



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

DOMANDA NUMERO	101999900768472
Data Deposito	21/06/1999
Data Pubblicazione	21/12/2000

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		

Titolo

ASSOCIAZIONE DI BATTERI LATTICI E SUO USO PER LA PREVENZIONE E/O IL TRATTAMENTO TERAPEUTICO DI INFEZIONI E DI STATI INFIAMMATORI.

RM 99 A 000400

DESCRIZIONE

dell'invenzione avente per titolo: "Associazione di batteri lattici e suo uso per la prevenzione e/o il trattamento terapeutico di infezioni e di stati infiammatori"

a nome: MENDES s.u.r.l.
di nazionalità: italiana
con sede in: Via Nuoro 12, Ardea RM
Inventore: Claudio DE SIMONE

---000---

La presente invenzione riguarda una associazione di batteri lattici e il suo uso per produrre un integratore alimentare, un prodotto per l'igiene od un farmaco per la prevenzione e/o il trattamento terapeutico di infezioni e di stati infiammatori provocati da batteri, virus o funghi, in particolare a carico della cavità orale e delle strutture vaginali, uretrali, nasali, oculari ed auricolari.

I batteri lattici sono batteri Gram-positivi che producono l'acido lattico dalla fermentazione del glucosio. Per convenzione, in questa definizione viene incluso anche lo *Streptococcus thermophilus*.

È noto che ceppi di batteri lattici produttori di H_2O_2 possono agire come regolatori della flora batterica a livello degli orifizi corporei e delle mucose. Si è visto che i batteri lattici produttori di H_2O_2 possono antagonizzare *E. coli*, *N. gonorrhoeae*, *G. vaginalis*, *C. trachomatis*, *U. urealyticum*, *B. bivius*. Pur tuttavia, tali batteri sono di limitata efficacia se utilizzati nella pratica medica, come

dimostrato dal fatto che le preparazioni a base di batteri lattici (ad esempio gli ovuli vaginali) per il trattamento delle infezioni causate dai sopracitati germi (ad esempio le vaginiti) sono tenute in ridotta considerazione dai medici che preferiscono trattare i pazienti con antibiotici o chemioterapici.

Nessuna attività antibatterica o regolatoria della flora a livello degli orifizi corporei e delle mucose è stata descritta a conoscenza dell'inventore per quel che riguarda i batteri lattici che utilizzano arginina.

Ora è stato sorprendentemente trovato che l'attività dei batteri lattici produttori di H_2O_2 risulta notevolmente potenziata dall'aggiunta di uno o più ceppi di batteri lattici in grado di utilizzare l'arginina. L'arginina è presente in vari piccoli peptidi rilevabili nei liquidi biologici o come arginina tal quale, e molte specie batteriche la utilizzano per i propri fini nutrizionali e di accrescimento. I batteri lattici che utilizzano arginina possono quindi privare altri batteri patogeni o potenzialmente patogeni di una quantità tale di arginina, che pur non essendo sufficiente a bloccarne la crescita, li rende più suscettibili all'azione dell' H_2O_2 prodotta dai batteri lattici.

Pertanto, secondo la presente invenzione, viene fornita una associazione di batteri lattici comprendente

(a) un primo componente costituito da almeno un ceppo di batteri lattici produttori di H_2O_2 , e

(b) un secondo componente costituito da almeno un ceppo di batteri lattici utilizzatori di arginina.

Preferibilmente, il ceppo di batteri lattici del componente (a) è scelto nel gruppo costituito dai ceppi delle specie *Lactobacillus crispatus* e *Lactobacillus salivarius* ed il ceppo di batteri lattici del componente (b) è scelto nel gruppo costituito dai ceppi delle specie *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus fermentum*. Più preferibilmente, il ceppo di batteri lattici del componente (b) è il ceppo di *Lactobacillus brevis* CD2 depositato presso il DSM - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germania, con il numero di accesso DSM 11988.

Il rapporto tra il numero di batteri del componente (a) e il numero di batteri del componente (b) è preferibilmente da 1:100 a 100:1, più preferibilmente da 1:5 a 5:1. In modo massimamente preferito, detto rapporto è di 1:1.

L'associazione può essere somministrata sotto forma di dosaggio unitario comprendente da 1×10^2 a 5×10^{11} di batteri del componente (a) e da 1×10^2 a 5×10^{11} di batteri del componente (b), preferibilmente 1×10^9 di batteri del componente (a) e 3×10^9 di batteri del componente (b).

L'associazione può altresì essere somministrata sotto forma di compresse, compresse masticabili, caramelle, gomme da masticare, gelatine, ovuli, supposte e microclismi, oppure sotto forma di granulati, creme e gel dentali, polveri per protesi, colluttori, dentifrici, sprays, sospensioni e pomate.

Secondo una ulteriore forma di realizzazione dell'invenzione, l'associazione comprende ulteriormente almeno un altro ceppo di batteri lattici scelto nel gruppo costituito da *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus cateniforme*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus leichmanii*, *Lactobacillus minutus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium angulatum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium dentium*, *Bifidobacterium eriksonii*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium plantarum* e *Streptococcus thermophilus*.

L'associazione può inoltre comprendere vitamine, basi ammoniche quaternarie, sali minerali, antiossidanti e agenti antiplacca.

Sempre secondo l'invenzione, viene fornito l'uso di una associazione di batteri lattici comprendente

- (a) un primo componente costituito da almeno un ceppo di batteri lattici produttori di H_2O_2 ; e
- (b) un secondo componente costituito da almeno un ceppo di batteri lattici utilizzatori di arginina,

per produrre un integratore alimentare, un prodotto per l'igiene od un farmaco per la prevenzione e/o il trattamento terapeutico di infezioni e di stati infiammatori provocati da batteri, virus o

funghi, in particolare a carico della cavità orale e delle strutture vaginali, uretrali, nasali, oculari ed auricolari. Le infezioni e gli stati infiammatori comprendono gengiviti, peridontiti, mucositi o stomatiti da farmaci e/o da agenti fisici, sindrome di Behçet, diacheratosi del cavo orale, glossite, angina, sialoadenite, sialolitiasi, pemfigo, *Lichen planus*, sindrome di Sjögren, vaginosi, vaginiti, uretriti, prostatiti, proctiti, otiti, congiuntiviti, riniti, sinusiti, leucoplachia, afte, infezioni erpetiche, e infezione da *Helicobacter pilori* a livello della cavità orale.

L'associazione potrà inoltre essere usata vantaggiosamente per il trattamento della cavità orale come agente deodorante, antinfiammatorio, agente anticarie e/o antiplacca.

Gli esempi che seguono illustrano ulteriormente i vari aspetti dell'invenzione, ma non devono essere considerati in alcun senso limitativi della medesima.

Esempio 1

È stato valutato l'effetto inibitorio di batteri lattici produttori di H_2O_2 (componente A), di batteri lattici utilizzatori di arginina (componente B) e dell'associazione dei due ceppi, nel caso specifico in rapporto 1:1, (associazione AB), sulla crescita di batteri potenzialmente patogeni.

In breve, la coltura del battero lattico da saggiare è stata portata a pH neutro, in quanto il pH acido è di per sé un inibitore della crescita batterica. La sospensione è stata filtrata sterilmente ed il filtrato è stato utilizzato per bagnare dei dischetti di carta

assorbente (30 µl di filtrato per dischetto). I dischetti sono stati disposti in una piastra di terreno selettivo di crescita precedentemente inoculata con 0,1 ml di *Gardnerella vaginalis* (un ceppo di isolamento clinico, agente eziologico delle vaginosi), unitamente ad un dischetto di controllo imbevuto con solo 30 µl di acqua distillata. Dopo 24 ore di incubazione a 37° C, l'inibizione della crescita dei patogeni viene valutata dal diametro (in mm) dell'alone attorno al dischetto.

In una seconda serie di esperimenti, come patogeno di riferimento è stato utilizzato lo *Streptococcus mutans* (agente eziologico della placca dentale e della carie).

Relativamente alla caratterizzazione dei batteri come produttori di H₂O₂ è stata utilizzata una classica reazione benzidina-perossidasi, che consente di evidenziare le colonie batteriche produttrici di H₂O₂ in base all'assunzione del colore blu. Per valutare la capacità di utilizzazione dell'arginina è stata valutata l'attività di arginina deidrolasi (M. C. Manca de Nadra, Milchwissenschaft, 37: 669-670, 1982).

I ceppi di batterici lattici sono stati ottenuti dalla American Type Culture Collection, Rockville, U.S.A. (ATCC).

<u>Ceppo batterico</u>	<u>Alone di inibizione (attività anti-<i>G. vaginalis</i>)</u>
Produttore di H ₂ O ₂ (componente A)	
<i>Lactobacillus crispatus</i> (ATCC 39197)	75
<i>Lactobacillus salivarius</i> (ATCC 11741)	60
<i>Lactobacillus crispatus</i> + <i>Lactobacillus salivarius</i>	63

Utilizzatore di arginina (componente B)

<i>Lactobacillus brevis</i> (ATCC 14869)	0
<i>Lactobacillus fermentum</i> (ATCC 14931)	2
<i>Lactobacillus brevis</i> + <i>Lactobacillus fermentum</i>	0

Associazione AB (rapporto A:B pari a 1:1)

<i>Lactobacillus crispatus</i> + <i>Lactobacillus brevis</i>	112
<i>Lactobacillus crispatus</i> + <i>Lactobacillus fermentum</i>	100
<i>Lactobacillus salivarius</i> + <i>Lactobacillus brevis</i>	117
<i>Lactobacillus salivarius</i> + <i>Lactobacillus fermentum</i>	104

Ceppo batterico

Alone di inibizione (attività anti-*S. mutans*)

Produttore di H₂O₂ (componente A)

<i>Lactobacillus crispatus</i> (ATCC 39197)	98
<i>Lactobacillus salivarius</i> (ATCC 11741)	102
<i>Lactobacillus crispatus</i> + <i>Lactobacillus salivarius</i>	99

Utilizzatore di arginina (componente B)

<i>Lactobacillus brevis</i> (ATCC 14869)	0
<i>Lactobacillus fermentum</i> (ATCC 14931)	1
<i>Lactobacillus brevis</i> + <i>Lactobacillus fermentum</i>	1

Associazione AB (rapporto A:B pari a 1:1)

<i>Lactobacillus crispatus</i> + <i>Lactobacillus brevis</i>	118
<i>Lactobacillus crispatus</i> + <i>Lactobacillus fermentum</i>	126
<i>Lactobacillus salivarius</i> + <i>Lactobacillus brevis</i>	121
<i>Lactobacillus salivarius</i> + <i>Lactobacillus fermentum</i>	120

Esempio 2

Sono state fabbricate delle compresse masticabili con la seguente composizione unitaria:

Associazione AB (<i>Lactobacillus salivarius</i> + <i>Lactobacillus brevis</i> , rapporto 1:1)	4 miliardi
Mannitolo	400 mg
Saccarina	5 mg
Poliossietilene	50 mg
Mg stearato	15 mg
Talco	25 mg
Silicone diossido	5 mg

Tali compresse sono state somministrate a 4 volontari, cui era stato proibito nella settimana precedente di lavarsi i denti e di masticare gomme americane. Sono state somministrate 3 compresse al giorno da sciogliere in bocca dopo i pasti per una settimana. Sono state effettuate valutazioni cliniche sia per l'indice di placca dentale, sia per l'indice di placca gengivale.

Per la placca dentale è stato adottato il seguente punteggio, valutato su sei denti (primo molare mascellare destro; incisivo centrale mascellare sinistro; primo premolare mascellare sinistro; primo molare mandibolare sinistro; incisivo centrale mandibolare destro; primo premolare mandibolare destro):

- 0 = assenza di placca
- 1 = assenza di placca visibile
- 2 = placca visibile
- 3 = placca grossolanamente visibile

Per la placca gengivale è stato adottato il seguente punteggio, selezionando il bordo dei sei denti precedentemente citati:

- 0 = assenza di infiammazione
- 1 = lieve infiammazione,
- 2 = moderata infiammazione, sanguinamento al contatto
- 3 = notevole infiammazione, tendenza al sanguinamento spontaneo.

I risultati cumulativi per i sei denti, relativamente ai 4 volontari sono stati:

<u>Soggetto</u>	<u>Indice di placca dentale</u>		<u>Indice di placca gengivale</u>	
	0	7 gg	0	7 gg
#1	8	2	7	1
#2	9	3	10	3
#3	15	5	6	2
#4	15	7	8	3

Esempio 3

Quattro soggetti con diagnosi clinica ed istologica di ulcerazioni aftose ricorrenti sono stati trattati per 10 giorni con 6 compresse masticabili al giorno la cui composizione è riportata nell'Esempio 2.

Al termine dei 10 giorni di trattamento, in tutti i pazienti trattati vi è stata una completa guarigione delle ulcerazioni e nessuna comparsa di nuove ulcerazioni durante il mese successivo.

Per migliorare il gusto e l'aspetto dell'associazione batterica AB, possono essere aggiunti appropriati coloranti e dolcificanti, quali saccarina, menta, xilitolo, come è comune ed è ben noto agli esperti del settore.

L'associazione AB può essere somministrata sotto forma di granulato, caramelle, gomme americane, gelatine, creme e gel dentali, polvere per protesi, colluttori, dentifrici, compresse, ovuli, supposte, spray, sospensioni o microclismi.

Esempio 4

Preparazione di una pasta dentifricia

Pasta base

Composizione percentuale:

Fosfato di calcio diidrato	37,5%
Glicerina (85% in acqua)	30,0%
Aroma (olio essenziale di menta piperita)	1,0%
Sodio carbossimetilcellulosa	1,0%
Acqua depurata	20,8%
Saccarina sodica (soluzione acquosa all'1%)	2,5%
Sodio laurilsolfato	2,0%
Acqua depurata	5,2%
	100,0%

Composizione in peso:

Fosfato di calcio diidrato	337,5 g
Glicerina (85% in acqua)	270,0 g
Aroma (olio essenziale di menta piperita)	9,0 g
Sodio carbossimetilcellulosa	9,0 g
Acqua depurata	187,2 g
Saccarina sodica (soluzione acquosa all'1%)	22,5 g
Sodio laurilsolfato	18,0 g
Acqua depurata	48,8 g
	900,0 g

Al fosfato di calcio diidrato, previamente macinato e passato su un setaccio da 50 mesh, è stata aggiunta la glicerina. Si è lasciato idratare il tutto, ottenendo una pasta densa omogenea. A questo punto, è stato aggiunto l'aroma, vale a dire l'olio essenziale di menta piperita in una percentuale dell'1%.

La sodio carbossimetilcellulosa è stata lasciata idratare per una notte in acqua (concentrazione al 4,6% in acqua depurata).

Alla soluzione (gel denso) è stata aggiunta la soluzione di saccarina sodica.

Il gel polimerico è stato versato in un mortaio sulla massa di fosfato di calcio idrato con la glicerina ed il tutto è stato mescolato energicamente.

A parte è stata preparata una soluzione di sodio laurilsolfato ad una concentrazione di circa il 28% in acqua depurata.

Alla pasta densa di fosfato dicalcico è stata quindi aggiunta la soluzione di sodio laurilsolfato.

La pasta densa, omogenea, ottenuta presenta buone caratteristiche reologiche. La pasta viene miscelata per alcuni minuti e

raffinata mediante passaggio su raffinatrice a rulli. Si ottiene una pasta omogenea di colore bianco candido e di gradevole profumo di menta.

Alla pasta dentifricia base residua (770 g) vengono aggiunti in piccole porzioni fino all'ottenimento di una pasta omogenea 38,5 g di batteri lattici liofilizzati (*L. salivarius* + *L. brevis*, 1:1; 10^{10} CFU/g) preliminarmente setacciati su setaccio da 50 mesh. Si ottiene una pasta omogenea, di colore leggermente nocciola pallido e con profumo di menta.

Esempio 5

Preparazione di compresse vaginali a rilascio rapido

Sono state ottenute con il metodo della granulazione a umido delle compresse vaginali rivestite con uno strato effervescente aventi ciascuna un peso di 2.100 mg e contenenti 100 mg di associazione di batteri lattici quale principio attivo.

Ogni compressa vaginale presenta la seguente composizione unitaria:

Batteri lattici liofilizzati setacciati [<i>L. brevis</i> (30×10^9 g), <i>L. salivarius</i> (30×10^9 g), <i>L. plantarum</i> (90×10^9 g)]	100,0 mg
Lattosio	1.368,0 mg
Amido di mais	246,0 mg
Acido adipico	192,0 mg
Sodio bicarbonato	150,0 mg
Magnesio stearato	30,0 mg
Acido stearico	9,0 mg
Silice colloidale	5,0 mg
	2.100,0 mg

RIVENDICAZIONI

R M 99 A 000400

1. Associazione di batteri lattici comprendente
 - (a) un primo componente costituito da almeno un ceppo di batteri lattici produttori di H_2O_2 , e
 - (b) un secondo componente costituito da almeno un ceppo di batteri lattici utilizzatori di arginina.
2. Associazione secondo la rivendicazione 1, in cui il ceppo di batteri lattici del componente (a) è scelto nel gruppo costituito dai ceppi delle specie *Lactobacillus crispatus* e *Lactobacillus salivarius* ed il ceppo di batteri lattici del componente (b) è scelto nel gruppo costituito dai ceppi delle specie *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus fermentum*.
3. Associazione secondo la rivendicazione 2, in cui il ceppo di batteri lattici del componente (b) è il ceppo di *Lactobacillus brevis* CD2 depositato presso il DSM - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germania, con il numero di accesso DSM 11988.
4. Associazione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 3, in cui il rapporto tra il numero di batteri del componente (a) e il numero di batteri del componente (b) è da 1:100 a 100:1.
5. Associazione secondo la rivendicazione 4, in cui detto rapporto è da 1:5 a 5:1.
6. Associazione secondo la rivendicazione 5, in cui detto rapporto è di 1:1.

7. Associazione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, sotto forma di dosaggio unitario, comprendente da 1×10^2 a 5×10^{11} di batteri del componente (a) e da 1×10^2 a 5×10^{11} di batteri del componente (b).
8. Associazione secondo la rivendicazione 7, comprendente 1×10^9 di batteri del componente (a) e 3×10^9 di batteri del componente (b).
9. Associazione secondo la rivendicazione 7 o 8 sotto forma di compresse, compresse masticabili, caramelle, gomme da masticare, gelatine, ovuli, supposte e microclismi.
10. Associazione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 6 sotto forma di granulati, creme e gel dentali, polveri per protesi, colluttori, dentifrici, sprays, sospensioni e pomate.
11. Associazione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, comprendente ulteriormente almeno un altro ceppo di batteri lattici scelto nel gruppo costituito da *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus catenaforme*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus leichmanii*, *Lactobacillus minutus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium angulatum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium dentium*, *Bifidobacterium eriksonii*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium*

plantarum e *Streptococcus thermophilus*.

12. Associazione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, comprendente ulteriormente vitamine, basi ammoniche quaternarie, sali minerali, antiossidanti e agenti antiplacca.

13. Uso di una associazione di batteri lattici comprendente

(a) un primo componente costituito da almeno un ceppo di batteri lattici produttori di H_2O_2 ; e

(b) un secondo componente costituito da almeno un ceppo di batteri lattici utilizzatori di arginina,

per produrre un integratore alimentare, un prodotto per l'igiene od un farmaco per la prevenzione e/o il trattamento terapeutico di infezioni e di stati infiammatori provocati da batteri, virus o funghi, in particolare a carico della cavità orale e delle strutture vaginali, uretrali, nasali, oculari ed auricolari.

14. Uso secondo la rivendicazione 13, in cui, le infezioni e gli stati infiammatori comprendono gengiviti, peridontiti, mucositi o stomatiti da farmaci e/o da agenti fisici, sindrome di Behçet, di cheratosi del cavo orale, glossite, angina, sialoadenite, sialolitiasi, pemfigo, *Lichen planus*, sindrome di Sjögren, vaginosi, vaginiti, uretriti, prostatiti, proctiti, otiti, congiuntiviti, riniti, sinusiti, leucoplachia, afte, infezioni erpetiche, e infezione da *Helicobacter pilori* a livello della cavità orale.

15. Uso secondo la rivendicazione 13 o 14 per il trattamento della cavità orale come agente deodorante, antinfiammatorio, agente anticarie e/o antiplacca.