



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 201**

51 Int. Cl.:
A23C 9/123 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **99940086 .4**
96 Fecha de presentación : **26.07.1999**
97 Número de publicación de la solicitud: **1104281**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.06.2001**

54 Título: **Incorporación de bacterias lácticas exógenas a la microflora oral.**

30 Prioridad: **12.08.1998 EP 98202707**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.07.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.07.2011

73 Titular/es: **Société des Produits NESTLÉ S.A.**
Case Postale 353
1800 Vevey, CH

72 Inventor/es: **Neeser, Jean-Richard;**
Guggenheim, Bernhard;
Comelli, Elena-Maria;
Stingele, Francesca y
Cocconcelli, Pier Sandro

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 363 201 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).

DESCRIPCIÓN

Incorporación de bacterias lácticas exógenas a la microflora oral

- 5 La presente invención se refiere a la Incorporación de bacterias lácticas exógenas a la microflora oral para la profilaxis o tratamiento de la caries dental, de la placa dental y de la infección periodontal.

Antecedentes de la presente invención

- 10 La boca (cavidad oral) contiene una microflora residente y una microflora no residente. La primera incluye microorganismos capaces de establecerse de manera más o menos permanente en las superficies orales. Estas bacterias están localizadas principalmente en la lengua, en la mucosa bucal y en los dientes, mientras que las encías, labios, mejillas, paladar y suelo de la boca solo soportan una microflora muy escasa.

- 15 La microflora natural residente en la lengua y en la mucosa bucal incluye microorganismos de los géneros Streptococcus, Veillonella, Bacteroides y Haemophilus. En los dientes predominan los estreptococos, lactobacilos y Actynomyces, pero también puede encontrarse muchos cocos y bacilos grampositivos y gramnegativos.

- 20 Por ejemplo, Frandsen y otros demostraron que el *S. sanguis* predomina en la mucosa bucal, aunque su hábitat principal sea la superficie dental, que el *S. gordonii* crece en la placa supragingival madura, que el *S. oralis* y el *S. mitis* crecen en la placa dental inicial (Oral Microbiol. Immunol., 6, 129-133, 1991). En los dientes se localizan cepas pertenecientes al grupo de mutantes (*S. cricetus*, *S. downei*, *S. ferus*, *S. macacae*, *S. mutans*, *S. rattus*, *S. sobrinus*). Las cepas del grupo *S. milleri* predomina en los abscesos dentales (*S. anginosus*, *S. constellatus*, *S. intermedius*; Bentley y otros, Int. J. System. Bacter. 1991, 41, 487-494; Wood y otros, The Genera of Lactic Acid Bacteria [Los géneros de bacterias acidolácticas], Blackie Academic and Professional, Chapman & Hall, W. H. eds., 1995).

- 25 Muchos de estos microorganismos son comensales inocuos, pero también han sido identificados como agentes etiológicos de bastantes enfermedades (Hill, M. J. and Marsh, P. D. eds. Human Microbial Ecology [Ecología microbiana humana], 1990, CRC Press, Boca Raton Florida, USA)

- 30 La placa dental es una película que se forma sobre la superficie dental y que consta de células bacterianas en una matriz de polisacáridos extracelulares y productos salivales. Inmediatamente después de la erupción los dientes se cubren de una capa amorfa de saliva, la película adquirida del esmalte (PAE), que tiene un espesor aproximado de 1,3 µm y no puede eliminarse con el cepillado normal de los dientes. El depósito de bacterias sobre los dientes se produce inmediatamente después de la formación de la PAE y resulta evidente al cabo de 8-12 horas en forma de estructura multicapa. La primera capa consta de bacterias (primeros colonizadores) que se adhieren a los dientes principalmente por reconocimiento específico del receptor de adhesina; forma un substrato para los segundos colonizadores que se adhieren entre sí por análoga fijación específica o por simple yuxtaposición. La cohesión de la placa está garantizada por tres mecanismos: la presencia de una película salival sobre la capa externa de bacterias, la coagregación entre las diferentes especies bacterianas y los glucanos sintetizados por las bacterias, y el hecho de que las bacterias quedan atrapadas en la matriz de la placa (Skopek y otros, Oral Microbiol. Immunol., 9, 19-24, 1994; Kolenbrander y otros, Meth. Enzymol., 253, 385-397, 1995; Hiroi y otros, FEMS Microbiol Lett., 96, 193-198, 1992; Gibbons y otros, Infect. Immun., 52, 555-561, 1986).

- 45 Los ácidos orgánicos producidos por las bacterias orales durante el proceso de fermentación causan directamente la caries dental. Estos ácidos atacan el tejido duro de los dientes con la consiguiente liberación de iones tales como calcio, fosfato, carbonato, magnesio, fluoruro, sodio. Cuando el pH de la cavidad oral alcanza de nuevo la neutralidad, la saliva se satura de calcio y se evita su desprendimiento del diente.

- 50 Entre todos los residuos de comida encontrados en la boca los carbohidratos muestran el mayor efecto promotor de la caries, pues están directamente expuestos a la fermentación oral bacteriana.

- Potencialmente todos los microorganismos fermentadores de azúcares son cariogénicos, pero los principales agentes etiológicos de las caries de corona y de raíz son los estreptococos mutantes, porque son fuertes productores de ácido; los lactobacilos, que son muy acidófilos, también pueden estar implicados. En los humanos el *S. mutans* y el *S. sobrinus* son las cepas más cariogénicas y viven sobre los dientes, sin colonizar toda la dentición. Se demostró un descenso en su número desde los molares hasta los dientes anteriores (Lindquist y otros, Dent. Res., 69, 1160-1166, 1990). Además en la placa proximal humana el *S. mutans* y el *S. sobrinus* colonizan preferentemente el lugar más propenso a la caries, apical al área de contacto (Ahmady y otros, Caries Res., 27, 135-139, 1993). También se halló un mayor predominio del *S. sobrinus* en las regiones molares, comparado con el del *S. mutans* (Lindquist y otros, Caries Res., 25, 146-152, 1991).

- 65 Se ha demostrado que el *S. mutans* y el *S. sobrinus* se adhieren a la película de los dientes principalmente por la vía específica adhesina-receptor. Gibbons y otros demostraron que el *S. mutans* lleva una adhesina que se une a componentes salivales de la película, mientras que el *S. sobrinus* parece poseer una adhesina que se une al glucano de la película (Infect. Immun., 52, 555-561, 1986).

La microflora transitoria comprende bacterias exógenas que pueden hallarse ocasionalmente en la boca, pero que no se establecen de manera permanente (aunque se efectúen administraciones orales repetidas de estas bacterias). Todas las bacterias alimentarias, y en particular las bacterias acidolácticas, pueden formar parte de esta microflora transitoria. Nunca se ha comprobado que estas bacterias lácticas exógenas sean capaces de adherirse directamente a la película dental. Sin embargo la administración repetida de bacterias lácticas exógenas da lugar a la colonización de todas las superficies bucales, como la lengua, la mucosa bucal, las encías, los labios, las mejillas, el paladar, el suelo y los dientes. Esta colonización puede ser debida a adherencias por fijaciones específicas de las bacterias a la microflora residente (fenómeno de coagregación) o por atrapamiento en la matriz de los polisacáridos producidos por las bacterias residentes o por adhesión a proteínas salivales (concretamente glicoproteínas).

Se ha señalado que el lactobacilo *casei rhamnosus* GG (ATCC53103) coloniza la boca, muy probablemente sobre el epitelio de la mucosa bucal. Esta cepa también se adhiere al epitelio del tracto intestinal (US 5032399, Gorbach y otros; *Micr. Ecol. In Health and Dis.*, 7, 295-298, 1994). En cambio el *L. rhamnosus* no se adhiere a los dientes.

La patente japonesa n°4021633 (Cyconmedix KK) también reveló la colonización de la boca por lactobacilos acidófilos, muy probablemente sobre el epitelio de la mucosa bucal. Se sabe que muchos lactobacilos acidófilos también se adhieren al epitelio del tracto intestinal (EP 577904; EP 199535; Perdigon y otros, *Medicina*, 46,751-754,1986; Perdigon y otros, *Immunology*, 63, 17-23, 1988).

Las bacterias exógenas también pueden producir factores que inhiben el crecimiento de la microflora residente en la boca. Por ejemplo la patente EP 759469 (Société des Produits Nestlé) describe el uso de una bacteriocina producida por el *Micrococcus varians* para inhibir el desarrollo de los patógenos orales *S. sobrinus*, *S. sanguis*, *S. mutans* y *A. viscosus*.

Se han utilizado algunas estrategias para minimizar el desarrollo de la microflora residente en la boca, en concreto la administración de bacterias comensales de la microflora residente que no son cariogénicas, tales como *Streptococcus mutans* (JP 59220191) o *Streptococcus salivarius* (JP 05004927) y/o *Stomatococcus mucilaginosus*, y/o administraciones repetidas de bacterias lácticas exógenas tales como *L. casei*, *L. fermentum*, *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. gasserri*, *L. salivarius*, *L. bulgaricus* y *S. salivarius* (Tanzer y otros, *Infec. and Immunity*, 48, 44-50, 1985; WO 92/14475; EP 0524732).

La aplicación de bacteriocinas también es una de las estrategias de investigación propuestas para reducir la caries dental. Estas moléculas han despertado interés como presuntos agentes anticaries y como factores importantes de modulación de la cavidad oral. El potencial anticaries de las aplicaciones de algunas bacteriocinas viene de su enérgica y amplia acción antibacteriana contra estreptococos mutantes y bacterias asociadas a la placa dental y de su existencia natural en bacterias consideradas humanamente seguras (US 5368845 de Colgate, y WO 94/12150 de Smithkline Beecham).

La aplicación de derivados lácteos también es interesante para la salud bucal. En efecto, la patente US 5427769 (Nestec S.A.) describe una alternativa consistente en prevenir la caries mediante el contacto de los dientes con una composición comestible que contiene caseína micelar en cantidad suficiente para inhibir la colonización por *Streptococcus sobrinus*. La patente EP 748591 (Société des Produits Nestlé S.A.) también señala el uso caseína micelar fluorada o de sus subunidades micelares para tratar la caries o placa dental. La patente US 4992420 (Nestec S.A.) describe el tratamiento de la cavidad bucal con caseína kappa-glicomacropéptido derivado de la leche para erradicar la placa y la caries.

La patente EP 0 699 689 se refiere a polisacáridos ramificados solubles, formados por una cadena principal con cadenas laterales repetidas de unidades de lactosa. También revela el microorganismo productor del polisacárido ramificado, que es una cepa de *Lactobacillus helveticus*, la CNCM I-1449. El polipéptido y el microorganismo pueden usarse respectivamente en composiciones alimenticias o cosméticas, p.ej. en un producto cosmético pensado para la higiene bucal, tales como pastas o geles dentífricos, colutorios, gomas y/o tabletas de mascar.

Nunca se ha comprobado que las bacterias lácticas ajenas a la microflora residente de la boca fueran realmente capaces de adherirse directamente a la película dental. Así, al colonizar la superficie dental, estas bacterias lácticas ejercerían una acción inhibitoria contra el crecimiento de la microflora residente, incluyendo patógenos orales.

Resumen de la presente invención

La presente invención tiene por objeto facilitar el empleo de bacterias lácticas ajenas a la microflora residente de la boca, que son poco acidificantes y capaces de adherirse directamente a la película dental, para preparar una composición destinada a la profilaxis o al tratamiento de la caries dental, de la placa dental y de la infección periodontal.

Conforme a la presente invención, al menos una bacteria láctica está elegida del grupo formado por CNCM 1-1984, CNCM 1-1985, CNCM 1-1986, CNCM I-1987 y LMG P-18997.

Según una forma de ejecución de la presente invención, la composición está diseñada para desplazar patógenos de los dientes o para evitar su adherencia.

5 Las bacterias lácticas pueden ser menos acidificantes que las cepas patógenas, contribuyendo así a establecer un pH de aproximadamente 5,5-7 en la cavidad oral.

Las bacterias lácticas pueden ser de origen lácteo.

10 En otra forma de ejecución, al menos una de las bacterias lácticas está elegida del grupo formado por *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*.

Según otra forma de ejecución la bacteria láctica se adhiere a la película dental mediante factores de adhesión.

15 En una forma de ejecución preferida la bacteria láctica se ha modificado genéticamente para aumentar su adhesión a la película dental y/o para ser menos acidificante; sobre todo para que se adhiera a la película dental mediante factores de adhesión y contribuya a establecer un pH de aproximadamente 5,5-7 en la cavidad oral.

20 En otra forma más de ejecución de la presente invención la composición es comestible y comprende una cantidad efectiva de bacteria láctica para la profilaxis o el tratamiento de la caries dental, de la placa dental y de la infección periodontal.

La composición puede contener al menos 10^4 - 10^9 ufc/g de bacteria láctica.

25 En otra forma de ejecución la bacteria láctica se combina con leche, leche fermentada, derivados lácteos o bacteriocina; los derivados lácteos se escogen preferentemente de cualquier forma de caseína-glicomacropéptido, caseína micelar, caseína micelar fluorada o leche cuajada.

30 Otra forma de ejecución preferida de la presente invención proporciona una composición para la salud bucal que comprende bacterias lácticas ajenas a la microflora residente de la boca que son poco acidificantes y capaces de adherirse directamente a la película dental, en la cual hay al menos una cepa de bacteria láctica escogida del grupo formado por las cepas CNCM I-1984, CNCM I-1985, CNCM I-1986, CNCM I-1987 y LMG P-18997.

Descripción detallada de la presente invención

35 En la siguiente descripción la boca define la cavidad oral de humanos o animales tales como mascotas, compuesta por la mucosa oral (encías, labios, mejillas, paladar y suelo de la boca), la lengua y los dientes (incluyendo estructuras artificiales).

40 La microflora residente de la boca incluye todos los microorganismos que viven naturalmente en la boca porque son capaces de establecerse permanentemente sobre las superficies orales. La microflora residente de la boca también incluye bacterias que viven en la región interfacial entre los tejidos dentales duros y blandos (en el punto de unión diente-encía), aunque en una boca sana no hay fisura gingival ni bolsa periodontal. Esta microflora incluye microorganismos de los géneros *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Micrococcus*, *Peptostreptococcus*, *Peptococcus*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Actinomyces*, *Arachnia*, *Rothia*, *Alcaligenes*, *Eubacterium*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Neisseria/Branhamella*, *Veillonella*, *Enterobacteriaceae*, *Campylobacter*, *Eikenella*, *Actinobacillus*, *Capnocytophaga*, *Haemophilus*, *Simonsiella*, *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Leptotrichia*, *Wolinella*, *Selenomonas*, *Mycoplasma*, *Candida*, *Spirochaetes*, *Protozoa*.

50 La microflora transitoria comprende bacterias exógenas que pueden hallarse ocasionalmente en la boca, pero que no se establecen permanentemente en ella. Esta microflora transitoria puede comprender todos los microorganismos de los alimentos, tales como las bifidobacterias (*B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. breve* y *B. longum*); los lactococos (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*); los estreptococos (*Streptococcus thermophilus*, *S. lactis*, *S. lactis cremoris* y *S. lactis diacetylactis*); los lactobacilos (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus fermentum* y el grupo acidófilo que comprende *L. johnsonii*; véase Fujisawa y otros, *Int. J. Syst. Bact.*, 42, 487-491, 1992); los pediococos (*Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici* y *Pediococcus halophilus*); los enterococos; los estafilococos (*Staphylococcus xylosum* y *Staphylococcus carnosus*); los micrococcos (*Micrococcus varians*); las levaduras de los géneros *Debaromyces*, *Candida*, *Pichia*, *Torulopsis* y *Saccharomyces*; y los mohos de los géneros *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor* y *Penicillium*.

65 El primer objeto de la presente invención es el uso de bacterias lácticas ajenas a la microflora residente de la boca, que son poco acidificantes y capaces de adherirse directamente a la película dental, para preparar una composición destinada a la profilaxis o al tratamiento de la caries dental, de la placa dental y de la infección periodontal.

Las bacterias lácticas según la presente invención son poco acidificantes y capaces de adherirse directamente a la

película dental, de modo que las composiciones preparadas con estas bacterias lácticas están diseñadas para desplazar patógenos de los dientes o para evitar su adherencia. Las bacterias lácticas según la presente invención son "poco acidificantes", lo cual significa que son menos acidificantes que las cepas patógenas. Por tanto contribuyen a establecer un pH de aproximadamente 5,5-7 en la cavidad oral. Preferentemente son de origen lácteo.

5 Las bacterias lácticas según la presente invención se adhieren a la película dental mediante interacciones y/o factores de adhesión específicos o inespecíficos. Los factores de adhesión específicos son proteínas o polisacáridos.

10 Al menos una bacteria láctica está escogida del grupo formado por *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, y en particular del grupo formado por las cepas CNCM 1-1984, CNCM I-1985, CNCM 1-1986, CNCM 1-1987 y LMG P-18997.

15 Estas cepas se han escogido entre las bacteria lácticas por su capacidad de adherirse a la película dental, su temperatura óptima de crecimiento es de unos 37°C, que es la temperatura de la cavidad oral. Además son capaces de fermentar glucosa y sacarosa y no sintetizan glucanos, que son los factores patógenos de las cepas cariogénicas.

20 Se considera la modificación genética de las bacterias lácticas para que se adhieran a la película dental mediante factores de adhesión. Para las bacterias lácticas que ya se adhieren a la película dental esta modificación pretende incrementar la adhesión de las cepas a los dientes. Del mismo modo, cualquier bacteria acidoláctica no adherente (no los lactobacilos) puede modificarse genéticamente para que se adhiera a la película dental.

25 Esta modificación de las bacterias lácticas se puede conseguir insertando los genes X17390, X14490 o X53657 (números de acceso al banco de genes), por ejemplo. En el *S. mutans* estos genes son responsables de la expresión del antígeno I/II que media en la adhesión a las glicoproteínas salivales.

30 También es posible modificar genéticamente bacterias lácticas para que sean poco acidificantes. Para las bacterias lácticas que ya son poco acidificantes esta modificación pretende incrementar dicho efecto disminuyendo su producción de ácido láctico.

35 Esta modificación se puede lograr de muchas maneras y preferiblemente de acuerdo con uno de los protocolos descritos en los siguientes documentos: Boumerdassi y otros, *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 2293-2299, 1997; Platteeuw y otros, *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 3967-3971, 1995; Ito y otros, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 58, 1569-1573, 1994.

40 Según la presente invención, al menos una de las bacterias lácticas de las cepas anteriores, modificada genéticamente o no, se usa en "cantidad efectiva" para preparar composiciones destinadas a la profilaxis o al tratamiento de la caries dental, de la placa dental y de la infección periodontal en humanos o animales tales como mascotas. Esta cantidad está comprendida preferiblemente entre 10⁴ y 10⁹ ufc/g.

45 También es posible emplear al menos una bacteria láctica de las cepas anteriores en combinación con derivados lácteos tales como leche o leche fermentada o con derivados lácteos escogidos entre cualquier forma de caseíno-glicomacropéptido, caseína micelar, caseína micelar fluorada, leche cuajada o bacteriocina, por ejemplo.

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS CEPAS SELECCIONADAS

Modelos de fermentación: se experimentaron 49 azúcares simples con la tira de ensayo api 50 CH bioMerieux (bioMérieux SA, 69280 Marcy-l'Etoile, Francia) y los resultados figuran en la tabla 1.

50 Curvas de acidificación: las curvas de acidificación se determinaron a 37°C en las condiciones siguientes:

- *S. sobrinus* OMZ 176: FUM sacarosa 1% y FUM glucosa 1%
- *S. thermophilus*, CNCM 1-1985: Belliker sacarosa 1% y Belliker glucosa 1%; la inoculación fue siempre al 5%; el pH se registró cada 20 min.

55 El *S. thermophilus* CNCM 1-1985 de la fermentación de sacarosa rebaja el pH a 4,5 y el *S. sobrinus* OMZ 176 a 4.

Tabla 1: Fermentación de azúcares con *L. lactis* CNCM 1-1987, *L. lactis* CNCM I-1986, *S. thermophilus* CNCM I-1984, *S. thermophilus* CNCM I-1985 y *S. thermophilus* LMG P-18997.

Azúcar	<i>L. lactis</i> CNCM 1-1987	<i>L. lactis</i> CNCM I-1986	<i>S. th.</i> CNCM I- 1984	<i>S. th.</i> CNCM I- 1985	<i>S. th.</i> LMG P- 18997
Adonitol	+++				
Esculina	++	++++			
Amigdalina	+++				
D-Arabinosa					

L-Arabinosa					
D-Arabitól					
L-Arabitól	+++				

(continuación)

Azúcar	L. lactis CNCM 1-1987	L. lactis CNCM I-1986	S. th. CNCM I- 1984	S. th. CNCM I- 1985	S. th. LMG P- 18997
Arbutina	+++	+++			
Celobiosa	+++	++++			
Dulcitol					
Eritritol					
D-Fructosa	+	++++			
D-Fucosa					
L-Fucosa					
Galactosa	++	++++			
β-Gentiobiosa		+++			
Gluconato					
2-ceto-Gluconato					
5-ceto-Gluconato					
GlcNAc	+	++++			
D-Glucosa	+	++++	+	++	++
Glicerina					
Glucógeno					
Inositol					
Inulina					
Lactosa	+	++++	+++	++++	++++
D-Lixosa					
Maltosa	++				
Manitol	+++	++			
D-Manosa	+	++++			
Melezitosa					
Melibiosa					
α-Metil-D-glucósido					
α-Metil-D-manósido					
D-Rafinosa					
Ramnosa					
Ribosa	++	++			
Salicina	+++	+++			
Sorbitol					
L-Sorbosa					
Almidón					
Sacarosa			+++	++++	+++
D-Tagatosa					
Trehalosa	++				
D-Turanosa	++				
Xilitol	+++				
D-Xylosa					
L-Xylosa					
β-metil-xilósido					

+, ++, +++, +++++ indican si la fermentación empieza al cabo de 3, 6, 24 o 48 horas.

5 El segundo objeto de la presente invención se refiere a una composición para la salud bucal que comprende una bacteria láctica ajena a la microflora residente de la boca que es poco acidificante y capaz de adherirse directamente a la película dental.

10 Estas composiciones están diseñadas concretamente para la profilaxis o el tratamiento de la caries dental, de la placa dental y de la infección periodontal.

Dicha cepa de bacterias lácticas se escoge del grupo formado por *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis biovar diacetylactis* y preferiblemente del grupo formado por las cepas CNCM 1-1984, CNCM I-1985, LMG P-18997, CNCM 1-1986 y CNCM I-1987.

15 Dichas cepas de bacterias lácticas se pueden incluir en una comida, en un pienso, en una composición cosmética o farmacéutica, por ejemplo.

Por tanto estas composiciones son preferentemente pastas dentífricas, colutorios, chicles, espráis, bebidas, dulces, fórmulas infantiles, helados, postres congelados, aderezos dulces para ensaladas, preparados lácteos, quesos, requesón, yogur, cuajada, crema de café o nata batida, por ejemplo.

5 En estas composiciones las cepas de bacterias lácticas se pueden incluir solas o en combinación con derivados lácteos, por ejemplo, a fin de obtener preparados sinérgicos. Así pues, estas composiciones para la salud bucal comprenden:

- una bacteria láctica ajena a la flora residente de la boca que es capaz de adherirse directamente a la película dental;
- 10 - cualquier forma de glicopéptidos lácticos, leche cuajada o bacteriocina.

Los glicopéptidos lácticos son preferiblemente caseíno-glicomacropéptidos (CGMP), caseína micelar fluorada o no fluorada (que puede obtenerse del modo descrito en las patentes EP 0 604 802 y EP 0 748 591) o también puede añadirse leche cuajada. Los caseíno-glicomacropéptidos se agregan preferiblemente en una cantidad mínima de un 0,1%. También se ha demostrado que los caseíno-glicomacropéptidos no impiden que dichas bacterias lácticas se adhieran a la película dental (fig. 2 y 3).

También se pueden preparar composiciones sinérgicas añadiendo al menos una bacteriocina que sea activa contra bacterias orales grampositivas. En este caso las composiciones de higiene oral pueden llevar 0,00001 hasta 50% y preferiblemente de 0,00001 hasta 15% de bacteriocina respecto al peso de la composición. La bacteriocina es preferentemente variacina (patente EP 0 759 469).

Para proteger la composición contra la degradación también puede incluirse un antioxidante liposoluble. Entre los antioxidantes adecuados cabe citar los "tocoferoles", butil-hidroxianisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT) y palmitato de ascorbilo. La cantidad de antioxidante liposoluble es de 0,005% hasta 0,5%, preferiblemente de 0,005% hasta 0,01% en peso de la composición.

Como abrasivos adecuados para usar en composiciones dentífricas de la presente invención cabe citar carbonato cálcico, aluminosilicato cálcico, alúmina, hidratos de alúmina, ortofosfato de cinc, partículas plásticas y sílice, entre los cuales la sílice es el abrasivo preferido.

Las composiciones pueden tener un pH oralmente aceptable que no afecte a la actividad de dichas bacterias lácticas. El pH puede estar en el intervalo 3,0-9,5, preferiblemente entre 3,5 y 6,5.

35 Las composiciones pueden prepararse por procesos convencionales que comprenden la mezcla de los ingredientes juntos en las proporciones apropiadas y por último ajustar el pH al valor deseado.

Un método para seleccionar bacterias lácticas capaces de adherirse a los dientes puede comprender las etapas de:

- 40 (1) preparar anticuerpos monoclonales que reconozcan proteínas superficiales específicas de una cepa de bacterias lácticas capaces de adherirse a los dientes, y
- (2) detectar cualquier cepa de bacteria láctica mediante el uso del anticuerpo monoclonal de la cepa capaz de adherirse a los dientes.

45 Dichos anticuerpos monoclonales se usarían como herramienta para detectar dicha cepa de bacterias lácticas entre otras cepas que crecen cerca.

El alcance de la presente invención no debe limitarse a las formas de ejecución específicas aquí descritas. De hecho hay varias modificaciones de la presente invención, aparte de las descritas aquí, que resultarán evidentes para los especialistas en la materia, a partir de la descripción precedente y de las figuras adjuntas. Se pretende que tales modificaciones caigan dentro del ámbito de las reivindicaciones. Aquí se citan varias publicaciones, cuyas revelaciones se incorporan como referencia en su integridad, en la medida necesaria para entender la presente invención. La manipulación de ADN, la clonación y transformación de células bacterianas se llevan a cabo, si no se indica otra cosa, conforme al manual de Sambrook y otros (Sambrook y otros, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.A., 1989). Estos ejemplos van precedidos por una breve descripción de los plásmidos, cepas y diversos medios utilizados, así como del método para producir un anticuerpo monoclonal.

Las cepas *S. thermophilus* S118 (NCC 1529), S123 (NCC 1561), *L. lactis subsp. lactis* 29 (NCC 2211), *L. lactis subsp. lactis biovar dioacetylactis* 69 (NCC 2225) fueron depositadas según el tratado de Budapest en la *Collection Nationale de Culture de Microorganismes* (CNCM 1-1984, CNCM 1-1985, CNCM 1-1986 y CNCM 1-1987 respectivamente), 25 rue du docteur Roux, 75724 Paris, Francia, el 3 de marzo de 1998. La cepa *S. thermophilus* BF11116 (CNBL1177) fue depositada según el tratado de Budapest en las *Belgian Coordinated Collections of Microorganisms* LMG P-18997, K.L. Ledeganckstraat 35, B-9000 Gante, Bélgica, el 5 de julio de 1999. Todas las restricciones a la disponibilidad de estos depósitos serán levantadas al publicarse por primera vez esta solicitud de patente u otra que reivindique el beneficio de la prioridad de esta solicitud.

Figuras

- Las figuras 1a, 1b y 1c representan respectivamente las curvas de saturación de adherencia para *S. sobrinus* OMZ 176, *L. lactis* (NCC2211 y *S. thermophilus* NCC1561).
- 5 - La figura 2 muestra las curvas obtenidas para las tres cepas al representar el número de células fijadas frente a cantidades crecientes de CGMP.
- La figura 3 muestra las curvas obtenidas para las tres cepas al representar el número de células fijadas frente a cantidades crecientes de As-CGMP.

10 **Ejemplo 1: CEPAS Y CONDICIONES DE CULTIVO**

Se ensayaron más de 100 cepas (pertenecientes a la colección de cultivos Nestle) para comprobar su capacidad de fijarse a perlas de hidroxiapatito recubiertas de saliva, y en particular las 23 cepas siguientes: *S. thermophilus* YS4 (NCC 2284), *S. thermophilus* Sfi6 (NCC 1971), *S. thermophilus* Sfi13 (NCC 2008), *S. thermophilus* Sfi21 (NCC 2038), *S. thermophilus* Sfi39 (NCC 2130), *S. thermophilus* Sfi42 (NCC 2145), *S. thermophilus* Sfi47 (NCC 2172), *S. thermophilus* S118 (NCC 1529), *S. thermophilus* S119 (NCC 1536), *S. thermophilus* S122 (NCC 1554), *S. thermophilus* S123 (NCC 1561), *S. thermophilus* S126 (NCC 1587), *L. lactis subsp. cremoris* 15 (NCC 92), *L. lactis subsp. cremoris* 25 (NCC 1932), *L. lactis subsp. cremoris* 136 (NCC 2419), *L. lactis subsp. diacetyllactis* 8 (NCC 1970), *L. lactis subsp. diacetyllactis* 28 (NCC 2057), *L. lactis subsp. diacetyllactis* 69 (NCC 2225), *L. lactis subsp. diacetyllactis* 80 (NCC 2272), *L. lactis subsp. lactis* 29 (NCC 2211), *L. lactis subsp. lactis* 50 (NCC 2224), *L. lactis subsp. lactis* 54 (NCC 2228), *S. macedonicus* 216 (NCC 2484).

Las 5 cepas orales *S. sobrinus* OMZ 176, *S. oralis* OMZ 607, *A. naeslundii* OMZ 745, *V. dispar* OMZ 493 y *F. nucleatum* OMZ 596 se obtuvieron de los Institute für Orale Mikrobiologie und Allgemeine Immunologie [*Institutos de microbiología oral e inmunología general*] de la universidad de Zürich y se cultivaron anaeróticamente en medio FUM (GasPackSystem, BBL) a 37°C.

Todas las cepas se conservaron en glicerina a -20°C y se precultivaron durante 14 horas antes de usarlas a su temperatura óptima específica; el *S. sobrinus* OMZ 176 creció en medio FUM (Gmür y otros), los lactococos y estreptococos en M17 (Difco), excepto los *S. thermophilus* NCC 1529, S119, S122, NCC 1561 y S126 que crecieron en medio Belliker (preparado por disolución en 1 l de agua de 20 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 2,5 g de gelatina, 5 g de dextrosa, 5 g de sacarosa, 5 g de lactosa, 4 g de NaCl, 0,5 g de ácido ascórbico, 10 g de extracto de buey).

Para el recuento de placa: el *S. sobrinus* OMZ 176 se cultivó en agar Mitis-Salivarius (Difco), los *S. thermophilus* NCC1529, S119, S122, NCC1561, BF11116 y S126 en agar Belliker (preparado por adición de 15 g de agar Bacto, Difco, al líquido Belliker) y las demás cepas de bacterias lácticas en agar M17 (Oxoid).

40 **Ejemplo 2: PRODUCCIÓN DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL**

Se emplearía un anticuerpo monoclonal como herramienta para detectar la *L. lactis subsp. lactis* NCC2211 entre 5 cepas orales creciendo juntas sobre discos S-HA y formando un biofilm simulador de la placa dental. Por tanto se ensayó el anticuerpo monoclonal contra estas cepas, para comprobar que no hubiera ninguna reacción cruzada.

45 Para ello el anticuerpo monoclonal se produce del modo descrito por Granato y otros "Un anticuerpo IgE monoclonal de ratón anti-lactoglobulina de leche bovina permite el estudio de la alergia en el tracto gastrointestinal, *Clin. Exp. Immunol.*, 63, 703-710, 1986.

50 **Ejemplo 3: SELECCIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS ADHERENTES**

Fijación a perlas de hidroxiapatito recubiertas de saliva (S-HA)

Para seleccionar entre las cepas de bacterias lácticas las que fueran capaces de fijarse a perlas de hidroxiapatito recubiertas de saliva (S-HA) se empleó el procedimiento previamente descrito por Neeser y otros (1994) con ligeras modificaciones: las perlas se lavaron con volúmenes de 150 µl y el hidróxido de hiamina se sustituyó por hidróxido de bencetonio (Sigma).

Resumiendo, todas las cepas se cultivaron hasta el final de la fase logarítmica en FUM, excepto los *S. thermophilus* NCC 1529, S119, S122, NCC1561 y S126 que se cultivaron en Belliker. El *S. sobrinus* OMZ 176, el *L. lactis subsp. lactis* NCC2211, 50 y 54, y los *S. thermophilus* NCC1529, S119, S122, NCC1561 y S126 crecieron a 37°C, y los estreptococos restantes a 42°C.

Se recubrieron 5 mg de perlas de hidroxiapatito (BDH Chemicals Ltd, Poole, England) con 70 µl de saliva clarificada obtenida de voluntarios en el laboratorio y se prepararon del modo explicado anteriormente (Neeser y otros, 1994). Las perlas recubiertas de saliva se guardaron por la noche a 4°C, luego se lavaron (primero con agua destilada y después con tampón HEPES) y al final se inocularon con 100 µl de la suspensión bacteriana marcada

metabólicamente (las bacterias habían sido cultivadas en su medio, suplementado con 10 $\mu\text{Ci/ml}$ de ácido acético C^{14}). La adhesión tuvo lugar durante 45 minutos a 37°C, luego se eliminaron por lavado las bacterias no fijadas y las células fijadas se contaron directamente en un contador de centelleo LKB (tipo 1219 Rackbeta).

- 5 Los porcentajes de adhesión se expresan como la radiactividad unida a las perlas, referida a la radiactividad total añadida a cada pocillo. Todas las mediciones se efectuaron por triplicado. En la tabla 2 figuran los porcentajes de adhesión a las perlas de hidroxiapatito recubiertas de saliva obtenidos para varias cepas analizadas y para la *S. sobrinus* OMZ 176 (como cepa de referencia).

- 10 **Tabla 2:** porcentajes de adhesión a perlas de hidroxiapatito recubiertas de saliva, obtenidos para varias cepas analizadas.

CEPA	% DE ADHESIÓN (\pm DE)
<i>S. sobrinus</i> OMZ 176	2,23 \pm 0,49
<i>S. thermophilus</i> Sfi42 (NCC 2145)	0,08 \pm 0,02
<i>S. thermophilus</i> Sfi47 (NCC 2172)	0,14 \pm 0,04
<i>S. thermophilus</i> NCC1529	2,89 \pm 0,60
<i>S. thermophilus</i> S119 (NCC 1536)	0,15 \pm 0,04
<i>S. thermophilus</i> S122 (NCC 1554)	0,93 \pm 0,17
<i>S. thermophilus</i> NCC1561	2,19 \pm 0,50
<i>S. thermophilus</i> S126 (NCC 1587)	1,19 \pm 0,56
<i>L. lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i> 28 (NCC 2057)	1,59 \pm 0,17
<i>L. lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i> NCC2225	1,96 \pm 0,40
<i>L. lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i> 80 (NCC 2272)	1,20 \pm 0,35
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCC2211	2,85 \pm 0,85

- 15 Las cuatro cepas *S. thermophilus* NCC1529 (CNCM I-1984), *S. thermophilus* NCC1561 (CNCM I-1985), *L. lactis* subsp. *lactis* NCC2211 (CNCM I-1986) (en lo sucesivo *L. lactis* NCC2211) y *L. lactis* subsp. *diacetylactis* NCC2225 (CNCM I-1987) mostraron valores próximos a la *S. sobrinus* OMZ 176.

- 20 Las cepas *L. lactis* NCC2211 y *S. thermophilus* NCC1561 se escogieron como las más prometedoras porque crecen bien a 37°C, que es la temperatura en la boca, mientras que la *L. diacetylactis* NCC2225 tiene un crecimiento óptimo a 30°C. La *L. lactis* NCC2211, en particular, no puede crecer en sacarosa, pero es capaz de fermentar una amplia variedad de azúcares. Además otras cepas orales pueden proporcionar glucosa mediante su invertasa.

Curvas de saturación de adherencia

- 25 Se determinaron curvas de UFC fijadas frente a UFC inoculadas en el pocillo, para comprobar si se podían saturar las perlas. El 50% de saturación se sacó directamente del punto de flexión de las curvas obtenidas. Se determinaron las curvas de saturación de adherencia para *S. sobrinus* OMZ 176, *L. lactis* NCC2211 y *S. thermophilus* NCC 1561. Se muestran en la figura 1.

- 30 El número de UFC de las tres cepas que debe inocularse en el pocillo para obtener el 50% de saturación de las perlas y el número correspondiente de UFC fijadas se dedujo directamente del punto de flexión de las curvas y se indica en la tabla 3.

Tabla 3: número de UFC a inocular en el pocillo para obtener el 50% de saturación de las perlas.

35

	ufc/pocillo	ufc fijadas	% de adhesión
<i>S. sobrinus</i> OMZ 176	4,00E+07	4,00E+06	10%
<i>L. lactis</i> NCC2211	1,00E+07	9,00E+05	9%
<i>S. thermophilus</i> NCC1561	3,00E+07	2,00E+06	7%

Ejemplo 4: EFECTO DE LOS CASEINOGLICOMACROPÉPTIDOS

- 40 Se estudió la influencia de los CGMP en la adhesión de *L. lactis* NCC2211 y *S. thermophilus* NCC 1561, a fin de verificar la posibilidad de usarlos para fomentar el predominio de una de estas dos cepas en las patogénicas (la *S. Sobrinus* OMZ 176, el caseino-glicopéptido (CGMP) y su derivado desialilado (As-CGMP) se obtuvieron de Nestec S. A., Lausanne (para su preparación véase Neeser y otros, 1994).

- 45 Se estudió el efecto dosis-respuesta de la adhesión a perlas de S-HA, inoculando en el pocillo 100 μl de suspensión bacteriana (UFC/ml correspondiente al 50% de saturación de perlas previamente calculado) que contenía distintas concentraciones de CGMP o As-CGMP y realizando luego el ensayo de adhesión del modo habitual. Se ensayaron concentraciones en el intervalo de 0,05-3 mg/ml. No se efectuó ninguna incubación previa de las bacterias en presencia de CGMP o As-CGMP.

En la figura 2 se muestran las curvas obtenidas para las tres cepas al representar el número de células fijadas frente a cantidades crecientes de CGMP, siendo el número de células inoculadas el correspondiente al 50% de saturación de perlas previamente calculado para cada cepa. La fuerte inhibición observada en el caso del *S. sobrinus* OMZ 176 confirma los resultados previos obtenidos por Neeser y otros (1994) y por Schüpbach y otros (*J. Dent. Res.*, 75, 1779-1788, 1996).

Tal como muestra la figura 2, 0,25 mg/ml produjeron el 50% de inhibición de la adhesión del *S. sobrinus* OMZ 176, mientras que para conseguir el mismo efecto con *S. thermophilus* NCC1561 se necesitaron más de 2 mg/ml. El CGMP intensifica ligeramente la adhesión del *L. lactis* NCC2211.

Como en el caso del CGMP el derivado desialilado inhibe la adhesión del *S. sobrinus* OMZ 176; solo se necesitan 0,05 mg/ml para disminuir el porcentaje de adhesión en un 50%. El As-CGMP no afecta a la adhesión del *L. lactis* NCC2211, pero favorece ligeramente la del *S. thermophilus* NCC1561 (fig. 3).

Ejemplo 5: PASTA DENTÍFRICA

Se prepara pasta dentífrica añadiendo 10^5 ufc/ml de al menos una de las cepas de bacterias lácticas CNCM I-1984, CNCM I-1985, CNCM I-1986, CNCM I-1987 o LMG P-18997 en forma liofilizada a la siguiente mezcla:

Cloruro de cetilpiridinio	1,65%
Sorbitol (sol. al 70%)	33,0%
Glicerina	25,0%
Carboximetilcelulosa sódica	2,0%
Fluoruro sódico	0,25%
Sílice (RP 93)	25,3%
Sílice espesante (Sident 22)	8,1%
Sacarina sódica	0,5%
Poloxamer (Pluronic F 108)	3,2%

Esta pasta dentífrica está diseñada para la profilaxis o el tratamiento de la caries dental, de la placa dental y de la infección periodontal.

Ejemplo 6: HELADO

Se prepara una crema formada por 10,8% de grasas lácteas, 13,5% de sólidos lácteos (no grasos), 0,3% de Emulstab® SE30 y 0,3% de Emulstab® foam (Grindsted, DK), luego se pasteuriza a 105°C durante 20 s, se homogeniza a 75°C y a 300 bar, se enfría a 38°C y se inocula con precultivos en medio MRS tomados en la fase de crecimiento exponencial, a una concentración de 10^7 - 10^8 ufc/ml, de al menos una de las cepas de bacterias lácticas CNCM I-1984, CNCM I-1985, CNCM I-1986, CNCM I-1987 o LMG P-18997. Luego se fermenta la crema durante 10 horas a 38°C hasta un pH de aprox. 4,5. Al final de la fermentación se le agrega sacarosa y jarabe de glucosa. La composición de la crema se indica en la siguiente tabla 4.

Después se bate la mezcla, se enfría a 4°C y se almacena a 4°C, enfiada bruscamente a un grado de expansión del 95% en volumen.

Tabla 4

Ingredientes	Composición (kg)	Grasas (%)	Sólidos no grasos (%)	Sacarosa (%)	Contenido en sólidos (%)
Crema (35%)	30,83	10,79	1,54		12,33
Leche desnatada en polvo	12,45		11,95		11,95
Emulstab® SE30	0,41				0,37
Emulstab® foam	0,41				0,36
Agua	55,91				
Total: base de crema	100,00	10,79	13,49	-	25,01
Base de crema	74,14	8,00	10,00	-	18,54
Sacarosa	22,06			15,00	15,00
Jarabe de glucosa	3,80				3,00
Helado fermentado	100,00	8,00	10,00	15,00	36,54

Ejemplo 7: YOGUR

Se esterilizan 5 l de medio de cultivo MRS durante 15 minutos a 121°C y luego se inoculan con 5% en volumen de un cultivo activo de al menos una de las cepas *S. Thermophilus* CNCM I-1984, CNCM I-1985 o LMG P-18997, que contiene aproximadamente 10^9 ufc/ml. Después de incubar durante 8 h a 41°C se obtiene un iniciador que contiene

4,5·10⁸ ufc/ml.

5 Se esterilizan durante 15 minutos a 121°C 5 l de leche descremada reconstituida, cuyo contenido de materia seca es del 10% y a la cual se ha añadido un 0,1% de extracto de levadura, y luego se inocula con 2% de un cultivo activo de *Streptococcus thermophilus* espesante comercial que contiene aproximadamente 10⁹ células/ml. Después de incubar durante 4 h a 41°C se obtiene un iniciador que contiene 4,5·10⁸ células/ml.

10 Un lote de leche entera que contiene 3,7% de grasas, reforzado con 2,5% de leche descremada en polvo y luego pasteurizada durante 30 minutos a 90°C, se inocula con 2% en volumen del iniciador de al menos una de las cepas CNCM 1-1984, CNCM I-1985 o LMG P-18997 y 3% en volumen del iniciador de *Streptococcus thermophilus* espesante. Luego la leche inoculada se agita, se vierte en botes y se incuba durante 4 h a 41°C.

El yogur obtenido tiene una textura bien firme y suave y está pensado para la salud bucal.

15 **Ejemplo 8: GOMA DE MASCAR**

20 Una goma de mascar para prevenir o tratar la caries dental, la placa dental o la infección periodontal se puede preparar añadiendo un cultivo activo de al menos una de las cepas de *S.Thermophilus* CNCM 1-1984, CNCM 1-1985 o LMG P-18997, de manera que contenga aproximadamente de 10⁴ a 10⁹ ufc/g, a los siguientes ingredientes usuales:

Xilitol	67,5%
Base de goma	20%
Carbonato cálcico	5%
Glicerina	3%
Pluronic F 127	2%
Goma celulosa	1%
Cargas	0,5%
Aroma	1%

Ejemplo 9: COMPOSICIÓN ALIMENTICIA PARA MASCOTAS

25 Se obtiene una comida de mascotas saludable para la boca, preparando una mezcla alimenticia compuesta de maíz, gluten de maíz, harina de pollo y de pescado, sales, vitaminas y minerales. La mezcla se introduce en un preacondicionador y se humecta. La mezcla humectada que sale del preacondicionador se introduce en una extrusora de cocción y se gelatiniza. A la salida de la extrusora la matriz gelatinizada se impulsa a través de una boquilla y se extruye. El producto extruido se corta en trozos adecuados para alimentar perros, se seca a unos
30 110°C durante 20 minutos y se enfría, formando un granulado que tiene una actividad acuosa de aproximadamente 0,6.

35 Los gránulos se pulverizan con 3 mezclas de recubrimiento. Cada mezcla de recubrimiento contiene un cultivo activo de al menos una cepa *S.Thermophilus* CNCM I-1984, CNCM 1-1985 o LMG P-18997, pero, como sustrato de recubrimiento, en una de las mezclas se emplea grasa de soja hidrogenada, en otra agua y en otra digesto proteico. El granulado contiene aproximadamente 10⁴ a 10⁹ ufc/g de dichas cepas.

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Uso de bacterias lácticas ajenas a la microflora residente de la boca, que son poco acidificantes y capaces de adherirse directamente a la película dental, para preparar una composición destinada a la profilaxis o al tratamiento de la caries dental, de la placa dental y de la infección periodontal, donde al menos una bacteria láctica está elegida del grupo formado por las cepas CNCM I-1984, CNCM I-1985, CNCM I-1986, CNCM I-1987 y LMG P-18997.
- 10 **2.** Uso según la reivindicación 1, en que la composición está diseñada para desplazar patógenos de los dientes o para impedir su adherencia.
- 3.** Uso según la reivindicación 1 o 2, en que la bacteria láctica es menos acidificante que las cepas patógenas y contribuye a establecer un pH de aproximadamente 5,5-7 en la cavidad oral.
- 15 **4.** Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en que la bacteria láctica es de origen lácteo.
- 5.** Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en que al menos una bacteria láctica está escogida del grupo formado por *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*.
- 20 **6.** Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en que la bacteria láctica se adhiere a la película dental mediante factores de adhesión.
- 7.** Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en que la bacteria láctica ha sido modificada genéticamente para aumentar su adherencia a la película dental y/o para ser menos acidificante.
- 25 **8.** Uso según la reivindicación 7, en que la bacteria láctica ha sido modificada genéticamente para adherirse a la película dental mediante factores de adhesión y para contribuir a establecer un pH de aproximadamente 5,5-7 en la cavidad oral.
- 30 **9.** Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en que la composición es comestible y contiene una cantidad efectiva de bacterias lácticas para la profilaxis o el tratamiento de la caries dental, de la placa dental y de la infección periodontal.
- 35 **10.** Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en que la composición contiene al menos 10^4 - 10^9 ufc/g de bacterias lácticas.
- 11.** Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en que la bacteria láctica está combinada con leche, leche fermentada, derivados lácteos o bacteriocina.
- 40 **12.** Uso según la reivindicación 11, en que los derivados lácteos están elegidos entre cualquier forma de caseínoglicomacropéptido, caseína micelar, caseína micelar fluorada o leche cuajada.
- 45 **13.** Composición para la salud bucal que comprende bacterias lácticas ajenas a la microflora residente de la boca, que son poco acidificantes y capaces de adherirse directamente a la película dental; en la cual al menos una cepa de bacterias lácticas está seleccionada del grupo formado por las cepas CNCM I-1984, CNCM I-1985, CNCM I-1986, CNCM I-1987 and LMG P-18997.

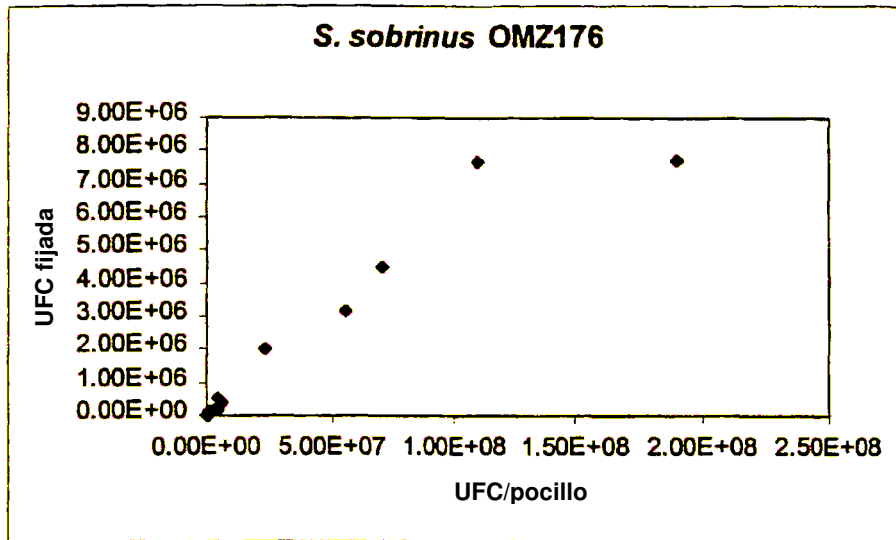


Figura 1a

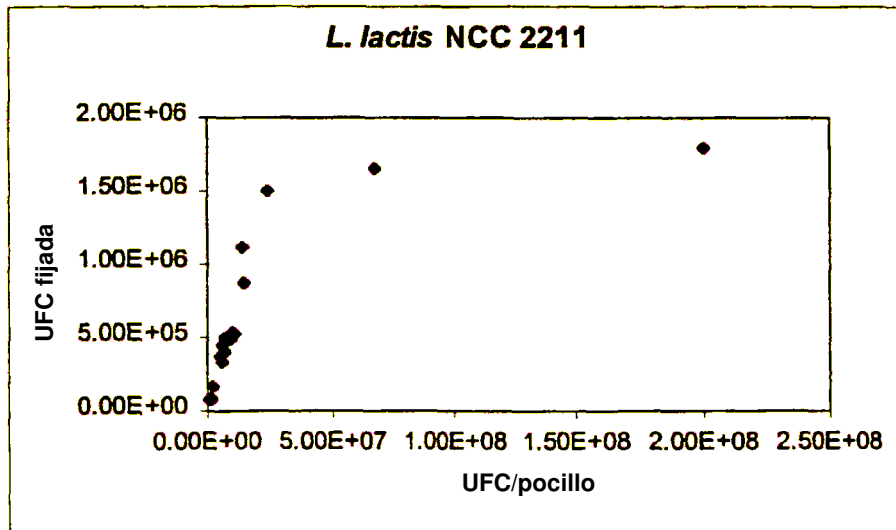


Figura 1b

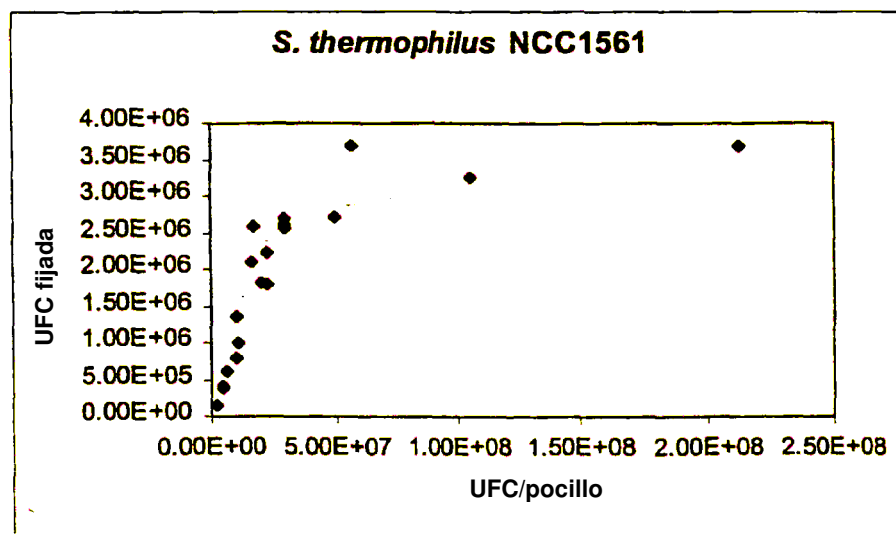


Figura 1c

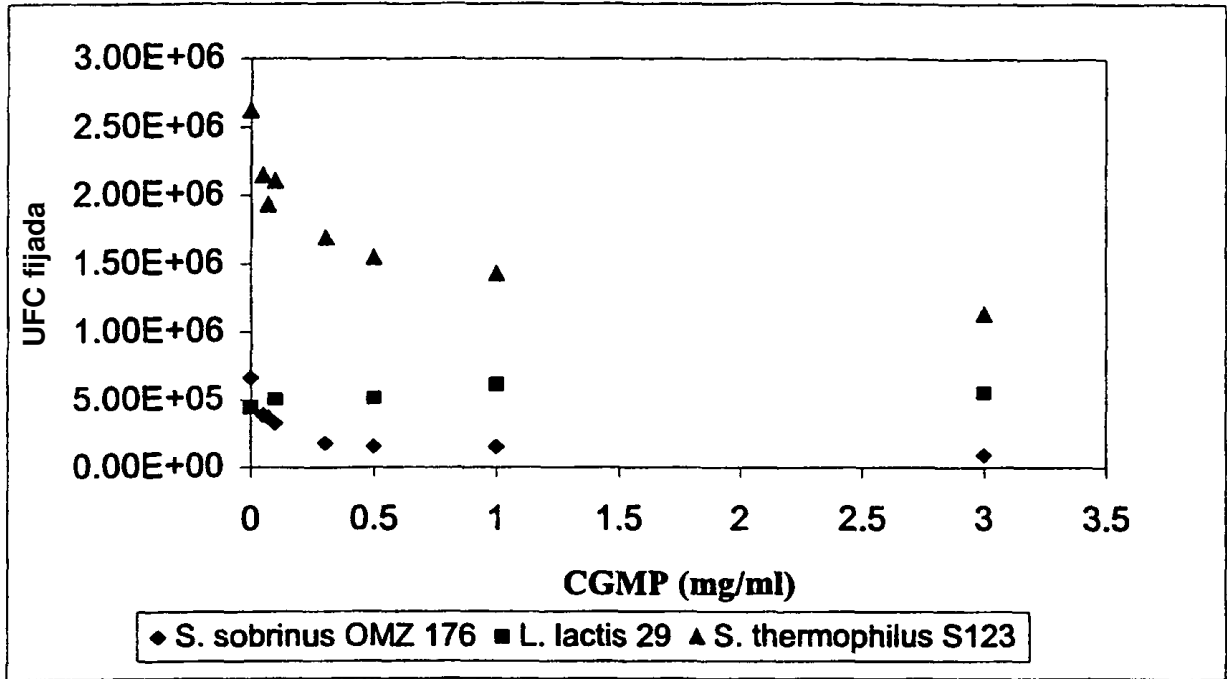


Figura 2. Efecto del CGMP en la adhesión de *S. sobrinus* OMZ 176, *L. lactis* 29 (NCC2211) y *S. thermophilus* S 123 (NCC1561) a perlas de S-HA.

5

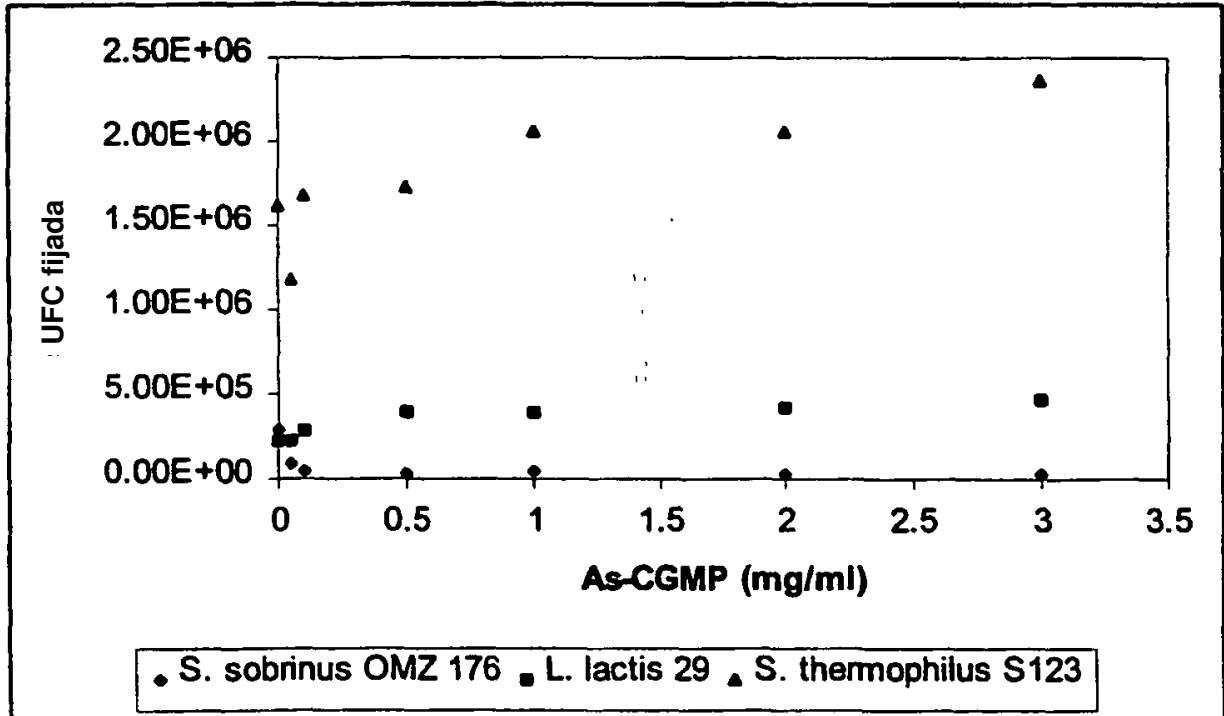


Figura 3. Efecto del As-CGMP en la adhesión de *S. sobrinus* OMZ 176, *L. lactis* 29 (NCC2211) y *S. thermophilus* S 123 (NCC1561) a perlas de S-HA.

10