

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042202**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.01.24

(21) Номер заявки
201990630

(22) Дата подачи заявки
2017.09.29

(51) Int. Cl. **C12N 1/20** (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)
A61K 35/744 (2015.01)

(54) **УСТОЙЧИВЫЕ К АНТИСЕПТИКУ МОЛОЧНОКИСЛЫЕ БАКТЕРИИ**

(31) **16382453.5**

(32) **2016.10.03**

(33) **EP**

(43) **2019.10.31**

(86) **PCT/EP2017/074844**

(87) **WO 2018/065324 2018.04.12**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
АБ-БИОТИКС, С.А. (ES)

(72) Изобретатель:
**Кунье Кастьяна Хорди, Сантас
Гутьеррес Хонатан (ES)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) **KR-A-20110019803**
US-A1-2016030331
WO-A1-2017012905

LAUREL L. DUNN ET AL.: "Antimicrobial Efficacy of an Array of Essential Oils Against Lactic Acid Bacteria", JOURNAL OF FOOD SCIENCE, vol. 81, № 2, 8 January 2016 (2016-01-08), pages M438-M444, XP055348738, US, ISSN: 0022-1147, DOI: 10.1111/1750-3841.13181, figure 1B, page M441, right-hand column, last paragraph

WO-A1-2012022773
J. SAMOT ET AL.: "Antibacterial activity of probiotic candidates for oral health", ANAEROBE, vol. 19, 1 December 2012 (2012-12-01), pages 34-38, XP055349271, GB, ISSN: 1075-9964, DOI: 10.1016/j.anaerobe.2012.11.007, the whole document
US-A1-2006153959

(57) В настоящем изобретении предложены штаммы молочнокислых бактерий, обладающие способностью переносить воздействие антисептиков. Указанные штаммы молочнокислых бактерий обладают дополнительной способностью антагонизировать рост патогенов в полости рта. В частности, молочнокислые бактерии, обладающие данными свойствами, относятся к роду *Pediosoccus*, в частности к виду *Pediosoccus acidilactici*. Таким образом, штаммы согласно настоящему изобретению можно применять в композициях и продуктах в области личной гигиены и особенно для гигиены полости рта, а также в фармацевтических продуктах.

B1

042202

042202

B1

Область техники

Настоящее изобретение относится к областям личной гигиены, медицины и микробиологии. В частности, в объем настоящего изобретения входят штаммы молочнокислых бактерий, особенно полезные для комбинирования с антисептиками, в частности с антисептиками для гигиены полости рта.

Уровень техники

Здоровый рот представляет собой уникальный и неоценимый ресурс, а также неотъемлемую составляющую общего состояния здоровья и качества жизни. Тем не менее здоровье полости рта часто ежедневно нарушается различными формами болезней полости рта, преимущественно кариесом зубов и заболеванием пародонта, а изредка раком полости рта, очаговыми поражениями при ВИЧ/СПИД, заболеваниями слизистой оболочки и слюнных желез и болью в челюстно-лицевой области и расщелинами. Данные заболевания полости рта в совокупности представляют собой самые распространенные хронические заболевания у людей и оказывают огромное влияние на жизненно важные функции ротовой полости, самооценку, качество жизни и общее состояние здоровья и самочувствие. На сегодняшний день общепризнано, что болезни полости рта являются эпидемией мирового масштаба и основной проблемой общественного здравоохранения. Согласно оценкам 90% мирового населения страдает от некоторых форм болезней полости рта в некоторые моменты на протяжении своей жизни [Jin L.J. и др., "Global burden of oral diseases: emerging concepts, management and interplay with systemic health", Oral Diseases, 2016 г.].

Заболевание пародонта чрезвычайно распространено и включает множество состояний, которые поражают одну или более тканей пародонта. Тогда как многие различные заболевания поражают поддерживающие зуб структуры, вызванные зубным налетом воспалительные повреждения составляют большую часть болезней пародонта, и их традиционно разделили на группы либо гингивита, либо пародонтита.

Гингивит представляет собой одно из наиболее распространенных хронических воспалительных заболеваний, поражающих человека, с распространенностью в западной популяции, составляющей приблизительно 75%. Для него характерно покраснение, отечность и частая кровоточивость десен, и оно вызвано накоплением бактерий в зубодесневом окружении. Такое хроническое воспаление может быть ограничено областью десны или может развиться в пародонтит, при котором наблюдается разрушение аппарата прикрепления зуба. Таким образом, гингивит всегда предшествует пародонтиту, хотя у некоторых индивидов гингивит может никогда не прогрессировать в пародонтит.

Следовательно, заболевания пародонта начинаются с бактериального, вызванного биопленкой воспаления мягких тканей, окружающих зубы. Бактериальная биопленка, также известная как зубной налет, проявляется различными оттенками белого и сочетается с остатками пищи, которые обычно остаются на краю десен, граничащем с зубами. Биопленка также часто находится между зубами, где для ее удаления требуются дополнительные усилия с применением зубной нити и межзубных щеток. Бактериальную биопленку, когда она выявлена клинически, считают первопричиной воспаления, и ее разрастание обычно пропорционально тяжести воспаления. Количество бактерий в биопленке коррелирует с тяжестью заболевания пародонта. Некоторые бактерии, которые соотносят с деструктивным заболеванием пародонта, считают бактериями высокого риска, и они включают *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella* sp., *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum* и *Tannerella forsythia*, среди прочих [Haffajee A.D. и др., "Microbial etiological agents of destructive periodontal Diseases", Periodontology, 2000, 1994, том 5, с. 78-11].

Первичное лечение пародонта обычно включает физическое удаление биопленки и приводит к уменьшению воспаления и улучшению общего состояния пародонта. Дантисты и пародонтологи могут рекомендовать дополнительные способы лечения, которые включают хирургическую обработку, местное применение химиотерапевтических агентов и назначение системного антибиотика. Для врача, который подозревает тяжелое состояние пародонта, рекомендация антибактериального ополаскивателя для полости рта часто является возможным способом лечения, особенно на основании эмпирической диагностики пародонта. Данная стратегия позволяет осуществить временный контроль состояния пародонта до тех пор, пока дантист не сможет оценить пациента, установить диагноз и рекомендовать дальнейшее лечение [Laudenbach и др., "Common Dental and Periodontal Diseases. Evaluation and management", Med. Clin. N. Am., 2014, том 98, с. 1239-1260].

Широко распространенный антисептический ополаскиватель для полости рта, применяемый при вызванном бактериями пародонтите, представляет собой 0,12% глюконат хлоргексидина. Обычно данный ополаскиватель назначают для применения два раза в день на протяжении 2 недель. Несмотря на то что было установлено, что глюконат хлоргексидина эффективен против патогенов зубного налета, его редко рекомендуют в качестве монотерапии и обычно применяют как дополнение к хирургическому и нехирургическому лечению бактериального зубного налета и удалению зубного камня.

Более того, пациентов необходимо уведомлять о возможных побочных действиях. Хлоргексидин может раздражать и повреждать слизистую оболочку полости рта, вызывает дисколорацию и окрашивание зубов и других поверхностей полости рта, повышает образование зубного камня и изменяет восприятие вкуса. Также сообщали о раздражении полости рта и местных подобных аллергии симптомах. Более того, были описаны побочные действия со стороны слизистой, включая стоматит, гингивит и язвы. Следовательно, применение хлоргексидина в течение длинных периодов не рекомендуется [Flotra L. и др.,

"Side effects of chlorhexidine mouth washes", *Scand. J. Dent. Res.*, 1971, том 73, с. 119-125].

Другой широко распространенный антисептик, используемый в ополаскивателях для полости рта, представляет собой триклозан (5-хлор-2-(2,4-дихлорфенокси)фенол). Триклозан представляет собой неионный галогенированный фенол с широким спектром противомикробного действия, широко применяемый во всей Северной Америке, Европе и Азии. Триклозан эффективен против многих типов бактерий и некоторых типов грибов, предотвращая размножение бактерий и/или, в конечном счете приводя к гибели клетки посредством механизмов, которые включают пермеабиллизацию клеточной стенки бактерии и нацеливание на множество цитоплазматических и мембранных сайтов, включая синтез РНК и продукцию макромолекул. Тем не менее триклозан все более тщательно проверяют после того, как появились опасения относительно того, что данное соединение может быть опасно для состояния здоровья человека и окружающей среды. Потенциальные проблемы с состоянием здоровья, связанные с применением триклозана, включают устойчивость к антибиотикам, раздражения кожи, заболевания эндокринной системы, повышенную частоту аллергий и образование канцерогенных побочных продуктов [Dann A.B. и др., "Triclosan: environmental exposure, toxicity and mechanisms of action", *Journal of Applied Toxicology*, 2011, том 31, с. 285-311].

В качестве альтернативы ополаскивателям для полости рта, содержащим синтетические соединения, некоторые продукты составлены с применением "природных" соединений, таких как эфирные масла. Например, Листерин® (Listerine®) представляет собой смесь соединений, выделенных из эфирных масел: ментола, эвкалиптола, тимола и метилсалицилата. Листерин® борется с опасными бактериями, такими как *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis* и *Eikenella corrodens*, и дрожжами *Candida albicans* [Vlachojannis C. и др., "A Preliminary Investigation on the Antimicrobial Activity of Listerine®, Its Components, and of Mixtures Thereof", *Phytotherapy research*, 2015, том 29, с. 1590-1594]. Ополаскиватели для полости рта с эфирными маслами считают более безопасными, и они оказывают меньше неприятных побочных действий (например, окрашивание зубов и накопление зубного камня), чем ополаскиватели, содержащие хлоргексидин. Тем не менее сообщали, что эффективность кратковременного лечения также оказывалась более низкой. Более того, некоторые компоненты эфирных масел могут оказывать цитотоксическое действие, следовательно, разумно предположить, что использование содержащих их продуктов должно подкрепляться всесторонними исследованиями токсичности, с особым вниманием к длительности воздействия и концентрациям любых используемых компонентов эфирных масел [Vlachojannis C. и др., "Listerine® Products: An update on the efficacy and safety", *Phytotherapy Research*, 2016, том 30, с. 367-373].

Одно из наиболее значимых нежелательных действий антисептиков связано с изменениями, вызванными в микробиоте полости рта, в результате их неселективного антисептического действия. В отличие от антибиотиков, которые селективно токсичны и воздействуют на определенные области внутри бактериальной клетки, у большинства антисептиков нет особой мишени в бактериальной клетке, на которую они бы действовали. Длительное применение антисептических агентов особенно в высоких концентрациях может устранить биопленку и/или убить связанные с заболеванием бактерии, но также может разрушить природные и полезные свойства постоянной микрофлоры полости рта. Это может привести к проблеме дисбиоза (также называемого дисбактериозом) в полости рта, который представляет собой микробный дисбаланс, который может служить предпосылкой к образованию кариеса или заболеваниям пародонта. Гипотеза дисбиоза утверждает, что переход от здорового до больного состояния пародонта отражает изменения в относительной численности малораспространенных видов бактериального сообщества в пародонтальном кармане. Такой сдвиг в составе микробного сообщества приводит к изменениям взаимного влияния хозяин-микроб, достаточным, чтобы опосредовать разрушительное воспаление и потерю костной ткани. В действительности считают, что этиология заболевания пародонта основана на трех группах факторов, которые определяют, возникнет ли активное заболевание пародонта: восприимчивый хозяин, присутствие патогенных видов и отсутствие так называемых "полезных бактерий". Последующее нарушение пропорционального соотношения между строгими симбионтами и патобионтами запускает разрушительный каскад, приводящий к активации воспаления и последующему разрушению кости [Castalonga M. и др., "The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries", *Immunology Letters*, 214, том 12, с. 22-38].

Следовательно, необходим поиск альтернативных или улучшенных продуктов, которые смогут уменьшить побочные действия ополаскивателей для полости рта или смогут повысить их эффективность так, что потребуются меньшие дозы особенно во время длительного лечения.

В качестве альтернативного профилактического средства было предложено применение пробиотиков. Пробиотики могут представлять собой перспективную область исследований в терапии пародонта. Пробиотикам дают следующее определение: "живые микроорганизмы, которые при введении в достаточных количествах приносят пользу состоянию здоровья хозяина". Полагают, что пробиотики могут восстановить популяцию полезных бактерий, которые могут помочь убить патогенные бактерии и бороться против инфекции. Пробиотики, которые вводят перорально, могут принести пользу здоровью полости рта, предотвратив рост опасной микробиоты или модулируя иммунитет слизистой полости рта. Виды пробиотиков по большей части относятся к родам *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*.

Один пробиотик для перорального применения, известный на рынке, представляет собой *L. reuteri* Prodentis. В недавнем исследовании показали, что пероральное лечение таблетками, содержащими пробиотический штамм *L. reuteri*, вызывает значительное уменьшение ответа провоспалительных цитокинов и улучшение клинических параметров у большинства пациентов с хроническим пародонтитом [Szkardkiewicz A.K. и др., "Effect of Oral Administration Involving a Probiotic Strain of *Lactobacillus reuteri* on Pro-Inflammatory Cytokine Response in Patients with Chronic Periodontitis", *Arch Immunol TherExp (Warsz)*, 2014, том 62, с. 495-500]. Целью другого исследования была оценка влияния содержащих пробиотик *L. reuteri* пастилок в качестве дополнения к удалению зубного камня и выравниванию поверхности корней зуба (SRP) у пациентов с хроническим пародонтитом. Наблюдалось снижение уровней *Porphyromonas gingivalis* в группе SRP, которую лечили пробиотиком, но не наблюдали изменений в уровнях других исследованных патогенных бактерий [Teughels W. и др., "Clinical and microbiological effects of *Lactobacillus reuteri* probiotics in the treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled study", *Journal of clinical periodontology*, 2013, том 40, с. 1025-35]. Тем не менее влияние *L. reuteri* на микробиоту полости рта остается спорным, поскольку в параллельном исследовании ежедневный прием пробиотических пастилок, содержащих *L. reuteri* (ATCC55730 и ATCC PTA5289), похоже, значительно не влиял на накопление зубного налета, воспалительный статус или микробный состав биопленки при экспериментальном гингивите [Hallstroem H. и др., "Effect of probiotic lozenges on inflammatory reactions and oral biofilm during experimental gingivitis", *Acta Odontologica Scandinavica*, 2013, том 71, с. 828-833].

Другой пример представляет собой недавнее исследование, в котором описано влияние перорального введения пастилок с *L. rhamnosus* GG и *B. animalis*, подвида *lactis* BB-12, на количество зубного налета, воспаление десен и микробиоту полости рта у здоровых молодых взрослых. Пробиотическая пастилка уменьшала как индекс зубного налета, так и десневой индекс, но ни в одной группе не обнаружили вызванных пробиотиком изменений состава микробов слюны. Из этого можно сделать вывод, что пробиотическая пастилка улучшала состояние пародонта в отношении воспаления десен, при этом не влияя на микробиоту полости рта [Toiviainen A. и др., "Impact of orally administered lozenges with *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 on the number of salivary mutans streptococci, amount of plaque, gingival inflammation and the oral microbiome in healthy adults", *Clin. Oral Investig*, 2015, том 19, с. 77-83].

Другие пробиотики, такие как *Lactobacillus brevis* CD2, могут быть полезны для содействия здоровью полости рта и ингибирования воспалительной потери костной ткани. Тем не менее их клиническая эффективность пока не ясна [Maekawa T. и др., "Topical treatment with probiotic *Lactobacillus brevis* CD2" inhibits experimental periodontal inflammation and bone loss", *J. Periodont. Res.*, 214, том 44, с. 785-791].

Nadkerny и др. опубликовали в 2015 г. клиническое исследование, в котором оценили и сравнили направленный против зубного налета и воспаления потенциал пробиотического ополаскивателя для полости рта с 0,2% хлоргексидином и солевым раствором. Указанный пробиотический ополаскиватель для полости рта (Sporlac Plus®) получали путем смешивания пробиотического состава, содержащего *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus sporogenes*, *Bifidobacterium longum* и *Saccharomyces boulardii* с 10 мл дистиллированной воды, доступной для приобретения в аптеке. Влияние пробиотика и хлоргексидина на десневой индекс и индекс гигиены полости рта было сходным [Nadkerny P.V. и др., "A comparative evaluation of the efficacy of probiotic and chlorhexidine mouthrinses on clinical inflammatory parameters of gingivitis: A randomized controlled clinical study", *J. Indian Soc. Periodontol.*, 2015, том 16, с. 633-639].

В недавнем клиническом испытании исследовали местное применение пробиотиков как дополнение к удалению зубного камня и выравниванию поверхности корней зуба (SRP) для лечения пациентов с хроническим пародонтитом и галитозом [Penala S. и др., "Efficacy of local use of probiotics as an adjunct to scaling and root planing in chronic periodontitis and halitosis: A randomized controlled trial", *J. Res. Pharm. Pract.*, 2016, том 5(2), с. 86-93]. Субъектов произвольно распределяли по исследуемой и контрольной группам. Исследуемая группа (SRP+пробиотики) получала поддесневую доставку пробиотиков и пробиотического ополаскивателя для полости рта, и контрольная группа (SRP+плацебо) получала поддесневую доставку плацебо и ополаскивателя для полости рта с плацебо в течение 15 дней. Пробиотик состоял из комбинации двух пробиотических организмов: *Lactobacillus salivarius* (2E+09 колониеобразующих единиц (КОЕ)) и *Lactobacillus reuteri* (2E+09 КОЕ) на капсулу. Каждый пациент получал 28 капсул, и его просили высыпать содержимое капсулы в 10 мл дистиллированной воды и ополаскивать рот в течение 1 мин два раза в день на протяжении 14 дней. Все клинические и микробиологические параметры снижались в обеих группах к концу исследования, тем не менее межгрупповое сравнение уменьшения глубины при зондировании (PDR) и увеличения уровня клинического прикрепления (CAG) не выявило статистической значимости, за исключением PDR умеренно глубоких карманов в исследуемой группе. Следовательно, клиническая эффективность потребления пробиотика остается спорной.

Напротив, в обзоре в данной области [Yanine N. и др., "Effects of probiotics in periodontal diseases: a systematic review", *Clinical oral investigations*, 2013, том 17, с. 1627-34] сделан вывод, что эффективность пробиотиков в отношении предотвращения и лечения заболеваний пародонта спорна. В отношении главного результата лечения - глубины карманов при зондировании - не будет полезного с клинической точ-

ки зрения действия пробиотиков. В отношении второстепенных результатов лечения, пробиотики показали небольшое благоприятное действие на индекс зубного налета и воспаление десен. Аналогично в более позднем метаанализе пришли к выводу, что хотя терапия пробиотиками может положительно влиять на показатели воспаления десен, на сегодняшний день недостаточно доказательств, поддерживающих применение пробиотиков для контролирования (т.е. предотвращения или лечения) заболевания пародонта. Следовательно, могут потребоваться дополнительные исследования в данном направлении, особенно учитывающие влияние носителя или дозы пробиотического лекарства [Gruner D. и др., "Probiotics for managing caries and periodontitis: Systematic Review and Meta-Analysis", J. Dent., 2016, том 48, с. 16-15]. Подводя итог вышесказанному, из известного уровня техники видно, что пробиотики могут способствовать улучшению в воспалительных процессах пародонта и десен, но остается спорным вопрос, могут ли пробиотики оказывать явное клиническое действие.

В статье L. Dunn и др. (Journal of Food Science • том 81, № 2, 2016, с. M438-M444) описана проверка противомикробной эффективности совокупности эфирных масел (и отдельных компонентов масел, таких как, например, тимол) против различных молочнокислых бактерий (например, *Pediosoccus acidilactici*, *Lactobacillus buchneri* и *Leuconostoc citrovorum*). Целью данной статьи была проверка того, можно ли использовать компоненты эфирных масел (например, тимол) для ингибирования надлежащим образом роста соответствующих молочнокислых бактерий и, таким образом, применять их в качестве консервирующих добавок в продукты питания. Соответственно в данной статье присутствие молочнокислых бактерий (например, *Pediosoccus acidilactici*) в продуктах питания, вероятно, видят как нежелательное. Другими словами, в данной статье не описано применение штамма *Pediosoccus* в комбинации с антисептиком (например, тимолом) для какой-либо практической цели, такой как, например, предотвращение и/или лечение заболевания полости рта.

В WO 2017012905 A1 (AB-BIOTICS) описана самостоятельно образующая пленку композиция в форме порошка, которая позволяет достаточную колонизацию пробиотиком полостей рта. В нем не описано применение штамма *Pediosoccus* в комбинации с антисептиком (например, тимолом) для какой-либо практической цели, такой как, например, предотвращение и/или лечение заболевания полости рта.

Краткое описание изобретения

Одну проблему, которую будет решать настоящее изобретение, можно рассматривать как относящуюся к предоставлению молочнокислых бактерий (МКБ), которые можно вводить в схемах лечения, включающих антисептики. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что штаммы *Pediosoccus* особенно устойчивы к антисептикам.

Соответственно в первом аспекте настоящего изобретения предложен штамм *Pediosoccus* для применения в комбинации с по меньшей мере одним антисептиком, при этом указанный штамм *Pediosoccus* обладает способностью переносить присутствие по меньшей мере одного антисептика, выбранного из группы, состоящей из

- a) триклозана;
- b) эфирного масла, содержащего по меньшей мере один отдельный компонент, выбранный из группы, состоящей из ментола, эвкалиптола, тимола и метилсалицилата; и
- c) отдельного компонента, выбранного из группы, состоящей из ментола, эвкалиптола, тимола и метилсалицилата,

при этом считают, что штамм *Pediosoccus* обладает способностью переносить указанный антисептик, когда гало ингибирования, определенное с помощью диско-диффузионного способа анализа, наблюдаемое для штамма *Pediosoccus*, меньше, чем гало ингибирования *Porphyromonas gingivalis*, при этом указанный антисептик находится в концентрации, достаточной для наблюдения ингибирования *Porphyromonas gingivalis*, и

при этом штамм *Pediosoccus* и антисептик входят в состав для раздельного, последовательного, одновременного введения или введения в виде смеси.

Данный первый аспект в качестве альтернативы можно сформулировать как применение штамма *Pediosoccus* в комбинации с антисептиком, при этом указанный штамм *Pediosoccus* обладает способностью переносить присутствие по меньшей мере одного антисептика, описанного выше.

Во втором аспекте предложена бактериальная композиция, которая содержит от 10^4 до 10^{12} КОЕ/г жизнеспособных клеток по меньшей мере одного штамма *Pediosoccus*, при этом штамм *Pediosoccus* обладает по меньшей мере свойствами, описанными в первом аспекте.

В третьем аспекте предложена композиция согласно второму аспекту для применения для предотвращения и/или лечения заболевания (расстройства) полости рта.

В четвертом аспекте предложен продукт для личной гигиены или фармацевтический продукт, содержащий композицию, описанную во втором аспекте, вместе с приемлемыми вспомогательными веществами и/или носителями.

В пятом аспекте предложен способ скрининга и выделения штамма молочнокислых бактерий, включающий следующие этапы:

- i) анализ способности переносить антисептики отдельных молочнокислых бактерий из пула кандидатных штаммов молочнокислых бактерий; и

ii) селекцию и выделение штаммов молочнокислых бактерий, обладающих лучшей способностью переносить антисептики, чем таковая у *Porphyromonas gingivalis*.

Термины, используемые в формуле изобретения и аспектах настоящего изобретения, следует понимать в данном описании в их широком и общем смысле. Тем не менее их определения приведены далее в данной заявке в подробном описании изобретения.

Во всем описании и формуле изобретения не предполагается, что термин "содержать" и его варианты исключает другие технические особенности, добавки, компоненты или этапы. Дополнительные объекты, преимущества и особенности согласно настоящему изобретению станут понятны для специалистов в данной области после изучения настоящего описания или могут быть изучены при осуществлении настоящего изобретения. Более того, в объем настоящего изобретения входят все возможные комбинации конкретных и предпочтительных вариантов реализации, описанных в данной заявке. Следующие примеры и фигуры предложены в данной заявке с целью иллюстрирования и не подразумевают ограничения настоящего изобретения.

Подробное описание изобретения

Как пояснено выше, общеизвестно, что антисептики обладают широким спектром противомикробного действия. Это позволяет убивать множество видов бактерий и грибов, но они также оказывают отрицательное действие на симбиотические или пробиотические бактерии. В действительности известно, что следовые количества антисептиков можно обнаружить после их введения, что также компрометирует применение пробиотиков даже после введения антисептика. Следовательно, применение молочнокислых бактерий особенно в качестве пробиотического лечения никогда не предполагали возможным в комбинации с антисептиками.

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что штаммы *Pediosoccus* обладают большей способностью переносить антисептики, таким образом, возможно введение указанных штаммов при применении антисептиков для терапевтических или косметических целей. Без привязки к конкретной теории полагают, что по принципу конкурентного исключения, который дает преимущество безвредным бактериям, если они прикрепилась до прикрепления патогенных штаммов, введение *Pediosoccus* в комбинации с антисептиками может быть особенно эффективным, защищая от колонизации условными патогенами.

Следовательно, в одном аспекте настоящего изобретения предложен штамм *Pediosoccus* для применения в комбинации с антисептиком, при этом указанный штамм *Pediosoccus* обладает способностью переносить присутствие по меньшей мере одного антисептика, выбранного из группы, состоящей из

- a) триклозана;
- b) эфирного масла, содержащего по меньшей мере один отдельный компонент, выбранный из группы, состоящей из ментола, эвкалиптола, тимола и метилсалицилата; и
- c) отдельного компонента, выбранного из группы, состоящей из ментола, эвкалиптола, тимола и метилсалицилата,

при этом считают, что штамм *Pediosoccus* обладает способностью переносить указанный антисептик, когда гало ингибирования, определенное с помощью диско-диффузионного способа анализа, наблюдаемое для штамма *Pediosoccus*, меньше чем гало ингибирования *Porphyromonas gingivalis*, при этом указанный антисептик находится в концентрации, достаточной для наблюдения ингибирования *Porphyromonas gingivalis*, и

при этом штамм *Pediosoccus* и антисептик входят в состав для раздельного, последовательного, одновременного введения или введения в виде смеси.

Данный первый аспект в качестве альтернативы можно сформулировать как применение штамма *Pediosoccus* в комбинации с антисептиком, при этом указанный штамм *Pediosoccus* обладает способностью переносить присутствие по меньшей мере одного антисептика, описанного выше.

Устойчивые к антисептику штаммы молочнокислых бактерий.

Предпочтительно, чтобы штамм *Pediosoccus*, который обсуждается в данной заявке, представлял собой выделенный штамм молочнокислых бактерий. Для специалиста в данной области понятно, что в данном контексте термин "выделенный" относится к штамму молочнокислых бактерий, который был выделен из природного окружения, т.е. он не присутствует в своем природном окружении, следовательно, он свободен от других организмов и веществ, присутствующих в природном окружении.

Термин "способность переносить" в данной заявке относится к способности, либо унаследованной, либо нет, микроорганизмов выживать в условиях временного воздействия антисептика, что часто достигается замедлением жизненно важного процесса в бактерии. "Способность переносить" обычно понимают в литературе как способность микроорганизмов выживать без изменения минимальной ингибиторной концентрации (МИК). Тем не менее ее также можно понимать как пониженную чувствительность микроорганизма к противомикробному средству, которая характеризуется повышением минимальной ингибиторной концентрации (МИК), или как ситуацию, в которой противомикробное средство более не предотвращает микробный рост.

Термин "антисептик" в данной заявке относится к противомикробному средству, которое уничтожает или ингибирует рост микроорганизмов в живой ткани или на ней. Термин "противомикробный" в

настоящем изобретении имеет обычное в данной области значение, а именно означает агент, который убивает микроорганизмы или ингибирует их рост. Их можно дополнительно сгруппировать в соответствии с микроорганизмами, против которых они прежде всего действуют, например, против бактерий (антибактериальные средства) и против грибов (противогрибковые средства). Антисептики, как правило, отличаются от антибиотиков, потому что антибиотики, как правило, перемещаются по лимфатической системе для уничтожения бактерий внутри организма, и от дезинфицирующих средств, которые уничтожают микроорганизмы, находящиеся на неживых объектах.

На основании подробного описания анализов, приведенного в примерах 2-3, специалист сможет обычным способом повторить указанный анализ, чтобы объективно определить, обладает ли конкретный штамм способностью переносить антисептики. В частности, в примере 2 предложен способ определения того, способен ли данный штамм переносить указанный антисептик, в котором способность переносить антисептик выражают в виде гало ингибирования, определенного с помощью диско-диффузионного способа анализа. Например, считают, что штамм *Pediosoccus* обладает способностью переносить указанный антисептик, когда гало ингибирования, определенное с помощью диско-диффузионного способа анализа, наблюдаемое для штамма *Pediosoccus*, меньше чем гало ингибирования *Porphyromonas gingivalis*, при этом указанный антисептик находится в концентрации, достаточной для наблюдения ингибирования *P. gingivalis*.

В конкретных вариантах реализации будут считать, что штамм *Pediosoccus* обладает способностью переносить указанный антисептик, когда диаметр гало ингибирования, определенный с помощью диско-диффузионного способа анализа для штамма *Pediosoccus*, по меньшей мере на 1, 2, 3 или 4 мм меньше, чем диаметр, определенный для *P. gingivalis*. В более конкретном варианте реализации диаметр гало ингибирования, наблюдаемый для *Pediosoccus*, по меньшей мере на 4 мм меньше, чем диаметр гало ингибирования, определенный для *P. gingivalis*.

Штаммы *Pediosoccus*, предложенные в настоящем изобретении, отличаются наличием способности переносить по меньшей мере один из антисептиков, описанных в первом аспекте. Тем не менее важно отметить, что помимо данной способности указанные штаммы также могут быть устойчивы к другим соответствующим антисептиками, как показано в примерах. Это означает, что свойство, описанное в первом аспекте, можно считать ключевым свойством или маркером для определения группы штаммов *Pediosoccus*, полезных для целей настоящего изобретения.

В примерах предложены различные штаммы, соответствующие требованиям наличия такой способности переносить антисептики лучше, чем *P. gingivalis*. Дополнительно к указанным штаммам, с помощью подробно описанного способа вполне возможно идентифицировать и выделить другие штаммы из совокупности МКБ с такой же способностью переносить антисептики. С помощью примеров также продемонстрировано, что способность переносить антисептики полезна для целей настоящего изобретения. Таким образом, хотя были исследованы и идентифицированы некоторые конкретные штаммы с данным полезным свойством, нет никаких оснований ограничивать объем настоящего изобретения данными штаммами, так как все этапы способа получения других пригодных штаммов исчерпывающе описаны в данной заявке. Следовательно, согласно настоящему изобретению также предложена совокупность штаммов, отличных от используемых в примерах, которые обладают таким же свойством. Важно отметить, что не все штаммы МКБ будут обладать способностью переносить антисептики; таким образом, в настоящем изобретении предложен способ их выявления.

Аналогично уместно отметить, что применение диско-диффузионного способа анализа и условий данного анализа, описанных в примере 2, не ограничивает объем настоящего изобретения. Данный анализ - лишь один из анализов, подходящих для проверки способности штаммов переносить антисептики. Концентрации и количества антисептиков будет выбирать специалист для проверки способности штаммов переносить антисептики в зависимости от конкретного антисептика, который нужно протестировать. В частности, концентрации и количества антисептиков, которые будут применять, будут такими, которые необходимы, чтобы наблюдать ингибирование *P. gingivalis*.

Триклозан (регистрационный номер в CAS: 3380-34-5) (TCS) представляет собой дифениловый эфир, и его можно назвать 2,4,4'-трихлор-2'-гидроксидифениловым эфиром, 5-хлор-2-(2,4-дихлорфенокси)фенолом или *Triclosanum*. Молекулярная формула TCS - $C_{12}H_7Cl_3O_2$ и молекулярная масса данного химического вещества составляет 289,55. Большая часть производимого для продажи TCS имеет степень чистоты более 99% и доступна в твердой форме в виде кристаллического порошка от белого до грязно-белого цвета с едва уловимым ароматическим запахом. Триклозан эффективен против многих типов бактерий и некоторых типов грибов, предотвращая размножение бактерий и/или, в конечном счете приводя к гибели клетки. Он проникает через клеточную стенку бактерий и нацеливается на множество цитоплазматических и мембранных сайтов, включая синтез РНК и продукцию различных биомолекул.

Эфирные масла также применяют в качестве альтернативных антисептиков, в частности, для гигиены полости рта. "Эфирные масла" (ЭМ) в данной заявке представляют собой масла, полученные из растительных или животных источников, или их синтетические эквиваленты, и они состоят из сложных смесей нескольких компонентов, таких как монотерпеновые и сесквитерпеновые углеводороды, моно-

терпеновые и сесквитерпеновые спирты, сложные эфиры, простые эфиры, альдегиды, кетоны, оксиды и тому подобные компоненты.

"Отдельные компоненты эфирных масел" представляют собой соединения, которые можно выделить из масла (природного) или можно полностью или частично химически синтезировать.

Ментол можно также называть 2-изопропил-5-метилциклогексанолом или 5-метил-2-(1-метилэтил)циклогексанолом, и он представляет собой органическое соединение, полученное синтетическим способом или полученное из масла полевой мяты, перечной мяты или другой мяты.

Эвкалиптол представляет собой циклический эфир и монотерпеноид, которым особенно богаты эфирные масла растений из рода эвкалиптовых. Эвкалиптол также известен под различными синонимами: 1,8-цинеол, каяпутол, 1,8-эпокси-пара-ментан, 1,8-оксидо-пара-ментан, эвкалиптол, 1,3,3-триметил-2-оксабицикло[2,2,2]октан, цинеол.

Тимол (также известен как 2-изопропил-5-метилфенол) представляет собой природное монотерпеновое фенольное производное цимена, изомерное карвакролу, обнаруженное в масле тимьяна и выделенное из *Thymus vulgaris* (обычный тимьян) и различных других видов растений в виде белого кристаллического вещества с приятным ароматическим запахом и сильными антисептическими свойствами.

Метилсалицилат представляет собой органический эфир, продуцируемый в природе многими видами растений, особенно грушанками. Метилсалицилат также обычно называют метил-2-гидроксibenзоатом, маслом гаультерии, маслом грушанки или березовым маслом.

В одном варианте реализации штамм *Pediosoccus* дополнительно обладает способностью переносить антисептик из группы бисуанидов.

"Бигуаниды" представляют собой класс химически родственных соединений, известных своими бактерицидными свойствами. Данные соединения включают антисептики алексидин и хлоргексидин. Алексидин можно также называть 1-[N'-[6-[[амино-[[N'-(2-этилгексил)карбамимидаил]амино]метилен]амино]гексил]карбамимидаил]-2-(2-этилгексил)гуанидином. Хлоргексидин представляет собой катионный полибигуанид, и его можно также называть (1E)-2-[6-[[амино-[(E)-[амино-(4-хлоранилино)метилен]-амино]метилен]амино]гексил]-1-[амино-(4-хлоранилино)метилен]гуанидином.

В частности, штамм *Pediosoccus* обладает способностью переносить глюконат хлоргексидина.

Авторы настоящего изобретения также обнаружили, что штаммы *Pediosoccus* могут также обладать способностью ингибировать рост бактериальных патогенов (т.е. антагонизировать), особенно патогенов в полости рта. Это позволяет штаммам *Pediosoccus* быть особенно полезными для того, чтобы избежать колонизации патогенами и даже ингибировать их рост, таким образом улучшая профиль микробиоты.

Таким образом, в одном варианте реализации штамм *Pediosoccus* дополнительно обладает способностью антагонизировать по меньшей мере один патоген, выбранный из группы, состоящей из *Fusarium nucleatum*, *Treponema denticola* и *Prevotella denticola*. В частности, штамм *Pediosoccus* обладает способностью антагонизировать по меньшей мере два из данных патогенов. В частности, штамм *Pediosoccus* обладает способностью антагонизировать *F. nucleatum*, *T. denticola* и *P. denticola*.

В одном конкретном варианте реализации штамм *Pediosoccus* дополнительно обладает способностью антагонизировать *Tannerella forsythia*.

В одном конкретном варианте реализации штамм *Pediosoccus* дополнительно обладает способностью антагонизировать *Porphyromonas gingivalis*.

На основании подробного описания анализа в данной заявке (см. в примере 4 анализ антагонистической активности) специалист сможет обычным способом повторить данный анализ, чтобы объективно определить антагонизирует ли штамм интересующие патогены. Описания и условия указанного анализа антагонистической активности не ограничивают объем настоящего изобретения. Данный анализ представляет собой анализ, подходящий для проверки способности интересующих штаммов антагонизировать патогены.

В конкретном варианте реализации штамм *Pediosoccus* представляет собой штамм *Pediosoccus acidilactici*. В частности, штамм *Pediosoccus* представляет собой *Pediosoccus acidilactici*, депонированный в Испанской коллекции типовых культур под номером доступа СЕСТ 8633.

Таким образом, в одном аспекте настоящего изобретения предложен штамм, относящийся к виду *Pediosoccus acidilactici*, депонированному в Испанской коллекции типовых культур под номером доступа СЕСТ 8633.

В другом аспекте настоящего изобретения предложена композиция, которая содержит от 10^4 до 10^{12} КОЕ/г жизнеспособных клеток по меньшей мере одного штамма *Pediosoccus*, при этом штамм *Pediosoccus* обладает по меньшей мере свойствами (т.е. способностью переносить антисептики), описанными в первом аспекте.

Композиции согласно настоящему изобретению могут содержать отдельный штамм или представлять собой комбинацию различных штаммов МКБ, относящихся к одному или различным видам. В конкретном варианте реализации штамм *Pediosoccus* согласно настоящему изобретению находится в комбинации со штаммом *Lactobacillus plantarum* и/или штаммом *Lactobacillus brevis*. В частности, композиция, содержащая штаммы *Pediosoccus* согласно настоящему изобретению, дополнительно содержит штамм

Lactobacillus plantarum, депонированный в Испанской коллекции типовых культур под номером доступа СЕСТ 7481, и штамм *Lactobacillus brevis*, депонированный в Испанской коллекции типовых культур под номером доступа СЕСТ 7480.

Ясно, что применяя указанные депонированные штаммы в качестве исходного материала, специалист в данной области сможет обычным способом с помощью обычных методик мутагенеза или повторного выделения получить дополнительные их варианты или мутанты, у которых сохранятся или улучшатся описанные в данной заявке соответствующие свойства и преимущества указанных штаммов, составляющих композицию согласно настоящему изобретению. Таким образом, в настоящем изобретении также предложены варианты штаммов, описанных в данной заявке. В данной заявке термин "вариант" или "мутант" штамма относится к любому встречающемуся в природе или специально разработанному штамму, полученному из исходного штамма X преимущественно путем мутации, которая сохраняет способность переносить антисептики, сходную с таковой у указанного штамма.

Например, последовательность гена 16S рРНК "варианта" штамма, предложенного в данной заявке, может быть приблизительно на 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности 16S рРНК SEQ ID NO: 1 штамма, описанного в данной заявке.

В другом варианте реализации степень родства между измененным и исходным штаммами определяют как степень подобия, полученную при анализе геномов исходного и измененного штамма с помощью гель-электрофореза в пульсирующем поле (ГЭПП), применяя одну или более эндонуклеаз рестрикции. Степень подобия, полученную с помощью ГЭПП, можно измерить с помощью коэффициента подобия Дайса. В конкретных вариантах реализации коэффициент подобия Дайса между вариантом и исходным штаммом составляет приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99%, приблизительно 99,1%, приблизительно 99,5%, приблизительно 99,6%, приблизительно 99,7%, приблизительно 99,8%, приблизительно 99,9%, приблизительно 99,99%, приблизительно 99,999%, приблизительно 99,9999% или более, но менее чем 100%.

В одном конкретном варианте реализации мутантов получали, применяя технологию рекомбинантных ДНК. В другом варианте реализации мутантов получали с помощью неспецифического мутагенеза. Таким образом, в другом аспекте настоящего изобретения предложен способ получения мутанта *Pediosoccus acidilactici*, при этом указанный штамм представляет собой штамм СЕСТ 8633, при этом указанный способ включает применение указанного депонированного штамма в качестве исходного материала и проведение мутагенеза и при этом у полученного варианта или мутанта далее сохраняется или повышается по меньшей мере способность указанного депонированного штамма переносить антисептики.

В конкретном варианте реализации штаммы ферментировали в искусственной среде и подвергали последующей обработке после ферментации с получением бактериальных клеток и полученные в результате этого бактериальные клетки находились в жидкой среде или в твердой форме. В частности, последующую обработку выбирали из группы, состоящей из сушки, замораживания, лиофилизации, сушки в псевдосжиженном слое, сушки распылением и охлаждения в жидкой среде, и, в частности, выбирали лиофилизацию.

Штаммы согласно настоящему изобретению получали путем культивирования (или ферментирования) бактерий в подходящей искусственной среде и при подходящих условиях. Под выражением "искусственная среда" для микроорганизмов следует понимать среду, содержащую природные вещества и необязательно синтетические химические вещества, такие как полимер поливиниловый спирт, который может воспроизводить некоторые функции сывороток. Обычные подходящие искусственные среды представляют собой питательные бульоны, которые содержат элементы, включающие источник углерода (например, глюкозу), источник азота (например, аминокислоты и белки), воду и соли, необходимые для роста бактерий. Ростовые среды могут находиться в жидкой форме или часто могут быть смешаны с агаром или другим желатинирующим агентом с получением твердой среды. Указанные штаммы можно культивировать отдельно с получением чистой культуры, или в виде смешанной культуры вместе с другими микроорганизмами, или путем культивирования бактерий различных типов отдельно с последующим их объединением в желательных соотношениях. После культивирования и в зависимости от конечного состава, штаммы можно использовать в виде очищенных бактерий или в качестве альтернативы можно использовать бактериальную культуру или суспензию клеток либо как есть, либо после подходящей последующей обработки. В настоящем описании под термином "биомасса" понимают культуру бактериальных штаммов, полученную после культивирования (или ферментации, так как данный термин синонимичен термину культивирование).

Под термином "последующая обработка" в контексте настоящего изобретения следует понимать любую обработку, проведенную над биомассой с целью получения способных хорошо храниться бактериальных клеток. Целью последующей обработки является снижение метаболической активности клеток в биомассе и, таким образом, замедление скорости вредных для клеток реакций. В результате последующей обработки бактериальные клетки могут находиться в твердой или жидкой форме. В твердой форме подлежащие хранению бактериальные клетки могут находиться в виде порошка или гранул. В любом случае как твердая, так и жидкая формы, содержащие бактериальные клетки, не присутствуют в природе,

следовательно, не встречаются в природе, поскольку их получают в результате искусственного процесса(ов) последующей обработки. В процессах последующей обработки в конкретных вариантах реализации может потребоваться применение одного или более из так называемых агентов последующей обработки. В контексте настоящего изобретения выражение "агент последующей обработки" относится к соединению, которое применяют для осуществления описанных в данной заявке процессов последующей обработки. В число агентов последующей обработки следует включить без ограничения дегидратирующие агенты, бактериостатические агенты, криозащитные агенты (криопротекторы), инертные наполнители (также известные как лиопротекторы), материал-носитель (также известный как заполняющий материал) и т.д., применяемые либо отдельно, либо в комбинации.

Существует два основных подхода к снижению метаболической активности бактериальных клеток и, следовательно, два подхода к проведению последующей обработки. Первый состоит в снижении скорости всех химических реакций, что можно осуществить при снижении температуры путем охлаждения или замораживания с применением холодильных камер, механических морозильных камер и морозильных камер с жидким азотом. В качестве альтернативы снижения скорости всех химических реакций можно добиться путем добавления веществ, которые ингибируют рост бактериальных клеток, а именно бактериостатического агента, сокращенно называемого б/статик.

Второй подход к проведению последующей обработки состоит в удалении воды из биомассы, данный процесс может включать сублимацию воды с применением лиофилизатора. Подходящие методики удаления воды из биомассы представляют собой сушку, лиофилизацию, сушку распылением или сушку в псевдосжиженном слое. Последующие обработки, которые позволяют получить твердую форму, могут представлять собой сушку, замораживание, лиофилизацию, сушку в псевдосжиженном слое или сушку распылением.

Последующая обработка предпочтительно представляет собой лиофилизацию, которая включает удаление воды из замороженных бактериальных суспензий путем сублимации при пониженном давлении. Данный процесс состоит из трех этапов: предварительного замораживания продукта с получением замороженной структуры, первичную сушку для удаления большей части воды и вторичную сушку для удаления связанной воды. Учитывая цель и ожидаемое непостоянство промышленных процессов производства и выделения лиофилизированных бактериальных культур, в последний из упомянутых обычно включают некоторое количество инертного наполнителя, также известного как лиопротектор. Его роль состоит в стандартизации содержания живых пробиотических бактерий в продукте. В доступных для приобретения лиофилизированных культурах используют следующие инертные наполнители: сахарозу, сахарозу, лактозу, трегалозу, глюкозу, мальтозу, мальтодекстрин, кукурузный крахмал, инулин и другие фармацевтически приемлемые негигроскопичные наполнители. Необязательно другие стабилизирующие или криозащитные агенты, такие как аскорбиновая кислота, также применяют для получения вязкой пасты, которую подвергают лиофилизации. В любом случае полученный таким образом материал можно перемолоть до подходящего размера, в том числе, в порошок.

Применение молочнокислых бактерий в комбинации с антисептиком.

Выше описано, что штаммы *Pediococcus* согласно настоящему изобретению способны переносить антисептики, следовательно, они подходят для применения в комбинации с антисептиками. Примеры антисептиков включают без ограничения триклозан, растительные экстракты и эфирные масла, бигуаниды и цетилпиридин.

В одном конкретном варианте реализации штамм *Pediococcus* применяют в комбинации с триклозаном.

В другом конкретном варианте реализации штамм *Pediococcus* применяют в комбинации с эфирными маслами. Примеры последних включают, но не ограничены перечисленными: масло корицы, масло базилика, масло бергамота, масло шалфея мускатного, масло иланг-иланг, масло из цветков померанца, масло санталового дерева, масло ладана, масло имбиря, масло перечной мяты, масло лаванды, абсолютное масло жасмина, масло герани "бурбон", масло мяты кудрявой, масло гвоздики, масло пачули, масло розмарина, масло розового дерева, масло санталового дерева, масло чайного дерева, масло ванили, масло лимонной травы, масло кедра, масла бальзама, масло мандарина, масло кипарисовика туполистного, масло туевики японского, масло гинкго, масло эвкалипта, масло лимона, масло апельсина, масло сладкого апельсина, масло из гранатовых семян, масло манука, масло цитронеллы, маслом грушанки и масло календулы. В более конкретном варианте реализации штамм *Pediococcus* применяют в комбинации с эфирным маслом, выбранным из группы, состоящей из масла перечной мяты, масла эвкалипта, масла тимьяна и масла грушанки.

В одном конкретном варианте реализации штамм *Pediococcus* применяют в комбинации с "отдельными компонентами эфирных масел". Примеры "отдельных компонентов эфирных масел" включают, но не ограничены перечисленными: тимьян, ореган, куркумин, 1-цитронеллол, альфа-амилкоричный альдегид, лираль, гераниол, фарнезол, гидроксцитронеллаль, изоэвгенол, эвгенол, камфор, эвкалиптол, линалоол, цитраль, тимол, лимонен и ментол. Дополнительные примеры отдельных компонентов включают сесквитерпеноидные соединения, которые могут представлять собой активные соединения в эфирных маслах. Сесквитерпеноидные соединения, содержащие 15 атомов углерода, образованы биосинтетиче-

ским способом из трех 5-углеродных изопреновых единиц. Сесквитерпеноидные соединения включают, но не ограничены перечисленными: фарнезол, неролидол, бисаболол, апритон, хамазулен, сантолол, зингиберол, каротол и карофиллен. В более конкретном варианте реализации штамм *Pediosoccus* применяют в комбинации с отдельным компонентом эфирного масла, выбранным из группы, состоящей из ментола, эвкалиптола, тимола и метилсалицилата.

В одном конкретном варианте реализации штамм *Pediosoccus* применяют в комбинации с бигуанидами, в частности алексидином или хлоргексидином. Алексидин и хлоргексидин применяют, главным образом, в виде солей. Соли хлоргексидина согласно настоящему изобретению включают, но не ограничены перечисленными: пальмитат хлоргексидина, дифосфанилат хлоргексидина, диглюконат хлоргексидина, диацетат хлоргексидина, дигидрохлорид хлоргексидина, дихлорид хлоргексидина, дигидройодид хлоргексидина, диперхлорат хлоргексидина, динитрат хлоргексидина, сульфат хлоргексидина, сульфит хлоргексидина, тиосульфат хлоргексидина, первичный кислый фосфат хлоргексидина, дифторфосфат хлоргексидина, диформат хлоргексидина, дипропионат хлоргексидина, дийодобутират хлоргексидина, ди-н-валерат хлоргексидина, дикапроат хлоргексидина, малонат хлоргексидина, сукцинат хлоргексидина, малат хлоргексидина, тартрат хлоргексидина, димоногликолят хлоргексидина, монодигликолят хлоргексидина, дилактат хлоргексидина, ди-альфа-гидроксиизобутират хлоргексидина, диглюкогептонат хлоргексидина, диизотионат хлоргексидина, дибензоат хлоргексидина, дициннамат хлоргексидина, диамделат хлоргексидина, диизофталат хлоргексидина, ди-2-гидроксинафтоат хлоргексидина и эмбонат хлоргексидина. В более конкретном варианте реализации штамм *Pediosoccus* применяют в комбинации с хлоргексидином, в частности с глюконатом хлоргексидина.

Указанные штаммы и антисептики согласно настоящему изобретению можно включить в состав для раздельного, последовательного, одновременного введения или введения в виде смеси.

Схемы введения и формы будет определять специалист в данной области в зависимости от заболевания, которое нужно вылечить. Введение антисептиков и молочнокислых бактерий можно осуществлять отдельно (выжидая некоторое время между введением штамма *Pediosoccus* и антисептика), последовательно (один за другим), параллельно (одновременно) или в виде смеси (совместно). В одном варианте реализации указанный антисептик и указанные штаммы согласно настоящему изобретению вводят в течение периода времени, составляющего не более 12 ч. В частности, указанный период времени длится не более 6 ч. В частности, указанный период времени длится не более 1 ч. В частности, указанный период времени длится не более 10 мин. В более конкретном варианте реализации схема лечения основана на одновременном введении антисептика и указанных штаммов. Одна обычная схема введения состоит во введении антисептика и последующем введении штамма *Pediosoccus* согласно настоящему изобретению. В конкретных вариантах реализации антисептик и штамм *Pediosoccus* вводят в одно и то же время. Когда антисептик и молочнокислые бактерии вводят пациенту в одно и то же время, их можно вводить в виде отдельных форм или как части одной композиции. Когда продукты вводят в отдельных лекарственных формах, указанные лекарственные формы могут находиться в одном или различных контейнерах.

В конкретной схеме введения лекарства субъекта, нуждающегося в просят прополоскать рот с помощью ополаскивателя для полости рта, содержащего антисептик (например, хлоргексидин при концентрации 0,12% (масса/объем)) в течение 30-60 с. Затем ополаскиватель для полости рта выплевывают и таблетку для перорального применения, содержащую молочнокислые бактерии, вводят в рот и позволяют ей медленно растаять.

Введение может быть постоянным или периодическим, как сочтет приемлемым наблюдающий врач, в частности, с учетом какого-либо изменения болезненного состояния или каких-либо нежелательных побочных действий. "Постоянное" введение относится к введению композиции непрерывным образом, тогда как "периодическое" введение относится к лечению, которое проводят с перерывом.

В неограничивающих вариантах реализации штаммы *Pediosoccus* и композиции согласно настоящему изобретению применяет стоматолог для неотложного лечения, и пациент может соблюдать поддерживающее лечение продуктами для гигиены полости рта, такими как жевательные резинки, зубная паста, ополаскиватель для полости рта, аэрозоль для полости рта, пастилки или диспергируемые таблетки для полости рта, содержащие самостоятельно образующую пленку композицию в форме порошка согласно настоящему изобретению или молочнокислые бактерии с обычными вспомогательными веществами. Стоматолог может осуществить введение, например, путем нанесения композиций согласно настоящему изобретению с помощью шприца, в частности, с тупоконечной иглой. Другие неограничивающие примеры профессиональных введений представляют собой применение зубной шины, содержащей гель, включающий композиции согласно настоящему изобретению, или нанесение композиции в форме лака на поверхности зубов с помощью кисти. В таких областях применения, как при галитозе, пародонтите, гингивите или кариесе, композиции согласно настоящему изобретению также может наносить сам пациент.

В одном конкретном варианте реализации антисептик находится в концентрации в диапазоне от 0,05 до 0,5% (по массе). В частности, концентрация антисептика находится в диапазоне от 0,05 до 0,2% (по массе). В частности, концентрация составляет 0,05, 0,1, 0,12 или 0,2% (по массе).

В одном аспекте настоящего изобретения предложен набор из частей, содержащий

спирт, пектин, ПЭГ-2М, ПЭГ-5М, полиакриловую кислоту, поливиниловый спирт, альгинат калия, алюминиевокалиевый полиакрилат, каррагинан калия, хлорид калия, сульфат калия, картофельный крахмал, альгинат пропиленгликоля, сополимер акрилата натрия/винилового спирта, карбоксиметилдекстран натрия, каррагинан натрия, целлюлозасульфат натрия, хлорид натрия, полиметакрилат натрия, алюмосиликат натрия, сульфат натрия, бентонит стеаралкония, гекторит стеаралкония, стеариловый спирт, талловый спирт, гидрохлорид триэтаноламина (ТЭА), трагакантовую камедь, тридециловый спирт, силикат трометамин магния-алюминия, пшеничную муку, пшеничный крахмал, ксантановую камедь, абиетоловый спирт, акрилолеву кислоту, бегенат алюминия, каприлат алюминия, дилолеат алюминия, соли алюминия, такие как дистеарат и изостеараты алюминия, пчелиный воск, бегенамид, сополимер бутадиена/акрилонитрила, кислоту С29-70, бегенат кальция, стеарат кальция, канделильский воск, карнаубский воск, церезин, холестерин, гидроксистеарат холестерина, кокосовый спирт, копал, малатдиглицерилстеарата, дигидроабиетоловый спирт, олеат диметиллаурамина, сополимер додекановой кислоты/цетеарилового спирта/гликоля, эрукамид, этилцеллюлозу, глицерилтриацетилгидроксистеарат, глицерилтриацетилрицинолят, дибегенат гликоля, диоктаноат гликоля, дистеарат гликоля, гександиолдистеарат, гидрогенизированные полимеры С6-14 олефина, гидрогенизированное касторовое масло, гидрогенизированное хлопковое масло, гидрогенизированный свиной жир, гидрогенизированное масло менхэдена, гидрогенизированные пальмоядровые глицериды, гидрогенизированное пальмоядровое масло, гидрогенизированное пальмовое масло, гидрогенизированный полиизобутен, гидрогенизированное соевое масло, гидрогенизированный талловый амид, гидрогенизированный талловый глицерид, гидрогенизированный растительный глицерид, гидрогенизированное растительное масло, японский воск, восковую фракцию масла хохобы, ланолиновый спирт, масло ши, лаурамид, метилдегидроабиетат, гидрогенизированное метилрезинат, метилрезинат, сополимер метилстирола/винилтолуола, микрокристаллический воск, буроугольный кислый воск, буроугольный воск, миристилэйкозанол, миристилоктадеканол, сополимер октадецена/малеинового ангидрина, октилдодецилстеароилстеарат, олеамид, олеостеарин, воск из листьев бразильской пуховой пальмы, окисленный полиэтилен, озокерит, парафин, гидрогенизированный резинат пентаэритритила, тетраоктаноат пентаэритритила, резинат пентаэритритила, тетраабиетат пентаэритритила, тетрабегенат пентаэритритила, тетраолеат пентаэритритила, тетрастеарат пентаэритритила, сополимер офтальмический сополимер ангидрида/глицерина/глицидилдеканоата, офтальмический тримеллитовый/гликолевый сополимер, полибутен, полибутилентерефталат, полидипентен, полиэтилен, полиизобутен, полиизопрен, поливинилбутираль, поливиниллаурат, диаприлат пропиленгликоля, дикокоат пропиленгликоля, диизононаноат пропиленгликоля, дилаурат пропиленгликоля, дипеларгонат пропиленгликоля, дистеарат пропиленгликоля, диундеканоат пропиленгликоля, сополимер ПВП/эйкозена, сополимер ПВП/гексадецена, воск из рисовых отрубей, бентонит стеаралкония, гекторит стеаралкония, стеарамид, диэтанолламин (ДЭА)-дистеарат стеарамида, диизобутиладипинат (ДИБА)-стеарат стеарамида, моноэтанолламин (МЭА)-стеарат стеарамида, стеарон, стеариловый эрукамид, стеариловый стеарат, стеариловый стеароилстеарат, синтетический пчелиный воск, синтетический воск, тригидроксистеарин, триизононаноин, триизоостеарин, триизоостеарилтрилинолеат, трилаурин, трилинолеву кислоту, трилинолеин, тримиристин, триолеин, трипальмитин, тристеарин, лаурат цинка, миристал цинка, неодаканоат цинка, резинат цинка и их смеси. Желатинирующие агенты, которые применяют в носителях, могут представлять собой природные желатинирующие агенты, такие как природные камеди, крахмалы, пектины, агар и желатин. Часто желатинирующие агенты получены на основе полисахаридов или белков. Их примеры включают, но не ограничены перечисленными, гуаровую камедь, ксантановую камедь, альгиновую кислоту (Е400), альгинат натрия (Е401), альгинат калия (Е402), альгинат аммония (Е403), альгинат кальция (Е404, полисахариды из бурых водорослей), агар (Е406, полисахарид, полученный из красных морских водорослей), каррагинан (Е407, полисахарид, полученный из красных морских водорослей), камедь бобов рожкового дерева (Е410, природная камедь из семян рожкового дерева), пектин (Е440, полисахарид полученный из яблока или цитрусового фрукта) и желатин (Е441, полученный путем частичного гидролиза коллагена животного).

В различных неограничивающих вариантах реализации настоящего изобретения штаммы и композиции, используемые в продукте для личной гигиены, могут дополнительно содержать поверхностно-активное вещество. Поверхностно-активное вещество может представлять собой анионное поверхностно-активное вещество, катионное поверхностно-активное вещество, амфолитическое поверхностно-активное вещество или неионогенное поверхностно-активное вещество. Примеры неионогенных поверхностно-активных веществ включают полиэтоксилаты, жирные спирты (например, цетет-20 (цетиловый эфир оксида полиэтилена, содержащий в среднем приблизительно 20 звеньев оксида этилена) и другие неионогенные поверхностно-активные вещества "бридж(R)", доступные от ICI Americas, Inc. (Уилмингтон, Делавэр)), кокамидопропилбетаин, алкилфенолы, эфиры жирных кислот сорбита, сорбитана или полиоксиэтиленсорбитана. Подходящие анионные поверхностно-активные вещества включают лаурилсульфат аммония и лауриловый эфир сульфосукцината. В различных неограничивающих вариантах реализации настоящего изобретения продукт для личной гигиены может содержать воду.

В различных неограничивающих вариантах реализации настоящего изобретения штаммы и композиции, используемые в продукте для личной гигиены, могут дополнительно содержать гидрогель, вклю-

чающий, например, такое соединение как гидроксипропилметилцеллюлоза, катионная гидроксиэтилцеллюлоза (полимеры U-care), этилцеллюлоза, гидроксипропилцеллюлоза, гидроксиметилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза, оксид полиэтилена (смолы полиокс) и пирролидонкарбоксилат хитозана (Kytomer PC).

Штампы и композиции согласно настоящему изобретению также предназначены для применения для поддержания здоровья полости рта. Соответственно в одном конкретном варианте реализации продукт для личной гигиены представляет собой продукт для гигиены полости рта, содержащий штампы или композиции согласно настоящему изобретению вместе с фармацевтическими вспомогательными веществами, или косметически приемлемыми вспомогательными веществами, или другими съедобными ингредиентами. Должно быть понятно, что композиции согласно настоящему изобретению будут находиться там в эффективном количестве. Термин "средство для гигиены полости рта" относится к продуктам, которые применяют для поддержания чистоты рта и зубов, чтобы предотвратить стоматологические проблемы, чаще всего, образование полостей в зубе, гингивит, заболевания пародонта (десен) и неприятный запах изо рта. В этом смысле продукт для гигиены полости рта намеренно не проглатывают для системного введения конкретных терапевтических агентов, а вместо этого оставляют в полости рта на время, достаточное для контакта по существу со всеми поверхностями зубов и/или тканями полости рта с целью проявления активности в полости рта. Неограничивающие примеры таких продуктов представляют собой зубные пасты, средства для чистки зубов, зубные порошки, топические гели для полости рта, ополаскиватель для рта, продукты зубного протезирования, спреи для рта, жевательные резинки, зубную нить, зубные ленты, шлифовальный порошок, полировочные пасты, стоматологические лаки, герметики для фиссур, заполняющие материалы, крем или гель для полости рта, леденец, пастилки, диспергируемую в полости рта таблетку или пластинку, или порошок, который можно сыпать непосредственно в полость рта.

В конкретном варианте реализации продукт для гигиены полости рта выбран из группы, состоящей из зубной пасты, геля для полости рта, спрея для полости рта, ополаскивателя для полости рта или диспергируемой в полости рта таблетки.

Продукты для гигиены полости рта могут дополнительно содержать ароматизирующие и маскирующие вкус агенты. Неограничивающие примеры данных агентов для применения в продуктах для гигиены полости рта включают коричный альдегид, эвгенол, эвкалиптол, ментол, N-этил-пара-ментан-3-кабоксамид, анетол, масло перечной мяты, масло мяты кудрявой и масло полевой мяты.

Продукты для гигиены полости рта могут необязательно содержать увлажнители, желатинирующие агенты, абразивные материалы, источники фторида, десенсибилизирующие агенты, ароматизирующие вещества, красители, подсластители, консерванты, структурирующие агенты, поверхностно-активные вещества, агенты против зубного камня и агенты против зубного налета.

Продукты для гигиены полости рта могут также содержать другие активные в полости рта агенты, такие как отбеливающие зубы активные агенты, включая отбеливающие или окисляющие агенты, такие как пероксиды, пербораты, перкарбонаты, пероксиангидриды, персульфаты, хлориты металлов и комбинации перечисленных агентов. Изменяющие цвет зубов вещества также можно учитывать среди активных агентов для гигиены полости рта, полезных в настоящем изобретении.

Состав зубных паст хорошо известен специалистам в данной области. В композициях зубных паст предпочтительно использовать неионогенные (например, сложные эфиры жирных кислот с сахарами) или амфотерные (например, полученные из кокоса бетаины) поверхностно-активные вещества, поскольку анионные поверхностно-активные вещества оказывают отрицательное влияние на чувствительную эпителиальную ткань десен. В случае зубных паст применение бикарбоната натрия для нейтрализации кислотности в полости рта также особенно предпочтительно. Кроме того, зубные пасты могут содержать загущающие агенты, такие как ксантановая камедь, абразивные кремниевые наполнители и другие вспомогательные агенты дополнительно к агентам, обычно используемым в отрасли производства зубных паст. Предпочтительно молочнокислые бактерии инкапсулированы или защищены другим способом для включения в состав зубной пасты.

Специалистам в данной области известно, что "ополаскиватель для полости рта", "жидкость для полоскания рта", "стоматологический ополаскиватель", "пероральный ополаскиватель" или "средство для промывки рта" в данной заявке относится к жидкой композиции, которую держат во рту пассивно или перекачивают по полости рта с помощью сокращения мышц ротовой полости и/или движений головой и которой можно прополоскать рот, запрокинув голову и булькая жидкостью на задней стороне рта. Обычно ополаскиватели для полости рта представляют собой антисептический раствор, предназначенный для снижения микробной нагрузки в полости рта, хотя другие ополаскиватели для полости рта могут давать для других целей, например для анальгетического, противовоспалительного или противогрибкового действия. Кроме того, некоторые ополаскиватели действуют как заменители слюны для нейтрализации кислоты и поддержания влажности во рту при ксеростомии (сухости во рту). Дополнительно к воде можно включить в состав ополаскивателей полигидроксилированные соединения, такие как глицерин или гликоли (например, пропиленгликоль, неионогенные поверхностно-активные вещества и т.д.), и другие вспомогательные вещества для улучшения внешнего вида, вкуса и консервации.

Спреи представляют собой композиции, такие же или сходные с ополаскивателями для полости рта, но распределенные по флаконам с распылителями для удобного нанесения дозы, необходимой для смазывания и защиты рта без необходимости последующего полоскания.

Гели для перорального применения содержат полимеры, которые позволяют непосредственное стабильное нанесение на полость рта. В отношении данных полимеров для целей настоящего изобретения предпочтительно применение комбинации полимеров, в общем случае известных как поликарбофил и карбомер, поскольку они сохраняют структуру геля стабильной в течение очень продолжительного времени при экстремальных температурных условиях. Указанные гели также могут содержать некоторое количество природного, некариесогенного подсластителя, такого как сорбит.

В другом варианте реализации продукт для личной гигиены представляет собой косметический продукт, который содержит штаммы *Pediosoccus* или композиции согласно настоящему изобретению вместе с косметически приемлемыми вспомогательными веществами. "Косметические продукты" или "косметические средства" представляют собой продукты, предназначенные для нанесения на тело человека, чтобы очистить, повысить красоту, способствовать привлекательности или изменить внешний вид, не влияя на структуру или функции тела. Косметические средства также могут принести терапевтическую пользу.

Термин "косметически приемлемый" относится к соединениям, материалам, композициям и/или лекарственным формам, которые в рамках здравого медицинского суждения подходят для применения в контакте с кожей человека без чрезмерной токсичности, несовместимости, нестабильности и аллергического ответа, среди прочих. Каждый "косметически приемлемый" носитель, вспомогательное вещество и т.д. также должен быть "приемлемым" в том смысле, что он совместим с другими ингредиентами косметического состава. Подходящие носители, вспомогательные вещества и т.д. для косметических составов можно найти в стандартной литературе.

Неограничивающие примеры косметических продуктов включают очищающие диски, одеколоны, ватные палочки, ватные диски, средство для подводки глаз, косметическую салфетку, щипчики для волос, блеск для губ, губную помаду, лосьон, средство для макияжа, пилки для ногтей, помаду, духи, бритвы, крем для бритья, увлажняющее средство, тальк, туалетную бумагу и влажные салфетки (включая, но не ограничиваясь жидкой или порошковой основой под макияж, жидким или твердым средством для подводки глаз, тушью для ресниц, кремовыми тенями для глаз, тонирующей пудрой, порошком "компактного" типа для применения в сухом или смоченном виде и т.д.).

Фармацевтические продукты и биологически активные пищевые добавки.

В одном аспекте штаммы *Pediosoccus* и композиции согласно настоящему изобретению получены в виде фармацевтических продуктов. Термин "фармацевтический продукт" в настоящем описании понимают в широком значении, включающем любую композицию, которая содержит активный ингредиент, в данном случае штаммы согласно настоящему изобретению предпочтительно в виде композиции, и не обязательно по меньшей мере один антисептик, вместе с фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами. Данный термин не ограничен лекарственными средствами.

Термин "фармацевтически приемлемый" известен в данной области и включает соединения, материалы, композиции, носители, среды и/или лекарственные формы, которые в рамках здравого медицинского суждения подходят для применения в контакте с тканями субъекта (например, человека), не вызывая избыточной токсичности, раздражения, аллергического ответа или другой проблемы или осложнения, соответствующих приемлемому отношению польза/риск. Каждый носитель, вспомогательное вещество и т.д. также должен быть "приемлемым" в смысле совместимости с другими ингредиентами состава. Подходящие носители, вспомогательные вещества и т.д. можно найти в стандартной фармацевтической литературе. Неограничивающие примеры материалов, которые могут служить в качестве фармацевтически приемлемых носителей, включают сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; целлюлозу и ее производные, такие как карбоксиметилцеллюлоза натрия, этилцеллюлоза и ацетат целлюлозы; порошок трагакант; солод; желатин; тальк; масло какао и суппозиторные воски; масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, подсолнечное масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; гликоли, такие как пропиленгликоль; полиолы, такие как глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; агар; буферные вещества, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; альгиновую кислоту; апирогенную воду; изотонический солевой раствор; раствор Рингера; этиловый спирт; фосфатные буферные растворы и другие нетоксичные совместимые вещества, используемые в фармацевтических составах.

Вспомогательные вещества выбирают без ограничения из группы, включающей наполнители/разбавители/объемообразующие агенты, связующие вещества, антиадгезивы, разрыхлители, покрытия, предотвращающие слеживаемость агенты, антиоксиданты, лубриканты, подсластители, вкусоароматические добавки, красители, тензиды и другие классы приемлемых в фармацевтике и ветеринарии вспомогательных веществ.

Наполнители выбирают без ограничения из группы, включающей инулин, олигофруктозу, пектин, модифицированные пектины, микрокристаллическую целлюлозу, лактозу, крахмал, мальтодекстрин,

сахарозу, глюкозу, фруктозу, маннит, ксилит, некристаллизирующийся сорбит, карбонат кальция, дикальцийфосфат, другие инертные неорганические и органические фармакологически приемлемые наполнители и смеси данных веществ. При лекарственной форме суспензии для перорального применения, наполнители или разбавители выбирают из группы, включающей растительное масло, олеиновую кислоту, олеиловый спирт, жидкий полиэтиленгликоль, другие фармакологически приемлемые инертные жидкости или смеси данных веществ.

Связующие вещества применяют в твердых лекарственных формах, например, чтобы удерживать вместе ингредиенты в таблетке, чтобы удостовериться в том, что таблетки и гранулы можно получить с необходимой механической силой, и чтобы придать объем таблеткам с низкой активной дозой. Связующие вещества в твердых лекарственных формах, таких как таблетки, представляют собой лактозу, сахарозу, кукурузный (маисовый) крахмал, модифицированные крахмалы, микрокристаллическую целлюлозу, модифицированную целлюлозу (например, гидроксипропилметилцеллюлозу (ГПМЦ) и гидроксипропилцеллюлозу), другие водорастворимые эфиры целлюлозы, поливинилпирролидон (ПВП), также известный как повидон, полиэтиленгликоль, сорбит, мальтит, ксилит и двухосновный фосфат кальция; другие подходящие фармакологически приемлемые связующие вещества или смеси данных веществ.

Антиадгезивы применяют для уменьшения адгезии между порошком (гранулами) и поверхностями пресса и, таким образом, предотвращения прилипания к прессам для таблеток. Их также применяют, чтобы помочь защитить таблетки от слипания. Наиболее часто применяемый антиадгезив представляет собой стеарат магния.

В качестве разрыхлителей и суперразрыхлителей в твердых лекарственных формах, таких как таблетки и капсулы, используют без ограничения следующие вещества: поливинилпирролидон с перекрестными связями, крахмал гликолят натрия, карбоксиметилцеллюлозу натрия, карбоксиметилцеллюлозу кальция и формальдегид-казеин, другой подходящий фармакологически приемлемый разрыхлитель и суперразрыхлитель или их смеси.

Покрытия в случае твердых лекарственных форм, таких как таблетки и гранулы для наполнения капсул, защищают ингредиенты от порчи под воздействием влаги в воздухе, позволяют легче проглотить большие таблетки с неприятным вкусом и/или, в случае энтеросолюбильных покрытий, обеспечивают интактное прохождение через сильно кислую среду желудочного сока (рН приблизительно 1) и позволяют высвобождение в двенадцатиперстной кишке или подвздошной кишке (тонком кишечнике). Для большинства покрытых оболочкой таблеток применяют пленочное покрытие эфиром целлюлозы - гидроксипропилметилцеллюлозой (ГПМЦ). Иногда используют другие материалы покрытий, например синтетические полимеры и сополимеры, такие как поливинилацетатфталат (ПВАФ); сополимеры метилакрилата/метакриловой кислоты; сополимеры метилметакрилата/метакриловой кислоты; шеллак, кукурузный белок зеин или другие полисахариды; воски или подобные воскам вещества, такие как пчелиный воск, стеариновая кислота; высшие жирные спирты, такие как цетиловый или стеариловый спирт; твердый парафин; глицеринмоностеарат; глицериндистеарат или их комбинации. Капсулы покрывают желатином или гидроксипропилметилцеллюлозой.

Энтеросолюбильные покрытия контролируют скорость высвобождения лекарственного средства и определяют, в каком отделе пищеварительного тракта будет высвобождено лекарственное средство. Материалы, используемые для получения энтеросолюбильных покрытий, включают жирные кислоты, воски, шеллак, пластики, растительные волокна и их смеси, также в комбинации с другими упомянутыми выше покрытиями.

Предотвращающий слеживаемость агент представляет собой вспомогательное вещество, которое добавляют в порошоканные или гранулированные материалы для предотвращения образования комков (слеживаемости) и для упрощения упаковки, транспортировки и потребления. В качестве предотвращающих слеживаемость агентов в твердых лекарственных формах, таких как таблетки, капсулы или порошки, применяют следующие агенты: стеарат магния, коллоидный диоксид кремния, тальк, другие фармакологически приемлемые предотвращающие слеживаемость агенты или их смеси.

Лубриканты применяют в твердых лекарственных формах, в частности в таблетках и капсулах, для предотвращения агрегации ингредиентов друг с другом и предотвращения прилипания к прессам для таблеток или заполняющим капсулы устройствам, а также в твердых капсулах. В качестве лубрикантов в таблетках или твердых желатиновых капсулах наиболее часто применяют такие лубриканты, как тальк или кремний, и жиры, например растительный стеарин, стеарат магния или стеариновую кислоту, и их смеси.

Подсластители добавляют, чтобы улучшить вкус ингредиентов, особенно в твердых лекарственных формах, например жевательных таблетках, а также в жидких лекарственных формах, таких как сироп от кашля. Подсластители можно выбрать из искусственных, природных или синтетических или полусинтетических подсластителей; неограничивающие примеры подсластителей представляют собой аспартам, ацесульфам калия, цикламат, сукралозу, сахарин, сахара или любые их смеси.

Вкусоароматические добавки можно применять для маскировки активных ингредиентов с неприятным вкусом в любой лекарственной форме. Вкусоароматические вещества могут быть природными (например, экстракт фруктов) или искусственными. Например, для улучшения вкуса

- (1) горького продукта: можно применять мяту, вишню или анис;
- (2) соленого продукта: можно применять персик или абрикос или корень солодки;
- (3) кислого продукта: малину; и
- (4) очень сладкого продукта: ваниль.

За исключением вспомогательных веществ из класса эксципиентов состав согласно настоящему изобретению может содержать другие фармакологически активные или питательные вещества, включая, но не ограничиваясь перечисленными, витамины, такие как витамин D (кальциферол) в фармацевтически приемлемой химической форме, в форме соли или производного; минералы в виде фармацевтически и питательно приемлемой химической формы; и L-аминокислоты. Получение составов согласно настоящему изобретению находится в рамках компетенции среднего специалиста в данной области и будет зависеть от конечной лекарственной формы. Например, без ограничения, когда конечная лекарственная форма представляет собой твердую форму для перорального применения, такую как таблетки, капсулы, порошок, гранулы, суспензия для перорального применения и т.д. процесс получения твердых лекарственных форм состава включает гомогенизацию (1) активного(ых) ингредиента(ов), включая по меньшей мере одну или более пробиотических бактерий после обработки согласно настоящему изобретению в эффективном количестве; с (2) одним или более вспомогательными веществами с получением гомогенной смеси, в которую, например, в соответствии с требованиями добавляют смазывающие вещества, такие как стеарат магния или другие лубриканты, с получением конечной лекарственной формы порошка. Таким гомогенным порошком наполняют обычные желатиновые капсулы или в качестве альтернативы устойчивые к действию желудочного сока капсулы. В случае таблеток их производят путем непосредственного прессования или гранулирования. В первом случае получают гомогенную смесь активных ингредиентов и подходящих вспомогательных веществ, таких как безводная лактоза, некристаллизующийся сорбит и другие вспомогательные вещества. Во втором случае таблетки получают путем обработки смеси в гранулированной форме. Гранулы получают с помощью процесса гранулирования активных ингредиентов состава с подходящими наполнителями, связующими веществами, разрыхлителями и небольшим количеством очищенной воды. Полученные таким образом гранулы просеивают и сушат до достижения содержания воды <1% по массе.

Касательно процесса получения жидких лекарственных форм (например, суспензии для перорального применения), он включает гомогенизацию активного(ых) ингредиента(ов) состава, включая по меньшей мере одну или более пробиотических бактерий после обработки согласно настоящему изобретению в эффективном количестве в инертном жидком разбавителе (наполнителе), таком как различные растительные масла, такие как подсолнечное, соевое или оливковое масло; олеиновая кислота; олеиловый спирт; жидкие полиэтиленгликоли, такие ПЭГ 200, ПЭГ 400 или ПЭГ 600; или другие инертные фармакологически приемлемые жидкости. Данный процесс дополнительно включает обработку гомогенной смеси с помощью одного или более процессов, выбранных из группы, включающей

- (1) стабилизацию состава путем добавления стабилизаторов суспензии, таких как пчелиный воск, коллоидный диоксид кремния и т.д. и гомогенизации;
- (2) подслащивание состава путем добавления подсластителя и гомогенизации;
- (3) ароматизирование состава путем добавления ароматизирующего вещества и гомогенизации.

Такие формы состава могут содержать также другие вспомогательные вещества или ингредиенты, обычно используемые в данной области.

Указанный фармацевтический продукт может иметь различные формы или наименования в зависимости от пути одобрения продукта, а также в зависимости от страны. Например, лекарственное средство представляет собой конкретный фармацевтический продукт. Продукт лечебного питания представляет собой другой конкретный фармацевтический продукт. Термины "продукт лечебного питания" или "продукт для специальных медицинских целей" применяют в некоторых странах по отношению к продукту специального состава, предназначенному для диетотерапии заболевания, при котором есть особые потребности в питании, которые не могут быть удовлетворены только обычной диетой. Они определены в нормативных документах, таких как нормативный документ Управления по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств Поправки к Закону об орфанных лекарственных препаратах в Соединенных Штатах, 1988 г., и Директива комиссии ЕС 1999/21/ЕС в Европе. Продукты лечебного питания отличаются от более широкой категории биологически активных пищевых добавок и от обычных продуктов, которые известны как полезные для здоровья. Таким образом, в конкретном варианте реализации штаммы согласно настоящему изобретению входят в состав продукта лечебного питания.

Часто штаммы *Rediosoccus* и композиции, такие как описанная в данной заявке, считают биологически активными пищевыми добавками. Биологически активную пищевую добавку, также известную как диетическая добавка или питательная добавка, считают другим конкретным фармацевтическим продуктом. Он представляет собой препарат или продукт, предназначенный для дополнения диеты, полученный из компонентов, обычно используемых в продуктах питания, которые обеспечивают питательными веществами или полезными ингредиентами, которые обычно не потребляются с нормальной диетой или не могут потребляться в достаточных количествах. По большей части биологически активные пищевые добавки считают продуктами питания, но иногда их определяют как лекарственные средства, природные

продукты для здоровья или нутрицевтические продукты. С точки зрения настоящего изобретения, биологически активные пищевые добавки также включают нутрицевтики. Биологически активные пищевые добавки обычно продают "безрецептурно", т.е. без назначения. Если биологически активная пищевая добавка принимает форму пилюли, капсулы, таблетки или порошка, то она содержит такие же вспомогательные вещества, которые используют в лекарственных средствах. Биологически активная пищевая добавка тем не менее также может принимать форму продукта питания, который обогащен некоторыми питательными веществами (например, батончик или йогурт). Таким образом, в конкретном варианте реализации содержащий штаммы согласно настоящему изобретению состав принимает форму биологически активной пищевой добавки. Биологически активную пищевую добавку можно вводить как есть, можно смешать с подходящими пригодными для питья жидкостями, такими как вода, йогурт, молоко или фруктовый сок, или можно смешать с твердой или жидкой пищей. В данном контексте биологически активная пищевая добавка может находиться в форме таблеток или пастилок, пилюль, капсул, гранул, порошков, суспензий, саше, сладостей, батончиков, сиропов и соответствующих формах для введения, обычно в виде разовой дозы.

Штаммы согласно настоящему изобретению можно также включить в различные продукты питания, такие как молочные продукты (йогурт, сыр, ферментированное молоко, молочный порошок, ферментированный продукт на молочной основе, мороженое, ферментированный продукт на злаковой основе, порошок на молочной основе), хлеб, батончики, спрэды, печенье и каши, напиток, различные типы масел или заправка. Термин "пищевой продукт" в данной заявке используют в наиболее широком значении, включая любой тип продукта, в любой форме представления, который может принять внутрь животное, но исключая фармацевтические и ветеринарные продукты. Примерами других продуктов питания являются мясные продукты, шоколадные пасты, наполнители и глазури, шоколад, кондитерское изделие, выпечка, соусы и супы, фруктовые соки и забеливатели для кофе. Особенно интересующие продукты питания представляют собой биологически активные пищевые добавки и детские смеси. Пищевой продукт предпочтительно содержит материал-носитель, такой как овсяная каша, молочнокислые ферментированные пищевые продукты, резистентный крахмал, пищевые волокна, углеводы, белки и гликозилированные белки. В конкретном варианте реализации штаммы согласно настоящему изобретению инкапсулируют или покрывают оболочкой.

В другом аспекте настоящего изобретения предложена твердая композиция, содержащая криопротектор; лиофилизированную биомассу, содержащую по меньшей мере одну молочнокислую бактерию согласно настоящему изобретению; и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтически приемлемый носитель предпочтительно выбирают из эмульсии, геля, пасты, гранул, порошка и камеди. В дополнительных аспектах настоящего изобретения предложен продукт для гигиены полости рта, фармацевтическая композиция, съедобный продукт, диетическая добавка и косметическая композиция, содержащие эффективное количество композиции, указанное в приведенном выше аспекте. В конкретном варианте реализации продукт для гигиены полости рта представляет собой жевательную резинку, зубную пасту, аэрозоль для полости рта, пастилку или диспергируемую в полости рта таблетку. В конкретном варианте реализации фармацевтическая композиция, съедобный продукт или диетическая добавка представляет собой пастилку или диспергируемую в полости рта таблетку.

Применения в медицине и способы применения.

В одном аспекте настоящего изобретения предложены штаммы *Pediococcus* и композиции согласно настоящему изобретению для применения в качестве лекарственных средств. Данный первый аспект в качестве альтернативы можно сформулировать как способ лечения пробиотиком, включающий введение при необходимости эффективного количества композиции, содержащей по меньшей мере один выделенный штамм молочнокислых бактерий, описанных в первом аспекте настоящего изобретения. Термин "пробиотик" в данной заявке относится к живым микроорганизмам, которые при введении в достаточных количествах проносят пользу здоровью хозяина.

В частности, оказывая несколько полезных действий в организме человека-хозяина, штаммы согласно настоящему изобретению полезны для лечения заболеваний или состояний, связанных с дисбиозом или вызванных патогенами. Дисбиоз (также называемый дисбактериозом) в данной заявке представляет собой термин для микробного дисбаланса или плохой приспособляемости на поверхности или внутри организма, такого как нарушение микробиоты. Например, часть микробиоты человека, такая как флора кожи, флора кишечника, флора влагалища, флора полости рта, может нарушиться таким образом, что наблюдается недостаток симбиотических доминирующих видов, и количество обычно вытесненных или сдерживаемых видов возрастает, чтобы заполнить пустое место. Утрата полезных микробов, размножение патобионтов и утрата разнообразия представляют собой события, которые включает дисбиоз. Дисбиоз может быть вызван такими разнообразными обстоятельствами, как повторное и нецелесообразное воздействие антибиотиками или антисептиками. Таким образом, в одном аспекте настоящего изобретения предложены штаммы согласно настоящему изобретению, полезные в комбинации с антисептиками, для применения для предотвращения и/или лечения дисбиоза или состояний, связанных с дисбиозом.

В другом аспекте предложены композиции согласно настоящему изобретению для применения для предотвращения и/или лечения дисбиоза или состояний, связанных с дисбиозом.

Штаммы согласно настоящему изобретению особенно полезны для стоматологической гигиены. Таким образом, в одном аспекте настоящего изобретения предложены композиции и штаммы согласно настоящему изобретению для применения в комбинации с антисептиками для применения для предотвращения и/или лечения заболевания полости рта животного, включая человека. В качестве альтернативы, данный аспект можно сформулировать как применение штаммов или композиций согласно настоящему изобретению для производства лекарственного средства для предотвращения и/или лечения заболевания полости рта животного, включая человека. Также в качестве альтернативы согласно настоящему изобретению также предложен способ предотвращения и/или лечения заболевания полости рта животного, включая человека, включающий введение указанному животному, нуждающемуся в этом, штаммов или композиций, описанных в настоящем изобретении.

В частности, заболевание полости рта вызвано патогенами полости рта. Наглядные неограничивающие примеры "заболевания полости рта, которое вызвано патогеном в полости рта" представляют собой связанные с зубным налетом заболевания, кариес, гингивит, пародонтит, кандидоз, герпес и язвы, а также галитоз, окрашенные зубы, чувствительные зубы, периимплантные заболевания, среди прочих.

В одном варианте реализации штаммы *Pediosoccus* и композиции с ними применяют для лечения и/или предотвращения заболеваний пародонта, включая, но не ограничиваясь перечисленными, гингивит, пародонтит и периимплантные заболевания. В частности, заболевание пародонта представляет собой гингивит или пародонтит.

В дополнительном варианте реализации штаммы *Pediosoccus* и композиции с ними применяют для лечения и/или предотвращения кандидоза.

Терапия пародонта обычно включает сначала механическое удаление поддесневого зубного налета путем соскабливания или с помощью ультразвука; под действием такого механического удаления, бактерии в биопленке высвобождаются и вымываются. В ходе данного лечения на сегодняшний день применяют композиции антисептика, которые разработаны таким образом, чтобы предотвратить повторную колонизацию грамотрицательными бактериями. Недостаток регулярного и широкого применения композиций, содержащих антисептики, тем не менее состоит в побочных действиях данных продуктов и опасном влиянии на симбиотическую микробиоту.

В другом варианте реализации штаммы и композиции согласно настоящему изобретению полезны для лечения поражений кожи. Примеры поражений кожи включают, но не ограничены перечисленными, грибковые инфекции ногтей; поверхностные поражения кожи (например, рожистое воспаление, инфекции открытых ран, акне, абсцесс, нарыв, экзема, дерматит, контактный дерматит, гиперчувствительность, контактные поражения, пролежни и диабетические поражения).

Способы скрининга.

В одном аспекте настоящего изобретения предложен способ скрининга и выделения штаммов молочнокислых бактерий, включающий следующие этапы:

- i) анализ способности переносить антисептики отдельных молочнокислых бактерий из пула кандидатных штаммов молочнокислых бактерий; и
- ii) селекцию и выделение штаммов молочнокислых бактерий, обладающих лучшей способностью переносить антисептики, чем таковая у *Porphomonas gingivalis*.

В одном варианте реализации способность переносить антисептики выражали в виде гало ингибирования, определенного с помощью диско-диффузионного способа анализа.

В одном конкретном варианте реализации способность переносить антисептики включает следующие этапы:

- i) равномерное нанесение суспензии молочнокислых бактерий в фосфатно-солевом буферном растворе при 0,1 М с оптической плотностью, эквивалентной стандарту № 3 по МакФарланду, на питательную среду в чашке с получением конфлюэнтного слоя;
- ii) помещение целлюлозного диска диаметром 6 мм в контакт с питательной средой;
- iii) добавление антисептика на целлюлозный диск в концентрации, которая ингибирует рост *Porphomonas gingivalis*;
- iv) инкубацию в течение ночи при 37°C при анаэробных или микроаэрофильных условиях;
- v) измерение в миллиметрах зон ингибирования через 24 или 48 ч путем размещения чашки на плоской линейке;
- vi) выражение результатов в виде гало ингибирования.

Специалист в данной области сможет обычным способом выбрать питательную среду для этапов i)-ii) в соответствии с потребностями в питательных веществах штамма молочных бактерий, который необходимо исследовать.

В одном варианте реализации способ скрининга и выделения молочнокислых бактерий применяют для скрининга и выделения штамма молочнокислых бактерий для личной гигиены. В конкретном варианте реализации указанный способ предназначен для скрининга и выделения молочнокислых бактерий для гигиены полости рта.

В одном варианте реализации пул кандидатных штаммов молочнокислых бактерий, которые используют для анализа способности переносить антисептики, включает штаммы молочнокислых бактерий

рода *Lactobacillus* или *Pediococcus*. В частности, кандидатные штаммы представляют собой штаммы *Pediococcus*, в частности штаммы *Pediococcus acidilactici*.

Краткое описание фигур

Фиг. 1. Способность бактерий переносить триклозан, выраженная в виде гало ингибирования (ГИнг) в миллиметрах (мм), определенного с помощью диско-диффузионного способа анализа. *Lactobacillus brevis* CD2 (L.b. CD2); *Pediococcus acidilactici* AB134 (P.a. AB134); *Pediococcus acidilactici* СЕСТ 8633 (P.a. СЕСТ 8633); *Pediococcus pentosaceus* СЕСТ 8330 (P.p. СЕСТ8330); *Streptococcus oralis*; *Streptococcus salivarius* K12 (S.s. K12); и *Porphyromonas gingivalis*.

Фиг. 2. Способность бактерий переносить тимол, выраженная в виде гало ингибирования (ГИнг) в миллиметрах (мм), определенного с помощью диско-диффузионного способа анализа. *Lactobacillus brevis* CD2 (L.b. CD2); *Pediococcus acidilactici* AB134 (P.a. AB134); *Pediococcus acidilactici* СЕСТ 8633 (P.a. СЕСТ 8633); *Pediococcus pentosaceus* СЕСТ 8330 (P.p. СЕСТ8330); *Streptococcus oralis*; *Streptococcus salivarius* K12 (S.s. K12); и *Porphyromonas gingivalis*.

Фиг. 3. Способность бактерий переносить Листерин Ориджинал® (*Listerine Original*®), выраженная в виде гало ингибирования (ГИнг) в миллиметрах (мм), определенного с помощью диско-диффузионного способа анализа. *Lactobacillus brevis* CD2 (L.b. CD2); *Pediococcus acidilactici* AB134 (P.a. AB134); *Pediococcus acidilactici* СЕСТ 8633 (P.a. СЕСТ 8633); *Pediococcus pentosaceus* СЕСТ 8330 (P.p. СЕСТ8330); *Streptococcus oralis*; *Streptococcus salivarius* K12 (S.s. K12); и *Porphyromonas gingivalis*.

Фиг. 4. Способность бактерий переносить Листерин Зеро® (*Listerine Zero*®), выраженная в виде гало ингибирования (ГИнг) в миллиметрах (мм), определенного с помощью диско-диффузионного способа анализа. *Lactobacillus brevis* CD2 (L.b. CD2); *Pediococcus acidilactici* AB134 (P.a. AB134); *Pediococcus acidilactici* СЕСТ 8633 (P.a. СЕСТ 8633); *Pediococcus pentosaceus* СЕСТ 8330 (P.p. СЕСТ8330); *Streptococcus oralis*; *Streptococcus salivarius* K12 (S.s. K12); и *Porphyromonas gingivalis*.

Фиг. 5. Способность бактерий переносить хлоргексидин, выраженная в виде гало ингибирования (ГИнг) в миллиметрах (мм), определенного с помощью диско-диффузионного способа анализа. *Lactobacillus brevis* CD2 (L.b. CD2); *Pediococcus acidilactici* AB134 (P.a. AB134); *Pediococcus acidilactici* СЕСТ 8633 (P.a. СЕСТ 8633); *Pediococcus pentosaceus* СЕСТ 8330 (P.p. СЕСТ8330); *Streptococcus oralis*; *Streptococcus salivarius* K12 (S.s. K12); и *Porphyromonas gingivalis*.

Фиг. 6. Способность бактерий переносить глюконат хлоргексидина, выраженная в виде гало ингибирования (ГИнг) в миллиметрах (мм), определенного с помощью диско-диффузионного способа анализа. *Lactobacillus brevis* CD2 (L.b. CD2); *Pediococcus acidilactici* AB134 (P.a. AB134); *Pediococcus acidilactici* СЕСТ 8633 (P.a. СЕСТ 8633); *Pediococcus pentosaceus* СЕСТ 8330 (P.p. СЕСТ8330); *Streptococcus oralis*; *Streptococcus salivarius* K12 (S.s. K12); и *Porphyromonas gingivalis*.

Фиг. 7. Гало ингибирования, наблюдаемые для *Pediococcus acidilactici* СЕСТ8633, *Streptococcus salivarius* K12 (S.S.) и *Porphyromonas gingivalis* (P.g.) вокруг 6-мм целлюлозных дисков, пропитанных 20 мкл 0,12% (в объемном отношении) глюконата хлоргексидина.

Фиг. 8. Кинетика роста *Streptococcus salivarius* K12 в отсутствие (контроль) или в присутствии различных концентраций Листерина Зеро® (К - контроль без антисептика; 1:1 - не разбавленный; 1:2 - 2-кратное разведение; 1:4 - 4-кратное разведение; 1:8 - 8-кратное разведение). Ось x=время (t) в часах (ч).

Фиг. 9. Кинетика роста *Streptococcus oralis* в отсутствие (контроль) или в присутствии различных концентраций Листерина Зеро® (К - контроль без антисептика; 1:1 - не разбавленный; 1:2 - 2-кратное разведение; 1:4 - 4-кратное разведение; 1:8 - 8-кратное разведение). Ось x=время (t) в часах (ч).

Фиг. 10. Кинетика роста *Lactobacillus brevis* CD2 в отсутствие (контроль) или в присутствии различных концентраций Листерина Зеро® (К - контроль без антисептика; 1:1 - не разбавленный; 1:2 - 2-кратное разведение; 1:4 - 4-кратное разведение; 1:8 - 8-кратное разведение). Ось x=время (t) в часах (ч).

Фиг. 11. Кинетика роста *Pediococcus pentosaceus* СЕСТ8330 в отсутствие (контроль) или в присутствии различных концентраций Листерина Зеро® (К - контроль без антисептика; 1:1 - не разбавленный; 1:2 - 2-кратное разведение; 1:4 - 4-кратное разведение; 1:8 - 8-кратное разведение). Ось x=время (t) в часах (ч).

Фиг. 12. Кинетика роста *Pediococcus acidilactici* AB134 в отсутствие (контроль) или в присутствии различных концентраций Листерина Зеро® (К - контроль без антисептика; 1:1 - не разбавленный; 1:2 - 2-кратное разведение; 1:4 - 4-кратное разведение; 1:8 - 8-кратное разведение). Ось x=время (t) в часах (ч).

Фиг. 13. Кинетика роста *Pediococcus acidilactici* СЕСТ8633 в отсутствие (контроль) или в присутствии различных концентраций Листерина Зеро® (К - контроль без антисептика; 1:1 - не разбавленный; 1:2 - 2-кратное разведение; 1:4 - 4-кратное разведение; 1:8 - 8-кратное разведение). Ось x=время (t) в часах (ч).

Фиг. 14. Доля выживаемости (Д. в.) штаммов молочнокислых бактерий, выраженная в виде процента (мм), определенная с помощью анализа в жидкой среде. *Lactobacillus brevis* CD2 (L.b.CD2); *Pediococcus*

cus acidilactici AB134 (P.a. AB134); *Pediococcus acidilactici* CECT 8630 (P.a. CECT 8630); *Pediococcus pentosaceus* CECT 8330 (P.p. CECT 8330); *Streptococcus oralis*; *Streptococcus salivarius* K12 (S.s. K12).

Фиг. 15. Антагонистическая активность *Streptococcus salivarius* K12, *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 и *Pediococcus acidilactici* CECT8633, выраженная в виде ингибирования роста (ИР) в миллиметрах, против патогенов полости рта *Fusobacterium nucleatum*, *Treponema denticola* и *Prevotella denticola*.

Фиг. 16. Уменьшение количества зубных поверхностей, для которых наблюдали наихудший балл десневого индекса (ДИ=3) по сравнению с началом исследования. Черный столбик обозначает группу субъектов после стандартной процедуры гигиены полости рта (группа плацебо); белый столбик обозначает группу субъектов после стандартной процедуры гигиены полости рта плюс пробиотик (группа пробиотика). Ось у=количество зубных поверхностей с десневым индексом, равным 3 (Кол-во з. поверх, с ДИ=3).

Фиг. 17. Изменение концентрации патогенов *Tannerella forsythia* и *Porphyromonas gingivalis* (А конц.=концентрация по окончании исследования - концентрация в начале исследования, выраженная в виде логарифма). Черные столбики обозначают группу субъектов после стандартной процедуры гигиены полости рта (группа плацебо); белые столбики обозначают группу субъектов после стандартной процедуры гигиены полости рта плюс пробиотик (группа пробиотика).

Примеры

Пример 1. Выделение и идентификация *Pediococcus acidilactici* CECT8633.

Кандидатных молочнокислых бактерий выделяли из свежего кала 0-9-летних детей. Образцы растворяли в буфере ФБР (рН 7,4), разделяли на аликвоты и высевали на среду MRS, дополненную различными комбинациями антибиотиков. Штаммы культивировали при микроаэрофильных условиях (5% CO₂) при 37 или 30°C. Время инкубации зависело от скорости роста, но обычно продолжалось от 24 ч до 3 дней. Выделение отдельных штаммов осуществляли в той же среде для селекции, а затем проводили окрашивание по Граму, чтобы получить первичную идентификацию. После того как выделенные штаммы выросли, их сохраняли путем лиофилизации в ФБР 0,1 × с 15% сухим обезжиренным молоком.

Идентификацию на уровне вида проводили путем секвенирования гена 16S рРНК. Бактерии растили в течение ночи на среде MRS (рН 6,4) при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂. Бактерии затем собирали, промывали, ресуспендировали в буфере для предварительного лизиса (480 мкл ЭДТА, 50 мМ, рН 8,0; 120 мкл лизоцима, 10 мг/мл) и дополнительно инкубировали при 37°C в течение 60 мин. ДНК выделяли, применяя набор для очистки геномной ДНК Wizard (Promega). После центрифугирования предварительно обработанных бактерий при 14000 g в течение 2 мин для удаления супернатанта, следовали протоколу Promega. Вкратце бактерии ресуспендировали в растворе для лизирования ядер и инкубировали при 80°C в течение 5 мин, затем охлаждали до комнатной температуры. Лизаты клеток инкубировали в растворе РНКазы при 37°C в течение 60 мин, и преципитировали белки путем добавления раствора для преципитации белков и встряхивания при высокой скорости. Образцы охлаждали и центрифугировали при 15000 g в течение 3 мин. Супернатанты, содержащие ДНК, переносили в чистые 1,5 мл микроцентрифужные пробирки и смешивали с 600 мкл изопропанола путем переворачивания. ДНК собирали путем центрифугирования при 15000 g в течение 2 мин и аккуратно сливали супернатант. Образцы ДНК промывали 600 мкл 70% этанола путем аккуратного переворачивания пробирки несколько раз. Этанол удаляли путем аспирации после центрифугирования при 15000 g в течение 2 мин. Наконец, осадок ДНК ресуспендировали в 100 мкл регидратационного раствора путем инкубации при 65°C в течение 1 ч. Образцы хранили при 2-8°C.

рРНК 16S амплифицировали с помощью ПЦР, применяя универсальные праймеры для зубобактерий Eub27f и Eub1492r. Затем ДНК, полученную как объяснено выше, промывали, применяя набор Quiaquick (Quiagene). Проводили четыре последовательных реакции секвенирования для каждого образца в генетическом анализаторе 3130 (Applied Biosystems), используя набор BigDye версии 3.1, применяя праймеры 27F, 357F, 907R и 1492R. Сбор данных проводили и строили хроматограммы, используя программное обеспечение для анализа последовательности ДНК Sequencing Analysis версии 5.2 (Applied Biosystems), и проверяли путем визуального анализа с помощью Chromas (Technelysium Pty Ltd.) и BioEdit (Ibis Biosciences).

Идентификацию рода осуществляли, применяя инструмент Ribosomal Database Project и идентификацию вида осуществляли путем сравнения полученной последовательности с последовательностями 16S известных организмов как из базы данных RefSeq (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>) посредством BLASTN, так и из базы данных Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/>).

Штамм CECT8633 идентифицировали как *Pediococcus acidilactici* и депонировали 26.05.2014 в Испанской коллекции типовых культур (Universitat de Valencia, Campus de Burjassot, Edif. de Investigacion, 46100 Burjassot, Валенсия, Испания). Депонированный штамм жизнеспособен и сохраняет все свои свойства, относящиеся к депозиту.

Последовательность рРНК 16S, полученная для штамма CECT8633, соответствует последовательности SEQ ID NO: 1.

Пример 2. Способность штаммов молочнокислых бактерий переносить антисептики (диффузионный способ анализа).

Штаммы МКБ с предполагаемыми пробиотическими свойствами, а именно *L. brevis*, *P. acidilactici*, *P. pentosaceus*, *S. oralis* и *S. Salivarius*, высевали на чашки с агаром с подходящими питательными средами и инкубировали, чтобы получить изолированные колонии. *Porphyromonas gingivalis* DSM20709 использовали как пример патогенов, связанных с патологиями пародонта. Используемые для каждого штамма питательные среды и атмосферные условия были наиболее подходящими для их правильного роста и показаны в табл. 1.

Таблица 1
Питательные среды и условия роста для анализируемых бактерий

Штамм	Среда	T°	Время (ч)	Атмосфера
<i>L. brevis</i> CD2	MRS	37°C	24 ч	5% CO ₂
<i>P. acidilactici</i> CECT8633	MRS	37°C	24 ч	5% CO ₂
<i>P. acidilactici</i> AB134	MRS	37°C	24 ч	5% CO ₂
<i>P. pentosaceus</i> CECT8330	MRS	37°C	24 ч	5% CO ₂
<i>S. oralis</i>	BHI	37°C	24 ч	5% CO ₂
<i>S. salivarius</i> K12	BHI	37°C	24 ч	5% CO ₂
<i>P. gingivalis</i>	Агар с кровью овец	37°C	48 ч	Анаэробноз

Для каждого микроорганизма использовали изолированные колонии для получения суспензии в фосфатно-солевом буферном растворе 0,1 М (ФБР) с оптической плотностью, эквивалентной стандарту № 3 по МакФарланду. Суспензию использовали для получения конфлюэнтного слоя микроорганизма на соответствующей питательной среде (табл. 1) путем равномерного посева микроорганизма с применением стерильного шпателя.

Незамедлительно после затравки чашек штаммами, помещали в них 6 мм целлюлозные диски. Диски были пропитаны различными обычными антисептиками согласно табл. 2.

Таблица 2
Антисептики, применяемые для исследования способности молочнокислых бактерий переносить их

Антисептик для ополаскивателя для полости рта	Растворитель	Объем	Концентрация (% в объемном отношении или мг/мл)		
Хлоргексидин	Диметилформамид	5 мкл	0,12 %	0,06%	0,03%
Хлоргексидина глюконат	ФБР	20 мкл	0,12 %	0,06%	0,03%
Триклозан	EtOH	5 мкл	0,2 %	0,1%	0,05%
Листерин Zero®	ФБР	20 мкл	---	Разб. 1:2	Разб. 1:4
Листерин Ориджинал®	ФБР	20 мкл	---	Разб. 1:2	Разб. 1:4
Тимол	EtOH	5 мкл	1,2 мг/мл	0,6 мг/мл	0,3 мг/мл

Используемый объем был максимальным, который допускал диск без распространения на среду. Подтверждали, что растворитель не оказывал ингибиторного действия против бактерий в используемом количестве. Микроорганизмам позволяли расти в соответствии с условиями, указанными в табл. 1, и гало ингибирования (в миллиметрах) измеряли через 24 или 48 ч согласно соответствующим оптимальным условиям роста микроорганизмов. Результаты получали в трех повторях.

На фиг. 1 представлено ингибирование, наблюдаемое для каждого микроорганизма в присутствии триклозана в различных концентрациях. Штаммы патогена *P. gingivalis*, а также *Streptococcus* sp. ингибировались триклозаном. Тем не менее ни *Lactobacillus brevis*, ни штаммы, относящиеся к роду *Pediosoccus*, не ингибировались. Аналогично тимол ингибировал рост *P. gingivalis* и штаммов вида *Streptococcus* в наиболее высокой исследованной концентрации 1,2 мг/мл, но не ингибировал рост *Lactobacillus brevis* или штаммов *Pediosoccus* (фиг. 2). Такой же эффект наблюдали, когда диски были пропитаны 20 микролитрами не разбавленного Листерина Ориджинал® (со спиртом) (фиг. 3). *P. gingivalis* и штаммы *Streptococcus* также ингибировались Листерином Zero® и соответствующим 2-кратным его разведением (фиг. 4). Способность *L. brevis* переносить присутствие Листерина Zero® была выше, чем таковая у *P. gingivalis* и *Streptococcus*, так как не наблюдали ингибирования в присутствии 4- и 2-кратного разведений Листерина Zero®. Тем не менее в противоположность триклозану, тимолу и Листерину Ориджинал®, присутствие неразбавленного Листерина Zero® оказывало ингибиторное действие на *L. brevis*. Ни один из штаммов *Pediosoccus* не ингибировался присутствием Листерина Zero®, также как и наблюдали

для Листерина Ориджинал®.

На фиг. 5 и 6 показано, что хлоргексидин и глюконат хлоргексидина оказались антисептиками для ополаскивания полости рта, проявившими наиболее сильное противомикробное действие, так как все штаммы ингибировались наиболее высокой исследованной концентрацией (0,12 %, в объемном отношении). Аналогично другим ингредиентам ополаскивателя для полости рта, *P. gingivalis* и виды *Streptococcus* представляли собой штаммы, проявившие наиболее высокую чувствительность к хлоргексидину, так как они ингибировались любой из исследованных концентраций. *L. brevis* ингибировался концентрациями 0,12 и 0,06%, но не 0,03%, следовательно, проявил более высокую способность переносить хлоргексидин, чем *P. gingivalis* и виды *Streptococcus*. Штаммы видов *Pediosoccus* оказались МКБ, проявившими наибольшую устойчивость к хлоргексидину. Гало ингибирования, наблюдаемые вокруг дисков, пропитанных с хлоргексидином, составляли 4, 3 и 2 мм для *Pediosoccus pentosaceus* СЕСТ8330, *P. acidilactici* СЕСТ8633 и *P. acidilactici* АВ134 соответственно, при этом гало ингибирования *P. gingivalis* составляло 9 мм. Следовательно, штаммы *Pediosoccus acidilactici* были особенно устойчивыми к хлоргексидину. Аналогичным образом, штаммы *Pediosoccus* оказались штаммами, проявившими наиболее высокую устойчивость к глюконату хлоргексидина. На фиг. 7. явно проиллюстрировано меньшее гало ингибирования, наблюдаемое для *P. acidilactici* СЕСТ8633, по сравнению с *S. salivarius* К12 и *P. gingivalis* в присутствии 0,12% глюконата хлоргексидина.

В заключение, было показано, что ингибиторное действие антисептиков было выше для патогена *P. gingivalis*, а также для пробиотиков из видов рода *Streptococcus*, за которыми следовали виды *Lactobacillus*. Пробиотики из видов рода *Pediosoccus* были особенно устойчивыми к антисептикам и особенно пробиотики, относящиеся к видам *Pediosoccus acidilactici*.

Пример 3. Способность штаммов молочнокислых бактерий переносить антисептики (анализ в жидкой среде).

Для того чтобы установить, влияет ли на кинетику роста ЛАС присутствие ополаскивателей для полости рта, исследовали ингибиторное действие Листерина Зеро® в жидких средах. Ночные культуры пробиотических бактерий получали, как описано в примере 2. Выделенные колонии использовали для получения бактериальной суспензии в стерильном 0,1 М ФБР до достижения оптической плотности, соответствующей стандарту по МакФарланду, равному 0,5 (приблизительно 1,5E+08 КОЕ/мл). Затем готовили 100-кратные разведения с получением концентрации, приблизительно равной 1,5E+06 КОЕ/мл. Листерин Зеро® фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,22 микрометра и готовили 4 последовательных 2-кратных разведения.

Жидкие ростовые среды (140 мкл), подходящие для надлежащего роста каждого микроорганизма согласно табл. 1 (пример 2), наносили пипеткой в 96-луночные микропланшеты. Затем добавляли 40 мкл разведения ополаскивателя для полости рта, а затем 20 мкл бактериальной суспензии, содержащей 1E+06 КОЕ/мл. Также получали пустые контроли без пробиотика и положительные контроли без ингредиентов (кроме ФБР). Бактериальный рост оценивали путем определения оптической плотности (ОП) на 550 нм для лунок, содержащих пробиотик, через 24 и 48 ч и вычитания полученной ОП для лунок, содержащих такую же концентрацию ополаскивателя для полости рта, но без пробиотика. Долю выживаемости рассчитывали через 48 ч по следующей формуле:

$$\text{Доля выживаемости (\%)} = \frac{(\text{ОП}_п - \text{ОП}_б) - (\text{ОП}_о - \text{ОП}_об)}{\text{ОП}_п - \text{ОП}_б} * 100$$

где ОП_п представляет собой оптическую плотность лунки, инокулированной пробиотиком, но не содержащей ополаскиватель для полости рта (положительный контроль),

ОП_б представляет собой оптическую плотность лунки без пробиотика и без ополаскивателя для полости рта,

ОП_о представляет собой оптическую плотность лунки с пробиотиком и с ополаскивателем для полости рта, и

ОП_{об} представляет собой оптическую плотность лунки без пробиотика и с ополаскивателем для полости рта.

Условия исследовали в трех повторах.

На фиг. 8-13 представлена кинетика роста пробиотических штаммов в различных концентрациях Листерина Зеро®. Результаты подтверждают, что Листерин уменьшал рост штаммов *Streptococcus* при всех исследованных концентрациях. Только *S. salivarius* К12 был способен расти в разведении 1:4 и 1:8, но его рост был сильно меньше по сравнению с положительным контролем (пробиотиком без ополаскивателя для полости рта). *S. oralis* был способен расти только когда разведение ополаскивателя для полости рта Листерина достигло 8-кратного от исходной концентрации. Тем не менее даже при этой концентрации не наблюдали роста через 24 ч и количество пробиотика было приблизительно в 2 раза ниже, чем для положительного контроля через 48 ч. Показатель роста *L. brevis* был ниже, чем для штаммов *Streptococcus*, так как не наблюдали роста до момента 48 ч после затравки среды. Тем не менее подтвердили, что способность *L. brevis* CD2 переносить ополаскиватель для полости рта была выше, чем у штаммов *Streptococcus*, так как он полностью ингибировался только когда ополаскиватель для полости рта был не

разбавленный. Концентрация *L. brevis* CD2, когда в среде присутствовали 2-, 4- и 8-кратные разведения, снижалась приблизительно на 50%.

Штаммы *Pediosoccus* оказались пробиотиками, для которых выявили наиболее высокую способность переносить ополаскиватель для полости рта. Присутствие неразбавленного Листерина® полностью ингибировало рост *P. pentosaceus* СЕСТ8330, *P. acidilactici* АВ134 и *P. acidilactici* СЕСТ8633 через 24 ч. Тем не менее *P. acidilactici* АВ134 и *P. acidilactici* СЕСТ8633 были единственными бактериями, которые были способны расти в присутствии данного ополаскивателя для полости рта через 48 ч.

На фиг. 14 резюмированы доли выживаемости различных штаммов через 48 ч. Можно явно увидеть, что только штаммы *Pediosoccus acidilactici* СЕСТ7780 и СЕСТ8633 были способны расти в присутствии неразбавленного ополаскивателя для полости рта и что *L. brevis* CD2 и особенно *P. pentosaceus* СЕСТ8330 также были способны расти, когда ополаскиватель для полости рта был разбавлен в 2 раза.

Доля выживаемости штаммов.

Streptococcus всегда была ниже, чем таковая для других пробиотических штаммов при всех указанных концентрациях.

Пример 4. Антагонистическая активность против патогенов пародонта.

Исследовали антагонистическую способность *P. acidilactici* СЕСТ8633 против видов патогенов, в значительной степени связанных с гингивитом, пародонтитом и галитозом, а именно *Fusobacterium nucleatum*, *Treponema denticola* и *Prevotella denticola*. Патогены получали из Коллекции Института Пастера (шифры депозита СІР104988, СІР103919 и СІР104478Т соответственно).

P. acidilactici СЕСТ8633 растили на чашках с MRS при 37°C и 5% CO₂ до конфлюэнтности. Цилиндрические срезы конфлюэнтных бактерий диаметром 6 мм помещали на чашки M20, инокулированные *F. nucleatum* и *P. denticola*, или M71 чашки, инокулированные с *T. denticola*. Среда в чашках M20 содержала 30 г триптона, 20 г дрожжевого экстракта, 0,5 г гидрохлорида цистеина, 5 г глюкозы и 25 мл раствора гемина (0,1 г хлорида гемина, 4 мл триэтанолamina и 96 мл дистиллированной воды на литр. Среда в чашках M71 содержала 15 г триптона, 5 г дрожжевого экстракта, 8 г вторичного кислого фосфата натрия, 1 г карбоната аммония, 0,5 г гидрохлорида цистеина, 0,03 мл тиогликолевой кислоты, 0,05 мл Tween 80 и 250 мл лошадиной сыворотки на литр. Чашки инкубировали в течение ночи при 37°C в анаэробных условиях. Активность ингибирования роста (ИР) рассчитывали путем вычитания диаметра цилиндра (ДЦ, мм) из диаметра зоны ингибирования (ДЗИ, мм), как описано далее: $ИР = (ДЗИ - ДЦ) / 2$. Результаты сравнивали с *S. salivarius* K12 (BLIS Technologies Ltd., Новая Зеландия) и *L. reuteri* ATCC 55730 (GumPerioBalance® (BioGaia, Швеция), которые растили в таких же условиях, что и *P. acidilactici* СЕСТ8633.

Результаты представлены на фиг. 15. *P. acidilactici* СЕСТ8633 проявил способность ингибировать рост трех исследованных патогенов, в отличие от *S. salivarius* и *L. reuteri*, которые ингибировали два из трех исследованных патогенов. Более того, *P. acidilactici* СЕСТ8633 проявил большую способность ингибировать рост *F. nucleatum* и *T. denticola*, чем коммерчески доступные контроли.

Пример 5. Клиническая эффективность.

Проводили двойное слепое рандомизированное плацебо-контролируемое клиническое испытание, чтобы оценить безопасность штаммов МКБ и их эффективность в качестве пробиотиков, улучшающих параметры, связанные с гингивитом.

Субъекты, включенные в данное клиническое испытание, удовлетворяли всем критериям включения и исключения. Критерии включения: возраст 18-55 лет; мужчины или женщины (сбалансированные группы); некурящие (никогда не курили или не курили в течение по меньшей мере 6 месяцев до проведения испытания); субъекты с гингивитом природного происхождения, определенным по среднему десневому индексу (ДИ) > 1,3; без потери межзубного контакта > 2 мм в большинстве областей. Критерии исключения: кариозные повреждения и/или недостаточная реставрация верхнечелюстных боковых резцов, первого или второго премоляров и первых моляров или соседних зубов, препятствующая удалению зубного налета в интересующих областях; субъекты, на данный момент проходящие стоматологическое лечение; субъекты, на данный момент проходящие ортодонтическую терапию или носящие окклюзионные шины; субъекты, страдающие любым системным заболеванием или состоянием, которое может влиять на реакцию тканей десны или возможность осуществления достаточного контроля над зубным налетом (беременность, диабет, количественные и/или качественные нарушения в полиморфноядерных клетках, другие заболевания иммунной системы и т.д.); субъекты, принимающие лекарства, которые могут препятствовать реакции десны; субъекты, принимающие антибиотики или антисептики в течение 2 месяцев перед исследованием; субъекты, применявшие пробиотические продукты для здоровья полости рта в течение 2 месяцев до исследования; гиперчувствительность или аллергия на любой компонент лекарственных продуктов в анамнезе.

В день 0 проводили профессиональную гигиену полости рта (удаление камня и полировку) всех субъектов. Предоставили фторсодержащую зубную пасту, а также попросили чистить зубы дважды в день, чтобы стандартизировать обычную гигиену полости рта.

Субъектов произвольно распределяли в одну из следующих двух групп лечения.

Таблица 3

	Исследуемые виды лечения	
	ПРОБИОТИК	ПЛАЦЕБО
Композиция (на таблетку):	Смесь пробиотиков <i>Lactobacillus plantarum</i> СЕСТ7481, <i>Lactobacillus brevis</i> СЕСТ7480 и <i>Pediococcus acidilactici</i> СЕСТ8633): 125 мг	Трегалоза: 125 мг Гуаровая камедь (Е-412): 80,00 мг Сорбит: 691,20 мг
	Гуаровая камедь (Е-412): 80,00 мг Сорбит: 691,20 мг Гидрогенизированное масло хлопчатника: 18,32 мг Мятная ароматическая добавка: 20,00 мг	Гидрогенизированное масло хлопчатника: 18,32 мг Мятная ароматическая добавка: 20,00 мг
Доза:	2 таблетки/день	2 таблетки/день
Путь введения:	Пероральный	Пероральный
Лекарственная форма:	Диспергируемые в полости рта таблетки	Диспергируемые в полости рта таблетки

Ни пациенты, ни исполнители не знали, какое лечение было назначено каждому субъекту. Диспергируемые таблетки имели одинаковый вид, и содержащие их коробки включали шифр исследования и соответствующий идентификационный номер субъекта. Исследователь давал участникам коробки, содержащие таблетки, которые имели одинаковый вид. Лечение, назначенное каждому добровольцу (А или В), заносили в датированный реестр. Рандомизирование раскрывали только по окончании исследования после анализа результатов или если наблюдали какое-либо значимое событие, которое вынуждало снять маскирование. Субъекты потребляли соответствующий продукт в течение 6 недель. Диспергируемым в полости рта таблеткам позволяли медленно раствориться во рту после завершения чистки каждого зуба (дважды в день). После потребления продукта участникам не позволяли чистить зубы или употреблять какую-либо пищу или напитки (отличные от воды) в течение 1 ч после потребления таблетки. У субъектов требовали регистрировать прием таблеток путем заполнения ежедневного опросника по следованию протоколу. Его возвращали исследователю вместе с коробками с неиспользованными таблетками, чтобы изучить соблюдение режима терапии каждым пациентом.

Первичная конечная точка представляла собой десневой индекс (ДИ), измеренный по модифицированному способу Loe и Silness (1963) без кровоточивости на инструменте [Löe H. и др., "Periodontal disease in pregnancy", Acta Odontologica Scandinavica, 1963, том 21, с. 533-551]. Средний ДИ рассчитывали путем деления суммы всех баллов для каждого зуба на суммарное количество исследованных зубов.

В день 0 (на момент начала исследования) десневой индекс (ДИ) определяли перед профессиональной гигиеной полости рта (удалением камня и полировкой). Тот же показатель определяли через 6 недель.

В день 0 (на момент начала исследования) и неделю 6 (окончание исследования) прямо перед клиническим обследованием собирали образцы наддесневого зубного налета по одному из каждого квадранта (верхнечелюстной левый-правый/нижнечелюстной левый-правый) и объединяли. Наддесневой зубной налет собирали, применяя стерильные бумажные пины, помещенные на 10 с. Бумажные пины с образцами объединяли и переносили в микроцентрифужную пробирку, содержащую 200 мкл буфера TE (10 mM Трис-(гидроксиэтил)-метиламина хлорид, 1 mM этилендиаминтетрауксусная кислота) и хранили при -20°C до проведения анализа. Проводили ПЦР в реальном времени с использованием зондов Taqman со специфическими праймерами к шести предполагаемым патогенам пародонта (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; *Porphyromonas gingivalis*; *Tannerella forsythia*; видам *Fusobacterium*; *Streptococcus oralis*; *Campylobacter rectus*).

Первичные и вторичные показатели анализировали с помощью SAS. Все анализы проводили в соответствии с критериями "все рандомизированные пациенты согласно назначенному лечению" (ВРП) и "пациенты без нарушений протокола" (ПП). Результаты проверяли по критерию нормальности Шапиро-Уилка. Если результаты были параметрически разбросаны, то различия в первичных и вторичных показателях между группами определяли с помощью дисперсионного анализа (ANOVA). Для того чтобы выяснить точную природу различий между группами, проводили ретроспективный анализ (например, многограновый критерий Дункана). Если результаты были разбросаны непараметрически, сравнение количественных показателей проводили с помощью непараметрических критериев (Уилкоксона для парных сравнений и Манна-Уитни для независимых данных). Во всех критериях для проверки гипотезы за нулевую гипотезу принимали равенство между группами лечения и опровергали ее, когда Р-значения оказывались ниже чем 0,05. Это означало, что значимыми различиями считали такие различия, когда α -ошибка

или ошибка I рода составляла $<0,05$.

Оценивали пригодность к участию в исследовании пятидесяти девяти пациентов и произвольно распределяли их по группам пробиотика ($n=30$) или плацебо ($n=29$). Характеристики пациентов на момент начала исследования представлены в табл. 4.

Таблица 4
Демографические характеристики исследуемой популяции

	Пробиотик N = 30	Контроль N = 29	Всего N = 59
Возраст (лет)			
p-значение = 0,7805 (критерий суммы рангов Уилкоксона)			
N	29	29	58
N отсутствующих	1*	0	1
Среднее (ст. отклонение)	30,91 (12,20)	32,50 (13,62)	31,71 (12,84)
ДИ 95% (среднее)	(26,27, 35,55)	(27,33, 37,68)	(28,33, 35,08)
Диапазон (мин, макс)	(17,76, 55,33)	(17,70, 65,70)	(17,70, 65,70)
Медиана	26,26	28,20	27,49
МКИ (Q1,Q3)	(21,47, 38,36)	(21,34, 37,45)	(21,45, 38,36)
Пол			
p-значение = 0,7106 (критерий хи-квадрат)			
Женщины	19 (63,3%)	17 (58,6%)	36 (61,0%)
Мужчины	11 (36,7%)	12 (41,4%)	23 (39,0%)

*Отсутствующие результаты, но в диапазонах критериев отбора

94,2% пациентов приняли по меньшей мере 75% лекарственного средства, 89,7% в группе пробиотика и 100,0% в контрольной группе. Не наблюдали различий в соблюдении режима терапии между группами.

В неделю 6 количество отдельных поверхностей зубов с баллом ДИ, равным 3 ("количество отдельных баллов ДИ=3") было ниже в группе пробиотика, чем в контрольной группе ($n=0$ (0,0%) по сравнению с $n=5$ (0,2%), p -значение=0,0418).

Величина изменений между началом исследования и конечной точкой (начало исследования - неделя 6) также была значительно выше в группе пробиотика, чем в контрольной группе (стандартный уход) ($P<0,01$, независимо от вида анализа: ВРП или ПП) (фиг. 16).

Лечение содержащими пробиотик таблетками коррелировало со значимым снижением уровней *Tannerella forsythia*, а также *Porphyromonas gingivalis* (фиг. 17).

В заключение таблетки пробиотика были способны уменьшить количество областей, в которых присутствовало тяжелое воспаление, по сравнению с профессиональной гигиеной полости рта отдельно у пациентов с гингивитом. Применение пробиотика также внесло существенный микробиологический вклад, так как оно было ассоциировано с уменьшением количества *T. forsythia* и *P. gingivalis* - патогенов, широко известных как отрицательно влияющие на течение гингивита, для которых выявили самую сильную корреляцию с количеством очагов с тяжелым воспалением среди патогенных бактерий, количество которых измеряли в исследуемой популяции.

Пример 6. Состав в форме диспергируемых в полости рта таблеток.

У диспергируемых в полости рта таблеток была следующая композиция:

125 мг *Pediosoccus acidilactici* СЕСТ8633;

1,3 мкг холекальциферола (витамина D3);

20 мг мятной ароматической добавки;

80 мг гуаровой камеди;

689,53 мг сорбита;

9,35 силиида;

9,35 стеарата магния.

Данный состав подходит для медленного растворения в полости рта. Концентрация пробиотика на момент окончания срока годности составляет $1E+09$ КОЕ на таблетку.

В качестве альтернативы таблетка содержит *Lactobacillus plantarum* СЕСТ7481, *Lactobacillus brevis* СЕСТ7480 дополнительно к *Pediosoccus acidilactici* СЕСТ8633.

Пример 7. Состав в форме геля для полости рта.

Флаконы содержат 500 мг порошка, содержащего следующие ингредиенты: *Pediosoccus acidilactici* СЕСТ8633 (минимальная концентрация пробиотика на момент окончания срока годности составляет $6E+09$ КОЕ/флакон) Хлорофиллин Е141ii (4%, по массе) Гуаровую камедь (5,2% по массе).

Пример 8. Состав в форме жевательные резинки.

Жевательные резинки содержат следующую композицию:

1340,68 мг жевательной основы (Health in Gum PWD-03);

125 мг *Lactobacillus plantarum* СЕСТ7481, *Lactobacillus brevis* СЕСТ7480 и *Pediococcus acidilactici* СЕСТ8633 (соотношение 1:1:1);

31,52 мг инкапсулированной ароматической добавки;

47,28 мг порошковой вкусоароматической добавки;

12,61 мг жидкой вкусоароматической добавки;

24,0 мг стеарата магния;

15,75 мг диоксида кремния;

1,89 мг аспартама;

1,26 мг ацесульфама К.

Пример 9. Состав в форме зубной пасты.

Зубная паста состоит из:

125 мг *Pediococcus acidilactici* СЕСТ8633;

0,12 диглюконата хлоргексидина;

1 г ксилита;

0,5 г ацетата альфа-токоферола;

100 г вспомогательного вещества.

В качестве альтернативы зубная паста имеет следующий состав:

Pediococcus acidilactici СЕСТ8633 до достижения конечной концентрации $1E+09$ КОЕ на момент окончания срока годности;

0,04 г глицирретиновой кислоты;

0,16 г фторида натрия;

8 г ПЭГ-12;

0,8 г цеолита;

5,6 г кремния;

1,6 г полиглицерил-5 лаурата;

0,8 г ксилита;

0,48 г ментола;

0,4 г сахараина натрия;

0,4 г бензоата натрия;

0,24 г эвкалипта шаровидного;

0,08 г циклодекстрина;

0,96 г гидроксипропилцеллюлозы;

30,56 г бутиленгликоля.

Пример 10. Состав в форме ополаскивателя для полости рта.

Ополаскиватель для полости рта состоит из комбинации ингредиентов, присутствующих в крышке для доставки и в пробирке. Крышки для доставки содержали 100 мг лиофилизованного пробиотического штамма СЕСТ8633 ($1-2 E+09$ КОЕ на крышку для доставки), стеарат магния (2,2 мг) (в настоящем описании называют, например, предотвращающим слеживаемость агентом и антиадгезивом) и диоксид кремния (0,5 мг) (называют в настоящем описании предотвращающим слеживаемость агентом). Пробирка содержала 10 мл ополаскивателя для полости рта, содержащего 0,092% эвкалиптола, 0,042% ментола, 0,06% метилсалицилата, 0,064% тимолола и 27% этанола (масса/объем).

При надавливании на крышку пробиотик высвобождается в жидкость, содержащуюся в пробирке. Композицию перемешивают, а затем используют для полоскания рта в течение 1 мин.

Пример 11. Ферментация и последующая обработка молочнокислых бактерий.

Биомассу после обработки, используемую в качестве сырого материала, получали с помощью производственного процесса, который включал этапы ферментирования и лиофилизации. Материнскую закваску получали путем инокуляции 80 мл питательной среды MRS штаммами *P. acidilactici*. Инокулированную среду ферментировали при 37°C в микроаэрофильных условиях в течение 48 ч. Полученную в результате этого культуру использовали для инокуляции 600 л питательной среды MRS при соотношении приблизительно 1-2% закваски на суммарный объем питательной среды. Полученную в результате этого среду охлаждали при $3-5^{\circ}\text{C}$ и центрифугировали, чтобы удалить большую часть воды, присутствующей в бульоне. В концентрированную культуру добавляли криопротекторы и полученную в результате этого смесь лиофилизировали при -45°C .

Библиографические ссылки.

- Castalunga M, *et al.* "The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries" *Immunology Letters* 214, vol. 12, pp. 22-38.
- Dann AB, *et al.* "Triclosan: environmental exposure, toxicity and mechanisms of action" *Journal of Applied Toxicology* 2011, vol. 31, pp. 285-311.
- Flötra, L. *et al.* "Side effects of chlorhexidine mouth washes". *Scand J Dent Res* 1971, vol. 73, p. 119-125.
- Gruner, D. *et al.* "Probiotics for managing caries and periodontitis: Systematic Review and Meta-Analysis". *J Dent* 2016, vol. 48, pp. 16-15.
- Haffajee, AD. *et al.* "Microbial etiological agents of destructive periodontal Diseases" *Periodontology* 2000. 1994, vol. 5, pp. 78–11.
- Hallstroem, H. *et al.* "Effect of probiotic lozenges on inflammatory reactions and oral biofilm during experimental gingivitis". *Acta Odontologica Scandinavica* 2013, vol. 71, p. 828-833.
- Jin LJ *et al.* "Global burden of oral diseases: emerging concepts, management and interplay with systemic health" *Oral Diseases* 2016
- Laudenbach *et al.* "Common Dental and Periodontal Diseases. Evaluation and management" *Med Clin N Am* 2014, vol. 98, pp. 1239–1260
- Maekawa, T. *et al.* "Topical treatment with probiotic *Lactobacillus brevis* CD2" inhibits experimental periodontal inflammation and bone loss" *J Periodont Res* 214, vol. 44, p. 785-791
- Nadkerny PV, *et al.* "A comparative evaluation of the efficacy of probiotic and chlorhexidine mouthrinses on clinical inflammatory parameters of gingivitis: A randomized controlled clinical study" *J Indian Soc Periodontol* 2015 vol 16, pp. 633-639
- Penala, S. *et al.* "Efficacy of local use of probiotics as an adjunct to scaling and root planing in chronic periodontitis and halitosis: A randomized controlled trial" *J Res Pharm Pract.* 2016 Vol. 5(2), pp. 86–93.
- Szkaradkiewicz, A.K. *et al.* "Effect of Oral Administration Involving a Probiotic Strain of *Lactobacillus reuteri* on Pro-Inflammatory Cytokine Response in Patients with Chronic Periodontitis". *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2014, vol. 62, p. 495-500
- Teughels, W. *et al.* "Clinical and microbiological effects of *Lactobacillus reuteri* probiotics in the treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled study" *J of clinical periodontology* 2013, vol. 40 p. 1025-35.
- Toiviainen, A. *et al.*, "Impact of orally administered lozenges with *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB-12 on the number of salivary mutans streptococci, amount of plaque, gingival inflammation and the oral microbiome in healthy adults". *Clin Oral Investig* 2015, vol. 19, p. 77–83.
- Vlachojannis C, *et al.* "A Preliminary Investigation on the Antimicrobial Activity of Listerine®, Its Components, and of Mixtures Thereof" *Phytotherapy research* 2015, vol. 29, pp. 1590-1594
- Vlachojannis C, *et al.* "Listerine® Products: An update on the efficacy and safety" *Phytotherapy Research* 2016, vol. 30, pp. 367-373

Yanine, N. *et al.* "Effects of probiotics in periodontal diseases: a systematic review". Clinical oral investigations 2013, vol. 17, p. 1627-34

L. Dunn *et al* (Journal of Food Science • Vol. 81, Nr. 2, 2016, pages M438-M444)

WO2017012905A1 (AB-BIOTICS)

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение штамма *Pediosoccus* в качестве пробиотика в комбинации с по меньшей мере одним антисептиком,

при этом указанный штамм *Pediosoccus* обладает способностью переносить присутствие по меньшей мере одного антисептика, выбранного из группы, состоящей из

а) триклозана;

б) эфирного масла, содержащего по меньшей мере один отдельный компонент, выбранный из группы, состоящей из ментола, эвкалиптола, тимола и метилсалицилата; и

с) отдельного компонента, выбранного из группы, состоящей из ментола, эвкалиптола, тимола и метилсалицилата,

при этом считают, что указанный штамм *Pediosoccus* обладает способностью переносить указанный антисептик, когда гало ингибирования, определенное с помощью диско-диффузионного способа анализа, наблюдаемое для указанного штамма *Pediosoccus*, меньше, чем гало ингибирования для *Porphyromonas gingivalis*, при этом указанный антисептик присутствует в концентрации, достаточной для того, чтобы установить ингибирование *Porphyromonas gingivalis*, и

при этом указанный штамм *Pediosoccus* и указанный антисептик приготовлены в форме для раздельного, последовательного, одновременного введения или введения в виде смеси, и указанный *Porphyromonas gingivalis* представляет собой *Porphyromonas gingivalis* DSM20709, и указанный штамм *Pediosoccus* представляет собой штамм *Pediosoccus acidilactici*,

причем указанный штамм *Pediosoccus* применяют при предотвращении или лечении состояния полости рта.

2. Применение согласно п.1, отличающееся тем, что указанный штамм *Pediosoccus acidilactici* представляет собой штамм *Pediosoccus acidilactici*, депонированный в Испанской коллекции типовых культур под номером доступа СЕСТ 8633.

3. Применение согласно любому из пп.1 и 2, отличающееся тем, что указанный штамм *Pediosoccus* находится в комбинации с по меньшей мере одним антисептиком, выбранным из группы, состоящей из триклозана;

эфирного масла, содержащего по меньшей мере один отдельный компонент, выбранный из группы, состоящей из ментола, эвкалиптола, тимола и метилсалицилата;

отдельного компонента, выбранного из группы, состоящей из ментола, эвкалиптола, тимола и метилсалицилата; и

бигуанидов.

4. Применение согласно п.3, отличающееся тем, что указанный штамм *Pediosoccus* находится в комбинации с по меньшей мере одним антисептиком, выбранным из группы, состоящей из триклозана и эфирного масла, содержащего по меньшей мере один отдельный компонент, выбранный из группы, состоящей из ментола, эвкалиптола, тимола и метилсалицилата.

5. Применение согласно любому из пп.1-4, отличающееся тем, что указанный антисептик приготовлен в форме продукта для личной гигиены вместе с приемлемыми вспомогательными веществами и/или носителями и указанный штамм *Pediosoccus* приготовлен в виде продукта для личной гигиены или фармацевтического продукта вместе с приемлемыми вспомогательными веществами и/или носителями.

6. Применение согласно п.5, отличающееся тем, что указанный продукт для личной гигиены представляет собой продукт для гигиены полости рта.

7. Применение согласно п.6, отличающееся тем, что указанный продукт для гигиены полости рта представляет собой зубную пасту, гель для полости рта, спрей для полости рта, ополаскиватель для полости рта или диспергируемую в полости рта таблетку.

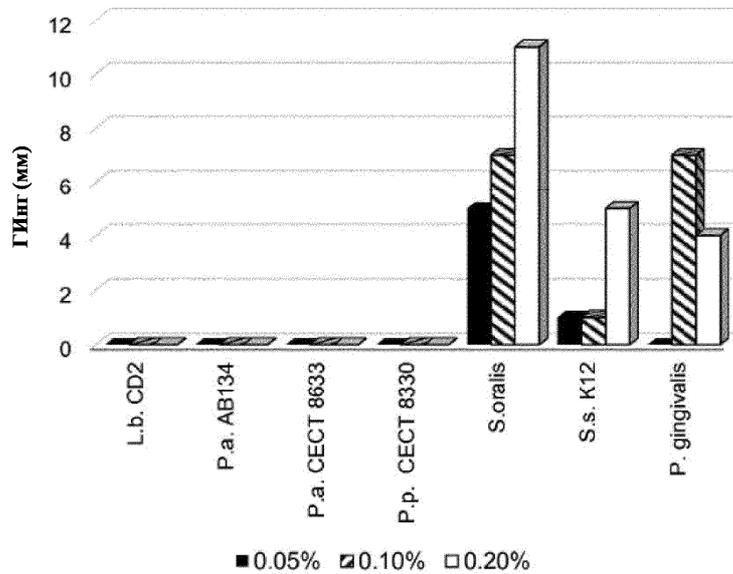
8. Применение согласно любому из пп.1-7, отличающееся тем, что указанный антисептик и указанный штамм *Pediosoccus* вводят отдельно (выжидая период времени между введением штамма *Pediosoccus* и антисептика), при этом указанный период времени длится не более 1 ч.

9. Применение согласно п.8, отличающееся тем, что субъекту, который нуждается в лечении, поручают прополоскать рот ополаскивателем для полости рта, содержащим антисептик, в течение 30-60 с, после чего выплюнуть ополаскиватель для полости рта, а затем помещают в рот таблетку для перорального применения, содержащую штамм *Pediosoccus*, и позволяют ей медленно раствориться.

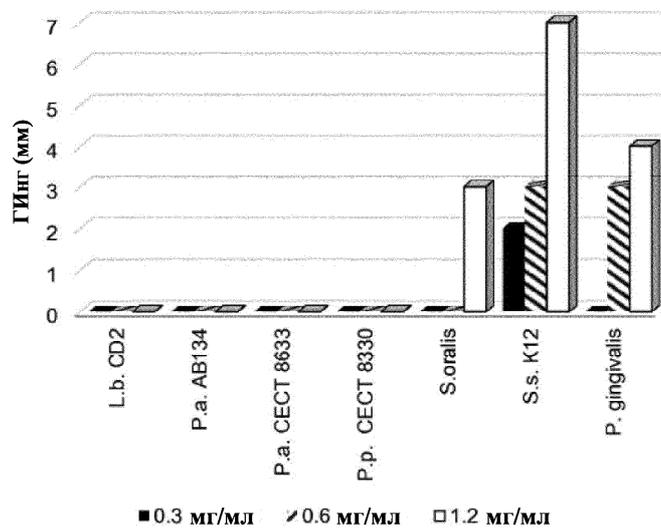
10. Применение согласно любому из пп.1-9, отличающееся тем, что указанное состояние полости рта вызвано патогенами полости рта.

11. Штамм, относящийся к виду *Pediosoccus acidilactici*, депонированный в Испанской коллекции типовых культур под номером доступа СЕСТ 8633 для использования в качестве пробиотика, при этом указанный штамм обладает способностью переносить присутствие по меньшей мере одного антисептика.

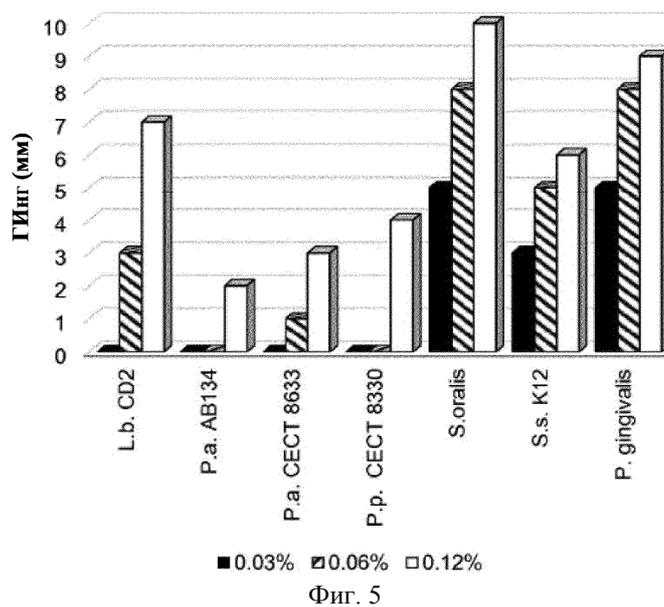
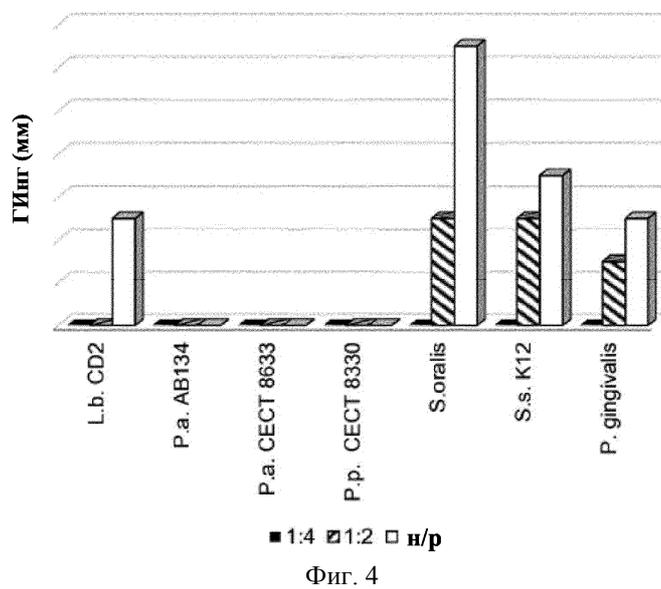
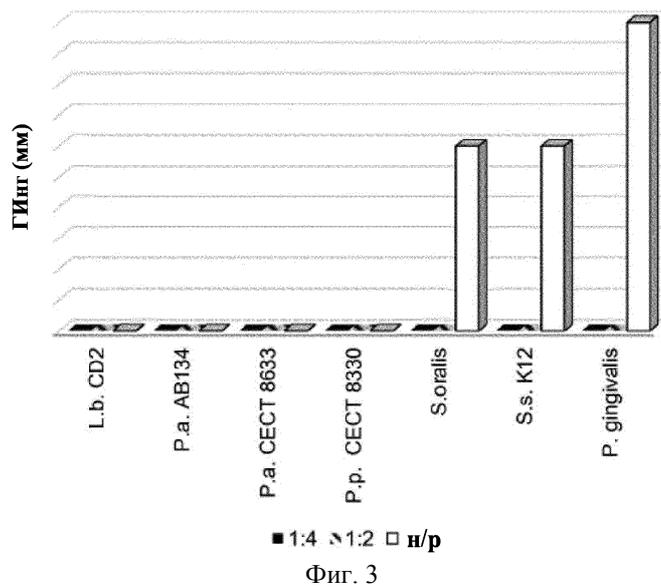
12. Способ получения мутанта *Pediosoccus acidilactici*, при этом указанный способ включает осуществление мутагенеза штамма *Pediosoccus acidilactici*, депонированного в Испанской коллекции типовых культур под номером доступа СЕСТ 8633, причем у полученного мутанта сохраняется или повышается по меньшей мере способность указанного депонированного штамма переносить присутствие по меньшей мере одного антисептика.

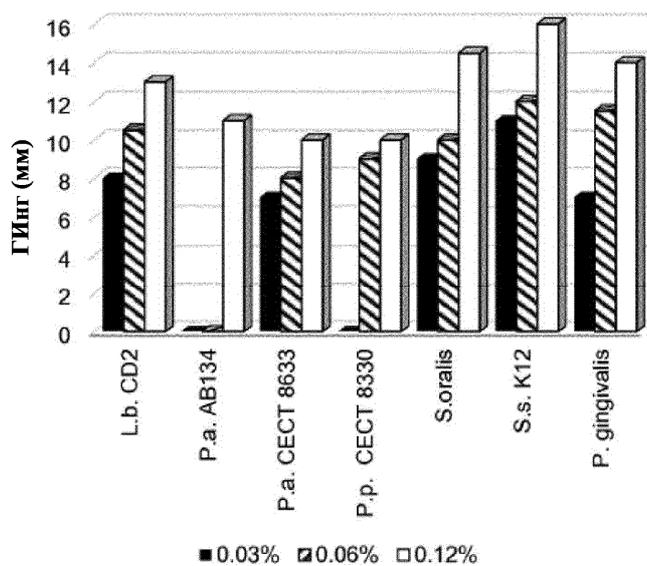


Фиг. 1

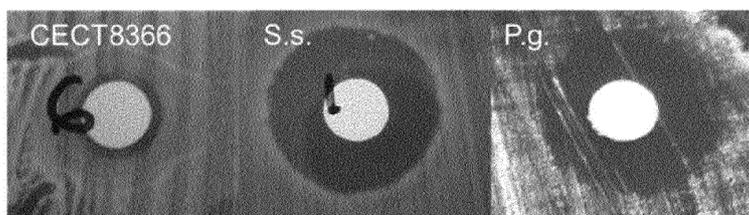


Фиг. 2

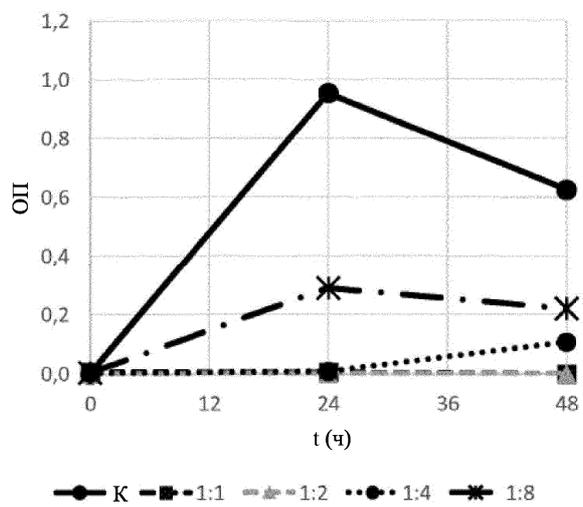




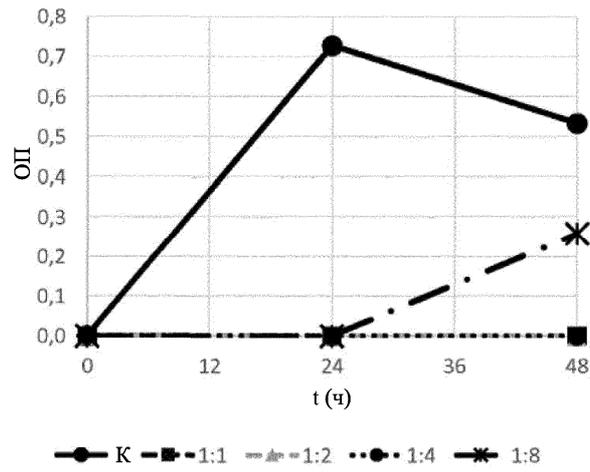
Фиг. 6



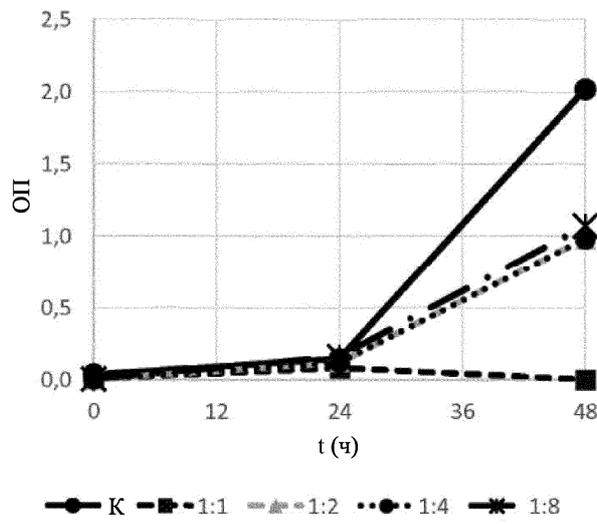
Фиг. 7



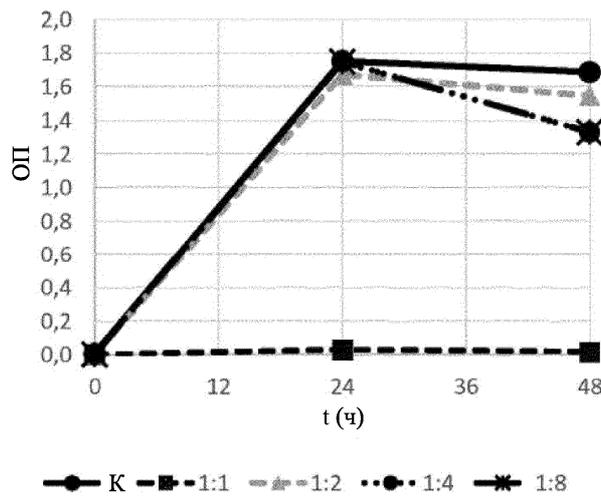
Фиг. 8



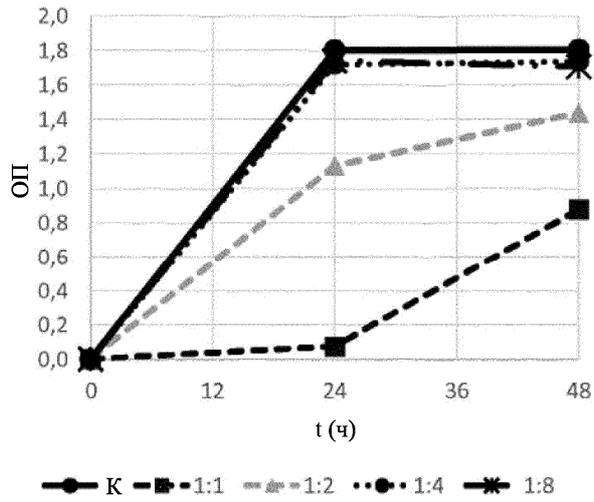
Фиг. 9



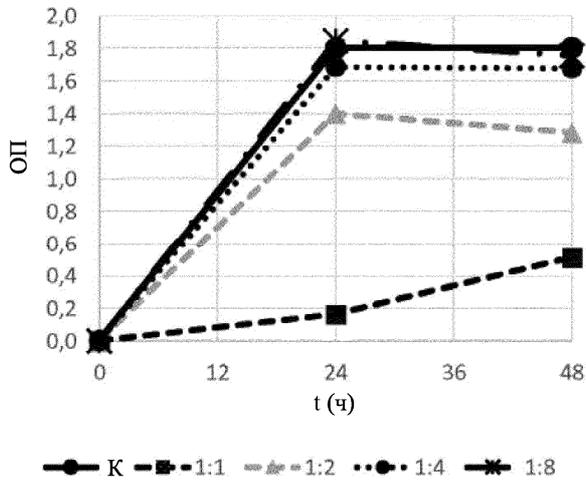
Фиг. 10



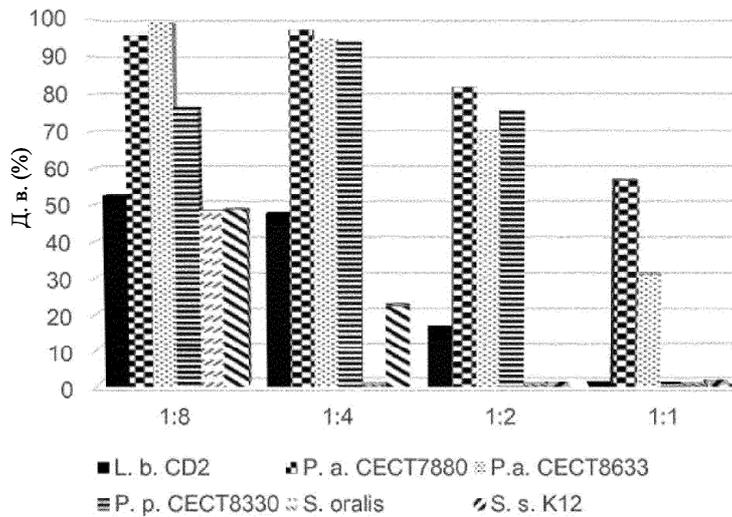
Фиг. 11



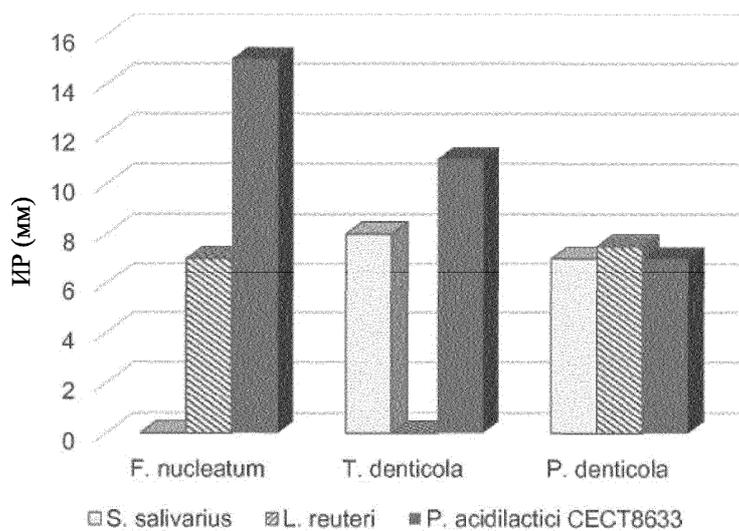
Фиг. 12



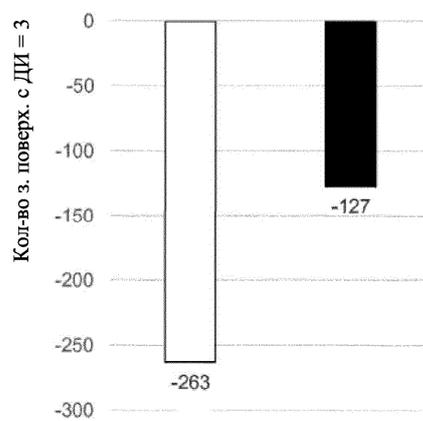
Фиг. 13



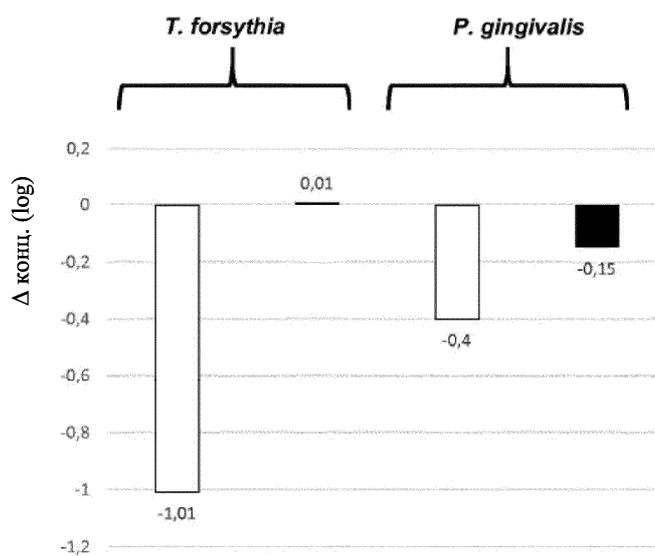
Фиг. 14



Фиг. 15



Фиг. 16



Фиг. 17

