



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) BR 112015032544-0 B1**



**(22) Data do Depósito: 24/06/2014**

**(45) Data de Concessão: 27/10/2020**

---

**(54) Título:** BACTÉRIA PROBIÓTICA QUE COMPREENDEM METAIS, NANOPARTÍCULAS METÁLICAS E USOS DAS MESMAS

**(51) Int.Cl.:** A23L 1/304; A61K 35/74; A61K 49/00; A23L 1/30; A61K 49/18; (...).

**(30) Prioridade Unionista:** 25/06/2013 EP 13384202.1.

**(73) Titular(es):** BIOSEARCH, S.A..

**(72) Inventor(es):** JOSÉ MANUEL DOMÍNGUEZ VERA; NATIVIDAD GÁLVEZ RODRÍGUEZ; MIGUEL ÁNGEL MARTÍN MARCOS; FERNANDO CARMONA RODRÍGUEZ-ACOSTA; DEYANIRA RONDÓN RODRÍGUEZ; MÓNICA OLIVARES MARTÍN.

**(86) Pedido PCT:** PCT EP2014063246 de 24/06/2014

**(87) Publicação PCT:** WO 2014/206969 de 31/12/2014

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 23/12/2015

**(57) Resumo:** BACTÉRIAS PRO-BIÓTICAS QUE COMPREENDEM METAIS, NANOPARTÍCULAS METÁLICAS E USOS DAS MESMAS A invenção refere-se a bactérias pro bióticas selecionadas a partir de bactérias de ácido láctico, tais como Lactobacillus e Bifidobacteria, que compreendem metais e / ou nanopartículas metálicas e aos gêneros alimentícios e composições farmacêuticas que compreendem estas bactérias. A invenção também proporciona métodos para a obtenção destas bactérias e usos destas bactérias para o tratamento e prevenção de patologias de deficiência de minerais, como um agente de contraste para a imagiologia do trato.

BACTÉRIA PROBIÓTICA QUE COMPREENDEM METAIS,  
NANOPARTÍCULAS METÁLICAS E USOS DAS MESMAS

Campo da Invenção

[0001] A presente invenção situa-se dentro do campo das bactérias probióticas e, mais especificamente, refere-se às bactérias carregadas com íons metálicos e / ou nano partículas metálicas, ao uso destas bactérias probióticas para a profilaxia ou tratamento de enfermidades de deficiências de minerais, ao uso destas bactérias como agente de contraste para imagiologia do trato digestivo e ao uso destas bactérias para o tratamento de câncer.

Antecedentes da Invenção

[0002] Os minerais constituem um dos cinco grupos fundamentais de nutrientes necessários para a vida. A desnutrição de micronutrientes afeta >50% da população mundial. Em particular, ferro, zinco e cálcio são considerados um problema de saúde pública emergente na maior parte dos países em desenvolvimento. Nos países desenvolvidos também existem sérios problemas de deficiência de minerais devido aos hábitos alimentares inapropriados que tem prevalecido sobre o conforto e prazer para a saúde. A deficiência de ferro é o problema nutricional mais comum no mundo. Além de afetar um grande número de crianças e mulheres nos países desenvolvidos, é a única deficiência de nutrientes que é também significativamente predominante em países industrializados. As conseqüências da anemia por deficiência de ferro são muito graves. A anemia resultante da deficiência de ferro em crianças jovens tornou-se muito comum uma vez que o nível de ferro biodisponível na dieta de uma criança típica é baixo, enquanto que o seu rápido crescimento requer um nível muito mais elevado de ferro. As conseqüências da

anemia por deficiência de ferro (IDA) são muito sérias uma vez que está associada com o desenvolvimento cognitivo e psicomotor, crescimento reduzido e resistência diminuída à infecção.

[0003] Para aumentar a ingestão diária destes minerais, suplementos alimentares contendo numerosos suplementos alimentícios que contêm diferentes formas inorgânicas e orgânicas destes metais estão comercialmente disponíveis. De qualquer forma, é bastante conhecido que os sais inorgânicos têm uma biodisponibilidade muito baixa. Os sais orgânicos comumente baseados em gluconato, citrato, ou outras moléculas, são caracterizados por um efeito sistêmico maior. As doses terapêuticas dos suplementos de ferro, que são prescritas para anemia por deficiência de ferro, podem causar efeitos colaterais gastrointestinais tais como náusea, vômito, prisão de ventre, diarreia, fezes de cor escura, e / ou desconforto abdominal. Por essa razão, existe uma necessidade no sentido de proporcionar novas formulações para a suplementação de metal, com particularidade para a suplementação de ferro, com efeitos colaterais gastrointestinais mínimos.

#### Sumário da Invenção

[0004] De acordo com um primeiro aspecto, a invenção refere-se a uma bactéria selecionada a partir de bactérias lácticas e uma bactéria do gênero *Bifidobactéria* que compreende pelo menos uma nano partícula de metal ligada à sua superfície.

[0005] De acordo com um segundo aspecto, a invenção refere-se a um método para a obtenção de uma bactéria selecionada a partir de uma bactéria de ácido láctico e uma bactéria do gênero *Bifidobactéria* que compreende pelo menos uma ligação de metal à sua superfície, que compreende contactar as ditas bactérias com

pelo menos o dito metal, em que o dito contacto é realizado na presença de pelo menos um sal de um cátion divalente e sob uma temperatura em que o crescimento das referidas bactérias é compreendido por substancialmente reduzido.

[0006] De acordo com um terceiro aspecto, a invenção refere-se a uma bactéria que pode ser obtida por meio do método de acordo com o segundo aspecto.

[0007] De acordo com um quarto aspecto, a invenção refere-se a uma cultura biologicamente pura de uma bactéria de acordo com o primeiro aspecto ou uma bactéria de acordo com o terceiro aspecto.

[0008] De acordo com um quinto aspecto, a invenção refere-se a um gênero alimentício que compreende uma bactéria de acordo com o primeiro aspecto ou uma bactéria de acordo com o terceiro aspecto ou uma cultura biologicamente pura de acordo com o quarto aspecto.

[0009] De acordo com um sexto aspecto, a invenção refere-se a uma composição farmacêutica que compreende a bactéria de acordo com seja o primeiro aspecto ou uma bactéria de acordo com o terceiro aspecto ou uma cultura biologicamente pura de acordo com o quarto aspecto e um carreador farmacêuticamente aceitável.

[0010] De acordo com um sétimo aspecto, a invenção refere-se a uma bactéria selecionada a partir de a bactéria de o primeiro aspecto e a bactéria de o terceiro aspecto, ou uma cultura biologicamente pura de acordo com o quarto aspecto, para o seu uso no tratamento e / ou prevenção de uma enfermidade ou condição associada com a deficiência de um metal, em que a bactéria compreende o metal que é deficiente na dita enfermidade ou condição e em que a bactéria ou cultura é administrada de forma oral.

[0011] De acordo com um oitavo aspecto, a invenção refere-se a uma bactéria selecionada a partir da

bactéria do primeiro aspecto e da bactéria do terceiro aspecto, ou uma cultura biologicamente pura de acordo com o quarto aspecto, para o uso seu uso no tratamento de câncer, em que o metal é compreendido de acordo com uma nano partícula magnética.

[0012] De acordo com um nono aspecto, a invenção refere-se a um método não terapêutico para a distribuição de um metal no intestino de um paciente, que compreende a administração oral de uma bactéria de acordo com o primeiro aspecto ou a bactéria do terceiro aspecto ou a cultura biologicamente pura do quarto aspecto.

[0013] De acordo com um décimo aspecto, a invenção refere-se ao uso de uma bactéria de acordo com seja o primeiro aspecto ou uma bactéria de acordo com o terceiro aspecto ou uma cultura biologicamente pura de acordo com o quarto aspecto como agente de contraste para imagiologia de ressonância magnética, em que o metal é compreendido de acordo com uma nano partícula magnética.

[0014] De acordo com um décimo primeiro aspecto, a invenção refere-se a um método para a imagiologia de ressonância magnética do trato digestivo de uma paciente que compreende:

(i) Administrar de forma oral à dita paciente a bactéria de acordo com o primeiro aspecto, ou uma bactéria de acordo com o terceiro aspecto, ou uma cultura biologicamente pura de acordo com o quarto aspecto, ou um agente de contraste que compreende uma bactéria de acordo com o primeiro aspecto, ou uma bactéria de acordo com o terceiro aspecto, ou uma cultura biologicamente pura de acordo com o quarto aspecto, em que o metal é compreendido de acordo com uma nanopartícula e,

(ii) detectar as nanopartículas de metal no trato digestivo da paciente.

### Descrição Breve Das Figuras

Figura 1. Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão de camadas de camadas de ajuste fino de bactérias magnéticas artificiais embutidas de acordo com uma resina epóxi amorfa. Nanopartículas de maghemita a) positivas e b) negativas e c) bactérias sem biofilme de EPS. Observe como ocorre o enxerto de nanopartículas quando as bactérias contêm biofilme de EPS e as nanopartículas são positivas. d) Mapeamento de Fe de uma bactéria que contém maghemita mostrando como o ferro se acumula seletivamente na superfície externa bacteriana.

Figura 2. uma imagem TEM não contrastada típica de bifidobactérias depois de incubação com formação de nanopartículas de maghemita positivas formando como que um pudim de ameixa.

Figura 3. (a) Dispersão de bactérias magnéticas artificiais no meio aquoso seguida por (b) separação das bactérias magnéticas por um campo magnético.

Figura 4. Deposição de bactérias magnéticas artificiais marcadas com o corante SYTO9 verde em polilisina na presença de um ímã externo.

Figura 5. Remoção de ferro na dependência de tempo a partir de bactérias que contêm nanopartículas de óxido de ferro em meios que imitam estômago e intestino. Note-se que o nível de ferro removido no meio de intestino é significativamente mais alto do que aquele do estômago.

Figura 6. Dependência de tempo de bactérias de remoção de cálcio em meios que imitam estômago e intestino.

Figura 7. Dependência de tempo de bactérias de remoção de zinco em meios que imitam estômago e intestino.

Figura 8. (A) A imagem de SEM mostra as bactérias depois da incubação com  $\text{Ca}^{2+}$ . (B) Espectro de EDX mostrou o pico  $K\alpha$  de 3,8 eV característico de Ca.

Figura 9. (A) A imagem de SEM mostra as bactérias depois da incubação com maghemita e  $\text{Ca}^{2+}$ . (B) O espectro de EDX mostrou os picos  $K\alpha$  de 6,2 eV e 3,8 eV característicos de Fe e Ca, respectivamente.

Figura 10. Uma imagem de corpo inteiro MRI de um camundongo, depois de 6 h de administração de bactérias que contêm nanopartículas de maghemita. A morfologia de algumas partes superiores do intestino é evidente devido ao contraste positivo (escuro) devido ao acúmulo de nanopartículas magnéticas.

Figura 11. Uma imagem de corpo inteiro MRI de um camundongo, depois de 12 h de administração de bactérias que contêm nanopartículas de maghemita. A morfologia de algumas partes superiores do intestino é evidente devido ao contraste positivo (escuro) devido ao acúmulo de nanopartículas magnéticas.

#### Descrição Detalhada Da Invenção

[0015] Os inventores da presente invenção observaram que uma bactéria de ácido láctico ou uma bactéria do gênero *Bifidobactéria* é capaz de ligar uma nanopartícula de metal à sua superfície de acordo com uma maneira dependente de pH. A associação entre a bactéria e uma nanopartícula de metal é estável sob aquelas condições de pH sob as quais uma nanopartícula é dotada de uma carga de superfície positiva (Figura 1). Além disso, os inventores observaram que as condições de pH sob as quais uma nanopartícula de metal é associada de forma estável com a bactéria sobreposta com as condições de pH ácido no estômago, enquanto que as condições de pH no intestino permitem a dissociação entre uma nanopartícula de metal e a bactéria com a subsequente distribuição duma nanopartícula de metal (Exemplo 2). Com base nesta propriedade, os inventores desenvolveram um método para administrar

suplementos de metais a pacientes com necessidade dos mesmos por meio da administração oral de uma bactéria que contém metais e / ou nanopartícula de metais de acordo com a invenção. Estas bactérias, da mesma forma que uma cultura destas bactérias, também podem ser formuladas na forma de uma composição farmacêutica ou formar parte de um gênero alimentício ou produto nutricional. Além disso, com base na capacidade das bactérias de ácido láctico e das bifidobactérias chegar a áreas de hipóxia do tumor, as bactérias associadas à nanopartícula, também poderiam ser utilizadas para direcionar um composto de interesse a um tumor. Além disso, as bactérias transportando nanopartículas magnéticas associadas às suas superfícies são capazes de destruir células tumorais quando submetidas a um aumento seletivo da temperatura (hipertermia) na vizinhança do tumor quando da aplicação de um campo magnético alternativo na faixa da radiofrequência.

[0016] Finalmente, os inventores da presente invenção também observaram que as bactérias carregadas de nanopartículas de metal são adequadas para a imagiologia do sistema gastrointestinal por meio de ressonância magnética (MRI) (exemplo 4). Deste modo estas bactérias também são adequadas para o uso como agentes de contraste de MRI oral.

#### Bactéria e cultura

[0017] De acordo com um primeiro aspecto, a invenção refere-se a uma bactéria, daqui em diante "bactéria da invenção", selecionada a partir de uma bactéria de ácido láctico e uma bactéria do gênero *Bifidobactéria* que compreende pelo menos uma nanopartícula de metal ligada à sua superfície.

[0018] A bactéria da invenção é selecionada a partir de uma bactéria de ácido láctico e uma bactéria do gênero *Bifidobactéria*.

[0019] O termo "bactéria de ácido láctico" ou "LAB", da forma que é utilizado neste contexto, refere-se a qualquer bactéria capaz de produzir, como seu produto final metabólico principal de fermentação de carboidrato, ácido láctico ou pelo menos um de seus derivados (incluindo, sendo que não se fica limitado aos mesmos, ácido acético ou ácido propiônico): por essa razão o termo destina-se a incluir bactérias de ácido propiônico (PAB), que produzem ácido propiônico na forma de um produto de fermentação de carboidrato. Exemplos ilustrativos não limitativos de bactérias de ácido láctico são compreendidos por bactérias dos gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Propionibactéria* e *Streptococcus* da mesma forma que os gêneros da ordem *Lactobacillales* *Aerococcus*, *Carnobactéria*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Teragenococcus*, *Vagococcus* e *Weisella*. Tipicamente, a bactéria do ácido láctico é selecionada a partir das espécies *Leuconostoc* spp., *Lactococcus cremoris*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus bifidus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus delbreuckii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus parapantarum*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus johnsonii* e *Lactobacillus jensenii*.

[0020] De acordo com uma concretização preferida, a bactéria de ácido láctico é uma bactéria do gênero *Lactobacillus*. Da forma que é utilizado neste contexto, o termo "*Lactobacillus*", refere-se a um gênero que é descrito na base de dados NCBI pela Taxonomia ID 1578. De acordo com uma concretização particular, a bactéria de ácido láctico é selecionada a partir do grupo que consiste de *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius* e *Lactobacillus bulgaricus*. De acordo com uma concretização de maior preferência, a bactéria de ácido láctico é compreendida por *Lactobacillus fermentum*. O termo "*Lactobacillus fermentum*" ou "*L. fermentum*" refere-se a uma espécie do gênero *Lactobacillus* que é descrita na base de dados NCBI pela Taxonomia ID 1613.

[0021] Da forma que é utilizado neste contexto, o termo "bactéria do gênero *Bifidobactéria*" ou "bifidobactéria", refere-se a um gênero de bactérias que se encontra descrito na base de dados NCBI database com a Taxonomia ID 1678. Exemplos ilustrativos, não limitativos de *Bifidobactéria* adequadas são compreendidos pelas espécies *Bifidobactéria lactis*, *Bifidobactéria bifidum*, *Bifidobactéria longum*, *Bifidobactéria animalis*, *Bifidobactéria breve*, *Bifidobactéria infantis*, *Bifidobactéria catenulatum*, *Bifidobactéria pseudocatenulatum*, *Bifidobactéria adolescentis*, e *Bifidobactéria angulatum*. De acordo com uma concretização particular, a bactéria do gênero *Bifidobactéria* é selecionada a partir do grupo que consiste de *Bifidobactéria breve*, *Bifidobactéria longum*, *Bifidobactéria animalis*, *Bifidobactéria infantum* e *Bifidobactéria*

*animalis*. De acordo com uma concretização de maior preferência, a bactéria do gênero *Bifidobactéria* é compreendida pela *Bifidobactéria breve*. O termo "*Bifidobactéria breve*" ou "*B. breve*" refere-se às espécies do gênero *Bifidobactéria* que se encontra descrito na base de dados NCBI pela Taxonomia ID 1685.

[0022] De acordo com outra concretização particular, a bactéria do ácido láctico ou a bifidobactéria da invenção é compreendida por uma bactéria que é capaz de ser transferida para a glândula mamária depois da ingestão oral. Para se detectar a capacidade de ser transferida para a glândula mamária, poderá ser utilizado um ensaio tal como aquele descrito no pedido WO2004003235 para detectar a transferência de um microorganismo para o leite depois da ingestão oral. Exemplos dessas bactérias encontram-se expostos no pedido internacional WO2008145756. De acordo com uma concretização mais particular, a bactéria de ácido láctico ou a bactéria do gênero *Bifidobactéria* capaz de ser transferida para a glândula mamária depois da ingestão oral é selecionada a partir do grupo que consiste de:

- *Bifidobactéria breve* depositado no CECT sob o N°. de acesso 7263
- *Lactobacillus fermentum* depositado no CECT sob o N°. de acesso 5716
- *Lactobacillus coryniformis* depositado no CECT sob o N°. de acesso 5711
- *Lactobacillus salivarius* depositado no CECT sob o N°. de acesso 5713
- *Lactobacillus gasseri* depositado no CECT sob o N°. de acesso 5714
- *Bifidobactéria breve* depositado no CECT sob o N°. de acesso 7264

- *Lactobacillus reuteri* depositado no CECT sob o N°. de acesso 7260,
- *Lactobacillus plantarum* depositado no CECT sob o N°. de acesso 7262,
- *Lactobacillus fermentum* depositado no CECT sob o N°. de acesso 7265,
- *Lactobacillus reuteri* depositado no CECT sob o N°. de acesso 7266,
- *Enterococcus hirae* depositado no CECT sob o N°. de acesso 7410,
- *Lactobacillus plantarum* depositado no CECT sob o N°. de acesso N° 7412,
- *Enterococcus faecalis* depositado no CECT sob o N°. de acesso 7411,
- *Lactobacillus salivarius* depositado no CECT sob o N°. de acesso 7409 e
- *Lactobacillus reuteri* depositado no CECT sob o N°. de acesso 7413.

[0023] A bactéria da invenção compreende pelo menos uma nanopartícula de metal ligada à sua superfície. Da forma que é utilizado neste contexto o termo "nanopartícula de metal", refere-se a uma nanopartícula que compreende um metal. Da forma que é utilizado neste contexto, o termo "nanopartícula", refere-se a uma particle que é dotada de um diâmetro variável desde cerca de 1 até cerca de 1000 nanômetros. De acordo com uma concretização particular, as nanopartículas para o uso de acordo com a invenção tipicamente são dotadas de um diâmetro médio de partícula o qual é variável desde 2 até 50 nm, de preferência a partir de 4 até 10 nm, com maior preferência 8 nm. O diâmetro médio de partícula é compreendido pela dimensão de partícula média máxima,

ficando entendido que as partículas não são necessariamente esféricas. Convenientemente, a dimensão de partícula pode ser medida utilizando-se técnicas convencionais tais como técnicas de microscopia, por exemplo, microscopia eletrônica de transmissão. De acordo com uma concretização, as nanopartículas para o uso de acordo com a invenção são dotadas de uma forma esférica ou substancialmente esférica. De forma conveniente, a forma pode ser avaliada por meio de técnicas de microscopia de luz ou eletrônica convencional.

[0024] Da forma que é utilizado neste contexto, o termo "metal" refere-se a qualquer elemento, composto ou liga que é um bom condutor tanto de eletricidade quanto de calor. De acordo com uma concretização particular, o metal é selecionado a partir do grupo que consiste de ferro, manganês, cobalto, níquel, cálcio, zinco, magnésio, potássio, cobre, cromo, selênio, silício, iodo e as suas combinações. De acordo com uma concretização preferida, o metal é selecionado a partir do grupo que consiste de ferro, cálcio, zinco, selênio e uma combinação dos mesmos. De acordo com uma concretização de maior preferência, o metal é compreendido por ferro.

[0025] De acordo com uma concretização particular, quando o metal é compreendido por selênio ele não está na forma de selênio cisteína.

[0026] O metal poderá estar em um estado de oxidação zero ou na forma de um óxido. De acordo com uma concretização mais particular, o metal está na forma de um óxido. Da forma que é utilizado neste contexto, o termo "metal oxide", refere-se a qualquer óxido de um elemento de metal. O termo "óxido" refere-se a qualquer composto químico que contém um ou vários átomos de oxigênio em um estado de -2 oxidação, em conjunto com outros elementos.

De acordo com uma concretização particular, o óxido de metal é compreendido por um óxido de ferro. Exemplos ilustrativos, não limitativos de óxidos de ferro que podem formar parte duma nanopartícula da bactéria da invenção são maghemita, magnetita, hematita, goetita e ferrihidrita. De acordo com uma concretização particular, o óxido de ferro é selecionado a partir do grupo que consiste de maghemita, magnetita, hematita, goetiita e ferrihidrita.

[0027] De acordo com uma concretização ainda de maior preferência, o óxido de ferro é compreendido por maghemita.

[0028] Da forma que é utilizado neste contexto, termo "maghemita", refere-se a um mineral de óxido de ferro definido por meio da fórmula  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ .

[0029] Da forma que é utilizado neste contexto, o termo "magnetita", refere-se a um mineral de óxido de ferro definido por meio da fórmula  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

[0030] Da forma que é utilizado neste contexto, o termo "hematita", refere-se a um mineral de óxido de ferro definido por meio da fórmula  $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ .

[0031] Da forma que é utilizado neste contexto, o termo "goetita", refere-se a um mineral de óxido de ferro definido por meio da fórmula  $\alpha\text{-FeO(OH)}$ .

[0032] Da forma que é utilizado neste contexto, o termo "ferrihidrita", refere-se ao um mineral de óxido de ferro definido por meio da fórmula  $(\text{Fe}^{3+})_2\text{O}_3 \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$  ou por meio da fórmula  $[\text{Fe}^{3+}_{10}\text{O}_{14}(\text{OH})_2]$ .

[0033] De acordo com uma concretização particular da bactéria da invenção, uma nanopartícula é compreendida por uma nanopartícula magnética. Da forma que é utilizado neste contexto, o termo "nanopartícula magnética", refere-se a qualquer nanopartícula com comportamento ferromagnético e / ou super paramagnético.

Exemplos adequados não limitativos poderão incluir,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_2\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_x\text{Pt}_y$ ,  $\text{Co}_x\text{Pt}_y$ ,  $\text{MnFe}_x\text{O}_y$ ,  $\text{CoFe}_x\text{O}_y$ ,  $\text{NiFe}_x\text{O}_y$ ,  $\text{CuFe}_x\text{O}_y$ ,  $\text{ZaFe}_x\text{O}_y$ , e  $\text{CdFe}_x\text{O}_y$ , em que x e y variam entre 1 e 6, na dependência do método de síntese conhecido na técnica. De acordo com uma concretização preferida, uma nanopartícula magnética compreende óxido de ferro. De acordo com uma concretização de maior preferência, uma nanopartícula magnética compreende maghemita.

[0034] As nanopartículas que podem ser anexadas às bactérias de acordo com o primeiro aspecto da invenção podem ser obtidas por meio de métodos que são do conhecimento da pessoa versada na técnica, tais como, por exemplo, o método descrito por Massart (Massart, R. IEEE Trans. Magn. 1981, 1247-1248) tal como ilustrado no exemplo 1.

[0035] De acordo com uma concretização preferida, as nanopartículas são ligadas diretamente às bactérias, ou seja, elas não contêm qualquer grupo químico voltado para fora ou qualquer revestimento que possa formar interações com os componentes da parede bacteriana. De acordo com uma concretização preferida, as nanopartículas não são funcionalizadas com os grupos amina. De acordo com outra concretização preferida, as nanopartículas de metais não são revestidas com um componente polimérico. De acordo com outra concretização ainda de maior preferência, as nanopartículas não são revestidas com um poli (ácido D,L-láctico-co-glicólico)-b-poli (L-histidina)-b-poli-(etileno glicol) (PLGA-PLH-PEG).

[0036] De acordo com um concretização particular, a bactéria compreende uma nanopartícula de metal e pelo menos um metal adicional, por exemplo, 2, 3, 4 ou mais metais adicionais. Nesta concretização particular, o dito metal adicional é diferente do metal que forma uma

nanopartícula de metal. De acordo com uma concretização mais particular, o metal adicional é selecionado a partir do grupo que consiste de ferro, manganês, cobalto, níquel, cálcio, zinco, magnésio, potássio, cobre, cromo, selênio, silício, iodo e as suas combinações. De acordo com uma concretização preferida, a bactéria compreende uma nanopartícula de metal que compreende ferro, de preferência óxido de ferro, com maior preferência maghemita, e um ou mais metais adicionais selecionados a partir do grupo que consiste de manganês, cobalto, níquel, cálcio, zinco, magnésio, potássio, cobre, cromo, selênio, silício, iodo e as suas combinações. De acordo com uma concretização mais particular, a bactéria compreende uma nanopartícula de metal que compreende ferro, de preferência óxido de ferro, com maior preferência maghemita, e um ou mais metais adicionais selecionados a partir do grupo que consiste de cálcio, zinco, selênio e uma combinação dos mesmos. De acordo com uma concretização mais particular, a bactéria compreende uma nanopartícula de metal que compreende ferro, de preferência um óxido de ferro, com maior preferência maghemita, e compreende além disso um metal selecionado a partir de zinco e cálcio, com maior preferência ele compreende zinco e cálcio.

[0037] De acordo com um segundo aspecto, a invenção refere-se a uma cultura biologicamente pura da bactéria do primeiro aspecto da invenção.

[0038] Da forma que é utilizado neste contexto, o termo "cultura biologicamente pura", refere-se a uma cultura em que as bactérias da invenção são encontradas de acordo com um relação de 95% ou mais, por exemplo, 96% ou mais, 97% ou mais, 98% ou mais, 99% ou mais ou 100%, em comparação com outros organismos presentes na cultura. Da forma que é utilizado neste contexto, o termo

"cultura", refere-se a uma população das bactérias da invenção. Uma cultura pode compreender outros elementos diferentes das bactérias da invenção, tais como o meio de cultura ou qualquer outra substância e que poderá ser adicionada ao meio de cultura benéfico para o crescimento ou manutenção da cultura. O termo "meio de cultura" ou "meio" é reconhecido na técnica, e refere-se de uma maneira geral a qualquer substância ou preparado utilizado para o cultivo de células vivas. De uma maneira geral o termo "meio", quando usado com referência a uma cultura de células, inclui os componentes do ambiente que circunda as células. Os meios podem ser sólidos, líquidos, gasosos ou uma mistura de tais materiais. Os meios incluem meios de cultura líquidos, bem como meios líquidos que não sustentam o crescimento celular. Os meios também incluem meios gelatinosos tais como matrizes de agar, agarose, gelatina e colágeno. Meios gasosos exemplificativos incluem a fase gasosa a que são expostas as células em crescimento em uma placa de Petri ou outro suporte sólido ou semi-sólido. O termo "meio" também se refere ao material que se destina a ser usado de acordo com uma cultura de células, mesmo se ele ainda não tiver sido contactado com células. Em outras palavras, um líquido rico em nutrientes preparado para a cultura bacteriana é um meio. De uma forma assemelhada, uma mistura de pós que quando misturada com água ou outro líquido se torna adequada para a cultura de células pode ser chamada de um "meio em pó". "Meio definido" refere-se aos meios que são feitos de componentes definidos quimicamente (usualmente purificados). "Meios definidos" não contêm extratos biológicos mal caracterizados tais como extrato de levedura e caldo de carne. O "meio rico" inclui meios que são concebidos para suportar o crescimento da maior parte ou de todas as formas viáveis de uma espécie em

particular. Os meios ricos muitas vezes incluem extratos biológicos complexos. Qualquer meio de cultura convencional apropriado para a cultura de bactérias de ácido láctico ou bifidobactérias conhecido na técnica poderá ser usado na presente invenção, tais como, por exemplo, meio MRS, meio de HANK'S, meio APT, meio RCM, meio LM17, meio GM17 e meio de Elliker. De acordo com uma concretização particular, o meio de cultura do que pode formar parte da cultura biologicamente pura da invenção é compreendido por meio (caldo) MRS. Uma descrição do caldo MRS e de outros meios apropriados para a cultura de bactérias de ácido láctico e bifidobactérias pode ser encontrada no Handbook of Culture Media for Food Microbiology, Vol. 34, editado pela Janet E.L. Corry, G.D.W. Curtis, Rosamund M. Baird.

Método para a obtenção de uma bactéria

[0039] De acordo com um terceiro aspecto, a invenção refere-se a um método para a obtenção de uma bactéria selecionada a partir de uma bactéria de ácido láctico e a bactéria do género *Bifidobactéria* que compreende pelo menos um metal ligado à sua superfície, que compreende contactar a dita bactéria com pelo menos o dito metal, em que o dito contacto é realizado na presença de pelo menos um sal de um cátion divalente e sob uma temperatura em que o crescimento da referida bactéria é substancialmente reduzido.

[0040] Os termos "bactéria de ácido láctico", "bactéria do género *Bifidobactéria*", e "metal" foram anteriormente descritos em conexão com o primeiro aspecto da invenção.

[0041] De acordo com o método do terceiro aspecto, o contacto entre a bactéria de ácido láctico ou a bactéria do género *Bifidobactéria* e o metal deverá ser

realizado na presença de pelo menos um sal de um cátion divalente de um cátion divalente. O termo "sal de um cátion divalente", da forma que é utilizado neste contexto, refere-se a um composto em que um cátion divalente é acoplado a um contra-íons ou está em solução. O termo "cátion divalente", da forma que é utilizado neste contexto, refere-se a um elemento de acordo com um estado de oxidação positivo, resultando em uma carga elétrica positiva com uma valência de 2. Exemplos de cátions divalentes são  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{2+}$ ,  $\text{Se}^{2+}$  e  $\text{Si}^{2+}$ . De preferência, o sal de um cátion divalente é selecionado a partir de um sal de cálcio, um sal de magnésio e uma combinação dos mesmos. Com maior preferência, o sal de um cátion divalente é selecionado a partir de cloreto de cálcio, cloreto de magnésio e uma combinação dos mesmos. Ainda com maior preferência, o sal de um cátion divalente é uma combinação de cloreto de cálcio e cloreto de magnésio. Sem com isso se pretender ficar limitado por qualquer teoria particular, acredita-se que a adição do sal é capaz de afetar a superfície da bactéria aumentando a sua porosidade e aumentando desse modo a ligação ao metal.

[0042] De acordo com o método do terceiro aspecto, o contacto entre a bactéria do ácido láctico ou a bifidobactéria e o metal deverá ser realizado sob condições de temperatura em que o crescimento da dita bactéria é substancialmente reduzido. Da forma que é utilizado neste contexto, o termo "temperatura de crescimento mínima", refere-se à temperatura abaixo da qual não ocorre crescimento bacteriano equilibrado, sustentado. A temperatura de crescimento adequada para a realização do método de acordo com a invenção varia na dependência das bactérias e deverá ser determinada para cada espécie e cepa

de bactérias. A pessoa versada na técnica conhece métodos e técnicas para a determinação das condições de temperatura em que o crescimento de uma bactéria é substancialmente reduzido, tais como os métodos descritos por Shaw et al (Shaw et al, Journal of Bacteriology, 1971, Vol. 105 (2): 683-684). De acordo com uma concretização particular, o contacto entre uma bactéria de ácido láctico ou bifidobactéria e o metal é realizado sob uma temperatura compreendida entre 0°C e 10°C, com maior preferência sob 0°C.

[0043] De acordo com uma concretização preferida, a temperatura sob a qual o contacto com o metal é realizada é uma temperatura sob a qual o crescimento de uma bactéria é reduzido pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90%, ou mais com relação ao crescimento das bactérias sob a sua temperatura de crescimento ótima.

[0044] De acordo com uma concretização particular, as bactérias de ácido láctico ou as bifidobactérias são resfriadas para uma temperatura situada abaixo da temperatura de crescimento mínima, por exemplo, 0°C, antes da incubação com o metal, por exemplo, pelo armazenamento da bactéria de ácido láctico ou da cultura da bifidobactéria em gelo durante um período de tempo de, por exemplo,, 10 minutos.

[0045] As bactérias de ácido láctico ou as bifidobactérias que vão ser modificadas pelo metal de acordo com o método do terceiro aspecto podem ser obtidas por meio de cultura das bactérias apropriadas em condições de cultura padrão que são conhecidas da pessoa versada na técnica. De acordo com uma concretização particular, as bactérias de ácido láctico ou as bifidobactérias são derivadas de uma cultura de 24 horas em meio de MRS. De

acordo com uma concretização preferida, a bactéria que vai ser tratada com o método do terceiro aspecto a fim de se obter uma bactéria que compreende uma ligação de à sua superfície foi cultivada de acordo com um meio de cultura que não compreende o dito metal. Sem querer estar ligado a qualquer teoria em particular, acredita-se que uma vez que a bactéria seja contactada com o metal sob condições que não permitem crescimento bacteriano substancial, o metal não entra de forma significativa em uma bactéria, mas é incluído na superfície da bactéria.

[0046] De acordo com uma concretização particular do método do terceiro aspecto, a bactéria de ácido láctico ou a bifidobactéria é contactada com um metal que está compreendido em uma nanopartícula. O termo "nanopartícula" foi definido anteriormente neste contexto. Nesta concretização particular, o dito contacto deverá ser realizado sob um pH em que a nanopartícula de metal é dotada de uma carga eletrostática de superfície positiva. O termo "carga eletrostática de superfície", da forma que é utilizado neste contexto, refere-se à carga eletrostática ou à partícula que pode ser medida pelo potencial Zeta da nanopartícula. O termo "potencial Zeta" refere-se ao potencial elétrico na camada dupla interfacial (DL) no local do plano de deslizamento versus um ponto no fluido de massa se afasta em relação à interface. Em outras palavras, o potencial Zeta é a diferença de potencial entre o meio de dispersão e a camada estacionária de fluido anexado à partícula dispersa. A pessoa que é versada na técnica sabe como calcular o potencial Zeta de uma nanopartícula com base em uma mobilidade eletroforética determinada experimentalmente ou mobilidade eletroforética dinâmica (Delgado AV et al, 2005, Pure Appl. Chem. 77 (10):

1753-1850; Dukhin AS e Goetz PJ "Ultrasound for characterizing colloids", Elsevier, 2002).

[0047] O pH sob o qual a carga eletrostática de superfície da nanopartícula de metal é positiva dependerá da composição da nanopartícula, e pode ser determinada pela pessoa que é versada na técnica. Por exemplo, quando a nanopartícula de metal compreende maghemita, o pH deverá ser mais baixo do que: 5. De acordo com uma concretização preferida, quando a nanopartícula de metal compreende maghemita, a bactéria de ácido láctico ou a bifidobactéria e a nanopartícula de maghemita são incubadas sob um pH de 2.

[0048] Estas condições experimentais preservam o biofilme de EPS (substância polimérica extracelular) das bactérias. A presença da EPS parece ser necessária para enxertar a nanopartícula de metal para as bactérias (Figura 1c). Com efeito, quando o biofilme de EPS é removido seguindo-se protocolos padrão (Molecular cloning: a laboratory manual. Vol. 2. John J. Sambrook, David, William Russell CSHL Press, 2001), as nanopartículas de metal positivas não são fixadas à superfície externa das bactérias (Figura 1c).

[0049] De acordo com uma concretização particular, uma etapa de secagem é realizada antes da incubação da bactéria de ácido láctico ou da cultura de bifidobactérias com o metal. A dita etapa de secagem pode ser realizada por meio de qualquer técnica adequada do conhecimento da paciente versada, tais como centrifugação da cultura de células e decantação do meio.

[0050] De acordo com uma concretização particular do método do terceiro aspecto, a bactéria de ácido láctico ou a bifidobactéria é contactada com dois ou mais metais. De acordo com uma concretização mais

particular, a bactéria é contactada com um primeiro metal compreendido em uma nanopartícula, sendo o dito contacto realizado sob um pH em que a nanopartícula é dotada de uma carga eletrostática positiva, e pelo menos um metal adicional diferente do metal que está compreendido na nanopartícula. De acordo com uma concretização ainda mais específica, a bactéria é contactada com uma nanopartícula de ferro, por exemplo, uma nanopartícula de maghemita, e um metal adicional selecionado a partir de cálcio, zinco, selênio e uma combinação dos mesmos, de preferência um metal adicional selecionado a partir de cálcio, zinco e uma combinação dos mesmos, com maior preferência uma combinação de cálcio e zinco.

[0051] Os metais podem ser proporcionados por meio de uma solução que compreende um composto o qual compreende o dito metal, por exemplo, um sal do referido metal, ou por meio de uma solução que compreende nanopartículas que compreendem o dito metal.

[0052] Quando se deseja uma bactéria que compreende mais do que um metal adicional, a bactéria de ácido láctico ou a bifidobactéria poderá ser contactada com estes metais adicionais na mesma etapa, ou seja, incubação das bactérias com uma solução que compreende os diferentes metais adicionais ou, de preferência, o contacto entre a bactéria de ácido láctico ou a bifidobactéria e cada um dos diferentes metais pode ser realizada em diferentes etapas de incubação sucessivas. De acordo com uma concretização específica, a(s) etapa(s) adicional(s) é(são) realizada(s) antes da incubação da bactéria de ácido láctico ou da bifidobactéria com a nanopartícula de metal. De acordo com uma concretização mais específica, cada etapa de contacto adicional da bactéria com um metal adicional é seguida por uma etapa de secagem. A dita etapa de secagem pode

compreender, por exemplo, centrifugar a mistura das bactérias e da solução que contém metal e remover a solução.

[0053] De acordo com uma concretização específica, o método do terceiro aspecto compreende as etapas de:

- Contactar uma bactéria de ácido láctico ou uma bifidobactéria com um primeiro metal, por exemplo, cálcio.

- Contactar a bactéria de ácido láctico ou a bifidobactéria com um segundo metal, por exemplo, zinco.

- Contactar a bactéria de ácido láctico ou a bifidobactéria com uma nanopartícula que compreende um terceiro metal, por exemplo, ferro, de preferência maghemita.

[0054] De acordo com outros aspectos, a invenção também se relaciona com uma bactéria suscetível de ser obtida por meio do método do terceiro aspecto, com a bactéria obtida pelo método ou o terceiro aspecto e com a sua cultura biologicamente pura. O termo "cultura biologicamente pura" foi definido anteriormente neste contexto.

#### Gênero alimentício e composições farmacêuticas

[0055] A bactéria do primeiro aspecto e a bactéria suscetível de ser obtida por meio do método do terceiro aspecto podem ser administradas de forma oral a uma paciente tanto na forma de um gênero alimentício quanto na forma de uma composição farmacêutica.

[0056] Deste modo, de acordo com outro aspecto, a invenção refere-se a um gênero alimentício que compreende a bactéria de acordo com o primeiro aspecto ou a bactéria suscetível de ser obtida por meio do método do

terceiro aspecto ou uma cultura biologicamente pura das mesmas.

[0057] Da forma que é utilizado neste contexto, o termo "gênero alimentício" refere-se a uma substância ou composição que é adequada para o consumo humano e / ou de animais. O gênero alimentício de acordo com a presente invenção pode referir-se a um gênero alimentício de acordo com uma forma que se encontra pronta para o consumo. Não obstante, de uma forma alternativa ou adicionalmente, o termo gênero alimentício da forma que é utilizado neste contexto, pode significar um ou mais materiais alimentícios que são usados no preparo de um gênero alimentício. Exemplos não limitativos de gêneros alimentícios adequados que podem ser usados na presente invenção são leite, iogurte, queijo, coalhada, leites fermentados, produtos fermentados à base de leite, produtos baseados em cereais fermentados, produtos de carne fermentados, outros pós à base de leite ou à base de cereais, fórmulas de nutrição clínica, sorvetes, sucos, pães, bolos e doces, formulações de ração animal, formulações de dietas semi- ou sintéticas, fórmulas para lactentes, fórmulas clínicas de nutrição, sorvetes, sucos, farinhas, pães, bolos, doces ou gomas de mascar. A pessoa versada na técnica sabe como preparar gêneros alimentícios a partir de bactérias probióticas, tais como, por exemplo, as bactérias da invenção.

[0058] De acordo com um outro aspecto, a invenção refere-se a uma composição farmacêutica que compreende uma bactéria de acordo com o primeiro aspecto ou uma bactéria suscetível de ser obtida por meio do método do terceiro aspecto ou uma cultura biologicamente pura da mesma e um excipiente farmacêuticamente ativo.

[0059] Da forma que é utilizado neste contexto, o termo "composição farmacêutica", refere-se a uma composição que se destina ao uso em terapia. A composição farmacêutica é direcionada ao uso em administração oral e pode apresentar-se na forma de comprimidos, cápsulas, suspensões bacterianas líquidas, suplementos orais secos, suplementos orais molhados, alimentação por tubo seco ou uma alimentação de tubo molhado.

[0060] Da forma que é utilizado neste contexto, o termo "carreador farmacêuticamente aceitável", significa um material, composição ou veículo farmacêuticamente aceitável, tais como um enchimento líquido ou sólido, diluente, excipiente, solvente ou material de encapsulação, envolvido no carreamento ou transporte dos agentes em referência a partir de um órgão, ou parte do corpo, para um outro órgão, ou parte do corpo. Cada carreador deve ser "aceitável" no sentido de ser compatível com os outros ingredientes da formulação. Alguns exemplos de materiais que podem servir como carreadores farmacêuticamente aceitáveis incluem: (1) açúcares, tais como lactose, glicose e sacarose; (2) amidos, tais como amido de milho e amido de batata; (3) celulose, e seus derivados, tais como carboximetil celulose de sódio, etil celulose e acetato de celulose; (4) tragacanto pulverizado; (5) malte; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes, tais como manteiga de cacau; (9) óleos, tais como óleo de amendoim, óleo de caroço de algodão, óleo de girassol, óleo de gergelim, azeite de oliva, óleo de milho e óleo de soja; (10) glicóis, tais como propileno glicol; (11) polióis, tais como glicerina, sorbitol, manitol, solutol e polietileno glicol; (12) ésteres, tais como oleato de etila e laurato de etila; (13) ágar; (14)

agentes de tamponamento, tais como hidróxido de magnésio e hidróxido de alumínio; (15) ácido algínico; (16) água isenta de pirogênio; (17) solução salina isotônica; (18) solução de Ringer; (19) álcool etílico; (20) soluções tampão de fosfato; e (21) outras substâncias compatíveis não tóxicas empregadas em formulações farmacêuticas tais como DMSO (dimetilsulfóxido) e os seus derivados. Remington's Pharmaceutical Sciences. Ed. by Gennaro, Mack Publishing, Easton, Pa., 1995 expõe carreadores usados na formulação de composições farmacêuticas e técnicas conhecidas para a sua preparação.

[0061] Formas farmacêuticas adequadas para administração oral incluem qualquer composição sólida (comprimidos, pastilhas, cápsulas, granulados e assemelhados) ou composição líquida (soluções, suspensões bacterianas, emulsões, xaropes e assemelhados) e podem conter excipientes convencionais conhecidos na técnica, tais como agentes de ligação, por exemplo, xarope, acácia, gelatina, sorbitol, tragacanto, ou polivinilpirrolidona; enchimentos, por exemplo, lactose, açúcar, amido de milho, fosfato de cálcio, sorbitol ou glicina; lubrificantes para a preparação de comprimidos, por exemplo, estearato de magnésio, desintegrantes, por exemplo, amido, polivinilpirrolidona, glicolato amido de sódio ou celulose microcristalina; ou agentes de umedecimento farmacêuticamente aceitáveis, tais como lauril sulfato de sódio.

[0062] A quantidade de dosagem necessária das bactérias da invenção no gênero alimentício ou composição farmacêutica será variável de acordo com a natureza do distúrbio ou do uso proposto da composição, se é usada profilaticamente ou terapeuticamente e do tipo de organismo envolvido.

[0063] Qualquer dosagem adequada das bactérias da invenção poderá ser usada na presente invenção a partir do momento que os efeitos tóxicos não excedam os efeitos terapêuticos. A eficácia terapêutica e a toxicidade podem ser determinadas por meio de procedimentos farmacêuticos padrão com animais experimentais, tais como por meio do cálculo estatístico da ED, (a dose terapeuticamente efetiva em 50% da população) ou LD (a dose letal para 50% da população). A razão da dose de tóxico para os efeitos terapêuticos é o índice terapêutico, que pode ser expresso como a relação LD/ED. Apesar disso, a atividade das bactérias da invenção no indivíduo é naturalmente dependente de dose bem como dependente da carga na nanopartícula de metal das bactérias. São preferidas as composições que exibem grandes índices terapêuticos. Os dados obtidos a partir de estudos de animais são usados para formular uma faixa de dosagem para o uso em seres humanos ou animais. A dosagem contida nessas composições está de preferência de acordo com uma faixa de concentrações de circulação que incluem a ED, com pouca ou nenhuma toxicidade. A dosagem varia dentro na dependência da forma de dosagem empregada, da sensibilidade do paciente, e da via de administração. A dosagem exata será determinada pelo médico, à luz dos fatores relacionados com a paciente que está necessitando do tratamento. Por exemplo, para a preparação de um gênero alimentício de acordo com o presente invenção a bactéria da invenção é incluída de acordo com um suporte adequado, de acordo com uma quantidade desde  $10^5$  cfu/g até cerca de  $10^{12}$  cfu/g de material de suporte, de preferência desde cerca de  $10^6$  cfu/g até cerca de  $10^{11}$  cfu/g de material de suporte, com maior preferência a partir de cerca de  $10^6$  cfu/g até cerca de  $10^{10}$  cfu/g material de suporte.

[0064] No caso de uma composição farmacêutica, a dosagem da bactéria da invenção deverá variar desde cerca de  $10^5$  cfu/g até cerca de  $10^{14}$  cfu/g de material de suporte, de preferência a partir de cerca de  $10^6$  cfu/g até cerca de  $10^{13}$  cfu/g de material de suporte, com maior preferência a partir de cerca de  $10^7$  cfu/g até cerca de  $10^{12}$  cfu/g de material de suporte. Para o propósito da presente invenção a abreviatura cfu deverá ter o significado de uma "unidade de formação de colônia" que é definida como o número de células bacterianas como reveladas por contagens microbiológicas em placas de agar.

[0065] A dosagem e administração são ajustadas de forma a proporcionarem níveis suficientes de nanopartícula de metal ou a manter o efeito desejado. Fatores que podem ser levados em consideração incluem a gravidade do estado da enfermidade, a saúde geral do paciente, a idade, peso, e gênero do paciente, tempo e frequência de administração, combinação(s) de fármacos, sensibilidades de reação, e resposta à terapia. As composições de ação prolongada podem ser administradas a cada 3 até 4 dias, cada semana, ou quinzenalmente na dependência dependendo da taxa de depuração e meia-vida da formulação particular.

Método para o tratamento e / ou prevenção de enfermidades causadas por uma deficiência de metal

[0066] A bactéria da invenção é adequada para ser usada como suplemento oral para uma paciente com necessidade de um metal. A administração de um metal por meio da bactéria da invenção é vantajosa, entre outras razões, pelo fato de que a nanopartícula de metal é especificamente liberada no intestino, evitando a liberação do metal no estômago, o que de um modo geral conduz a efeitos colaterais indesejados (exemplo 2, figura 5). Além

disso, diferentes metais, tais como cálcio ou zinco, associados a uma bactéria de ácido láctico ou uma bifidobactéria também são liberados em ambas as condições de estômago e intestino (exemplo 2, figuras 6 e 7), o que faz com que estas bactérias sejam plataformas adequadas para a suplementação oral de vários metais. Por essa razão, de acordo com outro aspecto, a invenção refere-se a uma bactéria selecionada a partir da bactéria do primeiro aspecto e da bactéria suscetível de ser obtida por meio do método do terceiro aspecto, ou uma cultura biologicamente pura do mesmo para o seu uso no tratamento e / ou prevenção de uma enfermidade ou condição associada com uma deficiência de metal, em que a bactéria compreende o metal que se encontra deficiente na dita enfermidade ou condição e em que a bactéria ou cultura é administrada de uma forma oral.

[0067] De acordo com outro aspecto, a invenção refere-se ao uso de uma bactéria selecionada a partir da bactéria do primeiro aspecto e da bactéria suscetível de ser obtida por meio do método do terceiro aspecto, ou uma cultura biologicamente pura do mesmo, na manufatura de um medicamento para o tratamento e / ou prevenção de uma enfermidade ou condição associada com uma deficiência de metal, em que a bactéria compreende o metal é deficiente na dita enfermidade ou condição e em que a bactéria ou cultura é administrada de uma forma oral.

[0068] De acordo com outro aspecto, a invenção refere-se a um método terapêutico para o tratamento e / ou prevenção de uma enfermidade ou condição associada com uma deficiência de metal, que compreende administrar a uma paciente uma quantidade terapeuticamente efetiva de uma bactéria selecionada a partir da bactéria do primeiro aspecto e a bactéria suscetível de ser obtida por

meio do método do terceiro aspecto, ou uma cultura biologicamente pura do mesmo, em que a bactéria compreende o metal que é deficiente na dita enfermidade ou condição e em que a bactéria ou cultura é administrada de uma forma oral.

[0069] O termo "metal" foi definido em conexão com a bactéria da invenção. De acordo com uma concretização particular do método para o tratamento e / ou prevenção de enfermidades causadas por uma deficiência de metal, o metal é compreendido por cálcio ou zinco. De acordo com um concretização particular, o metal é compreendido por um "cátion de metal". Da forma que é utilizado neste contexto, o termo "cátion de metal", refere-se a um elemento de metal de acordo com um estado de oxidação positiva que resulta em uma carga elétrica positiva. De acordo com uma concretização específica, o cátion de metal é compreendido por um cátion de metal divalente, ou seja, um cátion de metal com uma valência de 2. Exemplos de cátions de metais divalentes são  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{2+}$ ,  $\text{Se}^{2+}$  e  $\text{Si}^{2+}$ . De acordo com uma concretização particular, o cátion de metal divalente é compreendido por  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Zn}^{2+}$ .

[0070] De acordo com outra concretização particular do método de tratamento e / ou prevenção, a bactéria compreende mais do que um metal, por exemplo, 2, 3, 4, 5 ou mais metais. De acordo com uma concretização mais específica, a bactéria compreende cálcio e zinco.

[0071] A bactéria de ácido láctico ou bifidobactéria que compreende pelo menos um metal de utilidade para o método para o tratamento e / ou prevenção de enfermidades causadas por uma deficiência de metal poderá ser obtida pelo contactado da dita bactéria de ácido láctico ou bifidobactéria com o dito metal. Um método

ilustrativo não limitativo para a obtenção das ditas bactérias que compreendem um ou mais metais é proporcionado no exemplo 2 do presente pedido de patente.

[0072] De acordo com uma concretização particular, o metal está associado com a superfície da bactéria.

[0073] De acordo com outra concretização particular, o metal está compreendido em uma ligação de nanopartícula à superfície da bactéria. O termo "nanopartícula" bem como concretizações específicas e preferidas da mesma foram descritas anteriormente neste contexto.

[0074] De acordo com uma concretização particular, a bactéria de ácido láctico ou a bifidobactéria compreende uma nanopartícula de metal, e pelo menos um metal adicional diferente do metal compreendido na nanopartícula. De preferência, a nanopartícula de metal compreende um óxido, com maior preferência óxido de ferro, ainda com maior preferência maghemita. De preferência, o pelo menos um metal adicional é selecionado a partir do grupo que consiste de ferro, manganês, cobalto, níquel, cálcio, zinco, magnésio, potássio, cobre, cromo, selênio, silício, iodo e as suas combinações. Com maior preferência, o metal adicional é compreendido por cálcio, zinco, selênio ou uma combinação dos mesmos. Ainda com maior preferência, o metal adicional é compreendido por cálcio e zinco.

[0075] De acordo com uma concretização particular, quando o metal é compreendido por selênio ele não está na forma de selenocisteína.

[0076] De acordo com uma concretização mais específica, a bactéria de ácido láctico ou

bifidobactéria compreende uma nanopartícula de maghemita, cálcio e zinco.

[0077] Da forma que é utilizado neste contexto, o termo "tratamento", refere-se a qualquer processo, ação, aplicação, terapia, ou outro assemelhado em que uma paciente (ou paciente), que inclui um ser humano, é fornecida assistência médica com o objetivo de melhorar a condição da paciente, diretamente ou indiretamente, ou retardar a progressão de uma condição ou distúrbio na paciente, ou melhorar pelo menos um sintoma da enfermidade ou distúrbio submetido ao tratamento.

[0078] Da forma que é utilizado neste contexto, o termo "prevenção", significa que a bactéria da invenção é de utilidade quando administrada a um paciente o qual não foi diagnosticado como tendo possivelmente o distúrbio ou enfermidade na ocasião da administração, mas que seria normalmente esperado que desenvolvesse a enfermidade ou distúrbio ou estar em maior risco para o distúrbio ou enfermidade. De acordo com a invenção, a bactéria da invenção retardará o desenvolvimento dos sintomas da enfermidade ou distúrbio, retardará o aparecimento do distúrbio ou enfermidade, ou impedirá de qualquer modo que o indivíduo desenvolva o distúrbio ou enfermidade.

[0079] Da forma que é utilizado neste contexto, o termo "paciente" ou "paciente", refere-se a qualquer animal, de preferência um mamífero e inclui, sendo que não se fica limitado aos mesmos, animais domésticos e de fazenda, primatas e humanos, por exemplo, seres humanos, primatas não humanos, vacuns, cavalos, porcos, ovelhas, cabras, cachorros, gatos, ou roedores. De acordo com uma concretização preferida, o paciente é compreendido por um ser humano de qualquer idade ou raça. De acordo com uma

concretização particular, o paciente padece de uma enfermidade associada com uma deficiência de metal. De acordo com outra concretização particular, o paciente não foi diagnosticado como sofrendo de uma enfermidade associada com uma deficiência de metal, mas é considerado como estando em maior risco de desenvolver a dita enfermidade.

[0080] Da forma que é utilizado neste contexto, o termo "enfermidade ou condição associada com uma deficiência de metal" refere-se a uma condição que apresenta baixos níveis séricos de um ou mais metais. Os baixos níveis séricos de um metal que são considerados baixos níveis séricos variam na dependência de parâmetros tais como sexo e idade e são conhecidos da pessoa versada na técnica. A deficiência de metais pode resultar da ingestão insuficiente, digestão, absorção ou utilização do dito metal.

[0081] De acordo com uma concretização particular, a enfermidade ou condição associada com uma deficiência de metal é selecionada a partir do grupo que consiste de uma enfermidade ou condição associada com deficiência de ferro, uma enfermidade ou condição associada com deficiência de manganês, uma enfermidade ou condição associada com deficiência de cobalto, uma enfermidade ou condição associada com deficiência de níquel, uma enfermidade ou condição associada com deficiência cálcio, uma enfermidade ou condição associada com deficiência de zinco, uma enfermidade ou condição associada com deficiência de magnésio, uma enfermidade ou condição associada com deficiência de potássio, uma enfermidade ou condição associada com deficiência de cobre, uma enfermidade ou condição associada com deficiência de cromo, uma enfermidade ou condição associada com a deficiência de

selênio, uma enfermidade ou condição associada com a deficiência de silício e uma enfermidade ou condição associada com a deficiência de iodo.

[0082] Exemplos ilustrativos, não limitativos de enfermidades ou condições associadas com deficiências de metais são compreendidos pelos seguintes:

- Enfermidades ou condições associadas com a deficiência ferro: fraqueza, fadiga, palidez da pele, falta de ar, anemia, auto-imunidade baixa, depressão, pressão arterial baixa, distúrbios da fala, memória fraca e resfriados.

- Enfermidades ou condições associada com a deficiência de manganês: distúrbio de hiperatividade déficit de atenção (ADHD), asma, síndrome do túnel carpal, convulsões, perda da libido, aborto, retardo de crescimento e pesadelos.

- Enfermidades ou condições associadas com a deficiência de cobalto: anemia perniciosa, fadiga grave, falta de ar e baixa da tireóide.

- Enfermidades ou condições associadas com a deficiência de níquel: hiperglicemia (açúcar no sangue elevado), pressão arterial baixa, depressão, enfermidade hepática, anemia, baixa acidez estomacal, congestão nasal, fadiga e baixos supra-renais.

- Enfermidades ou condições associadas com a deficiência de cálcio: raquitismo, osteomalacia, osteoporose, recessão gengival, síndrome pré-menstrual, ataques de pânico, câibras musculares, pulmões fracos, dor lombar inferior, cálculos renais, insônia, fragilidade óssea, osteófitos e depósitos de cálcio.

- Enfermidades ou condições associadas com a deficiência de zinco: perda do paladar, perda do olfato,

retardamento de crescimento, desenvolvimento sexual atrasado, cicatrização lenta, ADHD, perda de cabelo, defeitos de nascimento, odor corporal, distúrbios cerebrais, diarreia, defeitos cardíacos, hérnia, impotência, distúrbios do pulmão e distúrbios da próstata.

- Enfermidades ou condições associadas com a deficiência de magnésio: fraqueza muscular e câibras, náuseas, arritmias cardíacas, TDAH, calcificação arterial, baixa absorção de cálcio, convulsões, depressão, distúrbios gastrointestinais, distúrbios de crescimento, enxaqueca menstrual, osteoporose, tremores, tonturas e desmaios.

- Enfermidades ou condições associadas com a deficiência de potássio: náusea, anorexia, irritabilidade, fraqueza muscular, medo, doença mental, baixa energia, dores e pontadas, acidez, tendência à violência, desconfiança, perda de ambição, nervosismo e negatividade.

- Enfermidades ou condições associadas com a deficiência de cobre: ADHD, anemia, artrite, violência, paralisia cerebral, colesterol alto, pálpebras caídas, cabelos brancos, hérnia, cirrose hepática, problemas de aprendizagem, baixa de açúcar no sangue, alto risco de acidente vascular cerebral e varizes.

- Enfermidades ou condições associadas com a deficiência de cromo: ADHD, perda inesperada de peso, baixa contagem de espermatozóides, diabetes, depressão maníaca, problemas de aprendizagem, problemas de crescimento, hiperatividade, enfermidade vaso coronário, catarata e níveis de açúcar anormais.

- Enfermidades ou condições associadas com a deficiência de selênio: manchas senis, envelhecimento da pele, doença de Alzheimer, câncer, fibrose cística, fadiga,

palpitações cardíacas, HIV, hipotireoidismo, lesões do fígado, fraqueza muscular e escoliose.

- Enfermidades ou condições associadas com a deficiência de silício: cabelos quebradiços, unhas das mãos e dos pés quebradiças, má qualidade da pele, má utilização de cálcio e enfermidade arterial.

- Enfermidades ou condições associadas com a deficiência de iodo: bócio, distúrbios menstruais, confusão mental, problemas cardíacos e pulmonares.

[0083] De acordo com o primeiro uso terapêutico da invenção, uma nanopartícula de metal que compreende o metal que é deficiente na enfermidade ou condição a ser tratada é administrada ao paciente com necessidade do mesmo. Por exemplo, se um paciente vai ser tratado de uma enfermidade relacionada com a deficiência de ferro, ou se a prevenção de uma enfermidade associada com a deficiência de ferro é desejável de acordo com um paciente sujeito ao risco de desenvolver a dita enfermidade, uma bactéria que compreende uma nanopartícula de ferro é administrada a este paciente.

[0084] De acordo com os primeiros usos terapêuticos e métodos da invenção, a bactéria ou a cultura biologicamente pura é administrada de forma oral.

[0085] Da forma que é utilizado neste contexto, o termo "administração oral", refere-se a qualquer forma de distribuição da bactéria ou cultura da invenção a um paciente, em que a bactéria ou cultura da invenção é colocada na boca do paciente, quer a bactéria ou cultura da invenção seja ou não imediatamente engolida. Deste modo a "administração oral" inclui uma administração bucal e sublingual da mesma forma que esofágica.

[0086] Da forma que é utilizado neste contexto, o termo "quantidade terapêuticamente efetiva",

refere-se à quantidade suficiente de uma bactéria ou cultura da invenção para proporcionar o efeito desejado e será de uma maneira geral determinada por, entre outras causas, as características da bactéria ou cultura da invenção propriamente dita e do efeito terapêutico a ser obtido. Ela dependerá igualmente do paciente a ser tratado, da gravidade da enfermidade sofrida pelo dito paciente, da forma de dosagem selecionada, e outras assemelhadas. Por esta razão, as doses mencionadas nesta invenção devem ser consideradas tão somente como guias para a pessoa versada na técnica, que deve ajustar as doses na dependência das variáveis supracitadas. De acordo com uma concretização, a quantidade efetiva produz a melhoria de um ou mais sintomas da enfermidade que está sendo tratada, por exemplo, a normalização dos níveis do metal em que havia deficiência no paciente.

#### métodos para o tratamento de câncer

[0087] As bactérias de acordo com a invenção ou as culturas biologicamente puras de acordo com a invenção também são adequadas para distribuírem nanopartículas magnéticas ao trato gastrointestinal. As nanopartículas magnéticas dispostas na superfície das bactérias fazem com que as bactérias exibam momentos magnéticos permanentes e resposta magnética mais forte. Em um campo magnético alternado aplicado, os momentos magnéticos das nanopartículas magnéticas poderão ser reorientadas periodicamente, conduzindo à conversão da energia magnética em energia térmica, e a temperatura das regiões circundantes foi rapidamente elevada para a faixa de temperatura terapêutica (mais alta do que 42°C), o que poderia resultar na morte por hipertermia das células vizinhas.

[0088] Deste modo, de acordo com outro aspecto, a invenção refere-se a uma bactéria de acordo com o primeiro aspecto ou a uma bactéria suscetível de ser obtida por meio do método do terceiro aspecto ou a uma cultura biologicamente pura do mesmo para o seu uso no tratamento de câncer, em que o metal está compreendido em uma nanopartícula magnética.

[0089] De acordo com outro aspecto, a invenção refere-se ao uso de uma bactéria de acordo com o primeiro aspecto ou da bactéria suscetível de ser obtida pelo método do terceiro aspecto ou a uma cultura biologicamente pura da mesma na manufatura de um medicamento para o tratamento de câncer, em que o metal está compreendido em uma nanopartícula magnética.

[0090] De acordo com outro aspecto, a invenção refere-se a um método terapêutico para o tratamento de câncer, que compreende administrar a um paciente uma quantidade terapêuticamente efetiva de uma bactéria de acordo com o primeiro aspecto ou a uma bactéria suscetível de ser obtida por meio do método do terceiro aspecto ou uma cultura biologicamente pura da mesma, em que o metal está compreendido em uma nanopartícula magnética.

[0091] Os termos "tratamento", "paciente" e "quantidade terapêuticamente efetiva" foram previamente definidos em conexão com os usos terapêuticos e métodos para o tratamento e / ou prevenção de enfermidades associada com deficiência de metal.

[0092] Da forma que é utilizado neste contexto, o termo "câncer", refere-se a uma enfermidade caracterizada por uma divisão de células descontrolada (ou por um aumento da sobrevivência ou resistência à apoptose), pela capacidade das ditas células invadirem outros tecidos das proximidades (invasão) ou pela disseminação para outras

áreas do corpo onde as células não estão normalmente localizadas (metástase) através dos vasos linfáticos e sanguíneos. Na dependência de se eles podem propagar-se ou não por invasão e metástase, os tumores são classificados como sendo benignos ou malignos: os tumores benignos são tumores que não podem se propagar pela invasão ou metástase, ou seja, eles apenas crescem localmente; enquanto que os tumores malignos são tumores que são capazes de se propagarem por invasão e metástase. Da forma que é utilizado neste contexto, o termo câncer inclui, sendo que não se fica limitado aos mesmos, os seguintes tipos de câncer: câncer de mama; câncer do trato biliar; câncer de bexiga; câncer cerebral incluindo glioblastomas e medulloblastomas; câncer cervical; coriocarcinoma; câncer de cólon; câncer do endométrio; câncer de esôfago; câncer gastrointestinal; câncer gástrico; neoplasmas hematológicos que incluem leucemia linfocítica aguda e mielogênica; leucemia aguda/linfoma linfoblástico das células "T"; leucemia das células pilosas; leucemia mielogênica crônica, mieloma múltiplo; leucemias associadas com AIDS e leucemia de células T de adulto / linfoma; neoplasmas intraepiteliais que incluem doença de Bowen e doença de Paget; câncer de fígado; câncer de pulmão; linfomas que incluem doença de Hodgkin e linfomas linfocíticos; neuroblastomas; câncer oral incluindo carcinoma de células escamosas; câncer de ovário inclusive os decorrentes de células epiteliais, células estromais, células germinativas e células mesenquimais; câncer de pâncreas; câncer de próstata; câncer retal; sarcomas incluindo leiomiossarcoma, rabdomiossarcoma, lipossarcoma, fibrossarcoma, e osteossarcoma; cancer de pele, incluindo melanoma, carcinoma de células de Merkel, do sarcoma de Kaposi, carcinoma de células basais, e carcinoma de células

escamosas; câncer testicular incluindo tumores germinais como seminoma, nonseminoma (teratomas, coriocarcinoma), tumores estromais e tumores de células germinativas; câncer da tireóide incluindo adenocarcinoma da tireóide e carcinoma medular; e câncer renal incluindo adenocarcinoma e tumor de Wilms. Outros cânceres serão do conhecimento daqueles normalmente versados na técnica.

[0093] De acordo com uma concretização específica, o câncer é compreendido por um cancer gastrointestinal. Da forma que é utilizado neste contexto, o termo "câncer gastrointestinal", refere-se a qualquer tipo de câncer que afeta o trato gastrointestinal, incluindo o esôfago, estômago, o sistema biliar, pâncreas, intestino delgado, intestino grosso e o reto ou o cólon. De acordo com uma concretização específica, o câncer gastrointestinal é compreendido por um câncer de estômago, um câncer do intestino delgado ou do intestino grosso ou câncer cólon.

[0094] De acordo com os métodos terapêuticos e usos para o tratamento de câncer, a bactéria da invenção pode ser administrada por meio de qualquer via adequada, por exemplo, via oral, via parentérica ou via intravenosa. De acordo com uma concretização preferida, a bactéria ou cultura da invenção são administradas de forma oral. O termo "administração oral" foi definido anteriormente neste contexto.

[0095] De acordo com uma concretização particular dos métodos terapêuticos e usos para o tratamento de câncer, a bactéria de acordo com o primeiro aspecto é capaz de ser transferida para a glândula mamária depois da ingestão oral. Os métodos para se detectar a capacidade de a bactéria ser transferida para a glândula mamária foram descritos anteriormente em conexão com a

bactéria do primeiro aspecto, da mesma forma que exemplos e concretizações específicas das bactérias. Nesta concretização particular, a bactéria da invenção é de utilidade para o tratamento de um cancer de mama. Deste modo, de acordo com uma concretização particular do método terapêutico e usos da invenção, o câncer é compreendido por câncer de mama e a bactéria é compreendida por uma bactéria capaz de ser transferida para a glândula mamária depois de ingestão oral.

[0096] O termo "cancer de mama" refere-se a qualquer distúrbio celular mamário proliferante maligno, que ocorre usualmente nos dutos (os tubos que transportam o leite ao mamilo) e lóbulos (glândulas produtoras de leite).

[0097] De acordo com uma concretização específica, o método terapêutico para o tratamento de câncer compreende a etapa de direcionar para o tumor uma bactéria de acordo com o primeiro aspecto.

[0098] A etapa de direcionar a bactéria de acordo com a invenção para um tumor poderá ser realizada por meio de diferentes mecanismos. De acordo com uma concretização, a bactéria é direcionada ao tumor devido à sua preferência para microambiente tumoral anaeróbico. De acordo com outra concretização, a bactéria que compreende uma nanopartícula magnética, previamente definida, é guiada e puxada para o tumor-alvo por um ou mais campos magnéticos ou gradientes de campo magnético (por exemplo, uma fonte externa de campos magnéticos ou gradientes de campo magnético). Esses campos ou gradientes pode ser gerados por meio de, por exemplo, um ou mais ímãs e dispositivos médicos associados colocados dentro ou adjacentes a um tumor alvo antes de, durante ou depois da distribuição da bactéria. De acordo com algumas concretizações, os ímãs são colocados dentro do corpo utilizando-se métodos

cirúrgicos ou percutâneos dentro do tumor alvo, ou no lado externo do tumor alvo (por exemplo, em torno de ou adjacente ao tumor alvo). De acordo com algumas concretizações, os ímãs são compreendidos por ímãs externos que são colocados no lado externo do corpo de um paciente para criar uma fonte externa de campo magnético em torno de ou adjacente ao tumor alvo. De acordo com algumas concretizações, a fonte de campos magnéticos é compreendida por um ímã permanente (por exemplo, um ímã de neodímio (NdFeB)). De acordo com uma concretização, a fonte de campos magnéticos é compreendida por um eletroímã. De acordo com outras concretizações, a dimensão dos ímãs varia a partir de cerca de 1 mm até cerca de 10 m e a intensidade dos campos magnéticos varia desde cerca de 0,1 Tesla até cerca de 100 Tesla, incluindo cerca de 0,1 até cerca de 0,5 Tesla, cerca de 0,5 até cerca de 1 Tesla, cerca de 1 Tesla até cerca de 1,1 Tesla, cerca de 1,1 Tesla até cerca de 1,2 Tesla, cerca de 1,2 Tesla até cerca de 1,3 Tesla, cerca de 1,3 Tesla até cerca de 1,4 Tesla, cerca de 1,4 Tesla até cerca de 1,5 Tesla, cerca de 1,5 Tesla até cerca de 2 Tesla, cerca de 2 Tesla até cerca de 4 Tesla, cerca de 4 Tesla até cerca de 10 Tesla, cerca de 10 Tesla até cerca de 30 Tesla, cerca de 30 Tesla até cerca de 50 Tesla, cerca de 50 Tesla até cerca de 70 Tesla, cerca de 70 Tesla até cerca de 90 Tesla, e faixas de sobreposição dos mesmos. De acordo com diversas concretizações, o campo magnético é aplicado durante um período de tempo o qual é variável desde cerca de 1 minuto até cerca de 5 horas. De acordo com algumas concretizações, o campo magnético é aplicado durante cerca de 1 minuto até 5 minutos, cerca de 5 minutos até cerca de 10 minutos, cerca de 10 minutos até cerca de 20, cerca de 20 minutos até cerca de 30 minutos, e faixas de sobreposição dos mesmos. De acordo com várias

concretizações, o campo magnético é aplicado durante cerca de 5-15 minutos, incluindo cerca de 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, ou 14 minutos.

[0099] De acordo com algumas concretizações, a fonte de campos magnéticos varia desde cerca de um ou mais ímãs de uma aparelhagem (por exemplo, um grupo de ímãs como um aparelho essencial para dar forma e foco ao campo magnético). Uma tal aparelhagem pode incluir, por exemplo, uma ferramenta cirúrgica (por exemplo, cateteres, arames de guia, e ferramentas secundárias, tais como lasers e balões, agulhas de biópsia, sondas de endoscopia, e dispositivos similares) com um acessório de ponta magnética (vide, por exemplo, a patente U.S. N°. 7.280.863 e as publicações dos pedidos de patentes U.S. N°s. 200711116006, 2006/0116634, 2008/0249395, 2006/0114088 e 2004/0019447). Deste modo, de acordo com algumas concretizações, as bactérias são distribuídas e utiliza-se um ímã externo para direcionar as bactérias.

[0100] Quando a bactéria da invenção compreende uma nanopartícula magnética, a dita bactéria poderá ser usada para aplicar uma terapia de calor a um tumor, de preferência um tumor sólido, por meio de um campo magnético alternado aplicado na proximidade do tumor. Nesta concretização, uma vez que uma bactéria carregada de nanopartícula magnética alcançou o tumor, um campo magnético alternativo é aplicado na proximidade do tumor, resultando na produção de calor por uma bactéria carregada por uma nanopartícula magnética. Este tratamento térmico induz a destruição parcial ou total das células tumorais e / ou do(s) tumor(s). Uma vez que as células tumorais são mais sensíveis ao calor do que as células saudáveis (vide, por exemplo: Overgaard et al., *Cancer*, 1977, 39, 2637 - 2646), a termoterapia descrita nesta exposição poderá

destruir seletivamente as células tumorais. Deste modo, de acordo com uma concretização particular, o método terapêutico compreende a etapa de

i) direcionar uma bactéria de acordo com o primeiro aspecto que compreende uma nanopartícula magnética para um tumor e

ii) aplicar um campo magnético alternativo em torno de ou adjacente ao tumor.

[0101] Da forma que é utilizado neste contexto, o termo "campo magnético alternativo" ou "campo magnético oscilante", refere-se a um campo magnético cuja intensidade mudanças ao longo do tempo. De acordo com uma concretização, o campo magnético alternativa aplicado durante o tratamento é caracterizado por uma freqüência que se situa entre cerca de 50 k Hz e cerca de 1000 k Hz, de preferência entre cerca de 100 k Hz e cerca de 500 k Hz, com maior preferência entre cerca de 1 00 kHz e cerca de 200 k Hz.

[0102] De acordo com outra concretização, o campo magnético é caracterizado por uma intensidade que se situa entre cerca de 0,1 mT e cerca de 200 mT, de preferência entre cerca de 1 mT e cerca de 100 mT, com maior preferência entre cerca de 10 mT e cerca de 60 mT, tipicamente entre cerca de 10 mT e cerca de 50 mT.

[0103] O valor máximo da intensidade do campo magnético é determinado pelo valor sob o qual ele se torna tóxico para o organismo (ou seja, essencialmente quando ele gera correntes de Foucault). Pode ser possível que os campos magnéticos de dosagens mais elevadas do que 200 mT possam ser usados na terapia se os mesmos mostrarem ser não tóxicos.

[0104] De acordo com outra concretização, o método da presente invenção é caracterizado por o espaço

de tempo durante o qual o campo magnético é aplicado. Este espaço de tempo pode ficar situado entre cerca de 1 segundo e cerca de 6 horas, de preferência entre cerca de 1 minuto e cerca de 1 hora, de preferência entre 0,5 e 30 minutos, com maior preferência entre 1 minuto e 30 minutos.

[0105] O tratamento térmico é aplicado de preferência a pacientes anestesiados. Por essa razão, o tempo durante o qual o tratamento é realizado pode ser igual ou menor do que o espaço de tempo da anestesia. Um tratamento térmico pode deste modo ser realizado potencialmente durante mais do que 6 horas, por exemplo, se um paciente for anestesiado durante mais do que 6 horas.

[0106] De acordo com outra concretização, o método da presente invenção é caracterizado pela quantidade de bactérias associadas a nanopartículas magnéticas usadas durante a terapia. Esta quantidade de bactérias associadas a nanopartículas magnéticas-está relacionada a uma carga de nanopartículas magnéticas das bactérias e à carga de material magnético da nanopartícula. Esta quantidade é estimada pela medição da quantidade de material magnético presente na suspensão de bactérias associadas com as nanopartículas magnéticas, que é administrada. A quantidade de bactérias associadas com as nanopartículas magnéticas, que precisam ser injetadas, depende essencialmente do volume do tumor tratado, da temperatura requerida durante o tratamento e o método de injeção. O maior volume de tumor e a temperatura de tumor mais elevada requerem a maior quantidade de bactérias associadas com as nanopartículas magnéticas administradas.

[0107] De acordo com outra concretização, a concentração da suspensão de bactérias associadas com as nanopartículas magnéticas fica situada tipicamente entre 1 mg/ml e 100 mg/ml, de preferência entre 10 mg/ml e 50

mg/ml, onde esta concentração representa a quantidade de material magnético, de preferência óxido de ferro, com maior preferência maghemita, contido dentro da suspensão.

[0108] De acordo com outra concretização, a administração das bactérias associadas com as nanopartículas magnéticas ao paciente é repetida. O número de repetições depende da quantidade de bactérias associadas com as nanopartículas magnéticas que é administrada de uma vez. Se apenas uma pequena quantidade de bactérias associadas com as nanopartículas magnéticas for administrada de uma única vez, a etapa de administração pode ser repetida diversas vezes até a quantidade desejada de bactérias associadas com as nanopartículas magnéticas ser administrada a um paciente.

[0109] De acordo com outra concretização o tratamento térmico iniciado pela aplicação do campo magnético alternativo é repetido. Os sucessivos tratamentos térmicos aplicados depois da administração de uma dada quantidade de bactérias associadas com as nanopartículas magnéticas são chamados de um ciclo térmico.

[0110] A determinada quantidade de bactérias associadas com as nanopartículas magnéticas usadas para cada ciclo de calor pode ter sido administrada através de uma única administração ou através de várias administrações sucessivas tal como foi exposto anteriormente neste contexto. Os diferentes tratamentos térmicos dentro de um ciclo de calor são separados uns dos outros por meio de um ciclo de repouso. O tempo de repouso pode ser igual a 1 segundo ou mais longo do que 1 segundo, de preferência igual a 1 minuto ou mais longo do que 1 minuto, com maior preferência igual a 10 minutos ou mais longo do que 10 minutos, de preferência igual ou mais longo do que 30 minutos.

[0111] De acordo com uma concretização, os diferentes tratamentos térmicos dentro de um ciclo de calor são separados uns dos outros por meio de um tempo de descanso mais longo do que aquele mencionado anteriormente. Este tempo de descanso pode estar situado entre 1 dia e 15 dias.

[0112] De acordo com uma concretização, o ciclo de calor é repetido de 1 até 648 000 vezes, em particular 1 até 10 1000 vezes, com maior particularidade de 1 até 100 vezes, tipicamente de 1 até 10 vezes. A taxa de repetição mais alta de 648 000 vezes é estimada ao supor-se que o tratamento é realizado durante um tempo muito curto, tipicamente cerca de um segundo, durante 15 dias com um tempo de descanso muito curto, tipicamente cerca de um segundo de tempo de repouso separando cada tratamento. O número de repetições do tratamento depende do espaço de tempo do tratamento. Preferencialmente, quanto mais longo for o tratamento menor será a repetição necessária a partir do momento que os outros parâmetros da terapia (tais como a intensidade e ou frequência do campo magnético aplicado) sejam fixos.

[0113] A transformação da energia magnética para ablação térmica tem demonstrado amplamente que induz a distribuição de fármacos com controle espacial e temporal dependente das suas operações "liga-desliga" do campo magnético de alta frequência aplicada (J. Liu, Y. Zhang, C. Wang, R. Xu, Z. Chen, N. Gu, J. Phys. Chem. C 114 (2010) 7673-7679). Como um exemplo, nanopartículas magnéticas com ibuprofeno no polímero de álcool polivinílico (PVA) e Pluronic F68, e uma camada fina de sílica exhibe comportamento de liberação de fármaco desencadeada magneticamente rápida (S.H. Hu, Y.Y. Chen, T.C. Liu, T.H. Tung, D.M. Liu, S.Y. Chen, Chem. Commun. 47

(2011) 1776-1778). Por essa razão, de acordo com outra concretização, a bactéria da invenção que compreende uma nanopartícula magnética compreende além disso um agente terapêutico de utilidade no tratamento de câncer. De acordo com uma concretização o agente é codificado em um vetor capaz de expressar pelo menos um gene exógeno que codifica o dito agente. Nesta concretização, a bactéria da invenção é transformada com o vetor. De acordo com outra concretização o agente o agente está ligado a uma bactéria da invenção. O agente pode ser encadeado, ligado, fixo ou acoplado ou anexado quimicamente a uma bactéria da invenção ou a uma membrana de bactéria ou anexado / ligado por meio de quaisquer outros meios conhecidos da pessoa versada na técnica. De acordo com outra concretização, o agente é ligado à nanopartícula de metal ou encapsulado na nanopartícula de metal. O método para a ligação do agente à nanopartícula de metal ou para encapsular o agente dentro da nanopartícula de metal dependerá da natureza do agente, e é do conhecimento da pessoa versada na técnica.

[0114] Da forma que é utilizado neste contexto, o termo "agente terapêutico de utilidade no tratamento de câncer", refere-se a um agente adequado para ser usado no tratamento de câncer, tais como um agente citotóxico, um agente antiangiogênico ou um agente antimetastático.

[0115] Os agentes citotóxicos que podem ser usados de acordo com esta concretização do método terapêutico da invenção para o tratamento de câncer incluem, sendo que não se fica limitado aos mesmos, antibióticos de antraciclina tais como doxorubicina e daunorubicina, taxanas tais como Taxol™ e docetaxel, alcalóides de vinca tais como vincristina e vinblastina, 5-fluorouracil (5-FU), leucovorin, irinotecan, idarubicina,

mitomicina C, oxaliplatina, raltitrexed, tamoxifen, cisplatina, carboplatina, metotrexato, actinomicina D, mitoxantrona, blenoxana ou mitramicina. Agentes antiangiogênicos que podem ser usados em combinação com os anticorpos da invenção para o tratamento de câncer incluem, sendo que não se fica limitado aos mesmos, um agente antiangiogênico selecionado a partir do grupo de paclitaxel, 2-metoxiestradiol, prinomastat, batimastat, BAY 12-9566, carboxiamidotriazol, CC-1088, ácido acético dextrometorfan, ácido acético dimetilxantenona, endostatin, IM-862, marimastat, penicilamina, PTK787/ZK 222584, RPI.4610, lactato de esqualamina, SU5416, talidomida, combretastatina, tamoxifen, COL-3, neovastat, BMS-275291, SU6668, anticorpos anti-VEGF, Medi-522 (Vitaxin II), CAI, interleucina 12, IM862, amilorida, angiostatina, K1-3 angiostatina, K1-5 angiostatina, Captopril, DL-alfa-difluorometilornitina, DL-alfa-difluorometilornitina HCl, endostatina, fumagillina, herbimicina, 4-hidroxifenilretinamida, juglona, laminina, hexapeptídeo de laminina, pentapeptídeo de laminina, lavendustina, medroxiprogesterona, minociclina, inibidor de ribonuclease placentário, suramina, trombospondina, anticorpos direcionados contra fatores proangiogênicos (por exemplo, Avastin, Erbitux, Vectibix, Herceptin); inibidores de tirosina quinase de baixo peso molecular de fatores de crescimento proangiogênicos (por exemplo, Tarceva, Nexavar, Sutent, Iressa); inibidores mTOR (por exemplo, Torisel); interferon alfa, beta e gama, IL-12, inibidores de metaloproteinase de matriz (por exemplo, COL3, marimastat, batimastat); ZD6474, SU11248, vitaxin; inibidores PDGFR (por exemplo, Gleevec); NM3 e 2-ME2; ciclopeptídeos, tais como cilengitida. Agentes antimetastáticos que podem ser usados em combinação com os anticorpos da invenção para o

tratamento de câncer incluem, sendo que não se fica limitado aos mesmos, qualquer agente capaz de agir como um agente antimetastático, tais como agentes de alquilação; antimetabolitos tais como 5-fluorouracil, pemetrexed (MTA), raltitrexed (TDX); agentes citotóxicos de platina, tais como cisplatina ou oxaliplatina; inibidores de topoisomerase; agentes agentes antimicrotúbulos; antraciclinas; alcalóides de plantas; inibidores de GTPase; inibidores de angiogênese; inibidores de metaloproteínase de matriz; inibidores de quinase do regulador do ciclo celular, tais como quinases dependentes de ciclina e inibidores de ciclina; inibidores de sinalização de Wnt; inibidores do fator de transcrição de E2F; inibidores de histona desacetilase; inibidores de AKT quinase ou ATPase.

#### Método não terapêutico

[0116] A associação entre a nanopartícula de metal e a bactéria de ácido láctico ou bifidobactéria, que é estável sob as condições de pH do estômago, é quebrada devido ao valor de pH relativamente elevado no intestino. Isto resulta na liberação da nanopartícula de metais no trato intestinal (exemplo 2). Além disso, diferentes metais, tais como cálcio ou zinco, associados a uma bactéria de ácido láctico ou uma bifidobactéria são também liberados nas condições tanto do estômago quanto do intestino (exemplo 2, Figuras 6 e 7). Por essa razão, a bactéria da invenção, quando administrada de forma oral, é de utilidade para a distribuição de um composto de interesse no intestino de um paciente.

[0117] Deste modo, de acordo com outro aspecto, a invenção também se refere a um método não terapêutico para a distribuição de um metal no intestino de um paciente, que compreende a administração oral de uma bactéria do primeiro aspecto ou uma bactéria suscetível de

ser obtida por meio do método do terceiro aspecto ou uma cultura biologicamente pura da mesma.

[0118] Da forma que é utilizado neste contexto, o termo "método não terapêutico", refere-se a um processo, ação, aplicação ou assemelhado em um paciente que (i) não é direcionado para a melhoria de uma condição ou enfermidade, diretamente ou indiretamente, ou para retardar a progressão de uma condição ou enfermidade, ou para melhorar um ou mais sintomas de uma condição ou enfermidade do referido paciente e (ii) não é direcionada ao retardamento do aparecimento do distúrbio ou enfermidade, ou prevenir o indivíduo de desenvolver o distúrbio ou enfermidade de qualquer modo.

[0119] Deste modo, o paciente de acordo com o método não terapêutico da invenção não sofre de a enfermidade ou condição relacionada com uma deficiência de metal ou qualquer outra enfermidade de condição que poderia ser tratada por meio da administração da bactéria ou da cultura da invenção e não está sob um risco aumentado de desenvolver as ditas enfermidades.

[0120] Os termos "metal" e "administração oral" foram definidos anteriormente em conexão com os métodos terapêuticos da invenção.

[0121] Da forma que é utilizado neste contexto, o termo "intestino" ou "tripa", refere-se ao segmento do trato digestivo que se estende a partir do esfíncter pilórico do estômago até ao anus. O termo intestino inclui tanto o intestino delgado, que por sua vez compreende o duodeno, jejuno e íleo, quanto o intestino grosso, que compreende o cecum e o cólon.

Agente de formação de imagem e método para geração de imagens

[0122] A bactéria da invenção é capaz de contrastar o trato digestivo em um método de formação de imagem, tal como ressonância magnética (exemplo 4). Por essa razão, de acordo com outro aspecto, a invenção refere-se a um agente de contraste que compreende a bactéria de acordo com o primeiro aspecto ou a bactéria suscetível de ser obtida por meio do método do terceiro aspecto ou um biologicamente puro do mesmo, em que o metal está compreendido em uma nanopartícula magnética.

[0123] Os termos "agente de formação de imagem" e "agente de contraste" são usados neste contexto indistintamente e referem-se a um composto biocompatível cujo uso facilita a diferenciação de diferentes partes da imagem, pelo aumento do "contraste" entre aquelas regiões diferentes da imagem. De preferência, o agente de contraste é compreendido por um agente de contraste para imagem de ressonância magnética (MRI). O agente de contraste para formação de imagem e ressonância magnética inclui quelatos de gadolínio, quelatos de manganês, quelatos de cromo e partículas de ferro. Os agentes de contraste de MRI podem incluir complexos de metais selecionados a partir do grupo que consiste de cromo (III), manganês (II), ferro (III), ferro (II), cobalto (II), níquel (II), cobre (II), neodímio (III), samário (III), itérbio (III), gadolínio (III), vanádio (II), térbio (III), disprósio (III), hólmio (III) e érbio (III).

[0124] De acordo com uma concretização particular, o agente de contraste compreende uma bactéria que compreende uma nanopartícula de metal que compreende ferro, com maior preferência óxido de ferro, ainda com maior preferência maghemita.

[0125] De acordo com outra concretização, a invenção refere-se ao uso da bactéria de acordo com o

primeiro aspecto ou a bactéria suscetível de ser obtida por meio do método do terceiro aspecto ou a uma cultura do mesmo como um agente de contraste para formação de imagem de ressonância magnética.

[0126] De acordo com uma concretização particular a bactéria de acordo com o primeiro aspecto ou a bactéria suscetível de ser obtida por meio do método do terceiro aspecto ou a sua cultura pode ser administrada de forma oral ou intravenosa para o seu uso como agentes de contraste para a formação de imagem de ressonância magnética.

[0127] Da forma que é utilizado neste contexto, o termo "formação de imagem de ressonância magnética" ou "MRI", refere-se a uma técnica de imagiologia médica mais comumente usada em radiologia para visualizar a estrutura e função do corpo. Ela proporciona imagens detalhadas do corpo em qualquer plano. MRI utiliza radiação não ionizante, mas utiliza um campo magnético poderoso para alinhar a magnetização nuclear dos (usualmente) átomos de hidrogênio em água no corpo. Os campos de radiofrequência são usados para alterar sistematicamente o alinhamento desta magnetização, fazendo com que os núcleos de hidrogênio produzam um campo magnético rotativo detectável pelo digitalizador. Este sinal pode ser manipulado por meio de campos magnéticos adicionais para construir a informação suficiente para construir uma imagem do corpo. Quando um paciente está em um digitalizador, os núcleos de hidrogênio (ou seja, prótons) encontrados em abundância no corpo de um animal em moléculas de água, alinham-se o forte campo magnético principal. Um segundo campo eletromagnético que oscila sob radiofrequências e fica perpendicular ao campo principal, é então pulsado para empurrar uma proporção dos prótons para

fora de alinhamento com o campo principal. Estes prótons, em seguida, derivam de volta ao alinhamento com o campo principal, emitindo um sinal de radiofrequência detectável quando eles o fazem. Uma vez que os prótons nos diferentes tecidos do corpo (por exemplo, gordura versus músculo) se realinham sob velocidades diferentes, as diferentes estrutura do corpo podem ser reveladas. Agentes de contraste podem ser injetados de forma intravenosa para intensificar o aparecimento de vasos sanguíneos, tumores ou inflamação. O MRI é usado para a imagem de cada parte do corpo, mas é particularmente útil em condições neurológicas, distúrbios dos músculos e articulações, para avaliar tumores e mostrar anormalidades nos vasos sanguíneos do coração.

[0128] A bactéria de acordo com o primeiro aspecto ou a bactéria suscetível de ser obtida por meio do método do terceiro aspecto poderá ser usado como um agente de contraste para a formação de imagem de ressonância magnética de virtualmente qualquer parte do corpo. Sem querer ficar limitado por qualquer teoria em particular, tanto as bactérias de ácido láctico quanto as bifidobactérias são reportadas como sendo atraídas pelos ambientes de tumores hipóxicos e, conseqüentemente, estas bactérias são especialmente úteis para a formação de imagens dos tumores sólidos.

[0129] De acordo com uma concretização particular, a bactéria de acordo com o primeiro aspecto ou a bactéria suscetível de ser obtida por meio do método do terceiro aspecto ou a sua cultura é se utilidade como um agente de contraste para formação de imagem de ressonância magnética do trato digestivo. Da forma que é utilizado neste contexto, o termo "trato digestivo", refere-se a uma série de órgãos ocos unidos em um tubo de torção, longo,

que vai da boca ao anus. O trato digestivo inclui a boca, esôfago, estômago, intestino delgado, intestino grosso ou cólon e reto.

[0130] De acordo com outra concretização, a invenção refere-se a um método para a formação de imagem de ressonância magnética do trato digestivo de um paciente, o qual compreende:

(i) administrar de forma oral ao dito paciente a bactéria de acordo com o primeiro aspecto, a bactéria suscetível de ser obtida por meio método do terceiro aspecto, uma cultura do mesmo ou um agente de contraste de acordo com a invenção, em que o metal está compreendido em uma nanopartícula/ e

(ii) detectar as nanopartículas de metais no trato digestivo do paciente.

[0131] Os termos "formação de imagem de ressonância magnética", "trato digestivo", "paciente", "administração oral" foram definidos anteriormente neste contexto.

[0132] A etapa de detectar as nanopartículas de metais no trato digestivo do paciente pode ser realizada por uma pessoa versada na técnica, de preferência um facultativo ou técnico especializado, por meio de digitalização com equipamento de RMI.

[0133] A parte do trato digestivo que pode ser contrastada por meio d método de formação de imagem da invenção dependerá do tempo decorrido entre a administração oral da bactéria ou cultura da invenção e a detecção das nanopartículas de metais por meio de digitalização do trato digestivo do paciente. Por essa razão, de acordo com uma concretização do método de formação de imagem de ressonância magnética, a digitalização é realizada entre 1 e 5 horas depois da

administração oral, de preferência 3 horas depois da administração oral, proporcionando deste modo a imagiologia do estômago ou entre 6 e 24 horas depois da administração oral, de preferência 24 horas depois da administração oral, proporcionando deste modo a imagiologia do intestino.

[0134] A invenção encontra-se descrita por meio dos exemplos seguintes, que são meramente ilustrativos e não limitativos do escopo da invenção.

#### EXEMPLO 1

Bactérias magnéticas artificiais como nano ímãs sob a temperatura ambiente

##### *Materiais e métodos*

Preparação de bactérias com nanopartículas de maghemita

[0135] Uma de bactérias foi preparada e mantida sob 37°C e agitação durante 24 h. então, a cultura bacteriana foi mantida no gelo para resfriar as bactérias, as bactérias foram coletadas por meio de centrifugação sob 100 g e a densidade óptica foi medida sob 600 nm para captar  $1 \times 10^9$  cfu/ml. As bactérias foram ressuspensas cuidadosamente em 1 ml de solução de MgCl<sub>2</sub>-CaCl<sub>2</sub> gelada (174,02 g de CaCl<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O e 203,02 g de MgCl<sub>2</sub>•6H<sub>2</sub>O e dissolver as mesmas em 1L de água destilada) para lavar todas as impurezas e bactérias foram coletadas sob 3000 g, 10 min. Depois disto, os tubos foram mantidos em posição invertida durante 1 min. para que a água fosse drenada e então 66,6 µl de uma solução das nanopartículas de maghemita (0,95 M) sob pH 2 foram misturadas com as bactérias. A mistura foi preenchida com água até 1 ml e as bactérias foram coletadas por meio de centrifugação sob 100 g, 20 min., para remover o excesso de íons.

[0136] Nanopartículas de maghemita foram preparadas de acordo com o método de Massart (Massart, R.

IEEE Trans. Magn. 1981, 1247-1248) por meio de coprecipitação de sais de Fe(II) e Fe(III) em estequiometria de 0,5. Pelo ajuste do pH (12 e 11 para 4 e 6 nm, respectivamente) e intensidade iônica (2 e 1 M NaNO<sub>3</sub> durante 4 e 6 nm, respectivamente), a dimensão das nanopartículas de magnetita resultantes pode ser controlada (Vayssieres, L.; Chaneac, C.; Tronc, E.; Jolivet, J. P. J. Colloid Interface Sci. 1998, 205, 205-212). Todas as soluções foram cuidadosamente desarejadas com argônio. Depois de oxidação, obteve-se um colóide de maghemita nanopartículas estável sob pH 2.

#### *Resultados*

[0137] Neste contexto, relata-se uma metodologia eficiente e simples de sintetizar bactérias magnéticas artificiais pela deposição de nanopartículas magnéticas em uma plataforma biológica tal como é a superfície da bifidobactéria gram positiva. A carga negativa da superfície externa das bactérias e a carga positiva das nanopartículas permitem a interação. A possibilidade desta interação eletrostática por requerer a presença dos biofilmes de EPS. Mais interessante, também é mostrado que a orientação e a manipulação das bactérias magnéticas artificiais quando formadas por um campo magnético externo também é possível. Além disso, a orientação magnética ocorre sob a temperatura ambiente, um fato que prevê diversas e atrativas aplicações em diferentes dispositivos magnéticos de gravação. A metodologia envolve condições suaves e pode ser adaptada à fabricação em grande escala, o que permite a produção de componentes mais baratos, ambientalmente mais favoráveis para dispositivos do futuro.

[0138] A deposição é conduzida por meio de interações eletrostáticas existentes entre

nanopartículas de maghemita positivas (8 nm de tamanho) e a totalidade da superfície externa das bifidobactérias. A interação física é controlada pela alteração da carga da superfície das nanopartículas de maghemita, de forma tal que o nível de adsorção das nanopartículas de maghemita nas bifidobactérias exibe nível de inserção distinto e altamente controlável. A Figura 1 mostra a distribuição de densidade de partículas como uma função de uma carga de superfície de nanopartícula magnética. Tal como pode ser observado, as nanopartículas de maghemita positivas são anexadas de forma seletiva à casca de peptidoglican (a) enquanto que as negativas não exibem qualquer afinidade para a deposição (b).

[0139] As condições mais favoráveis foram observadas quando *Bifidobactéria breve* em meio de MRS foram incubadas com nanopartículas de maghemita de dimensão de 8-nm sob pH 2 para proporcionar soluções homogêneas vermelhas que foram centrifugadas e lavadas com uma solução de NaCl por cinco vezes. As soluções foram examinadas por meio de Microscopia Eletrônica de Transmissão [Transmission Electron Microscopy (TEM)]. Uma imagem típica obtida a partir do material mostra núcleos densos de elétrons distintos, que são de forma e dimensão regular (Figura 2).

[0140] O diâmetro médio foi medido estatisticamente como sendo de  $8 \pm 0,5$  nm. Espectroscopia de energia dispersiva confirmou que as partículas continham Fe, que não foi detectado no lado externo das partículas.

[0141] Grande acumulação de nanopartículas magnéticas tem lugar na casca externa de bactérias formando como que um pudim de ameixa, onde as nanopartículas magnéticas são "ameixas" carregadas positivamente circundadas por um "pudim" carregado negativamente, formado pela rede de peptidoglican.

[0142] As bactérias marcadas com nanopartículas de maghemita são facilmente dispersas em água formando uma solução de cor vermelho escuro. Centrifugação seguida por lavagem não remove as nanopartículas da superfície das bactérias, assinalando a forte interação entre as nanopartículas e a rede de peptidoglican. As bactérias magnéticas são facilmente orientadas em baixos campos magnéticos e podem ser removidas das soluções por meio de pequenos ímãs permanentes (Figura 3). A orientação nos baixos campos magnéticos sob a temperatura ambiente foi inesperada uma vez que tinha sido mostrado que apenas nanopartículas de maghemita maiores do que 20 nm são atraídas a partir da solução por gradientes magnéticos modestos. O fato de que as bactérias magnéticas se comportam como ímãs à temperatura ambiente aponta para a existência de uma ordem magnética longa, devido à interação dipolar como consequência do grande acúmulo e curtas distâncias entre as nanopartículas na casca da peptidoglican. Neste sentido, é interessante notar que a solução amarela de fundo obtida depois da aplicação dos ímãs (Figura 3b) que continha somente nanopartículas de maghemita não se mover com a aplicação de um campo magnético externo, ou seja, as nanopartículas de maghemita de 8 nm não são atraídas pelo ímã permanente.

[0143] Além disso, a solução de cor amarela de fundo obtida depois da separação magnética (Figura 3b) é isenta de bactérias. Isto demonstra que i) todas as bactérias foram marcadas com nanopartículas magnéticas, ii) as bactérias atuam como bio-plataformas onde ocorre longa ordem magnética entre nanopartículas de maghemita com dimensão de 8 nm.

[0144] Uma vez que estas bactérias magnéticas podem mover-se na presença de um gradiente de campo magnético sob baixa temperatura ambiente, os inventores ensaiaram a formação de película orientada magneticamente pela aplicação de um campo magnético externo a uma única gota de bactérias magnéticas artificiais depositada em diferentes substratos. A fim de visualizar as bactérias magnéticas, estas foram previamente marcadas com o corante fluorescente SYTO 9 (verde), que é comumente utilizado para bactérias vivas de rotulagem. Como um exemplo a Figura 4 mostra o efeito de um modesto ímã permanente nas bactérias magnéticas artificiais quando depositadas em vidro de polilisina.

[0145] As bactérias magnéticas artificiais fluorescentes comportam-se como ímãs sob a temperatura ambiente e são alinhadas seguindo as linhas do campo magnético externo que dão origem a uma organização nano estruturada de bactérias magnéticas em que a posição e orientação de nano-objetos são controladas por meio de uma entrada externa (o campo magnético).

[0146] Em conclusão, a presente invenção mostra a possibilidade de se prepararem bactérias magnéticas artificiais e a possibilidade de controlara orientação magnética destes nano objetos sob a temperatura ambiente. Esta etapa é crucial no uso deste sistema no registro de dispositivos magnéticos.

#### EXEMPLO 2

##### Estudo de distribuição de ferro, cálcio e zinco

##### *Materiais e métodos*

Bactérias com minerais (adaptadas a partir de Sambrook J, Russell DW (2001). Molecular cloning: A laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor, Laboratory Press.132-150)

[0147] Preparou-se uma carga de quatro tipos diferentes de amostras: a) Somente bactérias (controle), b) bactérias com cálcio, c) bactérias com cálcio e zinco e finalmente d) bactérias com cálcio, zinco e ferro.

[0148] O procedimento geral foi o seguinte:

1. Medição do O.D.<sub>600</sub> da cultura de 24 horas de *L. fermentum* para coletar  $2 \times 10^9$  de células/ml.

2. Resfriamento das culturas para 0°C pelo armazenamento de tubos em gelo durante 10 minutos.

3. Recuperação das células por meio de centrifugação sob 3000 g, 20 minutos sob 4°C.

4. Decantação do meio a partir das pílulas de células. Dispor os tubos numa posição invertida sobre um chumaço de toalhas de papel durante 1 minuto para permitir que os últimos vestígios dos meios sejam drenados.

5. Ressuspender cada pílula por agitação ou vórtex suave em 1 ml de solução gelada de MgCl<sub>2</sub>-CaCl<sub>2</sub> (174.02 g de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O e 203.02 g de MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O e dissolver as mesmas em 1L de água destilada).

6. Recuperar as bacterias por meio de centrifugação sob 3000 g durante 20 minutos sob 4°C.

7. Decantar o meio a partir das pílulas de células. Dispor os tubos numa posição invertida sobre um chumaço de toalhas de papel durante 1 minuto para permitir que os últimos vestígios dos meios sejam drenados.

8. Ressuspender a pílula por agitação ou vórtex suave em 1 ml de 0,5 M CaCl<sub>2</sub> gelado.

9. Adicionar 5 µl de Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> ·4H<sub>2</sub>O (1M).

10. Recuperar as bactérias por meio de centrifugação sob 3000 g durante 20 minutos sob 4°C.

11. Adicionar 100  $\mu$ l de nanopartículas de maghemita (0,95 M, pH 2-5) à pílula isolada.

Nota 1: quando se prepara o controle somente com bactérias (controle), depois da etapa 7, ressuspende-se a pílula por agitação ou vórtex suave em 1 ml de água destilada e então pula-se para a etapa 11.

Nota 2: quando se preparam as bactérias somente com  $\text{CaCl}_2$  removem-se as etapas 9 e 10.

Nota 3: quando se preparam as bactérias com  $\text{CaCl}_2$  e Zinco remove-se a etapa 11.

Nota 4: quando se preparam as bactérias com  $\text{CaCl}_2$ , zinco e ferro, a sequência seguida para adicionar minerais foi compreendida por, cálcio, zinco e ferro.

12. Transferir os tubos para uma prateleira colocada num banho de água circulante pré aquecida a 42°C. Armazenar os tubos na prateleira durante exatamente 90 segundos. Não sacudir os tubos.

13. Transferir rapidamente os tubos para um banho gelado. Permitir que as bactérias sejam congeladas durante 1-2 minutos.

14. Recuperar as bactérias por meio de centrifugação sob 3000 g durante 20 minutos sob 4°C.

15. Lavar as bactérias duas vezes em água destilada.

[0148] As amostras de bactérias resultantes foram incubadas em suco gástrico e gastrointestinal sob 37°C com agitação contínua (170 rpm). Coletou-se uma amostra de 1 ml de hora em hora até completar 6 horas no caso da simulação de suco gástrico e de 4 horas no caso da simulação de suco gastrointestinal. A liberação de metal foi analisado por absorção atômica e ICP (espectrometria de plasma massa acoplada indutivamente).

[0149] Composição de suco gástrico simulado: Suco gástrico simulado foi preparado pela dissolução de pepsins (0,01 g), mucina gástrica (0,015 g) e NaCl (0,088 g) em 10ml de água destilada com pH de 1,3 ajustado mediante utilização de 1M HCl.

[0150] A composição final da amostra na célula de reação foi por essa razão, 1 mg/ml de pepsina, 1,5 mg/ml of3 mucina gástrica e 8,8 mg/ml de Nacl (0,15 mM).

[0151] Composição de suco gastrointestinal simulado: Suco gastrointestinal simulado foi preparado pela dissolução de extrato by dissolving extrato de bile (0,05 g), lipase (0,016 g) e CaCl<sub>2</sub> (0,007 g) em 10 ml de água destilada com pH de 7,0 ajustado utilizando-se 1M HCl ou NaOH.

[0152] A composição final da amostra na célula de reação foi por essa razão, 5 mg/ml de extrato de bile, 1,6 mg/ml de lipase, 5 mM de CaCl<sub>2</sub>.

### *Resultados*

[00153] As amostras (M1-M18) de *L. fermentum* preparadas especialmente com maghemita foram colocadas em vasos apropriados que continham sucos de estômago e de intestino simulados como apropriados e foram incubados sob 37°C com agitação contínua. As amostras foram coletadas sob os seguintes tempos: 0, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas. as amostras foram centrifugadas para se decantar as bactérias e 900 µl dos sobrenadantes foram coletados para análise. Os resultados mostram uma pequena liberação de Fe sob condições do estômago. A liberação é significativamente mais alta sob as condições do cólon e ocorrem a maior parte das vezes na primeira hora (Figura 5).

[00154] Seguindo-se o mesmo protocolo, a liberação de metal de cálcio e zinco foi analisada na presença e ausência de nanopartículas magnéticas (Figuras 6 e 7).

### EXEMPLO 3

Inclusão de metal na sup da bactéria

#### *Materials e métodos*

[00155] A microscopia eletrônica de varredura (SEM) é uma das técnicas mais poderosas para estudar a superfície de estrutura finas. Imagens de SEM foram registradas pelo uso de um Microscópio de Varredura Eletrônica Zeiss SUPRA40VP (Scanning Electron Microscope) acoplado com analisador de raios-X de energia dispersiva (EDX) X-Max 50 mm. A EDX é uma técnica analítica usada para análise elementar ou caracterização química. As amostras foram revestidas com carbono pelo método de descarga de arco para SEM-EDX.

#### *Resultados*

[00156] A espectroscopia de raios-X de energia dispersiva foi usada para se determinar a composição elementar da superfície de bactérias individuais. A imagem SEM da Figura 8a mostra as bactérias depois da incubação com  $\text{Ca}^{2+}$ . O espectro de EDX mostrou o pico  $K\alpha$  sob 3,8 eV característico de Ca, representando um valor em torno de 10% em peso (Figura 8b).

[00157] A imagem SEM da Figura 9a mostra as bactérias depois da incubação com maghemita e  $\text{Ca}^{2+}$ . O espectro de EDX exibiu os picos  $K\alpha$  sob 6,2 eV e 3,8 eV característicos do Fe e Ca, respectivamente (Figura 9b). O ferro representa um valor de cerca de 20%, em peso, ao mesmo tempo em que a percentagem de cálcio é de 10%.

### EXEMPLO 4

Bactérias que contêm nanopartículas de maghemita como agente de contraste de MRI oral

*Materiais e métodos*

[00158] Realizaram-se medições de MRI com um sistema 4.7T Biospec Tomograph System (Bruker, Karlsruhe, Germany) operando sob 200 MHz e equipado com um ímã de furo de 33 cm (Oxford Ltd., UK).

*Experiências In vivo*

[00159] Nas experiências in vivo, utilizaram-se camundongos Balb-c normais pesando cerca de 20 g. Agentes de contraste foram administrados de forma oral sob diferentes doses de Fe.

*Resultados*

[00160] A MRI é uma modalidade não invasiva das mais poderosas para o diagnóstico de muitas enfermidades em seres humanos.

[00161] Foi testada a eficiência em contrastar imagens de ressonância magnética MRI das bactérias uma vez que as nanopartículas de maghemita foram marcadas. As vantagens principais do sistema são as seguintes:

1. As bactérias servem como carreadores orais das nanopartículas de maghemita superparamagnéticas.

2. As bactérias não distribuem nanopartículas de maghemita no estômago e por essa razão, Imagens de MRI podem ser coletadas (Figura 10). É necessário o controle dos níveis de saturação das partículas nas bactérias ou a quantidade de bactérias para uma ótima aquisição RMI.

3. As bactérias liberam as nanopartículas de maghemita quando o pH sobe e por essa razão ocorre uma distribuição destas partículas durante o seu deslocamento ao longo dos intestinos (Figura 11).

## REIVINDICAÇÕES

1. Bactéria **caracterizada** por ser selecionada a partir de uma bactéria de ácido lático ou uma bactéria do gênero *Bifidobacterium*, a bactéria de ácido lático e a bactéria do gênero *Bifidobacterium* compreendendo pelo menos uma nanopartícula de metal diretamente ligada à sua superfície através de interações eletrostáticas, em que a nanopartícula de metal é uma nanopartícula magnética ou

a nanopartícula de metal é uma nanopartícula em que o metal dela está na forma de um óxido.

2. Bactéria, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que a nanopartícula de metal compreende um metal selecionado a partir do grupo que consiste em ferro, manganês, cobalto, níquel, cálcio, zinco, magnésio, potássio, cobre, cromo, selênio, silício, iodo e combinações destes.

3. Bactéria, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que o óxido de metal é óxido de ferro.

4. Bactéria, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizada** pelo fato de que o óxido de ferro é selecionado a partir do grupo que consiste em magemita, magnetita, hematita, goetita e ferridrita.

5. Bactéria, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** por compreender adicionalmente pelo menos um metal adicional diferente do metal dentro da nanopartícula de metal, em que o pelo menos um metal adicional é compreendido na nanopartícula de metal conforme definida na reivindicação 1 ou dentro de uma nanopartícula de metal diferente e separada.

6. Bactéria, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizada** pelo fato de que o pelo menos um metal

adicional é selecionado a partir do grupo que consiste em ferro, manganês, cobalto, níquel, cálcio, zinco, magnésio, potássio, cobre, cromo, selênio, silício, iodo e combinações destes.

7. Bactéria, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** por compreender adicionalmente pelo menos um metal adicional diferente do metal dentro da nanopartícula de metal, em que o pelo menos um metal adicional é compreendido na nanopartícula de metal conforme definida na reivindicação 1 ou dentro de uma nanopartícula de metal diferente e separada, em que o metal dentro da nanopartícula de metal conforme definida na reivindicação 1 é óxido de ferro e em que o pelo menos um metal adicional é selecionado a partir do grupo que consiste em ferro, manganês, cobalto, níquel, cálcio, zinco, magnésio, potássio, cobre, cromo, selênio, silício, iodo e uma combinação destes.

8. Bactéria, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que a nanopartícula possui um tamanho entre 2 e 50 nm.

9. Bactéria, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que a bactéria de ácido láctico é selecionada a partir do grupo que consiste em *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius* e *Lactobacillus bulgaricus* e a bactéria do gênero *Bifidobacterium* é selecionada a partir do grupo que consiste em *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantum* e *Bifidobacterium animalis*.

10. Método para a obtenção de uma bactéria selecionada a partir de uma bactéria de ácido láctico ou uma

bactéria do gênero *Bifidobacterium*, a bactéria de ácido lático e a bactéria do gênero *Bifidobacterium* compreendendo pelo menos uma nanopartícula de metal diretamente ligada à sua superfície através de interações eletrostáticas, em que a nanopartícula de metal é uma nanopartícula magnética ou

a nanopartícula de metal compreende um metal na forma de um óxido na dita nanopartícula de metal,

o método **caracterizado** por compreender colocar a referida bactéria em contato com a pelo menos uma nanopartícula de metal, em que o referido contato é realizado na presença de pelo menos um sal de um cátion bivalente e a uma temperatura em que o crescimento da referida bactéria é substancialmente reduzido e a um pH em que a referida nanopartícula possui uma carga eletrostática superficial positiva.

11. Bactéria **caracterizada** por ser obtida através do método conforme definido na reivindicação 10.

12. Cultura biologicamente pura, produto alimentício ou composição farmacêutica **caracterizada** por compreender uma bactéria conforme definida na reivindicação 1, em que a composição farmacêutica compreende ainda um veículo farmacêuticamente aceitável.

13. Uso de uma bactéria conforme definida na reivindicação 1, **caracterizado** por ser na fabricação de um medicamento para o tratamento e/ou prevenção de uma doença ou condição associada a uma deficiência de metal, em que a bactéria compreende o metal que é deficiente na referida doença ou condição, e em que a bactéria é administrada por via oral.

14. Uso de uma bactéria conforme definida na reivindicação 1, **caracterizado** por ser na fabricação de um medicamento para o tratamento e/ou prevenção de câncer, em

que o metal está compreendido em uma nanopartícula magnética.

15. Método não terapêutico para a liberação de um metal no intestino de um indivíduo **caracterizado** por compreender a administração oral de uma bactéria conforme definida na reivindicação 1.

16. Agente de contraste **caracterizado** por compreender uma bactéria conforme definida na reivindicação 1 e um veículo adequado.

17. Agente de contraste, de acordo com a reivindicação 16, **caracterizado** pelo fato de que a nanopartícula magnética compreende um metal na dita nanopartícula magnética.

18. Método para a ressonância magnética por imagem do trato digestivo de um indivíduo **caracterizado** por compreender:

(i) administrar por via oral ao referido indivíduo uma bactéria conforme definida na reivindicação 1;

(ii) detectar as nanopartículas de metal no trato digestivo do indivíduo.

19. Método, de acordo com a reivindicação 18, **caracterizado** pelo fato de que a detecção das nanopartículas de metal no trato digestivo do indivíduo é realizada entre 1 e 5 horas após a administração oral, obtendo assim imagens do estômago, ou entre 6 e 24 horas após a administração oral, obtendo assim imagens do intestino.

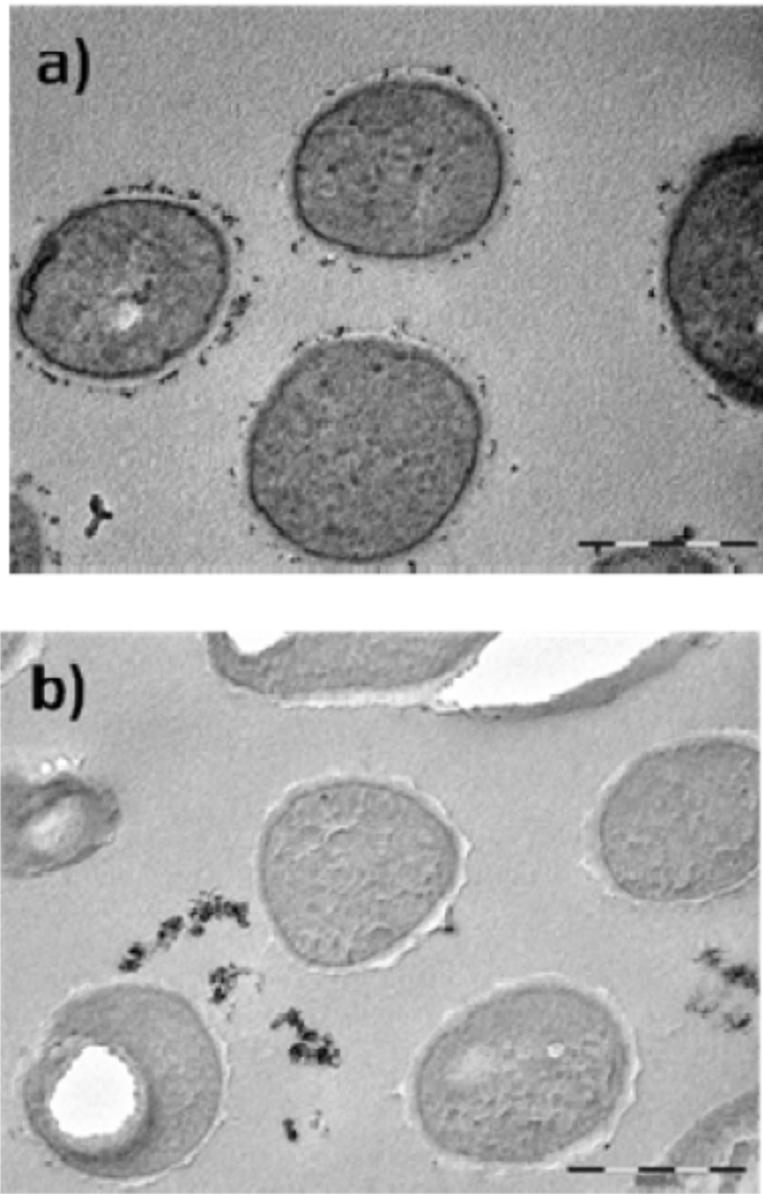
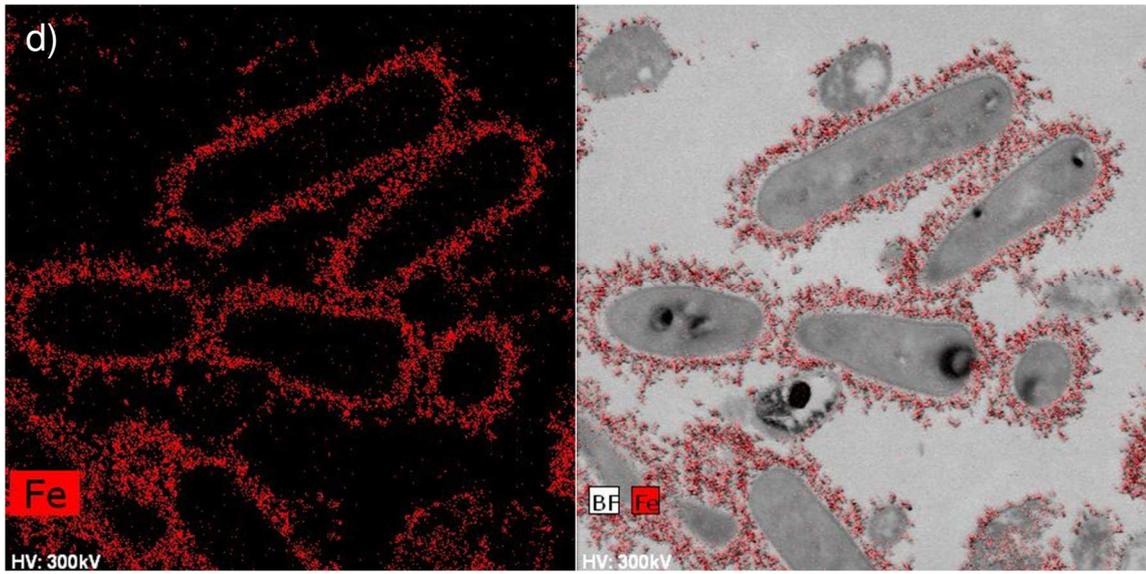
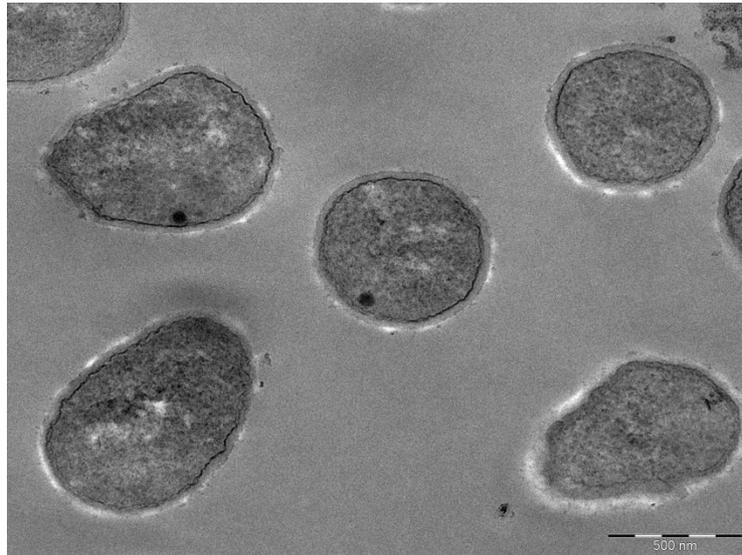
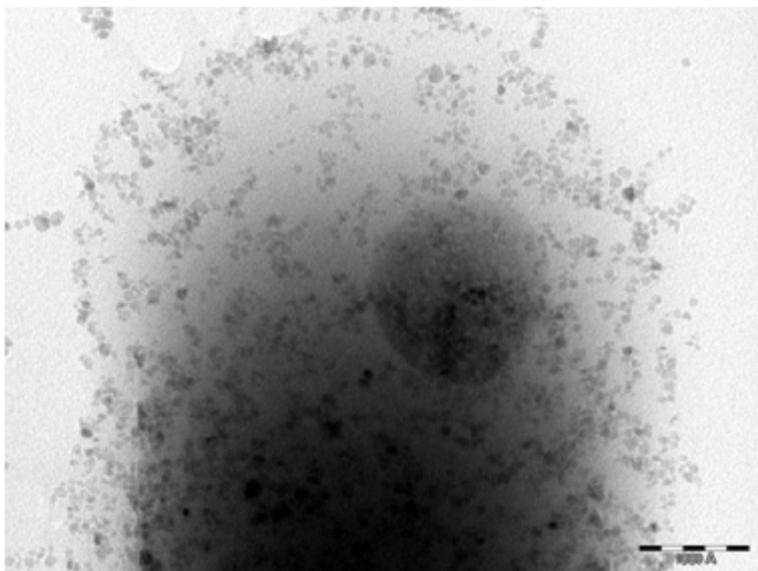


FIG. 1

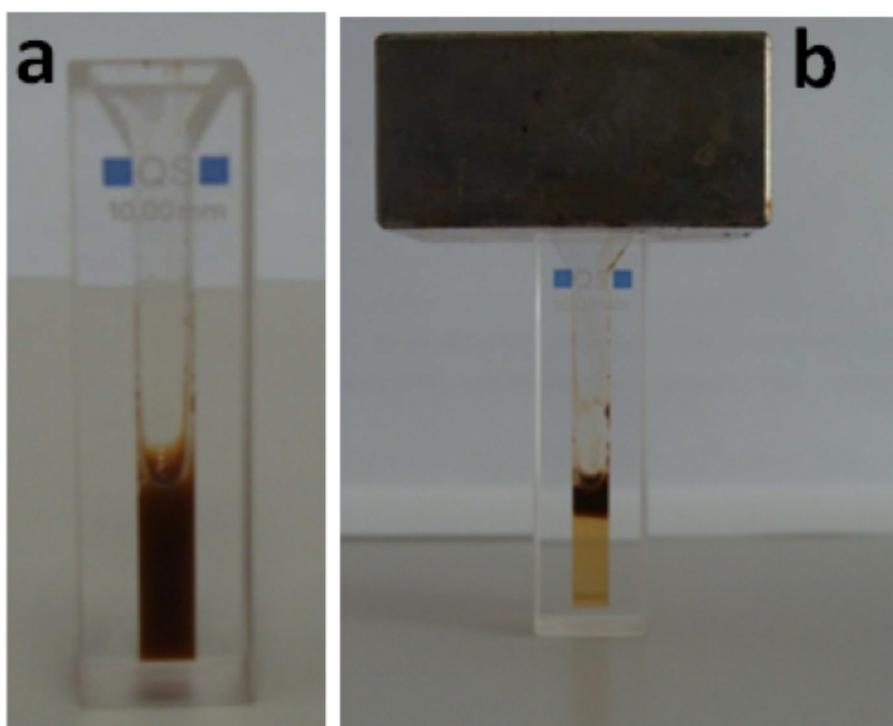
c)



**FIG. 1 (cont.)**



**FIG. 2**



**FIG. 3**

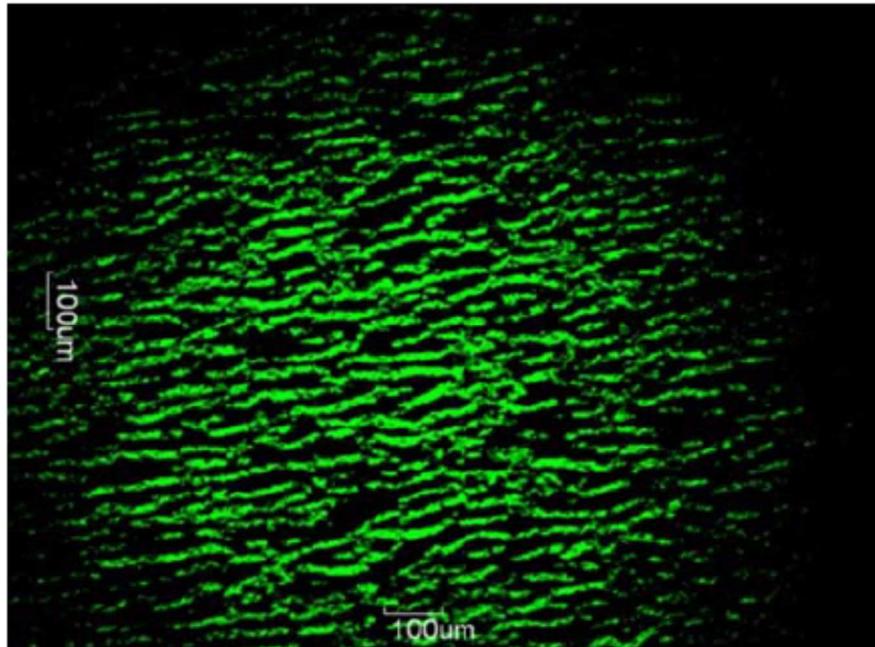


FIG. 4

% de remoção de ferro

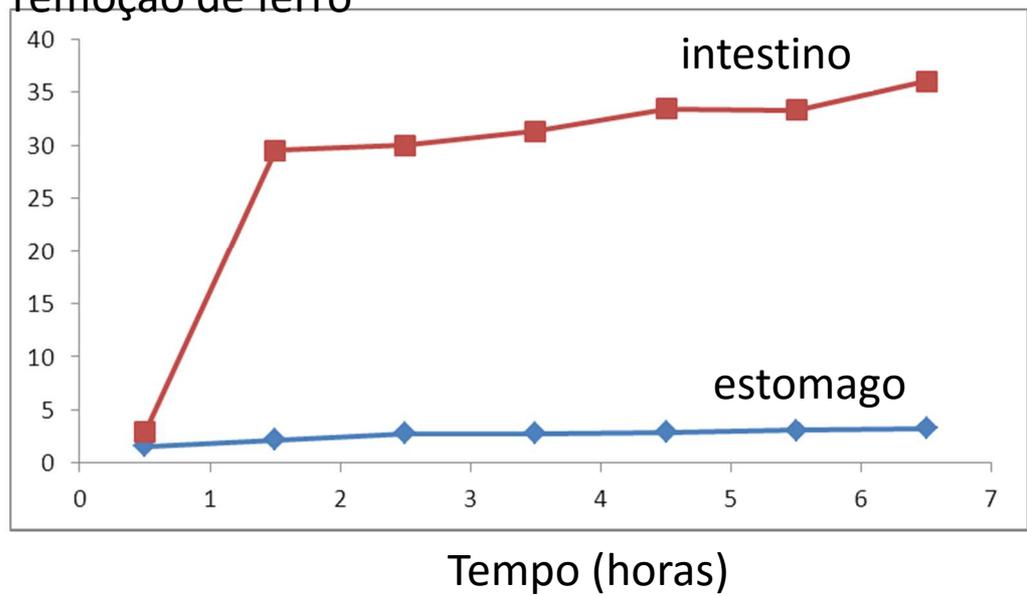


FIG. 5

% de remoção de Ca

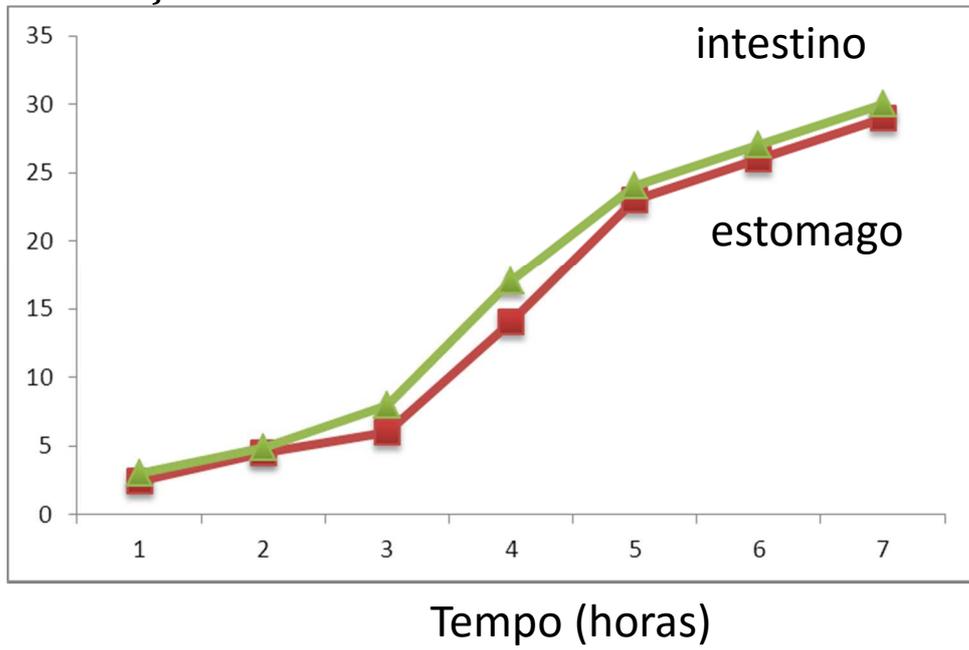


FIG. 6.

% de liberação de Zn

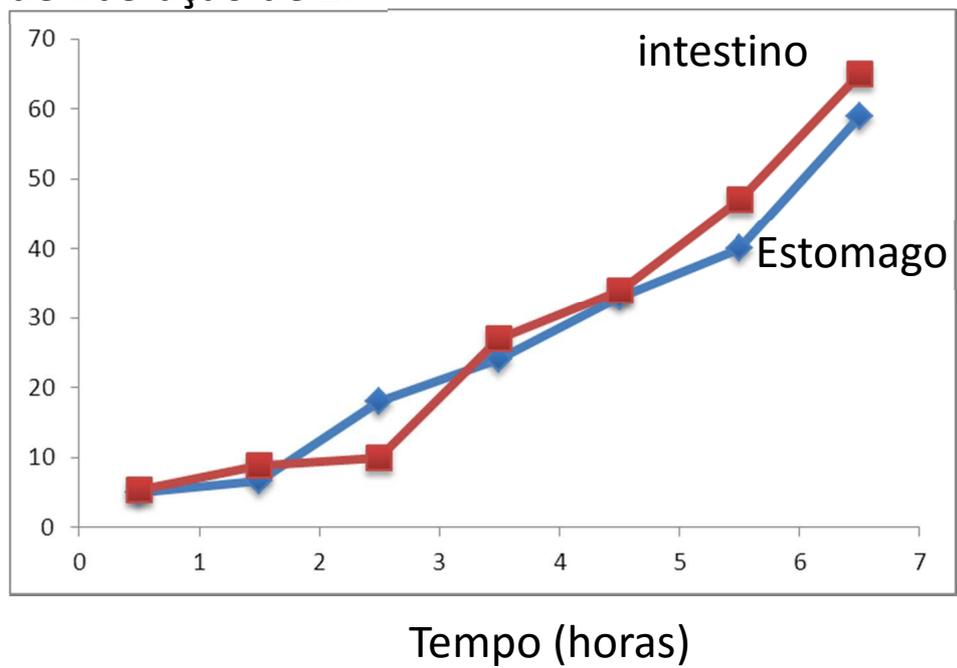
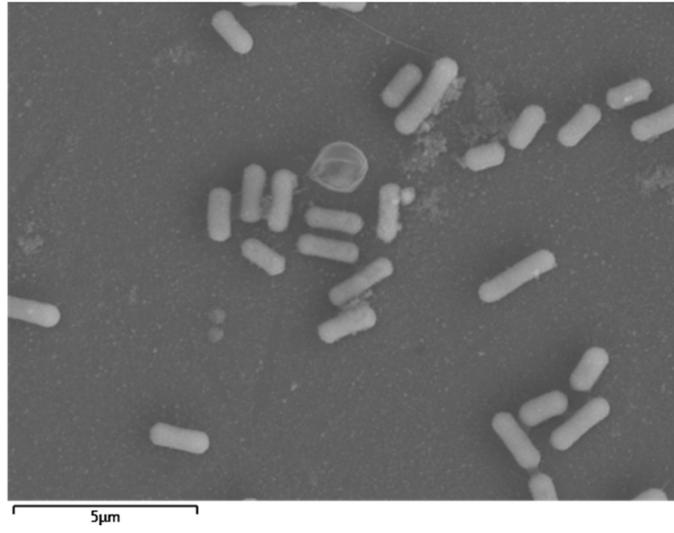


FIG. 7

A



B

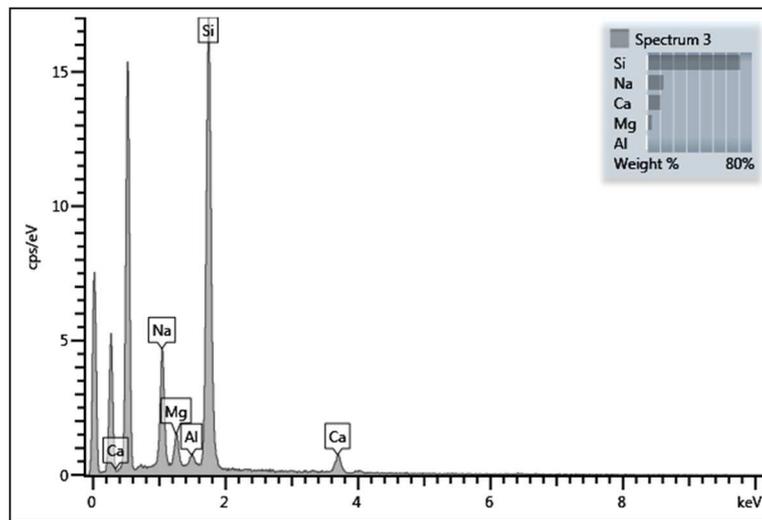
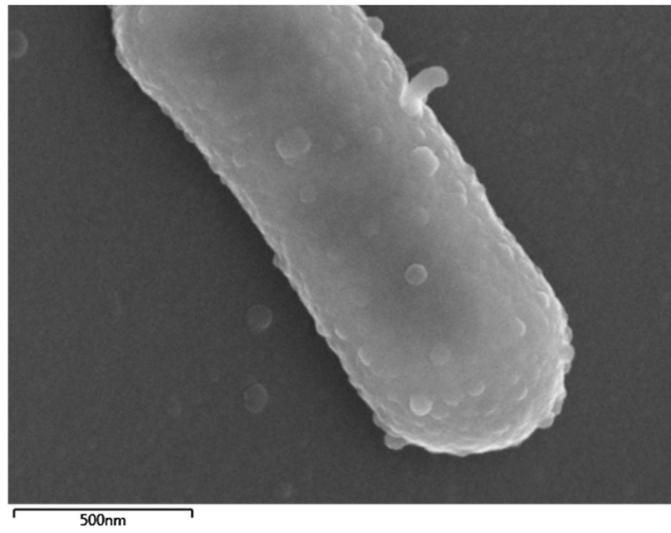
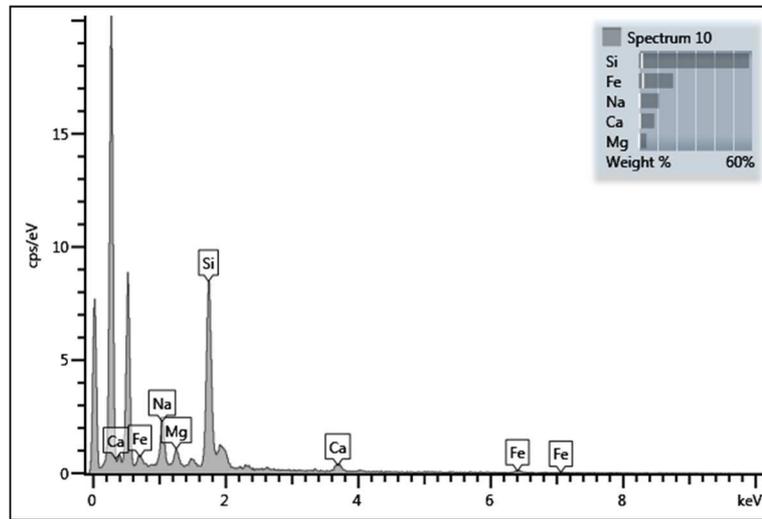
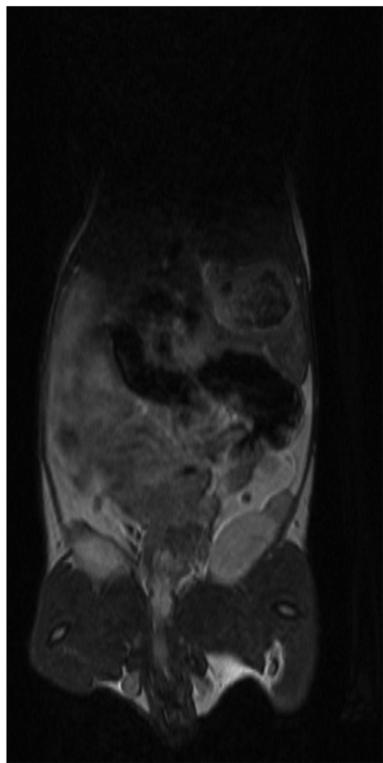
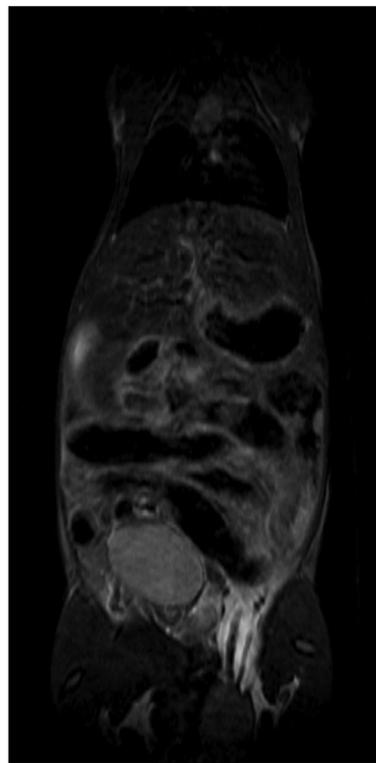


FIG. 8

**A****B****FIG. 9**



**FIG. 10**



**FIG. 11**