

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201690147 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2016.07.29

(51) Int. Cl. A61K 35/74 (2015.01)
A61K 8/99 (2006.01)
A61P 1/02 (2006.01)
A61Q 11/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2014.07.04

(54) ПЕРОРАЛЬНЫЕ КОМПОЗИЦИИ

(31) 61/843,158

(32) 2013.07.05

(33) US

(86) PCT/CA2014/050642

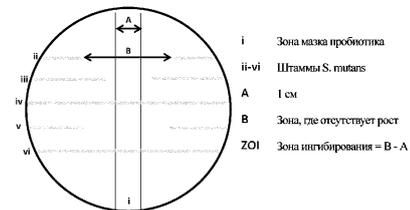
(87) WO 2015/000082 2015.01.08

(71) Заявитель:
ИНТЕГРА МЕДИКАЛ ИНК. (СА)

(72) Изобретатель:
Юдина Наталья, Сеферович Максим
Даниэль (СА)

(74) Представитель:
Осипов К.В., Хмара М.В., Липатова
И.И., Новоселова С.В., Дощечкина
В.В., Ильмер Е.Г., Пантелеев А.С.
(RU)

(57) Композиции для применения в гигиене полости рта содержат штамм *Lactobacillus helveticus*. Композиции, дополнительно содержащие штамм *Lactobacillus plantarum*, в частности штамм *Lactobacillus plantarum* SD5870, являются особенно эффективными. Комбинация *Lactobacillus helveticus* LAFTI L10 и *Lactobacillus plantarum* SD5870 синергетически улучшает гигиену полости рта. Эти композиции особенно пригодны против кариеса зубов.



201690147

A1

A1

201690147

ПЕРОРАЛЬНЫЕ КОМПОЗИЦИИ

Перекрестная ссылка на родственные заявки

5 Данная заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 61/843158, поданной 5 июля 2013, полное содержание которой включено в настоящее описание посредством ссылки.

Область техники

10 Настоящее изобретение относится к пробиотическим композициям для перорального введения. В частности, настоящее изобретение относится к пробиотическим композициям с полезными эффектами, такими как улучшение здоровья, особенно здоровья полости рта, а также к способам введения этих композиций.

15 Предшествующий уровень техники

Ротовая полость, например рот, является укрытием для многочисленной и разнообразной микробной флоры. При нарушении равновесия и появлении дисбаланса среди индигенных бактерий могут возникать патологии, такие как кариес зубов или периодонтит. Пробиотики являются живыми микроорганизмами, которые 20 могут иметь пользу для здоровья хозяина. Благотворное воздействие терапии пробиотиками достигается частично за счет изменения существующей микробной флоры, связанной с хозяином, в результате которого достигается сбалансированное и здоровое взаимодействия микробов и хозяина. Что касается полости рта, пробиотические композиции могут способствовать восстановлению 25 сбалансированной популяции бактерий, тем самым улучшая здоровье полости рта.

Кариес зубов является повсеместным инфекционным заболеванием, обычно передаваемым через воспитателей в детском возрасте, которое сохраняется на протяжении всей жизни или до полного эдентулизма. Кариес зубов контролируют, в основном, с помощью противомикробных профилактических подходов, таких как 30 чистка зубов щеткой или зубной нитью, которые эффективны, в основном, из-за их антимикробного действия. Последние достижения в области кариологии привели к более глубокому пониманию более широкого микробиологического контекста формирования кариеса зубов, и открывают новые возможности для новых стратегий и технологий профилактического лечения на основе микробов, которые должны 35 применяться для контроля кариеса.

Инфекцией инициирующих патогенных бактерий, участвующих в кариесе, является группа бактерий стрептококков мутанс, в первую очередь *Streptococcus mutans*, который инкапсулируется в биопленке нерастворимых экзополисахаридов, самостоятельно образуемых из сахарозы. Эта клейкая бляшка обеспечивает экологическую нишу, где патогенные бактерии размножаются и производят различные органические кислоты из углеводов, которые постепенно растворяют минералы зуба. Более современное понимание развития кариеса зубов теперь включает в себя контекст микробиологических, экологических факторов и факторов внешней среды, где изменение или дисбаланс в экологии микрофлоры предрасполагает к формированию кариеса. С этой целью были предложены пробиотические терапии как имеющие потенциал для обеспечения эффективного средства регулирования *S. mutans* и микрофлоры в ротовой полости (Caglar 2005a; Saha 2012; Tagg 2003), и было проведено значительное клиническое исследование потенциального использования отдельных штаммов в качестве пробиотиков (Näse 2001; Taipale 2012; Keller 2011; Stecksén-Blicks 2009; Burton 2013; Caglar 2008; Caglar 2006; Caglar 2005b).

Очевидный механизм, с помощью которого различные штаммы борются с кариесом, варьируется от случая к случаю. Например, некоторые штаммы имеют активность против *S. mutans* путем объединения с *S. mutans*, а другие - непосредственно убивают или ингибируют *S. mutans*, секретирруя особые бактериоцины, а другие еще колонизируют бляшки и конкурируют с *S. mutans* за свою экологическую нишу. В связи с этим существует потенциальная возможность для дополнительных синергетических эффектов комбинирования этих механизмов. В качестве другого примера можно привести то, что два пробиотических штамма могут секретировать различные бактериоцины, которые из-за их различной биохимической мишени в пределах *S. mutans* могут иметь больший комбинированный эффект в отношении уничтожения *S. mutans*, чем любой из них по отдельности.

Пробиотические композиции также могут быть улучшены при определенных обстоятельствах путем добавления в композицию пребиотиков. Пребиотик "кормит" микробную флору и увеличивает полезную субпопуляцию бактерий; пробиотик добавляет полезные культуры в популяции микробной флоры. Термин "синбиотический" описывает композицию, которая содержит как пребиотики, так и пробиотики, например, композицию, которая содержит как фруктоолигосахариды (FOS) (пребиотик), так и бифидобактерии (пробиотик). Исследования в этой области посвящены синергии между типами ингредиентов для получения лучшего

понимания того, как рост и выживаемость пробиотиков могут быть повышены за счет наличия дополнительных пребиотических ингредиентов.

Несмотря на то, что известно большое количество пробиотических композиций, каждая композиция обладает уникальными характеристиками и особыми преимуществами для здоровья. Один из примеров пробиотической композиции с пользой для здоровья полости рта описан в предварительной заявке на патент США того же заявителя № 61/674390, поданной 22 июля 2012 года, в которой описана пробиотическая комбинация, включающая *Streptococcus salivarius* K12® (BLIS K12®) и по меньшей мере пять штаммов бактерий *Lactobacillus*.

Тем не менее, всегда существует потребность в улучшенных пробиотических композициях, в частности композициях, которые приводят к достижению одного или более результатов из следующих: к улучшенной гигиене полости рта, улучшению колонизации в полости рта, улучшенной эффективности, улучшенной годности, эффективности для различных и конкретных заболеваний полости рта; а также в дополнительных улучшениях, а также в способах их введения или применения.

Сущность изобретения

В одном аспекте настоящего изобретения предложена композиция для применения в гигиене полости рта, содержащая эффективное для гигиены полости рта количество пробиотика, содержащего штамм *Lactobacillus helveticus*.

Во втором аспекте настоящего изобретения предложена композиция для применения в гигиене полости рта, содержащая эффективное для гигиены полости рта количество пробиотика, содержащего штамм *Lactobacillus helveticus* и штамм *Lactobacillus plantarum*.

В третьем аспекте настоящего изобретения предложена композиция для применения в гигиене полости рта, содержащая эффективное для гигиены полости рта количество пробиотика, содержащего штамм *Lactobacillus helveticus* и штамм *Bifidobacterium longum* SD5846.

В четвертом аспекте настоящего изобретения предложена композиция для применения в лечении или профилактике кариеса зубов, содержащая эффективное для профилактики кариеса зубов количество пробиотика, содержащего *Lactobacillus plantarum* SD5870.

В пятом аспекте настоящего изобретения предложена композиция для применения в лечении или профилактике кариеса зубов, содержащая эффективное для профилактики кариеса зубов количество пробиотика, содержащего *Bifidobacterium longum* SD5846.

В шестом аспекте настоящего изобретения предложены применения вышеупомянутых пробиотиков для гигиены полости рта.

В седьмом аспекте настоящего изобретения предложены применения вышеупомянутых пробиотиков для приготовления лекарственного средства для гигиены полости рта.

В восьмом аспекте настоящего изобретения предложен способ лечения или профилактики состояния или заболевания полости рта у субъекта, включающий пероральное введение вышеупомянутого пробиотика субъекту.

В девятом аспекте настоящего изобретения предложена товарная упаковка, содержащая вышеупомянутый пробиотик и инструкции по его применению в гигиене полости рта.

Пробиотик содержит или состоит по существу из штамма *Lactobacillus helveticus*. Пробиотик может содержать или состоять по существу из штамма *Lactobacillus helveticus* и одной или более других пробиотических бактерий, предпочтительно из лактобактерий, бифидобактерий и/или рода стрептококков, более предпочтительно одной или более других лактобактерий, еще более предпочтительно одной другой лактобактерии. Пробиотик может содержать или состоять по существу из обоих штаммов *Lactobacillus helveticus* и *Lactobacillus plantarum*, особенно *Lactobacillus plantarum* SD5870 (известен в продаже как *Lactobacillus plantarum* Lp-2001). Фраза "состоит по существу из" указывает на то, что другие пробиотические бактерии отсутствуют, либо присутствуют в несущественных количествах. Штамм *Lactobacillus helveticus* предпочтительно содержит *Lactobacillus helveticus* LAFTI L10, *Lactobacillus helveticus* R0052 или их смесь. Штамм *Lactobacillus helveticus* более предпочтительно содержит *Lactobacillus helveticus* LAFTI L10.

Особенно для лечения или профилактики кариеса зубов пробиотик может альтернативно содержать *Lactobacillus plantarum* SD5870 или *Bifidobacterium longum* SD5846. Пробиотик предпочтительно содержит *Lactobacillus plantarum* SD5870 в комбинации с одним или обоими *Streptococcus salivarius* M18 и *Streptococcus salivarius* K12. Предпочтительно пробиотик состоит по существу из *Lactobacillus plantarum* SD5870 или состоит по существу из *Lactobacillus plantarum* SD5870 и одного или обоих *Streptococcus salivarius* M18 и *Streptococcus salivarius* K12, причем другие пробиотические бактерии отсутствуют, либо присутствуют в несущественных количествах.

Гигиена полости рта включает профилактику или лечение состояний или заболеваний полости рта. Такие состояния или заболевания включают, например,

кариес зубов (полости), неприятный запах изо рта, гингивит, язвы во рту, включая афтозный стоматит (стоматит), кандидоз и заболевания пародонта. В одном аспекте изобретения популяция *Streptococcus mutans* в ротовой полости подавляется, приводя к улучшению здоровья полости рта. В особенно предпочтительном варианте осуществления кариес зубов предотвращается. Субъекты, для которых это изобретение является полезным, включают, например, млекопитающих. Субъекты могут включать в себя приматов, людей или домашних животных. Некоторыми примерами домашних животных являются собаки, кошки и лошади.

Композиция может содержать от примерно 0,0001% до примерно 100% по массе пробиотика в расчете на общую массу композиции. По желанию, пробиотик может составлять от примерно 0,001% до примерно 50% по массе, или от примерно 0,001% до примерно 10% по массе, или от примерно 0,001% до примерно 5% по массе композиции. Эффективное для гигиены полости рта количество пробиотика в композиции зависит в некоторой степени от возраста субъекта, типа пробиотических бактерий, частоты дозирования, лекарственной формы, способа введения и изменчивости комменсальной микрофлоры полости рта субъектов. Например, дозы пробиотика в диапазоне от приблизительно 10^7 до 10^{11} колониобразующих единиц (КОЕ), как правило, пригодны; в частности, для пастилок дозы пробиотика в диапазоне от приблизительно 10^8 до 10^{10} КОЕ на пастилку являются предпочтительными, причем оптимальное количество зависит от штамма или штаммов пробиотика в композиции и частоты введения, которая может варьироваться от 1 до 4 пастилок в день. Введение пробиотика можно осуществлять в любое удобное время, например, во время или после чистки зубов, или во время или после приема пищи.

Композиции содержат пробиотик и могут содержать другие ингредиенты, как правило, известные в данной области, например, один или более агентов реминерализации, пребиотиков, носителей, разбавителей, эксципиентов и тому подобное. Другие ингредиенты предпочтительно являются фармацевтически приемлемыми или, по меньшей мере, приемлемыми для использования в ротовой полости.

S. mutans разлагает матрицу зуба за счет секреции кислот, растворяющих минералы кальция и фосфата. Через несколько месяцев секреции кислоты деминерализация будет распространяться на эмаль и, в конечном счете, на дентин. Хотя на этом этапе она является обратимой, дальнейшее прогрессирование приводит к образованию полости и требует восстановления зубов. Слюна играет важную роль не только в качестве естественного буфера в отношении

раздражающих кислот, но и в качестве источника кальция и фосфата для реминерализации зубов, естественно подавляя патологию или даже обращая ее вспять. Образование кариеса зубов является динамическим равновесием между деминерализацией патогенными бактериями и реминерализацией. Вмешательства и профилактические процедуры часто фокусируются на смещении чаши весов в сторону реминерализации путем добавления агентов для этой цели. Агенты реминерализации включают, например, казеиновый фосфопептид/аморфный фосфат кальция (CPP-ACP), β -трикальцийфосфат, наночастицы аморфного фосфата кальция (NACP), гидроксипатит, глицерофосфат кальция или другие варианты кальция и фосфата. Агент реминерализации может быть добавлен в количестве от 1 до 10% от массы композиции, предпочтительно от 1 до 4 масс.%. Фтор также добавляют во многие стоматологические продукты, поскольку он является эффективным катализатором реминерализации и включается в кристаллическую структуру, что приводит к более устойчивой поверхности зуба, чем исходная. В частности, казеиновый фосфопептид/аморфный фосфат кальция (CPP-ACP) (смотри патент США 7491694, раскрытие которого включено в настоящее описание посредством ссылки) особенно эффективен, поскольку связанный пептид, полученный из молочного белка, связывается и стабилизирует фосфат кальция в растворимой аморфной форме, которая является легко биодоступной. Можно ожидать, что сочетание пробиотической композиции, которая предотвращает деминерализацию, с агентом реминерализации, особенно CPP-ACP, будет иметь еще большую эффективность в профилактическом лечении кариеса зубов.

Включение пребиотиков в композиции повышает эффективность пробиотика при определенных обстоятельствах. Пребиотик в основном функционирует как «пища» для микробной флоры. Термин "синбиотический" описывает композицию, которая содержит как пребиотики, так и пробиотики. Некоторые примеры пребиотиков, которые могут быть использованы в настоящем изобретении, включают, например, моно-, ди- и олигосахариды, такие как фруктаны манозы, фруктоолигосахариды (ФОС), ксилоолигосахариды (КОС), полидекстроза и галактоолигосахариды (ГОС), лактулоза, тагатоза, инулин, мальтодекстрин, лактит и их смеси. В общем, количество используемого пребиотика намного больше, чем количество пробиотика, например, граммовые количества пребиотика можно использовать на миллиграммовые количества пробиотика.

Носители, разбавители и эксципиенты для композиций для полости рта, как правило, известны в данной области и включают, например, абсорбенты,

подкисляющие агенты, подщелачивающие агенты, связующие агенты, буферы, покрытия, красители, агенты для контролируемого высвобождения, носители для контролируемого высвобождения, разбавители, разрыхлители, шипучие агенты, ароматизаторы, глиданты, лубриканты, пластификаторы, агенты, повышающие растворимость, смачивающие агенты, поверхностно-активные вещества, консервирующие агенты, подсластители, ароматизаторы и т.д. Некоторые конкретные примеры включают лактозу, декстрозу, фруктозу, сахарозу, сорбит, маннит, крахмалы, гуммиарабик, фосфат кальция, альгинаты, трагакант, желатин, силикат кальция, поливинилпирролидон, целлюлозу (например, микрокристаллическую целлюлозу), водный сироп, воду, смесь воды с этанолом, смесь воды с гликолем, смесь воды с полиэтиленгликолем, пропиленгликоль, метилцеллюлозу, метилгидроксibenзоаты, пропилгидроксibenзоаты, тальк, стеарат магния, минеральное масло или жировые вещества, такие как твердый жир, или их подходящие смеси.

Особенно предпочтительным классом инертных наполнителей являются заменители сахара, которые действуют в качестве подсластителей с уменьшенным или незначительным эффектом на уровень глюкозы в крови. Предпочтительно заменители сахара не являются кариогенными. Такие заменители сахара включают, например, сахарные спирты (например изомальт), стевию, аспартам, сукралозу, неотам, ацесульфам калия и сахарин. Особо отмечаем стевию и изомальт. Основой стевии являются стевигликозиды и она содержит экстракт растения *Stevia rebaudiana*. Изомальт является эквимольной смесью двух дисахаридов, каждый из которых состоит из двух сахаров глюкозы и маннита (α -D-глюкопиранозидо-1,6-маннит), а также глюкозы и сорбита (α -D-глюкопиранозидо-1,6-сорбит). Изомальт, в частности, повышает стабильность композиций согласно настоящему изобретению. Некоторые заменители сахара (например изомальт) также могут считаться пребиотиками.

Композиции согласно настоящему изобретению можно вводить субъекту перорально в виде пероральной или местной лекарственной формы. Подходящие лекарственные формы включают, например, таблетки (например шипучие таблетки и/или многослойные таблетки), пилюли, порошки, пастилки (включая многослойные пастилки), саше, пакеты, эликсиры, суспензии, эмульсии, растворы, сиропы, аэрозоли, капсулы, пасты (например, зубную пасту), продукты питания и кондитерские изделия (например, жевательную резинку). Рецептуры таких лекарственных форм хорошо известны в данной области техники. Композиции согласно настоящему изобретению имеют хорошую стабильность, сохраняя

эффективное количество КОЕ пробиотических штаммов в течение не менее 24 месяцев, даже в течение периода не менее 30 месяцев, при комнатной температуре (20-25 °С). Срок хранения может быть продлен на период более 36 месяцев в определенных условиях хранения (например, при условиях охлаждения при температуре 2-8 °С) и/или в различных системах доставки, таких как саше/палочки порошка.

Композиция может быть представлена на рынке в виде товарной упаковки вместе с инструкциями по применению композиции для гигиены полости рта. Товарные упаковки включают в себя, например, бутылки, банки, блистерную упаковку, коробки и т.д. Инструкции могут быть предусмотрены, например, в визуальной или звуковой форме, например, в письменной форме, в картинках, на звуковых и/или видео носителях информации, или в их комбинации.

Дополнительные признаки данного изобретения будут описаны или станут очевидными из последующего подробного описания.

Краткое описание графических материалов

Для того, чтобы изобретение было более понятным, теперь будут подробно описаны варианты осуществления изобретения в качестве примера со ссылками на сопровождающие графические материалы, на которых:

На фиг. 1 представлено схематическое изображение культуральной чашки, где показана зона бактериального мазка и как определяются зоны ингибирования (ZOI).

На фиг. 2 представлен 1,5% агарозный гель с ПЦР-ампликонами определенного сегмента ДНК хромосомы *S. mutans*, специфичного для этого вида. В качестве положительного контроля использовали штамм *S. mutans* 25175.

На фиг. 3 представлен график, показывающий количественную оценку в экспериментах по отсроченному антагонизму пробиотиков по отдельности и во всех возможных комбинациях двух пробиотиков против *S. mutans* 25175. Эксперименты выполняли по меньшей мере в 4 повторах с использованием агара ВН1, где рН был сбалансирован с помощью 0,1% CaCO₃.

На фиг. 4 представлен график, показывающий количественную оценку в экспериментах по отсроченному антагонизму пробиотиков по отдельности и во всех возможных комбинациях двух пробиотиков против свежесывленного *S. mutans* 13. Эксперименты выполняли по меньшей мере в 4 повторах с использованием агара ВН1, где рН был сбалансирован с помощью 0,1% CaCO₃.

На фиг. 5 представлен график, показывающий количественную оценку в экспериментах по отсроченному антагонизму пробиотиков по отдельности и во всех

возможных комбинациях двух пробиотиков против свежесыведенного *S. mutans* 14. Эксперименты выполняли по меньшей мере в 4 повторах с использованием агара ВНИ, где pH был сбалансирован с помощью 0,1% CaCO₃.

5 На фиг. 6 представлен график, показывающий количественную оценку в экспериментах по отсроченному антагонизму пробиотиков по отдельности и во всех возможных комбинациях двух пробиотиков против свежесыведенного *S. mutans* 15. Эксперименты выполняли по меньшей мере в 4 повторах с использованием агара ВНИ, где pH был сбалансирован с помощью 0,1% CaCO₃.

10 На фиг. 7 представлена таблица, демонстрирующая синергический антагонизм в отношении штаммов *S. mutans* для различных комбинаций пробиотических штаммов с антимикробными свойствами. Было проведено сравнение со штаммами компонентов по отдельности с использованием однофакторного ANOVA с данными по меньшей мере четырех индивидуально повторенных экспериментов.

15 На фиг. 8 представлена таблица, демонстрирующая сравнение относительной продукции перекиси водорода пробиотическими штаммами. +++ в течение 24 часов, ++ в течение 48 часов, + в течение 72 часов и – отсутствие продукции.

20 На фиг. 9 представлен график, показывающий адгезию различных пробиотических штаммов и штаммов *S. mutans* к клеточной линии 16HBE140-бронхиального эпителия человека.

25 На фиг. 10 представлен график, показывающий сравнение агрегации различных пробиотических штаммов с *S. mutans* 25175. Сравнение выполняли с помощью однофакторного ANOVA с коррекцией Бонферрони (многократный t-тест с альфа-коррекцией) (*p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001).

Подробное описание изобретения

30 На протяжении описания используются названия родов/видов и обозначения штаммов. Время от времени классификация организмов изменяется и любому конкретному организму могут присвоить другое название и/или обозначение штамма. Пробиотические организмы, упомянутые в настоящем документе, имеют определенные геномы, которые остаются неизменными независимо от того, 35 изменяется ли название и/или обозначение штамма организмов. Специалист в данной области может легко определить из генома, охватывается ли какой-либо конкретный организм, независимо от названия и/или обозначения его штамма, настоящим описанием.

Пример 1: Выделение *S. mutans* и экстракция ДНК

Налет от 4-х разных субъектов собирали с использованием стерильных пробников и распределяли непосредственно на агар *mitis salivarius-bacitracin* (митис саливариус с бацитрацином), селективный к *S. Mutans*, а затем инкубировали в течение 48 часов при температуре 37 °С в условиях микроаэрофилии. Затем отдельные колонии сеяли штрихом в квадранте на чашки с BHIYE, а затем снова инкубировали в течение 48 часов при температуре 37 °С в условиях микроаэрофилии. Последующее генотипирование проводили на выделенных колониях для подтверждения их видов. Экстрагировали ДНК бактерий с использованием InstaGene Matrix (BioRad), аналогично инструкциям изготовителя. Если коротко, то одну колонию собирали и диспергировали в 1 мл стерильной воды. Затем смесь центрифугировали в течение 1 мин со скоростью 10000 оборотов в минуту и супернатант отбрасывали. К осадку добавляли 200 мкл InstaGene Matrix, образцы быстро встряхивали и инкубировали при 55 °С в течение 20 минут на водяной бане. Образцы затем удаляли и инкубировали в кипящей водяной бане в течение 30 минут. Затем образцы снова перемешивали, а затем центрифугировали в течение 3 мин со скоростью 10000 оборотов в минуту. Супернатанты собирали и хранили при -20 °С до использования для ПЦР.

Все реагенты ПЦР получали от Invitrogen. Образцы экстрагированной ДНК подвергали ПЦР в реакционной смеси, содержащей 1хПЦР-буфер, 15 мМ MgCl₂, 200 мМ смеси dNTP, 10 мкМ праймера MUT-F, 10 мкМ праймера MUT-R, 5 ед. Taq ДНК-полимеразы, 10 мкл матричной ДНК и дважды дистиллированную воду (ddH₂O) до конечного объема 50 мкл. Праймеры амплифицируют участок ДНК 517 п.о., кодирующий *gtfB* внеклеточную глюкозилтрансферазу *S. mutans* (Oho 2000).

MUT-F: 5' – ACT ACA CTT TCG GGT GGC TTG G – 3' (SEQ ID NO: 1)
 MUT-R: 5' – CAG TAT AAG CGC CAG TTT CAT C – 3' (SEQ ID NO: 2)

Условия термоциклирования: первоначальная денатурация при 95 °С в течение 1 минуты, а затем 30 циклов денатурации при 95 °С в течение 30 секунд, отжиг при 59 °С в течение 30 секунд и удлинение при 72 °С в течение 1 минуты. Была включена конечная стадия удлинения при 72 °С в течение 5 минут. Продукты ПЦР затем смешивали с загрузочным буфером ДНК и разделяли в 1,5% агарозном геле с 0,05% EtBr при 100 В в течение 45 минут, и визуализировали при возбуждении УФ-светом.

Пример 2: Отсроченный антагонизм

Чтобы проверить антагонизм пробиотиков в отношении *S. mutans*, проводили эксперимент на отсроченный антагонизм, по существу как ранее его выполняли в

работе Tagg и Bannister (Tagg 1979). Жидкие культуры инокулировали в MRS для лактобацилл или для бифидобактерий, и в BHI для стрептококков, а затем инкубировали в течение ночи при температуре 37 °C в условиях микроаэрофилии. Со ссылкой на фиг. 1, наносили мазок суспензии, полученной в течение ночи, на чашку с BHI или CB с 0,1% (масс./объем) CaCO₃ шпателем шириной 1 см с использованием стерильных ватных тампонов. Чашки с BHI содержали 18,5 г сердечно-мозгового экстракта (BHI, Difco), 7,5 г агара (Fisher) и 1 г CaCO₃ (Sigma). Чашки с CB содержали 22 г колумбийской крови (Difco), 7,5 г агара (Fisher) и 1 г CaCO₃ (Sigma). Затем чашки инкубировали при 37 °C в условиях микроаэрофилии. Через 48 ч выросшую культуру бактерий соскабливали предметным стеклом для микроскопа и чашку повторно стерилизовали парами хлороформа в течение 20 минут. Затем перпендикулярно штрихами наносили мазки суспензии, полученной в течение ночи, штамма *S. mutans* ATCC25175, и 4 свежих изолятов, и чашки снова инкубировали.

Через 48 часов рассчитывали зону ингибирования (ZOI) как расстояние между этими двумя зонами роста бактерий, минус 1 см, где был посеян пробиотик непосредственно. Статистика была выполнена с использованием Prism 4 (GraphPad). Для сравнения между конкретными пробиотиками и комбинациями пробиотиков использовали однофакторный ANOVA. Синергизм рассчитывали как синергический фактор, который является суммой индивидуальных обработок, разделенной на комбинированную обработку. Значения $A > 1$ указывают на синергизм комбинации (Wang 2012).

Для определения штаммов с пробиотическим потенциалом в отношении кариеса зубов проводили скрининг антагонизма к *S. mutans* для многих имеющихся в продаже штаммов пробиотиков. Во-первых, как описано в примере 1, были получены свежие изоляты патогена путем высева образцов налета от 4 субъектов на чашки с агаром *mitis salivarius*-bacitracin, селективным к *S. Mutans*. Колонии генотипировали на присутствие специфической маркерной последовательности *S. mutans*, которую сравнивали со штаммом *S. mutans* ATCC 25175 (фиг. 2). Было выбрано четыре изолята (1 для каждого субъекта).

Проводили анализы отсроченного антагонизма против этих 4-х изолятов и *S. mutans* 25175 на двух типах носителей для быстрого скрининга пробиотических штаммов, имеющих какой-либо антагонизм. Таблица 1 показывает наличие или отсутствие зоны ингибирования (ZOI) для любого повтора и для любого из 5 штаммов, проанализированных в этих экспериментах. Обнаружено, что штаммы *Streptococcus salivarius* K12, *Streptococcus salivarius* M18, *Lactobacillus plantarum*

SD5870, *L. helveticus* R0052 и *Bifidobacteria longum* SD5846 (известный в продаже как *Bifidobacteria longum* BI-05) проявляют антагонизм на обоих типах агара, в то время как для *Lactobacillus helveticus* LAFTI L10 антагонизм наблюдался только на агаре BHI. Поэтому агар BHI использовали в последующих количественных экспериментах на отсроченный антагонизм. Для количественной оценки антагонизма эксперимент повторяли для каждой пробиотической бактерии в по меньшей мере от четырех до восьми отдельных экспериментах и специально измеряли зону ингибирования. Оценивали равные смеси всех штаммов пробиотических бактерий во всех возможных комбинациях из двух, чтобы проверить потенциальные синергетические эффекты. Измеряли ZOI пяти патогенных штаммов и усредняли по четырем экспериментам. Результаты показаны на фиг. 3-6.

В целом, оказалось, что штамм *S. mutans* из Коллекции культур является более устойчивым к антагонистическим факторам, секретлируемым пробиотиками, по сравнению со свежими изолятами (фиг. 3). Например, в экспериментах с отдельными пробиотиками не наблюдалось никакого антагонизма вообще для *S. mutans* 25175, в то время как для *S. mutans* 13 все 6 пробиотиков, за исключением *B. longum* SD5846, были антагонистическими. *L. helveticus* LAFTI L10 и *L. helveticus* R0052 в виде отдельного штамма были способны антагонизировать все четыре свежееизолированных *S. mutans*, тогда как *S. salivarius* K12 и *L. plantarum* SD5870S антагонизировали три из четырех. *S. salivarius* M18 антагонизировал два из четырех патогенных изолятов, и *B. longum* SD5846 - только один, причем средние ZOI во всех случаях были сравнительно слабее, чем у других штаммов пробиотиков.

Таблица 1

Наличие или отсутствие ZOI на основе качественной оценки анализов отсроченного антагонизма в отношении пяти штаммов *S. mutans*.

| Штамм | CB | BHI |
|------------------------------|----|-----|
| <i>S. salivarius</i> K12 | + | + |
| <i>S. salivarius</i> M18 | + | + |
| <i>S. thermophilus</i> R0083 | - | - |
| <i>S. thermophilus</i> St-21 | - | - |
| <i>L. rhamnosus</i> GG | - | - |
| <i>L. plantarum</i> SD5870 | + | + |
| <i>L. paracasei</i> Lp-37 | - | - |
| <i>L. salivarius</i> Ls-33 | - | - |

| | | |
|--------------------------------|---|---|
| <i>L. acididophilus</i> La-14 | - | - |
| <i>L. reuteri</i> Lru-1038 | - | - |
| <i>L. plantarum</i> Lp-115 | - | - |
| <i>L. rhamnosus</i> Lr-32 | - | - |
| AAP-2 | - | - |
| <i>L. helveticus</i> R0052 | + | + |
| <i>L. helveticus</i> LAFTI L10 | - | + |
| <i>L. casei</i> Lc-11 | - | - |
| <i>B. lactis</i> BI-04 | - | - |
| <i>B. breve</i> BI-03 | - | - |
| <i>B. bifidum</i> R0071 | - | - |
| <i>B. longum</i> R00175 | - | - |
| <i>B. longum</i> SD5846 | + | + |

Средние ZOI во многих случаях были больше, когда два штамма были объединены вместе в равных количествах, и оказалось, что определенные бактерии сочетаются лучше, чем другие. Например, для изолята *S. mutans* 15 (фиг. 6), из 15 возможных комбинаций из двух штаммов, ZOI семи комбинаций были больше, чем ZOI *L. helveticus* R0052, самого сильного отдельного пробиотика. Из этих семи комбинаций, шесть содержали либо *L. helveticus* LAFTI L10, либо *L. plantarum* SD5870. Это было справедливым для всех патогенных штаммов; в каждом случае ингибирования изолятов 13, 14, 15 и 17 *S. mutans*, или даже *S. mutans* 25175, четыре самые большие ZOI всегда обеспечивались комбинациями, содержащими либо *L. helveticus* LAFTI L10, либо *L. plantarum* SD5870.

На фиг. 7 представлены средние значения зоны ингибирования (ZOI) вместе с расчетными значениями синергизма антагонизма. Продемонстрировано существенное отличие ZOI, рассчитанной с помощью однофакторного ANOVA, для комбинаций по сравнению с составляющими их отдельными штаммами. Синергетический фактор (SQ) отражает относительный синергизм путем деления ZOI для комбинаций пробиотиков на сумму ZOI их компонентов, измеренных индивидуально. Комбинации с более чем 50% синергизмом (SQ >1,5) выделены жирным шрифтом. NA означает, что антагонизм отсутствует (no antagonism), в то время как US означает неопределенный синергизм (undetermined synergism), поскольку антагонизм наблюдали вообще только в комбинации. Комбинация *L. helveticus* LAFTI L10 с *B. longum* SD5846 и комбинация *L. plantarum* SD5870 с *L.*

helveticus R0052 были значительно более антагонистическими в отношении штаммов *S. mutans*, чем их отдельные компоненты. Комбинация *L. helveticus* LAFTI L10 с *B. longum* SD5846 была очень синергетической с US 1.8, 3.7, 2.4 и 2.2 при тестировании в отношении штаммов *S. mutans* 25175, 13, 14, 15 и 17, соответственно. Комбинация *L. plantarum* SD5870 с *L. helveticus* R0052 была также синергетической, проявляющая SQ, равное NA, 3.3, 1.5, 1.8 и 1.6, соответственно.

Интересно отметить, однако, что бактериальные компоненты из каждой из этих двух синергических комбинаций (*L. helveticus* LAFTI L10 и *L. plantarum* SD5870) имели особенно сильную активность и синергизм в сочетании друг с другом. ZOI для этих двух объединенных штаммов показала самый высокий антагонизм с большим отрывом в отношении всех пяти штаммов *S. mutans*. ZOI для *L. helveticus* LAFTI L10 и *L. plantarum* SD5870 была фактически выше, чем ZOI для двух штаммов по отдельности, добавленных во все штаммы *S. mutans*, что оказалось весьма значительным на основании однофакторного ANOVA. Для *S. mutans* 25175 не было никакого ингибирования вообще под влиянием любых пробиотических штаммов по отдельности, но наблюдалось очень значительное ингибирование (около 20 мм), когда оба штамма были объединены вместе. Это сильно наводит на мысль о синергетической активности между пробиотиками, и фактически синергетические факторы имели US 3.4, 3.9, 4.2 и 4.2 для штаммов *S. mutans* 25175, 13, 14, 15 и 17 соответственно.

Пример 3: Продукция перекиси водорода

Для проверки продукции перекиси водорода использовали обычную методику, которая весьма аналогична используемой в последнее время в работах Kang et al (Kang 2011). По существу, стандартную агаровую среду для выращивания (MRS для лактобацилл или для бифидобактерий, и BHYE для стрептококков) модифицировали путем добавления 0,25 мг/мл 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМВ) и 0,1 нг/мл пероксидазы. Кратко, 0,125 г ТМВ и 5 мг пероксидазы растворяли в 1 мл диметилсульфоксида (ДМСО) и воды соответственно. Эти растворы стерилизовали с использованием 0,2 мкм шприцевых фильтров и добавляли к 0,5 л агаровой среды непосредственно после охлаждения до <50°C после обработки в автоклаве. Затем чашки разливали. Выбирали отдельные колонии пробиотика из маточной чашки и наносили штрихом непосредственно на агар с ТМВ и пероксидазой, и на контрольные чашки со стандартным агаром с использованием инокуляционной петли. Затем чашки оставляли при 37 °C в условиях микроаэрофилии в течение 72 часов. Колонии, окружающие агар, оценивали на предмет каких-либо изменений в

цвете до синего или красного каждые 24 часа путем сравнения с контрольной чашкой с обычными мазками MRS или BHYE. Эксперимент повторяли три раза.

Поскольку многие лактобактерии продуцируют перекись водорода в качестве антагонистического агента против окружающих бактерий, анализировали продукцию перекиси водорода штаммами. Было подтверждено, что 10 из 11 штаммов лактобактерий продуцируют некоторое количество перекиси водорода. *S. salivarius* не продуцировал, а два штамма *S. thermophilus* и все 5 штаммов бифидобактерий продуцировали различное количество H_2O_2 (фиг. 8). Все штаммы, для которых было обнаружено, что они имеют антагонизм в отношении *S. mutans*, были одними из самых быстрых по продукции H_2O_2 , причем они это делали в течение 24 часов после посева, за исключением *S. thermophilus*.

Пример 4: Адгезия клеток к поверхности

Реагенты клеточных культур получали от GIBCO, если не указано иное. Иммуортиализованные человеческие бронхиальные эпителиальные клетки линии 16HBE14о- выращивали в MEM среде с добавлением 10% FBS (фетальной бычьей сыворотки) и 2 мМ L-глутамин, и выдерживали с использованием стандартных процедур клеточного культивирования при 37°C и 5% CO_2 . Клетки высевали в лунки 24-луночной планшеты в концентрации 1×10^5 клеток на лунку и оставляли расти до состояния конфлюентности (около 48 часов, приблизительно 5×10^5 клеток на лунку). Клеточную среду затем отсасывали и замещали 500 мкл свежей среды, содержащей 100-кратные разведения различных суспензий стационарной фазы бактериальных клеток, которые выращивали в течение ночи в MRS (лактобактерии и бифидобактерии) или в BHYE (стрептококки). Затем планшеты инкубировали при 37°C и 5% CO_2 . Через 5 часов культуральную среду отсасывали и монослои тщательно промывали три раза PBS (фосфатно-солевым буфером) для удаления несвободно прикрепленных бактерий. Эукариотические клетки затем разрушали добавлением Тритон™ X-100 до конечной концентрации 0,1%. Затем подсчитывали оставшиеся прикрепленные КОЕ, содержащиеся в лизисной суспензии, капельно-чашечным методом. В 96-луночной планшете выполняли 10-кратные серийные разведения до 10^{-6} , затем на соответствующий агар (MRS для лактобактерий и бифидобактерий, и BHYE для стрептококков) наносили по 10 мкл различных разведений в трех экземплярах. Чашки с агаром инкубировали при 37 °C в условиях микроаэрофилии в течение 24 часов, после чего подсчитывали КОЕ. Адгезия представлена в виде общего количества КОЕ, деленного на число бронхиальных клеток в лунке, как определено подсчетом клеток в контрольной лунке без бактерий с клетками 16HBE14о-.

Для того, чтобы проявить свое действие, бактерии должны находиться совместно с *S. mutans* в полости рта. Чтобы проверить потенциал пробиотических бактерий оставаться в полости рта, проводили анализ связывающей способности (фиг. 9). В этом анализе проверяли адгезию бактерий к монослою бронхиальных эпителиальных клеток человека 16HBE14o-, которые разделяют клеточную родословную с эпителиальными клетками полости рта и имеют сходный с ними фенотип. Бактерии высевали на MEM среду и давали расти в течение 5 часов, затем отмывали несвязанные бактерии и подсчитывали КОЕ в оставшейся смеси разрушенных эукариотических и бактериальных клеток. Было установлено, что, в целом, патогены *S. mutans* плохо прилипают к клеткам так же, как и лактобактерии (фиг. 9). Однако, для сравнения, *S. salivarius*, которые были первоначально выделены из человеческого горла, прилипали очень плотно.

Пример 5: Совместная агрегация с *S. mutans*

Различные пробиотические бактерии или *S. mutans* инокулировали в 1 мл жидкой MRS для лактобактерий или бифидобактерий, или в BHIYE для стрептококков, а затем инкубировали в течение ночи при температуре 37 °C в условиях микроаэрофилии. Затем пробирки центрифугировали со скоростью 2000 оборотов в минуту в течение 5 мин и супернатант отсасывали, а затем повторно суспендировали в 1 мл PBS. Эту стадию повторяли 3 раза. Делали 2-кратные серийные разведения суспендированных клеток в 100 мкл PBS до 128-кратного разведения в 96-луночную планшету. Оптическую плотность считывали с планшеты при 600 нм с помощью считывающего устройства EON microplate reader (BioTek). На основании полученных данных строили кривые зависимости оптической плотности от разбавления, и разбавление для оптической плотности 0,3 экстраполировали для каждой тестируемой бактерии. Тройные лунки, содержащие 200 мкл суспендированных бактерий, разводили непосредственно в 96-луночной планшете в соответствии с экстраполяцией. Для каждой бактерии также добавляли по 100 мкл того же разведения вместе со 100 мкл разведенных *S. mutans*. Смеси равномерно диспергировали путем отсасывания вверх и вниз с помощью многоканальной пипетки. Затем планшету герметизировали стерильной прозрачной пластиковой пленкой, а затем сразу же инкубировали в микропланшет-ридере при 37 °C вместе с контролем PBS. Лунки считывали при длине волны 600 нм через 6 часов.

Также оценивали потенциал штаммов приклеиваться и взаимодействовать непосредственно с *S. mutans* посредством анализа агрегации (фиг. 10). Отдельные штаммы, а также смеси с равными частями штаммов, содержащие *S. mutans*, анализировали на изменения оптической плотности при 600 нм при инкубации при

37 °C. Повышенная оптическая плотность указывает на быстрее оседание в результате агрегации по сравнению с любым штаммом по отдельности. Этот эксперимент показывает, что *S. mutans* не агрегируется автоматически без биопленки. Однако добавление любого штамма *L. helveticus* (LAFTI L10 или R0052) приводит к значительному увеличению оптической плотности по сравнению с любой бактерией по отдельности.

Пример 6: Обсуждение эффектов *in vitro*

Здесь было показано, что уникальные свойства конкретных штаммов бактерий обладают потенциалом изменения микрофлоры полости рта для улучшения состояния здоровья полости рта и уменьшения кариеса зубов, вызываемого *S. mutans*. Этот вывод подкрепляется особым открытием, что штаммы вида *L. helveticus* (LAFTI L10 и R0052) ингибируют патогены *S. mutans* лучше всех протестированных штаммов, включая *S. salivarius* M18 и *L. rhamnosus* GG, которые хорошо зарекомендовали себя в лечении кариеса.

Во-вторых, имеется существенный и значительный синергизм между штаммами *L. plantarum* SD5870 и *L. helveticus* LAFTI L10 в их объединенной способности ингибировать пять штаммов свежеизолированных *S. mutans*, а также штамма *S. mutans*, который является очень патогенным. Совместная агрегация *L. helveticus* LAFTI L10 с *S. mutans in vitro* еще раз подчеркивает его сильный потенциал локализовать и обеспечить его эффекты в ротовой полости. Наконец, было показано, что сочетание пробиотиков имеет синергетический потенциал снижать *S. mutans* при их объединении вместе на модели кариеса зубов *in vitro*. Это открытие является неожиданным, так как ранее мы наблюдали, что сочетание двух или более различных пробиотиков обычно приводит к более плохому ингибированию, чем любой из пробиотиков по отдельности. Комбинации могут, как правило, приводить к ухудшению ингибирования, так как различные пробиотики в комбинации могут конкурировать друг с другом, а также ингибировать друг друга. Даже сохранение ингибирования на том же уровне, по сравнению с одним пробиотиком, является неожиданным, не говоря уже об открытии синергии между комбинациями пробиотиков.

Было достоверно показано, что несколько бактериальных штаммов влияют на патогенез кариеса посредством различных механизмов. Следует отметить, что в испытаниях *in vitro* и клинических исследованиях было показано, что *S. salivarius* M18 имеет активность против *S. mutans*. Был также значительный интерес в клинических исследованиях, которые продемонстрировали, что пробиотические лактобактерии *Lactobacillus rhamnosus* GG имеют эффекты против кариеса зубов в

краткосрочных и долгосрочных исследованиях. В настоящем изобретении было показано, что некоторые штаммы пробиотических бактерий превзошли эти пробиотики в антагонизме *S. mutans*. Хотя не наблюдали антагонизма *S. mutans* с использованием *L. rhamnosus* GG, наблюдали значительный антагонизм с использованием *S. salivarius* M18. Следует отметить, однако, что было обнаружено, что все из некоторых протестированных штаммов пробиотиков, включая *L. plantarum* SD5870 и *B. longum* SD5846, и соответствующий штамм *S. salivarius* K12, имели больший антагонизм, чем *S. salivarius* M18 по меньшей мере в отношении одного штамма *S. mutans*, в то время как два исследованных штамма *L. helveticus* (LAFTI L10 и R0052) имели фактически больший или равный антагонизм в отношении всех исследованных штаммов.

Наибольший интерес заключается в том, что когда штамм *L. helveticus* LAFTI L10 объединяли с *L. plantarum* SD5870, наблюдался сильный синергизм в отношении *S. mutans* для всех пяти протестированных патогенных микроорганизмов. Наблюдаемый антагонизм был сильнее для этой комбинации, чем для любого другого отдельного испытанного штамма пробиотика или их комбинации, и был по меньшей мере в три раза более эффективным в антагонизме, чем сумма двух отдельных пробиотиков для всех пяти штаммов *S. mutans*.

Несмотря на то, что неизвестно, какие механизмы метаболизма лежат в основе синергизма, известно, что некоторые штаммы *L. helveticus* секретируют бактериоцины, такие как helveticin J и helveticin V-1829, а также штаммы *L. plantarum* имеют различные бактериоцины и другие противомикробные вещества, кодируемые локусом *pln*, секреция которого регулируется с помощью механизма кворума. Хотя неизвестно, продуцирует ли *L. plantarum* SD5870 какие-либо антимикробные факторы, считают, что их продукция, несмотря на изменчивость, является довольно распространенным явлением среди штаммов *L. plantarum*. Антимикробные пептиды, которые являются антагонистами *S. mutans*, могут быть особенно эффективными в комбинациях комплементарной летальности, когда секретируются двумя пробиотиками.

Интересно, что 4 нестрептококковых штамма, которые имели антагонизм в отношении *S. mutans*, были одними из сильнейших продуцентов H_2O_2 . Хотя *S. salivarius* K12 и M18 могут проявлять активность против *S. mutans* посредством секреции специфических бактериоцинов, представляется вероятным, что *L. plantarum* SD5870 и *Lactobacillus helveticus* LAFTI L10 делают это по меньшей мере частично через секрецию H_2O_2 . Сообщается, что *S. mutans* может продуцировать и разлагать перекись водорода, но тем не менее, он также легко восприимчив к ней

предположительно при пороговых концентрациях. Уровни перекиси водорода, локализованные вокруг *S. mutans in vivo*, могут быть дополнительно увеличены путем прямой агрегации, наблюдавшейся у *L. helveticus* LAFTI L10 с *S. mutans*, и, таким образом, могут действовать как дополнительный фактор, с помощью которого
5 достигается высокая степень антагонизма.

Эти открытия подтверждают вывод о том, что *L. helveticus* имеет значительный антагонизм в отношении *S. mutans*, и, кроме того, о том, что определенная комбинация *L. helveticus* LAFTI L10 и *L. plantarum* SD5870 действует синергетически, вызывая антагонизм и ингибируя рост *S. mutans* на модели гигиены
10 полости рта *in vitro*. Эти выводы имеют серьезные последствия для микробиологических стратегий лечения кариеса.

Пример 7: Эффекты *in vivo*

Эффекты *in-vivo* можно определить следующим образом. Проводят рандомизированное, двойное слепое, плацебо-контролируемое клиническое
15 испытание с 30-40 испытуемыми в каждой группе. Субъектов обрабатывают равными дозами минимум 1 миллиард КОЕ *L. helveticus* LAFTI I10 и *L. plantarum* SD5870 в пробиотических пастилках два раза в день после чистки зубов в течение 28-30 дней. Можно ожидать уменьшения обнаружения предкариозной деминерализованной площади поверхности на >20%, как определено с
20 использованием высокочувствительной инфракрасной фототермической радиотермометрии и модулированной люминесценции. Также ожидают снижения *S. mutans* и уровней бляшек.

Предполагают, что добавление комплекса казеиновый фосфопептид/аморфный фосфат кальция (CPP-ACP) или другого
25 агента реминерализации продемонстрирует значительные эффекты *in vivo* следующим образом. Рандомизированное, двойное слепое, плацебо-контролируемое клиническое испытание проводят с 30-40 испытуемыми в каждой группе. Исследование будет включать в себя 4 группы следующим образом: первая группа обработки, где субъектов обрабатывают равными дозами минимум 1 млрд
30 КОЕ *L. helveticus* LAFTI I10 и *L. plantarum* SD5870; вторая группа обработки, где субъектов обрабатывают комбинацией 1 млрд КОЕ *L. helveticus* LAFTI I10 и *L. plantarum* SD5870 и эффективной дозой CPP-ACP или другого агента реминерализации; третья группа обработки, где субъектов обрабатывают эффективной дозой CPP-ACP или другого агента реминерализации; и четвертая
35 группа обработки, где субъектов обрабатывают плацебо-контролем. Исследование будет продолжаться с дозами в пробиотических пастилках два раза в день после

5 чистки зубов в течение 28-30 дней. Можно ожидать уменьшения обнаружения предкариозной деминерализованной площади поверхности на >20%, как определено с использованием высокочувствительной инфракрасной фототермической радиотермометрии и модулированной люминесценции. Также ожидают снижения *S. mutans* и уровней бляшек.

Пример 8: Композиция и стабильность пастилок

Готовили круглые пастилки размером 7/16 дюймов в соответствии с таблицей

2.

Таблица 2

| Ингредиент | Количество на пастилку (мг) |
|--|-----------------------------|
| <i>Lactobacillus helveticus</i> LAFTI L10 | 45 |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> Lp-2001 (SD-5870) | 25 |
| <i>S. salivarius</i> M18 (BAA-2593) | 6 |
| Recaldent™ (CPP-ACP) | 20 |
| | |
| Изомальт | 160 |
| Фруктоза | 100 |
| Микрокристаллическая целлюлоза | 70 |
| Декстроза | 50 |
| Стеариновая кислота | 15 |
| Фосфат дикальция | 10 |
| Лимонная кислота | 6 |
| Ароматизатор вишнево-гранатовый (натуральный) | 3 |
| | |
| Всего | 510 |

10

Запечатанные упаковки пастилок хранят при комнатной температуре (20-25°C) при влажности окружающей среды 60-65%. Бактерии культивируют из пастилок в определенные моменты времени в соответствии с промышленным стандартным селективным поверхностным методом. Таким образом, пастилки растворяют в фосфатно-солевом буфере (PBS), серийно разводят и высевают на чашки с агаром, селективным для *S. salivarius* (CABK12) и *Lactobacilli* (Rogosa), в

15

трех экземплярах. Посчитывают КОЕ через 48 часов инкубации при температуре 37 °С в условиях микроаэрофилии. Даже через 27 месяцев все еще существует значительное количество живых штаммов пробиотиков, по меньшей мере около 4×10^8 КОЕ на пастилку. Имеются значительные и адекватные количества живых бактерий, чтобы обеспечить преимущества пробиотиков для здоровья.

Пример 9: Отсроченный антагонизм в известных продуктах

Были протестированы коммерчески доступные пробиотические продукты с помощью анализа отсроченного антагонизма, описанного выше. В таблице 3 представлена композиция пробиотических бактерий для каждого продукта.

Таблица 3

| Продукт | Пробиотические бактерии | КОЕ на пастилку |
|---------|--|--------------------|
| A | <i>S. salivarius</i> K12 и M18 | $3,97 \times 10^5$ |
| B | <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>S. salivarius</i> K12 | $9,72 \times 10^8$ |
| C | <i>Streptococcus uberis</i> KJ2, <i>S. oralis</i> KJ3, <i>S. rattus</i> JH145 | $2,2 \times 10^9$ |
| D | <i>L. reuteri</i> DSM 17938 (<i>L. reuteri</i> Protectis™) | $9,17 \times 10^6$ |
| E | <i>L. reuteri</i> DSM 17938, <i>L. reuteri</i> PTA 5289 | $3,67 \times 10^7$ |

Короче говоря, одну пастилку каждого продукта растворяли в 5 мл 1хPBS путем встряхивания в течение 2 ч при температуре 37 °С в стерильных условиях. Затем с помощью ватного тампона раствор распределяли полосой шириной 1 см по диаметру чашек с агаром, содержащих ВНІ и ВНІ, дополненным CaCO₃. Эти чашки инкубировали в течение 48 ч при температуре 37°С в условиях микроаэрофилии, а затем выращенные бактерии удаляли и агар стерилизовали. Затем на чашки перпендикулярно полосе пробиотика штрихами наносили 5 различных штаммов *S. mutans* (штамм ATCC и изоляты Integra 13, 14, 15 и 17) и оставляли расти в течение еще 48 ч. Эту процедуру повторяли два раза, причем каждый из них использовался в трех повторах для каждого условия. В отличие от композиций согласно настоящему изобретению, не наблюдалось ингибирования роста для любого из шести повторов каждого условия для любого из тестируемых коммерчески доступных пробиотических продуктов.

Следует также отметить, что количество пробиотической бактерий около 4×10^8 КОЕ на пастилку через 27 месяцев хранения пастилки согласно настоящему изобретению, как описано в примере 8, очень выгодно по сравнению с известными

продуктами, которые были протестированы, и значительно лучше, чем более половины из известных протестированных продуктов.

Список использованной литературы: содержание каждого источника включено посредством этой ссылки.

- 5 Burton JP, et al. (2013) The influence of probiotic *Streptococcus salivarius* M18 on indices of dental health in children: a randomised double-blind placebo-controlled trial. *Journal of medical microbiology*. doi:10.1099/jmm.0.056663-0.
- Caglar E, Kargul B, Tanboga I. (2005a) Bacteriotherapy and probiotics' role on oral health. *Oral diseases*. 11, 131-7.
- 10 Caglar E, et al. (2005b) Effect of yogurt with *Bifidobacterium* DN-173 010 on salivary mutans streptococci and lactobacilli in young adults. *Acta odontologica Scandinavica*. 63, 317-20.
- Caglar E, Cildir SK, Ergeneli S, Sandalli N, Twetman S. (2006) Salivary mutans streptococci and lactobacilli levels after ingestion of probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 by straws or tablets. *Acta odontologica Scandinavica*. 64, 314-8.
- 15 Caglar E, et al. (2008) Short-term effect of ice-cream containing *Bifidobacterium lactis* Bb-12 on the number of salivary mutans streptococci and lactobacilli. *Acta odontologica Scandinavica*. 66, 154-8.
- Kang M-S, et al. (2011) Inhibitory effect of *Lactobacillus reuteri* on periodontopathic and cariogenic bacteria. *Journal of microbiology (Seoul, Korea)*. 49, 193-9.
- Keller MK, Hasslöf P, Stecksén-Blicks C, Twetman S. (2011) Co-aggregation and growth inhibition of probiotic lactobacilli and clinical isolates of mutans streptococci: an *in vitro* study. *Acta odontologica Scandinavica*. 69, 263-8.
- 25 Näse L. et al. (2001) Effect of long-term consumption of a probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* GG, in milk on dental caries and caries risk in children. *Caries research*. 35, 412-20.
- Oho T, Yamashita Y, Shimazaki Y, Kushiya M, Koga T. (2000) Simple and rapid detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in human saliva by polymerase chain reaction. *Oral microbiology and immunology*. 15, 258-62.
- 30 Saha S, Tomaro-Duchesneau C, Tabrizian M, Prakash S. (2012) Probiotics as oral health biotherapeutics. *Expert opinion on biological therapy*. 12, 1207-20.
- Stecksén-Blicks C, Sjöström I, Twetman S. (2009) Effect of long-term consumption of milk supplemented with probiotic lactobacilli and fluoride on dental caries and general health in preschool children: a cluster-randomized study. *Caries research*. 43, 374-81.
- 35

Tagg JR, Bannister LV. (1979) "Fingerprinting" beta-haemolytic streptococci by their production of and sensitivity to bacteriocine-like inhibitors. *Journal of medical microbiology*. 12, 397-411.

5 Tagg JR, Dierksen KP. (2003) Bacterial replacement therapy: adapting "germ warfare" to infection prevention. *Trends in biotechnology*. 21, 217-23.

Taipale T, Pienihäkkinen K, Salminen S, Jokela J, Söderling E. (2012) *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis BB-12 administration in early childhood: a randomized clinical trial of effects on oral colonization by mutans streptococci and пробиотик. *Caries research*. 46, 69-77.

10 Wang J. et al. (2012) Synergistic effects of nanosecond pulsed electric fields combined with low concentration of gemcitabine on human oral squamous cell carcinoma *in vitro*. *PloS one*. 7, e43213.

15 Новые признаки настоящего изобретения станут очевидными для специалистов в данной области техники после изучения подробного описания изобретения. Следует понимать, однако, что объем формулы изобретения не должен быть ограничен предпочтительными вариантами, представленными в примерах, и следует использовать расширительное толкование в соответствии с описанием в целом.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> ИНТЕГРА МЕДИКАЛ ИНК.
Юдина, Наталья
Сеферович, Максим

<120> ПЕРОРАЛЬНЫЕ КОМПОЗИЦИИ

<130> INT-0002-RCT

<150> US 61/843,158
<151> 2013-07-05

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 22
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Праймер

<400> 1
actacacttt cgggtggctt gg 22

<210> 2
<211> 22
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Праймер

<400> 2
cagtataagc gccagtttca tc 22

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция для применения для гигиены полости рта, содержащая эффективное для гигиены полости рта количество пробиотика, содержащего штамм
5 *Lactobacillus helveticus*.
2. Композиция по п. 1, где штамм *Lactobacillus helveticus* представляет собой штамм *Lactobacillus helveticus* LAFTI L10, *Lactobacillus helveticus* R0052 или их смесь.
3. Композиция по п. 1, где штамм *Lactobacillus helveticus* представляет
10 собой штамм *Lactobacillus helveticus* LAFTI L10.
4. Композиция по любому из п.п. 1-3, где пробиотик дополнительно содержит другие пробиотические бактерии.
5. Композиция по любому из п.п. 1-4, где пробиотик дополнительно содержит одну или более лактобактерий.
- 15 6. Композиция по любому из п.п. 1-5, где пробиотик дополнительно содержит штамм *Lactobacillus plantarum*.
7. Композиция по любому из п.п. 1-6, где пробиотик дополнительно содержит *Lactobacillus plantarum* SD5870.
8. Композиция по любому из п.п. 1-7, где пробиотик состоит по существу
20 из штамма *Lactobacillus helveticus* и штамма *Lactobacillus plantarum*.
9. Композиция по любому из п.п. 1-8, где пробиотик состоит по существу из штамма *Lactobacillus helveticus* и *Lactobacillus plantarum* SD5870.
10. Композиция по п. 1, где пробиотик состоит по существу из *Lactobacillus helveticus* LAFTI L10 и *Lactobacillus plantarum* SD5870.
- 25 11. Композиция по п. 1, где пробиотик состоит по существу из *Lactobacillus helveticus* R0052 и *Lactobacillus plantarum* SD5870.
12. Композиция по любому из п.п. 1-4, где пробиотик дополнительно содержит одну или более бифидобактерий.
13. Композиция по п. 1, где пробиотик состоит по существу из *Lactobacillus*
30 *helveticus* LAFTI L10 и *Bifidobacterium longum* SD5846.
14. Композиция для применения в лечении или профилактике кариеса зубов, содержащая эффективное для профилактики кариеса зубов количество пробиотика, содержащего *Lactobacillus plantarum* SD5870.
15. Композиция по п. 14, где пробиотик дополнительно содержит
35 *Streptococcus salivarius*.

16. Композиция по п. 14 или 15, где пробиотик дополнительно содержит *Streptococcus salivarius* M18.
17. Композиция по любому из п.п. 14-16, где пробиотик дополнительно содержит *Streptococcus salivarius* K12.
- 5 18. Композиция по п. 14, где пробиотик состоит по существу из *Lactobacillus plantarum* SD5870 и *Streptococcus salivarius* M18.
19. Композиция для применения в лечении или профилактике кариеса зубов, содержащая эффективное для профилактики кариеса зубов количество пробиотика, содержащего *Bifidobacterium longum* SD5846.
- 10 20. Композиция по любому из п.п. 1-19, дополнительно содержащая агент реминерализации.
21. Композиция по п. 20, где агент реминерализации содержит казеиновый фосфопептид/аморфный фосфат кальция.
22. Композиция по любому из п.п. 1-21, дополнительно содержащая пребиотик.
- 15 23. Композиция по любому из п.п. 1-22, дополнительно содержащая носитель, разбавитель, эксципиент или их смесь.
24. Способ лечения или профилактики состояния или заболевания полости рта у субъекта, включающий пероральное введение субъекту композиции по любому из п.п. 1-23.
- 20 25. Способ по п. 24, где субъектом является человек, собака, кошка или лошадь.
26. Способ по п. 24 или 25, где композиция приготовлена в виде таблетки, пилюли, порошка, пастилки, саше, кахеты, эликсира, суспензии, эмульсии, раствора, сиропа, аэрозоля, капсулы, пасты, продукта питания или кондитерского изделия.
- 25 27. Способ по п. 24 или 25, где композиция приготовлена в виде зубной пасты, жевательной резинки или шипучей таблетки.
28. Способ по любому из п.п. 24-27, где состояние или заболевание полости рта включает кариес зубов, неприятный запах изо рта, гингивит, язвы во рту, афтозный стоматит, кандидоз и/или заболевание пародонта.
- 30 29. Способ по любому из п.п. 24-28 для лечения и профилактики кариеса зубов.
- 30 30. Применение штамма *Lactobacillus helveticus* для гигиены полости рта у субъекта.
- 35 31. Применение композиции по любому из п.п. 1-23, для гигиены полости рта у субъекта.

32. Применение композиции по любому из п.п. 1-23 для приготовления лекарственного средства для гигиены полости рта у субъекта.

33. Применение по любому из п.п. 31-32, где композиция приготовлена в виде таблетки, пилюли, порошка, пастилки, саше, кахеты, эликсира, суспензии, эмульсии, раствора, сиропа, аэрозоля, капсулы, пасты, продукта питания или кондитерского изделия

34. Применение по любому из п.п. 31-32, где композиция приготовлена в виде зубной пасты, жевательной резинки или шипучей таблетки.

35. Применение по любому из п.п. 30-34, где субъектом является человек, собака, кошка или лошадь.

36. Применение по любому из п.п. 30-35, где гигиена полости рта включает профилактику или лечение кариеса зубов, неприятного запаха изо рта, гингивита, язв во рту, афтозного стоматита, кандидоза и/или заболевания пародонта.

37. Применение по любому из п.п. 30-36 для лечения или профилактики кариеса зубов.

38. Товарная упаковка, содержащая штамм *Lactobacillus helveticus* и инструкции по его применению в гигиене полости рта у субъекта.

39. Товарная упаковка, содержащая композицию по любому из п.п. 1-23 и инструкции по ее применению в гигиене полости рта у субъекта.

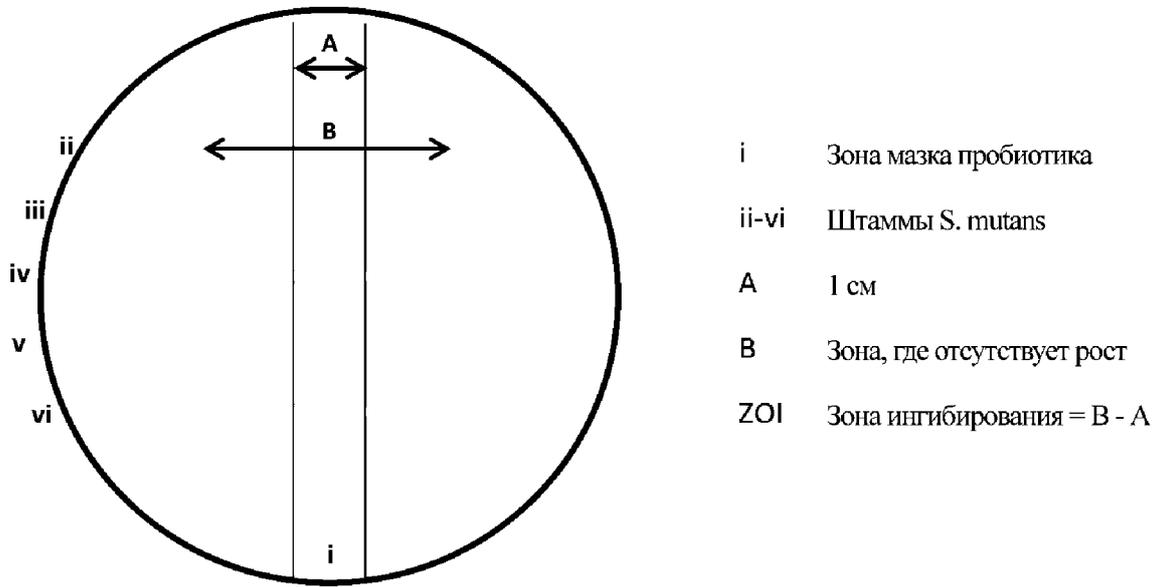
40. Товарная упаковка по п. 39, где композиция приготовлена в виде таблетки, пилюли, порошка, пастилки, саше, кахеты, эликсира, суспензии, эмульсии, раствора, сиропа, аэрозоля, капсулы, пасты, продукта питания или кондитерского изделия.

41. Товарная упаковка по п. 39, где композиция приготовлена в виде зубной пасты, жевательной резинки или шипучей таблетки.

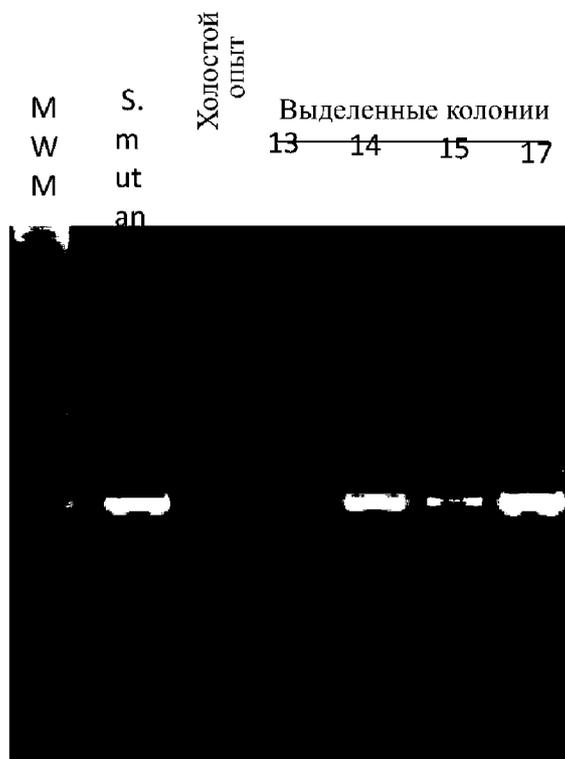
42. Товарная упаковка по любому из п.п. 38-41, где субъектом является человек, собака, кошка или лошадь.

43. Товарная упаковка по любому из п.п. 38-42, где гигиена полости рта включает профилактику или лечение кариеса зубов, неприятного запаха изо рта, гингивита, язв во рту, афтозного стоматита, кандидоза и/или заболевания пародонта.

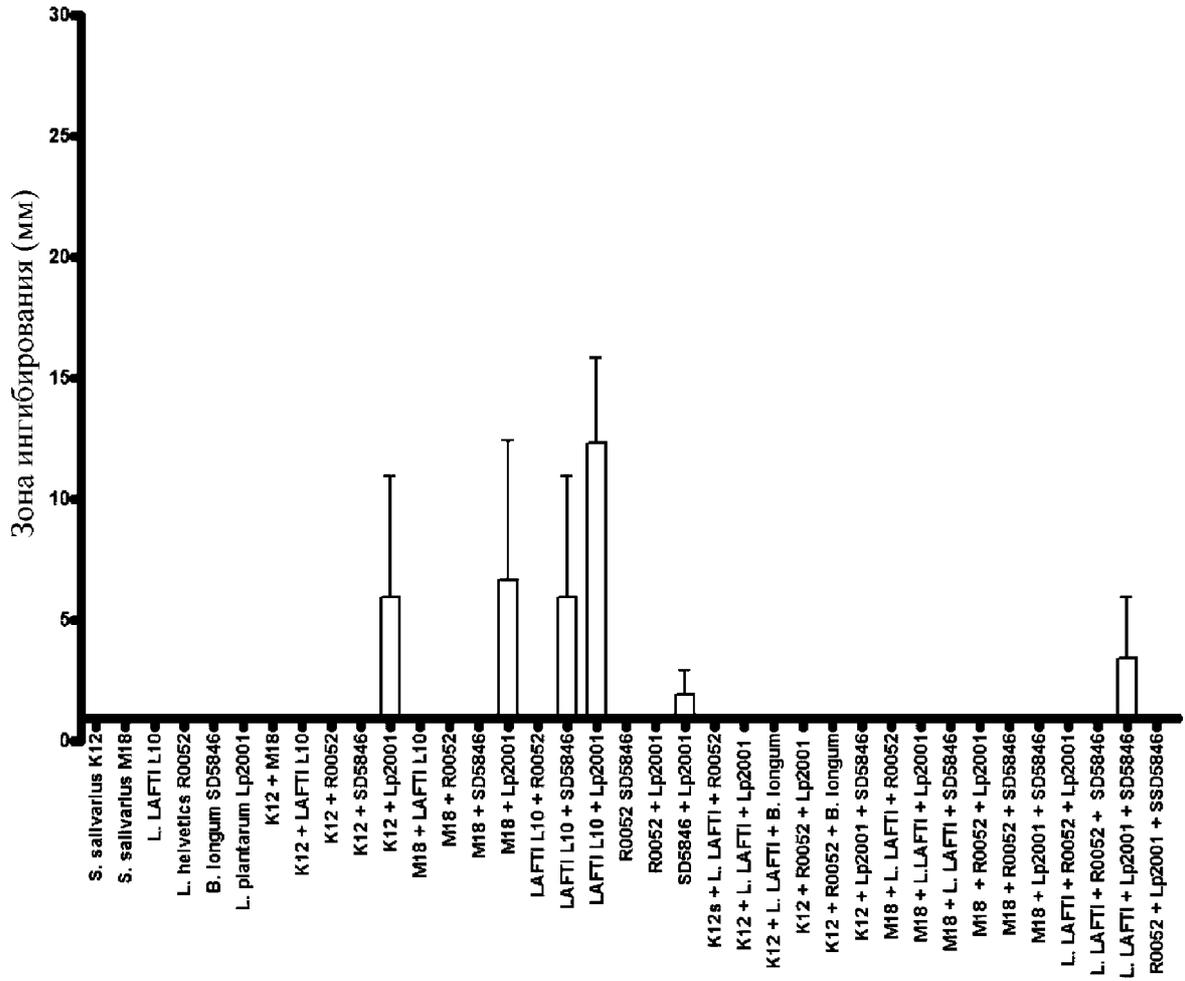
44. Товарная упаковка по любому из п.п. 35-40, где гигиена полости рта включает лечение или профилактику кариеса зубов.



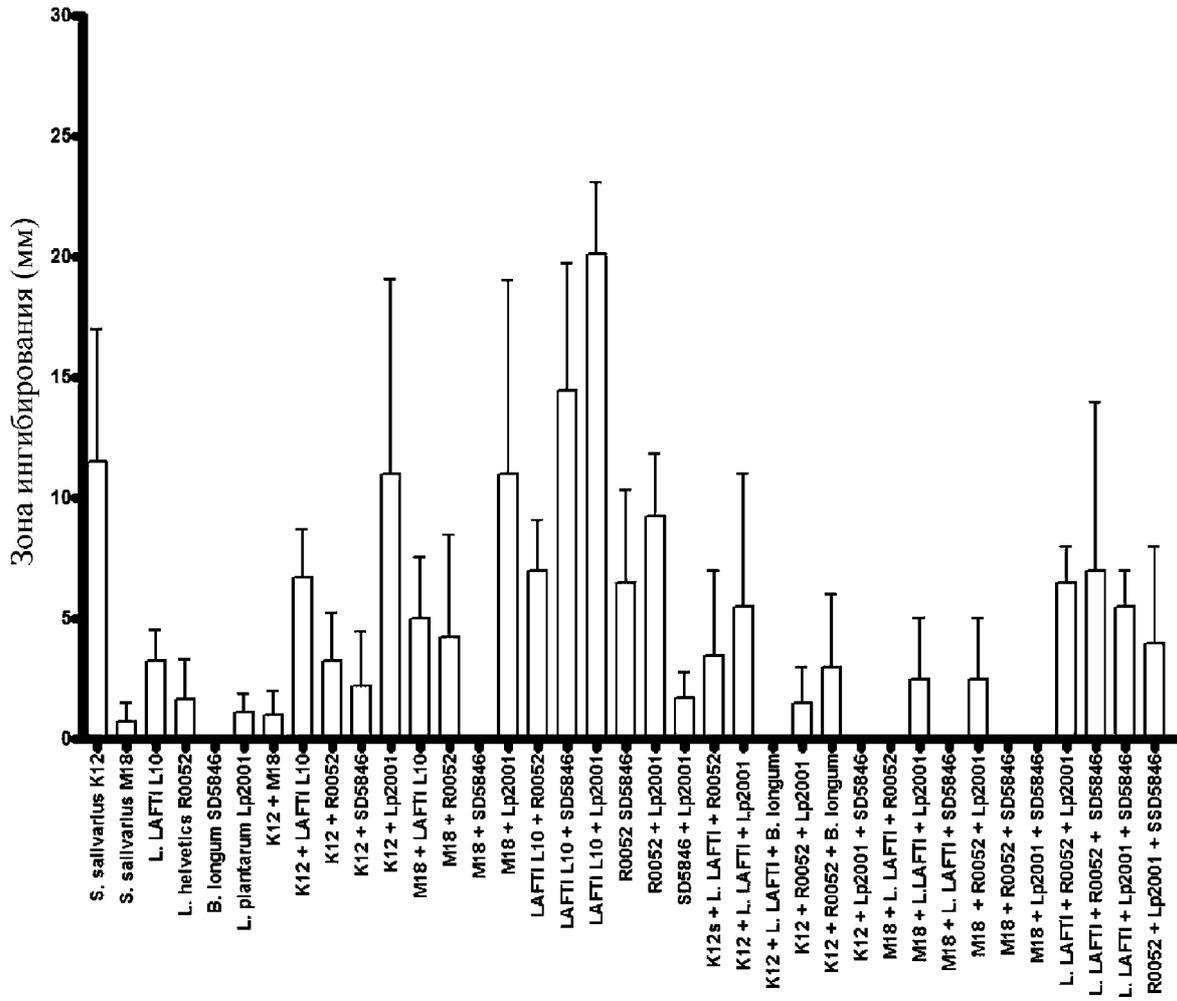
ФИГ. 1



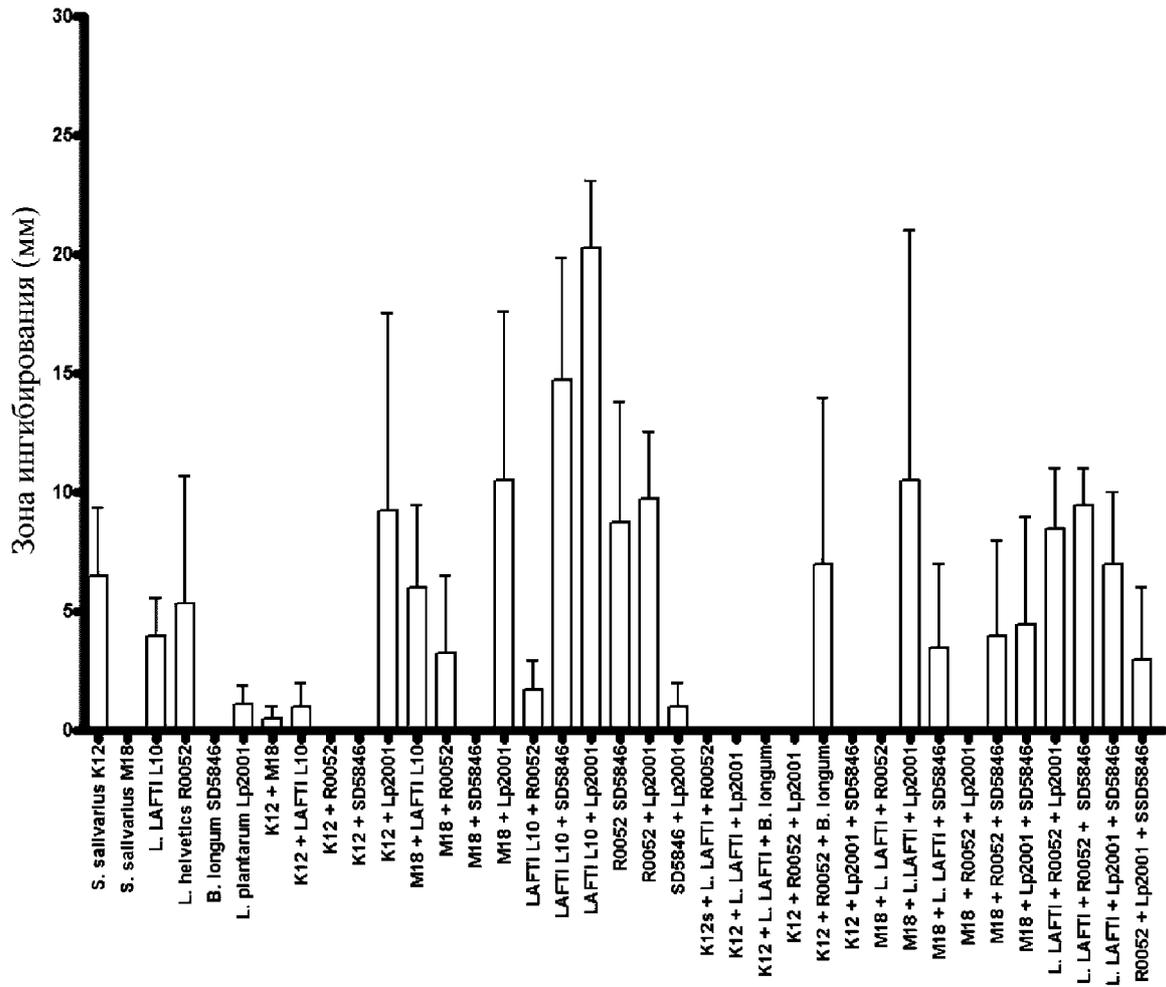
ФИГ. 2



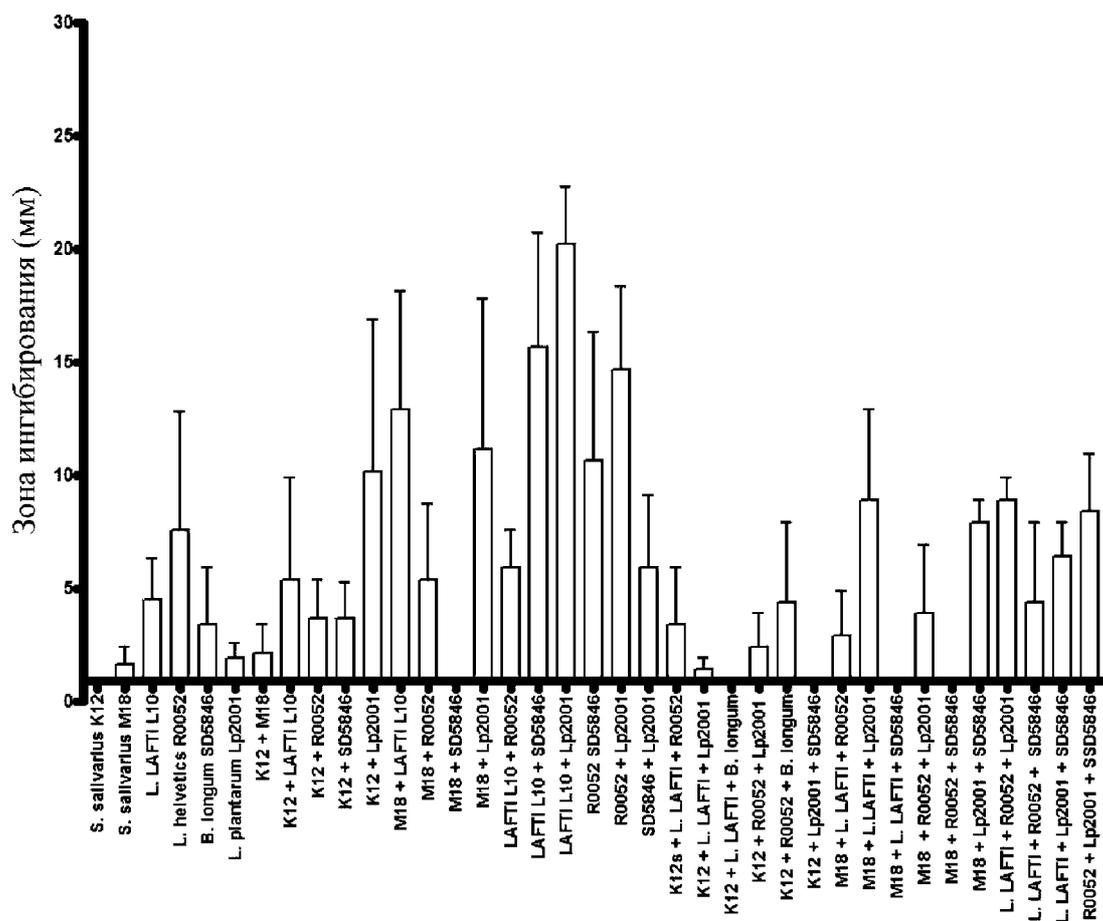
ФИГ. 3



ФИГ. 4



ФИГ. 5

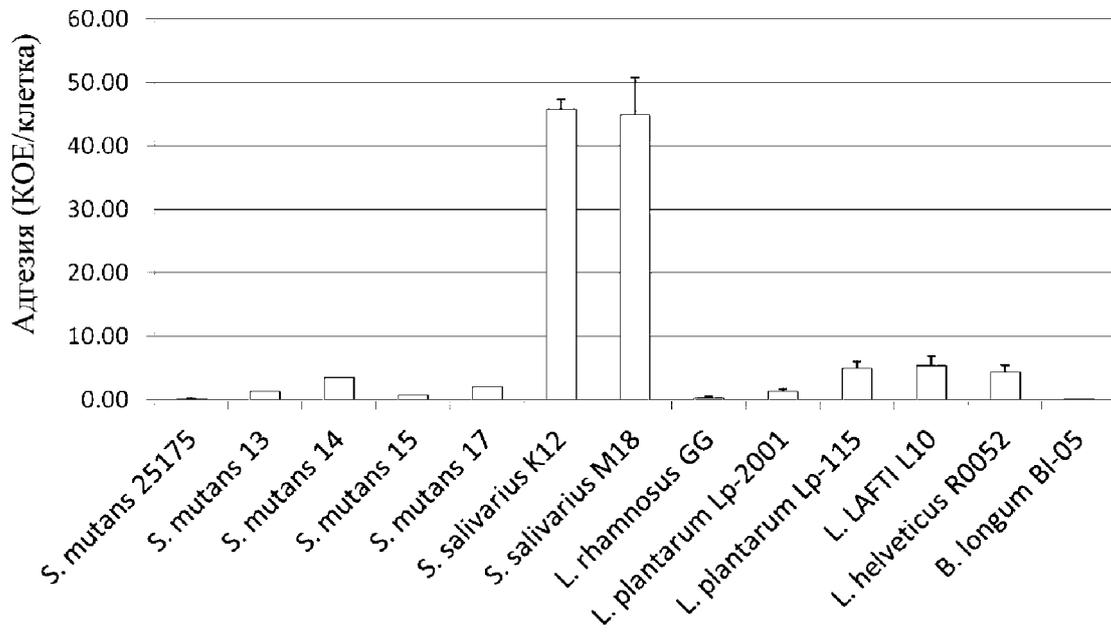


ФИГ. 6

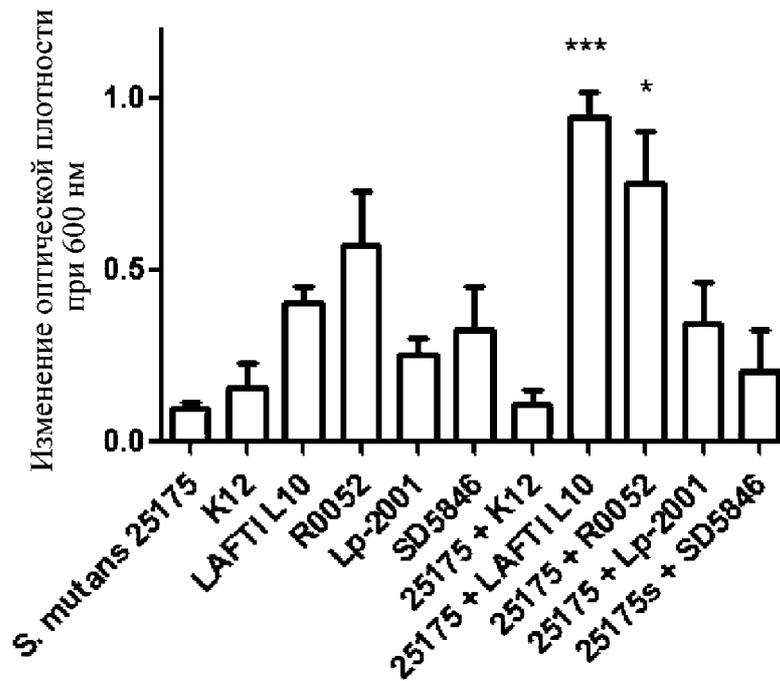
| | <i>S. mutans</i> 25175 | | | <i>S. mutans</i> 13 | | | <i>S. mutans</i> 14 | | | <i>S. mutans</i> 15 | | | <i>S. mutans</i> 17 | | |
|---------------------------|------------------------|-------------------|-----------|---------------------|-------------------|-------------|---------------------|-------------------|-------------|---------------------|-------------------|-------------|---------------------|-------------------|-------------|
| | Среднее (мм) | p | SQ | Среднее (мм) | p | SQ | Среднее (мм) | p | SQ | Среднее (мм) | p | SQ | Среднее (мм) | p | SQ |
| K12 + M18 | 0.00 | | NA | 1.00 | | 0.08 | 1.00 | | 0.08 | 1.25 | | 1.67 | 0.00 | | NA |
| K12 + LAFTI L10 | 0.00 | | NA | 6.75 | | 0.42 | 6.75 | | 0.10 | 4.50 | | 1.26 | 0.00 | | 0.00 |
| K12 + R0052 | 0.00 | | NA | 3.25 | | 0.25 | 3.25 | | 0.00 | 2.75 | | 0.41 | 0.00 | | 0.00 |
| K12 + SD5846 | 0.00 | | NA | 2.25 | | 0.15 | 2.25 | | 0.00 | 2.75 | | 1.10 | 0.00 | | NA |
| K12 + Lp2001 | 0.00 | | US | 3.00 | | 0.24 | 3.00 | | 0.20 | 2.67 | | 2.67 | 0.00 | | 0.00 |
| M18 + LAFTI L10 | 0.00 | | NA | 5.00 | | 0.92 | 5.00 | | 1.50 | 9.50 | | 2.20 | 2.50 | | 0.44 |
| M18 + R0052 | 0.00 | | NA | 4.25 | | 1.76 | 4.25 | | 0.61 | 4.50 | | 0.61 | 0.00 | | 0.00 |
| M18 + SD5846 | 0.00 | | NA | 0.00 | | 0.00 | 0.00 | | NA | 0.00 | | 0.00 | 0.00 | | NA |
| M18 + Lp2001 | 5.75 | | US | 11.00 | | 5.81 | 11.00 | | 9.19 | 10.25 | | 5.86 | 8.50 | | US |
| LAFTI L10 + R0052 | 0.00 | | NA | 6.50 | | 1.02 | 6.50 | | 0.19 | 5.00 | | 0.49 | 4.25 | | 0.37 |
| LAFTI L10 + SD5846 | 5.00 | | US | 14.50 | | 1.77 | 14.50 | 0.01 | 3.69 | 14.75 | 0.03 | 2.43 | 12.50 | | 2.19 |
| LAFTI L10 + Lp2001 | 13.00 | <0.0001 | US | 20.14 | <0.0001 | 3.44 | 20.14 | <0.0001 | 3.94 | 19.29 | <0.0001 | 4.22 | 23.86 | <0.0001 | 4.18 |
| R0052 + SD5846 | 0.00 | | NA | 6.50 | | 1.26 | 6.50 | | 1.64 | 9.75 | | 1.06 | 9.50 | | 1.68 |
| R0052 + Lp2001 | 0.00 | | NA | 9.25 | <0.01 | 3.29 | 9.25 | 0.05 | 1.51 | 13.75 | 0.01 | 1.79 | 9.25 | 0.05 | 1.63 |
| SD5846 + Lp2001 | 3.50 | | US | 1.75 | | 0.38 | 1.75 | | 0.88 | 5.00 | | 1.43 | 2.50 | | US |

ФИГ. 8

| | <i>S. salivarius</i> K12 | <i>S. salivarius</i> M18 | <i>S. thermophilus</i> R0083 | <i>L. rhamnosus</i> St-21 | <i>L. plantarum</i> GG | <i>L. paracasei</i> Cp-2001 | <i>L. salivarius</i> Cp-37 | <i>L. acidophilus</i> Ls-33 | <i>L. reuteri</i> Lru-14 | <i>L. plantarum</i> Cp-1038 | <i>L. rhamnosus</i> Cp-115 | <i>L. helveticus</i> Lr-32 | <i>L. acidophilus</i> R0052 | <i>L. casei</i> Lc-11 | <i>B. lactis</i> Bl-04 | <i>B. breve</i> Bl-03 | <i>B. bifidum</i> R0071 | <i>B. longum</i> R00175 | <i>B. longum</i> Bl-05 |
|---------|--------------------------|--------------------------|------------------------------|---------------------------|------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|--------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|
| Эксп. 1 | . | . | ++ | + | + | ++ | . | + | + | + | . | ++ | ++ | + | . | + | + | ++ | ++ |
| Эксп. 2 | . | . | ++ | + | ++ | ++ | . | + | ++ | ++ | + | ++ | ++ | + | + | ++ | + | ++ | ++ |
| Эксп. 3 | . | . | ++ | + | ++ | ++ | . | ++ | ++ | + | . | ++ | ++ | + | . | + | . | ++ | ++ |



ФИГ. 9



ФИГ. 10