочтительно вид *Lactobacillus*, выделенный из некоторых или всех существующих материалов в природной системе. Такой микроорганизм может быть частью композиции и все еще считается изолированным в ней, если такая композиция не является частью природной окружающей среды.

Термин «очищенный» не требует абсолютной чистоты; скорее под ним подразумевается относительное определение. Индивидуальные микроорганизмы, полученные из библиотеки, были обычным образом очищены до микробиологической гомогенности, т.е. они растут как одиночные колонии, когда посеяны штрихом на агаровых чашках с помощью методов, известных в данной области техники. Предпочтительно, агаровые чашки, которые используются для этой цели, селективны по отношению к виду *Lactobacillus*. Такие селективные агаровые чашки известны в данной области техники.

Более предпочтительно, вышеупомянутый микроорганизм, принадлежащий к группе молочнокислых бактерий, выбирают из группы, состоящей из бактерий *Lactobacillus acidophilus*, имеющих код DSM 19825, DSM 19826, DSM 19827 в коллекции DSMZ, или их мутантов или производных, где указанный мутант или производное сохраняет способность снижать концентрацию пептидов в анализе (a) и/или (A), описанных здесь выше. Термин «*Lactobacillus acidophilus*, имеющий код в коллекции DSMZ» относится к клеткам микроорганизма, принадлежащего к виду *Lactobacillus acidophilus*, депонированных компанией BASF AG совместно с Германской коллекцией микроорганизмов и культур клеток (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSMZ) 1 ноября 2007 года и обладающие кодами депонирования

DSM 19825, DSM 19826, DSM 19827. Коллекция DSMZ располагается на Inhoffenstr. 7b, 38124 Braunschweig, Germany.

Вышеупомянутые депонирования DSMZ были сделаны в соответствии с условиями Будапештского соглашения о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры.

«Мутант или производное» вышеупомянутого микроорганизма, принадлежащего к группе молочнокислых бактерий, предпочтительно депонированной бактерии *Lactobacillus acidophilus*, предпочтительно имеет те же самые характеристики, которые относятся к депонированным штаммам, т.е. он сохраняет способность снижать концентрацию пептидов в анализе (a) и/или (A), описанных здесь выше, и/или сохраняет способность стимулировать рост *Streptococcus salivarius*, но не стимулирует рост *Streptococcus mutans* и/или *Porphyromonas gingivalis*. Например, указанное производное может быть создано методами генной инженерии. В контексте настоящего изобретения термин «методы генной инженерии» используется в его самом широком смысле для методов, известных специалисту в данной области техники для модификации желаемой нуклеиновой кислоты *in vitro* и *in vivo* таким образом, чтобы генные модификации подвергались воздействию и гены изменялись благодаря технологии рекомбинантной ДНК. Соответственно, предпочтительно, что указанные методы содержат клонирование, секвенирование и трансформацию рекомбинантных нуклеиновых кислот. Для этой цели подходят векторы, включающие экспрессирующие векторы для вида *Lactobacillus*, как, например, описанные в европейских патентах EP-B1 506 789, EP-B1 316 677, EP-B1 251 064, EP-B1 218 230. EP-B1 133 046 или международной заявке на патент WO 89/01970.

Праймеры, ферменты, другие клетки-хозяева для клонирования промежуточных конструкций и тому подобное могут быть использованы и известны специалисту в данной области техники. Предпочтительно, мутанты, созданные методами генной инженерии, содержат клетки вышеупомянутого микроорганизма, принадлежащего к группе молочнокислых бактерий, предпочтительно депонированных видов *Lactobacillus*, включающие рекомбинантные нуклеиновые кислоты, либо содержащиеся в их бактериальной хромосоме, либо в плазмиде(ах). Указанные рекомбинантные нуклеиновые кислоты предпочтительно чужеродны вышеупомянутому микроорганизму, принадлежащего к роду молочнокислых бактерий. Под «чужеродным» подразумевается, что молекула полинуклеотида или нуклеиновой кислоты является либо гетерологичной по отношению к клетке-хозяину, то есть полученной из клетки или организма с другим геномным окружением, или является гомологичной по отношению к клетке-хозяину, но локализованной в другом геномном окружении, нежели чем встречающийся в природе аналог указанной молекулы нуклеиновой кислоты. Это означает, что если молекула нуклеиновой кислоты является гомологичной по отношению к клетке-хозяину, она не локализована в ее природном местоположении в геноме указанной клетки-хозяина, в частности она окружена другими генами. В этом случае полинуклеотид может быть либо под контролем его собственного промотора, или под контролем гетерологичного промотора. Описанный выше вектор или молекула нуклеиновой кислоты, которая присутствует в клетке-хозяине, либо может быть интегрирована в геном клетки-хозяина, либо может поддерживаться в некоторой форме вне хромосомы. В этом отношении также следует понимать, что описанная выше молекула нуклеиновой кислоты может быть использована для восстановления или создания мутантного гена через гомологичную рекомбинацию.

Мутант вышеупомянутого микроорганизма, принадлежащего к роду молочнокислых

бактерий, предпочтительно мутант депонированных штаммов *Lactobacillus*, предпочтительно является мутированным искусственно. Согласно настоящему изобретению термин «мутированный» означает постоянную(ые) модификацию(и) генетического материала, т.е. нуклеиновых кислот, вызванную(ые), например, естественным образом, или физическими средствами, или химическими соединениями/веществами/агентами, такими как ЭМС (этил метансульфонат) или ЭНМ (N-этил-N-нитрозомочевина). Указанные модификации включают точечные мутации, подобно транзициям или трансверсиям, делеции/вставки/присоединения одного или более оснований внутри нуклеиновой кислоты/гена/хромосомы, посредством этого модифицируя нуклеиновую кислоту/ген/хромосому, что может вызвать, среди прочего, абберантную генную экспрессию/транскрипцию/трансляцию неактивных генных продуктов, конститутивных активных/неактивных генных продуктов, приводящие, например, к доминантным негативным эффектам. Предпочтительно, мутация приводит к увеличенной способности снижать концентрацию пептидов в анализе (а) и/или (А), описанных выше. Таким образом, также предпочтительно, что в мутантных клетках депонированного микроорганизма, которые включают мутацию(и) в необходимом(ых) гене(ах), эта(и) мутация(и) в необходимом(ых) гене(ах) вызвана методами, известными специалисту в данной области техники. Также в предшествующем уровне техники известно, что мутированные или созданные методами генной инженерии бактериальные клетки могут быть выбраны любым подходящим методом/фенотипом. В контексте настоящего изобретения мутант, обладающий увеличенной способностью снижать концентрацию пептидов в анализе (а) и/или (А), описанных выше, и/или обладающий способностью стимулировать рост *Streptococcus salivarius* и не стимулировать рост *Streptococcus mutans* и/или *Porphyromonas gingivalis*, может быть протестирован в соответствии с методами, описанными здесь выше или в прилагаемых Примерах. Термин «мутант», тем не менее, также включает клетки вышеупомянутого микроорганизма, принадлежащего к роду молочнокислых бактерий, предпочтительно клетки депонированных микроорганизмов, которые включают происходящие в природе, спонтанные мутации в их геноме, т.е. бактериальной хромосоме. «Спонтанные мутации» представляют собой мутации, которые возникают в природе, т.е. без прямого манипулирования над генетическим материалом человеком или воздействия мутагеном. Выбор спонтанных мутантов можно осуществить путем культивирования штамма и выбора желательных вариантов, например, по способности различных бактерий проявлять увеличенную способность снижать концентрацию пептидов в анализе (а) и/или (А), описанных выше, и/или обладающих способностью стимулировать рост *Streptococcus salivarius* и не стимулировать рост *Streptococcus mutans* и/или *Porphyromonas gingivalis* (см., например, Sambrook, Russell "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (2001); Ausubel, "Current Protocols in Molecular Biology", Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989)). Например, такие мутации могут происходить во время культивирования, например, во время процесса нормального клеточного деления, объединенного с репликацией ДНК, или во время пассирования и/или хранения мутанта вышеупомянутого микроорганизма, принадлежащего к роду молочнокислых бактерий.

Настоящее изобретение также относится к производному вышеупомянутого микроорганизма, принадлежащего к роду молочнокислых бактерий. Термин «производное вышеупомянутого микроорганизма, принадлежащего к роду молочнокислых бактерий» включает инактивированную форму, аналог или фрагмент вышеупомянутого микроорганизма, принадлежащего к роду молочнокислых бактерий,

где указанная инактивированная форма, аналог или фрагмент сохраняют способность снижать концентрацию пептидов в анализе (а) и/или (А), описанных выше, и/или обладают способностью стимулировать рост *Streptococcus salivarius* и не стимулировать рост *Streptococcus mutans* и/или *Porphyromonas gingivalis*.

- 5 Согласно настоящему изобретению термин «инактивированная форма» включает мертвую или инактивированную клетку согласно изобретению, которая больше не способна формировать одиночную колонию на чашке, специфичной для микроорганизмов, принадлежащих к роду *Lactobacillus*. Указанная мертвая или инактивированная клетка может иметь либо интактную, либо поврежденную клеточную
- 10 мембрану. Методы умертвления или инактивирования клеток вышеупомянутого микроорганизма, принадлежащего к роду молочнокислых бактерий, известны в данной области техники. Публикация El-Nezami et al., J. Food Prot. 61 (1998), 466-468 описывает метод инактивирования видов *Lactobacillus* путем УФ-облучения. Предпочтительно, клетки микроорганизма согласно изобретению являются термически
- 15 инактивированными или лиофилизированными, как описано в прилагаемых Примерах. Лيوфилизация клеток, как описано выше, имеет преимущество, заключающееся в том, что клетки могут легко храниться и с ними легко обращаться, при этом они сохраняют их способность снижать концентрацию пептидов в анализе (а) и/или (А), описанных выше, и/или обладают способностью стимулировать рост *Streptococcus salivarius* и не
- 20 стимулировать рост *Streptococcus mutans* и/или *Porphyromonas gingivalis*.

- Более того, лиофилизированные клетки могут расти снова в условиях, известных в данной области техники для соответствующей жидкой или твердой среды. Лيوфилизация осуществляется методами, известными в данной области техники. Предпочтительно, ее проводят в течение по меньшей мере 2 часов при комнатной температуре, т.е. любой
- 25 температуре между 16°C и 25°C. Особенно предпочтительно ее проводить в течение 16 часов в вакууме. Более того, лиофилизированные клетки вышеупомянутого микроорганизма, принадлежащего к роду молочнокислых бактерий, стабильны в течение по меньшей мере 4 недель при температуре 4°C, так что они сохраняют способность снижать концентрацию пептидов в анализе (а) и/или (А), описанных выше,
- 30 и/или способность стимулировать рост *Streptococcus salivarius* и не стимулировать рост *Streptococcus mutans* и/или *Porphyromonas gingivalis*.

- Термическая инактивация может быть достигнута путем инкубации клеток вышеупомянутого микроорганизма, принадлежащего к группе молочнокислых бактерий, по меньшей мере, в течение 10 минут при температуре 80°C. Термическая инактивация
- 35 может быть осуществлена путем автоклавирования указанных клеток и/или супернатанта при температуре 121°C в течение по меньшей мере 20 минут в присутствии насыщенного пара при атмосферном давлении 2 бар. Предпочтительно, термическая инактивация клеток или культурального супернатанта осуществляется так, как описано здесь выше относительно термической обработки.

- 40 В качестве альтернативы, термическая инактивация клеток вышеупомянутого микроорганизма, принадлежащего к группе молочнокислых бактерий, осуществляется путем замораживания указанных клеток в течение 4 недель, 3 недель, 2 недель, 1 недели, 12 часов, 6 часов, 2 часов или 1 часа при -20°C. Предпочтительно, что по меньшей мере 70%, 75% или 80%, более предпочтительно 85%, 90% или 95% и особенно
- 45 предпочтительно по меньшей мере 97%, 98%, 99% и более предпочтительно 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% или 99,9% и наиболее предпочтительно 100% клеток аналога вышеупомянутого микроорганизма, принадлежащего к группе молочнокислых бактерий, умирают или инактивируются, тем не менее они еще обладают

способностью снижать концентрацию пептидов в анализе (а) и/или в анализе (А), описанных здесь выше, и/или стимулировать рост *Streptococcus salivarius* и не стимулировать рост *Streptococcus mutans* и/или *Porphyromonas gingivalis*. Являются ли на самом деле инактивированная форма, аналог или фрагмент вышеупомянутого микроорганизма, принадлежащего к группе молочнокислых бактерий, мертвыми или инактивированными, можно определить с помощью методов, известных в данной области техники, например с помощью теста на жизнеспособность.

Термин «инактивированная форма» или «аналог» также включает лизаты, фракции, такие как мембранные фракции, или экстракты описанных выше микроорганизмов, где указанные лизаты, фракции или экстракты сохраняют способность снижать концентрацию пептидов в анализе (а) и/или анализе (А), описанных здесь выше, и/или стимулировать рост *Streptococcus salivarius* и не стимулировать рост *Streptococcus mutans* и/или *Porphyromonas gingivalis*. Эти способности могут быть протестированы, как описано здесь и, в частности, как описано в прилагаемых Примерах. В случае если лизат, фракция или экстракт микроорганизма согласно изобретению, описанного здесь выше, возможно не проявляет способность снижать концентрацию пептидов в анализе (а) и/или анализе (А), описанных здесь выше, и/или стимулировать рост *Streptococcus salivarius* и не стимулировать рост *Streptococcus mutans* и/или *Porphyromonas gingivalis*, тогда специалист в данной области техники может, например, дальше очищать указанные лизат, фракцию или экстракт с помощью методов, известных в данной области техники, что проиллюстрировано на примерах здесь ниже, с тем чтобы удалить вещества, которые ингибируют снижение. После этого специалист в данной области техники может снова тестировать указанный лизат, фракцию или экстракт, способен ли он снижать концентрацию пептидов в анализе (а) и/или (А), описанных здесь выше.

Согласно настоящему изобретению термин «лизат» означает раствор или суспензию в водной среде клеток микроорганизма согласно изобретению. Однако термин не следует толковать любым ограничивающим образом. Клеточный лизат содержит, например, макромолекулы, такие как ДНК, РНК, белки, пептиды, углеводы, липиды и тому подобное, и/или микромолекулы, как аминокислоты, сахара, липидные кислоты и тому подобное, или их фракции. Дополнительно указанный лизат содержит клеточный детрит, который может иметь гладкую или зернистую структуру. Предпочтительно, указанный лизат содержит клеточную стенку, или клеточную мембрану, или их обе, или части или фрагменты клеточной стенки, или клеточной мембраны, или их обеих. Методы получения клеточных лизатов микроорганизма известны в данной области техники, например, применением пресса Френча, клеточных мельниц, использующих стеклянные или железные шарики, или ферментативный клеточный лизис и тому подобное. Дополнительно, лизис клеток относится к различным методам, известным в данной области техники для вскрытия/разрушения клеток. Метод лизиса клеток не важен и можно использовать любой метод, с помощью которого можно добиться лизиса клеток вышеупомянутого микроорганизма, принадлежащего к роду молочнокислых бактерий. Соответствующий метод может быть выбран специалистом в данной области техники, например вскрытие/разрушение клеток можно осуществить ферментативно, химически или физически. Неограничивающими примерами ферментов и ферментных коктейлей являются протеазы, как протеиназа К, липазы или гликозидазы; неограничивающими примерами химических веществ являются ионофоры, детергенты, как додецилсульфат натрия, кислоты или основания; и неограничивающими примерами физических средств являются высокое давление, как пресс Френча, осмолярность, температура, как тепло или холод. Например, клетки вышеупомянутого

микроорганизма, принадлежащего к роду молочнокислых бактерий, лизируют путем замораживания и таяния, более предпочтительно замораживания при температурах ниже -70°C и таяния при температурах больше 30°C , особенно замораживание предпочтительно при температурах ниже -75°C и таяние предпочтительно при температурах больше 35°C и наиболее предпочтительно при температурах замораживания ниже -80°C и температурах таяния больше 37°C . Также предпочтительно, чтобы указанное замораживание/таяние повторялось по меньшей мере 1 раз, более предпочтительно по меньшей мере 2 раза, еще более предпочтительно по меньшей мере 3 раза, особенно предпочтительно по меньшей мере 4 раза и наиболее предпочтительно по меньшей мере 5 раз.

Соответственно, специалисты в данной области техники могут получить желаемые лизаты, обращаясь к указанным выше общим пояснениям и соответствующим образом модифицируя или изменяя эти методы в случае необходимости. Предпочтительно, водная среда, использованная для описанных лизатов, является водой, физиологическим солевым раствором или буферным раствором. Преимущество бактериального клеточного лизата заключается в том, что его можно легко получать и эффективно экономить расходы, так как требуется меньше технической базы.

Предпочтительно, термин «экстракт» означает субклеточный компонент вышеупомянутого микроорганизма, принадлежащего к роду молочнокислых бактерий, например макромолекула, такая как белок, ДНК, РНК, пептид, углевод, липид и тому подобное, и/или микромолекула, как аминокислота, сахар, липидная кислота и тому подобное, или любое другое органическое соединение, или молекула, или комбинация указанных макромолекул, и/или микромолекул или любая их фракция, где указанный экстракт сохраняет способность снижать концентрацию пептидов в анализе (а) и/или (А), описанных выше, и/или стимулировать рост *Streptococcus salivarius* и не стимулировать рост *Streptococcus mutans* и/или *Porphyromonas gingivalis*. Эти свойства можно протестировать, как описано здесь или, в частности, как описано в прилагаемых Примерах. Предпочтительно, указанный экстракт содержит клеточную стенку, или клеточную мембрану, или обе, или части или фрагменты клеточной стенки или клеточной мембраны, или их обеих. Более предпочтительно, термин «экстракт» относится к любому из описанных выше субклеточных компонент в бесклеточной среде.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения экстракт может быть получен лизисом клеток в соответствии с различными методами, известными в данной области техники для вскрытия/разрушения клеток, как описано выше, и/или может представлять собой супернатант процедуры центрифугирования культуры вышеупомянутого микроорганизма, принадлежащего к роду молочнокислых бактерий, в любой подходящей жидкости, среде или буфере, известном специалисту в данной области техники, или лизата такой культуры, или любой другой подходящей клеточной суспензии. Более предпочтительно, экстракт может быть очищенным экстрактом, или клеточным культуральным супернатантом, или их любой фракцией, или субчастью, где указанный очищенный лизат, или клеточный культуральный супернатант, или их любая фракция, или субчасть сохраняет способность снижать концентрацию пептидов в анализе (а) и/или (А), описанных выше, и/или стимулировать рост *Streptococcus salivarius* и не стимулировать рост *Streptococcus mutans* и/или *Porphyromonas gingivalis*. Эти свойства могут быть протестированы, как описано выше и, в частности, как описано в прилагаемых Примерах. Подходящие методы фракционирования и очистки лизата, культурального супернатанта или экстракта известны специалисту в данной области техники и охватывают, например, аффинную хроматографию, ионообменную

хроматографию, эксклюзионную хроматографию, обращенно-фазовую хроматографию и хроматографию с другим хроматографическим материалом в колонке или методы групповой обработки, другие методы фракционирования, например методы фильтрации, например ультрафильтрация, диализ, диализ и концентрирование с эксклюзией по размеру при центрифугировании, центрифугирование в градиенте плотности или пошаговых матрицах, осаждение, например аффинное осаждение, осаждение с всаливанием или высаливанием (осаждение сульфатом аммония), спиртовые осаждения или любой другой белок-химический, молекулярный, биологический, биохимический, иммунологический, химический или физический метод.

Согласно изобретению лизаты также являются препаратами или фракциями молекул из вышеупомянутых лизатов. Эти фракции могут быть получены методами, известными специалисту в данной области техники, например хроматографией, включая, например аффинную хроматографию, ионообменную хроматографию, эксклюзионную хроматографию, обращенно-фазовую хроматографию, и хроматографию с другим хроматографическим материалом в колонке или методы групповой обработки, другие методы фракционирования, например методы фильтрации, например ультрафильтрация, диализ, диализ и концентрирование с эксклюзией по размеру при центрифугировании, центрифугирование в градиенте плотности или пошаговых матрицах, осаждение, например, аффинное осаждение, осаждение с всаливанием или высаливанием (осаждение сульфатом аммония), спиртовые осаждения, или любыми другими белок-химическими, молекулярными, биологическими, биохимическими, иммунологическими, химическими или физическими методами для разделения указанных выше компонент лизатов. В предпочтительном варианте осуществления изобретения предпочтительны те фракции, которые являются более иммуногенными, чем другие. Специалисты в данной области техники способны выбрать подходящий метод и определить иммуногенный потенциал, обращаясь к представленным выше общим объяснениям и специфическим пояснениям в приведенных примерах и соответствующим образом модифицируя или изменяя эти методы в случае необходимости.

Соответственно, термин «инактивированная форма аналога» также охватывает фильтраты микроорганизма изобретения, где указанные фильтраты предпочтительно сохраняют способность снижать концентрацию пептидов в анализе (а) и/или (А), описанных выше, и/или стимулировать рост *Streptococcus salivarius* и не стимулировать рост *Streptococcus mutans* и/или *Porphyromonas gingivalis*. Эти свойства могут быть протестированы так, как описано здесь и, в частности, как описано в прилагаемых примерах. В случае, когда фильтрат вышеупомянутого микроорганизма, принадлежащего к роду молочнокислых бактерий, как описано выше, может не обладать способностью снижать концентрацию пептидов в анализе (а) и/или (А), описанных выше, и/или стимулировать рост *Streptococcus salivarius* и не стимулировать рост *Streptococcus mutans* и/или *Porphyromonas gingivalis*, тогда специалист в данной области может, например, далее очищать указанный фильтрат методами, известными в данной области техники и иллюстрируемыми примерами здесь ниже, для того чтобы удалить вещества, которые ингибируют снижение и/или рост стимуляции. После этого специалист в данной области техники может снова тестировать указанный фильтрат на способность снижать концентрацию пептидов в анализе (а) и/или (А), описанных выше, и/или стимулировать рост *Streptococcus salivarius* и не стимулировать рост *Streptococcus mutans* и/или *Porphyromonas gingivalis*.

Термин «фильтрат» также означает бесклеточный раствор или суспензию микроорганизма изобретения, описанного здесь выше, которые были получены как

супернатант процедуры центрифугирования культуры вышеупомянутого микроорганизма, принадлежащего к роду молочнокислых бактерий, в любой подходящей жидкости, среде или буфере, известных специалисту в данной области техники. Однако термин не следует толковать любым ограничивающим образом.

5 Фильтрат содержит, например макромолекулы, такие как ДНК, РНК, белки, пептиды, углеводы, липиды и тому подобное, и/или микромолекулы, как аминокислоты, сахара, липидные кислоты и тому подобное, или их фракции. Методы получения фильтратов микроорганизмов известны в данной области техники. Дополнительно, «фильтрат» относится к различным методам, известным в данной области техники. Выбранный
10 метод не важен и можно использовать любой метод, с помощью которого можно достигнуть фильтрации клеток микроорганизма изобретения. Термин «фильтрат» также включает культуральные супернатанты, например, полученные осаждением клеток путем центрифугирования и восстановления полученного супернатанта.

В особенно предпочтительном варианте осуществления изобретения фильтрат, более
15 предпочтительно культуральный супернатант, является обработанным другим образом, в частности термически или путем лиофилизации, как описано здесь выше.

«Фрагмент» микроорганизма согласно изобретению охватывает любую часть клеток вышеупомянутого микроорганизма, принадлежащего к роду молочнокислых бактерий. Предпочтительно, указанный фрагмент является мембранной фракцией, полученной
20 путем приготовления мембран. Мембранные препараты микроорганизмов, принадлежащих к роду *Lactobacillus*, могут быть получены методами, известными в данной области техники, например, используя метод, описанный в публикациях Rollan et al. *Int. J. Food Microbiol.* 70 (2001), 303-307, Matsuchichi et al. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10 (2003), 259-266 или Stentz et al. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2000), 4272-4278 or Varmanen
25 et al. *J. Bacteriology* 182 (2000), 146-154. В качестве альтернативы, приготовление целых клеток также предусматривается. Предпочтительно, здесь описанное производное или фрагмент вышеупомянутого микроорганизма, принадлежащего к роду молочнокислых бактерий, сохраняет способность снижать концентрацию пептидов в анализе (а) и/или (А), описанных выше, и/или стимулировать рост *Streptococcus salivarius* и не
30 стимулировать рост *Streptococcus mutans* и/или *Porphyromonas gingivalis*.

Настоящее изобретение также относится к композиции, содержащей вышеупомянутый микроорганизм согласно настоящему изобретению, его инактивированную форму, производное, или мутант, или аналог, или фрагмент. Композиция предпочтительно является косметической композицией, или фармацевтической композицией, например
35 для лечения и/или предотвращения неприятного запаха изо рта и/или халитоза, или кормовой, или пищевой композицией.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения, указанная композиция содержит описанный выше микроорганизм в количестве между от 10^2 до 10^{12} клеток,
40 предпочтительно от 10^3 до 10^8 клеток, на мг в твердой форме композиции. В случае композиций в жидкой форме количество микроорганизмов находится между от 10^2 до 10^{13} клеток на мл. Однако в конкретных композициях количество микроорганизма может различаться, как это описывается здесь.

Косметическая композиция может содержать носитель или наполнитель, приемлемый
45 для косметического или перорального использования. Фармацевтическая композиция может содержать носитель или наполнитель, приемлемый для фармацевтического или перорального использования. Кормовая или пищевая композиция может содержать носитель или наполнитель, приемлемый для перорального использования.

Настоящее изобретение также относится к применению микроорганизма согласно настоящему изобретению, его инактивированной формы, производного, или мутанта, или аналога, или фрагмента для приготовления композиции, содержащей вышеупомянутый микроорганизм согласно настоящему изобретению, его

5 инактивированную форму, производное, или мутант, или аналог, или фрагмент, особенно косметической композиции, кормовой или пищевой композиции или, фармацевтической композиции для предотвращения и/или лечения неприятного запаха изо рта и/или халитоза.

Такая композиция может быть приготовлена методом, содержащим шаг составления

10 микроорганизма согласно изобретению с носителем или наполнителем, приемлемым для косметического, перорального или фармацевтического использования.

Термин «композиция», используемый согласно настоящему изобретению, относится к композиции(ям), которая(ые) содержит(ат) по меньшей мере один микроорганизм, или мутант, или производное, описанный выше, или инактивированную форму, или

15 аналог, или фрагмент указанного микроорганизма. Предусматривается, что композиции, используемые согласно настоящему изобретению, которые описываются здесь ниже, содержат вышеупомянутые компоненты в любой комбинации. Они могут при желании содержать по меньшей мере один другой компонент, подходящий для предотвращения и/или лечения неприятного запаха изо рта и/или халитоза. Соответственно, они могут

20 при желании содержать любую комбинацию из описанных дальше других ингредиентов. Термин «компоненты, подходящие для предотвращения и/или лечения неприятного запаха изо рта и/или халитоза» охватывает соединения, или композиции, и/или их комбинации, которые известны в данной области техники для снижения неприятного запаха изо рта. Примерами являются соли металлов, такие как хлорид цинка,

25 дезинфицирующие средства, такие как спирт или хлоргексидин, которые используются для лечения языка. Другим примером являются соединения, которые помогают поддерживать рН слюны на физиологически нормальном уровне. Это могут быть вещества, имеющие рН-поднимающие или рН-буферные вещества (например, бикарбонаты, карбамиды, фосфаты, белки и/или соли). Известно, что разновидности

30 микробов, ассоциированных с кариесом и инфекциями слизистой оболочки, благоприятствуют развитию кислой среды; разновидности микробов, ассоциированных с развитием периодонтальной болезни, благоприятствуют развитию рН выше нормальной, в то время как разновидности микробов, ассоциированных с хорошим здоровьем полости рта, благоприятствуют развитию нейтральной рН. Другим примером

35 являются пробиотические бактерии (например, *Lactobacillus* и *Streptococcus*), раскрытые в заявках на патент США US 200707137, US 2006018843 или международной заявке на патент WO 2007/077210, или молочнокислые бактерии, принадлежащие к роду *Weissella*, которые ингибируют рост ЛСС-продуцирующих бактерий путем взаимодействия с ними и выработки перекиси водорода в аэробных и анаэробных условиях, как

40 описано в заявке на патент США US 2006045870. Наконец, БПИВ (бактериоцино-подобные ингибирующие вещества) - продуцирующие штаммы *Streptococcus salivarius* и их экстракты, могут быть упомянуты в этом контексте (заявка на патент США US 2006171901).

Указано, что композиция, используемая в соответствии с настоящим изобретением,

45 может при желании содержать один или более из вышеупомянутых необязательных компонентов, которые подходят для предотвращения и/или лечения неприятного запаха изо рта и/или халитоза. Таким образом, указанная композиция может содержать по меньшей мере два, три, четыре, пять и т.д., т.е. «n» необязательных компонентов, где

«n» является целым числом, большим чем 2 и без ограничений. Указанные необязательные компоненты могут быть объединены в любой возможной комбинации.

Композиция может быть в твердой, жидкой или газообразной форме и может быть, среди прочего, в форме порошка(ов), таблетки(ок), пленочного(ых) препарата(ов), раствора(ов), аэрозоля(ей), гранул, пилюлей, суспензий, эмульсий, капсул, сиропов, жидкостей, эликсиров, экстрактов, настойки, или жидких экстрактов, или в форме, которая особенно подходит для перорального введения.

Жидкие препараты, подходящие для перорального введения, например сиропы, могут быть приготовлены используя воду, обычные сахараиды, такие как сахароза, сорбит и фруктоза, гликоли, такие как полиэтиленгликоль и пропиленгликоль, масла, такие как кунжутное масло, оливковое масло и соевое масло, антисептики, такие как сложный эфир n-гидроксibenзоата, консерванты, такие как производные n-гидроксibenзоата, например n-гидроксibenзоат метил и натрия бензоат, и другие материалы, такие как ароматизаторы, например ароматизатор земляники или мяты перечной.

Далее препараты, подходящие для перорального введения, например таблетки, порошки и гранулы, могут быть получены используя обычные сахараиды, такие как сахароза, глюкоза, маннит и сорбит, крахмал, такой как картофель, пшеница и зерно, неорганические материалы, такие как карбонат кальция, сульфат кальция, гидрокарбонат натрия и хлорид натрия, порошки из растений, такие как кристаллическая целлюлоза, порошок лакричника и порошок горечавки, наполнители, такие как pinedex, дезинтеграторы, такие как крахмал, агар, порошок желатина, кристаллическая целлюлоза, кармеллоза натрия, кармеллоза кальция, карбонат кальция, гидрокарбонат натрия и альгинат натрия, смазывающие вещества, такие как магния стеарат, тальк, гидрированные растительные масла, макрогол и силиконовое масло, связывающие вещества, такие как поливиниловый спирт, гидроксипропилцеллюлоза, метилцеллюлоза, этилцеллюлоза, кармеллоза, желатин и раствор крахмального клейстера, поверхностно-активные вещества, такие как сложный эфир жирной кислоты, и пластификаторы, такие как глицерин. Пленочный(ые) препарат(ы) может(могут) быть приготовлен(ы) методами, известными в данной области техники. Пример приготовления пленки дан в Примере 19.

В случае обычного перорального введения доза описанного выше микроорганизма, или аналога, или фрагмента может быть в сухом весе, как описано выше, по отношению к числу клеток или по отношению к массе, например, от 1 мкг до 50 г, от 1 мкг до 10 г, от 1 мкг до 5 мг, от 1 мкг до 1 мг или любая другая доза субъекту в день или несколькими порциями в день. Далее, в случае дозирования животным доза варьируется в зависимости от возраста и вида животного и природы или тяжести симптомов. Без какого-либо определенного ограничения доза для животных составляет от 0,1 мг до 10 г на 1 кг массы тела, предпочтительно от 1 мг до 1 г на 1 кг массы тела однократно или несколькими порциями в день. Однако эти дозы и количество доз варьируются в зависимости от индивидуальных условий.

Предпочтительно, композиция в соответствии с настоящим изобретением представляет собой косметическую композицию, дополнительно содержащую косметически приемлемый носитель или наполнитель. Более предпочтительно, указанная композиция является средством для чистки зубов, жевательной резинкой, таблеткой, ополаскивателем для рта, зубным эликсиром, зубной нитью или зубной лентой.

Косметическая композиция в соответствии с настоящим изобретением содержит микроорганизм, его инактивированную форму, мутант, производное, аналог или

фрагмент, как описано выше в связи с композицией изобретения, и также носитель, приемлемый для косметического или перорального использования. Предпочтительно, как отмечалось в связи с композицией в соответствии с настоящим изобретением, микроорганизм, инактивированная форма, мутант, производное, аналог или его
 5 фрагмент представляют собой микроорганизм, его инактивированную форму, мутант, производное, аналог или фрагмент, описанные здесь выше. Предпочтительно, косметическая композиция согласно настоящему изобретению предназначена для применения в полости рта. Соответственно, она может быть в форме зубной пасты, средства для чистки зубов, зубного порошка, геля для местного использования в полости
 10 рта, зубного эликсира, средства для зубных протезов, аэрозоля для ароматизации полости рта, таблетки для рассасывания, пероральной таблетки, жевательной резинки, зубной нити или зубной ленты.

Термин «носитель, приемлемый для перорального или косметического использования», используемый здесь, означает подходящую несущую среду, которая
 15 может быть использована для применения настоящих композиций к ротовой полости безопасным и эффективным образом. Такая несущая среда может включать материалы, такие как источники фторид-ионов, дополнительные антикалькулезные агенты, буферы, другие абразивные материалы, источники перекиси, бикарбонатные соли щелочных металлов, загустители, увлажнители, воду, поверхностно-активные вещества, диоксид
 20 титана, систему ароматизаторов, подсластители, ксилит, красители и их смеси. Термин «безопасное и эффективное количество», используемый здесь, означает количество, достаточное для чистки зубов и снижения пигментации/налета/гингивита/зубных камней без повреждения тканей и структур полости рта.

Уровень pH описанных здесь композиций находится в диапазоне предпочтительно
 25 от около 3,0 до около 9,0, при этом предпочтительный pH составляет от около 5,5 до около 9,0 и наиболее предпочтительный pH является от 7,0 до около 8,5 или 9,0.

Косметическая композиция представляет собой средство, которое в обычном режиме использования не проглатывают преднамеренно с целью системного введения
 30 конкретных терапевтических агентов, а скорее его держат в полости рта в течение времени, достаточного для контактирования практически всех зубных поверхностей и/или тканей ротовой полости, с целью действия в полости рта. Пероральная композиция может быть однофазной пероральной композицией или может быть комбинацией двух или более композиций для полости рта.

Термин «средство для чистки зубов», используемый здесь, означает пасту, гель или
 35 жидкие составы, если не указано иначе. Композиция средства для чистки зубов может быть в любой желаемой форме, такой как с глубокими полосами, с поверхностными полосами, многослойной, имеющей гель вокруг пасты или их комбинации. Композиция средства для чистки зубов может находиться в физически разделенной камере дозатора или располагаться вплотную. Композиции средств для чистки зубов раскрыты, например,
 40 в европейском патенте EP-B1 0617608.

Предпочтительные композиции средств для чистки зубов раскрыты в Примерах 13-16. Дополнительно к описанным выше компонентам композиции средств для чистки
 45 зубов этого изобретения могут содержать ряд необязательных компонентов средства для чистки зубов, некоторые из которых описаны ниже. Необязательные компоненты включают, но не ограничиваются, например, связующие компоненты, пенообразующие агенты, ароматизаторы, подсластители, дополнительные агенты против зубного налета, дополнительные абразивные материалы и красители. Эти и другие желаемые компоненты также описаны, например, в патентах США US 5,004,597; US 4,885,155;

US 3,959,458; и US 3,937,807.

Например, зубная паста может включать поверхностно-активные вещества, хелатирующие агенты, источники фторидов, активные вещества для отбеливания зубов и вещества, изменяющие цвет зубов, загустители, увлажнители, ароматизаторы и подсластители, бикарбонатную соль щелочного металла, смешанные носители и/или другие активные агенты.

Одним из предпочтительных необязательных агентов, используемых в соответствии с настоящим изобретением, является поверхностно-активное вещество, предпочтительно поверхностно-активное вещество (ПАВ), выбранное из группы, состоящей из саркозинатных ПАВ, изетионатных ПАВ и тауратных ПАВ. Предпочтительными для использования здесь являются соли щелочных металлов и аммония этих ПАВ. Наиболее предпочтительными являются соли натрия и калия следующих ПАВ: лауроил саркозината, миристоил саркозината, пальмитоил саркозината, стеароил саркозината и олеоил саркозината.

Другим предпочтительным необязательным агентом является хелатирующий агент, такой как винная кислота и ее фармацевтически приемлемые соли, лимонная кислота и цитраты щелочных металлов и их смеси. Хелатирующие агенты способны образовывать комплекс с кальцием, найденным в клеточных стенках бактерий. Хелатирующие агенты могут также разрушать налет за счет удаления кальция из кальциевых мостиков, которые помогают держать эту биомассу интактной.

Для обеспечения эффективности против кариеса принято иметь дополнительное водорастворимое фторидное соединение, которое присутствует в средствах для чистки зубов и других композициях для полости рта в количестве, достаточном для создания концентрации фторид-ионов в композиции при 25°C, и/или в концентрации от около 0,0025 до около 5,0 мас.%, предпочтительно от около 0,005 до около 2,0 мас.%. Широкое разнообразие материалов, дающих фторид-ионы, может использоваться в качестве источников растворимого фторида в данных композициях. Примеры подходящих материалов, дающих фторид-ионы, обнаружены в патентах США US 3,535,421 и US 3,678,154. Представители источников фторид-ионов включают фторид олова, фторид натрия, фторид калия, монофторфосфат натрия и многие другие. Фторид олова и фторид натрия являются особенно предпочтительными, так же как их смеси.

Композиции для ухода за полостью рта настоящего изобретения могут также содержать активные вещества для отбеливания зубов, включая отбеливающие или окисляющие агенты, такие как перекиси, пербораты, перкарбонаты, перокси кислоты, персульфаты, хлориты металлов и их комбинации. Подходящие соединения перекисей включают перекись водорода, перекись мочевины, перекись кальция и их смеси. Предпочтительным перкарбонатом является перкарбонат натрия. Другие подходящие отбеливающие агенты включают калия, аммония, натрия и лития персульфаты и перборат моно- и тетрагидраты, и натрия пирогенфосфат пероксигидрат. Подходящие хлориты металлов включают хлорит кальция, хлорит бария, хлорит магния, хлорит лития, хлорит натрия и хлорит калия. Предпочтительным хлоритом является хлорит натрия. Дополнительными отбеливающими активными веществами могут быть гипохлорит и диоксид хлора.

Дополнительно к отбеливающим агентам, таким как агенты для отбеливания зубов, вещества, изменяющие цвет зубов, можно считать среди активных веществ для ухода за полостью рта полезными в настоящем изобретении. Эти вещества подходят для изменения цвета зубов, чтобы удовлетворить пожелания потребителя. Эти вещества содержат частицы, которые при применении к зубной поверхности модифицируют эту

поверхность с точки зрения поглощения и/или отражения света. Такие частицы оказывают благоприятный эффект на внешний вид при применении пленки, содержащей такие частицы, на поверхности зуба или зубов.

При приготовлении зубных паст или гелей необходимо добавить некоторый загуститель, чтобы обеспечить композиции желаемую консистенцию, обеспечить желаемые характеристики высвобождения активного вещества при использовании, обеспечить стабильность при хранении и стабильность композиции и т.д.

Предпочтительными загустителями являются карбоксивиниловые полимеры,

каррагинан, гидроксиэтилцеллюлоза, ЛАПОНИТ® (изготовлен компанией Роквуд Аддитивс Лимитед) и водорастворимые соли эфиров целлюлозы, такие как карбоксиметилцеллюлоза натрия и карбоксиметилгидроксиэтилцеллюлоза натрия. Также могут использоваться природные камеди, такие как камедь карайи, ксантановая камедь, аравийская камедь и трагакантовая камедь. Коллоидный силикат магния алюминия или высокодисперсный диоксид кремния могут использоваться как часть загустителя, чтобы улучшить текстуру.

Другим необязательным компонентом носителей для местного перорального введения композиций заявленного изобретения является увлажнитель. Увлажнитель служит для предохранения композиций зубных паст от затвердевания под воздействием воздуха, придает композициям во рту ощущение влажности и, для определенных увлажнителей, придает желательный сладкий вкус композициям зубных паст. Увлажнитель, в расчете на чистый увлажнитель, обычно содержит от около 0% до около 70%, предпочтительно от около 5% до около 25 мас.% от композиции. Подходящие увлажнители для использования в композициях заявленного изобретения включают пищевые многоатомные спирты, такие как глицерин, сорбит, ксилит, бутилен гликоль, полиэтиленгликоль и пропиленгликоль, особенно сорбит и глицерин.

Ароматизаторы и подсластители также могут быть добавлены к композициям. Подходящие ароматизаторы включают масло грушанки, масло перечной мяты, масло кудрявой мяты, масло цветов гвоздичного дерева, ментол, анетол, метил салицилат, эвкалиптол, кассию, 1-ментил ацетат, шалфей, эвгенол, масло петрушки, оксанон, альфа-иризон, майоран, лимон, апельсин, пропенилгваестол, корицу, ванилин, тимол, линалоол, глицерин ацеталь коричневого альдегида, известный как CGA, и их смеси. Ароматизаторы обычно используются в композициях на уровне от около 0,001% до около 5 мас.% от композиции.

Подсластители, которые могут использоваться, включают сахарозу, глюкозу, сахарин, декстрозу, левулозу, лактозу, как описано здесь выше, манит, сорбит, фруктозу, мальтозу, ксилит, соли сахараина, тауматин, аспартам, D-триптофан, дигидрохалконы, соли ацесульфама и цикламата, особенно цикламат натрия и сахарин натрия, и их смеси. Композиция предпочтительно содержит от около 0,1% до около 10% этих агентов, предпочтительно от около 0,1% до около 1 мас.% от композиции.

Композиция настоящего изобретения также может включать бикарбонатную соль щелочного металла. Бикарбонатные соли щелочных металлов растворимы в воде и, если не стабилизированы, стремятся высвободить углекислый газ в водную систему. Бикарбонат натрия, также известный как пищевая сода, является предпочтительной солью щелочного металла. Настоящая композиция может содержать от около 0,5% до около 30%, предпочтительно от около 0,5% до около 15%, и наиболее предпочтительно от около 0,5% до около 5% бикарбонатной соли щелочного металла.

Вода, применяемая в приготовлении подходящих для промышленных условий композиций, предпочтительно должна быть с низким содержанием ионов и свободной

от органических примесей. Вода обычно содержит от около 10% до около 50%, и предпочтительно от около 20% до около 40%, от массы водных композиций зубных паст. Эти количества воды включают свободную воду, которая добавляется, плюс та, которая вводится с другими материалами, такими как сорбит. Диоксид титана также может быть добавлен к настоящей композиции. Диоксид титана представляет собой белую пудру, которая добавляет мутность композициям. Диоксид титана обычно содержит от около 0,25% до около 5% от массы композиций для чистки зубов.

Уровень pH композиций изобретения предпочтительно регулируют с помощью использования буферных агентов. Буферные агенты, используемые здесь, относятся к агентам, которые могут быть использованы для регулирования pH композиций на уровень от около 4,5 до около 9,5. Буферные агенты включают фосфат мононатрия, фосфат тринатрия, гидроксид натрия, карбонат натрия, пиродифосфат натрия, лимонную кислоту и цитрат натрия. Буферные агенты могут вводиться на уровне от около 0,5% до около 10 мас.% от настоящих композиций. Уровень pH композиций для чистки зубов измеряется для пропорции 3:1 водной суспензии средства для чистки зубов, например 3 части воды к 1 части зубной пасты.

Другие необязательные агенты, которые могут быть использованы в настоящих композициях, включают диметикон кополиолы, выбранные из алкил- и алкоксидиметикон кополиолов, таких как C12-C20 алкилдиметикон кополиолы и их смеси. В высокой степени предпочтительным является цетилдиметикон кополиол, продаваемый под торговым наименованием Abil EM90. Диметикон кополиол обычно присутствует на уровне от около 0,01% до около 25%, предпочтительно от около 0,1% до около 5%, более предпочтительно от около 0,5% до около 1,5 мас.%. Диметикон кополиолы помогают обеспечивать благоприятное воздействие на зубы. Другие полезные носители включают бифазные рецептуры средств для чистки зубов, такие как те, которые раскрыты в патентах США US 5.213.790; US 5.145.666; US 5.281.410; US 4.849.213 и US 4.528.180.

Косметическая композиция может также включать другие активные агенты, такие как противомикробные средства. К таким агентам относятся водонерастворимые некатионные противомикробные средства, такие как галогенированные дифениловые эфиры, фенольные соединения, включая фенол и его гомологи, моно- и полиалкил и ароматические галофенолы, резорцин и его производные, бисфенольные соединения и галогенированные салициланилиды, бензойные сложные эфиры и галогенированные карбанилиды. Водорастворимые противомикробные средства, среди прочих, включают соли четвертичного аммония и соли бис-бигуанида. Монофосфат триклозана является дополнительным водорастворимым противомикробным средством. Соединения четвертичного аммония включают те, в которых один или два заместителей на четвертичных азотах имеют углеродную цепочку длиной (обычно алкильная группа) от около 8 до около 20, обычно от около 10 до около 18 атомов углерода, в то время как оставшиеся заместители (обычно алкильная или бензильная группа) имеют более низкое число атомов углерода, такое как от около 1 до около 7 атомов углерода, обычно метильные или этильные группы. Додецилтриметиламмония бромид, тетрадецилпиридиния хлорид, домифена бромид, N-тетрадецил-4-этилпиридиния хлорид, додецилдиметил(2-феноксипропил)аммония бромид, бензилдиметилстеарил аммония хлорид, цетилпиридиния хлорид, кватернизированный 5-амино-1,3-бис(2-этилгексил)-5-метилгексагидропиримидин, бензалкония хлорид, бензетония хлорид и метилбензетония хлорид являются примерами типичных противомикробных средств четвертичного аммония. Другими соединениями являются бис[4-(R-амино)-1-пиридиния]

алканы, раскрытые в патенте США US 4,206,215. Другие противомикробные средства, такие как бисглицинат меди, глицинат меди, цитрат цинка и лактат цинка, также могут быть включены. Ферменты представляют собой другой тип активных веществ, которые могут быть использованы в настоящих композициях. Полезные ферменты включают те, которые принадлежат к категории протеаз, литических ферментов, ингибиторов матрицы зубного налета и оксидаз. Протеазы включают папаин, пепсин, трипсин, фицин, бромелин; литические ферменты клеточных стенок включают лизоцим; ингибиторы матрицы зубного налета включают декстраназы, мутаназы; и оксидазы включают оксидазу глюкозы, лактат оксидазу, оксидазу галактозы, оксидазу мочевиной кислоты, пероксидазы, включая пероксидазу хрена, миелопероксидазу, лактопероксидазу, хлорпероксидазу. Дополнительно к противомикробным свойствам оксидазы также имеют отбеливающую/чистящую активность. Такие средства раскрыты в патентах США US 2.946.725 и в US 4.051.234. Другие противомикробные средства включают хлоргексидин, монофосфат триклозана и ароматные масла, такое как тимол. Триклозан и другие агенты этого типа раскрыты в патентах США US 5.015.466 и US 4.894.220. Эти агенты, которые дают эффект против зубного налета, могут присутствовать на уровне от около 0,01% до около 5,0 мас.% от композиции средства для чистки зубов.

Термин «жевательная резинка», определенный здесь, означает кондитерскую композицию, которая подходит для жевания и которая содержит любое подходящее количество эластомера, известного специалисту в данной области техники, предпочтительно количество составляет 2% или больше по массе композиции.

Подходящие компоненты для таблеток для рассасывания и жевательной резинки раскрыты, например, в патентах США US 4.083.955; US 6.770.264 и US 6.270.781.

Предпочтительными таблетками для рассасывания являются те, которые раскрыты в Примерах 11 и 12. Предпочтительная композиция жевательной резинки раскрыта в Примере 17.

Композиции согласно настоящему изобретению предпочтительно содержат эластомер или смесь нескольких различных эластомеров. Эластомерные материалы в общем известны в данной области техники, но наглядные примеры включают бутадиенстирольный каучук (SBR); синтетические смолы; полиизобутилен и изобутилен-изопрен сополимеры; натуральные смолы; чикли; натуральный каучук; джелутонг; балату; гуттаперчу; лечи каспи; сорву и их смеси. Композиции настоящего изобретения предпочтительно содержат от около 2% до около 30%, более предпочтительно от около 5% до около 25%, по массе эластомера. Эти уровни определяют с учетом желательной конечной текстуры жевательной резинки, поскольку, когда суммарный уровень эластомера ниже около 2%, основе композиции не хватает эластичности, жевательной текстуры и способности к прилипанию, в то время как уровни выше 30% делают состав твердым, резиноподобным и обеспечивают тяжелое жевание. Растворители эластомеров также предпочтительно присутствуют в композициях настоящего изобретения, так как они помогают смягчить эластомерный компонент. Предпочтительные примеры растворителей эластомеров для использования здесь включают пентаэритритоловый сложный эфир частично гидрированной экстракционной канифоли, пентаэритритоловый сложный эфир экстракционной канифоли, глицериновый сложный эфир частично димеризованной канифоли, глицериновый сложный эфир полимеризованной канифоли, глицериновый сложный эфир таллового масла, экстракционную или живичную канифоль, глицериновый сложный эфир частично гидрированной канифоли, метиловый сложный эфир частично гидрированной канифоли и их смеси. Композиции настоящего

изобретения предпочтительно содержат от около 2 мас.% до около 50 мас.%, более предпочтительно от около 10 мас.% до около 35 мас.% растворителя эластомеров.

Таблетки для рассасывания согласно настоящему изобретению могут быть приготовлены, например, с помощью принятых в данной области техники методик для формирования прессованных таблеток, где дисахарид диспергирован в прессуемом твердом носителе, при желании объединенном с любыми подходящими вспомогательными средствами таблетирования, такими как смазывающее вещество (например, магния стеарат), и прессуется в таблетки. Твердым компонентом носителя для таких составов для таблетирования может быть растворимое в слюне твердое вещество, такое как сухой водорастворимый крахмал или моносахарид, для того чтобы таблетка для рассасывания легко растворялась при ее держании во рту, высвобождая содержащуюся в ней дисахаридную кислоту в раствор слюны для контакта и абсорбции слизистой оболочкой рта или фарингеальной слизистой оболочкой. Уровень pH описанных выше составов может находиться в диапазоне от около 4 до около 8,5.

Таблетки для рассасывания согласно настоящему изобретению также могут быть приготовлены, используя другие методики, принятые в данной области техники для приготовления твердых составов с однократной дозой.

Ополаскиватель для рта или зубной эликсир согласно настоящему изобретению предпочтительно может быть следующим:

А Масло Menthae	1,2 части
Настойка Arnicae	3,0 части
Настойка Myrrhae	3,0 части
Tween	5,0 частей
Б Спирт 90%	50,0 частей
В Бензоат натрия	0,2 части
Подсластитель (например, части аспартам)	0,02
Вода дистиллированная	до 100

А необходимо хорошо смешать, при перемешивании добавляется Б и затем добавляется В. Полученная в итоге прозрачная жидкость должна фильтроваться в течение 48 часов после приготовления. Другой предпочтительный ополаскиватель для рта описан в Примере 18.

Независимо от лекарственной формы, жидкой или твердой, в одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения лекарственную форму держат во рту пациента в течение периода времени, способствуя контакту микроорганизма, или аналога, или фрагмента вышеупомянутого микроорганизма, принадлежащего к роду молочнокислых бактерий, с ротовой полостью пациента.

Термины «зубная нить» и «зубная лента», используемые здесь, относятся к материалу для вытеснения и удаления разлагающихся остатков пищи, которые скапливаются в межзубных и поддесневых промежутках и для вытеснения и удаления бактерий, налета и/или зубных камней, которые скапливаются в полости рта. Зубная нить или зубная лента дополнительно к микроорганизмам согласно настоящему изобретению, описанным выше, также могут содержать очистители, абразивы, контролирующие зубной налет компоненты, отбеливатели, поверхностно-активные вещества и/или активные компоненты, такие как фториды, противомикробные средства, химиотерапевтические средства или антибиотики. Другими дополнительными средствами являются средства против налета, ароматизаторы и красители. Зубная нить или зубная лента могут быть в любой подходящей форме, известной специалисту в данной области техники, например в форме зубных нитей PTFE (Teflon), описанных, например, в патентах

США US 3,664,915, US 3,953,566, US 3,962,153, US 4,096,227, US 4,187,390, US 4,256,806, US 4,385,093, US 4,478,665, US 4,776,358, US 5,033,488, US 5,209,251, US 5,220,932, US 5,518,012, US 5,718,251, US 5,765,576 или US 5,911,228, в форме межзубных устройств из моноволокна, описанных, например, в патентах США US 3,800,812, US 4,974,615, US 5,760,117, US 5,433,226, US 5,479,952, US 5,503,842, US 5,755,243, US 5,884,639, US 6,003,525 или US 6,027,592, или в форме биокomпонентных лент. Предпочтительно, зубная нить или зубная лента могут быть в форме покрытого эластомером моноволокна, описанного, например, в заявке на патент США US 20050226820, или в форме зубной ленты на основе ориентированного термопластика, описанного, например, в заявке на патент США US 20020144704.

Косметические композиции, описанные здесь выше, могут быть использованы для перорального введения человеку, также как перорального введения животному, предпочтительно млекопитающим, не принадлежащим к человеческому роду, более предпочтительно домашним животным. Если косметическая композиция используется для перорального введения животному, композиция может содержать другие компоненты для такого введения, известные специалистам в данной области техники.

Настоящее изобретение также относится к применению микроорганизма согласно изобретению или его инактивированной формы для приготовления фармацевтической композиции для лечения и/или профилактики неприятного запаха изо рта и/или халитоза. Предпочтительно, фармацевтическая композиция также содержит фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель.

Фармацевтические композиции содержат терапевтически эффективное количество микроорганизма настоящего изобретения и могут быть составлены в разные формы, например в твердую, жидкую, порошковую, водную, лиофилизированную форму.

Фармацевтическая композиция может быть введена с фармацевтически приемлемым носителем пациенту, как описано здесь. В конкретном варианте осуществления изобретения термин «фармацевтически приемлемый» означает одобренный регуляторным органом или другой широко признанной фармакопеей для применения к животным и, в частности, к людям.

Термин «носитель» относится к растворителю, вспомогательному веществу, наполнителю или несущей среде, с которыми вводится терапевтическое средство. Такой носитель является фармацевтически приемлемым, т.е. нетоксичным по отношению к реципиенту в применяемых дозировке и концентрации. Предпочтительно он является изотоническим, гипотоническим или слабо гипертоническим и имеет относительно низкую ионную силу, такую как дает раствор сахарозы. Такими фармацевтическими носителями могут быть стерильные жидкости, такие как вода и масла, включая таковые нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т.п. Солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина также могут применяться в качестве жидких носителей, особенно для впрыскиваемых растворов. Подходящие фармацевтические наполнители включают крахмал, глюкозу, сахарозу, желатин, солод, рис, порошок, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, ион натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропилен, гликоль, воду, этанол и т.п. Наполнитель может содержать лактозу, как описано выше, более предпочтительно лактоза отсутствует. Композиция, при желании, также может содержать незначительные количества смачивающих агентов, или эмульгаторов, или рН-буферных агентов. Эти композиции могут принимать форму растворов, суспензий, эмульсий, таблеток, пилюлей, капсул, порошков, составов с замедленным высвобождением и т.п. Пероральный состав

может включать стандартные носители, такие как фармацевтические марки маннита, крахмала, стеарата магния, сахараина натрия, целлюлозы, карбоната магния и т.д.

Примеры подходящих фармацевтических носителей раскрыты в публикации "Remington's Pharmaceutical Sciences" by E.W.Martin. Обезжиренное молоко, сухое обезжиренное

5 молоко, продукты, не содержащие молока или лактозы, также могут использоваться. Сухое обезжиренное молоко традиционно суспендируют в фосфатно-солевом буфере (ФСБ), автоклавируют или фильтруют для удаления белковых или живых примесей, затем сушат сублимацией, сушат термически, сушат в вакууме или лиофилизируют. Некоторыми другими примерами веществ, которые могут служить в качестве

10 фармацевтических носителей, являются сахара, такие как глюкоза и сахароза; крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; целлюлоза и ее производные, такие как карбоксиметилцеллюлоза натрия, ацетаты этилцеллюлозы и целлюлозы; измельченный в порошок трагакант; солод; желатин; тальк; стеариновые кислоты; стеарат магния; сульфат кальция; карбонат кальция; растительные масла, такие как

15 арахисовые масла, хлопковое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и масло теобромы; многоатомные спирты, такие как пропиленгликоль, глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; агар; альгиновые кислоты; апирогенная вода; изотонический солевой раствор; клюквенные экстракты и фосфатный буферный раствор; сухое обезжиренное молоко; также как другие нетоксичные совместимые вещества,

20 используемые в фармацевтических составах, такие как витамин С, эстроген и эхинацея, например. Смазывающие и смазывающие вещества, такие как лаурилсульфат натрия, также как красители, ароматизаторы, скользящие вещества, наполнители, вещества для таблетирования, стабилизаторы, антиоксиданты и консерванты, также могут присутствовать.

25 Различные носители и/или наполнители, подходящие для перорального введения, которые хорошо известны в данной области техники, могут быть использованы для цели изобретения. Композиция, при желании, также может содержать различные известные вспомогательные вещества, такие как, например, консерванты, отверждающие вещества, смазывающие вещества, эмульгаторы, стабилизаторы, эссенцию и т.п. Такие

30 композиции будут содержать терапевтически эффективное количество вышеупомянутых соединений, предпочтительно в очищенной форме, вместе с подходящим количеством носителя, чтобы обеспечить форму для соответствующего введения пациенту. Состав должен подходить способу введения.

Обычно компоненты поставляются либо раздельно, либо смешиваются вместе в

35 единую лекарственную форму, например в виде порошка, высушенного лиофилизацией, или безводного концентрата в герметичном контейнере, таком как ампула или саше, указывая количество активного вещества. Когда композиция должна вводиться путем инфузии, она может быть диспергирована в инфузионном флаконе, содержащем стерильную воду фармацевтического качества или солевой раствор.

40 Фармацевтическая композиция изобретения может быть составлена в виде нейтральных или солевых форм. Фармацевтически приемлемые соли включают те, которые образованы с анионами, такими как анионы, полученные из соляной, фосфорной, уксусной, щавелевой, винной кислоты и т.д., и соли, которые образованы с катионами, такими как катионы, полученные из натрия, калия, аммония, кальция,

45 гидроксидов железа, изопропиламина, триэтиламина, 2-этиламиноэтанола, гистидина, прокаина и т.д.

При желании могут использоваться анализы *in vitro*, чтобы помочь идентифицировать оптимальные диапазоны дозировки. Точная доза, которая будет использоваться в

составе, также будет зависеть от пути введения и тяжести болезни или нарушения и должна быть определена в соответствии с решением практикующего врача и обстоятельств каждого пациента. Эффективные дозы могут быть экстраполированы из кривых зависимости «доза-эффект», полученных на тест-системах *in vitro* или на животных моделях. Предпочтительно фармацевтическая композиция вводится непосредственно или в комбинации со вспомогательным веществом. Вспомогательные вещества могут быть выбраны из группы, состоящей из хлорохина, протонных полярных соединений, таких как пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, глицерин, этанол, 1-метил L-2-пирролидон или их производные, или апротонных полярных соединений, таких как диметилсульфоксид (ДМСО), диэтилсульфоксид, ди-н-пропилсульфоксид, диметилсульфон, сульфолан, диметилформамид, диметилацетамид, тетраметилмочевина, ацетонитрил или их производные. Эти соединения добавляются, учитывая ограничения уровня pH. Композиция, используемая в соответствии с настоящим изобретением, может быть введена позвоночному. Термин «позвоночное», используемый здесь, подразумевает то же значение, которое обычно понимает под этим термином обыкновенный специалист в данной области техники. В частности, «позвоночное» охватывает млекопитающих, конкретнее, людей.

Термин «введенный» означает введение терапевтически эффективной дозы вышеупомянутой композиции. Под термином «терапевтически эффективное количество» подразумевается доза, которая оказывает действие, для которого она вводится, предпочтительно это противокариозный эффект. Точная доза будет зависеть от цели лечения и будет устанавливаться специалистом в данной области техники, используя известные методики. Как известно в данной области техники и описано выше, могут быть необходимы поправки на системную доставку по сравнению с локальной доставкой, поправки на возраст, вес тела, общее здоровье, пол, диету, время введения, лекарственное взаимодействие и множество условий, и они будут определяться рутинным экспериментированием специалистами в данной области техники.

Способы применимы и в терапии человека, и в ветеринарии. Соединения, описанные здесь, обладающие требуемой терапевтической активностью, могут быть введены в физиологически приемлемом носителе пациенту, как здесь описано. В зависимости от способа введения, соединения могут быть составлены в множество форм, что обсуждается ниже. Концентрация терапевтически активного соединения в составе может варьироваться от около 0,1-100 мас.%. Вещества могут вводиться по отдельности или в комбинации с другими средствами.

Введение фармацевтической композиции может быть осуществлено разными путями, как описано выше, включая в качестве неограничивающих примеров пероральное, подкожное, внутривенное, внутриартериальное, внутриузловое, интрамедуллярное, интратекальное, внутрижелудочковое, интраназальное, внутрибронхиальное, трансдермальное, внутривлагалищное, интраперитонеальное, внутримышечное, внутрилегочное, вагинальное, ректальное или внутриглазное введение.

Предпочтительно, введение является пероральным или трансбуккальным. Лечащий врач и показатели клинического состояния определяют режим дозирования. Как хорошо известно в области медицины, дозировки для любого пациента зависят от многих факторов, включая размер пациента, площадь поверхности тела, возраст, конкретное вводимое соединение, пол, время и путь введения, общее здоровье и наличие других лекарственных средств, вводимых одновременно. Обычная доза может быть, например, в диапазоне от 0,001 до 1000 мкг; однако предусматриваются дозы ниже или выше этого примерного диапазона, особенно учитывая вышеупомянутые факторы.

Лекарственное средство предпочтительно дается один раз в неделю, однако в ходе лечения лекарственное средство может даваться через намного более длинные временные интервалы и при необходимости может даваться через намного более короткие временные интервалы, например ежедневно. В предпочтительном случае иммунный ответ контролируется используя описанные здесь способы и другие способы, известные специалистам в данной области техники, и дозировки оптимизируются, например, по времени, количеству и/или композиции. Прогресс можно контролировать с помощью периодического обследования. Фармацевтическая композиция изобретения может быть введена местно или системно. Также предусматривается, что фармацевтические композиции применяются в комбинированной терапии, т.е. в совместном введении с другими медикаментами или лекарственными средствами, например другими лекарственными средствами для предотвращения, лечения или улучшения кариеса, описанными здесь.

В другом предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение касается применения микроорганизма согласно настоящему изобретению для приготовления композиции для лечения и/или профилактики неприятного запаха изо рта и/или халитоза, где композиция представляет собой продукт питания или кормовой продукт и к продуктам питания или кормовым продуктам, содержащим микроорганизм согласно настоящему изобретению, его инактивированную форму, мутант, производное, аналог или фрагмент. Предпочтительно композиция в форме продукта питания или кормового продукта представляет собой пищевую или кормовую композицию, содержащую микроорганизм, его инактивированную форму, мутант, производное, аналог или фрагмент, описанные здесь выше, также содержащие перорально приемлемый носитель или наполнитель.

«Продукт питания» или «кормовой продукт» содержат любой съедобный, обладающий приятным вкусом и/или годный для питья материал для млекопитающих, например людей или животных, например домашних животных, как описано здесь. Продукт питания и кормовой продукт описаны здесь в другом месте. «Перорально приемлемый носитель» описан здесь выше и предпочтительно он является нетоксичным и пищевого и/или кормового назначения. Кроме того, этот термин также охватывает носители, упомянутые в связи с фармацевтической композицией, используемой в соответствии с настоящим изобретением.

В соответствии с настоящим изобретением термин «продукт питания» охватывает все съедобные и годные для питья еду и напитки.

Соответственно, микроорганизм, его инактивированная форма, производное, аналог или фрагмент могут быть включены в еду или напиток. Они, например, представляют собой жевательную резинку, спрей, напиток, леденцы, молочную смесь, мороженое, замороженный десерт, сладкую заправку для салата, молочные заготовки, сыр, творог, йогурт без лактозы, подкисленное молоко, сливки для кофе или взбитые сливки и т.п.

Основанные на молоке продукты предусматриваются в пределах изобретения. Под молоком, однако, подразумевается, что оно животного происхождения, такого как корова, коза, овцы, буйвол, зебра, лошадь, осел или верблюд и т.п. Молоко может быть в природном состоянии, ресуспендированном, обезжиренном или обогащенном соединениями, необходимыми для роста бактерий или для последующей обработки сквашенного молока, такими как жир, белки дрожжевого экстракта, пептон и/или поверхностно-активное вещество, например. Термин «молоко» также относится к тому, что обычно называют растительным молоком, то есть экстрактами растительного материала, который был каким-либо образом обработан, такого как стручковые

растения (соя культурная, нут культурный, чечевица и т.п.) или масличное семя (рапс, соя культурная, сезам, хлопок и т.п.), чей экстракт содержит белки в растворе или в коллоидной суспензии, которые способны к коагуляции при химическом воздействии, кислотной ферментации и/или нагревании. Наконец, слово «молоко» также обозначает смеси животного и растительного молока.

Когда микроорганизм этого изобретения, его инактивированная форма, или производное, или аналог, или фрагмент добавляется в йогурт и т.п., имеющее схожее содержимое, обычно достаточно добавить микроорганизм этого изобретения в концентрации около 10^4 - 10^7 клеток/мл.

Такой продукт питания, напиток или корм могут быть произведены обычным способом производства продуктов питания и напитков или корма, включая добавление активного ингредиента к сырому или приготовленному материалу продукта питания, напитка или корма. Продукт питания, напиток или корм в соответствии с данным изобретением могут формоваться и гранулироваться тем же способом, который обычно используется для продуктов питания, напитков или корма. Методы формования и гранулирования включают методы грануляции, такие как грануляция в псевдооживленном слое, вихревая грануляция, грануляция экструзией, роликовая грануляция, грануляция в газовом потоке, грануляция с прессованием и формованием, грануляция дроблением, грануляция распылением, и инъекционная грануляция, методы нанесения покрытий, такие как смазывание форм, нанесение покрытий в псевдооживленном слое, и сухое покрытие, сушка со взрыванием, метод с избыточным паром, метод с использованием перфорированных лотков, методы расширения, такие как микроволновый инкубационный метод, и методы экструзии с экструзионными грануляционными машинами и экструдерами.

Продукт питания, напиток или корм настоящего изобретения включают любой продукт питания, напиток или корм, которые содержат микроорганизм изобретения, его инактивированную форму, производное, или аналог, или фрагмент в качестве активного компонента. Активный компонент в продукте питания, напитке или корме конкретно не ограничивается никакой концентрацией, пока готовый продукт питания, напиток или корм могут проявлять их активность, выраженную в снижении неприятного запаха изо рта. Концентрация активного компонента предпочтительно является от 0,001 до 100%, более предпочтительно от 0,01 до 100% и наиболее предпочтительно от 0,1 до 100% от массы продукта питания, напитка или корма, содержащего такой активный компонент, или по отношению к количеству клеток, описанных здесь.

Конкретные продукты питания или напитки, к которым добавляется активный компонент, включают, например, соки, освежающие напитки, супы, чай, кисломолочные напитки, молочные продукты, такие как сквашенное молоко, льды, масло, сыр, обработанное молоко и обезжиренное молоко, мясные продукты, такие как ветчина, колбаса и гамбургер, выпечка с мясом рыбы, яичные продукты, такие как приправленные яичные рулетики и яичный курд, кондитерские изделия, такие как печенье, желе, закуски, и жевательная резинка, хлеба, лапша, рассолы, копченые продукты, высушенные рыбы и заправки. Форма продукта питания или напитка включает, например, порошковые продукты, пластообразные продукты, бутилированные продукты, консервы, продукты, обработанные в автоклаве, продукты в капсулах, продукты в таблетках и жидкие продукты.

Продукт питания или напиток в соответствии с изобретением, который будет приниматься младенцами, предпочтительно является пищевыми композициями для детей. Такие пищевые композиции для детей включают модифицированное молоко,

подготовленное для младенцев, молоко с расщепленным белком, специальное модифицированное по питательным веществам молоко, или детское питание, или питание, приготовленное для малышей. Форма пищевой композиции для младенцев включает, но конкретно не ограничена ими, порошок, сухое молоко высушенное и мелкодисперсное и детское питание и также включает обычные продукты, такие как мороженое, сквашенное молоко и желе для детского питания.

Пищевая композиция для младенцев в соответствии с данным изобретением преимущественно состоит из белка, липида, сахара, витаминов и/или минералов. В пищевой композиции активный ингредиент смешивается с этими компонентами.

Белок включает белки молока, такие как обезжиренное молоко, казеин, сырная сыворотка, концентрат сывороточного белка, и изолят сывороточного белка и его фракции, такие как альфа-s-казеин, бета-казеин, альфа-лактоальбумин и бета-лактоглобулин. Далее могут использоваться яичный белок, такой как белок яичного желтка, белок яичного белка, и яичный альбумин, или белок сои, такой как обезжиренный белок сои, выделенный белок сои и концентрированный белок сои. Кроме них, белки, такие как пшеничная клейковина, белок мяса рыбы, белок мяса рогатого скота и коллаген также могут приемлемо использоваться. Далее фракции этих белков, пептиды от их кислотной или ферментной обработки, или свободные аминокислоты также могут приемлемо использоваться. Свободные аминокислоты могут служить источниками азота и могут дополнительно использоваться, чтобы оказать определенное физиологическое действие. Такие свободные аминокислоты включают, например, таурин, аргинин, цистеин, цистин и глютамин. Липид включает животные жиры и масла, такие как молочный жир, свиной жир, жир говядины и рыбий жир, растительные масла, такие как соевое масло, рапсовое масло, кукурузное масло, кокосовое масло, пальмовое масло, пальмоядровое масло, сафлоровое масло, перилловое масло, льняное масло, масло примулы вечерней, среднепочечный триглицерид жирной кислоты и хлопковое масло, созданные с помощью бактерий жиры и масла, и их фракционированные масла, их гидрированные масла и их масла, полученные путем переэтерификации. Количество липида, которое будет смешиваться, варьируется в зависимости от применения.

Сахарид включает, например, один или более из крахмала, растворимых полисахаридов, декстрина, моносахаридов, таких как сахароза, лактоза, как описано здесь, мальтоза, глюкоза и фруктоза и другие олигосахариды. Общее количество такого сахара предпочтительно составляет от 40 до 80 мас.% от общего содержания сухого вещества в пищевой композиции. Далее искусственные подсластители, такие как аспартам, могут приемлемо использоваться. Количество искусственного подсластителя соответственно составляет от 0,05 до 1,0 мас.% от общего содержания сухого вещества в пищевой композиции.

Витамины включают, но не ограничены ими, ликопен как существенный компонент и дополнительно включают, например, витамины, такие как витамин А, группа витаминов В, витамины С, D, и Е и группа витаминов К, фолиевая кислота, пантотеновая кислота, никотинамид, карнитин, холин, инозитол и биотин, лишь бы такие витамины могли вводиться младенцам. Такие витамины предпочтительно составляют от 10 мг до 5 г на общее содержание сухого вещества в пищевой композиции для младенцев.

Далее минералы включают кальций, магний, калий, натрий, железо, медь, цинк, фосфор, хлор, марганец, селен и йод. Такие минералы предпочтительно составляют от 1 мг до 5 г на общее содержание сухого вещества в пищевой композиции для младенцев.

Кроме тех компонентов, которые описаны выше, пищевая композиция для младенцев

в соответствии с данным изобретением может быть смешана с любым компонентом, по желанию смешанным в пищевых композициях, например, диетическая клетчатка, нуклеотиды, нуклеиновые кислоты, ароматизаторы и красители.

5 Продукт питания или напиток в соответствии с данным изобретением может использоваться в качестве здоровых продуктов питания, или напитков, или функциональных продуктов питания, или напитков для предотвращения и/или лечения неприятного запаха изо рта.

10 Когда продукт питания или напиток согласно настоящему изобретению принимаются внутрь, принимаемое количество конкретно не ограничено. Принимаемое количество обычно составляет от 0,1 до 50 г, предпочтительно от 0,5 г до 20 г ежедневно, исходя из общего количества активного ингредиента.

15 Продукт питания или напиток непрерывно принимается внутрь в этом количестве в течение периода времени от одного дня до 5 лет, предпочтительно от 2 недель до одного года. Здесь принимаемое внутрь количество можно скорректировать до подходящего диапазона в зависимости от тяжести симптомов человека, принимающего внутрь продукт питания или напиток, его возраст и вес тела, и т.п.

20 Корм согласно настоящему изобретению может представлять собой любой корм, содержащий активный ингредиент. Корм включает, например, корм для домашних животных, в частности для собак, кошек и крыс, корм для скота, в частности для коров и свиней, корм для кур и индюков, и корма для разведения рыбы, в частности для морского окуня и желтохвоста.

25 Корм может производиться путем соответствующего смешивания активного ингредиента, описанного здесь выше, с необработанным кормовым материалом, включающим, например, хлебные злаки, отруби, масличный жмых, необработанные кормовые материалы животного происхождения, другие необработанные кормовые материалы и очищенные продукты.

Хлебные злаки включают, например, milho, пшеницу, ячмень, овес, рожь, неочищенный рис, гречневую крупу, просо итальянское, просо китайское, злак деканский, кукурузу и сою.

30 Отруби включают, например, рисовые отруби, обезжиренные рисовые отруби, отруби, муку самого низкого сорта, ростки пшеницы, ячменные отруби, кормовые отходы, отруби кукурузные и ростки кукурузы.

35 Масличный жмых включает, например, жмых соевых бобов, соевую муку, жмых льняного семени, жмых семян хлопчатника, жмых арахиса, жмых сафлора, жмых кокоса, пальмовый жмых, жмых сезама, жмых подсолнечника, рапсовый жмых, жмых семени капока и горчичный жмых.

40 Необработанные кормовые материалы животного происхождения включают, например, рыбную муку, import meal, муку из цельного зерна и муку грубого помола, концентрированный рыбный бульон, мясную муку, муку из мяса и костей, кровяную муку, расщепленные волосы, муку из костей, побочные продукты скотобойни, муку из птичьих перьев, куколки тутового шелкопряда, обезжиренное молоко, казеин, сухую сыворотку и криль.

45 Другие необработанные кормовые материалы включают, например, стебли и листья растений, такие как брикеты люцернового сена, мука из листьев люцерны и мука из листьев лжеакалии, побочные продукты кукурузоперерабатывающей промышленности, такие как кукурузная глютенная мука, кукурузный глюиновый корм и жидкий кукурузный экстракт, крахмал, сахар, дрожжи, побочные продукты броидильного промышленности, такие как пивной осадок, солодовые ростки, осадок настоек и осадок

соевого соуса, и сельскохозяйственные побочные продукты, такие как цитрусовые переработанные отходы, отходы соевых бобов, кофейные отходы и отходы какао, маниока, конские бобы, гуаровая мука, морские водоросли, спирулину и хлореллу.

Очищенные продукты включают, например, белки, такие как казеин и альбумин, аминокислоты, крахмал, целлюлозу, сахараиды, такие как сахароза и глюкоза, минералы и витамины.

В случае обеспечения животных кормом согласно настоящему изобретению количество принимаемого корма конкретно не ограничено, но предпочтительно составляет, например, от 0,1 мг до 50 г на 1 кг массы тела в сутки, предпочтительно от 0,5 мг до 20 г на 1 кг массы тела в сутки, исходя из количества активного ингредиента. Корм непрерывно принимается в течение периода времени от одного дня до 5 лет, предпочтительно от 2 недель до одного года. Снова, принимаемое внутрь количество можно скорректировать до подходящего диапазона в зависимости от вида, возраста и веса тела животного, принимающего внутрь корм, и т.п.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к добавкам к продуктам питания, напиткам или кормам, включающим микроорганизм согласно настоящему изобретению, его инактивированную форму, мутант, производное, аналог или фрагмент, так же как к применению микроорганизма согласно настоящему изобретению, его инактивированной формы, мутанта, производного, аналога или фрагмента для приготовления композиции для лечения и/или профилактики неприятного запаха изо рта и/или халитоза, где композиция представляет собой добавку к продуктам питания, напиткам или кормам. Предпочтительно, добавка к продуктам питания или напиткам включает добавку к пищевым композициям для младенцев.

Добавка к продуктам питания может быть произведена обычным способом производства добавок к продуктам питания, напиткам или кормам. В случае необходимости, могут быть приемлемо добавлены добавки для общего использования в продуктах питания, напитках или корме, например, добавки, описанные в справочнике Food Additive Handbook (The Japan Food Additives Association; issued on January 6, 1997), включая подсластители, красители, консерванты, загустители и стабилизаторы, антиоксиданты, фиксаторы окраски, отбеливатели, антисептики, гуммиоснову, горькие настойки, ферменты, осветляющие вещества, кислотообразователь, заправки, эмульгаторы, усилители вкуса, средства для производства, ароматизаторы и экстракты специй. Далее могут быть приемлемо добавлены обычные сахараиды, крахмал, неорганические материалы, растительные порошки, наполнители, дезинтеграторы, смазывающие вещества, связывающие вещества, поверхностно-активные вещества и пластификаторы, упомянутые ранее для фармацевтических таблеток.

Добавки включают следующие добавки.

Подсластители включают аспартам, лакрицу, стевию, ксилозу и плод тыквы момордики grosfenори (Momordica grosvenori, rakanka). Красители включают каротиноид и экстракт куркумы, флавоноид, карамельный краситель, спирулиновый краситель, хлорофилл, пурпурный краситель на основе сладкого картофеля, пурпурный краситель на основе ямса, перилловый краситель и черничный краситель.

Консерванты включают, например, сульфит натрия, бензоаты, бензойный экстракт, сорбаты и пропионаты. Загустители и стабилизаторы включают, например, камеди, такие как аравийская камедь и ксантановая камедь, альгинаты, хитин, хитозан, экстракт алоэ, гуаровую камедь, гидроксипропилцеллюлозу, казеин натрия, кукурузный крахмал, карбоксиметилцеллюлозу, желатин, агар, декстрин, метилцеллюлозу, поливиниловый спирт, микроволокнистую целлюлозу, микрокристаллическую целлюлозу, целлюлозу

из морских водорослей, полиакрилат натрия, полифосфат натрия, каррагинан или клеточные стенки дрожжей.

Антиоксиданты включают, например, группу витамина С, этилендиаминтетраацетат натрия, этилендиаминтетраацетат кальция, эриторбовую кислоту, оризанол, катехин, кверцетин, экстракт гвоздики, обработанный ферментом рутин, яблочный экстракт, экстракт кунжутного семени, дибутилгидрокситолуол, экстракт фенхеля, экстракт хрена, водный экстракт сельдерея, экстракт чая, токоферолы, рапсовый экстракт, экстракт кофейного зерна, экстракт семени подсолнечника, феруловую кислоту, бутилгидроксианизол, экстракт листьев черники, экстракт прополиса, экстракт перца, экстракт бальзамина садового, галлиевую кислоту, эвкалиптовый экстракт и экстракт розмарина.

Фиксаторы окраски включают, например, нитрит натрия. Отбеливатели включают, например, сульфит натрия.

Антисептики включают, например, о-фенилфенол. Гуммиоснова включает, например, ацетилтрицинолеат метил, воск лакового дерева (urushi), эфир канифоли, элеми смолу, воск урукури, смола каури, карнаубский воск, сложный эфир жирной кислоты и глицерина, воск спермацета, копайский бальзам, копаловую смолу, каучук, воск рисовых отрубей, воск тростника, шеллак, джелутонг, сложный эфир жирной кислоты и сахарозы, деполимеризованный натуральный каучук, парафин, пихтовый бальзам, сложный эфир жирной кислоты и пропиленгликоля, измельченную целлюлозу, измельченную рисовую шелуху, масло жожоба, полиизобутилен, полибутен, микрокристаллический воск, мастиковую смолу, пчелиный воск и фосфат кальция.

Горькие настойки включают, например, изо-альфа-горькую кислоту, кофеин, экстракт каваратаке (*Coriolus versicolor*), экстракт красной перуанской хинной коры, экстракт коры бархата, экстракт корня горечавки, экстракты из пряностей, ферментативно модифицированный нарингин, экстракт кассии ямайской, теобромин, нарингин, экстракт кассии, экстракт абсента, экстракт изодониса, оливковый чай, экстракт горького апельсина (*Citrus aurantium*), экстракт хмеля и экстракт полыни.

Ферменты включают, например, амилазу, трипсин или реннин.

Осветляющие агенты включают, например, воск лакового дерева и японский воск. Кислотообразователи включают, например, адипиновую кислоту, итаконовую кислоту, лимонные кислоты, янтарные кислоты, ацетат натрия, винные кислоты, диоксид углерода, молочную кислоту, фитиновую кислоту, фумаровую кислоту, яблочную кислоту и фосфорную кислоту. Заправки включают, например, аминокислоты, такие как аспарагин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, глутамин, аланин, изолейцин, глицин, серин, цистеин, тирозин, лейцин и пролин, нуклеиновые кислоты, такие как инозинат натрия, уридилат натрия, гуанилат натрия, цитидилат натрия, рибонуклеотид кальция и рибонуклеотид натрия, органические кислоты, такие как лимонная кислота и янтарная кислота, хлорид калия, солевой раствор с уменьшенным количеством хлорида натрия, необработанный хлорид калия, соль сыворотки, фосфат трикалия, гидрофосфат дикалия, дигидрофосфат калия, гидрофосфат динатрия, дигидрофосфат натрия, фосфат тринатрия и экстракт хлореллы.

Усилители вкуса включают, например, цинковые соли, группу витамина С, различные аминокислоты, 5-адениловую кислоту, хлорид железа, гесперидин, различный прокаленный кальций, различный непрокаленный кальций, дибензоилтиамин, гидроксид кальция, карбонат кальция, тиамин гидрохлорида соль, каротин водорослей Дуналиелла (*Dunaliella Carotene*), каротин, токоферол, никотиновую кислоту, каротин моркови, каротин пальмового масла, пантотенат кальция, витамин А, гидроксипролин,

дигидропирофосфат кальция, железистый пирофосфат, пирофосфат железа, ферритин, гемовое железо, менахинон, фолиевую кислоту и рибофлавин.

Средства для производства включают, например, вспомогательные средства для обработки, такие как ацетон и ионообменная смола. Ароматизаторы включают, например, ванильную эссенцию и экстракты специй включают, например, экстракт стручкового перца.

Эти различные добавки могут быть добавлены к активному ингредиенту с учетом способа введения в соответствии с данным изобретением.

Композиция согласно настоящему изобретению охватывает микроорганизм согласно изобретению. Предусматривается, что композиции содержат микроорганизм в форме пробиотического микроорганизма. А именно, дополнительно к пробиотическому эффекту, вышеупомянутый пробиотический микроорганизм, принадлежащий группе молочнокислых бактерий, полезен для лечения и/или предотвращения неприятного запаха изо рта и/или халитоза. Количество указанного пробиотического микроорганизма достаточно велико, чтобы значительно облегчить заболевание, которое будет лечиться, предпочтительно неприятный запах изо рта, но и достаточно низко, чтобы избежать серьезных побочных действий (оправданное соотношение преимущество/риск) в рамках тщательного медицинского обследования. Эффективное количество указанного пробиотического микроорганизма будет варьироваться в зависимости от конкретной цели, которой необходимо добиться, от возраста и физического состояния лечащегося пациента, тяжести основной болезни, продолжительности лечения, природы одновременно проводимой терапии и конкретного используемого микроорганизма. Эффективное количество указанного пробиотического микроорганизма, таким образом, будет минимальным количеством, которое обеспечит желаемый эффект. Наличие, например, $1 \cdot 10^9$ бактерий в виде жизнеспособных или нежизнеспособных целых клеток в 0,05 мл раствора фосфатно-солевого буфера или в 0,05 мл суспензии агара, или эквивалент по сухому весу фрагментов клеточной стенки, является эффективным при введении в количествах от около 0,05 мл до около 20 мл.

Самое весомое практическое преимущество состоит в том, что пробиотический организм может применяться удобным образом, таким как пероральное введение. В зависимости от пути введения может потребоваться, чтобы активные ингредиенты, которые содержат указанные пробиотические организмы, были покрыты материалом, чтобы защитить указанные организмы от действия ферментов, кислот и других природных факторов, которые могут инактивировать указанные организмы. Чтобы применить пробиотические организмы каким-либо путем, отличным от парентерального введения, они должны быть покрыты или введены с материалом, чтобы предотвратить инактивацию. Например, пробиотические организмы можно ввести совместно с ферментными ингибиторами или в липосомах. Ферментные ингибиторы включают панкреатический трипсиновый ингибитор, диизопропилфторофосфат (ДФФ) и трасилол. Липосомы включают эмульсии вода-в-масле-в-воде P40, так же как обычные и специального назначения липосомы, которые транспортируют молочнокислые бактерии или их побочные продукты к урогенитальной поверхности. Дисперсии также могут быть приготовлены, например, в глицерине, жидких полиэтиленгликолях, и их смесях, и в маслах. Обычно дисперсии приготавливаются путем включения различных стерилизованных пробиотических организмов в стерильную несущую среду, которая содержит основную дисперсионную среду и необходимые другие ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных впрыскиваемых растворов предпочтительными способами приготовления являются

вакуумная сушка и сушка сублимацией, которые дают порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный желаемый ингредиент из предварительно профильтрованного в стерильных условиях раствора этих ингредиентов.

Дополнительные предпочтительные способы приготовления включают в качестве

5 неограничивающих примеров лиофилизацию и термическую сушку.

Композиция также охватывает продукты, предназначенные для перорального или трансбуккального введения, которые содержат фармацевтически приемлемый носитель, описанный здесь, к которому или в который клетки вышеупомянутого микроорганизма, принадлежащего к группе молочнокислых бактерий, добавляются в новой форме,

10 например сконцентрированной или высушенной. Конечно, также могут добавляться инактивированная форма, производное, или аналог, или фрагмент указанного микроорганизма, или любая комбинация указанного микроорганизма, его производного, и/или аналога, и/или фрагмента, раскрытых здесь. Эти продукты могут быть обеспечены в форме принимаемой внутрь суспензии, геля, распылителя, капсулы, твердой

15 желатиновой капсулы, сиропа или в любой другой галеновой форме, известной специалистам в данной области техники.

Когда пробиотические организмы соответствующим образом защищены, как описано выше, активное соединение может вводиться перорально, например, с инертным растворителем или с усвояемым пищевым носителем, или может быть включено в

20 твердую или мягкую желатиновую капсулу, или может быть спрессовано в таблетки, предназначенные для прохождения через желудок (то есть покрытые кишечнорастворимой оболочкой), или может быть объединено непосредственно с продуктами питания. Для терапевтического перорального введения пробиотические организмы могут быть объединены с наполнителями и использоваться в форме

25 принимаемых внутрь таблеток, таблеток для медленного растворения в щечном кармане, таблеток, капсул, эликсиров, суспензий, сиропов, пластинок и т.п. Композиции или составы согласно настоящему изобретению приготовлены так, чтобы пероральная единичная лекарственная форма содержала, например, около 1×10^9 жизнеспособных или нежизнеспособных, например, молочнокислых бактерий на миллилитр.

30 Пробиотический организм составляют для удобного и эффективного введения в эффективном количестве с подходящим фармацевтически приемлемым или приемлемым для потребления в пищу носителем в единичной лекарственной форме, как раскрыто выше. Единичная лекарственная форма может, например, содержать основное активное

35 соединение в количестве приблизительно 10^9 жизнеспособных или нежизнеспособных, например, молочнокислых бактерий на миллилитр. В случае композиций, содержащих дополнительные ингредиенты, таких как пребиотики, дозировки определяют, основываясь на обычной дозе и способе введения указанных ингредиентов.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение касается способа профилактики и/или лечения неприятного запаха изо рта и/или халитоза.

40 Предпочтительно способ профилактики и/или лечения включает введение субъекту микроорганизма согласно настоящему изобретению или инактивированной формы, или мутанта, производного, аналога или фрагмента указанного микроорганизма, описанного здесь выше. Предпочтительно, субъект, который будет лечиться, является животным. Более предпочтительно, животное является млекопитающим, еще более

45 предпочтительно млекопитающее является млекопитающим домашним животным. В предпочтительном варианте осуществления изобретения домашнее животное является собакой, кошкой, хомяком, обезьяной, крысой или мышью. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения животное является представителем рогатого

скота, лошастью, свиньей, ослом, овцой или козой. В другом предпочтительном воплощении млекопитающее является человеком.

Введение микроорганизма согласно изобретению в контексте способа лечения и/или профилактики настоящего изобретения может быть выполнено в любой подходящей форме, известной специалисту в данной области техники. Предпочтительно, введение охватывает использование и применение композиций, как описано здесь выше, которые могут при желании содержать, например, фармацевтические или косметические носители или наполнители, как описано здесь выше. Дозировка и длительность действия могут быть установлены согласно любой подходящей информации, известной специалисту в данной области техники. Предпочтительно, указанная дозировка и период действия могут быть установлены, как описано здесь выше.

Изобретение иллюстрируется Фигурами 1-7, на которых представлено:

ФИГУРА 1 демонстрирует результаты эксперимента, исследующего влияние снижения концентрации пептидов молочнокислыми бактериями на продуцирование H_2S граммотрицательными анаэробными бактериями, присутствующими в слюне.

ФИГУРА 2 демонстрирует результаты эксперимента, исследующего влияние супернатантов молочнокислых бактерий на рост *S. salivarius*, как описано в Примере 3.

ФИГУРА 3 демонстрирует результаты эксперимента, исследующего влияние молочнокислых бактерий на рост *P. gingivalis*, как описано в Примере 5.

ФИГУРА 4 демонстрирует результаты эксперимента, исследующего влияние термически обработанного супернатанта молочнокислых бактерий на рост *S. salivarius*, как описано в Примере 6.

ФИГУРА 5 демонстрирует результаты эксперимента, исследующего снижение концентрации пептидов молочнокислыми бактериями согласно изобретению.

ФИГУРА 6 демонстрирует результаты эксперимента, исследующего снижение концентрации пептидов лиофилизированными молочнокислыми бактериями согласно изобретению.

ФИГУРА 7 демонстрирует типичный аминокислотный профиль экстракта PTU.

Лучшее понимание данного изобретения и его многих преимуществ придет из следующих примеров, представленных только в иллюстративных целях и не предназначенных для какого-либо ограничения объема настоящего изобретения.

Пример 1

TSY-среда:

TSY-смесь (Difco, USA)	30 г/л
Дрожжевой экстракт (Deutsche Hefewerke, Germany)	3 г/л
MRS облегченная среда:	
Пептон Триптиказа:	1,0 г/л
Дрожжевой экстракт:	0,5 г/л
Диаммония гидроцитрат:	0,2 г/л
Натрия ацетат:	0,5 г/л

MgSO ₄ -гептагидрат:	0,050 г/л
MnSO ₄ -моногидрат:	0,025 г/л
D-глюкозы-моногидрат:	1 г/л
K ₂ HPO ₄ :	0,2 г/л
Олеиновая кислота:	0,1% (масс./об.)
Искусственная среда:	
Гуанин:	0,1 г/л

	Цитозин:	0,1 г/л
	Тимидин:	0,1 г/л
	2'-дезоксиаденозин:	0,1 г/л
	2'-деоксиуридин:	0,1 г/л
	K ₂ HPO ₄ :	2 г/л
5	Натрия ацетат:	5 г/л
	MgSO ₄ -гептагидрат:	0,1 г/л
	Ди-аммония гидроцитрат:	2 г/л
	CaCl ₂ -дигидрат:	0,5 г/л
	Олеиновая кислота:	0,1% (масс./об.)
10	Цианокобаламин:	0,02 мг/л
	Рибофлавин:	10 мг/л
	Фолиевая кислота:	0,2 мг/л
	Пиридоксал-5-фосфат-моногидрат:	10 мг/л
	4-аминобензойная кислота:	0,2 мг/л
	D(+)-биотин:	1 мг/л
15	Аскорбиновая кислота:	500 мг/л
	Никотиновая кислота:	10 мг/л
	Са-пантотенат:	10 мг/л
	Тиамин:	1 мг/л
	Кобальт(II)-нитрат-гексагидрат:	500 мг/л
	MnSO ₄ -моногидрат:	20 мг/л
20	MgSO ₄ -гептагидрат:	500 мг/л
	Na ₂ MoO ₄ :	0,04 мг/л
	PTU-экстракт (Ohiy, Deutsche Hefewerke, Germany): D- глюкозы-моногидрат:	15 г/л (или как установлено в другом месте) 10 г/л
	FAB среда:	
	Пептона смесь:	15,0 г/л
25	Дрожжевой экстракт:	10,0 г/л
	Натрия тиогликолят:	0,5 г/л
	Натрия хлорид:	2,5 г/л
	Агар No.1:	0,75 г/л
	L-цистеин HCl:	0,5 г/л
	Резазурин:	0,001 г/л
30	Натрия бикарбонат:	0,4 г/л
	Гемин:	0,005 г/л
	Витамин К:	0,0005 г/л

Хранение и рост

Хранение и рост штаммов может происходить с использованием обычных операций. Например, штаммы могут храниться как замороженное сырье при -80°C. 1 мл культуры может выращиваться до стационарной фазы (OD₆₀₀/мл 4-8) в среде MRS и смешиваться с 500 мкл стерильного 50% раствора глицерина и замораживаться.

Культуры *S. salivarius* выращивали в среде TSY до стационарной фазы (OD₆₀₀/мл 1-2) и обрабатывали так, как упоминалось выше. Штамм *S. salivarius*, предпочтительно используемый в экспериментах, был штаммом *S. salivarius* DSM 20560 (Andrews and Horder, 1906).

Культивирование *S. salivarius* (DSM 20560), также как изолятов, проводилось в анаэробных условиях в 6-луночных планшетах с 8 мл среды TSY в течение ночи при 37°C.

Молочнокислые бактерии (DSM 19825, 19826, 19827) культивировали в анаэробных условиях в 150 мкл искусственной среды в 96-луночных планшетах в течение 24 часов при 37°C.

Смешивание молочнокислых бактерий и *S. salivarius* проводили в соотношении клеток

1:100 (молочнокислые бактерии: *S. salivarius*) в $1/2$ среды TSY. Смешивание осуществляли в 96-луночных планшетах.

Культуральную суспензию инкубировали в течение 12 часов в спектрофотометре для микропланшета BioTek PowerWave при 37°C.

В качестве контроля вместо молочнокислой культуры использовали неизрасходованную $1/2$ среды TSY или облегченную среду MRS.

Стимуляция роста *S. salivarius* была видна при сравнении максимальной оптической плотности ($OD_{600, \max}$) или максимальной скорости роста ($V_{\max}$) с или без молочнокислых бактерий после 10 часов инкубации ($OD_{600, \max}$) или во время экспоненциального роста ($V_{\max}$).

Стимуляцией считается увеличенная, по меньшей мере, на 10% максимальная оптическая плотность ($OD_{600, \max}$) или максимальная скорость роста ($V_{\max}$).

Пример 2

Таксономическая классификация штаммов

Таксономическую классификацию штаммов проводили согласно их схеме ферментации углеводов. Классификацию осуществляли используя систему API 50 CH (bioMarieux, France) и анализировали используя программное обеспечение APILAB PLUS version 3.3.3 (bioMarieux, France).

Пример 3

Исследование стимуляции роста *Streptococcus salivarius* супернатантом молочнокислых бактерий

Бактерии культивировали согласно Примеру 1. Супернатант молочнокислых бактерий (в частности, DSM 19826) получали центрифугированием при 4000·g в течение 15 мин. Смешивание супернатанта молочнокислых бактерий с *S. salivarius* проводили в объемном соотношении от 2:1 до 4:1 (*S. salivarius*: супернатант молочнокислых бактерий) в $1/2$ среды TSY. Смешивание осуществляли в 96-луночных планшетах. Культуральную суспензию инкубировали в течение 12 часов в спектрофотометре для микропланшета BioTek PowerWave при 37°C. В качестве контроля вместо супернатанта молочнокислых бактерий использовали неизрасходованную $1/2$ среды TSY или облегченную среду MRS.

Стимуляция роста оценивалась согласно Примеру 1. Можно было наблюдать удачную стимуляцию роста *S. salivarius* супернатантами молочнокислых бактерий. Результаты показаны на Фигуре 2.

Пример 4

Отсутствие стимуляции патогенного представителя оральной флоры *S. mutans*

Культуры *S. salivarius* выращивали согласно Примеру 1. *Streptococcus mutans* (DSM 20253) выращивали в 5 мл среды TSY в закрытых 15-миллилитровых пробирках Falcon в течение ночи. Бактерии полости рта смешивали в объемном соотношении 2:1 с супернатантом молочнокислых бактерий и оценивали рост согласно Примеру 1. В качестве контроля вместо супернатанта молочнокислых бактерий использовали неизрасходованную $1/2$ среды TSY.

Можно было наблюдать отсутствие какой-либо стимуляции роста оральной патогенной бактерии *S. mutans* молочнокислыми бактериями.

Более того, отсутствие стимуляции роста *S. mutans* можно оценить посредством следующего анализа.

Молочнокислые бактерии (например, DSM 19825, 19826, 19827) культивировали в

анаэробных условиях в 150 мкл искусственной среды в 96-луночных планшетах в течение 24 часов при 37°C. *Streptococcus mutans* (DSM 20253) выращивали в анаэробных условиях в 5 мл среды TSY в закрытых 15-миллилитровых пробирках Falcon в течение ночи при 37°C. Смешивание молочнокислых бактерий и *S. mutans* проводили в

5 соотношении клеток 1:100 (молочнокислые бактерии:*S. mutans*) в $1/2$ среды TSY.

Смешивание осуществляли в 96-луночных планшетах. Культуральную суспензию инкубировали в аэробных условиях в течение 12 часов в спектрофотометре для микропланшета BioTek PowerWave при 37°C. В качестве контроля вместо культуры

10 молочнокислых бактерий использовали неизрасходованную $1/2$ среды TSY.

Пример 5

Отсутствие стимуляции патогенного представителя оральной флоры *P. gingivalis*

Культуры *S. salivarius* выращивали согласно Примеру 1. *Porphyromonas gingivalis* (DSM 20109) выращивали в анаэробных условиях в 5 мл среды FAB в закрытых 15-

15 миллилитровых пробирках Falcon при 37°C в течение ночи. *P. gingivalis* смешивали в объемном соотношении 2:1 с супернатантом молочнокислых бактерий (из DSM 19826) и культивировали в анаэробных условиях в 96-луночных планшетах. В качестве контроля вместо супернатанта молочнокислых бактерий проводили культивирование *P. gingivalis* с неизрасходованной средой FAB.

20 Никакой стимуляции роста оральной патогенной бактерии *P. gingivalis* молочнокислыми бактериями не наблюдалось. Результаты показаны на Фигуре 3.

Более того, отсутствие стимуляции роста *P. gingivalis* можно оценить посредством следующего анализа.

Молочнокислые бактерии (например, DSM 19825, 19826, 19827) культивировали в 25 анаэробных условиях в 150 мкл искусственной среды в 96-луночных планшетах в течение 24 часов при 37°C. *Porphyromonas gingivalis* (DSM 20709) выращивали в анаэробных условиях в 5 мл среды FAB в закрытых 15-миллилитровых пробирках Falcon в течение ночи при 37°C. Смешивание молочнокислых бактерий и *P. gingivalis* проводили в соотношении клеток 1:100 (молочнокислые бактерии:*P. gingivalis*) в среде 30 FAB. Смешивание осуществляли в 96-луночных планшетах. Культуральную суспензию инкубировали в аэробных условиях в течение 45 часов в анаэробной рабочей станции Whitley DG250 (Meintrup-DWS, Germany) при 37°C. В качестве контроля вместо культуры молочнокислых бактерий использовали неизрасходованную среду FAB.

Пример 6

35 Температурная устойчивость стимулирующей способности молочнокислых бактерий

Бактерии выращивали согласно Примеру 1. Супернатанты молочнокислых бактерий (DSM 19827) инкубировали при 80°C в течение 10 мин в инкубаторе. После охлаждения супернатанта до комнатной температуры супернатант молочнокислых бактерий смешивали в объемном соотношении 1:2 с выращенными культурами *S. salivarius* и 40 оценивали стимуляцию согласно Примеру 1, включая контрольные эксперименты.

(Стимуляцию оценивали, также используя оральные патогенные бактерии, как описано в общих чертах в Примерах 4 и 5. Было показано, что на нестимулирующее поведение молочнокислых бактерий по отношению к оральным патогенным бактериям не влияет термическая обработка.)

45 Можно было наблюдать отсутствие влияние термической обработки на стимулирующую активность по отношению к *S. salivarius*. Результаты показаны на Фигуре 4.

Пример 7

Чувствительность стимуляции к лиофилизации

S. salivarius выращивали согласно Примеру 1. Молочнокислые бактерии культивировали в анаэробных условиях в 50 мл искусственной среды в 100-миллилитровых колбах (Schott, Germany) в течение ночи при 37°C. Супернатант
 5 молочнокислых бактерий получали путем центрифугирования при 4000×g в течение 15 мин. 20 мл супернатанта замораживали до -80°C и лиофилизировали в вакууме в течение 16 часов. Лيوфилизированный супернатант ресуспендировали в 20 мл H₂O.

Ресуспендированный супернатант смешивали с культурой *S. salivarius* в соотношении
 10 2:1 (*S. salivarius*:ресуспендированный супернатант) в ¹/₂ среды TSY в 96-луночных планшетах. Стимуляцию роста оценивали согласно Примеру 1, включая контрольные эксперименты.

Стимулирующая активность не увеличивалась при лиофилизации.

Пример 8

Снижение концентрации пептидов с помощью молочнокислых бактерий

Молочнокислые бактерии (DSM 19827) культивировали согласно Примеру 1. Основную часть культуры культивировали в искусственной среде, содержащей 15 г/л пептидов (экстракт PTU). Среду инокулировали 10 мкл культуральной суспензии и культивировали в анаэробных условиях при 37°C в течение 24 часов. Затем определяли
 20 концентрацию пептидов и оказалось, что она снизилась, по меньшей мере, на 20% после 24 часов. Результаты продемонстрировали эффективное снижение концентрации пептидов растущими молочнокислыми бактериями. Результаты проиллюстрированы на Фигуре 5.

Пример 9

Чувствительность снижения концентрации пептидов к лиофилизации

Молочнокислые бактерии (DSM 19827) культивировали в 100 мл искусственной среды при 37°C в течение 24 часов. Всю культуру центрифугировали при 4000·g в течение 15 мин и ресуспендировали в 20 мл H₂O. 20 мл ресуспендированных молочнокислых
 30 бактерий замораживали до -80°C и лиофилизировали в вакууме в течение 16 часов.

Для анализа расходования пептидов 10 мг лиофилизированных молочнокислых бактерий ресуспендировали в H₂O и центрифугировали при 4000хд в течение 10 мин. 1 мл искусственной среды, содержащей 7 г/л пептидов, добавили к осадку и после 5 мин инкубации при 37°C клетки удаляли центрифугированием. Определяли концентрацию
 35 пептидов в супернатанте. Концентрация пептидов в среде после удаления клеток уменьшалась до 2 г/л. Это соответствует расходованию 0,5 мг пептидов/мг лиофилизированных молочнокислых бактерий.

Эти результаты показывают эффективное снижение концентрации пептидов молочнокислыми бактериями в лиофилизированном состоянии, что проиллюстрировано на Фигуре 6.

Пример 10

Влияние снижения концентрации пептидов с помощью молочнокислых бактерий на продуцирование H₂S грамотрицательными анаэробными бактериями

Молочнокислые бактерии культивировали и лиофилизировали согласно Примеру 8. Для эксперимента 10 мг лиофилизированных молочнокислых бактерий
 45 ресуспендировали в H₂O в глубоколоночном планшете и центрифугировали при 4000·g в течение 10 мин. 1 мл искусственной среды, содержащей 3 г/л пептидов, добавили к осадку и после 5 мин инкубации при 37°C клетки удаляли центрифугированием. Уровень pH среды не изменился при инкубации.

Среду затем инокулировали 50 мкл нестерильной человеческой слюны и инкубировали в анаэробных условиях в течение 6 часов при 37°C. Глубоколуночный планшет накрывали стерильной фильтровальной бумагой, пропитанной ацетатом свинца. Продуцирование сероводорода микроорганизмами из слюны контролировали

отслеживанием почернения фильтровальной бумаги.

Наблюдала сниженное продуцирование N_2S в среде, обработанной молочнокислыми бактериями, сравнивая почернение с контрольным экспериментом без предварительной инкубации с молочнокислыми бактериями.

Эти результаты показывают, что предварительная инкубация среды с молочнокислыми бактериями приводит к уменьшенному продуцированию H_2S во время последующей инкубации среды с микроорганизмами из человеческой слюны.

Пример 11

Композиция таблетки для рассасывания (I)

Композицию таблеток для рассасывания предпочтительно готовят так, как описано в Примере 4 на стр.8 патента Германии DE-C2 3645147, где дополнительно к компонентам, упомянутым в указанном Примере 4, вышеупомянутый микроорганизм, принадлежащий к роду молочнокислых бактерий, добавляют в количестве от 10^2 до 10^{12} , предпочтительно от 10^3 до 10^8 клеток на мг таблетки для рассасывания.

Пример 12

Композиция таблетки для рассасывания (II)

Композицию таблеток для рассасывания предпочтительно готовят так, как описано в Примере 5 на стр.8 патента Германии DE-C2 3645147, где дополнительно к компонентам, упомянутым в указанном Примере 5, вышеупомянутый микроорганизм, принадлежащий к роду молочнокислых бактерий, добавляют в количестве от 10^2 до 10^{12} , предпочтительно от 10^3 до 10^8 клеток на мг таблетки для рассасывания.

Пример 13

Композиция средства для чистки зубов

Композицию средства для чистки зубов предпочтительно готовят так, как описано в Примере 3 на стр.8 патента Германии DE-C2 3645147, где дополнительно к компонентам, упомянутым в указанном Примере 3, вышеупомянутый микроорганизм, принадлежащий к роду молочнокислых бактерий, добавляют в количестве от 10^2 до 10^{12} , предпочтительно от 10^3 до 10^8 клеток на мг средства для чистки зубов.

Пример 14

Композиция средства для чистки зубов на основе мела

Композицию средства для чистки зубов на основе мела предпочтительно готовят так, как описано в главе 7.1.4.4. «Rezepturbeispiel» на стр.205 руководства «Kosmetik», W. Umbach (editor), 2nd edition, Thieme Verlag, 1995, где дополнительно к компонентам, упомянутым в указанной главе на стр.205, вышеупомянутый микроорганизм, принадлежащий к роду молочнокислых бактерий, добавляют в количестве от 10^2 до 10^{12} , предпочтительно от 10^3 до 10^8 клеток на мг средства для чистки зубов на основе мела.

Пример 15

Гелевое средство для чистки зубов на основе кремниевой кислоты/фторида натрия

Композицию гелевого средства для чистки зубов на основе кремниевой кислоты/фторида натрия предпочтительно готовят так, как описано в главе 7.1.4.4. «Rezep-

turbeispiel» на стр.205 руководства «Kosmetik», W. Umbach (editor), 2nd edition, Thieme Verlag, 1995, где дополнительно к компонентам, упомянутым в указанной главе на стр.205, вышеупомянутый микроорганизм, принадлежащий к роду молочнокислых бактерий, добавляют в количестве от 10^2 до 10^{12} , предпочтительно от 10^3 до 10^8 клеток на мг гелевого средства для чистки зубов на основе кремниевой кислоты/фторида натрия.

Пример 16

Композиция средства для чистки зубов против зубного камня

Композицию средства для чистки зубов против зубного камня предпочтительно готовят так, как описано в главе 7.1.4.4. «Rezepturbeispiel» на стр.206 руководства «Kosmetik», W. Umbach (editor), 2nd edition, Thieme Verlag, 1995, где дополнительно к компонентам, упомянутым в указанной главе на стр.206, вышеупомянутый микроорганизм, принадлежащий к роду молочнокислых бактерий, добавляют в количестве от 10^2 до 10^{12} , предпочтительно от 10^3 до 10^8 клеток на мг средства для чистки зубов против зубного камня.

Пример 17

Композиция жевательной резинки

Композицию жевательной резинки предпочтительно готовят так, как описано в Примере 6 на стр.9 патента Германии DE-C2 3645147, где дополнительно к компонентам, упомянутым в указанном Примере 6, вышеупомянутый микроорганизм, принадлежащий к роду молочнокислых бактерий, добавляют в количестве от 10^2 до 10^{12} , предпочтительно от 10^3 до 10^8 клеток на мг жевательной резинки.

Пример 18

Композиция концентрированного ополаскивателя для рта

Композицию концентрированного ополаскивателя для рта предпочтительно готовят так, как описано в главе 7.1.4.4. «Rezepturbeispiel» на стр.206 руководства «Kosmetik», W. Umbach (editor), 2nd edition, Thieme Verlag, 1995, где дополнительно к компонентам, упомянутым в указанной главе на стр.206, вышеупомянутый микроорганизм, принадлежащий к роду молочнокислых бактерий, добавляют в количестве от 10^2 до 10^{13} клеток на мг концентрированного ополаскивателя для рта.

Пример 19

Пленочный препарат

Приготовление пленок:

1) водная фаза

- вода нагревается до 60°C

- аспартам (подсластитель) добавляют при перемешивании

- аспартам полностью растворяется

- полимерный водорастворимый пленкообразующий материал, как, например, Kollicoat IR (полиэтиленгликоль и поливиниловый спирт), или ПВП (поливинилпирролидон), или природные полимеры, такие как альгинаты, добавляют перемешивая, пока они не растворятся

- после 10 мин остаток пленки удаляют

- вышеупомянутый микроорганизм, принадлежащий к роду молочнокислых бактерий, добавляют в количестве от 10^2 до 10^{12} , предпочтительно от 10^3 до 10^8 клеток на готовую ароматическую пленку добавляют после охлаждения смеси; в качестве альтернативы можно добавлять мутант, или производное вышеупомянутого микроорганизма,

принадлежащего к роду молочнокислых бактерий, или аналог, или фрагмент вышеупомянутого микроорганизма, принадлежащего к роду молочнокислых бактерий

2) масляная фаза

- ментол растворяют в масле перечной мяты

5 - полисорбат 80 при перемешивании добавляют к смеси масла перечной мяты и ментола

- эту смесь затем при перемешивании добавляют к пропиленгликолю

- можно добавить необязательные красители (такие как пигменты, лаки)

- при перемешивании масляную фазу медленно смешивают с водной фазой

10 - тонкие пленки механически производят используя режущее устройство

	Состав I		Состав II	
	Вес (г)	Композиция в пленке (%)	Вес (г)	Композиция в пленке (%)
15 Фаза 1				
Аспартам	0,7	1,4	0,7	1,8
Kollicoat IR	35,0	68,5	25,0	65,8
Аскорбиновая кислота	-	-	1,0	2,6
Вишневый ароматизатор	85,0	-	6,0	15,8
Вода деминерализованная			80,0	
20 Фаза 2				
Ментол	1,4	2,7	-	
Масло перечной мяты	5,6	11,0	-	
Полисорбат 80	0,7	1,4	-	
Пропиленгликоль	7,0	13,7	5,0	13,2
	0,7	1,4	-	
25 Зеленый лак		-	0,3	0,8
Азорибуновый лак				
Суммарное количество	136,1	100,0	118,0	100,0
Твердая составляющая	51,1		38,0	

Другие варианты осуществления и применения изобретения будут очевидны специалисту в данной области техники из анализа описания и применения изобретения, раскрытого здесь. Все приведенные здесь по любой причине, включая все публикации, все американские патенты и других стран и все американские заявки на патент и других стран, специально и во всей полноте включены сюда посредством ссылки для любых целей. Следует понимать, что описание и примеры считаются показательными только в действительном объеме и сущности изобретения, обозначенными следующей формулой изобретения.

Номер дела заявителя или агента M3128 PCT S3	Номер Международной Заявки
---	----------------------------

**ССЫЛКИ НА ДЕПОНИРОВАННЫЙ МИКРООРГАНИЗМ ИЛИ ДРУГОЙ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ**
(Правило РСТ 13*bis*)

А. Сделанные ниже ссылки относятся к депонированному микроорганизму или другому биологическому материалу, упоминаемому в описании на странице <u>25</u> , строка <u>19-29</u> .	
В. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ДЕПОЗИТА Другие депозиты идентифицированы на дополнительном листе ☐	
Название учреждения по депонированию НЕМЕЦКАЯ КОЛЛЕКЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ И КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР (DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GMBH)	
Адрес учреждения по депонированию (включая почтовый индекс и страну) Инхоффенштрассе 7В 38124 Брауншвейг Германия	
Дата депонирования 1 ноября 2007 г.	Входящий номер DSM 19825
С. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ СВЕДЕНИЯ (если применимо) Продолжение информации на	

отдельном листе ☐

Заявитель пользуется правами согласно Правилу 32 ЕРС

D. УКАЗАННЫЕ СТРАНЫ, ДЛЯ КОТОРЫХ ДЕЛАЮТСЯ ССЫЛКИ (если ссылки не для всех стран)

E. ОТДЕЛЬНОЕ ПРЕДОСТАВЛЕНИЕ ССЫЛОК (если применимо)

Перечисленные ниже ссылки будут поданы в Международное Бюро позже (укажите общую суть ссылок, например «Входящий номер депозита»)

Для заполнения в Бюро-получателе

Данный лист получен с международной заявкой

Уполномоченный представитель

Для заполнения в Международном Бюро

Данный лист получен Международным Бюро:

Уполномоченный представитель

Форма PCT/RO/134 (Июль 1998; перепечатка Январь 2004)

Номер дела заявителя или агента M3128 PCT S3	Номер Международной Заявки
---	----------------------------

**ССЫЛКИ НА ДЕПОНИРОВАННЫЙ МИКРООРГАНИЗМ ИЛИ ДРУГОЙ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ**
(Правило PCT 13bis)

А. Сделанные ниже ссылки относятся к депонированному микроорганизму или другому биологическому материалу, упоминаемому в описании
на странице 25, строка 19-29.

В. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ДЕПОЗИТА

Другие

депозиты идентифицированы на
дополнительном листе ☐

Название учреждения по депонированию

НЕМЕЦКАЯ КОЛЛЕКЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ И КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР
(DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GMBH)

Адрес учреждения по депонированию (включая почтовый индекс и страну)

Инхоффенштрассе 7В
38124 Брауншвейг
Германия

Дата депонирования

1 ноября 2007 г.

Входящий номер

DSM 19826

С. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ СВЕДЕНИЯ (если применимо)

Продолжение информации на
отдельном листе ☐

Заявитель пользуется правами согласно Правилу 32 ЕРС

D. УКАЗАННЫЕ СТРАНЫ, ДЛЯ КОТОРЫХ ДЕЛАЮТСЯ ССЫЛКИ (если ссылки не для всех стран)

E. ОТДЕЛЬНОЕ ПРЕДОСТАВЛЕНИЕ ССЫЛОК (если применимо)

Перечисленные ниже ссылки будут поданы в Международное Бюро позже (укажите общую суть ссылок, например «Входящий номер депозита»)

Для заполнения в Бюро-получателе

Данный лист получен с международной заявкой

Уполномоченный представитель

Для заполнения в Международном Бюро

Данный лист получен Международным Бюро:

Уполномоченный представитель

Форма PCT/RO/134 (Июль 1998; перепечатка Январь 2004)

Номер дела заявителя или агента M3128 PCT S3	Номер Международной Заявки
---	----------------------------

**ССЫЛКИ НА ДЕПОНИРОВАННЫЙ МИКРООРГАНИЗМ ИЛИ ДРУГОЙ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ**
(Правило PCT 13bis)

А. Сделанные ниже ссылки относятся к депонированному микроорганизму или другому биологическому материалу, упоминаемому в описании
на странице 25, строка 19-29.

В. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ДЕПОЗИТА

Другие
депозиты идентифицированы на
дополнительном листе ☐

Название учреждения по депонированию

НЕМЕЦКАЯ КОЛЛЕКЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ И КЛЕТОЧНЫХ
КУЛЬТУР
(DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND
ZELLKULTUREN GMBH)

Адрес учреждения по депонированию (включая почтовый индекс и страну)

Инхоффенштрассе 7В
38124 Брауншвейг
Германия

Дата депонирования

1 ноября 2007 г.

Входящий номер

DSM 19827

С. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ СВЕДЕНИЯ (если применимо)

Продолжение информации на
отдельном листе ☐

Заявитель пользуется правами согласно Правилу 32 ЕРС

D. УКАЗАННЫЕ СТРАНЫ, ДЛЯ КОТОРЫХ ДЕЛАЮТСЯ ССЫЛКИ (если ссылки не для всех стран)

E. ОТДЕЛЬНОЕ ПРЕДОСТАВЛЕНИЕ ССЫЛОК (если применимо)

Перечисленные ниже ссылки будут поданы в Международное Бюро позже (укажите общую суть ссылок, например «Входящий номер депозита»)

Для заполнения в Бюро-получателе

Данный лист получен с международной заявкой

Уполномоченный представитель

Для заполнения в Международном Бюро

Данный лист получен Международным Бюро:

Уполномоченный представитель

Форма РСТ/RO/134 (Июль 1998; перепечатка Январь 2004)

Формула изобретения

1. Средство для снижения неприятного запаха изо рта, представляющее собой штаммы микроорганизмов *Lactobacillus acidophilus*, выбранные из группы: *Lactobacillus acidophilus* DSM 19825, *Lactobacillus acidophilus* DSM 19826 и *Lactobacillus acidophilus* DSM 19827.

2. Средство по п.1, отличающееся тем, что оно дополнительно способно стимулировать рост *Streptococcus salivarius*, но не стимулирует рост *Streptococcus mutans*

и/или *Porphyromonas gingivalis*.

3. Средство по пп.1 или 2, представляющее собой штаммы микроорганизмов *Lactobacillus acidophilus* в инактивированной форме.

5 4. Применение средства по одному из пп.1-3 для снижения неприятного запаха изо рта.

5. Композиция для снижения неприятного запаха изо рта, содержащая средство по одному из пп.1-3 в количестве от 10^2 до 10^{12} клеток на мг композиции или в количестве от 10^2 до 10^{13} клеток на мл композиции.

10 6. Композиция по п.5, где указанная композиция представляет собой средство для чистки зубов, жевательную резинку, таблетку для рассасывания, ополаскиватель для рта, зубной эликсир, зубную нить или зубную ленту.

15 7. Средство для снижения неприятного запаха изо рта, представляющее собой культуральный супернатант штаммов микроорганизмов *Lactobacillus acidophilus*, выбранных из группы: *Lactobacillus acidophilus* DSM 19825, *Lactobacillus acidophilus* DSM 19826 и *Lactobacillus acidophilus* DSM 19827.

8. Применение средства по п.7 для снижения неприятного запаха изо рта.

9. Композиция для снижения неприятного запаха изо рта, содержащая средство по п.7 и носитель.

20 10. Композиция по п.9, где указанная композиция представляет собой средство для чистки зубов, жевательную резинку, таблетку для рассасывания, ополаскиватель для рта, зубной эликсир, зубную нить или зубную ленту.

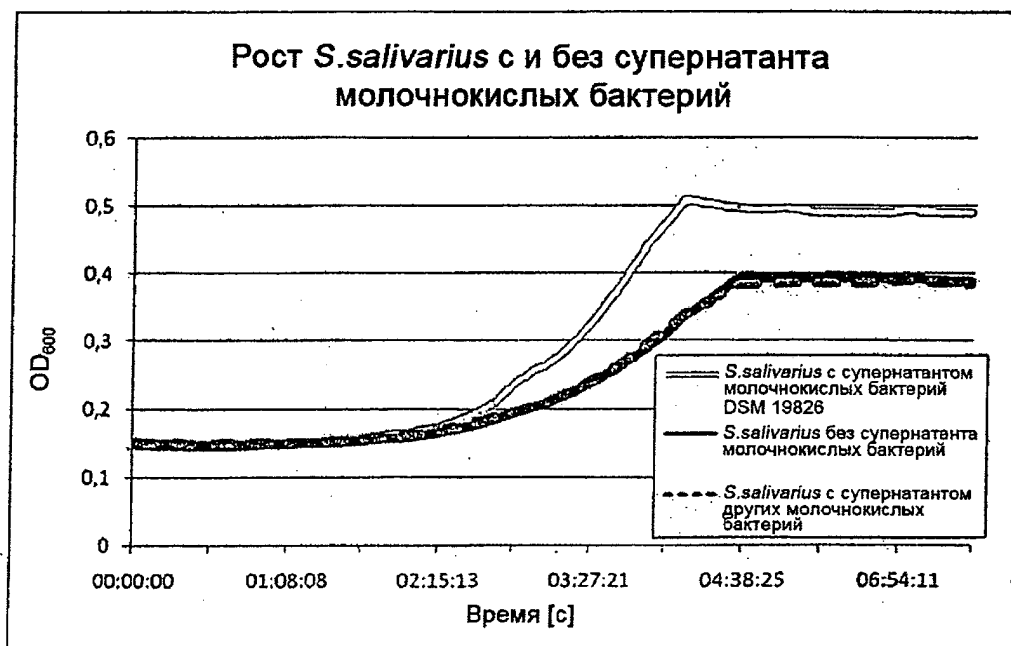
25

30

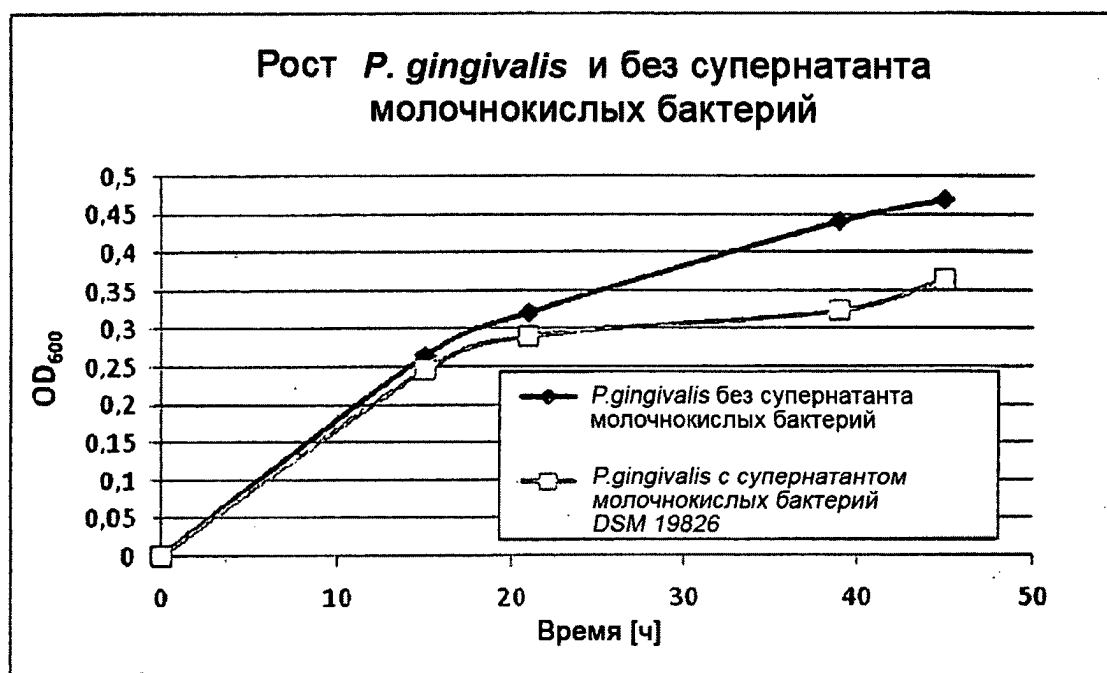
35

40

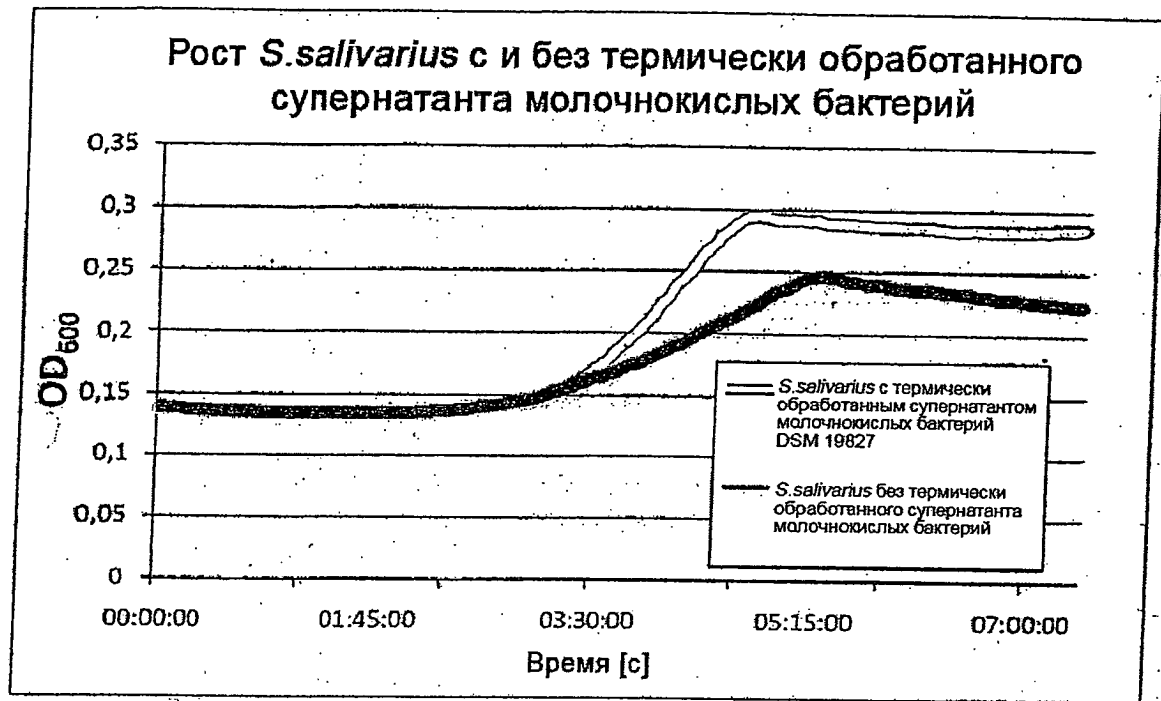
45



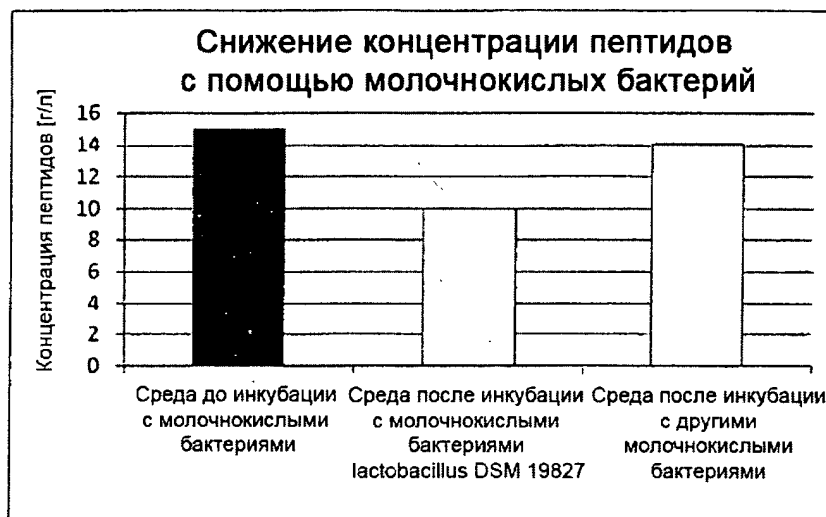
Фиг. 2



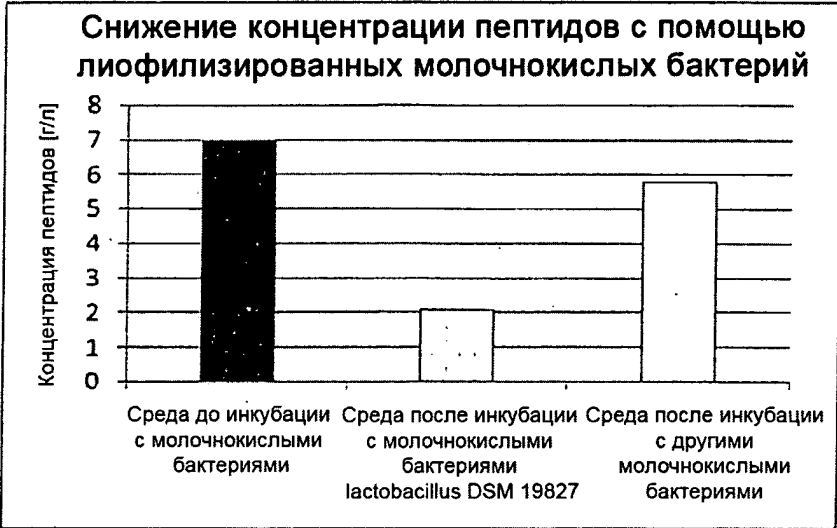
Фиг. 3



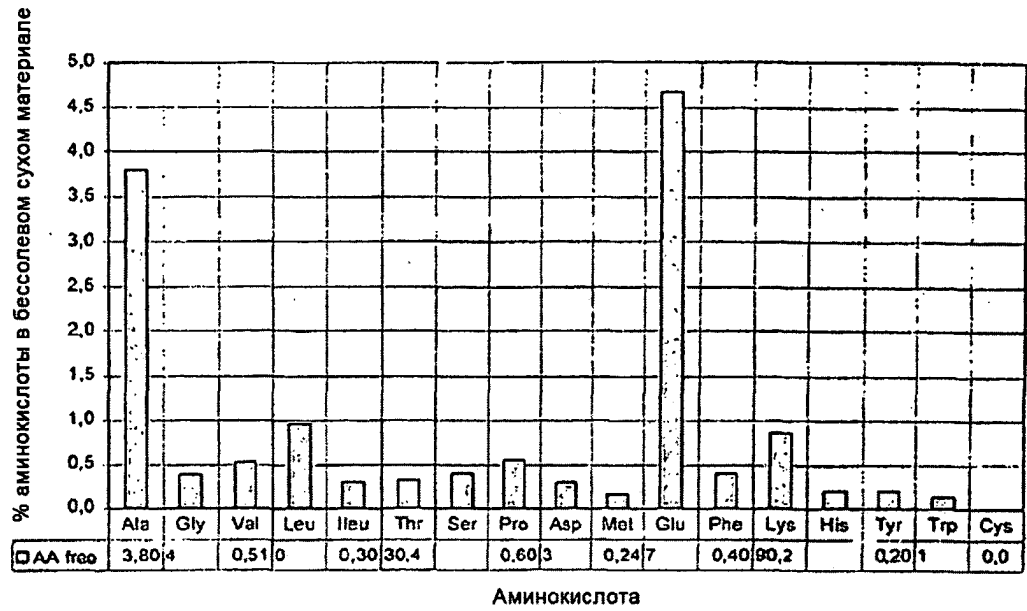
Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7