



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 344 654**

51 Int. Cl.:
C12N 1/20 (2006.01)
C12R 1/225 (2006.01)
A61K 35/74 (2006.01)
A23L 1/03 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05790013 .6**
96 Fecha de presentación : **09.09.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1797170**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.06.2007**

54 Título: **Medios y métodos para evitar y/o tratar caries.**

30 Prioridad: **10.09.2004 US 608381 P**
10.09.2004 EP 04021591

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.09.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.09.2010

73 Titular/es: **BASF SE**
67056 Ludwigshafen, DE

72 Inventor/es: **Kaesler, Bruno;**
Knoll, Rolf;
Boettner, Mewes;
Budde, Eckhard;
Lang, Christine;
Ryser, Martin y
Veen, Markus

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 344 654 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

ES 2 344 654 T3

DESCRIPCIÓN

Medios y métodos para evitar y/o tratar caries.

5 La presente invención se relaciona con un microorganismo que pertenece al género *Lactobacillus* caracterizado por que es capaz unirse específicamente a *Streptococcus mutans*, en donde la unión específica es

(i) resistente a un tratamiento al calor a más de 95°C durante por lo menos 20 minutos; y

10 (ii) resistente al tratamiento de proteasa con una proteasa seleccionada del grupo que consiste de pronasa E, pepsinasa K, tripsina y quimotripsina; y

(iii) dependiente de calcio; y

15 (iv) formado entre un rango de pH entre 4.5 y 8.5; y

(v) formado en la presencia de saliva. Preferiblemente, la unión específica se puede ensayar como sigue:

(a) hacer crecer dicho microorganismo en una fase estacionaria;

20 (b) mezclar dicho microorganismo con *Streptococcus mutans* que se han hecho crecer en una fase estacionaria;

25 (c) incubar la mezcla obtenida en la etapa (b) bajo condiciones que permiten la formación de cúmulos de microorganismos y *Streptococcus mutans* y

(d) detectar cúmulos mediante la ocurrencia de un sedimento.

30 Otro aspecto de la presente invención es un análogo o fragmento de dicho microorganismo que se inactiva térmicamente o se liofiliza, en donde dicho análogo o fragmento retiene la capacidad de unirse específicamente al *Streptococcus mutans*. Adicionalmente, la presente invención abarca composiciones y aditivos para alimentos, alimentación o bebidas que comprenden microorganismos que pertenecen al grupo de las bacterias del ácido láctico que se unen específicamente al *Streptococcus mutans* o un análogo o fragmento del mismo. Más aún, el uso de dicho microorganismo o dicho análogo o fragmento del mismo para la preparación de una composición anticariogénica o farmacéutica o alimento anticariogénico o producto alimenticio así como también se suministran por la presente invención métodos para producir dichas composiciones o alimentos o producto alimenticio.

40 El *Streptococcus mutans* tiene una función central en el desarrollo de las caries. El *S. mutans* metaboliza la sacarosa a ácidos orgánicos desarrollando un micro ambiente ácido. De otra parte, esto proporciona una ventaja para la placa bacteriana oral no cariogénica menos acidófila. De otra parte, los ácidos orgánicos desmineralizan el esmalte dental, conduciendo a lesiones carióticas. Adicionalmente, El *S. mutans* sintetiza una matriz de glucano no soluble en agua que refuerza la placa y que agrega la adherencia del *S. mutans* a la superficie dental. La función de las especies bacterianas adicionales que se relacionan con las caries desarrolla también bacterias del ácido láctico o actinomicetos que no son conclusivos. Estas bacterias se encuentran frecuentemente en lesiones carióticas, pero solo en asociación con *S. mutans*. En el conocimiento actual, la presencia de *S. mutans* es una condición indispensable de la cariogenia.

50 La unión inicial del *S. mutans* a la superficie de los dientes ocurre a través de dos mecanismos. El primer mecanismo es la unión de *S. mutans* a través del antígeno estreptocócico I/II (SA I/II) - una proteína de superficie también conocida por el sinónimo B, IF, P1, SR, MSL-1 o PAc - a la cutícula, una capa de proteína de saliva sobre la superficie dental. Se ha mostrado que los anticuerpos contra esta proteína evitan la adhesión del *S. mutans in vitro*. De acuerdo con lo anterior, el antígeno estreptocócico I/II (SA I/II) es un objetivo para vacunación. Se han mostrado en diferentes combinaciones recombinantes - el antígeno completo, la región de unión de la saliva, la proteína acoplada a la toxina cólera o expresada sobre la superficie de una cepa de *Salmonella avirulenta* -una inmunización exitosa de animales. Esto resulta en altos títulos de IgA y una reducción de la colonización de *S. mutans* (Huang *et al.*, Infect. Immun. 69 (2001), 2154-2161). Se han obtenido resultados comparables utilizando codificación de ADN de vacuna para SA I/II (Fan *et al.*, J. Dent. Res. 81 (2002), 784 - 787). Se ha alcanzado inmunidad pasiva mediante expresión recombinante de anticuerpos anti-SA I/II sobre la superficie de las bacterias del ácido láctico. Estos cúmulos de *Streptococcus mutans* y la administración de la bacteria a ratas conduce a una reducción del desarrollo de las caries (Krueger *et al.*, Nature Biotechnology 20 (2002), 702-706).

65 El socio de unión más importante del antígeno estreptocócico es la aglutinina salival, una proteína similar a la glucoproteína de pulmón gp-340 de la superfamilia rica en cisteína de receptor secuestrante (Prakobphol *et al.*, J. Biol. Chem. 275 (2000) 39860-39866).

El papel de la aglutinina en la cariogenia no se entiende completamente. Esta puede conducir a la adhesión de *S. mutans* cuando se presenta pegada a las superficies, esta puede conducir a un cúmulo de *S. mutans* cuando se presenta

en un estado soluble. Por último puede resultar en una remoción del cúmulo del *S. mutans* de la boca mediante flujo de saliva. Una alta concentración de aglutinina en la saliva conduce a un incremento *in vitro* en la adhesión en *S. mutans*, mientras que en vivo no hay una correlación clara entre la concentración de aglutinina en la saliva y el riesgo de caries (Stenudd *et al.*, J. Dent. Res. 80 (2001), 2005-2010). Los anticuerpos monoclonales contra aglutinina bloquean completamente la unión del *S. mutans* a la hidroxiapatita cubierta por saliva *in vitro* y evitan la acumulación de pendiente de aglutinina (Carlen und Olsson, J. Dent. Res. 74 (1995), 1040-1047; Carlen *et al.*, J. Dent. Res. 77 (1998), 81-90). Brady *et al.*, Infect. Immun. 60 (1992), 1008-1017 muestra que la adhesión a la superficie y la acumulación se pueden inhibir independientemente mediante diferentes anticuerpos. Este indica que diferentes epítomos de aglutinina son responsables por estos dos efectos.

Otras proteínas de saliva que se relacionan frecuentemente con el desarrollo de caries son las proteínas ricas en prolina (PRP). Sin embargo, la función de estas proteínas en la adhesión de la bacteria cariogénica se discute controverialmente. Estas proteínas se codifican por dos lugares génicos (PRH-1 y PRH-2) y ocurren en diferentes variantes que difieren en solo unos pocos aminoácidos (PRPEP 1, PRP-2, PIF, Db-doble banda). Estas variantes se pueden dividir proteolíticamente, resultando en los llamados PRP pequeños (PRP-3, PRP-4, PIF-f y Db-f). Los PRP median una fuerte unión de comensales similares a *Streptococcus no mutans* o *Actinomyces naeslundii*. De manera interesante, esta tiene lugar solo después de la adhesión de la proteína a la superficie dental, lo que resulta en un cambio conformacional que hace accesibles los sitios de unión. Los *S. mutans* solo se unen débilmente. El Db variante PRP es de importancia para la unión efectiva de *S. mutans*. Una alta concentración de Db se correlaciona con una alta adhesión de *S. mutans* y un fuerte desarrollo de la caries. Una parte reducida del PRP-Db de una alta concentración PRP total se correlaciona con un bajo desarrollo de las caries (Stenudd *et al.*, J. Dent. Res. 80 (2001), 2005-2010). Se desconoce, si *S. mutans* se une directamente al PRP.

La segunda forma de *S. mutans* para adherirse a la superficie dental es a través de la adhesión de pendiente de sacarosa. *S. mutans* expresa tres glicosiltransferasas diferentes (GTF) que son capaces de sintetizar el glucano de polímero de azúcar. Los glucanos existe en forma soluble en agua (conexión 1-6 glicosídica) y una forma no soluble llamada mutan (conexión 1-3 glicosídica). El mutan no se puede degradar ya sea por bacterias orales o por enzimas en saliva. Esta forma una matriz pegajosa dentro de la placa dental que es la base de la sacarosa dependiente de la adición de *S. mutans*. Las glicosiltransferasas GTFB y GTFC, las enzimas prevalentes responsables de la formación de mutan, se ubica en la superficie celular del *S. mutans*. En contraste, la glicosiltransferasa GTFD que sintetiza glucano y es secretada por *S. mutans*. Los experimentos utilizan mutantes deficientes de GTF de *S. mutans* que muestran que la interacción de todas las tres enzimas es necesaria para una adhesión dependiente de sacarosa (Ooshima *et al.*, J. Dent. Res. 80. (2001), 1672-1677).

Las glicosiltransferasas tienen un sitio de unión de sacarosa de terminal N y el sitio de unión de glucano de terminal C. los anticuerpos contra la enzima o contra el sitio de unión glucano conduce a una inhibición de la sacarosa dependiente de la adhesión *S. mutans*. No ha sido posible bloquear el sitio de unión de sacarosa de terminal N- utilizando anticuerpos (Yu *et al.*, Infect. Immun. 65 (1997), 2292-2298).

Una inhibición de las glicosiltransferasas seguida por adhesión reducida de *S. mutans* también se puede lograr mediante algunos flavonoides o terpenoides (US 2004/0057908) o extractos de propóleos (Duarte *et al.*, Biol. Pharmacol. Bull. 26 (2003), 527-531).

Se ha encontrado que las bacterias de ácido láctico denominadas S11 reduce la formación de mutan y, por lo tanto, la adherencia de *S. mutans in vitro*. Como se describió anteriormente, la formación de mutan es esencial para *S. mutans* para adherirse a la superficie dental. De acuerdo con lo anterior, Chung *et al.* (Oral Microbiol. Immunol. 19 (2004), 214-216) han encontrado células de *S. mutans* separadas cuando se han incubado con bacterias de ácido láctico de la cepa S11 que se dice reduce la formación de mutan. La unión de *S. mutans* al mutan ocurre a través de proteínas de unión bacteriana (proteína de unión glucano). El mecanismo exacto de esta unión se tiene que determinar (Sato *et al.*, Infect. Immun. 65 (1997), 668-675).

Los hongos *Trichoderma harzianum* y *Penicillium purpurogenum* producen alfa-1,3-glucanasas homólogas (Fuglsang *et al.*, J. Biol. Chem. 275 (2000), 2009-2018). El uso de *Enterococcus*, *Lactobacillus* y *Lactococcus* especies son efectivas contra la producción de glucano y se describe la formación de placa (US 6,036,952). El mecanismo de acción se debe aclarar.

Un método adicional para inhibir las caries es neutralizar el bajo pH en la placa. La urea y arginina son componentes de la saliva. La urea está presente en concentraciones de 3-10 mmol/L sin mayor diferencia entre personas afectadas por caries y personas libres de caries. La concentración de arginina libre difiere entre 4 y 40 μ mol/L. los individuos libres de caries tienen un mayor promedio de concentraciones de arginina libre en la saliva que las personas afectadas con caries (van Wuyckhuysse *et al.*, J. Dent. Res. 74 (1995), 686-690). Algunas bacterias de placas similares a *Streptococcus sanguis* y *Actinomyces naeslundii* son capaces de dividir la urea o arginina que resulta en la formación de amoniaco. Al amoniaco alcalino aumentar el pH de la placa y por lo tanto reduce la caries (Curran *et al.*, Appl. Environm. Microbiol. 61 (1995), 4494-4496; Morou-Bermudez and Burne, Infect. Immun. 68 (2000), 6670-6676). De acuerdo con lo anterior, se sugiere que estas bacterias se utilizan para tratar la caries. Otro método sugerido para tratar la caries es proteólisis de péptidos ricos en arginina PRP-1 y PRP-3 que se crean, que pueden, después de proteólisis adicional mediante bacterias orales similares a *S. sanguis*, *S. oralis* y *S. mitis*, conducir a un mayor pH en la placa. Mediante la aplicación de una variante recombinante de estos péptidos, la reducción dependiente de sacarosa del pH se inhibe (Li

ES 2 344 654 T3

et al., Infect. Immun. 68 (2000), 5425-5429). Más aún, se describe que al utilizar una goma de mascar que contiene urea después de toma de sacarosa se puede inhibir la caída del pH y, de acuerdo con lo anterior, por ejemplo, el *S. mutans* puede no contribuir tanto a las caries.

5 Sin embargo, como es evidente a partir de lo anterior, la técnica anterior proporciona microorganismos recombinantes y/o microorganismos vivos para uso en el tratamiento de las caries que pueden ser perjudiciales y que no son organismos de grado alimenticio. Alternativamente, la técnica anterior proporciona agente que pueden no ser suficientemente estable durante un periodo prolongado en la cavidad oral para ejercer su efecto anticariogénico potencial. Adicionalmente, los agentes de la técnica anterior quieren ser útiles para trata caries, por ejemplo, preparaciones de
10 enzima, compuestos químicos, etc. que pueden no ser estables en el frío, estables al pH y/o termoestable lo que los deja como inefectivos. Adicionalmente, algunos de ellos tienen el riesgo de efectos colaterales adversos. Por ejemplo, se sugieren antígenos estreptocócicos que se utilizan para vacunación contra la caries que pueden originar problemas severos asociados con la vacunación. Para resumir, la técnica anterior no mejora un agente que no es perjudicial para el sujeto en necesidad de profilaxis de caries y/o tratamiento, que puede ser efectiva y fácilmente utilizado
15 para tratar caries y que se pueden producir económicamente en grandes cantidades. Por lo tanto, subsiste la necesidad de un agente que cumpla el criterio deseable descrito anteriormente que es útil para evitar y/o tratar las caries. Así, se sigue que el problema técnico subyacente de la presente invención es cumplir con las necesidades descritas anteriormente. La solución a este problema técnico se logra al proporcionar las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

20 De acuerdo con lo anterior, un primer aspecto la presente invención se relaciona como un microorganismo que pertenece al género *Lactobacillus* caracterizado porque es capaz de unir específicamente al *Streptococcus mutans*, en donde la unión específica es

25 (i) resistente a un tratamiento al calor en más de 95°C durante por lo menos 20 minutos; y

(ii) resistente al tratamiento de proteasa con una proteasa seleccionada del grupo que consiste de pronasa E, pepsinasa K, tripsina y quimotripsina; y

30 (iii) dependiente de calcio; y

(iv) formado entre un rango de pH entre 4.5 y 8.5 y

(v) formado en la presencia de saliva.

35

Preferiblemente, la unión específica se puede ensayar como sigue:

40 (a) hacer crecer dicho microorganismo a una fase estacionaria;

(b) mezclar dicho microorganismo con *Streptococcus mutans* que se han hecho crecer en fase estacionaria;

(c) incubar la mezcla obtenida en la etapa (b) bajo condiciones que permitan la formación de cúmulos de dicho microorganismos y *Streptococcus mutans*; y

45

(d) detectar cúmulos mediante la ocurrencia de un sedimento.

50 La unión específica se ensaya preferiblemente como se describe en el Ejemplo 3 adelante. Los microorganismos que pertenecen al género *Lactobacillus* se mezclan preferiblemente con *S. mutans* en relaciones volumétrica de 3:1 a 60:1 (*S. mutans*: *lactobacilli*). La bacteria *Lactobacillus* y *S. mutans* se hacen crecer en fase estacionaria como se describe en el Ejemplo 1. Preferiblemente, la densidad óptica se mide fotométricamente en una longitud de onda de 600 nm. Las relaciones mencionadas corresponden a una relación de unidades formadoras de colonia de 1:50 a 1:2.5. Preferiblemente, un OD₆₀₀=1 en 1 ml se correlaciona con 3 x 10⁸ unidades formadoras de colonia de *S. mutans*. Preferiblemente, un OD₆₀₀=1 en 1 mL se correlaciona con 7 x 10⁹ unidades formadoras de colonia de lactobacilos de la presente invención. Preferiblemente, para ensayar la reacción de acumulación, las bacterias están en un volumen de 2 ml en tubos de 15 ml Falcon. Si es necesario, se diluyen las suspensiones del cultivo con amortiguador PBS para obtener las relaciones volumétricas mencionadas anteriormente, aunque manteniendo el volumen final en 2 ml. Preferiblemente, la mezcla se centrifuga durante aproximadamente 15 segundos y luego se deja sin interrupción durante por lo menos 5, 10, 15 minutos y más preferiblemente durante por lo menos 20 minutos a temperatura ambiente, es decir. Cualquier temperatura entre 16°C y 25°C. Es visible una acumulación como una turbidez inmediata de la suspensión y, después de por lo menos 20 minutos es visible una acumulación por cúmulos que sedimentan como un sedimento visible (mostrado en ejemplo en Figura 1, Tubo Falcon izquierdo), Mientras que las mezclas de cúmulos de no *S. mutans* permanecen en suspensión (mostrado en ejemplo en Figura 1, tubo Falcon derecho). Como un control, la auto acumulación de la respectiva bacteria *Lactobacillus bacterium* y la cepa *S. mutans* se pueden ensayar al omitir la bacteria *S. mutans* o la bacteria *Lactobacillus bacterium*. Adicionalmente, la unión específica no requiere magnesio. Esta característica se puede probar como se describe en los Ejemplos adjuntos.

65

Todas las características mencionadas anteriormente producen el microorganismo de la presente invención que pertenece al género de *Lactobacillus* un agente adecuado para prevenir y/o tratar las caries que es originado por *S. mutans*. De acuerdo con lo anterior, el microorganismo de la presente invención ejerce un efecto anticariogénico y es así un agente útil para evitar y/o tratar las caries. “Caries” o “caries dental” o “cavidad.” son términos intercambiables para una enfermedad infecciosa crónica asociada con área de caries blanda en un diente que conduce progresivamente a la muerte del diente. Esto ocurre usualmente en niños y en adultos jóvenes pero puede afectar a cualquier persona. Es la causa más importante de la pérdida de diente en la población joven. La caries se puede diagnosticar por métodos conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Angmar-Mansson and ten Bosch, Adv. Dent. Res. 7 (1993), 70-79).

El término “que evita la caries ” incluye la profilaxis de la caries. De acuerdo con lo anterior, un sujeto que nunca ha tenido *Streptococcus mutans*, el agente causante de la caries, pero están en riesgo de tenerlo, es decir. Infectado con *Streptococcus mutans* se beneficia, por ejemplo, de la composición de la presente invención que comprende el microorganismo o un mutante o derivado de la presente invención o un análogo o fragmento del mismo como se describe aquí ya que dicho sujeto no sufrirá de caries. Por lo tanto, las composiciones de la presente invención son, por ejemplo, útiles para ser administradas a niños para la profilaxis de la caries en razón a que la cavidad oral de los niños esta normalmente libre de *Streptococcus mutans*. Sin embargo, las composiciones de la presente invención no se limitan a la administración a niños.

El término “que tratar las caries” incluye la administración de las composiciones de la presente invención a un sujeto que sufre de caries con el propósito de administrar la cantidad de células de *Streptococcus mutans* y/o para agotar completamente el *Streptococcus mutans* de la boca, en particular de la cavidad oral incluyendo los dientes. Por supuesto, después de haberse curado de *Streptococcus mutans*, se prevé que el sujeto respectivo tiene beneficios de las composiciones de la presente invención a sus efectos anti-caries profiláctico de residuos en *Streptococcus mutans*.

Opcionalmente, el microorganismo de la presente invención es un microorganismo probiótico que tiene sus efectos anticariogénico, efectos benéficos para el organismo anfitrión al que se administra. Un “probiótico”, mediante la definición generalmente aceptada, es un “complemento de alimentación microbiano vivo con efectos benéficos al animal anfitrión al mejorar su balance microbiano intestinal”. El microorganismo de la presente invención, si tiene propiedades probióticas, se puede incluir en productos alimenticios funcionales o saludables que se describen aquí adelante.

El *Streptococcus mutans* ocurre como parte de la flora normal en la boca. Está involucrada en la causa de la caries dental. La placa dental se adhiere a las fisuras y agujeros de los dientes adyacentes a las encías. Esto consiste inicialmente de glucoproteína que se precipita y se absorbe sobre el esmalte dental. Las bacterias orales se llegan a asociar con la glucoproteína. La sacarosa dietaria es un contribuyente importante a la producción de caries, particularmente si la sacarosa está en la forma de alimentos dulces pegajosos algunos de los cuales pueden permanecer en la boca durante algún tiempo. La sacarosa es así más completamente metabolizada por el *Streptococcus mutans* para formar ácido. Las bebidas que contienen sacarosa son ingeridas y la sacarosa dura menos tiempo en la boca. Es esencial que la placa dental se controle mediante el uso regular del cepillado dental e hilo dental. La adición de 1 ppm de fluoruro al agua de bebida ha probado ser muy efectivo en la reducción de las caries. Se ha rechazado La posibilidad de utilizar una vacuna contra *Streptococcus mutans*. Sin embargo, mediante el sorprendente hallazgo de la presente invención de que los microorganismos de ocurrencia natural pertenecen al género de *Lactobacillus* son capaces de unirse específicamente al *Streptococcus mutans*, es posible evitar efectivamente y/o tratar las caries debido a que los microorganismos de la presente invención se acumulan y retiran el *Streptococcus mutans* debido a, por ejemplo, el flujo salivar de la boca que incluye a la superficie dental y la cavidad oral. De acuerdo con lo anterior, la presente invención proporciona bacterias que se pueden administrar fácilmente que son organismos de grado alimenticio que pueden, en adición a sus propiedades anticarieogénica, ser útiles como probióticos.

Cuando se selecciona una colección privada para identificar microorganismos por la capacidad de unirse al *Streptococcus mutans*, se encuentra sorprendentemente que los microorganismos de ocurrencia natural que pertenecen al género *Lactobacillus* son capaces de unirse específicamente a los *Streptococcus mutans* que es el agente causante de la caries. Mediante la unión específica al *Streptococcus mutans*, el microorganismo que pertenece al género *Lactobacillus* descrito aquí, inter alia, unido a y agregado al *Streptococcus mutans* y así, en consecuencia, enjuagado el *Streptococcus mutans* mediante flujo natural de saliva, evitando por lo tanto y/o tratando las caries. En la parte superior de esto, el microorganismo de la presente invención no se une preferiblemente a otros microorganismos presentes en la cavidad oral que se describe aquí y en particular en el Ejemplo 4 adelante. Así, el microambiente de la cavidad oral no se interrumpe debido a que solo el *S. mutans* como el agente causante de la caries se agota. Se sabe que, el *S. mutans* no tiene ningún efecto benéfico en la cavidad oral y, así, su pérdida no tiene efectos adversos para el anfitrión respectivo.

Sorprendentemente, la unión específica del microorganismo, en particular de las especies *Lactobacillus* descritas aquí para *Streptococcus mutans* es resistente al tratamiento del calor y resistente al tratamiento con proteasa. Adicionalmente, la unión específica es dependiente en calcio y/o independiente de magnesio y estable en un punto ácido de 4.5 y ocurre en la presencia de saliva que la deja particularmente adecuada para aplicaciones orales o como aditivo para alimentos, productos alimenticios o bebidas que pueden contener mayores concentraciones de calcio, tal como la leche. En forma destacada, los análogos o fragmentos liofilizados o inactivados térmicamente de dichos microorganismos dispuestos aquí son todavía capaces de unirse específicamente al *Streptococcus mutans*. Este sorprendente efecto es ventajoso para utilizar dichos análogos o fragmentos de dichos microorganismos así como también mutantes

ES 2 344 654 T3

o derivados de los mismos en composición para uso en mamíferos, preferiblemente, humanos o animales para evitar y/o tratar las caries. En dichos análogos particulares o fragmentos se puede agregar fácilmente cualquier composición, por ejemplo una composición cosmética o farmacéutica, alimento o producto alimenticio o bebidas y similares. Adicionalmente, la producción de tales análogo o fragmentos es económica y fácil y se pueden almacenar durante períodos prolongados sin perder su capacidad para unirse específicamente a *Streptococcus mutans*. Una ventaja adicional el microorganismo de la presente invención es que este retiene su capacidad para unirse específicamente al *S. mutans* si se liofiliza o se seca o se seca por rociado. Esto lo hace un ingrediente favorable para las composiciones descritas aquí.

Otras realizaciones y ventajas de la invención que establecen en parte en la descripción aquí, y en parte pueden ser obvias a partir de la descripción, pues se debe aprender de la práctica de la invención.

Antes se describe la presente invención en detalle, se entiende que esta invención no se limita a la metodología particular, protocolos, bacterias, vectores, y reactivos etc. Descritos aquí ya que ellos pueden variar. También se entiende que la terminología utilizada aquí es para el propósito de escribir solo realizaciones particulares, y no se pretenden que limiten el alcance de la presente invención que solo se limitaran por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se defina otra cosa, todos los términos científicos y técnicos utilizados aquí tiene el mismo significado que lo entiende comúnmente el experto en la técnica.

Preferiblemente, los términos utilizados aquí se definen como se describe en “A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)”, Leuenerger. H.G.W, Nagel, B. and Kölbl, H. eds. (1995), Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basilea, Suiza).

A través de esta especificación y las reivindicaciones que siguen, al menos que el contexto requiera otra cosa, la palabra “comprende”, y variaciones tales como “comprendes” y “que comprenden”, se entiende que implican la inclusión de un entero establecido o etapa o grupo de enteros o etapas pero no la exclusión de ningún otro entero o etapas o grupo de enteros o etapas.

Cabe notar que como se utiliza aquí y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singular “un”, “uno” y “el”, incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a “un reactivo” incluye uno o más de tales reactivos diferentes, y la referencia a “el método” incluye referencia a etapas equivalentes y métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica y que se pueden modificar o sustituir por los métodos descritos aquí.

Cuando se utiliza en el contexto de la presente invención, El término “microorganismo que pertenece al género de *Lactobacillus*” o “microorganismo de la presente invención” dicho término también abarca derivados o mutantes o análogos o fragmentos, tal como una fracción de membrana como se describe aquí, de dichos microorganismos que retienen la capacidad descrita anteriormente para unirse específicamente al *S. mutans*. Los términos “derivado”, “mutantes”, “análogos” y “fragmentos” también se describen aquí. Las bacterias de los ácidos lácticos que divide desde un punto de vista taxonómico en las subdivisiones de *Streptococcus*, *Leuconostococcos*, *Pediococcus* y *Lactobacillus*. El microorganismo de la presente invención es una especie *Lactobacillus*. Los miembros del grupo de bacterias del ácido láctico carecen normalmente de porfirinas y citocromos, no llevan a cabo fosforilación de transporte del electrones y por lo tanto obtienen la energía solo mediante fosforilación de nivel de sustrato, Es decir las bacterias del ácido láctico ATP se sintetizan a través de la fermentación de carbohidratos. Todas las bacterias del ácido láctico crecen anaeróbicamente, Sin embargo, a diferencia de muchos anaerobios, la mayor parte de las bacterias del ácido láctico no son sensibles al oxígeno y pueden crecer así en su presencia así como también en su ausencia. De acuerdo con lo anterior, las bacterias de la presente invención son preferiblemente bacterias del ácido láctico anaeróbicas aerotolerantes que pertenece al género de *Lactobacillus*.

Las bacterias del ácido láctico de la presente invención son preferiblemente esférica o con forma de barra, que van desde largas y delgadas a barras cortas y dobladas, preferiblemente son inmóviles y/o asporogenas y producen ácido láctico como un producto principal o único producto del metabolismo de la fermentación. El género *Lactobacillus* al que pertenecen los microorganismos de la presente invención se divide por las siguientes características en tres subgrupos principales, con lo cual se prevé que las especies *Lactobacillus* de la presente invención pueden pertenecer a cada uno de los tres subgrupos principales:

(a) *Lactobacillus* homofermentativo

- (i) producir ácido láctico, preferiblemente isómeros L-, D- o DL- de ácido láctico en una cantidad de por lo menos 85% de glucosa a través de la ruta Embden-Meyerhof;
- (ii) hacer crecer a una temperatura de 45°C, pero no a una temperatura de 15°C;
- (iii) ser de forma de barra alargada; y
- (iv) tener ácido teicoico glicerol en la pared celular;

ES 2 344 654 T3

(b) *Lactobacillus* homofermentativo

- (i) producir ácido láctico, preferiblemente isómero L- o DL de ácido láctico a través de la ruta Embden-Meyerhof;
- (ii) hacer crecer a una temperatura de 15°C, que muestra el crecimiento variable a una temperatura de 45°C;
- (iii) tener forma de barra larga o coniforme; y
- (iv) tener ribitol y/o ácido teicoico glicerol en su pared celular;

(c) *Lactobacillus* heterofermentativo

- (i) producir ácido láctico, preferiblemente de DL-isómero de ácido láctico en un cantidad de por lo menos 50% de glucosa a través de la ruta pentosa-fosfato;
- (ii) producir dióxido de carbono y etanol
- (iii) producir crecimiento variable a una temperatura de 15°C a 45°C;
- (iv) tener forma de barra alargada o corta; y
- (v) tener ácido teicoico glicerol en su pared celular.

Basado en las características descritas anteriormente, los microorganismos de la presente invención se pueden clasificar para pertenecer al género de *Lactobacillus*. Al utilizar sistemáticos clásicos, por ejemplo, con referencia a las descripciones pertinentes en "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" (Williams & Wilkins Co., 1984), un microorganismo de la presente invención se puede determinar que pertenece al género de *Lactobacillus*. Alternativamente, los microorganismos de la presente invención se puede clasificar para pertenece al género de *Lactobacillus* mediante los métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, por su huella metabólica, es decir un resumen comparable de la capacidad de microorganismos de la presente invención para metabolizar azúcares o mediante otros métodos descritos, por ejemplo, en Schleifer *et al.*, System. Appl. Microb., 18 (1995), 461-467 o Ludwig *et al.*, System. Appl. Microb., 15 (1992), 487-501. Los microorganismos de la presente invención son capaces de metabolizar fuentes de azúcar que son típicas y conocidas en la técnica para microorganismos que pertenecen al género de *Lactobacillus*. En una realización preferida, Sin embargo, el microorganismo de la presente invención tiene una huella metabólica seleccionada del grupo que consiste de:

- (i) metaboliza D-lactosa, pero no L-sorbosa y/o D-sacarosa y/o D-inulina,
- (ii) metaboliza inulina,
- (iii) metaboliza L-sorbosa, pero no D-lactosa y/o D-sacarosa y/o inulina, y
- (iv) metaboliza L-sorbosa, D-lactosa y inulina.

Preferiblemente, el microorganismo de la presente invención tiene una huella metabólica del grupo que consiste de:

- (i) metaboliza D-lactosa, pero no L-sorbosa, D-sacarosa y inulina,
- (ii) metaboliza L-sorbosa, D-lactosa y inulina, pero no D-sacarosa,
- (iii) metaboliza L-sorbosa, pero no D-lactosa, D-sacarosa y inulina, y
- (iv) metaboliza L-sorbosa, D-lactosa, D-sacarosa, pero no inulina.

Por supuesto, los microorganismos de la presente invención no se limitan a la metabolización de los azúcares mencionados en el patrón de huella metabólica mencionado anteriormente, pero pueden ser capaces de metabolizar adicionalmente azúcares que se metabolizan comúnmente por especies *Lactobacillus*.

La afiliación de los microorganismos de la presente invención al género de *Lactobacillus* también se puede caracterizar al utilizar otros métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, utilizando electroforesis de SDS-PAGE de proteínas total de las especies al ser determinadas y que las comparan con cepas conocidas y ya caracterizadas del género *Lactobacillus*. Las técnicas para preparar un perfil de proteína total como se describió anteriormente, así co-

mo también el análisis numérico de tales perfiles, son bien conocidas por el experto en la técnica. Sin embargo, los resultados solo son confiables cuando cada etapa del proceso se estandariza suficientemente. Enfrentados con los requerimientos de exactitud cuando se determina la unión de un microorganismo del género *Lactobacillus*, los procedimientos estandarizados están regularmente disponibles al público por los autores tal como aquel de Pot *et al.*, como se presenta durante un “trabajo” organizado por la Unión Europea, en la Universidad de Ghent, en Bélgica, en Sep. 12 a 16, 1994 (Fingerprinting techniques for classification and identification of bacteria, SDS-PAGE of whole cell protein). El software utilizado en la técnica para analizar el gel de electroforesis SDS-PAGE es de importancia crucial debido al grado de correlación entre las especies que dependen de los parámetros y algoritmos utilizados por este software. Sin ir a los detalles teóricos, las comparaciones cuantitativas de las bandas medidas con un densitómetro y normalizado por un computador se hacen preferiblemente con el coeficiente de correlación de Pearson. La matriz de similitud así obtenida se puede organizar con la ayuda de algoritmo UPGMA (método de grupo de par no ponderado utilizando conexión promedio) que no solo hace posible agrupar juntos la mayoría de perfiles similares, sino también construye dendogramas (véase Kersters, Numerical methods in the classification and identification of bacteria by electrophoresis, in Computerassisted Bacterial Systematics, 337-368, M. Goodfellow, A. G. O'Donnell Ed., John Wiley and Sons Ltd, 1985).

Alternativamente, la afiliación de dicho microorganismos de la presente invención al género *Lactobacillus* se puede caracterizar con respecto al ARN ribosómico en un denominado Riboprinter.RTM. Más preferiblemente, la afiliación de la especie identificada recientemente de la invención para el género *Lactobacillus* se demuestra al comparar la secuencia de nucleótido de ARN ribosómico 16S la bacteria de la invención, o de su ADN genómico que codifica el ARN ribosómico 16S, con aquellos de otros géneros y especies de bacterias del ácido láctico conocidas hasta la fecha. Otra alternativa para determinar la unión de las especies nuevamente identificadas de la invención al género *Lactobacillus* es el uso de cebadores PCR específicos de especies que tienen objetivo la región separadora rARN 16S-23S. Otra alternativa preferida es RAPD-PCR (Nigatu *et al.* en Antonie van Leeuwenhoek (79), 1-6, 2001) por virtud de aquel patrón de ADN específico de cepa que se genera que permite determinar la afiliación de microorganismos identificados de acuerdo con la presente invención para el género *Lactobacillus*. Técnicas adicionales útiles para determinar la afiliación del microorganismo de la presente invención al género *Lactobacillus* son el polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP) (Giraffa *et al.*, Int. J. Food Microbiol. 82 (2003), 163-172), huella del ementos repetitivos (Gevers *et al.*, FEMS Microbiol. Lett. 205 (2001) 31-36) o análisis de patrón de éster de metilo de ácido graso (FAME) de células bacterianas (Heyrman *et al.*, FEMS Microbiol. Lett. 181 (1991), 55-62). Alternativamente, se puede determinar *Lactobacillus* mediante tipificación de lectina (Annuk *et al.*, J. Med. Microbiol. 50 (2001), 1069-1074) o mediante análisis de sus proteínas de pared celular (Gatti *et al.*, Lett. Appl. Microbiol. 25 (1997), 345-348).

De acuerdo con la presente invención, los microorganismos son bacterias del ácido láctico que pertenece al género de *Lactobacillus*, más preferiblemente especies *Lactobacillus* como se describe aquí. Aún más preferiblemente los *Lactobacillus* de la presente invención son *Lactobacillus paracasei* o *Lactobacillus rhamnosus*. Sin embargo, las especies *Lactobacillus* no se limitan a estos. En una realización particular preferida los microorganismos de la presente invención se “aislan” o “purifican”. El término “aislando” significa que el material se remueve de su ambiente original, por ejemplo el ambiente natural de su ocurrencia natural. Por ejemplo, un microorganismo de ocurrencia natural, preferiblemente una especie *Lactobacillus*, separada de algunos o todos los materiales coexisten en el sistema natural, se aísla. Tal un microorganismo puede ser una parte de una composición, y se relaciona por estar aislado en la composición que no es parte de su ambiente natural.

El término “purificado” no requiere pureza absoluta; a diferencia, se pretende una definición relativa. Los microorganismos individuales obtenidos a partir de una colección que han purificado convencionalmente a homogeneidad microbiológica, es decir ellos crecen como colonias sencillas cuando se siembra en placas agar mediante los métodos conocidos en la técnica. Preferiblemente, las placas agar que se utilizan para este propósito son selectivas para especies *Lactobacillus*. Tales placas agar selectivas se conocen en la técnica.

Una realización particularmente preferida de la presente invención, el microorganismo de la presente invención se selecciona del grupo que consiste de *Lactobacillus paracasei* o *Lactobacillus rhamnosus* que tienen un número de acceso de DSMZ número DSM 16667 (*L. paracasei* ssp. *paracasei* Lb-Ob-K1), número de acceso DSMZ DSM 16668 (*L. paracasei* ssp. *paracasei* Lb-Ob-K2), número de acceso DSMZ DSM 16669 (*L. paracasei* ssp. *paracasei* Lb-Ob-K3), número de acceso DSMZ DSM 16670 (*L. paracasei* ssp. *paracasei* Lb-Ob-K4), número de acceso DSMZ DSM 16671 (*L. paracasei* ssp. *paracasei* Lb-Ob-K5), número de acceso DSMZ DSM 16672 (*L. rhamnosus* Lb-Ob-K6) y número de acceso DSM DSM 16673 (*L. rhamnosus* Lb-Ob-K7) o un mutante o derivado del mismo, en donde dicho mutante o derivado retiene la capacidad para unirse específicamente al *Streptococcus mutans*. El término “*Lactobacillus paracasei* o *Lactobacillus rhamnosus*” tiene el número de acceso DSMZ” se relaciona con células de un microorganismo que pertenece a las especies *Lactobacillus paracasei* o *Lactobacillus rhamnosus* depositado con el “Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (“DSMZ”) en Agosto 26, 2004 y que tiene los siguientes números de depósitos DSM 16667, 16668, 16669, 16670, 16671, 16672 o 16673. El DSMZ se ubica en Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Alemania. Los depósitos DSMZ mencionados anteriormente se hacen de conformidad con los términos del tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos para propósitos de procedimiento de patentes.

“Un mutante o derivado” del microorganismo de la presente invención, preferiblemente de la células de *Lactobacillus paracasei* o *Lactobacillus rhamnosus* depositadas tiene preferiblemente las mismas características que las

cepas depositadas respectivas es decir estas retienen la capacidad de unirse específicamente a *Streptococcus mutans*, preferiblemente con las características de unión como se describió anteriormente. Por ejemplo, dicho derivado se puede construir con ingeniería genética. En el contexto de la presente invención se utiliza el término “construir con ingeniería genética” en su sentido más amplio por métodos conocidos por el experto en la técnica para modificar ácidos nucleicos deseados *in vitro* e *in vivo* de tal manera que las modificaciones genéticas se afecten y los genes se alteren mediante tecnología de ADN recombinante. De acuerdo con lo anterior, se prefiere que dichos métodos comprendan clonación, secuenciamiento y transformación de ácidos nucleicos recombinantes. Para este propósito los vectores apropiados que incluyen vectores de expresión para Especies Lactobacillus, por ejemplo, como se describe en la EP-B1 506 789, EP-B1 316 677, EP-B1 251 064, EP-B1-218 230, EP-B1 133 046 o WO 89/01970, cebadores, enzimas, células anfitrionas adicionales para clonación de construcciones intermedias y similares se pueden utilizar y son conocidas por el experto. Preferiblemente, los mutantes construidos con ingeniería genética comprenden células del microorganismo de la presente invención, preferiblemente de las especies Lactobacillus depositadas cosechadas de ácidos nucleicos recombinantes comprendidas en su cromosoma bacteriano o un plásmido o comprendidas en su cromosoma bacteriano y/o plásmido. Dichos ácidos nucleicos recombinantes son preferiblemente externos al microorganismo de la presente invención. Por “externo” significa que la molécula de ácido nucleico o polinucleótido es heteróloga con respecto a las células anfitrionas, esto significa derivado de una célula o organismo con un fondo genómico diferente, o es homólogo con respecto a las células anfitrionas pero ubicada en un diferente ambiente genómico que la contraparte de ocurrencia natural de dicha molécula de ácido nucleico. Esto significa que, si la molécula de ácido nucleico es homóloga con respecto a las células anfitrionas, no se ubica en su ubicación natural en el genoma de dicha célula anfitriona, en particular está rodeada por diferentes genes. En este caso el polinucleótido puede estar bajo el control de su propio promotor o bajo el control de un promotor heterólogo. El vector o molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención que está presente en la célula anfitriona puede estar integrado en el genoma de la célula o puede estar mantenido en alguna forma extracromosómicamente. A este respecto, también se entiende que la molécula de ácido nucleico de la invención se puede utilizar para restaurar o crear un gen mutante a través de recombinación homóloga.

Los Plásmidos pueden ser plásmidos de número de copia alta baja o medias. Dicho mutantes construidos con ingeniería genética pueden cosechar ácidos nucleico que codifican una glucanasa o mutanasa que es capaz de degradar el enlace 1,3-glicosídico específico de subunidades de sacarosa. Las glucanasas, por ejemplo, se describe en la Fuglsang *et al.*, J. Biol. Chem. 275 (2000), 2009-2018. También se prevé que los mutantes construidos con ingeniería genética comprenden células que tienen ácidos nucleicos recombinantes que codifican anticuerpos que se secretan preferiblemente o anclan en la pared de las células bacterianas. El término “anticuerpo” a barca anticuerpos intactos así como también fragmentos de anticuerpo del mismo, como, similares a cadenas ligeras y pesadas separadas, Fab, Fab/c, Fv, Fab'. F(ab')₂. El término “anticuerpo” también comprende anticuerpos humanizados, anticuerpos bifuncionales y construcciones de anticuerpo, similares Fvs monocatenario (scFv) de proteína de fusión de anticuerpo. También se prevé en el contexto de esta invención que el término “anticuerpo” comprende construcciones de anticuerpo que se puede expresar en células del derivado del microorganismo depositado de la presente invención, por ejemplo construcciones de anticuerpo que se puede transformar a través, *inter alia*, de vectores mediante métodos conocidos en la técnica. Se prevé en particular que tales construcciones de anticuerpos reconocen específicamente, por ejemplo, el antígeno estreptocócico I/II. Tal un método, por ejemplo, se describe en la Krueger *et al.*, Nat. Biotechnol. 20 (2002), 702-706 o Shiroza, Biochim Biophys Acta 1626 (2003), 57-64.

La secreción del anticuerpo expresado se logra preferiblemente al conectar operativamente el ácido nucleico que codifica un anticuerpo a una secuencia de señal de secreción. El anclaje en la pared celular bacteriana se puede lograr al hacer uso del mecanismo del sortasa enzima. A saber, las proteínas de superficie de las bacterias gran positivas se conectan a la pared celular bacteriana mediante un mecanismo que involucran la división de un motivo Leu-Pro-X-Thr-Gly (LPXTG) conservado y que ocurre durante el ensamble de la pared celular del péptidoglicano. De acuerdo con lo anterior, la molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo se puede fusionar a una frecuencia que codifica el motivo conservado mencionado anteriormente que se utiliza por sortasa para anclar proteínas en la pared celular bacteriana. También se prevé que el microorganismo de la presente invención, preferiblemente las especies Lactobacillus depositadas se modifican genéticamente para alojar una molécula de ácido nucleico que codifican reuterina que es una sustancia antimicrobiana efectiva, *inter alia*, contra *Streptococcus mutans*. La reuterina, por ejemplo, se describe en la Talarico *et al.*, Chemother. 33 (1989), 674-679.

Un mutante del microorganismo de la presente invención, preferiblemente un mutante de las cepas Lactobacillus depositadas preferiblemente muta artificialmente. De acuerdo con la presente invención, El término “muta” significa una modificación permanente del material genético, es decir, ácidos nucleico, causados, por ejemplo, naturalmente o por medios físicos o por compuestos químicos/sustancias/agentes, tal como EMS o ENU. Dichas modificaciones incluye mutaciones de punto, como transversiones, eliminación/inserción/adición de una o más bases dentro de un ácido nucleico/gen/cromosoma modificando por lo tanto el ácido nucleico/gen/cromosoma que puede originar, *inter alia*, expresión/transcripción/traducción génica aberrante o productos génicos inactivos, productos génicos activos constitutivos/inactivos que conducen a por ejemplo, efectos negativos dominantes. Preferiblemente, una mutación conduce a una capacidad incrementada de unión específica a *Streptococcus mutans*. Así, también se prefiere que las células mutantes del microorganismo depositado que cosecha la mutación de los genes deseados o en la que se induce una mutación en los genes deseados por los métodos conocidos por los expertos en la técnica. También se conoce en la técnica anterior que muta o células bacterianas construidas genética que se pueden seleccionar mediante cualquier método/fenotipo adecuado. En el contexto de la presente invención, un mutante que tiene una capacidad para unirse específicamente a *Streptococcus mutans* se puede probar De acuerdo con el métodos como se describe en la los

Ejemplos adjuntos. El término “mutante”, sin embargo, también incluyen células del microorganismo de la presente invención, preferiblemente células de los microorganismo depositado que aloja mutaciones espontáneas, de ocurrencia natural, en su genoma, es decir cromosoma bacteriano. “Mutaciones espontáneas” son mutaciones que surgen naturalmente, es decir, sin la manipulación genética directa del hombre, o mediante exposición al mutágeno. La selección de mutantes espontáneos se puede lograr al cultivar la cepa y seleccionar las variantes deseadas, por ejemplo, mediante la capacidad bacteriana para mostrar una mejora. Los métodos para la selección de mutantes espontáneos se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook, Russell “Molécula Cloning, A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (2001); Ausubel, “Current Protocols en Molécula Biology”, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989)). Por ejemplo, tales mutaciones pueden ocurrir durante cultivo, por ejemplo, durante procesos de división celular normal con replicación de ADN durante el paso y/o conservación del mutante del microorganismo de la presente invención:

La cavidad oral es el hogar de muchas especies diferentes de streptococci y no es sorprendente, que se consideren que ellas comparten el mismo hábitat, que ellas tienen las mismas características en común. Así, es preferible que el microorganismo de la presente invención se una específicamente al *Streptococcus mutans*. De acuerdo con lo anterior, El término “unión específica” en el contexto de la presente invención significa que el microorganismo de la presente invención se une al *Streptococcus mutans* pero no se une a la mayoría de otras especies, preferiblemente no se une a otras especies que pertenece al género Streptococcus. Otras especies que pertenecen al género Streptococcus son aquella que se describe en la el Ejemplo 4. A saber, el microorganismo de la presente invención no se une preferiblemente a bacterias que pertenece a las especies *Streptococcus salivarius*, que pertenece preferiblemente a las subespecies termofilus, a las especies *Streptococcus oralis*, a las especies *Streptococcus mitis* y/o a las especies *Streptococcus sanguinis*. Más preferiblemente, no se une a *Streptococcus salivarius* ssp. termofilus (identificada por API 50 CH (Biomerieux, Francia), *Streptococcus oralis* (DSMZ 20066), *Streptococcus oralis* (DSMZ 20395), *Streptococcus oralis* (DSMZ 20627), *Streptococcus mitis* (DSMZ 12643) y/o *Streptococcus sanguinis* (DSMZ 20567). Adicionalmente, dicho microorganismo no se une preferiblemente a bacteria que pertenece a géneros diferentes de Streptococcus, por ejemplo que pertenecen al género de Staphylococcus. Más preferiblemente, no se unen bacteria que pertenece a las especies *Staphylococcus epidermidis*. Más preferiblemente, no se une al *Staphylococcus epidermidis* (DSMZ 1798) y/o *Staphylococcus epidermidis* (DSMZ 20044).

Para la prueba de unión específica, preferiblemente cada una de las bacterias orales mencionadas anteriormente se mezclan preferiblemente en una relación volumétrica 3:1 con cultivos de Lactobacillus de la presente invención y se ensaya preferiblemente a acumulación como se describe aquí y para el ejemplo en el Ejemplo 3.

Se muestra que el *Lactobacillus paracasei*, preferiblemente *L. paracasei* ssp. paracasei de la presente invención no acumula ninguna de las bacterias orales mencionadas anteriormente que pertenece al género de Streptococcus y no se une a la bacteria que pertenece al género de Staphylococcus mencionado aquí anteriormente. Las cepas *Lactobacillus rhamnosus* de la presente invención se muestra que no agregan todo el Streptococcus mencionado anteriormente y la especie Staphylococcus, diferentes de *Streptococcus salivarius* ssp. thermophilus. Preferiblemente el término “que se une específicamente” también significa que un microorganismo de la presente invención se une a tales cepas *Streptococcus mutans* que tienen la capacidad de ser un patógeno dental cariogénico. La reacción de unión específica comprende la unión y, preferiblemente, acumulación de células *Streptococcus mutans* como se describe aquí mediante el microorganismo de la presente invención en la boca. Esta unión específica conduce en consecuencia, a lavado de las células de *Streptococcus mutans* mediante, por ejemplo, flujo saliva o mediante un enjuague bucal o lavado de la boca o similar como se describe aquí. En la boca define la cavidad oral de los mamíferos, preferiblemente humano o animales tal como mascotas, compuesta por la mucosa oral (encías, labios, mejilla, paladar y el piso de la boca), la lengua y los dientes (incluyendo estructuras artificiales). Preferiblemente, la reacción de unión específica de los microorganismos de la presente invención a *Streptococcus mutans* evita que la célula de *Streptococcus mutans* se adhiera a la superficie de un diente o dientes (aunque no se limita por la teoría puede conducir a la separación de células de *Streptococcus mutans* que mutan de la superficie de un diente o dientes). En consecuencia, la reacción de unión específica resultan enjuague de células de *Streptococcus mutans* de la boca, disminuyendo por lo tanto el agente causante de las caries y, evitando así y/o tratando las caries.

Se considera que el microorganismo de la presente invención se puede unir específicamente al antígeno estreptocócico I/II que también se conoce como antígeno B, IF, P1, SR, MSL-1 o PAc. Sin embargo, el microorganismo de la presente invención se puede unir a cualquier otra proteína o estructura de superficie de *S. mutans*, agregando por lo tanto *S. mutans* y jugando la cavidad oral como se describe aquí. Se sabe que *Streptococcus mutans* se une a través dicho antígeno estreptocócico I/II a la cutícula. De acuerdo con lo anterior, cuando el microorganismo de la presente invención se puede unir, por ejemplo, a dicho antígeno estreptocócico I/II, el *Streptococcus mutans* se obstaculiza para que se una a la superficie de los dientes lo cual ayuda así a evitar y/o tratar las caries.

La cutícula es un recubrimiento claro, delgado que contiene proteína y lípidos (grasas) encontradas en la saliva. Esta es su forma en segundos después que se limpia la superficie dental. La formación de cutícula es la primera etapa en la formación de la placa dental. La placa dental es un depósito blando que se acumula en los dientes. La placa se puede definir como una comunidad microbiana compleja con más de 10^{10} bacterias por miligramo. Se ha estimado que se pueden encontrar en la placa 400 especies bacterianas distintas. En adición a las células bacterianas, la placa consiste de un número pequeño de las células epiteliales, leucocitos, y macrófagos. Las células están contenidas dentro de una matriz extracelular, que se forma de productos bacterianos y saliva. La matriz extracelular contiene proteínas, polisacáridos y lípidos. Una de las proteínas presente en saliva es aglutinina que se considera de una parte conduce a la

ES 2 344 654 T3

remoción parcial del *Streptococcus mutans* de la boca, sin embargo, de otra parte se sospecha que facilita la adhesión de *Streptococcus mutans* a la superficie de los dientes, facilitando por lo tanto la adhesión inicial del *Streptococcus mutans* a los dientes y, así, el inicio de las caries.

5 Si el microorganismo de la presente invención se une específicamente a *Streptococcus mutans* como se definió aquí anteriormente se puede probar fácilmente, inter alia, al comparar la reacción de dicho microorganismo de la presente invención con células *S. mutans* con un microorganismo que también pertenece al género de *Lactobacillus* que no se une específicamente al *Streptococcus mutans* al emplear preferiblemente el método como se describe en los Ejemplos adjuntos adelante.

10 Preferiblemente, el microorganismo de la presente invención es capaz de unirse específicamente al *Streptococcus mutans* serotipo c (DSMZ 20523) y/o serotipo e (NCTC 10923) y/o serotipo f (NCTC 11060). Esto significa que el microorganismo de la presente invención se une al *Streptococcus mutans* serotipo c, serotipo e o serotipo f. Preferiblemente esto significa que el microorganismo de la presente invención se une al *Streptococcus mutans* serotipo c y serotipo e o serotipo f. Esto también significa que el microorganismo de la presente invención se une al *Streptococcus mutans* serotipo c y serotipo f o serotipo e o que el microorganismo de la presente invención se une al *Streptococcus mutans* serotipo e y serotipo f o c. Más preferiblemente esto significa que el microorganismo de la presente invención se une a *Streptococcus mutans* serotipo c, serotipo e y serotipo f. De acuerdo con la presente invención un "serotipo" es una propiedad antigénica de una célula bacteriana, preferiblemente de una célula *Streptococcus mutans* identificada por método serológicos conocidos en la técnica.

20 Como se describió anteriormente, la unión específica del microorganismo de la presente invención al *Streptococcus mutans* es resistente al tratamiento con calor. De acuerdo con lo anterior, el microorganismo de la presente invención se trata con calor, por ejemplo, a una temperatura de más de 95°C durante por lo menos 20 minutos, preferiblemente a 121°C. Después de enfriamiento, la capacidad del microorganismo de la presente invención de unirse específicamente al *S. mutans* se determina como se describe aquí.

30 La temperatura correspondiente puede ser dependiente de la especie *Lactobacillus* pero se puede determinar fácilmente por el expertos mediante experimentación de rutina, por ejemplo al incubar las células correspondientes a diferentes temperaturas y determinando la cantidad de células *Lactobacillus* que aún son capaces de unirse específicamente al *Streptococcus mutans* al utilizar métodos como aquellos mostrados en los ejemplos aquí.

35 El tratamiento con calor dura un periodo de por lo menos n minutos, en donde n es un entero en el rango de 20 a 60, siendo n=20 particularmente preferible. Sin embargo, no hay en principio un límite superior para el tiempo de incubación. Sin embargo, preferiblemente no es mayor de 4, 3, 2 o 1 hora. El tratamiento con calor más preferido dura 20 minutos a una temperatura de 121°C en un vapor saturado que tiene una presión atmosférica de 2 bar. El tratamiento con calor más preferido se considera que eliminan cualquier función de una proteína y/o cualquier vitalidad de las células que distingue así los el microorganismo de la presente invención de otros microorganismos en los que aún es capaz de unirse específicamente al *S. mutans*. Por lo tanto, es muy útil para cualquier alimento, producto alimenticio, bebida o composición de la presente invención si se desea que el microorganismo no pueda estar vivo.

40 La unión específica del microorganismo de la presente invención se caracteriza adicionalmente por la resistencia al tratamiento de proteasa que es tratamiento con una proteasa seleccionada del el grupo que consiste de pronasa E, tripsina y quimotripsina. Estas proteínas son proteasas que no muestra especificidad y, así, se consideran que degradan cualquier proteína que esta sobre la superficie celular del microorganismo. Otras proteasa, que se conocen por tener preferencias por ciertos patrones de residuos de aminoácidos son elastasa, trombina, aminopeptidasa I, carboxipeptidasa, dostripaina, endoproteínasa, papaína, pepsina o proteasas. Estas últimas proteasas también se pueden utilizar para probar si la unión específica del microorganismo de la presente invención a *S. mutans* es resistente a la ultima proteasa más específica. Así, después que se describe el tratamiento de proteasa como se describe en la los Ejemplos adjuntos, el microorganismo de la presente invención todavía es capaz de unirse específicamente al *Streptococcus mutans*.

55 En adición, la unión específica del microorganismo de la presente invención se caracteriza adicionalmente por su dependencia de calcio. Preferiblemente, la unión específica toma lugar en la presencia de una concentración de iones de calcio entre 0.05 mM y 500 mM, preferiblemente entre 1 mM y 100 mM. Particularmente la concentración de calcio preferida está entre 2 mM y 30 mM. Se puede probar la dependencia de la unión específica sobre el calcio como se describe en los Ejemplos adjuntos.

60 Más aún, la unión específica al microorganismo de la presente invención se mantiene sobre un rango de pH entre 4,0 y 9,0, preferiblemente entre 4,0 y 7,0. En particular, el valor del pH en el que tiene lugar la unión específica todavía es preferiblemente 4,5. El ensayo del mantenimiento de la unión específica en el rango de pH descrito anteriormente se muestra en los Ejemplos adjuntos.

65 Adicionalmente, la unión específica es independiente de magnesio. Así, no es necesario que los iones de magnesio o sales de magnesio estén presentes lo que se demuestra en los Ejemplos adjuntos.

Todavía una característica adicional de la unión específica es su ocurrencia en la presencia de saliva. La saliva es una secreción exógena que se sintetiza por las glándulas salivales. Es un complejo líquido que contiene, aparte de

aproximadamente 99% de agua una multiplicidad de compuestos orgánicos e inorgánicos. Los ingredientes fisiológicos de la saliva son, inter alia, enzimas, por ejemplo, amilasas, carboanhidasas, lisozima, peroxidadas o proteínas, por ejemplo, mucinas, lactoferrina, proteínas ricas en prolina, cistatinas, histatinas o estaterinas o IgA soluble. Así, aunque están presentes como una variedad de sustancias que interfieren potencialmente en la saliva, la unión específica del microorganismo de la presente invención no se interrumpe o impide. Para probar la unión específica en la presencia de saliva, se prefiere que se utilice la saliva que contiene preferiblemente la especie *Streptococcus* descrito en el Ejemplo 4 y/o la especie *Staphylococcus* del Ejemplo 4. Sin embargo, si se prueba la especie *Lactobacillus rhamnosus* de la presente invención para la unión específica a *S. mutans* en la presencia de saliva, se refiere a que se omite el *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*. La unión específica se ensaya como se describe aquí.

Las características anteriormente mencionadas del microorganismo de la presente invención hace que sea un agente robusto y efectivo para prevenir y/o tratar caries, ya que se administra principalmente en varias formas a la boca, que incluye la cavidad bucal y dientes, donde, inter alia, está presente la saliva que incluye ciertas proteasas y bajos valores de pH después de la ingestión de carbohidratos del los productos alimenticios. Más aún, la resistencia al calor tiene efectos beneficiosos en la adición de los microorganismos de la presente invención como aditivo al producto alimenticio durante la preparación de dicho producto alimenticio. A saber, el producto alimenticio es a menudo esterilizado por calor, precocinado y pasteurizado y similares que son perjudiciales para la viabilidad de los microorganismos.

En otro aspecto la presente invención se relaciona con un análogo o fragmento del microorganismo de la presente invención, que se inactivada térmicamente o se liofiliza, en donde dicho análogo o fragmento conserva la capacidad de unir específicamente el *Streptococcus mutans*.

De acuerdo con la presente invención el término “análogo del microorganismo de la presente invención” incluye una célula muerta o inactivada del microorganismo de la presente invención, preferiblemente de la especie *Lactobacillus* descrita aquí que ya no es capaz de formar una sola colonia en una placa específica para los microorganismos que pertenecen al género de *Lactobacillus*. Dichas células muertas o inactivadas pueden tener una membrana celular intacta o rota. Los métodos para matar o inactivar las células del microorganismo de la presente invención se conocen en la técnica. IE-Nezami *et al.*, J. Food Prot. 61 (1998), 466-468 describe un método para inactivar la especie *Lactobacillus* por irradiación UV. Preferiblemente, las células del microorganismo de la presente invención se inactivan térmicamente o se liofilizan como se describe en los Ejemplos adjuntos. La liofilización de las células de la presente invención tiene la ventaja de que se pueden almacenar y manipular fácilmente mientras que retiene su capacidad de unirse específicamente a *S. mutans*. Más aún, se pueden hacer crecer las células liofilizadas de nuevo cuando se aplican bajo las condiciones conocidas en la técnica de apropiarse de los medios líquidos o sólidos apropiados. La liofilización se hace mediante métodos conocidos en la técnica. Preferiblemente, se lleva a cabo durante por lo menos 2 horas a temperatura ambiente, es decir, cualquier temperatura entre 16°C y 25°C. Más aún, las células del microorganismo liofilizado de la presente invención son estables durante por lo menos 4 semanas a una temperatura de 4°C de tal manera que todavía se unen específicamente a *S. mutans* como se muestra en el Ejemplo 7 a continuación. La inactivación térmica se puede lograr al incubar las células del microorganismo de la presente invención por lo menos 2 horas a una temperatura de 170°C. Aún, la inactivación térmica realiza preferiblemente al autoclavar dichas células a una temperatura de 121°C durante por lo menos 20 minutos en la presencia de vapor saturado a una presión atmosférica de 2 bar. En la alternativa, la inactivación térmica de las células del microorganismo de la presente invención se logra al congelar dichas células durante por lo menos 4 semanas, 3 semanas, 2 semanas, 1 semana, 12 horas, 6 horas, 2 horas o 1 hora a -20°C. Se prefiere que por lo menos el 70%, 75% o 80%, más preferiblemente 85%, 90% o 95% y, se prefiere particularmente por lo menos el 97%, 98%, 99% y se prefiere más particularmente, 99,1%, 99,2%, 99,3 %, el 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% o 99,9% y se prefiere más particularmente el 100% de las células del análogo del microorganismo de la presente invención estén muertas o inactivadas, sin embargo, ellas todavía tienen la capacidad de unirse específicamente a *S. mutans*. Ya sea que se destine el análogo o fragmento del microorganismo de la presente invención a morir o inactivarse se pueden probar por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante una prueba de viabilidad.

El término “análogo del microorganismo de la presente invención” también abarca lisatos o fracciones del microorganismo de la presente invención, preferiblemente de la especie de *Lactobacillus* descrita aquí. De acuerdo con la presente invención el término “lisato”, significa una solución o suspensión en un medio acuoso de las células que se rompen del microorganismo de la presente invención. Sin embargo, el término no se debe interpretar en ninguna forma limitante. El lisato celular comprende, por ejemplo, las macromoléculas, como el ADN, ARN, proteínas, péptidos, carbohidratos, lípidos y similares y/o micromoléculas, como aminoácidos, azúcares, ácidos lípidos y similares, o fracciones de estos. Adicionalmente, dicho lisato comprende celulares que pueden ser de estructura lisa o granular. Los métodos para preparar lisatos celulares a partir de los microorganismos se conocen en la técnica, por ejemplo, al emplear la prensa Francesa, molino de células utilizando glóbulos de vidrio o hierro o lisis celular enzimática y similares. En adición, las células de lisis se relacionan con varios métodos conocidos en la técnica para abrir/destruir las células. El método para lisar una célula no es importante y se puede emplear cualquier método que pueda realizar la lisis de las células del microorganismo de la presente invención. Un método apropiado se puede escoger por la persona experta en la técnica, por ejemplo, la apertura y/o la destrucción de las células se puede hacer enzimática, química o físicamente. Ejemplos no limitantes para las enzimas y los cócteles de enzima son proteasas, como la proteinasa K, lipasas o glucosidasas; ejemplos no limitantes para los productos químicos son ionóforos, detergentes, como el sulfato de dodecil sodio, ácidos o bases, y ejemplos no limitantes, de medios físicos son alta presión, como Frenchpressing, osmolaridad, temperatura, como calor o el frío. Adicionalmente, también se puede utilizar un método que emplea una combinación apropiada de una enzima diferente de la enzima proteolítica, un ácido, una base y similares. Por ejem-

plo, las células del microorganismo de la presente invención se lisan al congelar y descongelar, más preferiblemente congelar a temperaturas por debajo de -70°C y descongelar a temperaturas de más de 30°C , se prefiere particularmente congelar a temperaturas por debajo de -75°C y se prefiere descongelar a temperaturas de más de 35°C y se prefiere más temperaturas para congelar por debajo de -80°C y temperaturas para descongelar de más de 37°C . También se prefiere que dicha congelación/descongelación se repita por lo menos 1 vez, más preferiblemente por lo menos 2 veces, aún se prefiere más durante por lo menos 3 veces, se prefiere particularmente por lo menos 4 veces y se prefiere más durante por lo menos 5 veces.

De acuerdo con lo anterior, aquellos expertos en la técnica pueden preparar los lisatos deseados al hacer referencia a las explicaciones generales anteriores, y modificar o alterar apropiadamente estos métodos, si es necesario. Preferiblemente, el medio acuoso utilizado para los lisatos como se describe es agua, solución salina fisiológica o una solución de amortiguador. Una ventaja de un lisato celular bacteriano es que se puede producir y almacenar fácilmente producidos y almacenados de manera eficiente ya que se necesitan instalaciones técnicas.

De acuerdo con la invención, los lisatos son también preparaciones de fracciones de las moléculas de los lisatos anteriormente mencionados. Estas fracciones se pueden obtener mediante métodos conocidos por aquellos expertos, en la técnica, por ejemplo, cromatografía, que incluye, por ejemplo, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de fase inversa, y cromatografía con otro material cromatográfico métodos de columna o de tandas, otros métodos de fraccionamiento, por ejemplo, métodos de filtración, por ejemplo, la ultrafiltración, diálisis, diálisis y concentración con exclusión de tamaño en la centrifugación, centrifugación en gradientes de densidad o matrices de etapa, precipitación, por ejemplo, precipitaciones de afinidad, precipitaciones alcohólicas en salado o sin salado (precipitación de amoniosulfato), u otros métodos proe-teínquímicos, biológicos moleculares, bioquímicos, inmunológicos, o físicos para separar los componentes anteriores de los lisatos. En una realización preferida se prefieren aquellas fracciones que son más inmunogénicas que otras. Aquellos expertos en la técnica son capaces de elegir un método adecuado y determinar su potencial inmunogénico al hacer referencia a las anteriores explicaciones generales y explicaciones específicas en los ejemplos aquí, y modificar o alterar apropiadamente estos métodos, si es necesario.

“Un fragmento del microorganismo de la presente invención” abarca cualquier parte de las células del microorganismo de la presente invención. Preferiblemente, dicho fragmento es una fracción de membrana obtenida mediante una preparación de membrana. Las preparaciones de membrana de microorganismos pertenecientes al género de *Lactobacillus* se pueden obtener por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, al emplear el método descrito en Rollan *et al.*, Int. J. Food Microbiol. 70 (2001), 303-301, Matsuguchi *et al.*, Clin. Diagn. Lab. Immunol. 10 (2003), 259-266 o Stentz *et al.*, Appl. Environ. Microbiol. 66 (2000), 4272-4278 o Varmanen *et al.*, J. Bacteriology 182 (2000), 146-154. Alternativamente, también se prevé una preparación de células enteras. Preferiblemente, el derivado o fragmento descrito aquí del microorganismo de la presente invención retiene la capacidad de unirse específicamente a *Streptococcus mutans*, el cual se describe en detalle aquí.

Otro aspecto de la presente invención es una composición que comprende un microorganismo de acuerdo a la invención que es capaz de unirse específicamente a *Streptococcus mutans* o un mutante, derivado, análogo o fragmento de este microorganismo. Preferiblemente, este microorganismo es un microorganismo de la presente invención o un mutante o derivado del mismo o dicho análogo o fragmento de dicho microorganismo. En una realización preferida, dicha composición comprende un microorganismo como se describió anteriormente en una cantidad entre 10^2 a 10^{12} células, de preferiblemente 10^3 a 10^8 células por mg en una forma sólida de la composición. Preferiblemente, este microorganismo es un microorganismo de la presente invención. En caso de una formulación líquida de composiciones, la cantidad de los microorganismos está entre 10^2 a 10^{13} células por ml. Sin embargo, para composiciones específicas la cantidad del microorganismo puede ser diferente a lo descrito aquí. Una composición preferida de la presente invención no contiene lactosa en un rango entre 1% (p/p) y el 6% (p/p). También se prefiere que la composición no contenga más del 1% (p/p) de lactosa, por ejemplo, que contenga menos de 1%, preferiblemente menos de 0,9% (p/p), 0,8% (p/p) de lactosa, etc., o que la composición contenga más de 6%, 7%, 8%, etc. (p/p) de lactosa. Alternativamente, también se prefiere que la composición no contenga lactosa.

Todavía, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para la producción de una composición anticariogénica que comprende las etapas de formular un microorganismo de acuerdo a la invención que es capaz de unirse específicamente a *Streptococcus mutans* o un mutante, derivado, análogo o fragmento de este microorganismo con un portador o excipiente cosmética, oral o farmacéuticamente aceptables. El microorganismo es un microorganismo de la presente invención y el mutante, derivado, análogo o fragmento es uno de aquellos de la presente invención. Una composición anticariogénica preferida de la presente invención no contiene lactosa en un rango entre 1% (p/p) y 6% (p/p). También se prefiere que la composición no contenga más del 1% (p/p) de lactosa, por ejemplo, que contenga menos de 1%, preferiblemente menos de 0,9% (p/p), 0,8% (p/p) de lactosa, etc., o que la composición anticariogénica contenga más del 6%, 7%, 8%, etc. (p/p) de lactosa. Alternativamente, también se prefiere que la composición anticariogénica no contenga lactosa.

El término “composición”, como se utiliza de acuerdo con la presente invención, se relaciona con (a) composiciones que comprenden por lo menos un microorganismo o mutante o derivado como se describió anteriormente, preferiblemente de la presente invención o análogo o fragmento de dicho microorganismo. Se prevé que las composiciones de la presente invención que se describen aquí comprenden los ingredientes anteriormente mencionados en cualquier combinación. Puede comprender, opcionalmente, por lo menos un ingrediente adicional adecuado para pre-

venir y/o tratar las caries. De acuerdo con lo anterior, opcionalmente puede comprender cualquier combinación de los ingredientes adicionales descritos aquí adelante. El término “ingredientes adecuados para prevenir y/o tratar la caries” abarca los compuestos o composiciones y/o combinaciones de los mismos que ya sea inhiben la unión del *Streptococcus mutans* a la superficie de los dientes, a cutículas y/o que inactivan al *Streptococcus mutans*. Más preferiblemente, dicho término abarca compuestos o composiciones y/o combinaciones de los mismos que pueden inhibir la adhesión del *Streptococcus mutans* a la superficie de los dientes, inhiben la actividad de glicosiltransferasas de *Streptococcus mutans*, inhiben o inactivan el *Streptococcus mutans*, inhiben la unión dependiente de aglutinina del *Streptococcus mutans* y/o inhiben la unión dependiente de sacarosa del *Streptococcus mutans* como se describirá adelante.

En particular, se prevé que la composición opcionalmente comprende adicionalmente compuestos que inhiben la adhesión de *Streptococcus mutans* a la superficie del diente. De acuerdo con lo anterior, se prevé que dicho compuesto es un inhibidor del péptido de señal de competencia (CSP) del *Streptococcus mutans*. Dicho inhibidor se describe en la CA 2,302,861 como un derivado o fragmento de dicho CSP que inhibe competitivamente la unión de dicho CSP a su receptor natural, una histidina quinasa preceptor, o que es un anticuerpo contra dicho CSP. Dicho inhibidor previene el desarrollo de un ambiente de biopelícula de placa dental en la superficie de los dientes y, así, previene la unión del *Streptococcus mutans*. Alternativamente, la composición de la presente invención puede opcionalmente incluir adicionalmente fragmentos de polipéptido de antígenos I/II del *Streptococcus mutans* que son útiles en el tratamiento y/o prevención de la caries dental. Tales fragmentos del polipéptido se describen en la EE.UU. 6,500,433. A saber, dichos fragmentos del polipéptido pueden tener la capacidad de adherirse a la superficie del diente de mamíferos al unirse a la aglutinina de manera competitiva con antígeno I/II de *Streptococcus mutans* de ocurrencia natural, previniendo así la adhesión de *S. mutans* al diente. Algunos de los péptidos de la EE.UU. 6,500,433 han mostrado que inhiben la adhesión de *S. mutans* a un modelo de la superficie de los dientes (saliva humana completa adsorbida en los pozos de las placas de microtítulo de poliestireno o granos de hidroxiapatita). De acuerdo con lo anterior, la EE.UU. 6,500,433 describe estos péptidos que comprenden uno o más sitios de adhesión y que se adherirán a los dientes de mamíferos en una forma competitiva con SA I/II de ocurrencia natural. Otro ingrediente opcional de la composición de la presente invención es la proteína de adhesión asociada con fimbrias de *Streptococcus mutans*, SmaA, o un fragmento de la misma como se describe en la WO 00/66616. La proteína SmaA que está involucrada en la presente invención es una adhesión de las fimbrias de *S. mutans* que media la adhesión de las bacterias a la cutícula salival, que se considera se une a través de proteína salival 52 kd, amilasa. La proteína SmaA madura tiene un peso molecular de aproximadamente 65 kilodaltons (kd), medida en un gel de poliacrilamida reducida, exhibe la capacidad de unir la amilasa, y es la principal proteína de fimbrias de *S. mutans* inmunodominante. De acuerdo con lo anterior, se considera que el SmaA compete con el *Streptococcus mutans* por los sitios de adhesión en la superficie de los dientes.

Como se describió anteriormente, se prevé que los compuestos que inhiben la actividad glicosiltransferasa del *Streptococcus mutans* están comprendidos opcionalmente en la composición de la presente invención. Por ejemplo, la EE.UU. 2004/0057908 describe una mezcla de terpenoides y flavonoides que inhiben la actividad de dichas glicosiltransferasas. Duarte *et al.* Biol. Pharm. Bull. 26 (2003), 527-531 describe un nuevo tipo de propóleos y sus fracciones químicas en glicosiltransferasas y en el crecimiento y la adhesión de *Streptococcus mutans*. De acuerdo con lo anterior, se contempla dicho nuevo tipo de propóleos y sus fracciones químicas por ser un ingrediente adicional opcional de la composición de la presente invención. Koo *et al.*, J. Antimicrob. Chemother. 52 (2003), 782-789 describe que la apigenina y tt-farnesol inhiben la acumulación de biopelícula de *Streptococcus mutans* y la producción de polisacáridos. Por lo tanto, se contempla que la apigeneina y tt farnesol están comprendidos opcionalmente en la composición de la presente invención. Ya que los ésteres de ácidos grasos de carbohidratos se describen en Devulapalle *et al.* Carbohidr. Res. 339 (2004), 1029-1034 para efectuar la actividad glicosiltransferasa dichos ésteres de ácidos grasos de carbohidratos se contemplan que opcionalmente están comprendidos en la composición de la presente invención.

La inhibición directa del *Streptococcus mutans*, por ejemplo, se describe en la WO 2004/000222. A saber, se utilizan los bacteriófagos modificados genéticamente específicos para *Streptococcus mutans* para el tratamiento de la caries bacteriana originada por *Streptococcus mutans*. La WO 2004/017988 describe una composición de la proteasa activa biológicamente y por lo menos una glucosidasa activa biológicamente que se utiliza para tratar la caries bacteriana. Imazato *et al.*, Biomaterials 24 (2003), 3605-3609 describe que el bromuro de metacriloloxidodecilmiridinio (MDPB) es útil para inhibir el crecimiento de *Streptococcus mutans*. De acuerdo con lo anterior, se prevé que los compuestos mencionados anteriormente, pueden opcionalmente estar comprendidos adicionalmente en la composición de la presente invención.

La lactoferrina de leche bovina descrita por Mitoma *et al.*, J. Biol. Chem. 276 (2001), 18060-18065 o extractos de *Helichrysum italicum* descrito por Nostro *et al.*, Lett. Appl. Microbiol. 38 (2004), 423-427 que inhiben la unión dependiente de aglutinina o dependiente de sacarosa del *Streptococcus mutans* se contemplan por estar comprendidas adicional y opcionalmente en la composición de la presente invención.

Más aún, la composición de la presente invención, puede comprender adicional y opcionalmente una mutanasa (1,3-glucanasa), que, por ejemplo, se describe en la DE 2152620 o Fuglsang (2000), loc. cit. o un antibiótico contra el *Streptococcus mutans*, por ejemplo, aquellos descritos en la EE.UU. 6,342,385; EE.UU. 5,932,469; EE.UU. 5,872,001 o EE.UU. 5,833,958. En adición, se nota que la composición de la presente invención, pueda comprender opcionalmente uno o más de los ingredientes opcionales mencionados anteriormente que son adecuados para la prevención y/o el tratamiento de la caries. Así, dicha composición puede contener por lo menos dos, tres, cuatro, cinco, etc., es decir, “n” ingredientes opcionales, donde “n” es un entero mayor de 2, que no se limita. Dichos ingredientes opcionales se pueden combinar en cualquier combinación posible.

ES 2 344 654 T3

La composición puede estar en forma sólida, líquida o gaseosa y puede estar, entre otras cosas, en la forma de (un) polvo(s), (un) comprimido(s), (una) preparación de película(s), (una) solución(es) (un) aerosol(s), gránulos, pastillas, suspensiones, emulsiones, cápsulas, jarabes, líquidos, elixires, extractos, extractos de tintura o fluido o en una forma que es particularmente adecuada para la administración oral.

5 Las prelacones líquidas adecuadas para administración oral, por ejemplo, jarabes se pueden preparar, utilizando agua, sacáridos convencionales, tales como sacarosa, sorbitol y fructosa, glicoles, tales como polietilenglicol y propilenglicol, aceites tales como aceite de semilla de sésamo, aceite de oliva y aceite de soya, antisépticos tales como p-hidroxibenzoato éster, conservantes tales como derivados de hidroxibenzoato, por ejemplo, p-hidroxibenzoato metil y benzoato de sodio y otros materiales tales como saborizantes, por ejemplo sabor a fresa o menta.

Adicionalmente, se pueden producir las preparaciones adecuadas para la administración oral, por ejemplo comprimidos, polvos y gránulos utilizando sacáridos convencionales, tales como sacarosa, glucosa, manitol y sorbitol, almidones tales como almidón de papa, trigo y maíz, materiales inorgánicos tales como carbonato de calcio, sulfato de calcio, hidrógeno carbonato de sodio, y cloruro de sodio, polvos de plantas tales como celulosa cristalina, polvo de regaliz y polvo de genciana, excipientes tales como pinedex, desintegradores, tales como almidón, agar, gelatina en polvo, celulosa cristalina, carmelosa de sodio, carmelosa de calcio, carbonato de calcio, hidrógeno carbonato de sodio y alginato de sodio, lubricantes tales como estearato de magnesio, talco, aceites vegetales hidrogenados, macrogol, y el aceite de silicona, aglutinantes tales como alcohol polivinílico, hidroxipropil celulosa, metil celulosa, etilcelulosa, carmelosa, gelatina, y fluido de cola de almidón y tensoactivos tales como ésteres de ácidos grasos y plastificantes tales como glicerina. Se puede preparar una preparación de película(s) mediante métodos conocidos en la técnica. Un ejemplo para la preparación de una película se da en el Ejemplo 19 aquí.

En el caso de la administración oral ordinaria, la dosis del microorganismo o análogo o fragmento de la presente invención puede estar (en peso seco) como se describió anteriormente con respecto al número de células o con respecto a la masa, por ejemplo, 1 μ g a 50 g, 1 μ g a 10 g, 1 μ g a 5 mg, 1 μ g a 1 mg o cualquier otro peso por sujeto por día o en varias porciones diarias. En el caso de la dosificación a los animales no humanos, adicionalmente, la dosis varía dependiendo de la edad y la especie de un animal y la naturaleza o severidad de los síntomas de la misma. Sin ninguna limitación específica, la dosis para los animales es de 0.1 mg a 10 g por 1 kg de peso corporal, preferiblemente 1 mg a 1 g por 1 kg de peso corporal una vez al día o en varias porciones diarias. Sin embargo, estas dosis y el número de dosificaciones varían dependiendo de las condiciones individuales.

Preferiblemente, la composición de la presente invención es una composición cosmética que comprende adicionalmente un portador cosméticamente aceptable o excipiente. Más preferiblemente, dicha composición cosmética es un dentífrico, goma de mascar, pastillas para chupar, colutorio, enjuague bucal o seda dental, que tiene una actividad anticariogénica. Una composición cosmética preferida de la presente invención no contiene lactosa en un rango entre 1% (p/p) y 6% (p/p). También se prefiere que la composición cosmética no contenga más del 1% (p/p) de lactosa, por ejemplo, que contenga menos de 1%, preferiblemente menos de 0,9% (p/p), el 0,8% (p/p) de lactosa, etc. o que la composición cosmética contenga más del 6%, 7%, 8%, etc. (p/p) de lactosa. Alternativamente, también se prefiere que la composición cosméticos no contenga lactosa.

La composición cosmética de la presente invención comprende el microorganismo, mutante, derivado, análogo o fragmento del mismo como se describió anteriormente en relación con la composición de la invención y adicionalmente un portador cosmética u oralmente aceptable. Preferiblemente, como se menciona en relación con la composición de la presente invención el microorganismo, mutante, derivado, análogo o fragmento del mismo es un microorganismo, mutante, derivado, análogo o un fragmento de la presente invención. Preferiblemente, la composición cosmética de la presente invención es para uso en aplicaciones orales. De acuerdo con lo anterior, puede estar en forma de una pasta dental, dentífrico, polvo para dientes, gel oral tópico, enjuague bucal, producto de prótesis, aerosol para la boca, pastillas para chupar, comprimidos orales o goma de mascar.

El término “portador cosmética u oralmente aceptable” como se utiliza aquí significa un vehículo adecuado, que se puede utilizar para aplicar las composiciones presentes en la cavidad oral de una manera segura y efectiva. Tal vehículo puede incluir materiales tales como fuentes de iones de fluoruro, otros agentes anticálculo, amortiguadores, otros materiales abrasivos, fuentes de peróxido, sales de bicarbonato de metales alcalinos, materiales espesantes, humectantes, agua, tensoactivos, dióxido de titanio, sistema saborizante, agentes edulcorantes, xilitol, agentes de coloración, y mezclas de los mismos. El término “cantidad segura y efectiva” como se utiliza aquí, significa una cantidad suficiente para limpiar los dientes y reducir la mancha/placa/gingivitis/cálculo sin dañar los tejidos y las estructuras de la cavidad oral.

El pH de las presentes composiciones descritas aquí varía preferiblemente de aproximadamente 3.0 a aproximadamente 9.0, con un pH preferido de aproximadamente 5.5 a aproximadamente 9.0 y un pH más preferido de 7.0 a aproximadamente 8.5 o 9.0.

La composición cosmética es un producto, que en el curso normal de uso, no se ingiere intencionalmente para propósitos de administración sistémica de agentes terapéuticos particulares, sino que a diferencia se retiene en la cavidad oral durante un tiempo suficiente para ponerla en contacto con sustancialmente todas las superficies dentales y/o los tejidos orales para los propósitos de la actividad oral. La composición oral puede ser de una sola fase o puede ser una combinación de dos o más composiciones orales.

ES 2 344 654 T3

El término “dentífrico”, como se utiliza aquí, significa pasta, gel o formulaciones líquidas a menos que se especifique lo contrario. La composición de dentífrico puede estar en cualquier forma deseada tales como rayas profundas, superficie rayada y múltiples capas, que tiene el gel que rodea la pasta, o cualquier combinación de los mismos. La composición de dentífrico puede estar contenida en un compartimiento separado físicamente de un dispensador y dispensar lado a lado. Las composiciones dentífricas, por ejemplo, se describe en la EP-B1 0 617 608.

Las composiciones dentífricas preferidas se describen en los Ejemplos 13 a 16. En adición a los componentes descritos anteriormente, las realizaciones de esta invención pueden contener una variedad de ingredientes dentífricos opcionales algunos de los cuales se describen adelante. Los ingredientes opcionales incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a, adhesivos, agentes de espuma, agentes saborizantes, agentes edulcorantes, agentes antiplaca adicionales, abrasivos adicional, y agentes colorantes. Estos y otros componentes opcionales se describen adicionalmente, por ejemplo, en la EE.UU. 5,004,597; EE.UU. 4,885,155; EE.UU. 3,959,458; y EE.UU. 3,937,807.

Por ejemplo, la pasta dental puede incluir tensoactivos, agentes quelantes, fuentes de fluoruro, sustancias activas para blanquear los dientes y que modifican los, agentes espesantes, humectantes, agentes saborizantes y edulcorantes, sal de bicarbonato de metal alcalino, portadores misceláneos y/u otros agentes activos.

Uno de los agentes opcionales preferidos de la presente invención es un tensoactivo, preferiblemente uno seleccionado del grupo que consiste de tensoactivos de sarcosinato, tensoactivos de isetionato y tensoactivos de taurato. Se prefieren para uso aquí las sales de metales alcalinos o de amonio de estos tensoactivos. Se prefieren más aquí las sales de sodio y de potasio de los siguientes: lauroil sarcosinato, miristoil sarcosinato, palmitoil sarcosinato estearoil sarcosinato, y oleoil sarcosinato.

Otro agente opcional preferido es un agente quelante como el ácido tartárico y sales farmacéuticamente aceptable del mismo, ácido cítrico y citratos de metales alcalinos y mezclas de los mismos. Los agentes quelantes son capaces de hacer complejo con el calcio que se encuentra en las paredes celulares de las bacterias. Los agentes quelantes también pueden romper la placa al remover el calcio de los puentes de calcio, que ayudan a mantener esta biomasa intacta.

Es común tener un compuesto de fluoruro soluble en agua adicional presente en los dentífricos y otras composiciones orales en una cantidad suficiente para dar una concentración de ión de flúor en la composición a 25°C, y/o cuando se utiliza de aproximadamente 0.0025% a aproximadamente 5.0% en peso, preferiblemente de aproximadamente 0.005% a aproximadamente el 2.0% en peso, para proporcionar eficacia anticariogénica adicional. Una amplia variedad de materiales que producen iones de fluoruro se pueden emplear como fuentes de fluoruro soluble en las presentes composiciones. Ejemplos de materiales que producen ión de fluoruro se encuentran en la EE.UU. 3,535,421 y la EE.UU. 3,678,154. Las fuentes de iones de fluoruro representativas incluyen fluoruro de estaño, fluoruro de sodio, fluoruro de potasio, monofluorofosfato de sodio y muchos otros. Se prefieren particularmente fluoruro de estaño y fluoruro de sodio, así como mezclas de los mismos.

Los activos de blanqueamiento dental que se pueden utilizar en las composiciones de cuidado oral de la presente invención incluyen agentes de blanqueo u oxidantes tales como peróxidos, perboratos, percarbonatos, peroxiácidos, persulfatos, cloritos de metal y combinaciones de los mismos. Los compuestos de peróxido adecuados incluyen de peróxido de hidrógeno, peróxido de urea, peróxido de calcio, y mezclas de los mismos. Un percarbonato preferido es percarbonato de sodio. Otros agentes de blanqueamiento adecuados incluyen mono-y tetrahidratos de persulfatos y perboratos de potasio, amonio, sodio y litio y peroxihidrato de pirofosfato de sodio. Los cloritos de metal adecuados incluyen clorito de calcio, clorito de bario, clorito de magnesio clorito de litio, clorito de sodio, clorito de potasio. El clorito preferido es clorito de sodio. Los activos de blanqueamiento adicionales pueden ser hipoclorito y dióxido de cloro.

En adición a los agentes de blanqueamiento como los agentes para blanquear dientes, sustancias que modifican el color de los dientes se pueden considerar entre los activos de higiene bucal útiles en la presente invención. Estas sustancias son adecuadas para modificar el color de los dientes para satisfacer al consumidor. Estas sustancias comprenden partículas que cuando se aplican sobre la superficie del diente modifican tal superficie en términos de absorción y, o reflexión de la luz. Tales partículas proporcionan una apariencia benéfica cuando se aplica una película que contiene partículas, sobre las superficies de un diente o los dientes.

En la preparación de la pasta dental o eles, es necesario agregar algunos materiales espesantes para proporcionar una consistencia deseable de la composición, para proporcionar las características de liberación activa deseables en el uso, para proporcionar estabilidad de vida de almacenamiento, y para proporcionar la estabilidad a la composición, etc. Los espesantes preferidos son polímeros de carboxivinilo, carragenina, hidroxietil celulosa, laponita y sales solubles en agua de éteres de celulosa tales como carboximetilcelulosa de sodio y carboximetilcelulosa hidroxietil de sodio. También se puede utilizar las gomas naturales tales como goma karaya, goma xantano, goma arábica, y goma tragacanto. Se puede utilizar silicato de magnesio aluminio coloidal o sílice dividida finamente como parte del agente espesante para mejorar adicionalmente la textura.

Otro componente opcional de los portadores tópicos, orales de las composiciones del objeto de la invención es un humectante. El humectante sirve para que las composiciones de pasta dental no se endurezcan luego de la exposición al aire, para dar composiciones húmedas al piso de la boca, y, para humectantes particulares, para impartir dulzura o sabor deseable a las composiciones de pasta dental. El humectante, sobre una base humectante pura, por lo general

ES 2 344 654 T3

comprende de aproximadamente 0% a 70%, preferiblemente de aproximadamente 5% de a aproximadamente 25% en peso de las composiciones. Los humectantes adecuados para uso en composiciones del objeto de la invención incluyen alcoholes polihídricos comestibles tales como glicerina, sorbitol, xilitol, butilenglicol, polietilenglicol, y propilenglicol, especialmente sorbitol y glicerina.

5 También se pueden agregar los agentes saborizantes y edulcorantes a las composiciones. Los agentes saborizantes adecuados incluyen aceite de gaulteria, aceite de menta, aceite de menta, aceite de brote de clavo de olor, mentol, anetol, salicilato de metilo, eucaliptol, casia, acetato de 1-mentilo, salvia, eugenol, aceite de perejil, oxanona, alfa-irisona, mejorana, limón, naranja, guaetol propenilo, canela, vainillina, timol, linalol, acetal glicerol cinnamaldeido conocido como CGA, y mezclas de los mismos. Los agentes saborizantes se utilizan generalmente en las composiciones en niveles de aproximadamente 0.001% a aproximadamente 5% en peso de la composición.

10 Los agentes edulcorantes que se pueden utilizar son sacarosa, glucosa, sacarina, dextrosa, levulosa, lactosa, como describió aquí anteriormente, manitol, sorbitol, fructosa, maltosa, xilitol, sales de sacarina, taumatina, aspartame, D-triptofano, dihidrocalconas, acesulfame y sales de ciclamato, especialmente ciclamato de sodio y sacarina de sodio, y mezclas de los mismos. Una composición contiene preferiblemente aproximadamente 0.1% a aproximadamente 10% de estos agentes, preferiblemente de aproximadamente 0.1% a aproximadamente 1% en peso de la composición.

20 La presente invención también puede incluir una sal de bicarbonato de metal alcalino. Las sales de bicarbonato de metal alcalino son solubles en agua y se estabilizan a menos, que tiendan a liberar dióxido de carbono en un sistema acuoso. El bicarbonato de sodio, también conocido como bicarbonato sódico, es la sal de bicarbonato de metal alcalino preferida. La presente composición puede contener entre 0.5% a aproximadamente 30%, preferiblemente, de aproximadamente 0.5% a aproximadamente 15%, y más preferiblemente de aproximadamente 0.5% a aproximadamente 5% de una sal de bicarbonato de metal alcalino.

25 El agua empleada en la preparación de composiciones orales comercialmente disponibles preferiblemente debe ser de bajo contenido de iones y libre de impurezas orgánicas. El agua por lo general comprende de aproximadamente 10% a aproximadamente 50%, y preferiblemente de aproximadamente 20% a aproximadamente 40% en peso de las composiciones de pasta dental acuosas. Estas cantidades de agua incluyen agua libre que se agrega más que la que se introduce con otros materiales tales como con sorbitol. También se puede agregar dióxido de titanio a la presente composición: el dióxido de titanio es un polvo blanco, que agrega opacidad a las composiciones. El dióxido de titanio en general, comprende de aproximadamente 0,25% a aproximadamente 5% en peso de las composiciones dentífricas.

30 El pH de las presentes composiciones se ajusta preferiblemente a través del uso de agentes de amortiguación. Los agentes de amortiguación, como se utiliza aquí, se refieren a los agentes que se pueden utilizar para ajustar el pH de las composiciones a un rango de aproximadamente 4.5 a aproximadamente 9.5. Los agentes de amortiguación incluyen fosfato de monosodio, fosfato de trisodio, hidróxido de sodio, carbonato de sodio, pirofosfato ácido de sodio, ácido cítrico y citrato de sodio. Los agentes de amortiguación se pueden administrar a un nivel de aproximadamente 0.5% a aproximadamente 10% en peso de las presentes composiciones. El pH de las composiciones dentífricas se mide a partir de una suspensión acuosa de dentífrico 3:1, por ejemplo, 3 partes de agua a 1 parte de pasta dental.

35 Otros agentes opcionales que se pueden utilizar en las presentes composiciones incluyen dimeticona copoliololes seleccionados de de alquil- y alcoxi-dimeticona copoliololes, como alquil dimeticona copoliololes C12 a C20 y mezclas de los mismos. Se prefiere mayormente cetil dimeticona copoliol comercializado bajo el marca comercial Abil EM90. El copoliol dimeticona generalmente está presente en un nivel de aproximadamente 0.01% a aproximadamente 25%, preferiblemente de aproximadamente 0.1% a aproximadamente 5%, más preferiblemente de aproximadamente 0.5% a aproximadamente 1,5% en peso. Los dimeticona copoliololes ayudan en proporcionar beneficios que se sienten positivos en los dientes. Otros portadores útiles incluyen formulaciones de dentífrico bifásicas como aquellas descritas en la EE.UU. 5,213,790; EE.UU. 5,145,666; EE.UU. 5,281,410; EE.UU. 4,849,213 and EE.UU. 4,528,180.

40 Las composiciones cosméticas presentes también pueden incluir otros agentes activos tales como los agentes antimicrobianos. Se incluyen entre tales agentes, agentes antimicrobianos no catiónicos insolubles en agua tales como éteres de difenilo halogenados, compuestos fenólicos que incluyen fenoles y sus homólogos, mono y poli-alquilo y halofenoles aromáticos, resorcinol y sus derivados, compuestos bisfenólicos y salicilanilidas halogenadas, esterés benzoicos, y carbanilidas halogenadas. Los antimicrobianos solubles en agua incluyen sales de amonio cuaternario y sales de bis-biguanida, entre otras. El monofosfato de triclosan es un agente antimicrobiano adicional soluble en agua. Los agentes de amonio cuaternario incluyen aquellos en los que uno o dos de los sustitutos en el nitrógeno cuaternario tiene una longitud de cadena de carbono (típicamente grupo alquilo) de aproximadamente 8 a aproximadamente 20, típicamente de aproximadamente 10 a aproximadamente 18 átomos de carbono, mientras que los sustitutos estantes (típicamente grupo alquilo o bencilo) tienen un menor número de átomos de carbono, tales como de de aproximadamente 1 a aproximadamente 7 átomos de carbono, típicamente grupos metilo o etilo. El bromuro de dodecil trimetil amonio, cloruro tetradecilpiridinio, bromuro de domifen, cloruro de N-tetradecil-4-etil piridinio, bromuro de dimetil dodecil (2-fenoxietil) amonio, cloruro de bencil dimetilstearyl amonio, cloruro de cetil piridinio, 5-amino-1,3-bis (2-etil-hexil)-5-metil hexa hidropirimidina, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio de metilo y cloruro de metil bencetonio son ejemplos agentes antibacterianos de amonio cuaternario típicos. Otros compuestos son bis [4-(R-amino)-1-piridinio] alcanos como se describe en la EE.UU. 4,206,215. También se pueden incluir otros antimicrobianos tales como bisglicinato de cobre, glisinato de cobre, citrato de zinc, y lactato de zinc. Las enzimas son otro tipo de activos que se pueden utilizar en las presentes composiciones. Las enzimas útiles incluyen aquellas que pertenecen

ES 2 344 654 T3

a la categoría de las proteasas, enzimas líticas, inhibidores de matriz de placa y oxidasas: Las proteasas incluyen papaína, pepsina, tripsina, ficina, bromelina, las enzimas líticas de la pared celular incluyen lisozima; los inhibidores de matriz de placa incluyen dextranasas, mutanasas; y las oxidasas incluyen glucosa oxidasa, lactato oxidasa, galactosa oxidasa, ácido úrico oxidasa, las peroxidasas incluyen peroxidasa de rábano, mieloperoxidasa, lactoperoxidasa, cloroperoxidasa. Las oxidasas también tienen actividad de blanqueamiento y limpieza, en adición de las propiedades anti-microbianas. Tales agentes se describen en la EE.UU. 2,946,725 y en la EE.UU. 4,051,234. Otros agentes anti-microbianos incluyen clorhexidina, triclosán, monofosfato de triclosán, y aceites saborizantes tales como el timol. El triclosán y otros agentes de este tipo se describen en la EE.UU. 5,015,466 y la EE.UU. 4,894,220. Estos agentes, que proporcionan beneficios anti-placa, pueden estar presentes en niveles de aproximadamente 0.01% a aproximadamente 5.0%, en peso de la composición de dentífrico.

El término “goma de mascar”, como define aquí significa una composición de confitería que es adecuada para la masticación y que comprende de 2% o más, en peso de la composición, de elastómero. Las pastillas para chupar adecuadas y los componentes de goma de mascar, por ejemplo, se describen en la EE.UU. 4,083,955; EE.UU. 6,770,264 o EE.UU. 6,270,781. Se prefieren las pastillas para chupar descritas en los Ejemplos 11 y 12. Una composición de goma de mascar preferida se describe en el Ejemplo 17.

Las composiciones de la presente invención preferiblemente comprenden un elastómero preferiblemente, o mezcla de varios elastómeros diferentes. Los materiales elastoméricos se conocen generalmente en la técnica, pero los ejemplos ilustrativos incluyen caucho estireno-butadieno (SBR); gomas sintéticas; polisobutileno y copolímeros de isobutileno-isopreno, gomas naturales; chicle, caucho natural, jelutong; balata, gutapercha, leche del tallo; sorva, y mezclas de los mismos. Las composiciones de la presente invención comprenden preferiblemente de aproximadamente 2% a aproximadamente 30%, más preferiblemente de aproximadamente un 5% a aproximadamente 25%, en peso, del elastómero. Estos niveles se determinan por la textura final deseada de la goma de mascar ya que cuando el nivel total de elastómero está por debajo del 2% la composición base carece de elasticidad, textura de goma mascar, y cohesión, mientras que a niveles por encima de aproximadamente 30% la formulación es dura, como caucho, mantiene una mordida estrecha. Los disolventes de elastómero preferiblemente están presentes en las composiciones de la presente invención, ya que ayudan al ablandamiento del componente de elastómero. Los ejemplos preferidos de disolventes de elastómero para uso aquí incluyen el éster de pentaeritritol de resina de madera parcialmente hidrogenada, éster de pentaeritritol de resina de madera, éster de glicerol de resina parcialmente dimerizada, éster de glicerol de resina polimerizada, éster de glicerol de aceite de sebo, o resina de madera o goma, éster de glicerol de resina parcialmente hidrogenada, metil éster de resina parcialmente hidrogenados, y mezclas de los mismos. Las composiciones de la presente invención comprenden preferiblemente de aproximadamente 2% a aproximadamente 50%, más preferiblemente de aproximadamente 10% a aproximadamente 35%, en peso, de los disolventes del elastómero.

Se pueden preparar las pastillas para chupar para uso de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, mediante técnicas reconocidas para la formación de tabletas comprimidas donde el disacárido se dispersa en un soporte sólido compresible, opcionalmente se combina con cualesquier auxiliares de compresión apropiados tales como un lubricante (por ejemplo, estearato de magnesio) y se comprime en tabletas. El componente de portador sólido para tales formulaciones de comprimidos puede ser un sólido soluble en saliva, tales como almidón soluble en agua fría o un monosacárido, de tal manera que la pastilla para chupar se disuelve fácilmente en la boca para liberar el contenido de ácido disacárido en la solución de saliva para poner en contacto con y la absorción por la mucosa oral/faríngea, cuando la pastilla para chupar se mantiene en la boca. El pH de las formulaciones descritas anteriormente puede variar de 4 a aproximadamente 8.5. También se pueden preparar las pastillas para chupar para uso de acuerdo con la presente invención utilizando otras técnicas de formulación de la dosificación unitaria reconocidas en el arte.

Un colutorio o un enjuague bucal de la presente invención, preferiblemente podría ser como sigue:

50	A	Menta rizada	1,2 partes
		tintura de Árnica	3.0 partes
		tintura Myrrhae	3.0 partes
55		Tween	5.0 partes
	B	Spiritus 90%	50,0 partes
	C	benzoato de sodio	0,2 partes
60		Agente edulcorante (por ejemplo, aspartame)	0.02 partes
		Agua destilata ad 100,	

A se mezcla bien, B se agrega bajo agitación y C se agrega posteriormente. El líquido claro resultante se filtra en 48 horas después de preparación. Otro colutorio preferido se describe en el Ejemplo 18.

ES 2 344 654 T3

Independientemente de la forma de dosificación, líquida o sólida, en una realización preferida de la presente invención la forma de dosificación se mantiene en la boca del paciente por un período para promover el contacto del microorganismo o análogo o fragmento de un microorganismo de la presente invención con la cavidad oral del paciente.

5

Otra composición preferida de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende el microorganismo o un derivado o un mutante o análogo o fragmento del mismo como se describió anteriormente en relación con la composición farmacéutica que comprende adicionalmente un portador farmacéutica aceptable o excipiente.

10 El microorganismo, mutante, análogos, derivado o fragmento del mismo es un microorganismo, mutante, derivado o fragmento de la presente invención.

15 En adición, la presente invención se relaciona con la utilización de un microorganismo o un derivado o un mutante o análogo o un fragmento del mismo como se describió anteriormente en relación con la composición de la presente invención para la preparación de una composición, preferiblemente un compuesto farmacéutico o cosmético para la profilaxis contra la caries. El microorganismo, mutante, derivado, análogo o fragmento del mismo es un microorganismo, mutante, derivado o fragmento de la presente invención.

20 Las composiciones farmacéuticas comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de un microorganismo o derivado o mutante de la presente invención o análogo o un fragmento de dicho microorganismo de la presente invención descrito en relación con la composición de la presente invención y se puede formular de varias formas, por ejemplo, en forma sólida, líquida, en polvo, acuosa, liofilizada.

25 La composición farmacéutica se puede administrar con un portador farmacéuticamente aceptable a un paciente, como se describe aquí. En una realización específica, el término “farmacéuticamente aceptable”: significa aprobado por un organismo regulador u otras farmacopeas reconocidas generalmente para en animales, y más particularmente en humanos. Una composición farmacéutica preferida de la presente invención no contiene lactosa en un rango entre 1% (p/p) y 6% (p/p). También se prefiere que la composición farmacéutica no contenga más del 1% (p/p) de lactosa, por ejemplo, que contenga menos de 1%, preferiblemente menos de 0,9% (p/p), 0,8% (p/p) de lactosa, etc., o que la 30 composición farmacéutica contenga más de 6%, 7%, 8%, etc. (p/p) de lactosa. Alternativamente, también se prefiere que la composición farmacéutica no contenga lactosa.

35 El término “portador” se relaciona con un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el producto terapéutico. Este portador es farmacéuticamente aceptable, es decir, no es tóxico a un receptor en la dosificación y concentración empleada. Se prefieren soluciones isotónicas, hipotónicas o hipertónicas débilmente y que tengan una resistencia iónica relativamente baja, tales como las proporcionadas por una solución de sacarosa. Tales portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, como agua y aceites, que incluyen aceites de petróleo, de animales, de vegetales o de origen sintético tales como el aceite de maní, aceite de soya, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. También se pueden emplear soluciones salinas y dextrosa acuosa y soluciones de glicerol como portadores líquidos, 40 particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, iones de sodio, leche descremada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. El excipiente puede contener lactosa como se describió aquí anteriormente, más preferiblemente es libre de lactosa. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes de amortiguación de pH. Estas composiciones pueden adoptar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. La formulación oral puede incluir portadores 45 estándar tales como grados farmacéuticos de manitol, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados se describen en “Remington’s Pharmaceutical Sciences” por EW Martin. También se pueden emplear leche desnatada, leche desnatada en polvo, productos que no contienen leche o lactosa. La leche desnatada en polvo se suspende convencionalmente en solución salina amortiguada con fosfato (PBS), se autoclava o se filtra para erradicar proteínas y contaminantes vivos, luego se seca por congelamiento o se seca por calor, se seca a vacío o se liofiliza. Algunos otros ejemplos de sustancias que pueden servir como portadores farmacéuticos son azúcares tales como glucosa y sacarosa; almidones tales como almidón de maíz y fécula de papa; celulosa y sus derivados tales como carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa y acetatos de celulosa; 50 polvo tragancanto, malta, gelatina; talco; ácidos esteáricos, estearato de magnesio, sulfato de calcio, carbonato de calcio; aceites vegetales tales como aceites de maní, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de teobroma; polioles como el propilenglicol, glicerina, sorbitol, manitol, y polietilenglicol; agar; ácidos alginicos, agua libre de pirógenos; solución salina isotónica; extractos de arándano y solución amortiguada con fosfato; leche desnatada en polvo, así como también otras sustancias compatibles que no son tóxicas se utilizan en formulaciones farmacéuticas tales como vitamina C, estrógeno y equinácea, por ejemplo. También pueden estar presentes los agentes humectantes y lubricantes tales como lauril sulfato de sodio, así como también agentes colorantes, 60 agentes saborizantes, lubricantes, excipientes, agentes de comprimidos, estabilizantes, antioxidantes y conservantes.

65 Preferiblemente, la formulación oral contiene lactosa como se describe aquí, y más preferiblemente libre de lactosa. Varios portadores y/o excipientes adecuados para la administración oral, que son bien conocidos en la técnica se pueden utilizar para el propósito de esta invención. La composición no cariogénica puede, si desea, contener adicionalmente varios aditivos conocidos tales como, por ejemplo, conservantes, agentes endurecedores, lubricantes, emulsionantes, estabilizantes, esencias y similares. Tales composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente efectiva

ES 2 344 654 T3

de los compuestos anteriormente mencionados, preferiblemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de portador con el fin de proporcionar la forma para una administración apropiada al paciente. La formulación debe adecuarse al modo de administración.

5 Generalmente, los ingredientes se suministran ya sea separadamente o mezclados juntos en formas unitarias de dosificación, por ejemplo, como un polvo seco liofilizado o concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente sellado, como una ampolla o bolsita que indica la cantidad de agente activo. Cuando la composición se administra por infusión, se puede dispensar con una botella de infusión que contiene agua estéril de grado farmacéutico o solución salina. La composición farmacéutica de la invención se puede formular como formas neutras o como sales. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas formadas con aniones tales como aquellas derivadas de ácido clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y aquellas que se forman con cationes tales como las derivadas del sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos de hierro, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, etc.

15 Los ensayos *in vitro*, se pueden emplear opcionalmente para ayudar a identificar los rangos de dosificación óptimos. La dosis precisa a ser empleada en la formulación también dependerá de la ruta de administración, y la gravedad de la enfermedad o trastorno, y se debe decidir de acuerdo con el juicio del médico y las circunstancias de cada paciente. Las dosis efectivas se pueden extrapolar a partir de la curva de respuesta- dosis derivada de sistemas de prueba de modelo animal *in vitro*. Preferiblemente, la composición farmacéutica se administra directamente o en combinación con un adyuvante. Los adyuvantes se pueden seleccionar del grupo que consiste de una cloroquina, compuestos polares, próticos, tales como propilenglicol, polietilenglicol, glicerol, ETOH, 1-metil L-2-pirrolidona o sus derivados o compuestos polares apróticos como dimetilsulfóxido (DMSO) , dietilsulfóxido, di-n-propilsulfóxido, dimetilsulfona, sulfolano, dimetilformamida, dimetilacetamida, tetrametilurea, acetonitrilo o sus derivados. Estos compuestos se agregan en condiciones que respeten las limitaciones de pH. Se puede administrar la composición de la presente invención a un vertebrado. “Vertebrado” como se utiliza aquí está destinado a tener el mismo significado como se entiende comúnmente por las personas medianamente versadas en la técnica. Particularmente, “vertebrado” abarca los mamíferos, y más particularmente los humanos.

30 El término “administrar” significa administración de una dosis terapéuticamente efectiva de la composición anteriormente mencionada. Por “cantidad terapéuticamente efectiva” se entiende la dosis que produce los efectos para los que ésta se administra, preferiblemente este efecto es anticariogénico. La dosis exacta dependerá del propósito del tratamiento, y será comprobada por un experto en el arte utilizando técnicas conocidas. Como se conoce en la técnica y se describió anteriormente, los ajustes para el suministro sistémico versus localizado, edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, tiempo de administración, la interacción del fármaco y la severidad de la afección pueden ser necesarios, y serán comprobados con experimentación de rutina por los expertos en la técnica.

40 Los métodos son aplicables tanto a la terapia humana y aplicaciones veterinarias. Los compuestos descritos aquí que tienen la actividad terapéutica deseada se pueden administrar en un portador fisiológicamente aceptable a un paciente, como se describe aquí. Dependiendo de la manera de introducción, se puede formular el compuesto en una variedad de formas como se discute adelante. La concentración de los compuestos terapéuticamente activos en la formulación puede variar de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 100% en peso. Se pueden administrar los agentes individualmente o en combinación con otros tratamientos. La administración de la composición farmacéutica se puede hacer en una variedad de formas como se mencionó anteriormente, que incluyen, pero no se limitan a, oralmente, subcutáneamente, intravenosamente, intra-arterial, intranodal, intramedularmente, intratecal, intraventricular, intranasalmente, intrabronquial, transdérmicamente, intranodalmente, rectalmente, intraperitonealmente, intramuscularmente, intrapulmonar, vaginalmente, rectalmente o ocularmente. Preferiblemente la administración es oralmente o bucal. El médico de cabecera, y los factores clínicos determinarán el régimen de dosificación. Como es bien conocido en las técnicas de medicina, las dosificaciones para cualquier paciente dependen de muchos factores, que incluyen la estatura del paciente, el área de superficie corporal, la edad, el compuesto que se administra, sexo, tiempo y ruta de administración, salud general y otros fármacos que se administran al mismo tiempo. Una dosis típica puede estar, por ejemplo, en el rango de 0.001 a 1,000 μg , sin embargo, se prevé las dosis por debajo o por encima de este rango de ejemplo, especialmente teniendo en cuenta los factores anteriormente mencionados.

55 Las dosificaciones se dan preferiblemente una vez por semana, sin embargo, durante la progresión del tratamiento las dosificaciones se pueden administrar en intervalos de tiempo mucho más largos y si se necesita se pueden dar en intervalos de tiempo mucho más cortos, por ejemplo, diariamente. En un caso preferido la respuesta inmune se monitorea utilizando métodos descritos aquí y métodos adicionales conocidos por aquellos expertos en la técnica y se optimizan las dosificaciones, por ejemplo, en el tiempo, cantidad y/o composición. Se puede monitorear el progreso por la evaluación periódica. La composición farmacéutica de la invención se puede administrar localmente o sistémicamente. También se prevé que las composiciones farmacéuticas se emplean en métodos de co-terapia, es decir, en la co-administración con otros medicamentos o fármacos, por ejemplo, otros fármacos para prevenir, tratar o aliviar la caries que se describen aquí.

65 Otra composición preferida de la presente invención es un alimento o composición de alimento que comprende un microorganismo, mutante, derivado, análogo o fragmento del mismo como se describe en relación con la composición de la presente invención, que comprende adicionalmente un portador oralmente aceptable o excipiente. El microorganismo, mutante, derivado, análogo o fragmento del mismo es un microorganismo, mutante, derivado o fragmento de la presente invención.

ES 2 344 654 T3

“Alimentos” o “productos alimenticios” comprende cualesquier alimento “latable”, apetecible y/o potable para los mamíferos, por ejemplo, las personas o animales, por ejemplo, mascotas como se describe aquí. Los alimentos y productos alimenticios se describen aquí en otra parte. Un “portador farmacéuticamente aceptable” se describe anteriormente aquí y es preferible no tóxico y grado de alimentos y/o productos alimenticios. Aún, este término también abarca los portadores mencionados en relación con la composición farmacéutica de la presente invención. Un alimento o composición de alimento preferida de la presente invención no contiene lactosa en un rango entre 1% (p/p) y 6% (p/p). También se prefiere que los alimentos o composiciones de alimento contengan no más de 1% (p/p) de lactosa, por ejemplo, que contenga menos de 1%, preferiblemente menos de 0,9% (p/p), 0,8% (p/p) de lactosa, etc. o que el alimento o composición de alimento contenga más del 6%, 7%, 8%, etc. (p/p) de lactosa. Alternativamente, también se prefiere que los alimentos o la composición de alimento no contengan lactosa.

La presente invención proporciona adicionalmente el uso de un microorganismo o un derivado o mutante del mismo o un análogo o fragmento en relación con la composición de la presente invención aquí para la preparación de una composición anticariogénica que es preferiblemente un dentífrico, goma de mascar, pastillas para chupar, colutorio, enjuague bucal o seda dental, como se describió anteriormente. El microorganismo, mutante, derivado, análogo o fragmento del mismo es un microorganismo, mutante, derivado o fragmento de la presente invención.

Otro aspecto de la presente invención es un método para la producción de una composición anticariogénica que comprende las etapas de formular un microorganismo o derivado o mutante del mismo o un análogo o fragmento de un microorganismo descrito en relación con la composición de la presente invención con un portador cosmética, oral o farmacéuticamente aceptable o excipiente. El microorganismo, mutante, derivado, análogo o fragmento del mismo es un microorganismo, mutante, derivado o fragmento de la presente invención.

También se proporciona un método para la producción de un producto alimenticio o alimento anticariogénico en donde el método comprende la etapa de agregar un microorganismo o derivado o mutante o análogo o un fragmento del mismo que se describen aquí en relación con la composición de la presente invención por la presente solicitud. El microorganismo, mutante, derivado, análogo o fragmento del mismo es un microorganismo, mutante, derivado o fragmento de la presente invención.

De acuerdo con la presente invención, el término “producto alimenticio” abarca todos los alimentos y bebidas comestibles y bebibles. De acuerdo con lo anterior, se puede incluir el microorganismo o análogo o fragmento en un alimento o bebida. Estos son, por ejemplo, goma, aerosol, bebidas, dulces, leche maternizada, helados, postres helados, ensalada de aderezo, preparaciones lácteas, queso, queso fresco, yogurt sin lactosa, leche acidificada, crema de café o crema batida y similares.

Se prevé que los productos lácteos basados en leche están dentro del marco de la invención. La leche es sin embargo se entiende que la leche es de origen animal tal como vaca, cabra, oveja, búfalo, cebrá, caballo, burro o camello, y similares. La leche puede estar en el estado natural, una leche reconstituida, una leche desnatada o una leche complementada con compuestos necesarios para el crecimiento de las bacterias o para el posterior procesamiento de leche fermentada, tal como grasa las proteínas de un extracto de levadura, peptona y/o un tensoactivo, por ejemplo. El término leche también se aplica a lo que se denomina comúnmente leche vegetal, es decir, los extractos de material vegetal que se han tratados o de otra forma, tales como las leguminosas (soya, garbanzos, lentejas, y similares) o las semillas oleaginosas (colza, frijón de soya, ajonjolí, algodón y similares), cuyo extracto contiene proteínas en solución o en suspensión coloidal, que se coagulan por la acción química, por fermentación ácida y/o por el calor. Por último, la palabra leche denota mezclas de leches de animales y de leches vegetales.

Cuando el microorganismo o análogo o fragmento de la presente invención se agrega al yogurt y similares que tienen contenidos idénticos, es suficiente agregar el microorganismo de la presente invención a una concentración de aproximadamente 10^5 - 10^7 células/ml. En tal caso, es posible prevenir o inhibir completamente la caries dental inducida por cepas de *S. mutans* cariogénicas, sin efectos colaterales significativos en la calidad de la bebida *per se*.

Tal bebida de alimento o producto alimenticio se puede producir por un método general para la producción de alimentos y bebidas o productos alimenticios, que incluyendo la adición del ingrediente activo a un material crudo o cocinado de los alimentos, bebidas o productos alimenticios. Los alimentos, bebidas o productos alimenticios de acuerdo con la presente invención se pueden moldear y granular de la misma manera como se utiliza generalmente para los alimentos, las bebidas o los productos alimenticios. El método de moldeado y granulación incluye métodos de granulación tales como granulación de capa fluida, granulación por agitación, granulación por extrusión, granulación por laminación, granulación por corriente de gas, granulación por moldeamiento de compactación, granulación por agrietamiento, granulación de pulverización, y granulación por inyección, los métodos de recubrimiento tales como recubrimiento de bandeja, recubrimiento de capa fluida, y recubrimiento seco, método de soplado en seco, de vapor en exceso, método de manta de espuma, métodos de expansión tal como el método de incubación en microondas, y los métodos de extrusión con máquinas granulación por extrusión y extrusores.

Los alimentos, bebidas o productos alimenticios de acuerdo con la presente invención incluye alimentos, bebidas o productos alimenticios que comprenden el ingrediente activo. Los alimentos, bebidas o productos alimenticios a ser utilizados en la presente invención incluyen cualesquier alimentos, bebidas o productos alimenticios. El ingrediente activo en los alimentos, bebidas o productos alimenticios no se limita específicamente a cualquier concentración, mientras que los alimentos resultantes, bebidas o productos alimenticios pueden ejercer su actividad de unir específi-

ES 2 344 654 T3

camente al *Streptococcus mutans*. La concentración de los ingredientes activos es preferiblemente 0.001 a 100% en peso, más preferiblemente desde 0.01 a 100% en peso y más preferiblemente 0.1 a 100% en peso de los alimentos, bebidas o productos alimenticios que comprenden tal ingrediente activo o con respecto al número de células aquellos descritos aquí. Los alimentos o bebidas específicas, a la que se agrega el ingrediente activo, incluyen, por ejemplo, jugos, bebidas refrescantes, sopas, té, bebidas de leche agria, productos lácteos como leches fermentadas, helados, mantequilla, queso, leche procesada y leche descremada, productos cárnicos como el jamón, salchichas y hamburguesas, productos de torta de carne de pescado, productos de huevo como los rollos de huevo condimentado y cuajada de huevo, productos de confitería tales como galletas, gelatinas, bocadillos, y goma de mascar, pan, fideos, conservas, productos ahumados, pescado seco y condimentos. La forma de los alimentos o bebidas incluye, por ejemplo, alimentos en polvo, alimentos como hojuelas, alimentos embotellados, alimentos enlatados, alimentos de retorta, alimentos en cápsulas, alimentos en comprimidos y alimentos en fluido. Los alimentos o bebidas con para unir específicamente a *Streptococcus mutans* a ser ingeridos por los niños, preferiblemente son composiciones nutritivas para los niños. Tales composiciones nutritivas para los niños incluyen leche modificada preparada para lactantes, leche descompuesta por proteína, leche modificada nutricionalmente específica o alimentos infantiles y alimentos preparados para los niños. La forma de la composición nutritiva para niños incluye pero no se limita específicamente a leches en polvo secas y pulverizadas y alimentos infantiles y también incluyen alimentos en general tales como helados, leche fermentada, y jalea para la ingestión infantil.

La composición nutritiva para niños de acuerdo con la presente invención se compone principalmente de proteínas, lípidos, sacáridos, vitaminas y/o minerales. En la composición nutritiva, el ingrediente activo se mezcla con estos componentes.

La proteína incluye proteínas de leche tales como la leche descremada, caseína, suero de queso, concentrado de proteína de suero y proteína de suero aislada, y sus fracciones tales como alfa s-caseína, beta caseína, alfa-lactoalbúmina y beta-lactoglobulina. Adicionalmente, se puede utilizar la proteína del huevo tal como la proteína de yema de huevo, proteína de huevo blanco, y ovoalbúmina, o proteína de soya como la proteína de soya desgrasada, proteína de soya separada, y proteína de soya concentrada. Diferente de estas, también se pueden utilizar satisfactoriamente las proteínas tales como el gluten de trigo, proteína de carne de pescado, proteína de carne bovina y colágeno. Adicionalmente, también se pueden utilizar satisfactoriamente las fracciones de estas proteínas, péptidos del tratamiento de ácido o enzima del mismo, o pueden ser ácidos no libres. Los aminoácidos libres pueden servir como fuentes de nitrógeno y, adicionalmente se pueden utilizar para dar acciones fisiológicas específicas. Tales aminoácidos libres incluyen, por ejemplo, taurina, arginina, cisteína, cistina y glutamina. Los lípidos incluyen grasas y aceites animales tales como leche, grasa, manteca de cerdo, carne grasa y aceite de pescado, aceites vegetales como aceite de soya, aceite de colza, aceite de maíz, aceite de coco, aceite de palma, aceite de almendra de palma, aceite de cártamo, aceite de perilla, aceite de linaza, aceite de onagra, triglicéridos de ácidos grasos de cadena media y aceite de semilla de algodón, grasas y aceites generados bacteriamente, y aceites fraccionados de los mismos, aceites hidrogenados de los mismos, y aceites de intercambio de éster de los mismos. La cantidad de lípido a ser mezclada varía dependiendo del uso.

El sacárido incluye, por ejemplo, uno o más almidones, polisacáridos solubles, dextrina, monosacáridos tales como sacarosa, lactosa como se describe aquí, maltosa, glucosa y fructosa y otros oligosacáridos. La cantidad total de tal sacárido es preferiblemente 40 a 80% en peso del sólido total en la composición nutritiva. Adicionalmente, los edulcorantes artificiales como el aspartame se pueden utilizar de manera satisfactoria. La cantidad de un edulcorante artificial es apropiadamente 0.05 a 1,0% en peso del sólido total en la composición nutritiva.

Las vitaminas incluyen, pero no se limitan a, licopeno como un componente esencial e incluyen, adicionalmente, por ejemplo, vitaminas como la vitamina A, grupo de vitamina B, vitaminas C, D y E y el grupo de vitamina K, ácido fólico, ácido pantoténico, niotinamida, carnitina, colina, inositol y biotina mientras que tales vitaminas se pueden administrar a los infantes. Tales vitaminas son preferiblemente de 10 mg a 5 g por peso por el sólido total en la composición nutritiva para niños.

Adicionalmente, los minerales incluyen calcio, magnesio, potasio, sodio, hierro, cobre, zinc, fósforo, cloro, manganeso, selenio y yodo. Tales minerales son preferiblemente de 1 mg a 5 g en peso por el sólido total en la composición nutritiva para niños.

Otros diferentes de aquellos componentes descritos anteriormente, la composición nutritiva para niños de la presente invención se puede mezclar con cualquier componente deseablemente mezclado en composiciones nutritivas, por ejemplo, fibra dietética, nucleótidos, ácidos nucleicos, saborizantes y colorantes.

El alimento o bebida de la presente invención se puede utilizar como un alimento o bebida saludable o un alimento o bebida funcional para prevenir y/o tratar las caries.

Cuando se ingiere el alimento o bebida de acuerdo con la presente invención, la cantidad que se ingiere no se limita específicamente. La cantidad que se ingiere es generalmente de 0.1 a 50 g, preferiblemente de 0.5 g a 20 g diariamente, con base en la cantidad total de ingrediente activo. El alimento o bebida se ingiere continuamente en esta cantidad durante un período de un solo día hasta 5 años, preferiblemente de 2 semanas a un año. Aquí, la cantidad ingerida se puede ajustar a un rango apropiado dependiendo de la severidad del síntoma del individuo, del consumo del alimento o bebida, la edad y el peso corporal del mismo, y similares. El alimento de la presente invención puede ser cualquier alimento que comprende el ingrediente activo. El alimento incluye, por ejemplo, concentrados para perros,

ES 2 344 654 T3

gatos y ratas, comida para el ganado, para vacas y cerdos, comida para aves, para pollos y pavos, y comidas para peces de cultivo para pargo y amarillo.

5 Se puede producir el alimento al mezclar apropiadamente el ingrediente activo de la presente invención en una materia prima en bruto, que incluye, por ejemplo, cereales, salvado, alimentos oleaginosos, materias primas de alimentos de origen animal, otras materias primas en bruto y productos purificados.

10 Los cereales incluyen, por ejemplo, millo, trigo, cebada, avena, centeno, arroz integral, trigo sarraceno, mijo cola de zorro, mijo chino, pasto Deccan, maíz y soya.

El salvado incluye, lejos ejemplo, salvado de arroz, salvado de arroz desgrasado, salvado, harina de menor grado, germen de trigo, salvado de cebada, gránulos tamizados, salvado de maíz y germen de maíz.

15 Las harinas oleaginosas incluyen, por ejemplo, harina de soya, soya en polvo, harina de linaza, harina de semilla de algodón, harina de maní, harina de cártamo, harina de coco, harina de palma, harina de ajonjolí, harina de girasol, harina de colza, harina de semilla de ceiba y harina de mostaza. Las materias primas para alimento de origen animal incluyen, por ejemplo, polvos de pescado, harina de importación, harina completa, y harina de costa, solubles de pescado, polvo de carne, polvo de carne y hueso, polvo de sangre, pelo descompuesto, polvo de hueso, subproductos de carnicerías, harina de plumas, pupa del gusano de seda, leche descremada, caseína, suero de leche y krill. Otras materias primas para alimento incluyen, por ejemplo, tallos y hojas de plantas como la alfalfa, fardos de heno, harina de hojas de alfalfa, polvo de hoja de algarriba, subproductos de las industrias que procesan maíz, tales como harina de gluten de maíz, comida de gluten de maíz y licor de maceración de maíz, almidón, azúcar, levadura, subproductos de la industria de la fermentación tales como residuos para cerveza, raíz de malta, residuos para licor y residuos de salsa de soya y subproductos agrícolas tales como residuos procesados de cítricos, residuos de cuajada de soya, residuos de café y residuos de cacao, yuca, haba caballar, harina de guar, algas marinas, espirulina y clorela. Los productos purificados incluyen, por ejemplo, las proteínas tales como la caseína y albúmina, aminoácidos, almidón, celulosa, sacáridos tales como la sacarosa y la glucosa, minerales y vitaminas.

25 En caso de proporcionar a los animales el alimento de acuerdo con la presente invención, la cantidad de alimento a ser ingerido no se limita específicamente, pero es preferible, por ejemplo, 0.1 mg a 50 g por 1 kg de peso corporal por día, preferiblemente 0.5 mg a 20 g por 1 kg de peso corporal por día, basado en la cantidad del ingrediente activo. El alimento es ingerido continuamente en esta cantidad durante un período de un solo día hasta 5 años, preferiblemente de 2 semanas a un año. De nuevo, la cantidad ingerida se puede ajustar a un rango apropiado dependiendo de la especie, la edad y el peso corporal del animal que ingiere el alimento, y similares.

35 Adicionalmente, la presente invención se relaciona con un aditivo para alimentos, bebidas y productos alimenticios, que, debido a la presencia de un microorganismo o derivado o mutante o análogo o fragmento del mismo como se describe en relación con la composición de la presente invención es, inter alia, capaz de unirse específicamente a *Streptococcus mutans* con el fin de prevenir y/o tratar la caries. El microorganismo, mutante, derivado, análogo o fragmento del mismo es un microorganismo, mutante, derivado o fragmento de la presente invención. El aditivo para los alimentos o bebidas incluye el aditivo para composiciones nutritivas para niños. El aditivo para los alimentos se puede producir mediante un método general para la producción de aditivos para alimentos, bebidas o productos alimenticios. Si es necesario, se pueden agregar los aditivos para uso general en alimentos, bebidas o productos alimenticios, por ejemplo, los aditivos descritos en el Manual de Aditivos Alimenticios (La Asociación de Aditivos Alimenticios del Japón; emitido el 06 de enero 1997) de forma satisfactoria, que incluyen edulcorantes, colorantes, conservantes, espesantes y estabilizantes, antioxidantes, agentes fijadores de color, blanqueadores, antisépticos, base de goma, amargos, enzimas, agentes de brillo, acidulante, condimentos, emulsionantes, agentes mejoradores para la fabricación de sabores y extractos de especias. Adicionalmente, se pueden agregar satisfactoriamente sacáridos convencionales, almidón, materiales inorgánicos, polvos vegetales, excipientes, desintegradores, lubricantes, aglutinantes, tensoactivos y plastificantes mencionados anteriormente para productos farmacéuticos, comprimidos.

Los aditivos incluyen los siguientes aditivos.

55 Los edulcorantes incluyen el aspartame, regaliz, estevia, xilosa y “lo han ku” (*Momordica grosvenori* fruit). Los colorantes incluyen oleoresina carotenoide y turmerica, flavonoides, color caramelo, color espirulina, clorofila, el color púrpura de patata dulce, color púrpura del ñame, color de perilla, y el color de arándano.

60 Los conservantes incluyen, por ejemplo, sulfito de sodio, benzoatos, extracto de benzoína, sorbatos y propionatos. Los espesantes y estabilizadores incluyen, por ejemplo, gomas tales como la goma xantano y goma arábica, alginatos, quitina, quitosano, extracto de aloe, goma guar, hidroxipropil celulosa, caseína de sodio, almidón de maíz, carboximetil celulosa, gelatina, agar, dextrina, celulosa de metilo, alcohol polivinílico, microfibras de celulosa, celulosa microcristalina, celulosa de algas, poliácido de sodio, polifosfato de sodio, carragenina o la levadura de la pared celular.

65 Los antioxidantes incluyen, por ejemplo, el grupo de vitamina C, etilendiaminotetraacetato de sodio, etilendiaminotetraacetato de calcio, ácido eritórbito, orizanol, catequina, quercetina, extracto de clavo de olor, rutino tratado con enzimas, extracto de manzana, extracto de semilla de sésamo, dibutilhidroxitolueno, extracto de hinojo, extracto de rábano, extracto de apio acuoso, extracto de té, tocoferoles, extracto de colza, extracto de café, extracto de girasol,

ES 2 344 654 T3

ácido ferulio, butilhidroxianisol, extracto de la hoja de arándano, extracto de propóleo, extracto de pimienta, extracto de bálsamo jardín, ácido gálico, extracto de eucalipto, y extracto de romero.

Los agentes que fijan color incluyen, por ejemplo, nitrito de sodio.

Los blanqueadores incluyen, por ejemplo, sulfito de sodio.

Los antisépticos incluyen, por ejemplo, fenol o-fenilo. La base de goma incluye, por ejemplo, acetilricinoleato metilo, cera urushi, goma de éster, resina Elemi, cera urucury, gama Sauri, cera carnauba, éster de ácido graso de glicerina, cera de esperma de ballena, copaiba balsam, resina de copal, caucho, cera de salvado de arroz, cera de caña, shellac, jelutong, éster de ácido graso de sacarosa, caucho natural despolimerizado, cera de parafina, abeto balsámico, éster de ácido graso de propilenglicol, pulpa polvo, cascarilla de arroz en polvo, aceite de jojoba, poliisobutileno, polibuteno, cera microcristalina, goma para masticar, cera de abejas y fosfato de calcio. Los amargos incluyen, por ejemplo, el ácido iso-alfa-amargo, cafeína, extracto de kawaratake (*Coriolus versicolor*), extracto de quina corteza roja, extracto de corteza de Phellodendron, extracto de raíz de genciana, extractos de especias, naringina modificada enzimáticamente, extracto de casia Jamaica, teabromina, naringina, extracto de casia, extracto de absintio, extracto de isodonis, té de olivo, extracto de naranjo amargo (*Citrus aurantium*), extracto de lúpulo y de extracto ajeno. Las enzimas incluyen, por ejemplo, amilasa, tripsina o cuajo.

Los agentes de brillo incluyen, por ejemplo, cera urushi y cera Japonesa. El acidificante incluye, por ejemplo, ácido adípico, ácido itacania, ácidos cítricos, ácidos succínicos, acetato de sodio, ácidos tartáricos, dióxido de carbono, ácido láctico, ácido fítico, ácido fumárico, ácido málico y ácido fosfórico. Los condimentos incluyen, por ejemplo, aminoácidos tales como asparagina, ácido aspártico, ácido glutámico, glutamina, alanina, isoleucina, glicina, serina, cistina, tirosina, leucina, y pralina, los ácidos nucleicos tales como inosinato de sodio, uridinato de sodio, guanilato de sodio, citidilato de sodio, ribonucleótido de calcio y ribonucleótido de sodio, ácidos orgánicos tales como el ácido cítrico y ácido succínico, cloruro de potasio, solución salina reducida en cloruro de sodio, cloruro de potasio crudo, sal suero, fosfato de tripotasio, fosfato de dipotasio, dihidrógeno fosfato de potasio, hidrógeno fosfato de disodio, dihidrógeno fosfato de sodio, fosfato de trisodio y extracto de clorela. Los mejoradores incluyen, por ejemplo, sales de zinc, el grupo de vitamina C, varios aminoácidos, ácido 5-adenílico, cloruro de hierro, hesperidina, varios calcios calcinados, varios calcios no calcinados, dibenzoiltiamina, hidróxido de calcio, carbonato de calcio, sal de clorhidrato de tiamina, Dunallella. Oarotene, tocoferol, ácido nicotínico, caroteno de la zanahoria, caroteno de aceite de palma, pantotenato de calcio, vitamina A, hidroxiprolina, dihidrógeno pirofosfato de calcio, pirofosfato ferroso, pirofosfato férrico, ferritina, hierro hemo, menaquinona, ácido fólico y riboflavina.

Los agentes para la fabricación incluyen, por ejemplo, auxiliares de procesamiento tales como acetona y resina de intercambio de ión. Los sabores incluyen, por ejemplo, esencia de vainilla y los extractos de especias incluyen, por ejemplo, extracto de pimienta.

Se pueden agregar estos varios aditivos al ingrediente activo, teniendo en consideración el modo de administración, de acuerdo con la presente invención. La composición anticariogénica de la presente invención comprende una cantidad de un microorganismo o derivado o mutante del mismo de la presente invención o análogo o fragmento del mismo como se describe en relación con la composición de la presente invención. Los microorganismos, mutante, derivada, análogo o fragmento de los mismo es un microorganismo, mutante, derivado o fragmento de la presente invención. Se prevé que las composiciones y, en particular, la composición anticariogénica comprende un microorganismo de la presente invención como se describe en relación con la composición de la presente invención en forma de un microorganismo probiótico. A saber, en adición al efecto probiótico, el microorganismo probiótico de la presente invención es útil para tratar y/o prevenir la caries. La cantidad de dicho microorganismo probiótico es muy alta para modificar significativamente positivamente la afección a ser tratada, preferiblemente la caries, pero lo suficientemente bajo para evitar efectos colaterales serios (en una relación de beneficio/riesgo razonable), dentro del alcance del juicio médico. Una cantidad efectiva de dicho microorganismo probiótico variará con el objetivo particular a se alcanzado, la edad y condición física del paciente que se trata, la severidad de la enfermedad subyacente, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia concurrente y el microorganismo específico empleado. La cantidad efectiva de dicho microorganismo probiótico será, la cantidad mínima que proporcionará la unión específica deseada al *Streptococcus mutans*. La presencia de, por ejemplo, 1×10^9 bacterias, como células completas viables o no viables, en 0.05 ml de solución de solución salina amortiguada con fosfato, o en 0.05 ml de suspensión de agar, o el equivalente del peso en seco de los fragmentos de pared celular, es efectiva cuando se administra en cantidades de aproximadamente 0.05 ml a 20 ml.

Una ventaja práctica es que se puede administrar el organismo probiótico de una manera conveniente, como mediante la ruta oral. Dependiendo de la ruta de administración, se puede requerir que los ingredientes activos que comprenden dichos organismos probióticos estén cubiertos de un material para proteger dichos organismos de la acción de las enzimas, ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar dichos organismos. Con el fin de administrar organismos probióticos por otros diferentes a la administración parenteral, ellos se deben recubrir por, o administrar con, un material para prevenir la inactivación. Por ejemplo, se pueden coadministrar los organismos probióticos con inhibidores de enzima o en liposomas. Los inhibidores de enzima incluyen el inhibidor de la tripsina pancreática, diisopropilfluorofosfato (DFP) y trasilol. Los liposomas incluyen emulsiones P40 agua en aceite en agua, así como también liposomas convencionales y diseñados específicamente que trasportan lactobacilos o sus subproductos a la superficie urogenital. También se pueden preparar dispersiones, por ejemplo, en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos, y en aceites. Generalmente, las dispersiones se preparan al incorporar los varios organismos

ES 2 344 654 T3

probióticos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos otros de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación, la técnica de secado al vacío y de secado por congelamiento que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional que deseado de la solución estéril filtrada previamente del mismo. Métodos preferidos adicionales para la preparación incluyen pero no se limitan a la liofilización y el secado por calor.

La composición anticariogénica también abarca los productos destinados a ser administrados oralmente o bucalmente, que comprenden un portador farmacéuticamente aceptable, como se describe aquí, el cual, o en el cual, se agrega las células de un microorganismo de la presente invención como se describe en relación con la composición de la presente invención que es un microorganismo de la presente invención, en forma fresca, concentrada o deshidratada, por ejemplo. Por supuesto, también se puede agregar un derivado o un fragmento de dicho microorganismo o cualquier combinación de dicho microorganismo, derivado y/o fragmento del mismo que se describen aquí. Se pueden proporcionar estos productos en la forma de una suspensión ingerible, un gel, un difusor, una cápsula, una cápsula de gelatina dura, jarabe, o en cualquier forma galénica conocida por los expertos en la técnica.

Cuando los organismos probióticos se protegen de forma adecuada como se describió anteriormente, se puede administrar el compuesto activo oralmente, por ejemplo, con un diluyente inerte o con un portador comestible asimilable, o se puede encerrar en la cápsula de gelatina dura o blanda, o se puede comprimir en tabletas diseñadas para pasar a través del estómago (es decir, recubierta entérica), o se puede incorporar directamente con el alimento de la dieta. Para la administración terapéutica oral, se pueden incorporar los organismos probióticos con excipientes y utilizar en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, píldoras, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, y similares. Las composiciones o preparaciones de acuerdo con la presente invención se preparan de tal manera que una forma unitaria de dosificación oral contiene, por ejemplo, aproximadamente 1×10^9 , viables o no viable, por ejemplo, lactobacilos por ml. El microorganismo probiótico se compone para la administración conveniente y efectiva en cantidades efectivas con un portador farmacéuticamente de alimento aceptable o en forma de dosificación unitaria como se describe aquí. Una forma de dosificación unitaria puede, por ejemplo, contener el compuesto activo principal en una cantidad de aproximadamente 10^9 viables o no viables, por ejemplo, lactobacilos, por ml. En el caso de composiciones que contienen ingredientes complementarios tales como prebióticos, se determinan las dosificaciones en función de la dosis habitual y la forma de administración de dichos ingredientes.

Las figuras muestran:

Figura 1

Acumulación de Streptococcus mutans por especies de Lactobacillus

La figura muestra una mezcla de Lactobacillus en acumulación con S. mutans (tubo de la izquierda) en comparación con una mezcla de un Lactobacillus sin acumulación con S. mutans (tubo de la derecha). Se ha realizado el experimento como se describe en el Ejemplo 3 y los tubos se dejan reposar durante 20 minutos para dejar que se disuelvan los cúmulos.

Figura 2

Imagen microscópica de una especie de Lactobacillus de acumulación con Streptococcus mutans

La figura muestra una imagen microscópica de los cúmulos entre el Lactobacillus y S. mutans mostrados en la Figura 1 (tubo de la izquierda). La imagen se toma con un aumento de 1000 veces utilizando un microscopio de contraste de fase.

Ejemplo 1

Almacenamiento y crecimiento

En almacenamiento y crecimiento de las cepas puede ocurrir de acuerdo a los procedimientos ordinarios. Por ejemplo, las cepas se pueden almacenar como existencias congeladas a -80°C . Se puede hacer crecer 1 ml de un cultivo a la fase estacionaria (OD600/mL 4-8) en el Medio MRS y se mezclan con $500 \mu\text{l}$ de una solución de glicerina estéril de 50% y se congelan. Los cultivos de S. mutans se pueden hacer crecer en medio TSY a la fase estacionaria (OD600/mL 1-2) y se tratan como se mencionó anteriormente. El cultivo de S. mutans (DSMZ 20523, serotipo c; NCTC 10923, serotipo e; NCTC 11060, serotipo f, así como también aislados no serotipados), así como también el cultivo de los lactobacilos se puede hacer en tubos Falcon cerrados de 5 ml a 37°C sin agitación durante la noche.

En particular, las cepas utilizadas en la presente solicitud se almacenan como existencias congeladas a -80°C . se hace crecer 1 ml de cultivo a la fase estacionaria (OD600/mL 4-8) en caldo MRS se mezcla con $500 \mu\text{l}$ de una solución de glicerol estéril de 50% y se congelan.

ES 2 344 654 T3

En particular, los cultivos de *S. mutans* se cultivan en caldo TSY a la fase estacionaria (OD600/mL 1-2) y se tratan como se mencionó anteriormente.

5 El cultivo de *S. mutans* (DSMZ 20523, serotipo c; NCTC 10923, serotipo e; NCTC 11060, serotipo f y otros aislados no serotificados aislado por OrganoBalance) y el cultivo de lactobacilos se hace en tubos Falcon cerrados de 5 ml a 37°C sin agitación durante la noche.

Ejemplo 2

10

Clasificación taxonómica de las cepas

15 La clasificación taxonómica de las cepas se hace de acuerdo con su patrón de fermentación de carbohidratos. Este se determina utilizando el sistema API 50 CH (bioMérieux, Francia) y se analiza utilizando el software APILAB PLUS versión 3.3.3 (bioMérieux, Francia).

Ejemplo 3

20 *Ensayo en la acumulación de Streptococcus mutans*

25 La mezcla de los lactobacilos con *S. mutans* se hace en relaciones volumétricas de 3:1 a 60:1 (*S. mutans*: lactobacilos), lo que corresponde a una relación de unidades que forman colonias de 1:50 a 1:25. Una densidad óptica medida en una longitud de onda de 600 nm de 1 ml significa preferiblemente para el *S. mutans* 3×10^8 unidades que forman colonias y para el lactobacilos preferiblemente de 7×10^9 unidades que forman colonias. La mezcla se hace a un volumen 2 mL en tubos Falcon de 15 mL. Las suspensiones de cultivo se diluyen con amortiguador de PBS para obtener las relaciones volumétricas mencionadas anteriormente, mientras que se mantiene el volumen final en 2 ml. La mezcla se agita fuertemente durante 15 segundos. Una acumulación es visible como una turbidez inmediata de la suspensión. Los tubos se dejan reposar durante 20 min, después de ese período los cúmulos se establecen como un sedimento visible, mientras que las mezclas sin cúmulos permanecen en suspensión.

30 Como control, la auto-acumulación de la cepa *Lactobacillus* respectiva y las cepas mutantes de *S.* siempre se examina mediante al desarrollar la prueba con sólo agregar la cepa *Lactobacillus* o la cepa *S. mutans* al tubo. Una acumulación de *S. mutans* por *Lactobacillus* se muestra en las Figuras 1 (tubo de la izquierda) y 2. Las cepas de lactobacilos de la presente invención, en particular, aquellas depositadas con el DSMZ exhiben acumulación de todos los serotipos de *S. mutans* sin mostrar un comportamiento de auto-acumulación.

40 *Medios*

caldo MRS	
mezcla MRS (Difco, EE.UU.)	55g/L
pH: 6.5	
caldo TSY:	
mezcla TSY (Difco, EE.UU.)	30g/L
extracto de levadura (Deutsche Hefewerke, Alemania)	3 g/L

50

Amortiguador

55 Amortiguador PBS:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.5 g/L
KH_2PO_4	0.2 g/L
NaCl	8.8 g /L

60

El pH se ajusta con HCl

65

ES 2 344 654 T3

Ejemplo 4

Especificidad de la acumulación hacia los miembros típicos de la flora oral

5 Se hacen crecer los cultivos de *Lactobacillus* como en el Ejemplo 1.

Las bacterias orales - a saber: *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (aislado por OrganoBalance, identificados por API 50 CH (Biomerieux, Francia) de acuerdo con las instrucciones del fabricante); *Streptococcus oralis* (DSMZ 20066); *Streptococcus oralis* (DSMZ 20395); *Streptococcus oralis* (DSMZ 20627); *Staphylococcus epidermidis* (DSMZ 1798); *Staphylococcus epidermidis* (DSMZ 20044); *Streptococcus mitis* (DSMZ 12643); *Streptococcus sanguinis* (DSMZ 20567) - se cultivan en 5 mL de medio BHI en tubos Falcon cerrados de 15 mL a 37°C durante la noche. Cada una de las bacterias orales se mezclan preferiblemente en una relación volumétrica de 3:1 con cultivos de *Lactobacillus* y la acumulación se ensaya como en el Ejemplo 3. Para cada prueba de acumulación/sin acumulación sólo se utiliza preferiblemente una de las bacterias mencionadas para determinar de inmediato los resultados de la prueba.

Como control, siempre se examina una auto-acumulación de las bacterias orales respectivas, así como también las cepas *Lactobacillus* probadas al realizar la prueba sólo con los lactobacilos o las cepas de la flora oral agregadas al tubo.

Las cepas paracasei mencionadas *L. paracasei* subsp. no se suman a las bacterias orales mencionadas anteriormente. Las cepas de *L. rhamnosus* se suman a *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*.

25 caldo BHI:
mezcla BHI (Difco, EE.UU.) 37 g /L
pH: 7.2

30

Ejemplo 5

Resistencia a la temperatura de la capacidad de cúmulo de los lactobacilos

35 Se hacen crecer las bacterias como en el Ejemplo 1.

Los cultivos de lactobacilos se incuban a 121°C a 2 bar en vapor saturado durante 20 min (autoclave). Después del enfriamiento de los cultivos autoclavados a temperatura ambiente, los lactobacilos se mezclan en una relación volumétrica de 1: 3 con cultivos *S. mutans* en crecimiento y la acumulación se ensaya como en el ejemplo 3, que incluye los experimentos de control.

La acumulación también se ensaya utilizando bacterias orales como se indica en el Ejemplo 4.

45 Se encuentra que el comportamiento de la acumulación de los lactobacilos no se cambia por el procedimiento de esterilización en autoclave hacia los serotipos de *S. mutans* probado o hacia las bacterias orales.

Ejemplo 6

Dependencia de la acumulación de valor de pH

Se hacen crecer las bacterias como en el Ejemplo 1.

55 Se cosechan 0.5 ml de los lactobacilos y 1.5 ml de *S. mutans* por centrifugación a 3200 g * durante 10 minutos y el sobrenadante se desecha. Las células se resuspenden en su volumen original (0.5 ml y 1.5 ml, respectivamente) en diferentes amortiguadores de PBS ajustados a los diferentes valores de pH. Los valores de pH de los amortiguadores se ajustan a los valores de 7.0 a 3.0 en etapas de 0.5 unidades de pH. Los cultivos se resuspenden en amortiguadores de valor de pH respectivo que se utilizan para el ensayo de comportamiento de acumulación.

60 Posteriormente se mezclan preferiblemente los lactobacilos en una relación volumétrica de 1: 3 con cultivos de *S. mutans* y la acumulación se ensaya como en el ejemplo 3, que incluye los experimentos de control. La acumulación no visible de *S. mutans* por los lactobacilos ocurre en valores de pH por debajo de 4,5.

65

ES 2 344 654 T3

Ejemplo 7

Sensibilidad del comportamiento de acumulación a liofilización

5 Se hacen crecer las bacterias como en el Ejemplo 1.

10 Se cosechan alícuotas de 1 ml de cultivos de lactobacilos por centrifugación a 3200 g * durante 10 minutos. El sobrenadante se desecha y los sedimentos se liofilizan a temperatura ambiente bajo vacío durante dos horas. Los sedimentos secos resultantes de cada cepa de *Lactobacillus* probada se almacenan a temperatura ambiente y a 4°C, respectivamente, durante 1 día, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas y 4 semanas. Después del tiempo de almacenamiento, los sedimentos liofilizados se resuspenden en 1 ml de amortiguador de PBS, pH 7.0. Los lactobacilos resuspendidos se mezclan en una relación volumétrica de 1: 3 con cultivos de *S. mutans* que han crecido recientemente y la acumulación se ensaya como en el ejemplo 3, que incluye los experimentos de control.

15 El comportamiento de acumulación de los lactobacilos mencionados hacia *S. mutans* no se cambia por la liofilización o los procedimientos de almacenamiento.

Ejemplo 8

20 *Ensayo de resistencia a la proteasa*

Se hacen crecer las bacterias como en el Ejemplo 1.

25 Las proteasas utilizadas son pronasa E, proteinasa K, tripsina, quimotripsina (todas obtenidos de Sigma, Alemania). Se lavan alícuotas de 1 ml de los lactobacilos en amortiguador de PBS al cosechar las células mediante centrifugación a 3200 g * durante 10 minutos y resuspender el sedimento en 1 ml de amortiguador de PBS (pH 7.0). Posteriormente las células se cosechan de nuevo como se describió anteriormente y se resuspende en amortiguador de PBS (pH 7.0) que contiene la proteasa respectiva a una concentración final de 2.5 mg/mL. La suspensión se incuba durante 1 hora a 30 37°C. Luego se lavan las células y se resuspenden en amortiguador de PBS (pH- 7.0) como se describió anteriormente.

35 La acumulación se ensaya como en el ejemplo 3, que incluye los experimentos de control. El comportamiento de acumulación de los lactobacilos mencionados hacia el *S. mutans* no se cambia por el tratamiento con cualquiera de las proteasas mencionadas.

Ejemplo 9

40 *Dependencia de iones del comportamiento de acumulación*

Se hacen crecer las bacterias como en el Ejemplo 1.

45 Se lavan alícuotas de 1 ml de los lactobacilos en 1 ml 200 mM de EDTA dos veces como se describió anteriormente. Posteriormente las células se cosechan y se resuspende en 1 ml de amortiguador de PBS (pH 7.0).

50 La acumulación se ensaya como en el ejemplo 3 y se observa una pérdida completa de la capacidad de acumulación. La resuspensión de los lactobacilos en 1 ml de una solución de calcio de 2 mM después de las dos veces de lavado en 200 mM de solución de EDTA restaura la capacidad de agregar el *S. mutans*. La resuspensión de las células lavadas con EDTA en hasta 100 mM de solución de magnesio no restablece la capacidad de agregar el *S. mutans*.

Ejemplo 10

55 *Ensayo de acumulación en la presencia de saliva*

Se hacen crecer las bacterias como en el Ejemplo 1.

60 Se cosechan alícuotas de 2 ml de cultivos de *S. mutans* como se describió anteriormente y se resuspenden en 2 ml de saliva. La saliva se proporciona por dos voluntarios y se utiliza inmediatamente después de ganancia.

La acumulación se ensaya como en el Ejemplo 3.

65 El comportamiento de acumulación de los lactobacilos mencionados hacia el *S. mutans* no cambian en la presencia de saliva.

ES 2 344 654 T3

Ejemplo 11

Composición de pastilla para chupar (I)

5 La composición de pastillas para chupar se prepara preferiblemente como se describe en el Ejemplo 4 en la página 8 del DE-C2 36 45 147, en donde, en adición a los ingredientes mencionados en dicho Ejemplo 4, el microorganismo de la presente invención, se agrega en una cantidad de 10^2 a 10^{12} , preferiblemente 10^3 a 10^8 células por mg de la pastilla para chupar.

10 Ejemplo 12

Composición Pastilla para chupar (II)

15 La composición de pastillas para chupar se prepara como se describe en El ejemplo 5 en la página 8 del DE-C2 36 45 147, en donde, en adición de los ingredientes mencionados en dicho Ejemplo 4, el microorganismo de la presente invención, se agrega en una cantidad de 10^2 a 10^{12} , preferiblemente 10^3 a 10^8 células por mg de la pastilla para chupar.

20 Ejemplo 13

Composición de dentífrico

25 La composición de dentífrico se prepara preferiblemente como se describe en el Ejemplo 3 de la página 8 del DE-C2 36 45 147, en donde en adición a los ingredientes mencionados en dicho Ejemplo 4, el microorganismo de la presente invención, se agrega en una cantidad de 10^2 a 10^{12} , preferiblemente 10^3 a 10^8 células por mg de dentífrico.

Ejemplo 14

Composición de dentífrico basada en tiza

35 La composición de dentífrico basada en tiza se preparar preferiblemente como se describe en el capítulo 7.1.4.4 "Rezepturbeispiel" en la página 205 del libro de "Kosmetik", W. Umbach (editor), 2nd edition, Thieme Verlag, 1995, en donde, en adición a los ingredientes mencionados en dicho capítulo en la página 205, el microorganismo de la presente invención, se agrega en una cantidad de 10^2 a 10^{12} , preferiblemente 10^3 a 10^8 células por mg de dentífrico basado en tiza.

Ejemplo 15

Dentífrico en gel en base de ácido silícico/fluoruro de sodio

45 El dentífrico en gel en base de composición de dentífrico de ácido silícico/fluoruro de sodio se prepara preferiblemente como se describe en el capítulo 7.1.4.4 "Rezepturbeispiel" en la página 205 del libro "Kosmetik", W. Umbach (editor), 2nd edition, Thieme Verlag, 1995, en donde, en adición a los ingredientes mencionados en dicho capítulo en la página 205, el microorganismo de la presente invención, se agrega en una cantidad de 10^2 a 10^{12} , preferiblemente 10^3 a 10^8 células por mg de dentífrico en gel en base de ácido silícico/fluoruro de sodio.

50 Ejemplo 16

Composición de dentífrico contra el sarro

55 La composición de dentífrico contra el sarro se prepara preferiblemente como se describe en el capítulo 7.1.4.4 "RezepturEP 1 797 170 B1 beispiel" en la página 206 del libro "Kosmetik", W. Umbach (editor), 2nd edition, Thieme Verlag, 1995, en donde, en adición a los ingredientes mencionados en dicho capítulo en la página 206, el microorganismo de la presente invención, se agrega en una cantidad de 10^2 a 10^{12} , preferiblemente 10^3 a 10^8 células por mg de crema dental contra el sarro.

60 Ejemplo 17

Composición de goma de mascar

65 La composición es la goma de mascar se prepara preferiblemente como se describe en el Ejemplo 6 en la página 9 del DE-C2 36 45 147, en donde en adición a los ingredientes mencionados en dicho Ejemplo 4, el microorganismo de la presente invención se agrega en un cantidad de 10^2 a 10^{12} , preferiblemente 10^3 a 10^8 células por mg de la goma de mascar.

ES 2 344 654 T3

Ejemplo 18

Composición de enjuague bucal concentrada

5 La composición de enjuague bucal concentrada se prepara preferiblemente como se describe en el capítulo 7.1.4.4
"Rezepturbeispiel" en la página 206 del libro "Kosmetik", W. Umbach (editor), 2nd edition, Thieme Verlag, 1995,
en donde, en adición a los ingredientes mencionados en dicho capítulo en la página 206, el microorganismo de la
presente invención, se agrega en una cantidad de 10^2 a 10^{13} , las células por ml de la composición de enjuague bucal
concentrada.

10

Ejemplo 19

Preparación de películas

15

preparación de películas:

1. Fase de agua

20

- agua caliente a 60°C
- se agrega aspartame (edulcorante), con agitación
- se disuelve el aspartame por completo

25

- se agrega un formador de película soluble en agua polimérico, como, por ejemplo, Kollicoat IR (polietilenglicol en alcohol polivinílico) o PVP (povidona) o polímeros naturales tales como alginatos bajo agitación hasta que se disuelven

30

- después de 10 min. se remueve el resto de la espuma
- el microorganismo de la invención presente en una cantidad de 10^2 a 10^{12} preferiblemente 10^3 a 10^8 células por película aroma final se agrega después del enfriamiento de la mezcla; alternativamente, se puede agregar el mutante o derivado del microorganismo de la presente invención o análogo o un fragmento del microorganismo de la presente invención.

35

2. fase aceitosa

40

- se disuelve mentol en el aceite de menta
- se agrega polisorbato 80 al aceite de menta-mentol-mezcla bajo agitación
- luego se agrega esta mezcla a propilenglicol bajo agitación

45

- se pueden agregar colorantes opcionales (tales como pigmentos, lacas)

3.

50

- bajo agitación la fase oleosa se mezcla lentamente con la fase de agua

4.

55

- Las películas delgadas se generan mecánicamente utilizando un dispositivo de corte.

60

65

ES 2 344 654 T3

Formulaciones de muestra

	formulación I		formulación II		
	peso [g]	composición en película [%]	peso [g]	composición en película [%]	
5					
10	Fase I aspartame	0.7	1.4	0.7	1.8
	Kollicoat IR	35.0	68.5	25.0	65.8
	Ac ascórbico	-	-	1.0	2.6
	Sabor de cereza			6.0	15.8
15	Agua desmin.	85.0	-	80.0	
	Fase II				
	mentol	1.4	2.7	-	
	Aceite de menta	5.6	11.0	-	
20	Polisorbato 80	0.7	1.4	-	
	Propilenglicol	7.0	13.7	5.0	13.2
	laca verde	0.7	1.4		
25	Laca azorubina	-	-	0.3	0.8
	Suma	136.1	100.0	118.0	100.0
	Contenido total	51.1		38.0	

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Un microorganismo que pertenece al género de *Lactobacillus* **caracterizado** porque es capaz de unirse específicamente a *Streptococcus mutans*, en donde la unión específica es

- (i) resistente a un tratamiento de calor a más de 95°C durante por lo menos 20 minutos, y
- 10 (ii) resistente al tratamiento de proteasa con una proteasa seleccionada del grupo que consisten en pronasa E, proteinasa K, la tripsina y quimotripsina, y
- (iii) dependiente de calcio, y
- 15 (iv) se forma en un rango de pH entre 4.5 y 8.5, y
- (v) se forma en la presencia de saliva.

20 2. El microorganismo de la reivindicación 1, **caracterizado** porque la unión específica se puede ensayar de la siguiente manera:

- (a) se hace crecer cada dicho microorganismo a la fase estacionaria,
- 25 (b) mezclar dicho microorganismo con *Streptococcus mutans* que se ha hecho crecer a la fase estacionaria;
- (c) incubar la mezcla obtenida en la etapa (b) en condiciones que permitan la formación de cúmulos de dicho microorganismo y *Streptococcus mutans*, y
- 30 (d) detectar los cúmulos mediante la ocurrencia de un sedimento.

3. El microorganismo de la reivindicación 1 ó 2, en donde el *Lactobacillus* es *Lactobacillus paracasei* o *Lactobacillus rhamnosus*.

35 4. El microorganismo de la reivindicación 3, que se selecciona del grupo que consiste de *Lactobacillus paracasei* o *Lactobacillus rhamnosus* que tiene número de acceso DSMZ DSM 16667, número de acceso DSMZ DSM 16668, número de acceso DSMZ DSM 16669, número de acceso DSMZ DSM 16670 y el número de acceso DSMZ DSM 16671, número de acceso DSMZ DSM 16672 y número de acceso DSMZ DSM 16673, un mutante o derivado de los mismos, en donde dicho mutante o derivado conserva la capacidad de unirse específicamente al *Streptococcus mutans* como se define en la reivindicación 1.

45 5. El microorganismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho microorganismo es capaz de unirse al de *Streptococcus mutans* serotipo c (DSMZ 20523) y/o serotipo e (NCTC 10923) y/o serotipo f (NCTC 11060).

6. Un análogo o fragmento del microorganismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que se inactiva térmicamente o se liofiliza, en donde dicho análogo o fragmento retiene la capacidad de unir específicamente al *Streptococcus mutans* como se define en la reivindicación 1.

50 7. Una composición que comprende un microorganismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o análogo o un fragmento de la reivindicación 6, que comprende adicional y opcionalmente un portador cosméticamente aceptable o excipiente, o que comprende adicional y opcionalmente un portador farmacéuticamente aceptable o excipiente, o que comprende adicional y opcionalmente un portador oralmente aceptable o excipiente.

55 8. La composición de la reivindicación 7, que es un dentífrico, goma de mascar, pastilla para chupar, colutorio, enjuague bucal o seda dental.

9. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8, que tiene actividad anticariogénica.

60 10. Uso de un microorganismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o de un análogo o fragmento de la reivindicación 6 para la preparación de una composición anticariogénica.

11. El uso de la reivindicación 10, en donde dicha composición anticariogénica es un dentífrico, goma de mascar, pastilla para chupar, colutorio, enjuague bucal o seda dental.

65 12. Un método para la producción de un producto alimenticio o alimento anticariogénico en donde el método comprende la etapa de agregar un microorganismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o un análogo o fragmento de la reivindicación 6 a un alimento o producto alimenticio.

ES 2 344 654 T3

13. Un método para la preparación de una composición anticariogénica que comprende proporcionar un microorganismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o un análogo o fragmento de la reivindicación 6.

5 14. El microorganismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o un análogo o fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 6 o una composición de acuerdo con la reivindicación 7 para uso en un método de profilaxis contra la caries.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

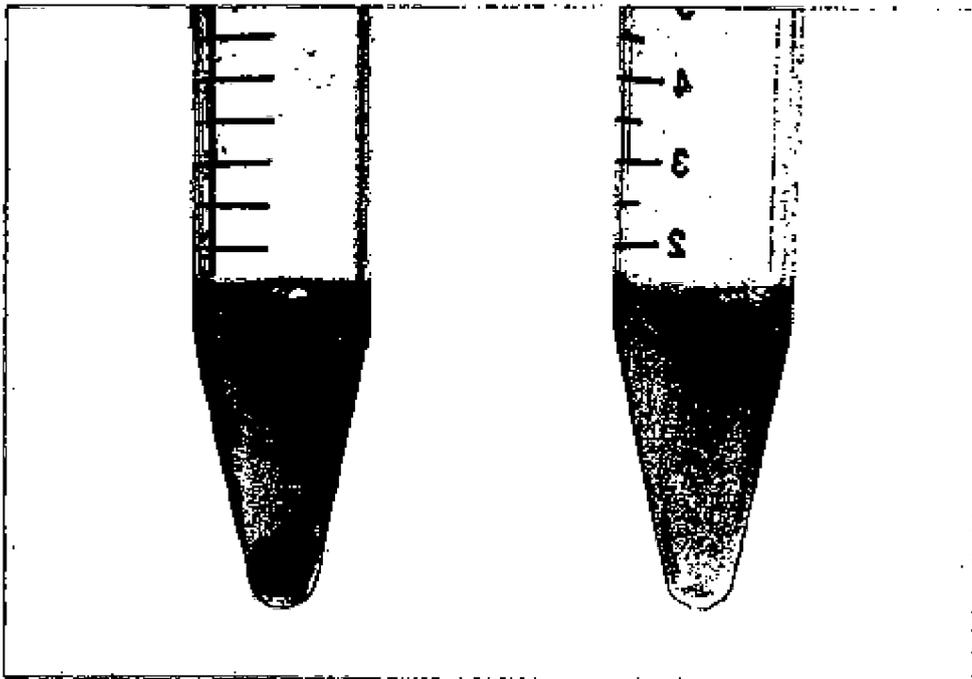


Figura 2

