

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

(21) PI 0715740-1 A2



* B R P I 0 7 1 5 7 4 0 A 2 *

(22) Data de Depósito: 14/08/2007
(43) Data da Publicação: 16/07/2013
(RPI 2219)

(51) Int.Cl.:
A61K 35/74
A61P 3/06
A61P 9/10

(54) Título: AGENTE REDUTOR DE TRIGLICERÍDEOS SÉRICOS

(30) Prioridade Unionista: 21/08/2006 JP 2006-224672

(73) Titular(es): Calpis CO., LTD.

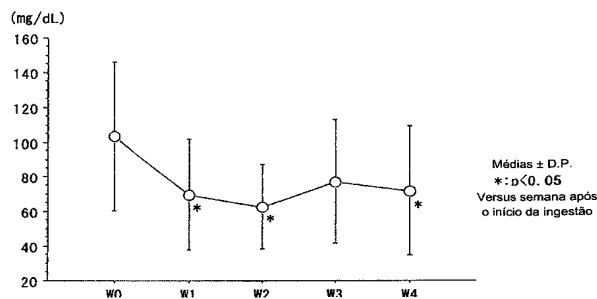
(72) Inventor(es): Hiromi Suzuki, Shigeru Fujiwara

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigbler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT JP2007065848 de 14/08/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/023608de
28/02/2008

(57) Resumo: AGENTE REDUTOR DE TRIGLICERÍDEOS SÉRICOS. A presente invenção refere-se a agentes farmacêuticos e produtos alimentares que não têm efeitos colaterais, são fáceis de ingerir continuamente e têm um efeito redutor de triglicerídeos séricos. Apresentam-se um agente para melhorar o metabolismo lipídico e um agente redutor de triglicerídeos séricos, cada um compreendendo, como um ingrediente ativo, uma cultura de uma bactéria pertencente ao gênero Bacillus. A bactéria pertencente ao gênero Bacillus é, de preferência, Bacillus subtilis, e, mais preferivelmente, Bacillus subtilis C-3102 (FERM BP-1096). O agente para melhorar o metabolismo lipídico e o agente redutor de triglicerídeos séricos são utilizáveis para o tratamento e prevenção de doenças como arteriosclerose.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**AGENTE REDUTOR DE TRIGLICERÍDEOS SÉRICOS**".

Campo Técnico

5 A presente invenção refere-se a um agente para melhorar o metabolismo lipídico que compreende, como um ingrediente ativo, células ou uma cultura de uma bactéria do gênero *Bacillus*, particularmente *Bacillus subtilis* C-3102, e que tenha uma ação redutora de triglicerídeos séricos.

Antecedentes

10 Um nível elevado de triglicerídeos séricos é um importante fator no desencadeamento de doenças como hiperlipidemia, arteriosclerose, doença cardíaca isquêmica (angina pectoris e infarto do miocárdio) e diabetes, e em geral é um indicador de doenças do estilo de vida. Além disso, sabe-se que uma elevação pós-prandial do nível de gorduras neutras e a persistência de um nível mais elevado são os principais fatores que influenciam doenças
15 cardiovasculares.

Farmacoterapia e terapia dietética que restringe a ingestão de lipídios são geralmente selecionadas para o tratamento de hiperlipidemia. Fármacos como inibidores da HMG-CoA redutase, que inibem a biossíntese de colesterol por inibição da síntese de ácido mevalônico a partir de 3-
20 hidróxi-3-metilglutaril cofator A (HMG-CoA) pela via sintética de colesterol, e absorvedores de ácidos biliares (resinas trocadoras de ânions) são usados em farmacoterapia.

Entretanto, inibidores da HMG-CoA redutase têm efeitos colaterais, como anafilaxia, anormalidades da função hepática e rabdomiólise. Da
25 mesma forma, quando se usam resinas trocadoras de ânions, como colestiramina, a resina trocadora de ânions adsorve os ácidos biliares que contêm muito colesterol dentro do trato digestivo, bloqueando, dessa forma, o ciclo entero-hepático e fazendo com que o colesterol seja excretado do organismo. Entretanto, resinas trocadoras de ânions são difíceis de engolir em uma
30 grande dose. Além disso, elas podem causar constipação e sintomas no trato digestivo. Quanto à terapia dietética, essa abordagem se acompanha de sofrimento mental devido às restrições dietéticas, tornando difícil a continua-

ção durante um período de tempo prolongado.

Portanto, são desejados fármacos e produtos alimentares com uma atividade redutora de triglicerídeos séricos, que não tenham efeitos colaterais e sejam fáceis de ingerir por um longo tempo.

5 Descrição da Invenção

O objetivo da invenção é apresentar uma melhora do metabolismo lipídico utilizável para o tratamento e prevenção de doenças como arteriosclerose.

A presente invenção apresenta um agente para melhorar o metabolismo lipídico compreendendo, como um ingrediente ativo, células ou uma cultura de uma bactéria pertencente ao gênero *Bacillus*. A invenção também apresenta um agente redutor de triglicerídeos séricos compreendendo, como um ingrediente ativo, células ou uma cultura de uma bactéria pertencente ao gênero *Bacillus*. A bactéria pertencente ao gênero *Bacillus* é, de preferência, *Bacillus subtilis*, e, mais preferivelmente, *Bacillus subtilis* C-3102 (FERM BP-1096).

Breve Descrição dos Desenhos

A figura 1 mostra os padrões de digestão com enzima de restrição NotI ou SfiI do DNA genômico de *Bacillus subtilis* C-3102.

A figura 2 mostra a mudança com o tempo na concentração de triglicerídeos séricos em sujeitos que ingeriram o agente para melhorar o metabolismo lipídico da presente invenção.

Modalidades Preferidas da Invenção

Bactérias do gênero *Bacillus* (por exemplo, *Bacillus subtilis*) estão há muito tempo intimamente associadas aos hábitos dietéticos do homem. Embora haja ampla informação sobre a funcionalidade desse organismo, não havia sido anteriormente relatado que tivessem uma ação redutora de triglicerídeos séricos ou um efeito de melhora do metabolismo lipídico.

O agente para melhorar o metabolismo lipídico e o agente redutor de triglicerídeos séricos da presente invenção se caracterizam por compreender, como um ingrediente ativo, células ou uma cultura de uma bacté-

ria do gênero *Bacillus*, e, de preferência, células ou uma cultura de *Bacillus subtilis*. As características bacteriológicas do *Bacillus subtilis* são descritas, por exemplo, no *Bergey's Manual of Bacteriology*, Vol. 11 (1986), e incluem as seguintes.

- 5 (1) Gram-positiva
 (2) Forma esporos ovais
 (3) Em forma de bastonete
 (4) Móvel
 (5) Aeróbica
- 10 (6) Catalase: positiva
 (7) Crescimento a 50°C: +
 (8) Crescimento a pH 5,7: +
 (9) Utilização de citrato: +
 (10) Produção de ácido a partir dos açúcares arabinose, glicose,
 15 xilose, manitol: +
 (11) Reação VP: +
 (12) Hidrólise de amido: +
 (13) Redução de nitrato: +
 (14) Produção de indol: –
- 20 (15) Hidrólise de gelatina: +
 (16) Hidrólise de caseína: +
 (17) Formação de película em meio líquido: +
 (18) Coagulação do leite: –
 (19) Peptonização do leite: +
- 25 O *Bacillus subtilis* usado no agente para melhorar o metabolismo lipídico e no agente redutor de triglicerídeos séricos da invenção pode incluir, por exemplo, *Bacillus subtilis* C-3102 (depositado em 25 de dezembro de 1985 no Instituto Nacional Japonês de Biociências e Tecnologia Humana, sob o número de acesso FERM BP-1096). Culturas em soja de *Bacillus sub-*
- 30 *tilis* C-3102 têm inúmeros efeitos desejáveis no gado, como uma melhora da flora intestinal, crescimento somático, prevenção de infecções, aumento da resistência da casca de ovos, aumento da qualidade da carne e melhora dos

odores fecais, e são usadas como aditivos de ração (Publicação de Patente Japonesa nº H4-24022). Os efeitos benéficos dessa cepa sobre a saúde humana incluem a regulação da função intestinal e a diminuição dos produtos de putrefação intestinal (*Chonai Saikin Gakkaishi* (Jornal de Microbiologia Intestinal) Vol. 18, No. 2, 93-99 (2004)).

Com o *Bacillus subtilis* C-3102, um fragmento de aproximadamente 700 pb é amplificado por PCR usando-se os iniciadores de PCR de SEQ ID NOs:1 e 2 abaixo. Em outras cepas de *Bacillus subtilis*, nenhuma amplificação é observada com esses iniciadores de PCR. O fragmento de aproximadamente 700 pb amplificado com o genoma do *Bacillus subtilis* C-3102 como o molde não tem nenhuma homologia com a sequência da amilase. Isso distingue claramente a cepa C-3102 de outras cepas de *Bacillus subtilis*.

Sequência 1: 5'-GCCCCGCACATACGAAAAGACTGGCTGAAA-
3' (SEQ ID NO: 1)

Sequência 2: 5'-GGATCCCACGTTGTGATTAAAAGCAGCGAT-
3' (SEQ ID NO: 2)

O *Bacillus subtilis* C-3102 também tem as seguintes características.

(1) Desprovido de DNA plasmídico.

(2) O padrão de digestão obtido na digestão do DNA genômico com a enzima de restrição NotI ou SfiI e separação por eletroforese em agarose é conforme mostrado na FIG. 1.

(3) Produz substâncias antibacterianas contra *B. cereus*.

(4) Desprovido de resistência à ampicilina, cloranfenicol, ciprofloxacina, eritromicina, gentamicina, canamicina, linezolid, quinupristina/dalfopristina, rifampina, estreptomicina, tetraciclina, trimetoprim e vancomicina (em cada caso, a concentração inibitória mínima é de 0,03 a 4 µg/mL).

O *Bacillus subtilis* pode ser cultivado em um meio de cultura líquido ou sólido comumente usado para o cultivo de microorganismos, que contenha, por exemplo, uma fonte de carbono, uma fonte de nitrogênio e

substâncias inorgânicas. A fonte de carbono pode ser qualquer uma das utilizadas pelo *Bacillus subtilis*, como glicose, frutose, sacarose, amido ou melado. Exemplos de fontes de nitrogênio que podem ser usadas incluem peptonas, hidrolisados de caseína, extratos de carne e sulfato de amônio. Além disso, ácidos fosfóricos e seus sais, como sais de potássio, magnésio, cálcio, sódio, ferro e manganês, e também vitaminas, aminoácidos e tensoativos podem ser adicionados quando necessário. Além desses meios sintéticos, o *Bacillus subtilis* também pode ser cultivado usando-se substâncias derivadas de produtos naturais, como farelo de óleo de soja. O cultivo é, de preferência, realizado sob condições aeróbicas. Exemplos preferidos de aparelhos de cultura incluem aparelhos para cultivo em líquido com aeração rotativa com um fermentador de jarra, aparelhos de cultura sólida do tipo bandeja e aparelhos de cultura para preparação de *koji* automatizados. A temperatura da cultura é, de preferência, de 20 a 50°C, e, mais preferivelmente, de 30 a 45°C; o período de cultura é de 12 horas a 7 dias; e o pH inicial é, de preferência, de 5 a 9, e, mais preferivelmente, de 6 a 8.

A cultura assim obtida contém células de *Bacillus subtilis*, meio e produtos de fermentação. A cultura pode ser usada diretamente sem processamento como um agente para melhorar o metabolismo lipídico ou um agente redutor de triglicerídeos. Alternativamente, a cultura pode ser concentrada e usada. Excipientes e outros ingredientes podem ser adicionados à cultura ou à cultura concentrada para uso como uma preparação na forma de pó seco, grânulos ou comprimidos. Células isoladas da cultura, a cultura livre de células ou a cultura contendo as células podem ser usadas na presente invenção. Em uma modalidade particularmente preferida, o *Bacillus subtilis* é cultivado usando-se substâncias de origem natural que sejam adequadas para uso como alimentos, como farelo de óleo de soja, feijões de soja cozidos, feijões adzuki cozidos, arroz cozido, arroz cozido com cevada, farelo de trigo, milho cozido e outros grãos, e é diretamente misturado no produto alimentar sem separação das células da cultura.

O agente para melhorar o metabolismo lipídico e o agente redutor de triglicerídeos séricos da invenção podem ser tomados na forma de,

por exemplo, um líquido, pó, grânulos ou comprimidos, ou podem ser misturados como um aditivo alimentar em bebidas e produtos alimentares e ingeridos. Exemplos ilustrativos de bebidas e produtos alimentares incluem refrigerantes, balas e doces, pastas, pão, produtos de peixe e carne processados e laticínios. O agente para melhorar o metabolismo lipídico e o agente 5 redutor de triglicerídeos séricos da invenção podem ser adicionados a esses vários materiais alimentares e fornecidos como bebidas saudáveis, alimentos saudáveis ou nutracêuticos com benefícios promotores de saúde.

Conforme acima descrito, a presente invenção apresenta um 10 agente para melhorar o metabolismo lipídico com uma atividade redutora de triglicerídeos séricos, que compreende, como um ingrediente ativo, células de *Bacillus subtilis* ou uma cultura delas. O *Bacillus subtilis* que serve de ingrediente ativo na presente invenção é eficaz em quantidades muito pequenas e em um curto período de tempo. Tem excelente capacidade de preservação e resistência a ácidos, atinge facilmente e cresce no intestino grosso, 15 e se pode esperar que tenha um efeito redutor de triglicerídeos séricos prolongado.

O conteúdo inteiro de todas as patentes e documentos de referência citados neste relatório são aqui incorporados por referência. Da mesma forma, o conteúdo inteiro do relatório e os desenhos do Pedido de Patente 20 Japonesa nº 2006-224672, que serve de base para a reivindicação de prioridade do presente pedido, são aqui incorporados por referência.

A presente invenção é descrita em maiores detalhes abaixo, a título de exemplo, embora o âmbito da invenção não se limite aos exemplos.

25 Exemplo 1

No exemplo de trabalho a seguir, *Bacillus subtilis* C-3102 (depositado em 25 de dezembro de 1985 no Instituto Nacional Japonês de Biociências e Tecnologia Humana, sob o número de acesso FERM BP-1096) foi usado como um exemplo de bactéria pertencente ao gênero *Bacillus*.

30 Cinco quilogramas de água de torneira foram adicionados a 5 kg de farelo de óleo de soja comercial granulado, e a mistura foi esterilizada a 121°C durante 120 minutos, então, inoculada com um caldo de cultura de

- 5 *Bacillus subtilis* cepa C-3102 que havia sido pré-cultivado. A mistura resultante foi cultivada a 37°C durante 40 horas para produzir uma cultura em soja de *Bacillus subtilis* C-3102. A cultura resultante foi moída a seco, homogeneizada com outros ingredientes mostrados na tabela abaixo, e se prepararam comprimidos de 500 mg (cada um contendo 3×10^9 esporos de *Bacillus subtilis*). A Tabela 1-1 mostra os nutrientes contidos nos comprimidos, e a Tabela 1-2 mostra a composição dos comprimidos.

Tabela 1

Análise de nutrientes dos comprimidos (por 100 g)

Nutrientes		Valores
Proteínas	g/100 g	4,1
Lipídios	g/100 g	1,4
Cinzas	g/100 g	18
Carboidratos	g/100 g	74,6
Energia	Kcal/100 g	327
Sódio	Mg/100 g	20,2

- 10 Composição do comprimido

Ingrediente	Teor (%)
Açúcar em pó	64,10%
Cálcio de casca de ovo	22,00%
Glicose	6,00%
Cultura em soja de <i>Bacillus subtilis</i> C-3102	5,60%
Éster de sacarose	1,00%
Goma-laca	0,60%
Goma-arábica em pó	0,35%
Cera de carnaúba	0,35%

Exemplo 2

Teste de Supressão da Elevação de Triglicerídeos Séricos (Teste de Ingestão Humana)

Procedimento:

- 15 Dez homens e mulheres saudáveis (5 mulheres e 5 homens) de

25 a 40 anos de idade foram selecionados como indivíduos. Os critérios de seleção são mostrados na Tabela 2. Foram excluídos indivíduos que estivessem tomando ou ingerindo fármacos específicos ou alimentos para uso específico na saúde.

5 Tabela 2

Dez indivíduos (5 homens e 5 mulheres) que satisfizeram os seguintes critérios e não atenderam aos critérios de exclusão foram escolhidos como indivíduos.

Critérios de seleção (critérios para a seleção dos indivíduos)
(1) Indivíduos de 25 a 40 anos de idade.
(2) Indivíduos sem uso de qualquer medicação e livres de doença aparente (TG, T-cho, BS, pressão sanguínea, constipação e outras.).
a) Gordura neutra < 250 mg/dL.
b) Colesterol total < 240 mg/dL.
c) Açúcar sanguíneo em jejum < 126 mg/dL.
d) GOT < 50 IU/L; GPT < 50 IU/L; γ -GTP < 100 IU/L.
e) Pressão sanguínea sistólica < 140 mmHg; Pressão sanguínea diastólica < 90 mmHg.
(3) Indivíduos com uma dieta relativamente constante e nível de exercícios.
(4) Indivíduos recebendo exames regulares em instalação médica.
(5) Indivíduos que não manifestam uma reação anafilática à ingestão do alimento em estudo (cultura de soja fermentada).
(6) Indivíduos capazes de limitar sua ingestão de bebidas alcoólicas (a no máximo o equivalente a 500 mL de cerveja por dia).
(7) Indivíduos capazes de manter um estilo de vida diário constante no decorrer do teste.
(8) Indivíduos capazes de manter um diário (para registrar a ingestão do agente em estudo, exercícios, dieta e peso corporal) durante o período de teste.
(9) Indivíduos que, antes do início do teste, tenham dado consentimento à participação no teste e tenham colocado sua marca pessoal ou assinado o formulário de consentimento e datado.

Os indivíduos ingeriram por via oral um comprimido de 500 mg (um comprimido de cultura em soja de *Bacillus subtilis* C-3102 contendo 3×10^9 esporos) ao dia, sempre que possível, após o café da manhã, durante um período de quatro semanas. Amostras de sangue em jejum (sem comer ou beber após 9 h da noite anterior; o sangue foi extraído em uma hora fixa de manhã) foram coletadas antes do início da ingestão e após uma semana, duas semanas, três semanas e quatro semanas após o início da ingestão, e o nível de triglicérides séricos em cada amostra foi medido. O cronograma do teste é mostrado na Tabela 3.

10 Tabela 3 Cronograma do teste (itens/período)

Itens de teste/período (semana)	Período de ingestão (4 semanas)				
	Início	1 se- mana	2 se- manas	3 se- manas	4 se- manas
	Cerca de 22/9	Cerca de 29/9	Cerca de 6/10	Cerca de 13/10	Cerca de 20/10
Índice de Massa Corporal + Exame Cardiovascular Peso (exame inicial), peso, porcentagem de gordura corporal (método BI), pressão sanguínea, pulso, temperatura	o	o	o	o	o
Bioquímica do Sangue (1) TG, T-cho, razão AG, bilirrubina total, açúcar sanguíneo em jejum, GOT, GPT, AL-P, γ -GTP, amilase, LDL-cho, HDL-cho, LDH, proteína total, albumina, UA, BUN, creatinina, ZTT, Na, Cl, K, Ca, cálcio ionizado, P, Mg, Fe	o	o	o	o	o

Itens de teste/período (semana)	Período de ingestão (4 semanas)				
	Início	1 se- mana	2 se- manas	3 se- manas	4 se- manas
	Cerca de 22/9	Cerca de 29/9	Cerca de 6/10	Cerca de 13/10	Cerca de 20/10
Bioquímica do Sangue (2) PT (pró-trombina), hepaplastina, HbAlc, TT (Tromboteste), fibri- nogênio, APTT (tempo de trom- boplastina), fração de vitamins K	o	o	o	o	o
Testes Sanguíneos Gerais WBC, RBC, Hb, Ht, MCV, MCH, MCHC, plaquetas	o	o	o	o	o
Testes Urinários Gerais Açúcares, proteína, urobilinogê- nio, sedimentos (realizado quan- do positivo para proteínas)	o	o	o	o	o
Entrevista do Paciente Pelo Mé- dico: Exame Verificado quando a sintomas subjetivos e reações adversas, diário verificado diariamente e orientações fornecidas	o	o	o	o	o

o: testado

Os resultados do teste acima são mostrados na FIG. 2. O nível de triglicerídeos séricos com o tempo foi de $103,6 \pm 42,82$ mg/dL no início da ingestão, $69,8 \pm 32,00$ mg/dL após uma semana de ingestão, $63,0 \pm 24,58$ mg/dL após duas semanas de ingestão, $77,0 \pm 35,63$ mg/dL após três se-
5 manas de ingestão e $71,8 \pm 37,26$ mg/dL após quatro semanas de ingestão. Uma análise unidirecional de variância para medições repetidas com base

no período de ingestão revelou uma diferença significativa ($p < 0,01$). Como resultado de uma comparação múltipla (teste de Tukey-Kramer), diferenças significativas foram observadas entre o início da ingestão e após uma semana de ingestão ($p < 0,05$), entre o início da ingestão e após duas semanas de ingestão ($p < 0,05$), e entre o início da ingestão e após quatro semanas de ingestão ($p < 0,05$). Com os resultados acima, ficou claro que as culturas em soja de *Bacillus subtilis* C-3102 têm um efeito redutor de triglicédeos séricos.

Aplicabilidade Industrial

10 O agente para melhorar o metabolismo lipídico da presente invenção é capaz de reduzir a concentração de triglicédeos séricos em seres humanos e é, portanto, utilizável como um agente para prevenir e melhorar arteriosclerose.

Listagem de Sequências

<110> Calpis Co. Ltd.

<120> AGENTE REDUTOR DE TRIGLICÉDEOS SÉRICOS

<130> PCP-9006W0

<150> JP2006-224672

<151> 21.08.2006

<160> 2

<170> PatentIn versão 3.1

<210> 1

<211> 30

<212> DNA

<213> *Bacillus subtilis*

<400> 1

gccccgcaca tacgaaaaga ctggctgaaa

30

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> *Bacillus subtilis*

<400> 2

ggatcccacg ttgtgattaa aagcagcgat

30

REIVINDICAÇÕES

1. Agente redutor de triglicerídeos séricos, caracterizado pelo fato de que compreende, como um ingrediente ativo, uma cultura de *Bacillus subtilis* C-3102 (FERM BP-1096).
- 5 2. Agente redutor de triglicerídeos séricos de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a cultura é uma cultura de soja.
3. Agente redutor de triglicerídeos séricos de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que a cultura de soja compreende pelo menos 3×10^9 esporos de *Bacillus subtilis* C-3102.
- 10 4. Agente redutor de triglicerídeos séricos de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que a cultura de soja responde por pelo menos 5% do agente.
5. Agente redutor de triglicerídeos séricos, caracterizado pelo fato de que compreende, como um ingrediente ativo, esporos de *Bacillus subtilis* C-3102 (FERM BP-1096).
- 15 6. Agente redutor de triglicerídeos séricos de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o agente compreende pelo menos 3×10^9 esporos de *Bacillus subtilis* C-3102.

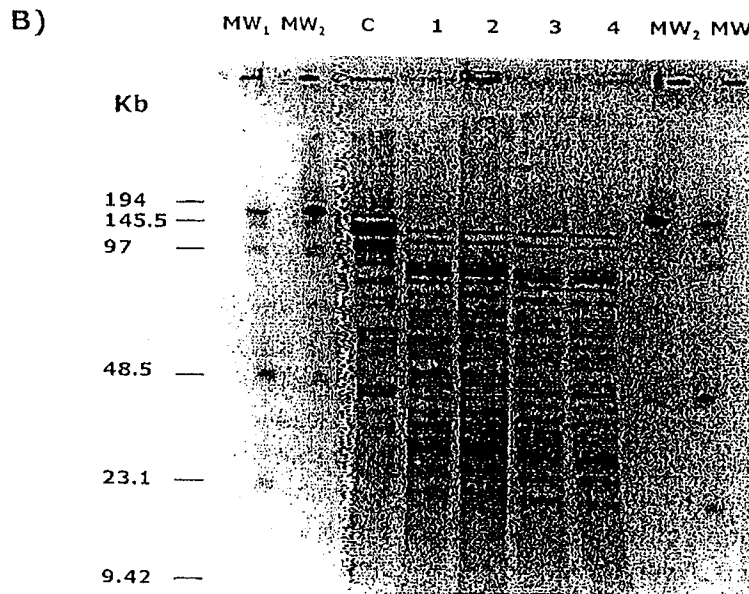
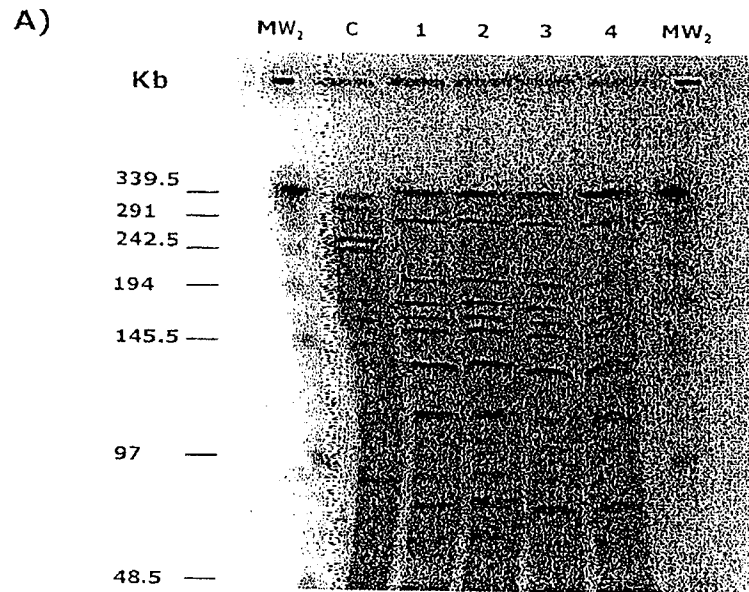


FIG. 1

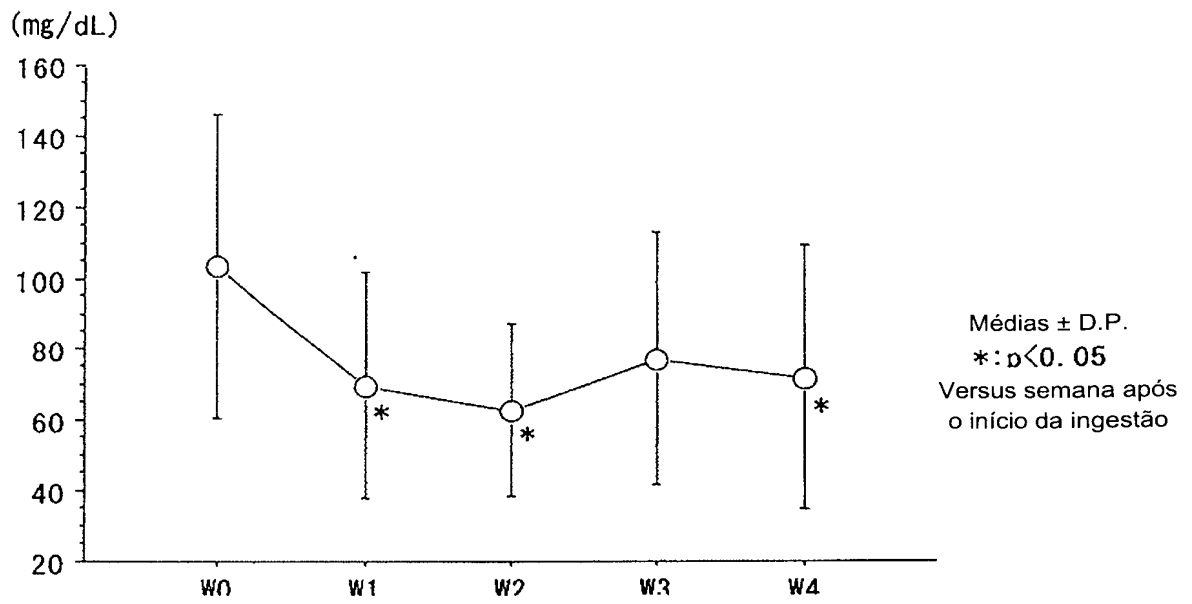


FIG. 2

RESUMO

Patente de Invenção: "**AGENTE REDUTOR DE TRIGLICERÍDEOS SÉRICOS**".

5 A presente invenção refere-se a agentes farmacêuticos e produtos alimentares que não têm efeitos colaterais, são fáceis de ingerir continuamente e têm um efeito redutor de triglicerídeos séricos. Apresentam-se um agente para melhorar o metabolismo lipídico e um agente redutor de triglicé-
rídeos séricos, cada um compreendendo, como um ingrediente ativo, uma
10 cultura de uma bactéria pertencente ao gênero *Bacillus*. A bactéria pertencente ao gênero *Bacillus* é, de preferência, *Bacillus subtilis*, e, mais preferivelmente, *Bacillus subtilis* C-3102 (FERM BP-1096). O agente para melhorar o metabolismo lipídico e o agente redutor de triglicerídeos séricos são utilizáveis para o tratamento e prevenção de doenças como arteriosclerose.