

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 417 132**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/20** (2006.01)

**A61K 35/74** (2006.01)

**A23L 1/03** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2007 E 07866245 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2013 EP 2094830**

54 Título: **Usos y métodos para prevenir y/o tratar caries causadas por mutans Streptococci**

30 Prioridad:

**19.12.2006 EP 06026301**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**06.08.2013**

73 Titular/es:

**BASF SE (100.0%)  
67056 Ludwigshafen , DT**

72 Inventor/es:

**REINDL, ANDREAS;  
LANG, CHRISTINE;  
BÖTTNER, MEWES y  
VEEN, MARKUS**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 417 132 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

Usos y métodos para prevenir y/o tratar caries causadas por mutans Streptococci.

5 La presente invención se relaciona con el uso de un microorganismo que pertenece al género *Lactobacillus* o un derivado o derivado del mismo (como se define más adelante), caracterizado porque es capaz de unirse específicamente a una bacteria que pertenece al grupo de mutans Streptococci en donde las uniones específicas son (i) resistentes al tratamiento por calor, en donde dicho tratamiento por calor se lleva a cabo a una temperatura de más de 95°C durante al menos 20 minutos; y (ii) resistente al tratamiento con proteasa, en donde dicho tratamiento con proteasa es tratamiento con una proteasa seleccionada del grupo consistente de pronasa E, proteinasa K, tripsina y quimiotripsina; y (iii) dependiente del calcio; y (iv) formada en un rango de pH entre 4.5 y 8.5; y (v) formada en presencia de saliva, para la preparación de una composición anticaries para el tratamiento o prevención de caries causadas por *Streptococcus sobrinus*.

Preferiblemente, la unión específica puede ser probada como sigue:

- (a) hacer crecer dicho microorganismo a la fase estacionaria;
- 15 (b) mezclar dicho microorganismo con una bacteria que pertenece al grupo mutans Streptococci el cual ha sido cultivado a la fase estacionaria;
- (c) incubar la mezcla obtenida en la etapa (b) bajo condiciones que permiten la formación de agregados de dicho microorganismo y una bacteria de mutans Streptococci; y
- (d) detectar agregados por la presencia de una pella.

20 Otro aspecto en relación con la presente invención es un método de profilaxis o tratamiento de caries causadas por mutans Streptococci diferentes a *Streptococcus mutans*, que comprende administrar un microorganismo que pertenece al grupo de bacterias del ácido láctico caracterizado porque dicho microorganismo es capaz de unirse específicamente a una bacteria que pertenece al grupo de mutans Streptococci o un mutante, derivado o fragmento de dicho microorganismo.

25 Los mutans Streptococci colonizan el anfitrión después de la primera aparición de los dientes (Carlson et al., *Caries Res.* 9 (1975), 333-339. Se localizan en las superficies de los dientes, y su abundancia en la placa es más alta durante las lesiones iniciales (Duchin and van Houte *Arch. Biol. Biol.* 23 (1978) 779-786). Su nivel de colonización dentro de la placa se incrementa con el consumo de sacarosa (Staat et al., *J. Dent. Res.* 54 (1975) 872-880). Son capaces de sintetizar ciertas macromoléculas a partir de sacarosa que favorecen su unión a los dientes (Tanzer et al., *Infect. Immun.* 10 (1974) 197-203). Los mutans Streptococci son productores rápidos de ácido a partir de carbohidratos simples, incluyendo sacarosa, y son tolerantes a un pH bajo (Edwardsson, *Arch. Biol.* 13 (1968) 637-646). Adicionalmente, esencialmente siempre se recuperan por cultivo en sitios de lesiones de caries iniciales y establecidas (Littleton et al., *Arch. Oral. Biol.* 15 (1979) 461-463). El interés en los mismos aumentó después de la demostración de su alta inducción potente y progresión de las lesiones de las caries en una variedad de animales experimentales, incluyendo gnotobiotos mono-infectados. Su expresión de virulencia está asociada fuertemente con el consumo de carbohidratos, especialmente sacarosa.

35 El papel de las especies bacterianas adicionales que están relacionadas con el desarrollo de la caries como las bacterias del ácido láctico o los actinomicetos no es concluyente. Estas bacterias se encuentran frecuentemente en lesiones carióticas, pero solamente en asociación con mutans Streptococci. De acuerdo con el presente conocimiento la presencia de mutans Streptococci es una condición indispensable de la cariogénesis (Tanzer et al., *J. Dent. Educ.* 65 (2001) 1028-1037). El grupo de mutans Streptococci ha sido definido por comprender al menos *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. cricetus*, *S. ratti*, *S. ferus* y *S. macacae* (Loesche et al., *Microbio. Rev.* 50 (4) (1986) 353-380). Debido al hecho de que el *Streptococcus mutans* es el representante más abundante de los mutans Streptococci en los humanos, la mayor parte de la investigación microbiológica sobre caries así como las medidas anticaries se concentran en esta especie específica.

45 La unión inicial del *S. mutans* a la superficie de los dientes ocurre a través de dos mecanismos. El primer mecanismo es el enlazamiento de *S. mutans* a través del antígeno de estreptococo I/II (SA I/II) - una proteína de superficie también conocida por los sinónimos B, IF, P1, SR, MSL-1 o PAC - a la película, una capa de proteínas de saliva en la superficie de los dientes. Los anticuerpos contra esta proteína han mostrado evitar la adhesión del *S. mutans* in vitro.

50 De acuerdo con lo anterior, el antígeno de estreptococo I/II (SA I/II) es un objetivo de vacunación. En diferentes combinaciones recombinantes - el antígeno completo, la región de unión en la saliva, la proteína acoplada a la toxina del cólera o expresada sobre la superficie de una cepa avirulenta de *Salmonella* - se ha demostrado una inmunización exitosa de animales. Esto da como resultado altos títulos de IgA y la reducción de la colonización de *S. mutans* (Huang et al., *Infect. Immun.* 69 (2001), 2154-2161). Se han alcanzado resultados comparables utilizando una codificación de vacuna de ADN para SA I/II (Fan et al., *J. Dent Res* 81 (2002), 784 - 787). Se ha logrado

inmunidad pasiva por expresión recombinante de anticuerpos anti-SA I/II sobre las superficies de las bacterias del ácido láctico. Estos lactobacilos se agregan al *S. mutans* y la administración de la bacterias a ratas lleva a la reducción del desarrollo de caries (Krueger et al, Nature Biotechnology 20 (2002), 702 - 706).

5 La WO 06/027265 provee bacterias del ácido láctico capaces de unirse a *S. mutans* con el objetivo de suprimir la adhesión a los dientes.

El asociado de unión más importante del antígeno de estreptococo es la aglutinina salivar, una proteína similar a la glicoproteína de los pulmones gp-340 de la superfamilia rica en cisteína del receptor devorador (Prakobphol et al., J. Biol. Chem. 275 (2000) 39860-39866).

10 El papel de la aglutinina en la cariogénesis no está entendido del todo hasta ahora. Puede llevar a la adhesión de *S. mutans* cuando está presente unido a las superficies, y puede llevar a una agregación de *S. mutans* cuando está presente en un estado soluble. Este último puede dar como resultado una eliminación del *S. mutans* agregado desde la boca mediante el flujo de saliva. Una alta concentración de aglutinina en la saliva lleva in vitro a un incremento en la adhesión de *S. mutans*, mientras que in 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).

15 Los anticuerpos monoclonales contra la aglutinina bloquean completamente la unión del *S. mutans* a la hidroxiapatita cubierta con saliva in vitro y previene la agregación dependiente de la 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 mostraron que la adhesión en superficie y la agregación pueden ser inhibidas independientemente por anticuerpos diferentes. Esto indica que diferentes epítomos de la aglutinina son responsables de estos dos efectos.

20 Otras proteínas de la saliva frecuentemente relacionadas con el desarrollo de la caries son las proteínas ricas en prolina (PRP). Sin embargo, el papel de estas proteínas en la adhesión de bacterias cariogénicas es discutido con controversia. Estas proteínas son codificadas por dos loci del gen (PRH-1 y PRH-2) y se presentan en diferentes variantes que difieren en solamente unos pocos aminoácidos (PRP-1, PRP-2, PIF. Db-banda doble). Estas variantes pueden ser escindidas proteolíticamente, dando como resultado los así llamados PRP pequeños (PRP-3, PRP-4. PIF-f y Db-f). Los PRP median una fuerte unión de comensales tales como Actinomicetos naeslundii o streptococci no mutans. De manera interesante, esta unión tiene lugar solamente después de la adhesión de la proteína a la superficie del diente, dando como resultado un desplazamiento conformacional que hace que los sitios de unión sean accesibles. El *S. mutans* se une sólo débilmente. La variante de PRP Db es de relevancia 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 las caries. Una parte reducida de PRP-Db de una concentración alta total de PRP se correlaciona con un bajo desarrollo de las caries (Stenudd et al., J. Dent. Res. 80 (2001), 2005-2010). Es desconocido si *S. mutans* se une directamente a los PRP.

35 La segunda vía del *S. mutans* para adherirse a la superficie del diente es a través de la adhesión dependiente de sacarosa. El *S. mutans* expresa tres diferentes glicosiltransferasas (GTF) que son capaces de sintetizar el polímero de azúcar glucano. Los glucanos existen en una forma soluble en agua (enlace 1-6 glicosídico) y una forma no soluble llamada mutano (enlace 1-3 glicosídico). El mutano no puede ser degradado ni por bacterias orales ni por enzimas en la saliva. Forma una matriz pegajosa dentro de la placa dental que es la base para la adhesión de *S. mutans* dependiente de la sacarosa. Las glicosiltransferasas GTFB y GTFC, las enzimas prevalentes responsables de la formación del mutano, están localizadas en la superficie celular de *S. mutans*. En contraste, la glicosiltransferasa GTFD sintetiza el glucano soluble y es secretada por *S. mutans*. Experimentos utilizando mutantes deficientes en GTF de *S. mutans* muestran que una interacción de todas las tres enzimas es necesaria para una adhesión dependiente de la sacarosa (Ooshima et al., J. Dent. Res. 80 (2001), 1672-1677). Las glicosiltransferasas tienen un sitio de enlazamiento de sacarosa en terminal N y un sitio de enlazamiento de glucano en terminal C. Los anticuerpos contra la enzima o contra el sitio de enlazamiento de glucano llevan a una inhibición de la adhesión dependiente de sacarosa de *S. mutans*. No ha sido posible bloquear el sitio de enlazamiento de sacarosa de N-terminal utilizando anticuerpos (Yu et al., Infect. Immun. 65 (1997), 2292-2298).

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

55 Se ha encontrado que las bacterias del ácido láctico denominadas S11, reducen la formación del mutano y, por lo tanto la adherencia de *S. mutans* in vitro. Como se describió anteriormente, la formación de mutano es esencial para que el *S. mutans* se adhiera a la superficie del diente. De acuerdo con lo anterior, Chung et al. (Oral Microbiol Immunol 19 (2004), 214 - 216) han encontrado células de *S. mutans* desprendidas cuando se incuban con las bacterias de ácido láctico de la cepa S11 de las cuales se dice que reduce la formación de mutano. El enlazamiento de *S. mutans* al mutano ocurre a través de proteínas de unión bacterianas (proteína de enlazamiento de glucano). El mecanismo exacto del enlazamiento tiene que ser determinado (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 especies de *Enterococcus*, *Lactobacillus* y *Lactococcus* efectivos contra la producción de glucano y la producción de placa está ya descrito (US 6.036.952). El mecanismo de acción todavía tiene que ser dilucidado.

- 5 Una metodología adicional para inhibir caries es neutralizar el bajo pH en la placa. La urea y la arginina son componentes de la saliva. La urea está presente en concentraciones de 3 - 10 mmol/L sin diferencias mayores entre personas libres de caries y afectadas por caries. La concentración de la arginina libre difiere entre 4 y 40  $\mu\text{mol/L}$ . Los Individuos libres de caries tienen un promedio más alto de concentraciones de arginina libre en la saliva que las personas afectadas por caries (van Wuyckhuysse et al., J. Dent Res. 74 (1995), 686-690).
- 10 Algunas bacterias de la placa tales como *Streptococcus sanguis* y *Actinomyces naeslundii* son capaces de escindir la urea o la arginina dando como resultado la formación de amoníaco. El amonio alcalino eleva el pH de la placa y por lo tanto reduce las caries (Curran et al., Appl. Environm. Microbiol. 61 (1995), 4494-4496; Morou-Bermudez and Bume, Infect. Immun. 68 (2000), 6670-6676). De acuerdo con lo anterior se sugiere que se usen estas bacterias para tratar las caries. Otra metodología sugerida para tratar las caries es que mediante la proteólisis de PRP-1 y PRP-3 se crean péptidos ricos en arginina, los cuales pueden, después de proteólisis adicional por bacterias orales
- 15 tales como *S. sanguis*, *S. oralis* y *S. mitis*, llevar a un pH más alto en la placa. Por aplicación de una variante recombinante de estos péptidos, el descenso dependiente de la sacarosa del pH es inhibido (Li et al., Infect. Immun. 68 (2000), 5425-5429). Además, se describe que utilizando una goma de mascar que contiene urea después del consumo de sacarosa la caída del pH puede ser inhibida y, de acuerdo con lo anterior, por ejemplo, el *S. mutans* puede no contribuir demasiado a las caries.
- 20

Sin embargo, es evidente de lo anterior, que la técnica anterior se concentra en medidas anticaries dirigidas contra *Streptococcus mutans*. No se describen medidas que permitirían apuntar hacia mutans *Streptococci* diferentes a *Streptococcus mutans* a pesar de su posible papel en la cariogénesis. Por lo tanto, hay una necesidad de medios y métodos que satisfagan los criterios deseables antes mencionados y que sean útiles para prevenir y/o tratar caries

25 causadas por bacterias diferentes a *Streptococcus mutans*.

El problema técnico subyacente a la presente invención es así satisfacer las necesidades antes descritas. La solución a dicho problema técnico se logra proveyendo las realizaciones según se caracterizan en las reivindicaciones.

- 30 De acuerdo con lo anterior, en un primer aspecto la presente invención se relaciona con el uso de un microorganismo que pertenece al género *Lactobacillus* o un mutante o derivado del mismo, caracterizado porque es capaz de unirse específicamente a una bacteria que pertenece al grupo de mutans *Streptococci*, en donde la unión específica es (i) resistente a tratamiento con calor, en donde dicho tratamiento con calor se lleva a cabo a una temperatura de más de 95°C durante al menos 20 minutos; y (ii) resistente al tratamiento con proteasa, en donde dicho tratamiento con proteasa es un tratamiento con una proteasa seleccionada del grupo consistente de pronasa
- 35 E, proteinasa K, tripsina y quimiotripsina; y (iii) dependiente de calcio; y (iv) formado en un rango de pH entre 4.5 y 8.5; y (v) formado en la presencia de saliva, para la preparación de una composición anticariogénica para el tratamiento o prevención de caries causadas por *Streptococcus sobrinus*, en donde dicho derivado del microorganismo es una forma inactivada de dicho microorganismo o un fragmento de dicho microorganismo, siendo dicho microorganismo inactivado térmicamente o liofilizado, en donde dicho fragmento es una fracción de la
- 40 membrana obtenida por una preparación de membrana y en donde dicha forma inactivada o dicho fragmento retiene la capacidad de unirse específicamente a una bacteria que pertenece al grupo de mutans *Streptococci*.

Preferiblemente, la unión específica puede ser probada como sigue:

- (a) cultivar dicho microorganismo a la fase estacionaria;
- (b) mezclar dicho microorganismo con una bacteria que pertenece al grupo de mutans *Streptococci* el cual ha sido
- 45 cultivado en una fase estacionaria;
- (c) incubar la muestra obtenida en la etapa (b) bajo condiciones que permiten la formación de agregados de dicho microorganismo y una bacteria del grupo de mutans *Streptococci*; y
- (d) detectar agregados por la presencia de una pella.

La bacteria que pertenece al grupo de mutans *Streptococci* utilizada en tal ensayo puede ser *Streptococcus mutans*.

- 50 La unión específica se prueba específicamente como se describe en el Ejemplo 4 más adelante.

En particular, para una prueba de agregación de pella de mutans *Streptococci* tal como se describe en el Ejemplo 4, infra, se mezclan preferiblemente microorganismos que pertenecen al grupo de las bacterias del ácido láctico, a saber microorganismos que pertenecen al género *Lactobacillus*, con mutans *Streptococci* en relaciones volumétricas de 3:1 a 60:1 (mutans *Streptococci*: *lactobacillus*). Ambos, las bacterias del ácido láctico y mutans *Streptococci* se cultivan en fase estacionaria como se describe en el Ejemplo 1. Preferiblemente, la densidad óptica se mide

55

fotométricamente a 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  $OD_{600} = 1$  en 1 ml se correlaciona con  $3 \times 10^8$  unidades formadoras de colonia de un mutans *Streptococcus*. Preferiblemente, un  $OD_{600} = 1$  en 1 ml se correlaciona con  $7 \times 10^9$  unidades formadoras de colonia de *Lactobacillus* tal como se describe aquí más adelante.

5 Preferiblemente, para probar la reacción de agregación por formación de pellas, las bacterias están en un volumen de 2 ml en tubos Falcon de 15 ml. Si es necesario, las suspensiones del cultivo se diluyen con regulador PBS para obtener relaciones volumétricas mencionadas anteriormente, a la vez que se mantiene el volumen final en 2 ml. Preferiblemente, la mezcla se somete a vórtex durante aproximadamente 15 segundos y luego se deja sin perturbar durante al menos 5, 10, 15 minutos y más preferiblemente al menos 20 minutos a temperatura ambiente, esto es, cualquier temperatura entre 16°C y 25°C. Una agregación es visible en forma de una turbidez inmediata de la suspensión y, después de al menos 20 minutos es visible una agregación por agregados que se depositan como una pella visible (ejemplo mostrado en la Figura 1, tubo Falcon de la izquierda), mientras que las mezclas de agregación no mutans *Streptococcus* permanecen en suspensión (ejemplo mostrado en la Figura 1, tubo Falcon de la derecha). Como control, puede probarse la autoagregación de las respectivas bacterias de ácido láctico y la cepa de mutans *Streptococcus* omitiendo bien sea los mutans *Streptococcus* o las bacterias de ácido láctico.

La agregación de un *Lactobacillus* y un mutans *Streptococcus* de acuerdo con la prueba antes descrita puede ser cuantificada separando los agregados formados por centrifugación, por ejemplo, a  $500 \times g$  durante 30 segundos. Subsecuentemente, la cantidad de agregación puede ser determinada midiendo la cantidad de células no agregadas que permanecen en el sobrenadante. La determinación puede llevarse a cabo por cualquier medio adecuado conocido para la persona experimentada en la técnica. Preferiblemente, la determinación se lleva a cabo retirando un cierto volumen del sobrenadante, por ejemplo 1 ml. Subsecuentemente, puede medirse la densidad óptica del sobrenadante retirado a una longitud de onda adecuada, conocida para una persona experimentada, por ejemplo a 600 nm. El valor medido después de la sustracción de un valor de una prueba de control correspondiente sin lactobacilos representa la cantidad de células que no se han agregado.

Alternativamente, con el fin de direccionar el posible problema de autoagregación puede emplearse una tinción, preferiblemente una tinción fluorescente. La unión específica puede probarse como sigue:

(a) cultivo de dicho microorganismo en fase estacionaria;

(b) mezclar dicho microorganismo con una bacteria que pertenece al grupo de mutans *Streptococci* el cual ha sido cultivado en fase estacionaria y que ha sido sometido a tinción utilizando una tinción adecuada, preferiblemente una tinción fluorescente;

(c) incubación de la mezcla obtenida en la etapa (b) bajo condiciones que permitan la formación de agregados de dicho microorganismo y una bacteria del grupo de mutans *Streptococci*; y

(d) detectar agregados mediante la detección de la tinción, preferiblemente una tinción fluorescente.

La bacteria que pertenece al grupo de mutans *Streptococci* utilizada como ensayo puede ser *Streptococcus mutans*. Preferiblemente tal prueba de agregación puede ser llevada a cabo como se describe en el Ejemplo 5, aquí más adelante. En particular, para una prueba de agregación de mutans *Streptococci* tal como se describe en el Ejemplo 5, más abajo, tanto las bacterias del ácido láctico, a saber microorganismos pertenecientes al género *Lactobacillus* y los mutans *Streptococci* se cultivan en fase estacionaria como se describe en el Ejemplo 1. Preferiblemente, la densidad óptica se mide fotométricamente a una longitud de onda de 600 nm. Preferiblemente, un  $OD_{600} = 1$  en 1 ml se correlaciona con  $3 \times 10^8$  unidades formadoras de colonia de un mutans *Streptococcus*. Preferiblemente, un  $OD_{600} = 1$  en 1 ml se correlaciona con  $7 \times 10^9$  unidades formadoras de colonias de lactobacilos según se describe aquí más adelante. Subsecuentemente, los mutans *Streptococci* sufren la tinción. En una realización preferida, los lactobacilli son teñidos, mientras que los *Streptococci* no son teñidos. Como tinción se puede utilizar cualquier tinción adecuada, preferiblemente una tinción fluorescente conocida para las personas experimentadas en la técnica. Preferiblemente, puede utilizarse una tinción de fluorescencia específica o no específica, por ejemplo, CFDA-SE. Específicamente, las células son recolectadas, por ejemplo por centrifugación, preferiblemente a  $3200 \times g$  por 5 minutos. Subsecuentemente, la pella obtenida puede ser resuspendida en cualquier regulador adecuado conocido para la persona experimentada en la técnica, preferiblemente un regulador PBS. La cantidad de regulador puede ser calculado de tal manera que la suspensión resultante tenga una  $OD_{600}$  de, por ejemplo, 4.2/ml. Subsecuentemente, la suspensión puede ser mezclada con una tinción adecuada, por ejemplo una tinción de fluorescencia, preferiblemente con diacetato de 5,6-carboxifluoresceína, succinimidil éster (CFDA-SE), preferiblemente con 2  $\mu$ l de una solución de CFDA-SE (Invitrogen). Subsecuentemente, las células pueden ser incubadas durante un periodo adecuado, como lo sabe la persona experimentada en la técnica, por ejemplo durante 2 horas, a una temperatura adecuada como lo sabe la persona experimentada, por ejemplo a 37°C. En una etapa adicional, las células teñidas pueden ser recolectadas, por ejemplo por centrifugación. Preferiblemente, la centrifugación se lleva a cabo a  $3200 \times g$  durante 5 minutos. Las células pueden ser entonces resuspendidas en un regulador adecuado, como lo sabe la persona experimentada en la técnica, por ejemplo, en 2 ml de un regulador de PBS. Para la agregación, los microorganismos que pertenecen al grupo de bacterias del ácido láctico se mezclan preferiblemente con mutans *Streptococci* en relaciones volumétricas de 3:1 a 1:3 (mutans *Streptococci*: lactobacilos). Más preferiblemente, la relación volumétrica de la mezcla es 1:1. Las relaciones mencionadas corresponden a una relación de unidades

formadoras de colonia de 1:50 hasta 1:150. Para probar la reacción de agregación a través de la medición de la tinción, preferiblemente la fluorescencia, los lactobacilos y los mutans Streptococci se utilizan en cualquier volumen adecuado conocido para la persona experimentada, preferiblemente en un volumen de 50 µl. Preferiblemente, la mezcla se lleva a cabo en una placa de microtitulación, por ejemplo en una placa de microtitulación de 96 pozos.

5 Subsecuentemente, la mezcla puede ser sometida a vórtex, preferiblemente durante 12 minutos a velocidad máxima. Después de esto, la mezcla puede ser centrifugada, por ejemplo durante 10 segundos a 500 x g. El sobrenadante puede ser retirado entonces y la pella puede ser resuspendida en cualquier regulador adecuado conocido por la persona experimentada en la técnica, preferiblemente en un regulador PBS en cualquier volumen adecuado, por ejemplo en 100 µl. La tinción de la suspensión puede ser medida en la mezcla por cualquier medio

10 adecuado conocido por la persona experimentada. Preferiblemente, en caso de la fluorescencia, la fluorescencia puede ser detectada en un lector de fluorescencia, por ejemplo a una longitud de onda de 495 nm para excitación y 525 nm para emisión. Como controles pueden probarse lactobacilos solos y mutans Streptococci teñidos solos. Cualquier tinción de fondo, por ejemplo fluorescencia, puede ser medida para los mutans Streptococci probados solos y puede ser sustraída preferiblemente del valor para la agregación con los lactobacilos respectivos. Un efecto de agregación está presente si la tinción de fondo, por ejemplo, la fluorescencia, medida como se indica aquí, es

15 sustraída de la tinción medida, por ejemplo fluorescencia, en una muestra que contiene un Lactobacillus como se describe aquí más arriba y un mutans Streptococcus probado, como se describe aquí a continuación, y el valor resultante está al menos por encima de cero. Más preferiblemente, un efecto de agregación está presente si el valor resultante está reproduciblemente por encima de cero en una serie de pruebas, llevadas a cabo como se describió aquí arriba. Una "serie de experimentos" significa al menos 2, preferiblemente 3, más preferiblemente 4 y lo más preferiblemente 5 pruebas.

La unión específica descrita anteriormente no requiere magnesio. Esta característica puede ser probada como se describe en los ejemplos anexos.

Como se muestra en los Ejemplos anexos, se ha encontrado sorprendentemente que las bacterias específicas del ácido láctico que originalmente han sido identificadas y aisladas por las pruebas de ensayo antes mencionadas debido a su capacidad para unirse a Streptococcus mutans mientras no se unen a las otras especies de Streptococcus S. salivarius, S. oralis, S.mitis y/o S. sanguinis (véase WO 06127265), muestran la capacidad de agregar diversos otros mutans Streptococci, por ejemplo, Streptococcus sobrinus, Streptococcus cricetus, Streptococcus Ratti, Streptococcus Ferus y Streptococcus macacae. Así, la identificación de las bacterias de ácido

25 láctico que muestran las características de enlazamiento descritas anteriormente en relación con Streptococcus mutans y en donde el enlazamiento se establece preferiblemente por los ensayos descritos anteriormente provee bacterias del ácido láctico que no solamente tienen la capacidad de agregar Streptococcus mutans sino que también tienen la capacidad de agregar otros mutans Streptococci, esto es, especies de Streptococcus que tienen las características comunes como se describen más adelante y que también han sido puestos en relación con el desarrollo de la caries. Así, las bacterias del ácido láctico, las cuales muestran las características de unión

30 anteriormente citadas versus un tipo de bacteria perteneciente al grupo de mutans Streptococci (por ejemplo Streptococcus mutans) han demostrado ser capaces de agregar también otras bacterias pertenecientes al grupo de mutans Streptococci y pueden, por lo tanto, ser utilizadas para prevenir y/o tratar caries causadas por tales otras bacterias. Así, los ensayos identificados más arriba para probar el enlazamiento de bacterias del ácido láctico a una bacteria que pertenece al grupo de mutans Streptococci permiten identificar las bacterias del ácido láctico que también se unen a/se agregan a otras bacterias del grupo de mutans Streptococci. Así, la presente invención provee una mejora importante en la provisión de medios y métodos para atacar las caries, las cuales son causadas por mutans Streptococci diferentes a Streptococcus mutans, a saber S. sobrinus.

Como es evidente de lo anterior, todas las características antes mencionadas hacen que el microorganismo mencionado más arriba perteneciente al grupo de bacterias de ácido láctico sea un agente adecuado para prevenir y/o tratar caries, en particular caries que son causadas por S. sobrinus. De acuerdo con lo anterior, el microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de bacterias del ácido láctico del género Lactobacillus, ejerce un efecto anticariogénico y es así un agente útil para prevenir y/o probar caries, en particular caries causadas por S. sobrinus. "Caries" o "caries dental" o "cavidad" son términos intercambiables para una enfermedad infecciosa

45 crónica asociada con un área blanda de caída en un diente que progresivamente lleva a la muerte de un diente. Usualmente ocurre en niños y en adultos jóvenes pero puede afectar a cualquier persona. Es la causa más importante de pérdida de dientes en gente más joven. Las caries pueden ser diagnosticadas por métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Angmar-Mansson and ten Bosch, Adv. Dent. Res. 7 (1993), 70-79).

El término "mutans Streptococcus" se refiere a un microorganismo del grupo taxonómico de Streptococcus, el cual se encuentra en la placa en la cavidad oral y el cual fermenta el manitol y el sorbitol. Preferiblemente es un microorganismo con las características arriba mencionadas que adicionalmente es capaz de producir glucanos extracelulares a partir de sacarosa. Preferiblemente, dicho microorganismo es cariogénico, en particular en modelos humanos y/o animales. Más preferiblemente, el término se relaciona con un microorganismo, el cual muestra todas las características antes mencionadas. La fermentación del sorbitol y el manitol pueden ser comprobadas utilizando cualquier prueba adecuada conocida por las personas experimentadas en la técnica, por ejemplo, la prueba API 20 Strep (Biomerieux, Francia).

55

60

- Más preferiblemente, el término se relaciona con un microorganismo que pertenece a las especies *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus cricetus*, *Streptococcus ratti*, *Streptococcus ferus* o *Streptococcus macacae*. Aún más preferiblemente, el término se relaciona con un microorganismo que pertenece al serotipo c de *Streptococcus mutans* (DSMZ 20523) serotipo e de *Streptococcus mutans* (NCTC 10923), serotipo f de *Streptococcus mutans* (NCTC 11060), *Streptococcus sobrinus* DSM 20742, *Streptococcus Ratti* DSM 20564, *Streptococcus cricetus* DSM 20562, *Streptococcus ferus* DSM 20646 o *Streptococcus macacae* DSM 20714. El término "mutans Streptococci" se refiere a al menos un microorganismo del grupo de mutans *Streptococcus*, tal como se describe aquí anteriormente. Preferiblemente, el término se refiere a cualquier combinación y subgrupo de microorganismos que pertenecen al grupo de mutans *Streptococcus* tal como se describe aquí anteriormente.
- El término "prevenir caries" incluye profilaxis de las caries. De acuerdo con lo anterior, un sujeto al que nunca se le ha encontrado mutans *Streptococci*, los agentes causantes de la caries, pero está en riesgo de que se le encuentre, esto es, infectado con mutans *Streptococci* se beneficia, por ejemplo, de los usos y métodos de la presente invención en la medida en tanto dicho sujeto no sufrirá de caries. Por lo tanto, los usos y métodos de la presente invención pueden ser aplicados, por ejemplo, a infantes, niños o animales jóvenes para la profilaxis de caries puesto que la cavidad oral de los infantes o animales jóvenes normalmente está libre de mutans *Streptococci*. Sin embargo, las composiciones tal como se utilizan de acuerdo con la presente invención no se limitan a la administración a infantes, niños o animales jóvenes.
- El término "tratamiento de caries" incluye la administración de las composiciones tal como se describe aquí a continuación a un sujeto que sufre de la caries para el propósito de disminuir la cantidad de células de mutans *Streptococci* y/o para eliminar completamente el mutans *Streptococci* de la boca, en particular de la cavidad oral incluyendo los dientes. Desde luego, después de haber sido curados de mutans *Streptococci*, se prevé que el sujeto respectivo se beneficia de los usos y métodos de la presente invención con respecto al efecto anticaries profiláctico ejercido sobre mutans *Streptococci*.
- Opcionalmente, el microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico es un microorganismo probiótico que además de sus efectos anticariogénicos, tiene efectos beneficiosos sobre el organismo anfitrión al cual se administra. Un "probiótico", según la definición aceptada en general, es un "suplemento alimenticio microbiano vivo que afecta de manera beneficiosa el animal anfitrión mejorando su balance microbiano intestinal".
- Mutans *Streptococci* se presentan como parte de la flora normal en la boca. Están involucrados en la causa de la caries dental en humanos y animales, en particular mamíferos. La placa dental se adhiere a las fisuras y recesos de los dientes adyacentes a las encías. Consiste inicialmente de glicoproteína, la cual se precipita y se adsorbe sobre el esmalte dental. Las bacterias orales luego se asocian con la glicoproteína. La sacarosa de la dieta 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 metabolizada más completamente por mutans *Streptococci* para formar ácido. Las bebidas que contienen sacarosa son tragadas y así la sacarosa pasa menos tiempo en la boca. Es esencial que la placa dental sea controlada mediante el uso regular de cepillado dental y el uso de palillos e hilo dental. La adición de 1 ppm de fluoruro al agua para beber ha demostrado ser muy efectiva en la reducción de las caries. Sin embargo, la posibilidad de utilizar una vacuna contra *Streptococcus mutans* fue contemplada en la comunidad científica. Así, además de los esquemas generales de higiene oral, que afectan la mayor parte de las bacterias en la cavidad oral, la técnica anterior casi completamente se enfoca en medidas específicas contra *Streptococcus mutans*. Sin embargo, debido al hallazgo sorprendente de la presente invención de que microorganismos de origen natural que pertenecientes al grupo de las bacterias del ácido láctico, específicamente al género de *Lactobacillus*, los cuales han sido identificados por su capacidad para unirse a *Streptococcus mutans*, tienen también la capacidad de enlazar cepas de mutans *Streptococci*, como por ejemplo, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus cricetus*, *Streptococcus ratti*, *Streptococcus ferus* o *Streptococcus macacae*, es posible ahora prevenir y/o tratar efectivamente las caries causadas por mutans *Streptococci* diferentes a *Streptococcus mutans*, en particular *S. sobrinus*, puesto que los microorganismos antes mencionados pertenecientes al grupo de las bacterias del ácido láctico son capaces de agregarse y arrastrar mutans *Streptococci* tales como, por ejemplo *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus cricetus*, *Streptococcus ratti*, *Streptococcus ferus* o *Streptococcus macacae*. De acuerdo con lo anterior, la presente invención provee el uso de bacterias fácilmente administrables, las cuales son organismos grado alimenticio que pueden, además de sus propiedades anticariogénicas, ser útiles como probióticos.
- En particular, cuando se analizan microorganismos pertenecientes al grupo de las bacterias del ácido láctico, específicamente al género *Lactobacillus*, los cuales han sido identificados originalmente por su capacidad de unirse a *Streptococcus mutans* pero no a *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis* y *Streptococcus sanguinis*, se ha encontrado sorprendentemente que dichos microorganismos no solamente son capaces de unirse a *Streptococcus mutans*, sino que también se pueden unir a otras especies de mutans *Streptococci*, tales como, por ejemplo, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus cricetus*, *Streptococcus ratti*, *Streptococcus ferus* o *Streptococcus macacae*, los cuales son los agentes causantes de la caries. Al unirse a estos mutans *Streptococci*, el microorganismo perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico, específicamente al género de *Lactobacillus* tal como se describe aquí, inter alia, se unen y agregan a mutans *Streptococcus* y así, en

consecuencia, arrastra mutans Streptococcus por el flujo natural de la saliva, evitando y/o tratando por lo tanto la caries. Además de esto, los microorganismos antes mencionados pertenecientes al grupo de bacterias del ácido láctico preferiblemente no se unen a otros microorganismos que no pertenecen al grupo de mutans Streptococci, presentes en la cavidad oral tal como se describe aquí y en particular en el Ejemplo 6 aquí más adelante. Así, el microambiente de la cavidad oral no es perturbado puesto que solamente los mutans Streptococci como agentes causantes de caries son eliminados. Para mejor conocimiento, los mutans Streptococci no tienen ningún efecto beneficioso en la cavidad oral y, así, su pérdida no tiene efectos adversos para el anfitrión respectivo.

De manera muy llamativa, la unión específica del microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico, especialmente de la especie *Lactobacillus* descrita aquí, a mutans Streptococci es resistente a tratamiento por calor y/o resistente al tratamiento con proteasa. Además, la unión específica depende del calcio y/o es independiente de magnesio y es estable en un punto de acidez de 4.5 y ocurre en la presencia de saliva lo que lo hace particularmente adecuado para el uso en la forma de aplicaciones orales o como aditivo para alimentos, comidas o bebidas que pueden contener concentraciones más altas de calcio, tales como leche. De manera notable, derivados térmicamente inactivados o liofilizados o fragmentos de dichos microorganismos divulgados aquí son aún capaces de unirse específicamente a mutans Streptococci. Este efecto sorprendente es ventajoso para usar dichos fragmentos de dichos microorganismos así como mutantes o derivados de los mismos en composiciones para uso en animales, preferiblemente humanos o mamíferos, para prevenir y/o tratar caries. En particular dichos derivados o fragmentos pueden ser agregados fácilmente a cualquier composición, por ejemplo una composición cosmética o farmacéutica, alimento o productos alimenticios o bebidas y similares. Adicionalmente, la producción de tales derivados o fragmentos es barata y fácil y pueden ser almacenadas durante períodos prolongados de tiempo sin perder su capacidad de unirse específicamente a mutans Streptococci. Una ventaja adicional del microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico es que retiene su capacidad para unirse específicamente a mutans Streptococci si es liofilizado o secado por aspersión o secado. Esto lo convierte en un ingrediente favorable para uso en las composiciones descritas aquí.

Otras ventajas de la invención se definen en parte en la descripción aquí, y en parte, pueden ser obvias a partir de la descripción, o pueden ser aprendidas a partir de la práctica de la invención.

Antes de que la presente invención sea descrita en detalle, se debe entender que esta invención no está limitada a la metodología particular, protocolos, bacterias, vectores y reactivos, etc., descritos aquí en la medida en que éstos pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada aquí es para el propósito de describir realizaciones particulares únicamente, y no pretende limitar el alcance de la presente invención, la cual será limitada solamente por las reivindicaciones anexas. A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen los mismos significados según se entienden comúnmente por una persona de experiencia normal en la técnica.

Preferiblemente, los términos utilizados aquí se definen como se describe en "A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)", Leuenberger, H.G.W, Nagel, B. and Kölbl, H. eds. (1995), Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basel, Switzerland). A lo largo de esta especificación y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera otra cosa, la palabra "comprenden" y variaciones tales como "comprende" y "que comprende", se entiende como implicando la inclusión de un entero establecido o paso o grupo de enteros o pasos pero no la exclusión de ningún otro entero o paso o grupo de enteros o pasos.

Debe anotarse que tal como se utilizan aquí y en las reivindicaciones anexas, las formas singulares "un", "una" y "el, la", incluyen los referentes plurales a menos que el contexto indique claramente otra cosa. Así, por ejemplo, la referencia a "un reactivo" incluye uno o más de tales diferentes reactivos, y referencia a "el método" incluye referencia a etapas y métodos equivalentes conocidos para las personas experimentadas en la técnica que podrían ser modificados o sustituidos por los métodos descritos aquí.

Cuando se utiliza en el contexto de la presente invención, el término "microorganismo que pertenece al grupo de las bacterias del ácido láctico" abarca microorganismos que pertenecen a bacterias, en particular pertenecientes a las eubacterias fermentadoras gram-positivas, más particularmente pertenecientes a la familia de las lactobacteriaceae incluyendo las bacterias del ácido láctico. Además, dicho término también abarca derivados o mutantes o fragmentos, tales como fracciones de las membranas tal como se describen aquí, de dichos microorganismos, que retienen la capacidad de unirse específicamente a mutans Streptococci. Los términos "derivado", "mutantes" y "fragmentos" se describen aquí en diversos lugares. Las bacterias del ácido láctico están divididas desde un punto de vista taxonómico en las subdivisiones de Streptococcus, Leuconostoc, Pediococcus y Lactobacillus. El microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico es preferiblemente una especie de *Lactobacillus*. Los miembros del grupo de bacterias del ácido láctico carecen normalmente de porfirinas y citocromos, no llevan a cabo fosforilación con transporte de electrones y por lo tanto obtienen energía solamente por fosforilación a nivel de sustrato. Esto es en las bacterias del ácido láctico el ATP sintetizado a través de la fermentación de carbohidratos. Todas las bacterias del ácido láctico crecen anaeróticamente, sin embargo, a diferencia de muchos anaerobios, la mayor parte de las bacterias del ácido láctico no son sensibles al oxígeno y así pueden crecer en su presencia tanto como en su ausencia. De acuerdo con lo anterior, los microorganismos antes mencionados pertenecientes al grupo de las bacterias del ácido láctico son preferiblemente bacterias del ácido

láctico anaeróbicas aerotolerantes, preferiblemente pertenecientes al género de *Lactobacillus*. Tal como se describió anteriormente, los microorganismos usados de acuerdo con la presente invención tal como se describe en las reivindicaciones pertenecen al género *Lactobacillus*.

- 5 Las bacterias del ácido láctico antes mencionadas son preferiblemente en forma de barra o esféricas, variando desde barras largas y esbeltas hasta cortas y gruesas y son preferiblemente inmóviles y/o asporógenas y producen ácido láctico como producto principal o único del metabolismo fermentado. El género *Lactobacillus* al cual pertenece el microorganismo antes mencionado está dividido según las siguientes características en tres subgrupos principales, con lo cual se prevé que la especie de *Lactobacillus* antes mencionada pueden pertenecer a cada uno de los tres subgrupos principales:
- 10 (a) lactobacilos homofermentadores
- (i) producen ácido láctico, preferiblemente el isómero L-, D- o DL- del ácido láctico en una cantidad de al menos 85% a partir de glucosa a través de la ruta Embden-Meyerhof;
- (ii) crece a temperatura de 45°C, pero no a temperatura de 15°C;
- (iii) son de forma de barra larga; y
- 15 (iv) tienen ácido glicerol teicoico en la pared celular;
- (b) lactobacilos homofermentadores
- (i) producen ácido láctico, preferiblemente los isómeros L- o DL- del ácido láctico a través de la ruta Embden-Meyerhof;
- (ii) crecen a una temperatura de 15°C, mostrando crecimiento variable a una temperatura de 45°C;
- 20 (iii) son de forma de barra corta y corineformes; y
- (iv) tienen ácido ribitol y/o glicerol teicoico en su pared celular;
- (c) lactobacilos heterofermentadores
- (i) producen ácido láctico, preferiblemente el isómero DL- del ácido láctico en una cantidad de al menos 50% a partir de glucosa a través de la ruta pentosa-fosfato;
- 25 (ii) producen dióxido de carbono y etanol
- (iii) muestran crecimiento variable a una temperatura de 15°C o 45°C;
- (iv) tienen forma de barra larga o corta; y
- (v) tienen ácido glicerol teicoico en su pared celular.
- 30 Con base en las características descritas más arriba, los microorganismos antes mencionados pueden ser clasificados por la pertenencia al grupo de las bacterias del ácido láctico, particularmente al género de *Lactobacillus*. Utilizando sistemas clásicos, por ejemplo con referencia a las descripciones pertinentes en "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" (Williams & Wilkins Co., 1984), puede determinarse que un microorganismo pertenece al género de *Lactobacillus*. Alternativamente, puede clasificarse que los microorganismos pertenecen al género de *Lactobacillus* por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, por su huella metabólica, esto es, una revisión comparable de la capacidad de tal microorganismo para metabolizar azúcares o por 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 antes mencionados son capaces de metabolizar fuentes de azúcar, las cuales son típicas y conocidas en la técnica para microorganismos que pertenecen al género de los *Lactobacillus*. Preferiblemente, sin embargo, el microorganismo antes mencionado tiene una huella metabólica seleccionada del grupo consistente de:
- 35 (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
- 40 (iv) metaboliza L-sorbosa, D-lactosa e inulina.
- 45 Preferiblemente el microorganismo antes mencionado tiene una huella metabólica seleccionada del grupo consistente de:

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

5 Desde luego, el microorganismo antes mencionado no está limitado a la metabolización de los azúcares mencionados en el patrón de huellas metabólicas antes mencionado, pero puede ser capaz de metabolizar azúcares adicionales que son metabolizados comúnmente por especies de *Lactobacillus*.

La afiliación de los microorganismos antes mencionados al género de *Lactobacillus* también puede ser caracterizada utilizando otros métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, utilizando electroforesis en gel SDS-PAGE de proteína total de las especies que van a ser determinadas y comparando con cepas conocidas y ya caracterizadas del género *Lactobacillus*. Las técnicas para preparar un perfil de proteína total como se describe más arriba, así como el análisis numérico de tales perfiles, son bien conocidos para una persona experimentada en el arte. Sin embargo, los resultados solamente son confiables en tanto cada etapa del proceso sea estandarizada suficientemente. Enfrentado con el requerimiento de exactitud cuando se determina la unión de un microorganismo al género de *Lactobacillus*, los procedimientos estandarizados se hacen regularmente disponibles al público por sus autores tales como el de Pot et al., tal como fue presentado durante un "taller" organizado por la Unión Europea, en la Universidad de Gante, en Bélgica, del 12 al 16 de septiembre 1994 (*Fingerprinting techniques for classification and identification of bacteria, SDS-PAGE of whole cell protein*). El software usado en la técnica para analizar la electroforesis en gel en SDS-PAGE es de crucial importancia puesto que el grado de correlación entre las especies depende de los parámetros y algoritmos utilizados por este software. Sin entrar en los detalles teóricos, la comparación cuantitativa de las bandas medidas mediante un densitómetro y normalizadas mediante un ordenador se hace preferiblemente con el coeficiente de correlación de Pearson. La matriz de similitud así obtenida puede ser organizada con la ayuda del algoritmo UPGMA (método de grupo de pares no sopesado utilizando uniones promedio) que no solamente hace posible agrupar juntos los perfiles más similares, sino también construir dendogramas (véase Kersters, Numerical methods in the classification and identification of bacteria by electrophoresis, in *Computer-assisted Bacterial Systematics*, 337-368, M. Goodfellow, A. G. O'Donnell Ed., John Wiley and Sons Ltd, 1985).

Alternativamente, la afiliación de dichos microorganismos al género de *Lactobacillus* puede ser caracterizado con respecto al ARN ribosómico en el así llamado Riboprinter.RTM. Más preferiblemente, la afiliación de la especie antes mencionada al género *Lactobacillus* se demuestra comparando la secuencia de nucleótidos del ARN ribosómico 16S de dichas bacterias, o de su ADN genómico que codifica para el ARN ribosómico 16S, con los de otros géneros y especies de bacterias de ácido láctico conocidas hasta la fecha. Otra alternativa preferida para determinar la unión de las especies al género *Lactobacillus* es el uso de cebadores de PCR específicos de la especie que apuntan a la región espaciadora de ARNr 16S-23S. Otra alternativa preferida es RAPD-PCR (Niaatu et al. in Antonie van Leenwenhoek (79), 1-6, 2001), en virtud de que se genera un patrón de ADN específico de una cepa el cual permite determinar la afiliación de un microorganismo identificado al género de *Lactobacillus*. Técnicas adicionales útiles para determinar la afiliación de un microorganismo al género de *Lactobacillus* son el polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP) (Giraffa et al., *Int. J. Food Microbiol.* 82 (2003), 163-172), seguimiento de ollas de elementos repetitivos (Gevers et al., *FEMS Microbiol. Lett.* 205 (2001) 31-36) o análisis del patrón de éster metílico de ácidos grasos (FAME) de células bacterianas (Heyman et al., *FEMS Microbiol. Lett.* 181 (1991), 55-62). Alternativamente, los lactobacilos pueden ser determinados por tipificación de lectina (Annuk et al., *J. Med. Microbiol.* 50 (2001), 1069-1074) o por análisis de las proteínas de su pared celular (Gatti et al., *Lett. Appl. Microbiol.* 25 (1997), 345-348).

Los microorganismos antes mencionados son preferiblemente bacterias del ácido láctico pertenecientes al género de *Lactobacillus*, más preferiblemente especies de *Lactobacillus* como las descritas aquí. Aún más preferiblemente dicho *Lactobacillus* es *Lactobacillus paracasei* o *Lactobacillus rhamnosus*. Sin embargo, las especies de *Lactobacillus* no están limitadas a estos. Como se describió anteriormente, los microorganismos usados de acuerdo con la presente invención tal como se describe en las reivindicaciones pertenecen al género *Lactobacillus*. Los microorganismos antes mencionados pueden ser preferiblemente "aislados" o "purificados". El término "aislado" significa que el material es retirado de su ambiente original, por ejemplo el ambiente natural si es de origen natural. Por ejemplo, un microorganismo de origen natural, preferiblemente una especie de *Lactobacillus*, separado de alguno o todos los materiales coexistentes en el sistema natural, es aislado. Tal microorganismo podría ser parte de una composición, y debe verse aún como aislado en cuanto a la composición no sea parte de su ambiente natural.

El término "purificado" no requiere pureza absoluta, más bien, pretende ser una definición relativa. Los microorganismos individuales obtenidos a partir de una biblioteca han sido purificados convencionalmente hasta una homogeneidad microbiológica, esto es, crecen como colonias individuales cuando se siembran sobre placas de agar por métodos conocidos en la técnica. Preferiblemente, las placas de agar que se utilizan para este propósito son selectivas para especies de *Lactobacillus*. Tales placas de agar selectiva son conocidas en el arte.

Más preferiblemente, el microorganismo mencionado anteriormente que pertenece al grupo de las bacterias del ácido láctico se selecciona del grupo consistente de *Lactobacillus paracasei* o *Lactobacillus rhamnosus* que tiene el número de acceso DSMZ 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 DMSZ, DSM 16669 (*L. paracasei* ssp. *paracasei* Lb-Ob-K3), Número de acceso DMSZ, DSM 16670 (*L. paracasei* ssp. *paracasei* Lb-Ob-K4), Número de acceso DMSZ, DSM 16671 (*L. paracasei* ssp. *paracasei* Lb-Ob-K5), Número de acceso DMSZ, DSM 16672 (*L. rhamnosus* Lb-Ob-K6) y Número de acceso DMS, DSM 16673 (*L. rhamnosus* Lb-Ob-K7) o un mutante o derivado del mismo, donde dicho mutante o derivado retiene la capacidad de unirse específicamente a mutans *Streptococci*. El término "Lactobacillus paracasei o Lactobacillus rhamnosus que tiene número de acceso DSMZ" se relaciona con células de un microorganismo que pertenece a la especie *Lactobacillus paracasei* o *Lactobacillus rhamnosus* depositada con el Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH ("DSMZ") en el 26 de Agosto de 2004 y que tiene los siguientes números de depósito DSM 16667, 16668, 16669, 16670, 16671, 16672 o 16673. El DSMZ está localizado en el Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Germany. Los depósitos DSMZ antes mencionados fueron hechos con conformidad de los términos del tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos para propósitos de procedimientos de patentes.

"Un mutante o derivado" del microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico, preferiblemente de las células de *Lactobacillus paracasei* o *Lactobacillus rhamnosus* depositadas tiene preferiblemente las mismas características que las cepas respectivas depositadas, esto es, retiene la capacidad de enlazarse específicamente a mutans *Streptococci*, preferiblemente con las características de unión tal como se describen aquí más arriba. Por ejemplo, dicho derivado puede ser manipulado genéticamente. En el contexto de la presente invención el término "manipulado genéticamente" se utiliza en su sentido más amplio para métodos conocidos para la persona experimentada en la técnica para modificar ácidos nucleicos deseados *in vitro* e *in vivo* de tal manera que se afectan las modificaciones genéticas y los genes se alteran por la 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 se usan vectores apropiados que incluyen vectores de expresión para especies de *Lactobacillus* tales como, por ejemplo, los descritos en 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 clonar constructos intermedios y similares pueden utilizarse y son conocidas por las personas experimentadas en la técnica. Preferiblemente, los mutantes genéticamente manipulados comprenden células del microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico, preferiblemente de la especie *Lactobacillus* depositada que acoge ácidos nucleicos recombinantes bien sea comprendidos en su cromosoma bacteriano o un plásmido o plásmidos o comprendido en su cromosoma bacteriano y/o un o unos plásmidos. Dichos ácidos nucleicos recombinantes son preferiblemente foráneos para el microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico. Por "foráneo" se entiende que la molécula de polinucleótido o ácido nucleico es heteróloga con respecto a la célula anfitriona, esto significa derivada de una célula u organismo con un fondo genómico diferente, o es homóloga con respecto a la célula anfitriona, pero localizada en un ambiente genómico diferente que la contraparte de origen natural de dicha molécula de ácido nucleico. Esto significa que, si la molécula de ácido nucleico es homóloga con respecto a la célula anfitriona, no se localiza en su localización natural en el genoma de dicha célula anfitriona, en particular está rodeada por genes diferentes. En este caso el polinucleótido puede estar bien sea bajo el control de su propio promotor o bajo el control de un promotor heterólogo. El vector o molécula de ácido nucleico antes descritos, los cuales están presente en la célula anfitriona pueden ser integrados en el genoma de la célula anfitriona o pueden ser mantenidos de alguna manera extracromosómicamente. En este aspecto, debe entenderse que la molécula de ácido nucleico antes descrita puede ser utilizada para restaurar o crear un gen mutante a través de recombinación homóloga. Los plásmidos pueden ser plásmidos de número de copias bajo, medio o alto. Dichos mutantes genéticamente manipulados pueden acoger ácidos nucleicos que codifican una glucanasa o mutanasa la cual es capaz de degradar el enlace 1,3-glicosídico específico de mutano de las subunidades de sacarosa. Las glucanasas fúngicas están descritas por ejemplo, en Fuglsang et al., *J. Biol. Chem.* 275 (2000), 2009-2018. También se prevé que mutantes genéticamente manipulados comprenden células que acogen ácidos nucleicos recombinantes que codifican anticuerpos los cuales son preferiblemente secretados o anclados en la pared celular bacteriana. El término "anticuerpo" abarca anticuerpos intactos así como fragmentos de anticuerpos de los mismos, tales como cadenas livianas y pesadas separadas, Fab, Fab/c, Fv, Fab', F(ab')<sub>2</sub>. El término "anticuerpo" también comprende anticuerpos humanizados, anticuerpos bifuncionales y constructos de anticuerpos, como cadena Fvs (scFv) o proteínas de fusión anticuerpos. También se prevé en el contexto de esta invención que el término "anticuerpos" comprende constructos de anticuerpos que pueden ser expresados en células del derivado del microorganismo antes mencionado, por ejemplo, constructos de anticuerpos que pueden ser transformados a través de, entre otros, vectores por métodos conocidos en el arte. En particular se prevé que tales constructos de anticuerpos reconocen específicamente, por ejemplo, el antígeno I/II de estreptococos. Tal metodología está descrita por ejemplo, en Krueger et al., *Nat. Biotechnol.* 20 (2002). 702-706 o Shiroza, *Biochim Biophys Acta* 1626 (2003). 57-64.

La secreción del anticuerpo expresado se alcanza preferiblemente mediante enlazamiento operativo del ácido nucleico que codifica un anticuerpo a una secuencia de señal de secreción. El anclaje en la pared celular de la bacteria puede lograrse haciendo uso del mecanismo de la enzima sortasa. A saber, las proteínas de superficie de

5 las bacterias gran positivas están enlazadas a la pared celular bacteriana por un mecanismo que involucra la escisión de un motivo conservado Leu-Pro-X-Thr-Gly (LPXTG) y que se presenta durante el ensamblaje de la pared celular de peptidoglicano. De acuerdo con lo anterior, la molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo puede ser fusionada a una secuencia que codifica el motivo conservado antes mencionado, el cual es utilizado por la sortasa para anclar las proteínas en la pared celular bacteriana.

10 También se prevé que el microorganismo mencionado anteriormente perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico, preferiblemente la especie de *Lactobacillus* depositada sea genéticamente modificada para acoger una molécula de ácido nucleico que codifica reuterina la cual es una sustancia antimicrobiana efectiva, entre otras, contra *Streptococcus mutans*. La reuterina, por ejemplo, está descrita en Talarico et al., *Chemother.* 33 (1989), 674-679.

15 Un mutante del microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias de ácido láctico, preferiblemente un mutante de las cepas de *Lactobacillus* depositadas se hace mutar preferiblemente de manera artificial. De acuerdo con la presente invención, el término "mutado" significa una o unas modificaciones permanentes del material genético, esto es, ácidos nucleicos, causada, por ejemplo, naturalmente o por medios físicos o compuestos/sustancias/agentes químicos, tales como EMS o ENU. Dichas modificaciones incluyen mutaciones puntuales, tales como transiciones o transversiones, eliminación/inserción/adición de una o más bases dentro de un ácido nucleico/gen/cromosoma modificando por tanto el ácido nucleico/gen/cromosoma que puede causar, entre otros, una expresión/transcripción/traslación aberrante del gen o productos genéticos inactivos, productos genéticos activos/inactivos constitutivos que llevan a, por ejemplo, efectos negativos dominantes. 20 Preferiblemente, una mutación lleva a una capacidad incrementada de unirse específicamente a mutans *Streptococci*. Así, también se prefiere que las células mutantes del microorganismo depositado que acoge una o unas mutaciones en un gen o genes deseados en el cual una o unas mutaciones en un gen o genes deseados es inducida por métodos conocidos para una persona experimentada en la técnica. También se sabe de la técnica anterior que las células bacterianas mutadas o manipuladas genéticamente pueden ser seleccionadas por cualquier método/fenotipo adecuado. En el contexto de la presente invención, un mutante que tiene una capacidad incrementada para enlazarse específicamente a mutans *Streptococci* puede ser probado de acuerdo con los métodos descritos en los ejemplos anexos. El término "mutante", sin embargo, incluye también células del microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico, preferiblemente células del microorganismo depositado, que acogen mutaciones espontáneas de origen natural en su genoma, esto es, cromosoma bacteriano. "Mutaciones espontáneas" son mutaciones que surgen naturalmente, esto es, sin manipulación genética directa por el hombre, o por exposición a un mutágeno. La selección de un mutante espontáneo puede ser lograda cultivando la cepa y seleccionando las variantes deseadas, por ejemplo, mediante, la capacidad de la bacteria variable de mostrar una unión mejorada a mutans *Streptococci*. Métodos para la selección de mutantes espontáneos son bien conocidos en el arte (véase por ejemplo, Sambrook, Russell "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (2001); Ausubel, "Current Protocols in Molecular Biology". Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989)). Por ejemplo, tales mutaciones pueden ocurrir durante el cultivo, por ejemplo, durante el proceso de división celular normal acoplado con la replicación de ADN o durante el paso y/o impedimento del mutante del microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de bacterias del ácido láctico.

40 La cavidad oral es hogar de muchas especies diferentes de estreptococos y no es sorprendente, considerando que comparten el mismo hábitat, que puedan tener muchas características en común. Así, es preferible que el microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de bacterias del ácido láctico se una específicamente a mutans *Streptococci*. De acuerdo con lo anterior, el término "unirse específicamente" en el contexto de la presente invención significa que el microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico, preferiblemente un microorganismo perteneciente al género de *Lactobacillus* se une a mutans *Streptococcus*, en particular *Streptococcus mutans*, pero no se une a la mayoría de los otros, preferiblemente no a otras especies que pertenecen al género *Streptococcus*, en donde otras especies pertenecientes al género de *Streptococcus* son aquellas descritas en el Ejemplo 6. A saber, los microorganismos antes mencionados pertenecientes al grupo de bacterias del ácido láctico preferiblemente no se unen a bacterias pertenecientes a las especies de *Streptococcus salivarius*, preferiblemente perteneciente a la subespecie *thermophilus*, a la especie *Streptococcus oralis*, a la especie *Streptococcus mitis* y/o a la especie *Streptococcus sanguinis*. Más preferiblemente, no se une a *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* (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). Además, dicho microorganismo preferiblemente no se une a bacterias pertenecientes a los géneros diferentes a *Streptococcus*, por ejemplo, pertenecientes al género de *Staphylococcus*. Más preferiblemente, no se une a bacterias pertenecientes a las especies *Staphylococcus epidermidis*. Lo más preferiblemente, no se une a *Staphylococcus epidermidis* (DSMZ 1798) y/o *Staphylococcus epidermidis* (DSMZ 20044).

60 Como ya se mencionó anteriormente, se ha encontrado sorprendentemente que las bacterias de ácido láctico se seleccionan por su unión a *Streptococcus mutans* mientras que no se unen a las otras especies de *Streptococcus*. *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis* y/o *Streptococcus sanguinis*, muestran la capacidad también de unirse a otros mutans *Streptococci*, esto es, otras especies de *Streptococcus*, que muestran

5 las características comunes antes mencionadas y que de los cuales también se sospecha que son agentes  
causantes de la caries. Así, las bacterias del ácido láctico que muestran las características de unión específicas  
antes mencionadas para *Streptococcus mutans* muestran la capacidad de ser usadas también en relación con la  
profilaxis o tratamiento de caries producida por mutans *Streptococci* diferentes a *Streptococcus mutans*, en particular  
10 *S. sobrinus*. Así, en una realización preferida las bacterias del ácido láctico se caracterizan porque despliegan las  
características de unión antes descritas (esto es, (i) resistencia al tratamiento por calor; y (ii) resistencia al  
tratamiento con proteasa; y (iii) dependencia de calcio; y (iv) formación de la unión dentro de un rango de pH entre  
4.5 y 8.5: y (v) formación de la unión en presencia de saliva) en relación con *Streptococcus mutans* y la unión se  
prueba en un ensayo tal como el que se describe aquí anteriormente en el cual se utiliza *Streptococcus mutans*  
como bacteria perteneciente al grupo de mutans *Streptococci*.

Para la prueba de unión específica, preferiblemente cada una de las bacterias orales antes mencionadas se mezclan  
preferiblemente en una relación volumétrica de 3:1 con cultivos de *Lactobacillus* tal como se describe aquí  
anteriormente y se ensaya la agregación tal como se describe aquí y por ejemplo en el Ejemplo 4 o Ejemplo 5,  
preferiblemente como se describe en el Ejemplo 5.

15 Se demostró que el antes mencionado *Lactobacillus paracasei*, preferiblemente *L. paracasei* ssp. *paracasei* no se  
agrega a ninguna de las bacterias orales antes mencionadas pertenecientes al género de *Streptococcus* y no se une  
a las bacterias pertenecientes al género de *Staphylococcus* mencionados aquí anteriormente. Las cepas antes  
mencionadas de *Lactobacillus rhamnosus* no mostraron agregación a todas las especies antes mencionadas de  
*Streptococcus* y *Staphylococcus*, aparte de *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*. Preferiblemente el término  
20 "unión específicamente" también significa que el microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las  
bacterias de ácido láctico se une a tales cepas de mutans *Streptococci* que tienen la capacidad de ser un patógeno  
cariogénico dental.

La reacción de unión específica comprende la unión y, preferiblemente, la agregación de células de mutans  
*Streptococcus* como se describe aquí mediante el microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las  
25 bacterias del ácido láctico en la boca. Esta unión específica lleva, en consecuencia, a arrastrar las células de mutans  
*Streptococcus* por ejemplo, por el flujo salival o por un enjuague bucal o lavado bucal y similares tal como se  
describe aquí. La boca define la cavidad oral de los mamíferos, preferiblemente humanos o animales tales como  
mascotas, compuesta por mucosa oral (encías, labios, mejillas, paladar y piso de la boca), la lengua y los dientes  
(incluyendo estructuras artificiales). Preferiblemente, la reacción de unión específica del microorganismo antes  
30 mencionado perteneciente al grupo de las bacterias de ácido láctico a mutans *Streptococci* evita que las células de  
mutans *Streptococci* se unan a la superficie de un diente o dientes (o que mientras no estén unidas en teoría puedan  
llevar a desprendimiento de células de mutans *Streptococcus* de la superficie de un diente o dientes). En  
consecuencia la reacción de unión específica da como resultado el arrastre de células de mutans *Streptococcus*  
fuera de la boca, disminuyendo por lo tanto el agente causante de la caries y, así, prevenir y/o tratar la caries.

35 Se cree que los microorganismos antes mencionados pertenecientes al grupo de las bacterias del ácido láctico  
pueden unirse específicamente al antígeno de estreptococos I/II el cual también es conocido como antígeno B, IF,  
P1, SR, MSL-1 o PAc. Sin embargo, el microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias  
del ácido láctico puede unirse a cualquier otra proteína o estructura de superficie de mutans *Streptococci*, por lo  
tanto agregarse a mutans *Streptococci* y arrastrarlos fuera de la cavidad oral tal como se describe aquí. Es sabido  
40 que *Streptococcus mutans* se une a través de dicho antígeno de estreptococo I/II a la película. De acuerdo con lo  
anterior, cuando el microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico  
puede unirse, por ejemplo, a dicho antígeno de estreptococos I/II, *Streptococcus mutans*, así como otros  
microorganismos pertenecientes al grupo de mutans *Streptococci* son impedidos de unirse a la superficie de los  
dientes lo cual ayuda así a prevenir y/o tratar caries.

45 La película es un recubrimiento claro, delgado que contiene proteínas y lípidos (grasas) encontrados en la saliva. Se  
forma en segundos después de que se limpia la superficie de un diente. La formación de película es la primera etapa  
en la formación de placa dental. La placa dental es un depósito blando que se acumula sobre los dientes. La placa  
puede ser definida como una comunidad microbiana compleja, con más de  $10^{10}$  bacterias por miligramo. Se ha  
estimado que hasta 400 especies bacterianas distintas pueden encontrarse en la placa. Además de las células  
50 bacterianas, la placa contiene un pequeño número de células epiteliales, leucocitos y macrófagos. Las células están  
contenidas dentro de una matriz extracelular, la cual se forma a partir de productos bacterianos y saliva. La matriz  
extracelular contiene proteína, polisacáridos y lípidos. Una de las proteínas presentes en la saliva es la aglutinina la  
cual es por un lado la que se cree lleva a una eliminación parcial de *Streptococcus mutans* de la boca, sin embargo,  
por otro lado se sospecha que facilita la adhesión de *Streptococcus mutans* a la superficie de los dientes, facilitando  
55 por lo tanto la unión inicial de *Streptococcus mutans* a los dientes y, así, la aparición de las caries.

El hecho de que el microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias de ácido láctico se  
una específicamente a mutans *Streptococci* tal como se define aquí anteriormente puede ser probado fácilmente,  
entre otros, comparando la reacción de dicho microorganismo con células de mutans *Streptococcus* con un  
microorganismo que también pertenece al género de *Lactobacillus* que, sin embargo, no se une específicamente a

mutans Streptococci empleando preferiblemente el método tal como se describe aquí más arriba y en los ejemplos anexos aquí más adelante.

5 Preferiblemente, el microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico es capaz de unirse específicamente a Streptococcus mutans serotipo c (DSMZ 20523) y/o serotipo e (NCTC 10923) y/o serotipo f (NCTC 11060) y/o Streptococcus sobrinus DSM 20742 y/o Streptococcus Ratti DSM 20564 y/o Streptococcus cricetus DSM 20562 y/o Streptococcus ferus DSM 20646 y/o Streptococcus macacae DSM 20714.

10 Esto significa que el microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico se une preferiblemente a al menos un microorganismo seleccionado del grupo consistente de Streptococcus mutans serotipo c (DSMZ 20523), serotipo e (NCTC 10923), serotipo f (NCTC 11060), Streptococcus sobrinus DSM 20742, Streptococcus ratti DSM 20564, Streptococcus cricetus DSM 20562, Streptococcus ferus DSM 20646 y Streptococcus macacae DSM 20714. Más preferiblemente, el microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico se une a cualquier combinación, agrupamiento o subagrupamiento de las bacterias antes mencionadas. Aún más preferiblemente, el microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico se une a todas las bacterias antes mencionadas. De acuerdo con la presente invención un "serotipo" es una propiedad antigénica de una célula bacteriana, preferiblemente de una célula de Streptococcus mutans o Streptococcus sobrinus identificada por métodos serológicos conocidos en el arte.

15 Como se describió anteriormente, el enlazamiento específico del microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico a mutans Streptococci es resistente al tratamiento con calor. De acuerdo con lo anterior, el microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico son tratadas con calor, por ejemplo, a una temperatura por encima de 15°C o 37°C. Más preferiblemente las células se incuban a una temperatura de más de 55°C, aún más preferiblemente de más de 65°C, particularmente de manera preferible de más de 95°C y lo más preferido a 121°C. Después del enfriamiento, la capacidad del microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico para unirse específicamente a mutans Streptococci se determina como se describe aquí.

20 La temperatura correspondiente puede depender de la especie específica de Lactobacillus pero puede ser determinada fácilmente por la persona experimentada mediante experimentación de rutina, por ejemplo, incubando las células correspondientes a diferentes temperaturas y determinando la cantidad de células de Lactobacillus las cuales son aún capaces de unirse específicamente a mutans Streptococci utilizando métodos como los descritos en los ejemplos aquí.

25 En general, el tratamiento por calor debería durar un período de tiempo de al menos 1 minuto. Preferiblemente, el tratamiento por calor dura durante un período de tiempo de al menos n minutos, en donde n es un entero en el rango de 2 a 60, siendo n = 20 particularmente preferido. En relación con el uso de la presente invención tal como se describe en las reivindicaciones, el tratamiento por calor se lleva a cabo a temperatura de más de 95°C a al menos 20 minutos. Sin embargo, en principio no hay límite superior para el tiempo de incubación. Sin embargo, preferiblemente no es mayor de 4, 3, 2 o 1 horas. El tratamiento con calor más preferido es al menos 20 minutos a una temperatura de 121°C en vapor saturado que tiene una presión atmosférica de 2 bar. El tratamiento por calor más preferido se considera como causante de la anulación de cualquier función de una proteína y de cualquier vitalidad de las células, lo que así distingue el microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido de otro microorganismo en que es capaz aún de unirse específicamente al mutans Streptococci. Por lo tanto, es muy útil para el uso en cualquier alimento, producto alimenticio, bebida o composición en el contexto de la presente invención si se desea que el microorganismo no sea similar.

30 Preferiblemente, el microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico, que ha sido sometido a un tratamiento por calor como se describe aquí anteriormente, tiene una capacidad incrementada de unirse específicamente a una bacteria perteneciente al grupo de mutans Streptococci. El término "capacidad incrementada" significa un aumento de la unión, según es medible, mediante un ensayo tal como se describe aquí anteriormente, preferiblemente como se describe en el Ejemplo 5, en al menos 5%, preferiblemente al menos 10%, más preferiblemente al menos 20% y lo más preferiblemente al menos 30%. En una realización preferida, un microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico, que tiene una capacidad incrementada de unirse específicamente a una bacteria perteneciente al grupo de mutans Streptococci al haber sido sometido a un tratamiento por calor pertenece a la especie Lactobacillus paracasei, más preferiblemente a L. paracasei ssp. paracasei y lo más preferiblemente a L. paracasei ssp. paracasei Lb-Ob-K5 (DSM 16671).

35 La unión específica del microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico, específicamente del género Lactobacillus, se caracteriza adicionalmente por su resistencia al tratamiento con proteasa el cual es un tratamiento con una proteasa seleccionada del grupo consistente de pronasa E, proteinasa K, tripsina y quimiotripsina. Estas proteinasas y proteasas no muestran especificidad y, así, se consideran como degradadoras de cualquier proteína que esté en la superficie celular de un microorganismo. Otras proteasas, que son conocidas por tener preferencias para ciertos patrones de residuos de aminoácidos son elastasa, trombina, aminopeptidasa I, carboxipeptidasa, dostripaina, endoproteinasa, papaína, pepsina o proteasas. Estas últimas proteasas también podrían ser utilizadas para probar si la unión específica del microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico a mutans Streptococci es resistente a estas últimas

proteasas más específicas. Así, después del tratamiento con proteasa, el cual se describe en los ejemplos anexos, el microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico aún es capaz de unirse específicamente a mutans Streptococci.

5 Además, la unión específica del microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico se caracteriza adicionalmente por su dependencia del calcio. Preferiblemente, la unión específica tiene lugar en la presencia de una concentración de iones calcio entre 0.05 mM y 500 mM, preferiblemente entre 1 mM y 100 mM. Se prefiere particularmente la concentración de calcio entre 2 mM y 30 mM. La dependencia de la unión específica en el calcio puede probarse según se describe en los ejemplos anexos.

10 Además, la unión específica al microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico se mantiene en un rango de pH entre 4.0 y 9.0, preferiblemente entre 4.0 y 7.0. En particular, el valor de pH al cual tiene a un lugar la unión específica es preferiblemente 4.5. El ensayo del mantenimiento de la unión específica a lo largo del rango de pH descrito anteriormente se muestra en los ejemplos anexos. Adicionalmente, el enlazamiento específico es independiente del magnesio. Así, no es necesario que iones magnesio o sales de magnesio estén presentes lo cual se demuestra en los ejemplos anexos.

15 Una característica aún adicional de la unión específica es su ocurrencia en la presencia de saliva. La saliva es una secreción exógena que es sintetizada por las glándulas salivares. Es un líquido complejo que contiene, además de aproximadamente 99% de agua una multiplicidad de compuestos orgánicos e inorgánicos. Los ingredientes fisiológicos de la saliva son, entre otro, enzimas, por ejemplo, amilasas, carboanhidrasas, lisozima, peroxidasas o proteínas, por ejemplo, mucinas, lactoferrina, proteínas ricas en prolina, cistatinas, histatinas o estaterinas o IgA soluble. Así, aunque hay presente en la saliva una variedad de sustancias potencialmente interferentes, la unión específica de los microorganismos antes mencionados pertenecientes al grupo de las bacterias del ácido láctico no fue perturbada o impedida. Para probar la unión específica en presencia de saliva, se prefiere que la saliva utilizada contenga preferiblemente las especies de Streptococcus descritas en el Ejemplo 6 y/o las especies de Staphylococcus del Ejemplo 6. Sin embargo, la especie Lactobacillus rhamnosus tal como se describió anteriormente se probó en cuanto a su unión específica a mutans Streptococci en presencia de saliva, prefiriéndose que se omitan Streptococcus salivarius ssp. thermophilus. La unión específica se prueba como se describe aquí.

20 Las características antes mencionadas del microorganismo arriba antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico lo hacen un agente robusto y efectivo para evitar y/o tratar caries puesto que se administra principalmente en diversas formas a la boca incluyendo la cavidad oral y los dientes en donde, entre otros, está presente la saliva que incluye ciertas proteasas y valores bajos de pH después de la ingestión de alimentos que contienen carbohidratos. Además, la resistencia al calor tiene efectos benéficos para agregar el microorganismo antes mencionado al grupo de bacterias del ácido láctico como aditivo a alimentos durante la preparación de dicho producto alimenticio. A saber, el producto alimenticio frecuentemente es esterilizado por calor, precocido, pasteurizado y similares lo cual es nocivo para la viabilidad de los microorganismos.

30 En otro aspecto de la presente invención se emplea un derivado del microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico en el uso descrito. El término "derivado del microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico" significa una forma inactivada o fragmento del microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico, el cual se inactiva térmicamente o liofiliza, en donde dicha forma inactivada o fragmento retiene la capacidad de unirse específicamente a mutans Streptococci.

35 De acuerdo con la presente invención el término "forma inactivada del microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico" incluye una célula muerta o inactivada del microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico, preferiblemente de la especie Lactobacillus divulgada aquí la cual no es más capaz de formar una colonia individual sobre una placa específica para microorganismos que pertenecen al género de Lactobacillus. Dicha célula muerta o inactivada puede tener una membrana celular intacta o rota. Los métodos para matar o inactivar células del microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico son conocidos en la técnica. El-Nezami et al., J. Food Prot. 61 (1998), 466-468 describe un método para inactivar especies de Lactobacillus por radiación UV. Preferiblemente, las células de los microorganismos antes mencionados pertenecientes al grupo de las bacterias del ácido láctico son inactivadas térmicamente o liofilizadas como se describe en los ejemplos anexos. La liofilización de las células tal como se describe anteriormente tiene la ventaja de que pueden ser almacenadas y manipuladas fácilmente a la vez que retiene su capacidad de unirse específicamente a mutans Streptococci. Además, las células liofilizadas pueden cultivarse de nuevo cuando se aplican bajo condiciones conocidas en la técnica a medios líquidos o sólidos apropiados. La liofilización se hace por métodos conocidos en la técnica. Preferiblemente, se lleva a cabo durante al menos 2 horas a temperatura ambiente, esto es cualquier temperatura entre 16°C y 25°C. Además, las células liofilizadas del microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico son estables durante al menos 4 semanas a una temperatura de 4°C de manera que aún se pueden unir específicamente a mutans Streptococci como se muestra en el Ejemplo 7 u 8 aquí más adelante. La inactivación térmica puede lograrse incubando las células del microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico durante al menos 2 horas a una temperatura de 170°C. Aún así, la inactivación térmica se

logra preferiblemente sometiendo dichas células al autoclave a una temperatura de 121°C durante al 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 antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico se alcanza congelando dichas células durante al menos 4 semanas, 3 semanas, 2 semanas, 1 semana, 12 horas, 6 horas, 2 horas o 1 hora a -20°C. Se prefiere que al menos 70%, 75% u 80%, más preferiblemente 85%, 90% o 95% y particularmente de manera preferible al menos el 97%, 98%, 99% y más particularmente de preferencia 99.1%, 99.2%, 99.3 %, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8% o 99.9% y lo más particularmente preferido el 100% de las células del análogo del microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico estén muertas o inactivadas, sin embargo, teniendo aún la capacidad de unirse específicamente a mutans Streptococci. Si la forma inactivada, análogo o fragmento del microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico está en efecto muerta o inactivada puede probarse por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante una prueba de viabilidad.

El término "forma inactivada del microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico" también describe lisados, fracciones o extractos del microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico, preferiblemente de la especie *Lactobacillus* divulgada aquí, en donde dichos lisados, fracciones o extractos son preferiblemente capaces de unirse específicamente a una bacteria perteneciente al grupo de mutans Streptococci. Esta capacidad de unión puede probarse tal como se describe aquí y se describe en particular en los ejemplos anexos. En un caso, un lisado, fracción o extracto de un microorganismo tal como se describió anteriormente, puede no unirse específicamente a una bacteria perteneciente al grupo de mutans Streptococci, luego la persona experimentada puede, por ejemplo, purificar adicionalmente dicho lisado, fracción o extracto por métodos conocidos en el arte, los cuales se ejemplifican aquí más adelante, de tal manera que se retiren sustancias que inhiban la unión. Después de esto la persona experimentada en la técnica puede de nuevo probar dicho lisado, fracción o extracto en cuanto a si se une específicamente a una bacteria perteneciente al grupo de mutans Streptococci.

El término "lisado" significa una solución o suspensión en un medio acuoso de células del microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico que están rotas. Sin embargo, el término no debería ser considerado limitante de manera alguna. La célula lisada comprende, por ejemplo, macromoléculas, tales como ADN, ARN, proteínas, péptidos, carbohidratos, lípidos y similares y/o micromoléculas, tales como aminoácidos, azúcares, ácidos lipídicos y similares, o fracciones de los mismos. Adicionalmente, dicho lisado comprende residuos de células que pueden ser de estructura suave o granular. Preferiblemente, dicho lisado comprende la pared celular o la membrana celular o ambas o porciones o fragmentos de la pared celular o de la membrana celular o ambos. Los métodos para preparar lisados de células de microorganismos son conocidos en la técnica, por ejemplo, utilizando una prensa French, un molino de células utilizando perlas de vidrio o hierro o lisis celular enzimática y similares. Además, las células en lisis se relacionan con diversos métodos conocidos en la técnica para abrir/destruir células. El método de lisado de una célula no es importante y puede emplearse cualquier método que pueda alcanzar la lisis de las células del microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico. Uno apropiado puede escogerse por la persona experimentada en la técnica, por ejemplo, la apertura/destrucción de las células puede hacerse enzimáticamente, químicamente o físicamente. Ejemplos no limitantes de enzimas y cócteles de enzimas son proteasas, como la proteinasa K, lipasas o glicosidasas; ejemplos no limitantes de agentes químicos son ionóforos, detergentes, tales como dodecil sulfato de sodio, ácidos o bases; y ejemplos no limitantes de medios físicos son alta presión, como la presión French, osmolaridad, temperatura, como calor o frío. Adicionalmente, también puede utilizarse un método que emplea una combinación apropiada de una enzima diferente a la enzima proteolítica, un ácido, una base y similares. Por ejemplo, las células del microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico son sometidas a lisis por congelación y descongelación, más preferiblemente congelación a temperaturas por debajo de -70°C y descongelación a temperaturas de más de 30°C, el congelamiento se prefiere particularmente a temperaturas por debajo de -75°C y el descongelamiento se prefiere a temperaturas de más de 35°C y lo más preferido son temperaturas de congelamiento por debajo de -80°C por debajo de -80°C y temperaturas de descongelamiento de más de 37°C. También se prefiere que dicho congelamiento/descongelamiento se repita durante al menos 1 vez, más preferiblemente durante al menos 2 veces, aún se prefiere más durante al menos 3 veces, particularmente se prefiere durante al menos 4 veces y lo más preferido durante al menos 5 veces.

De acuerdo con lo anterior, las personas experimentadas en la técnica pueden preparar los lisados deseados haciendo referencia a las explicaciones generales anteriores, y modificando o alterando apropiadamente estos métodos, si es necesario. Preferiblemente, el medio acuoso usado para los lisados tal como se describe es agua, solución salina fisiológica, o una solución reguladora. Una ventaja del lisado celular bacteriano es que puede ser producido fácilmente y almacenado con eficiencia de costes puesto que se requieren instalaciones menos técnicas.

Preferiblemente, el término "extracto" significa un componente subcelular del microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de bacterias del ácido láctico, por ejemplo, una macromolécula, como una proteína, ADN, ARN, un péptido, un carbohidrato, un lípido y similares y/o una micromolécula como un aminoácido, un azúcar, un ácido lipídico y similares o cualquier otro compuesto o molécula orgánicos, o una combinación de dichas macromoléculas y/o micromoléculas o cualquier fracción de ellas, en donde dicho extracto retiene la capacidad de unirse específicamente a una bacteria perteneciente al grupo de mutans Streptococci. Esta unión específica puede

probarse según se describe aquí y en particular como se describe en los ejemplos anexos. Preferiblemente, dicho extracto comprende la pared celular o la membrana celular o ambas o porciones o fragmentos de la pared celular o la membrana celular o de ambas. Más preferiblemente, el término "extracto" se refiere a cualquiera de los componentes subcelulares antes descritos en un medio libre de células.

5 Un extracto puede ser obtenido sometiendo células a lisis de acuerdo con diversos métodos conocidos en la técnica para abrir/destruir las células, tal como se describe aquí anteriormente y/o como sobrenadante de un procedimiento de centrifugación de un cultivo del microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico en cualquier líquido, medio o regulador apropiado conocido para la persona experimentada en la técnica o de un lisado de tal cultivo o cualquier otra suspensión celular adecuada. Más preferiblemente, el extracto  
10 puede ser un lisado purificado o sobrenadante de cultivo celular o cualquier fracción o subporción de los mismos, en donde dicho lisado o sobrenadante de cultivo celular o cualquier fracción o subporción de los mismos purificados retienen la capacidad de unirse específicamente a una bacteria perteneciente al grupo de mutans Streptococci. Esta unión puede ser probada tal como se describe aquí y en particular como se describe en los ejemplos anexos. Métodos adecuados para fraccionamiento y purificación de un lisado, sobrenadante de un cultivo o un extracto son  
15 conocidos para la persona experimentada en la técnica y comprenden, por ejemplo, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía en fase reversa, y cromatografía con otro material cromatográfico en columna o métodos por lotes, otros métodos de fraccionamiento, por ejemplo métodos de filtración, por ejemplo ultrafiltración, diálisis, diálisis y concentración con exclusión por tamaño en centrifugación, centrifugación en gradientes de densidad o matrices por etapas, precipitación, por ejemplo  
20 precipitaciones por afinidad, salificación o desalificación (precipitación con sulfato de amonio), precipitaciones alcohólicas o cualquier otro método adecuado proteinoquímico, de biología molecular, bioquímico, inmunológico, químico o físico.

Los lisados también son preparaciones de fracciones de moléculas de los lisados antes mencionados. Estas fracciones pueden ser obtenida por métodos conocidos por los experimentados en la técnica, por ejemplo,  
25 cromatografía, incluyendo por ejemplo cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía en fase reversa y cromatografía con otro material cromatográfico en columna o en métodos por lotes, otros métodos de fraccionamiento, por ejemplo métodos de filtración, por ejemplo, ultrafiltración, diálisis, diálisis y concentración con exclusión por tamaño en centrifugación, centrifugación en gradientes de densidad o matrices por etapas, precipitación, por ejemplo, precipitaciones por afinidad, salificación o  
30 desalificación (precipitación con sulfato de amonio), precipitaciones alcohólicas u otros métodos proteinoquímicos, de biología molecular, bioquímicos, inmunológicos, químicos o físicos para separar los componentes anteriores de los lisados. En una realización preferida se prefieren aquellas fracciones que son más inmunogénicas que otras. Los experimentados en la técnica son capaces de seleccionar un método adecuado y determinar su potencial inmunogénico haciendo referencia a las explicaciones generales anteriores y explicaciones específicas en los  
35 ejemplos aquí y modificando o alterando apropiadamente estos métodos, si es necesario.

De acuerdo con lo anterior, el término "forma inactivada del microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico" describe también filtrados de un microorganismo tal como describen aquí anteriormente, preferiblemente de la especie *Lactobacillus* divulgada aquí, en donde dichos filtrados retienen preferiblemente la capacidad de unirse específicamente a una bacteria perteneciente al grupo de mutans Streptococci. Esta unión puede ser probada como se describe aquí y en particular como se describe en los ejemplos  
40 anexos. En un caso, un filtrado del microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico, tal como se describe aquí anteriormente, puede no específicamente unirse a una bacteria perteneciente al grupo de mutans Streptococci, luego la persona experimentada en la técnica puede, por ejemplo, purificar adicionalmente dicho filtrado por métodos conocidos en la técnica, los cuales se ejemplifican aquí más adelante, de tal manera que retiren sustancias que inhiben la unión. Después de esto la persona experimentada en la técnica puede de nuevo probar dicho filtrado acerca de si específicamente se une a una bacteria perteneciente al grupo de mutans Streptococci.

El término "filtrado" significa una solución o suspensión libre de células de un microorganismo tal como se describe aquí anteriormente las cuales han sido obtenidas como sobrenadantes de un procedimiento de centrifugación de un cultivo del microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico en cualquier líquido, medio o regulador apropiado conocido para la persona experimentada en la técnica. Sin embargo, el término no debería ser considerado de ninguna manera limitante. El filtrado comprende, por ejemplo, macromoléculas, como ADN, ARN, proteínas, péptidos, carbohidratos, lípidos y similares y/o micromoléculas, como aminoácidos, azúcares, ácidos lipídicos y similares, o fracciones de ellos. Los métodos para preparar filtrados de microorganismos son  
50 conocidos en la técnica. Además, "filtrado" se relaciona con diversos métodos conocidos en la técnica. El método exacto no es importante y puede emplearse cualquier método que pueda lograr la filtración de las células del microorganismo de la invención, tal como se describió aquí más arriba.

"Un fragmento del microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico" describe cualquier parte de las células del microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico. De acuerdo con la invención dicho fragmento es una fracción de membrana obtenida por preparación de membrana y retiene la capacidad de unirse específicamente al grupo de mutans Streptococci. Las  
60

preparaciones de membrana de los microorganismos pertenecientes al género de *Lactobacillus* pueden obtenerse por métodos conocidos en el arte, por ejemplo, empleando el método descrito en Rollan et al., *Int. J. Food Microbiol.* 70 (2001), 303-307, 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 aquí descritos del microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico retiene la capacidad de unirse específicamente a mutans *Streptococci* lo cual se describe en detalle aquí.

Tal como se define en las reivindicaciones, en caso de que se use un derivado de acuerdo con la presente invención, dicho derivado del microorganismo es una forma inactivada de dicho microorganismo o un fragmento de dicho microorganismo, siendo dicho microorganismo inactivado térmicamente o liofilizado, en donde dicho fragmento es una fracción de membrana obtenida mediante una preparación de membrana y donde dicha forma inactivada o dicho fragmento retiene la capacidad de unirse específicamente a una bacteria perteneciente al grupo de mutans *Streptococci*.

Un aspecto en relación con la presente invención se relaciona con el uso del microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico, un derivado o mutante o un análogo o un fragmento del mismo para la preparación de una composición anticariogénica, preferiblemente una composición farmacéutica o cosmética, para el tratamiento o prevención de caries causada por mutans *Streptococci* diferentes a *Streptococcus mutans*. Preferiblemente, la composición comprende un microorganismo perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico, el cual es capaz de unirse específicamente a mutans *Streptococci* o a un mutante, derivado o fragmento de este microorganismo. Más preferiblemente, este microorganismo es un microorganismo depositado tal como se describió aquí anteriormente o un mutante o derivado del mismo o un análogo o fragmento de dicho microorganismo. En una realización preferida, dicha composición comprende un microorganismo tal como se describió anteriormente en una cantidad de  $10^2$  hasta  $10^{12}$  células, preferiblemente  $10^3$  hasta  $10^8$  células por mg en una forma sólida de la composición. En caso de una forma líquida de las composiciones, la cantidad de microorganismos está entre  $10^2$  hasta  $10^{13}$  células por ml. Sin embargo, para composiciones específicas la cantidad del microorganismo puede ser diferente a la descrita aquí. 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 contenga no más de 1% (p/p) de lactosa, por ejemplo contiene 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, pero también preferido es que la composición no contenga lactosa.

En un aspecto adicional en relación con la presente invención, tal composición anticariogénica puede ser producida comprendiendo las etapas de formular un microorganismo que pertenece al grupo de las bacterias del ácido láctico que es capaz de unirse específicamente a mutans *Streptococci* o a un mutante, derivado, análogo o fragmento de este microorganismo con un vehículo o excipiente cosmética, oral o farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, este microorganismo es un microorganismo depositado como se describió aquí anteriormente o un mutante, derivado o fragmento del mismo. Una composición anticariogénica preferida como la usada de acuerdo con la presente invención no contiene lactosa en un rango entre 1% (p/p) y 6% (p/p). También se prefiere que la composición contenga no más de 1% (p/p) de lactosa, por ejemplo 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 de 6%, 7%, 8%, etc. (p/p) de lactosa. Alternativamente, pero también preferido es que la composición anticariogénica no contenga lactosa.

El término "composición", tal como se utiliza de acuerdo con la presente invención se relaciona con composiciones que comprenden al menos un microorganismo o mutantes o derivados como se describió anteriormente, preferiblemente un microorganismo depositado tal como se describió anteriormente o un análogo o un fragmento de dicho microorganismo. Se prevé que las composiciones tal como se utilizan de acuerdo con la presente invención, los cuales están descritos aquí más adelante comprenden los ingredientes antes mencionados en cualquier combinación. Opcionalmente, puede comprender al menos un ingrediente adicional adecuado para prevenir y/o tratar caries. De acuerdo con lo anterior, puede comprender opcionalmente cualquier combinación de los ingredientes adicionales descritos aquí más adelante. El término "ingredientes adecuados para prevenir y/o tratar caries" abarca compuestos o composiciones y/o combinaciones de los mismos los cuales bien inhiben la unión de mutans *Streptococci* a la superficie de los dientes, a películas y/o los cuales inactivan mutans *Streptococci*. Más preferiblemente, dicho término abarca compuestos o composiciones y/o combinaciones de los mismos que pueden inhibir la adhesión de mutans *Streptococci* a la superficie de los dientes, inhiben la actividad de glicosiltransferasas de mutans *Streptococci*, inhiben o inactivan mutans *Streptococci*, inhiben la unión dependiente de aglutinina de mutans *Streptococci* y/o inhiben la unión dependiente de sacarosa de mutans *Streptococci* tal como será descrito más adelante.

En particular, se prevé que la composición comprende de manera adicional opcionalmente compuestos que inhiben la adhesión de mutans *Streptococci* a la superficie del diente. De acuerdo con lo anterior, se prevé que tal compuesto es un inhibidor del péptido de señal de competencia (CSP) de *Streptococcus mutans*. Dicho inhibidor está descrito en CA 2,302,861 como un derivado o un fragmento de dicho CSP, el cual inhibe competitivamente la unión de dicho CSP a su receptor natural, un receptor de histidina quinasa, o el cual es un anticuerpo contra dicho

- CSP. Dicho inhibidor previene el desarrollo de un ambiente de biopelícula de placa dental sobre la superficie del diente y, así, evita el enlazamiento de mutans Streptococci. Alternativamente, la composición tal como se usa de acuerdo con la presente invención puede comprender adicionalmente de manera opcional fragmentos de polipéptidos del antígeno de Streptococcus mutans I/II que son útiles en el tratamiento y/o prevención de la caries dental. Tales fragmentos de polipéptido están descritos en US 6,500,433. A saber, dichos fragmentos de polipéptidos pueden tener la capacidad de adherirse a la superficie de los dientes de los mamíferos uniéndose a la aglutinina de manera competitiva con el antígeno I/II de Streptococcus mutans de origen natural, previniendo o disminuyendo así la adhesión de S. mutans al diente. Algunos de los péptidos de US 6,500,433 han demostrado inhibir la adhesión de S. mutans a un modelo de superficie de diente (saliva humana entera adsorbida a los pozos de placas de adhesión de poliestireno o perlas de hidroxiapatita). De acuerdo con lo anterior, la US 6,500,433 describe estos péptidos para comprender uno o más sitios de adhesión y se adherirán a los dientes de los mamíferos de manera competitiva con el SA I/II de origen natural. Otro ingrediente opcional de la composición tal como se usa de acuerdo con la presente invención es una proteína de adhesión asociada fimbrial de Streptococcus mutans, smaA, o un fragmento de la misma tal como se describe en WO 00/66616. La proteína SmaA es una proteína de adhesión de las fimbrias de S. mutans que media la unión de la bacteria a la película salival, lo que se cree sucede a través del enlazamiento de la proteína salival de 52 kd, la amilasa. La proteína SmaA madura tiene un peso molecular de aproximadamente 65 kilodaltons (kd) medido sobre un gel de poli(acrilamida) reductor, exhibe la capacidad de unirse a la amilasa, y es la principal proteína fimbrial inmunodominante de S. mutans. De acuerdo con lo anterior, se cree que la SmaA compete con mutans Streptococci por los sitios de adhesión sobre la superficie de los dientes.
- Tal como se describió anteriormente, se prevé que los compuestos que inhiben la actividad de la glicosiltransferasa de mutans Streptococci están comprendidos adicionalmente de manera opcional en una composición tal como se utiliza de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, la US 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 tipo novedoso de propolis y sus fracciones químicas sobre las glicosiltransferasas y sobre el crecimiento y adherencia de Streptococcus mutans. De acuerdo con lo anterior, dicho tipo novedoso de propolis y sus fracciones químicas se contemplan como un ingrediente adicional opcional de la composición tal como se utiliza de acuerdo con la presente invención. Koo et al., J. Antimicrob. Chemother. 52 (2003), 782-789 describe que la apigenina y el tt-farnesol inhiben la acumulación de biopelícula de Streptococcus mutans y la producción de polisacáridos. Por lo tanto, la apigenina y el tt-farnesol se contemplan como opcionalmente comprendidos en la composición tal como se utiliza de acuerdo con la presente invención. Puesto que los ésteres de carbohidratos de ácidos grasos están descritos en Devulapalle et al., Carbohydr. Res. 339 (2004), 1029-1034 para afectar la actividad de la glicosiltransferasa, dichos ésteres de carbohidrato de ácidos grasos están contemplados como comprendidos opcionalmente en la composición tal como se usan de acuerdo con la presente invención.
- La inhibición directa de Streptococcus mutans está descrita, por ejemplo, en WO 2004/000222. A saber, los bacteriófagos genéticamente modificados específicos para Streptococcus mutans se utilizan para tratar caries bacterianas causadas por Streptococcus mutans. La WO 2004/017988 describe una composición de proteasa biológicamente activa y al menos una glicosidasa biológicamente activa que se utiliza para tratar caries bacteriana. Imazato et al., Biomaterials 24 (2003), 3605-3609 describe que el bromuro de metacrililoiloxidodecilo piridinio (MDPB) se utiliza para inhibir el crecimiento de Streptococcus mutans. De acuerdo con lo anterior, se prevé que los compuestos antes mencionados pueden estar comprendidos opcionalmente de manera adicional en la composición tal como se utiliza de acuerdo con 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 de Streptococcus mutans dependiente de aglutinina o dependiente de sacarosa se contemplan como comprendidos opcionalmente de manera adicional en la composición tal como se utiliza de acuerdo con la presente invención. Además, la composición tal como se utiliza de acuerdo con la presente invención puede comprender adicionalmente de forma opcional una mutanasa (1,3-glucanasa) la cual, por ejemplo, es descrita en DE 2152620 o Fuglsang (2000), loc. cit. o un antibiótico contra Streptococcus mutans, por ejemplo, los descritos en US 6,342,385; US 5,932,469; US 5,872,001 o US 5,833,958. Además, se anota que la composición tal como se utiliza de acuerdo con la presente invención puede comprender opcionalmente uno o más de los ingredientes opcionales antes mencionados los cuales son adecuados para prevenir y/o tratar caries. Así, dicha composición puede contener al menos dos, tres, cuatro, cinco, etc., esto es "n" ingredientes opcionales, en donde "n" es un entero mayor que 2 el cual no está limitado. Dichos ingredientes opcionales pueden ser combinados en cualquier combinación posible.
- La composición puede estar en forma sólida, líquida o gaseosa y puede estar, entre otros, en la forma de polvos, tabletas, preparaciones en película, soluciones, aerosoles, gránulos, píldoras, suspensiones, emulsiones, cápsulas, jarabes, líquidos, elixires, extractos, tinturas o extractos fluidos o en una forma que sea particularmente adecuada para administración oral.
- Las preparaciones líquidas adecuadas para administración oral, por ejemplo jarabes pueden prepararse utilizando agua, sacáridos convencionales tales como sacarosa, sorbitol y fructosa, glicoles tales como polietileno glicol y propileno glicol, aceites tales como aceite de semilla de sésamo, aceite de oliva y aceite de soja, antisépticos tales como p-hidroxibenzoato éster, conservantes tales como derivados de p-hidroxibenzoato, por ejemplo p-

hidroxibenzoato de metilo y benzoato de sodio, y otros materiales tales como sabores, por ejemplo sabores de fresa o yerbabuena.

Adicionalmente, las preparaciones adecuadas para administración oral, por ejemplo tabletas, polvos y gránulos pueden ser producidos, utilizando sacáridos convencionales, tales como sacarosa, glucosa, manitol y sorbitol, almidones tales como almidón de patata, trigo y maíz, materiales inorgánicos tales como carbonato de calcio, sulfato de calcio, hidrógeno carbonato de sodio y cloruro de sodio, polvos vegetales tales como celulosa en cristal, polvo de regaliz y polvo de genciana, excipientes tales como pinedex, desintegrantes tales como almidón, agar, polvo de gelatina, celulosa en cristal, 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 aceite de silicona, aglomerantes tales como alcohol polivinílico, hidroxipropil celulosa, metil celulosa, etil celulosa, carmelosa, gelatina y fluido de goma de almidón, surfactantes tales como ésteres de ácidos grasos, y plastificantes tales como glicerina. Una preparación de una película puede ser preparada por métodos conocidos en la técnica. Un ejemplo para la preparación de una película se da en el Ejemplo 27 aquí.

En el caso de administración oral ordinaria, la dosis del microorganismo antes descrito o su análogo o fragmento puede ser (en peso seco) como se describe aquí anteriormente con respecto al número de células o con respecto a la masa, por ejemplo, 1 µg a 50 g, 1 µg a 10 g, 1 µg a 5 mg, 1 µg a 1 mg o cualquier otro peso por sujeto por día o en varias porciones diariamente. En el caso de dosificación a animales no humanos, adicionalmente, la dosis varía dependiendo de la edad y especies de un animal y la naturaleza o severidad del síntoma en el mismo. Sin ninguna limitación específica, la dosis para animales es 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 al día. Sin embargo, estas dosis y el número de dosificaciones varía dependiendo de las condiciones individuales.

Preferiblemente, la composición anticariogénica tal como se utiliza de acuerdo con la presente invención es una composición cosmética que comprende adicionalmente un vehículo o excipiente cosméticamente aceptable. Más preferiblemente, dicha composición cosmética es un dentífrico, goma de mascar, tableta, enjuague bucal, enjuague en espuma, hilo dental o cinta dental que tiene una actividad contra el mutans *Streptococci*. Una composición cosmética preferida que se utiliza de acuerdo con la presente invención no contiene lactosa en un rango entre 1% (p/p) y 6% (p/p). También se prefiere que la composición cosmética contenga 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 la composición cosmética contenga más de 6%, 7%, 8%, etc. (p/p) de lactosa. Alternativamente pero también preferido es que la composición cosmética no contenga lactosa.

La composición cosmética tal como se utiliza de acuerdo con la presente invención comprende el microorganismo, mutante, derivado, análogo o fragmento del mismo tal como se describe anteriormente en relación con la composición de la invención y adicionalmente un vehículo cosmética u oralmente aceptable. Preferiblemente, como se mencionó en relación con la composición tal como se usa de acuerdo con la presente invención el microorganismo, mutante, derivado, análogo o fragmento del mismo es un microorganismo, mutante, derivado o fragmento tal como se describió aquí anteriormente. Preferiblemente la composición cosmética tal como se utiliza de acuerdo con la presente invención es para uso en aplicaciones orales. De acuerdo con lo anterior, puede estar en la forma de una pasta dental, dentífrico, polvo dental, gel oral tópico, enjuague bucal, producto para dentaduras, aspersión bucal, tableta, tableta oral, goma de mascar, hilo dental o cinta dental.

El término "vehículo oral o cosméticamente aceptable" tal como se utiliza aquí significa un vehículo adecuado, el cual puede ser utilizado para aplicar las presentes composiciones a la cavidad oral de una manera segura y efectiva. Tal vehículo puede incluir materiales tales como fuentes de ion fluoruro, agentes adicionales anticálculos, reguladores, otros materiales abrasivos, fuentes de peróxido, sales de bicarbonato de metales alcalinos, materiales aglomerantes, humectantes, agua, surfactantes, dióxido de titanio, sistemas saborizantes, agentes endulzantes, xilitol, agentes colorantes y mezclas de los mismos. El término "cantidad segura y efectiva" tal como se utiliza aquí, significa una cantidad suficiente para limpiar los dientes y reducir manchas/placa/gingivitis/cálculos sin poner en riesgo los tejidos y estructuras de la cavidad oral.

El pH de las composiciones presentes aquí descritas varía preferiblemente desde aproximadamente 3.0 hasta aproximadamente 9.0, siendo el pH preferido desde aproximadamente 5.5 hasta aproximadamente 9.0 y siendo el pH más preferido 7.0 hasta aproximadamente 8.5 o 9.0.

La composición cosmética es un producto, en el cual en el curso ordinario de uso, no se traga intencionalmente para propósitos de administración sistémica de agentes terapéuticos particulares, sino que se retiene principalmente en la cavidad oral durante un tiempo suficiente para poner en contacto sustancialmente todas las superficies dentales y/o tejidos orales para propósitos de actividad oral. La composición oral puede ser una composición oral en fase sencilla o puede ser una combinación de dos o más composiciones orales.

El término "dentífrico", tal como se utiliza aquí, significa pasta, gel o formulaciones líquidas a menos que se especifique otra cosa. La composición dentífrica puede estar en cualquier forma deseada, tal como en bandas en profundidad, bandas en superficie, capas múltiples, con el gel alrededor de la pasta, o cualquier combinación de los anteriores. La composición dentífrica puede estar contenida en un compartimento físicamente separado de un

dispensador y ser dispensada lado a lado. La composiciones dentífricas están descritas, por ejemplo, en EP-B1 0 617 608.

Las composiciones dentífricas preferidas están descritas en los Ejemplos 21 a 24. Además de los componentes antes descritos, las composiciones dentífricas de esta invención pueden contener una variedad de ingredientes dentífricos opcionales algunos de los cuales han sido descritas anteriormente. Ingredientes opcionales incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a, adhesivos, agentes espumantes, agentes saborizantes, agentes endulzantes, agentes antiplaca adicionales, abrasivos adicionales y agentes colorantes. Estos y otros componentes opcionales están descritos adicionalmente, por ejemplo, en US 5,004,597; US 4,885,155; US 3,959,458; y US 3,937,807.

Por ejemplo, la pasta dental puede incluir surfactantes, agentes quelantes, fuentes de fluoruro, agentes activos para blanqueo de dientes y sustancias modificadoras del color de los dientes, agentes aglomerantes, humectantes, agentes saborizantes y endulzantes, sales de bicarbonato de metales alcalinos, vehículos misceláneos y/o otros agentes activos.

Uno de los agentes opcionales preferidos tal como se utilizan de acuerdo con la presente invención es un surfactante, preferiblemente uno seleccionado del grupo consistente de surfactantes de sarcosinato, surfactantes de isetionato y surfactantes de taurato. Se prefieren para uso aquí sales de metales alcalinos o de amonio de estos surfactantes. Los más preferidos aquí son las sales de sodio y potasio de los siguientes: sarcosinato de lauroilo, sarcosinato de miristoilo, sarcosinato de palmitoilo, sarcosinato de estearoilo y sarcosinato de oleoilo.

Otro agente opcional preferido es un agente quelante tal como ácido tartárico y sales farmacéuticamente aceptables del mismo, ácido cítrico y citratos de metales alcalinos, y mezclas de los mismos. Agentes quelantes son capaces de complejar el calcio encontrado en las paredes celulares de las bacterias. Los agentes quelantes también pueden perturbar la placa retirando el calcio de los puentes de calcio, los cuales ayudan a mantener su biomasa intacta.

Es común tener un compuesto adicional de fluoruro soluble en agua presente en dentífricos y otras composiciones orales en una cantidad suficiente para dar una concentración de ion fluoruro en la composición a 25°C, y/o cuando se utiliza desde aproximadamente 0.0025% hasta aproximadamente 5.0% en peso, preferiblemente desde aproximadamente 0.005% hasta aproximadamente 2.0% en peso, para proveer efectividad anticaries adicional. Una variedad amplia de materiales productores de ion fluoruro puede emplearse como fuente de fluoruro soluble en las composiciones presentes. Ejemplos de materiales productores de ion fluoruro se encuentran en la US 3,535,421 y US 3,678,154. Las fuentes de ion fluoruro representativas incluyen fluoruro estannoso, fluoruro de sodio, fluoruro de potasio, monofluorofosfato de sodio y muchos otros. El fluoruro estannoso y el fluoruro de sodio son preferidos en particular, así como mezclas de los mismos.

Las composiciones de cuidado oral de acuerdo con la presente invención pueden comprender también agentes activos blanqueadores de dientes, incluyendo agentes decolorantes u oxidantes tales como peróxidos, perboratos, percarbonatos, peroxiácidos, persulfatos, cloritos metálicos y combinaciones de los mismos. Compuestos de peróxido adecuados incluyen peróxido de hidrógeno, peróxido de urea, peróxido de calcio y mezclas de los mismos. Un percarbonato preferido es percarbonato de sodio. Otros agentes blanqueadores incluyen persulfatos y perborato mono y tetrahidratados de potasio, amonio, sodio y litio, y peroxihidratado pirofosfato de sodio. Cloritos metálicos adecuados incluyen clorito de calcio, clorito de bario, clorito de magnesio, clorito de litio, clorito de sodio y clorito de potasio. El clorito preferido es clorito de sodio. Agentes blanqueadores activos adicionales pueden ser hipoclorito y dióxido de cloro.

Además de los agentes decolorantes como agentes blanqueadores de dientes, pueden considerarse sustancias modificadoras del color de los dientes entre los agentes activos para cuidado oral 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 a la superficie del diente modifican la superficie en términos de absorción y/o reflexión de la luz. Tales partículas proveen una apariencia beneficiosa cuando una película que contiene tales partículas se aplica sobre las superficies de un diente o dientes.

En la preparación de pasta dental o geles, es necesario agregar algún material aglomerante para proveer una consistencia deseable de la composición, para proveer características de liberación de agente deseables con el uso, para proveer estabilidad de la vida útil, y para proveer estabilidad de la composición, etc. Agentes aglomerantes preferidos son polímeros de carboxivinilo, carragenano, hidroxietil celulosa, laponita y sales solubles en agua de éteres de celulosa tales como carboximetilcelulosa de sodio y carboximetil hidroxietil celulosa de sodio. También pueden utilizarse gomas naturales tales como goma de karaya, goma de xantano, goma arábiga y goma tragacanto. Puede utilizarse silicato de magnesio y aluminio coloidal o sílica finamente dividida como parte del agente aglomerante para mejorar adicionalmente la textura.

Otro componente opcional de los vehículos tópicos orales de las composiciones de la presente invención es un humectante. El humectante sirve para proteger las composiciones de la pasta dental del endurecimiento por exposición al aire, para dar a las composiciones una sensación húmeda en la boca, y, para humectantes particulares, para impartir dulzura o sabor deseable a las composiciones de pasta de dientes. El humectante, sobre una base de humectante puro, comprende en general desde aproximadamente 0% hasta aproximadamente 70%,

preferiblemente desde aproximadamente 5% hasta aproximadamente 25%, en peso de las composiciones presentes. Los humectantes adecuados para uso en las composiciones de la presente invención incluyen alcoholes polihídricos comestibles tales como glicerina, sorbitol, xilitol, butilen glicol, polietilen glicol y propilen glicol, especialmente sorbitol y glicerina.

5 También pueden agregarse agentes saborizantes y endulzantes a las composiciones. Agentes saborizantes adecuados incluyen aceite de gaulteria, aceite de menta, aceite de menta verde, aceite de brote de clavo, mentol, anetol, salicilato de metilo, eucaliptol, cassia, acetato de 1-mentilo, salvia, eugenol, aceite de perejil, oxanona, alfa irisona, mejorana, limón, naranja, propenil guaetol, canela, vainillina, timol, linalol, cinamaldehído glicerol acetal conocido como CGA, y mezclas de los mismos. Los agentes saborizantes se usan generalmente en las  
10 composiciones en niveles que van desde aproximadamente 0.001% hasta aproximadamente 5% en peso de la composición.

Los agentes endulzantes que pueden ser utilizados incluyen sacarosa, glucosa, sacarina, dextrosa, levulosa, lactosa como se describió aquí anteriormente, manitol, sorbitol, fructosa, maltosa, xilitol, sales de sacarina, taumatina, aspartame, D-triptófano, dihidrochalconas, acesulfame y sales de ciclamato, especialmente ciclamato de sodio y sacarina de sodio y mezclas de los mismos. Una composición contiene preferiblemente desde aproximadamente  
15 0.1% hasta aproximadamente 10% de estos agentes, preferiblemente desde aproximadamente 0.1% hasta aproximadamente 1% en peso de la composición.

La presente invención también puede incluir una sal de bicarbonato de metales alcalinos. Las sales de bicarbonato de metales alcalinos son solubles en agua y a menos que se estabilicen, tienden a liberar dióxido de carbono en un sistema acuoso. El bicarbonato de sodio, también conocido como soda de hornear, es la sal de bicarbonato de metal  
20 alcalino preferida. La presente composición puede contener desde aproximadamente 0.5% hasta aproximadamente 30%, preferiblemente desde aproximadamente 0.5% hasta aproximadamente 15%, y lo más preferiblemente desde aproximadamente 0.5% hasta aproximadamente 5% de una sal de bicarbonato de un metal alcalino.

El agua empleada en la preparación de las composiciones orales comercialmente adecuadas debería ser preferiblemente de bajo contenido iónico y libre de impurezas orgánicas. El agua generalmente comprende desde  
25 aproximadamente 10% hasta aproximadamente 50%, y preferiblemente desde aproximadamente 20% a aproximadamente 40%, en peso de las composiciones de pasta dental acuosas presentes. Estas cantidades de agua incluyen el agua libre que se agrega además de la que es introducida con otros materiales, tales como el sorbitol. El dióxido de titanio también puede ser agregado a la presente composición. El dióxido de titanio es un  
30 polvo blanco, que agrega opacidad a las composiciones. El dióxido de titanio comprende en general desde aproximadamente 0.25% hasta aproximadamente 5% en peso de las composiciones dentífricas.

El pH de la presente composición se ajusta preferiblemente a través del uso de agentes reguladores. Agentes reguladores, tal como se utiliza aquí, se refiere a agentes que pueden ser utilizados para ajustar el pH de la  
35 composición a un rango de aproximadamente 4.5 hasta aproximadamente 9.5. Los agentes reguladores 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 reguladores pueden ser administrados a un nivel desde aproximadamente 0.5% hasta aproximadamente 10% en peso de las presentes composiciones. El pH de las composiciones dentífricas se mide en una suspensión acuosa 3:1 de dentífrico, por ejemplo, 3 partes de agua a 1 parte de pasta dental.

Otros agentes opcionales que pueden ser utilizados en las presentes composiciones incluyen copolios de  
40 dimeticona seleccionados entre copolios de alquilo y alcoxi dimeticona, tales como copolios de C12 a C20 alquil dimeticona y mezclas de los mismos. Se prefiere principalmente el copoliol de cetil dimeticona comercializado bajo el nombre comercial Abil EM90. Este copoliol de dimeticona está presente en general en un nivel desde aproximadamente 0.01% hasta aproximadamente 25%, preferiblemente desde aproximadamente 0.1% hasta  
45 aproximadamente 5%, más preferiblemente desde aproximadamente 0.5% hasta aproximadamente 1.5% en peso. Los copolios de dimeticona ayudan en proveer beneficios de sensación positiva en los dientes. Otros vehículos útiles incluyen formulaciones dentífricas bifásicas tales como las divulgadas en US 5,213,790; US 5,145,666; US 5,281,410; US 4,849,213 y US 4,528,180

Las composiciones cosméticas presentes también pueden incluir otros agentes activos, tales como agentes antimicrobianos. Incluidos entre tales agentes están agentes antimicrobianos no catiónicos insolubles en agua tales  
50 como difenil éter halogenados, compuestos fenólicos incluyendo fenol y sus homólogos, halofenoles mono y polialquilo y aromáticos, resorcinol y sus derivados, compuestos bisfenólicos y salicilanilidas halogenadas, ésteres benzoicos, y carbanilidas halogenadas. Los antimicrobianos solubles en agua incluyen sales de amonio cuaternarias y sales de bis-biquanida, entre otros. El monofosfato de triclosán es un agente antimicrobiano adicional soluble en agua. Los agentes de amonio cuaternario incluyen aquellos en los cuales uno o dos de los sustitutos en el nitrógeno  
55 cuaternario tienen una longitud de cadena de carbono (típicamente un grupo alquilo) desde aproximadamente 8 hasta aproximadamente 20, típicamente desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 18 átomos de carbono mientras que los sustitutos restantes (típicamente grupos alquilo o bencilo) tienen un número menor de átomos de carbono, tales como desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 7 átomos de carbono, típicamente grupos metilo o etilo. El bromuro de dodecil trimetil amonio, cloruro de tetradecilpiridinio, bromuro de domifén, N-tetradecil-4-  
60 etilo piridinio cloruro, dodecilo dimetilo (2-fenoxtiel) amonio bromuro, bencilo dimetilsteirilo amonio cloruro, cloruro

de cetil piridinio, 5-amino-1,3-bis(2-etil-hexil)-5-metilo hexa hidropirimidina cuaternizado, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio y cloruro de metil bencetonio son ejemplos de agentes antibacterianos de amonio cuaternario típicos. Otros compuestos son bis[4-(R-amino)-1-piridinio] alcanos tal como se divulgan en US 4,206,215. También pueden ser incluidos otros antimicrobianos tales como bisglicinato de cobre, glicinato de cobre, citrato de zinc y lactato de zinc. Las enzimas son otro tipo de agente activo que puede ser utilizado en las presentes composiciones. Enzimas útiles incluyen las que pertenecen a la categoría de las proteasas, enzimas lífticas, inhibidores de la matriz de placa y oxidasas: Las proteasas incluyen papaína, pepsina, tripsina, ficina, bromelina; enzimas lífticas de las paredes celulares incluyen lisozima; inhibidores de matriz de placa incluyen dextranasas, mutanasas; y las oxidasas incluyen glucosa oxidasa, lactato oxidasa, galactosa oxidasa, oxidasa del ácido úrico, peroxidasas que incluyen peroxidasa de rábano, mieloperoxidasa, lactoperoxidasa, cloroperoxidasa. Las oxidasas también tienen actividad blanqueadora/limpiadora, además de propiedades antimicrobianas. Tales agentes se divulgan en US 2,946,725 y en US 4,051,234. Otros agentes antimicrobianos incluyen clorhexidina, triclosán, monofosfato de triclosán, y aceites saborizantes tales como timol. El triclosán y otros agentes de este tipo están divulgados en US 5,015,466 y US 4,894,220. Estos agentes, que proveen beneficios antiplaca, pueden estar presentes en niveles que van desde aproximadamente 0.01% hasta aproximadamente 5.0%, en peso de la composición dentífrica.

El término "goma de mascar" tal como se define aquí indica una composición de confitería que es adecuada para masticar y comprende cualquier cantidad adecuada de elastómero conocido por la persona experimentada en la técnica, preferiblemente una cantidad de 2% o más, en peso de la composición. Componentes adecuados de tabletas y goma de mascar están divulgadas, por ejemplo, en US 4,083,955; US 6,770,264 o US 6,270,781. Tabletillas preferidas son las descritas en los Ejemplos 19 y 20. Una composición de goma de mascar preferida se describe en el Ejemplo 25.

Las composiciones que se usan de acuerdo con la presente invención comprenden preferiblemente un elastómero, o mezcla de varios diferentes elastómeros. Los materiales elastoméricos son conocidos en general en la técnica pero ejemplos ilustrativos incluyen goma de estireno-butadieno (SBR); gomas sintéticas; copolímeros de poliisobutileno e isobutileno-isopreno; gomas naturales; chicle; goma natural; jelutong; balata; gutapercha; lechi caspi; sorva; y mezclas de las mismas. Las composiciones tal como se utilizan de acuerdo con la presente invención comprenden preferiblemente desde aproximadamente 2% hasta aproximadamente 30%, más preferiblemente desde aproximadamente 5% hasta aproximadamente 25%, en peso, de elastómero. Estos niveles se determinan por la textura final deseada de la goma de mascar puesto que cuando el nivel total de elastómero está por debajo de aproximadamente 2% la composición de base carece de elasticidad, textura de masticado y cohesividad mientras que en niveles por encima de aproximadamente 30% la formulación es dura, gomosa y mantiene una masticación apretada. Los solventes de elastómeros también están presentes preferiblemente en composiciones tal como se utilizan de acuerdo con la presente invención puesto que ayudan a ablandar el componente elastomérico. Ejemplos preferidos de solventes para elastómeros para uso aquí incluyen el éster de pentaeritritol de rosina de madera parcialmente hidrogenada, éster de pentaeritritol de rosina de madera, éster de glicerol de rosina de madera parcialmente dimerizada, éster de glicerol de rosina polimerizada, éster de glicerol de tallol, rosina de madera o goma, éster de glicerol de rosina parcialmente hidrogenada, éster metílico de rosina parcialmente hidrogenada, y mezclas de los mismos. Las composiciones tal como se utilizan de acuerdo con la presente invención comprenden preferiblemente desde aproximadamente 2% hasta aproximadamente 50%, más preferiblemente desde aproximadamente 10% hasta aproximadamente 35%, en peso, del solvente elastomérico.

Las tabletas para uso de acuerdo con esta invención pueden ser preparadas, por ejemplo, mediante técnicas reconocidas en el arte para formar tabletas comprimidas en donde el disacárido se dispersa en un vehículo sólido compresible, combinado opcionalmente con cualquier auxiliar de formación de tabletas apropiado tal como lubricante (por ejemplo, estearato de magnesio) y se comprime en tabletas. El componente vehículo sólido para tales formulaciones para tabletas puede ser un sólido soluble en saliva, tal como almidón soluble en agua fría o un monosacárido, de tal manera que la tableta se disuelva fácilmente en la boca para liberar el ácido disacárido contenido en solución en saliva para contacto con y absorción por la mucosa oral/faríngea cuando la tableta es mantenida en la boca. El pH de las formulaciones antes descritas puede variar desde aproximadamente 4 hasta aproximadamente 8.5.

Las tabletas para uso de acuerdo con la presente invención también pueden prepararse utilizando otras técnicas de formulación de dosificaciones unitarias sólidas reconocidas en el arte.

Un lavado bucal o un enjuague bucal tal como se utiliza de acuerdo como la presente invención podría ser preferiblemente como sigue:

A	Olium menthae	1.2 partes
	Tinctura Amicae	3.0 partes
	Tinctura Myrrhae	3.0 partes
	Tween	5.0 partes

B	Spiritus 90%	50.0 partes
C	Benzoato de Sodio	0.2 partes
	Agente endulzante (por ejemplo aspartame) Agua destilata ad 100,	0.02 partes

Se mezcla bien A, B se agrega bajo agitación y C se agrega subsecuentemente. El líquido claro resultante se filtra dentro de las 48 horas después de la preparación. Otro lavado bucal preferido se describe en el Ejemplo 26.

5 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 durante un período de tiempo para promover el contacto del microorganismo o análogo o fragmento de un microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico con la cavidad oral del paciente.

10 Los términos "hilo dental" y "cinta dental" tal como se utilizan aquí se refieren a un material para desalojar y remover material alimenticio descompuesto que se acumula en las superficies interproximal y subgingival y para desalojar y retirar bacterias, placa y/o cálculo que se acumula en la cavidad oral. El hilo dental o la cinta dental pueden contener  
 15 adicionalmente, además de los microorganismos de acuerdo con la presente invención tal como se describe aquí, limpiadores, abrasivos, ingredientes para el control del tártaro, blanqueadores, surfactantes y/o ingredientes activos tales como fluoruros, antimicrobianos, agentes quimioterapéuticos o antibióticos. Agentes adicionales posteriores son agentes antiplaca, agentes saborizantes y agentes colorantes. El hilo dental o cinta dental puede estar en cualquier forma adecuada, conocida para la persona experimentada en la técnica, por ejemplo en la forma de hilos dentales de PTFE (teflón) como se describe, por ejemplo, en US 3,664,915 US 3,953,566, US 3,962,153 US 4,096,227, US 4,187,390, US 4,256,806, US 4,385,093, US 4,478,665, US 4,776,358, US 5,033,488, US 5,209,251, US 5,220,932, US 5,518,012, US 5,718,251, US 5,765,576 o US 5,911,228, en la forma de dispositivos interproximales monofilamento como los que se describen, por ejemplo, en US 3,800,812, US 4,974,615, US 5,760,117, US 5,433,226, US 5,479,952, US 5,503,842, US 5,755,243, US 5,884,639, US 6,003,525 o US  
 20 6,027,592, o en la forma de cintas con biocomponentes. Preferiblemente, el hilo dental o cinta dental puede estar en la forma de un monofilamento elastomérico recubierto tal como se describe por ejemplo, en US 20050226820 o en la forma de una cinta dental basada en un termoplástico orientado tal como se describe, por ejemplo, en US 20020144704.

25 Las composiciones cosméticas anticariogénicas tal como se describen aquí arriba pueden ser utilizadas en el ámbito de la administración oral humana así como del ámbito de la administración oral veterinaria, preferiblemente para mamíferos no humanos, más preferiblemente para mascotas. Si la composición cosmética anticariogénica se utiliza en el ámbito de la administración oral veterinaria, la composición puede contener ingredientes adicionales adecuados para tal administración, tal como los conoce una persona experimentada en la técnica.

30 En otro aspecto la presente invención se relaciona con el uso de un microorganismo que pertenece al grupo de bacterias del ácido láctico tal como se define en las reivindicaciones, el cual es capaz de unirse específicamente a una bacteria perteneciente al grupo de mutans Streptococci tal como se define en la reivindicaciones, para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento o profilaxis de caries causadas por mutans Streptococci diferentes a Streptococcus mutans, a saber S. sobrinus. Preferiblemente, tal composición farmacéutica comprende un microorganismo o un derivado o mutante o fragmento del mismo tal como se describe anteriormente.  
 35 Más preferiblemente, una composición farmacéutica comprende adicionalmente un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

40 Las composiciones farmacéuticas incluyen una cantidad terapéuticamente efectiva del microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico o un derivado, mutante o fragmento de dicho microorganismo descrito en conexión con la composición tal como se usa de acuerdo con la presente invención y puede formularse en varias formas, por ejemplo, en forma sólida, líquida, en polvo, acuosa, liofilizada.

45 La composición farmacéutica puede ser administrada a un paciente con un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como se describe aquí. En una realización específica, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora u otra farmacopea reconocida en general para uso en animales, y más particularmente en humanos. Una composición farmacéutica preferida tal como se usa de acuerdo con la presente invención no contiene lactosa en un rango entre 1% (p/p) y 6% (p/p). También se prefiere que la composición farmacéutica contenga 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 la composición farmacéutica contenga más de 6%, 7%, 8%, etc. (p/p) de lactosa. Alternativamente, pero también preferido es que la composición farmacéutica no contenga lactosa.

50 El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el cual se administra el agente terapéutico. Tal vehículo es farmacéuticamente aceptable, esto es, es no tóxico para un receptor en la dosificación y concentración empleadas. Es preferiblemente isotónico, hipotónico o débilmente hipertónico y tiene una fuerza iónica relativamente baja, tal como la provista por una solución de sacarosa. Tales vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de petróleo, animales, vegetales o de origen

5 sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Las soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol también pueden ser empleadas como vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, sílica gel, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, ion sodio, leche en polvo descremada, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. El excipiente puede contener lactosa tal como se describió anteriormente, lo más preferiblemente es libre de lactosa. La composición si se desea también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsificantes, agentes reguladores del pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, tabletas, 10 píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. La formulación oral puede incluir vehículos estándar tales como grados farmacéuticos de manitol, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados son descritos en "Remington's Pharmaceutical Sciences" by E.W. Martin. También pueden emplearse leche descremada, leche en polvo descremada, productos no lácteos o sin lactosa. La leche en polvo descremada se suspende convencionalmente en solución salina regulada con fosfato (PBS), se somete a autoclave o se filtra para erradicar 15 contaminantes proteináceos y vivientes, luego se seca por congelación, se seca por calor, se seca al vacío o se liofiliza. Algunos otros ejemplos de sustancias que pueden servir como vehículos farmacéuticos son azúcares, tales como glucosa y sacarosa; almidones tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados tales como carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa y acetatos de celulosa; tragacanto pulverizado; malta; gelatina; talco; ácidos esteáricos; estearato de magnesio; sulfato de calcio; carbonato de calcio; aceites vegetales, tales como 20 aceites de maní, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de teobroma; polioles tales como propileno glicol, glicerina, sorbitol, manitol y polietileno glicol; agar, ácidos alginicos; agua libre de pirógenos; solución salina isotónica; arándano, extractos y solución reguladora de fosfato; leche en polvo descremada, así como otras sustancias compatibles no tóxicas usadas en formulaciones farmacéuticas tales como vitamina C, estrógeno y equinácea, por ejemplo. También pueden estar presentes agentes humectantes y 25 lubricantes tales como lauril sulfato de sodio, así como agentes colorantes, agentes saborizantes, lubricantes, excipientes, agentes para formación de tabletas, estabilizantes, antioxidantes y conservantes.

Preferiblemente, la formulación oral contiene lactosa tal como se describe aquí y es lo más preferiblemente libre de lactosa. Diversos vehículos y/o excipientes adecuados para administración oral que son bien conocidos en la técnica pueden ser usados para el propósito de esta invención. La composición no cariogénica si se desea, puede contener 30 diversos aditivos conocidos tales como, por ejemplo, conservantes, agentes de endurecimiento, lubricantes, emulsificantes, estabilizadores, esencias y similares. Tales composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente efectiva de los compuestos antes mencionados, preferiblemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de vehículo de tal manera que provean la forma para administración apropiada al paciente. La formulación debería adecuarse al modo de administración.

35 Generalmente, los ingredientes se suministran bien sea separadamente o mezclados entre sí en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, un polvo liofilizado seco o un concentrado libre de agua en un contenedor herméticamente sellado tal como una ampolla o un saquito indicando la cantidad de agente activo. Cuando la composición se administra por infusión, puede ser dispensada con una botella de infusión que contiene agua o solución salina grado farmacéutico estéril.

40 La composición farmacéutica de la invención puede ser formulada como formas neutras o salinas. Sales farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas formadas con aniones tales como los derivados de los ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc. Y los formados con cationes tales como los derivados de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, etc.

45 Pueden emplearse opcionalmente ensayos in vitro para ayudar a identificar los rangos de dosificación óptimos. La dosis precisa que se debe emplear en la formulación también dependerá de la ruta de administración, y la seriedad de la enfermedad o trastorno, y debe decidirse de acuerdo con el juicio del médico y las circunstancias de cada paciente. Las dosis efectivas pueden extrapolarse a partir de las curvas dosis-respuesta derivadas de sistemas modelo in vitro o animales. Preferiblemente, la composición farmacéutica se administra directamente o en combinación con un adyuvante. Los adyuvantes pueden ser seleccionados del grupo consistente de una cloroquina, 50 compuestos polares próticos, tales como propileno glicol, polietileno glicol, glicerol, EtOH, 1-metil L-2-pirrolidona o sus derivados, o compuestos polares apróticos tales como dimetilsulfóxido (DMSO), dietilsulfóxido, di-n-propilsulfóxido, dimetilsulfona, sulfolano, dimetilformamida, dimetilacetamida, tetrametilurea, acetonitrilo o sus derivados. Estos compuestos se agregan en condiciones que respetan las limitaciones de pH. La composición tal como se usa de acuerdo con la presente invención puede ser administrada a un vertebrado. "Vertebrado" tal como se utiliza aquí pretende tener el mismo significado que se entiende comúnmente por parte de una persona experimentada en la 55 técnica. De forma particular, "vertebrado" abarca mamíferos, y más particularmente humanos.

El término "administrado" significa administración de una dosis terapéuticamente efectiva de la composición antes mencionada. Por "cantidad terapéuticamente efectiva" se entiende una dosis que produce los efectos para los cuales se administra, preferiblemente este efecto es anticariogénico. La dosis exacta dependerá del propósito del 60 tratamiento, y se podrá establecer por parte de una persona experimentada en la técnica utilizando técnicas conocidas. Como es conocido en la técnica y que está descrito anteriormente, los ajustes para administración

sistémica versus localizada, edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, tiempo de administración, interacción de fármacos y la severidad de la condición pueden ser necesarios, y se establecerán mediante experimentación de rutina por las personas experimentadas en la técnica.

5 Los métodos son aplicables tanto a aplicaciones de terapia humana como veterinaria. Los compuestos descritos aquí que tienen la actividad terapéutica deseada pueden ser administrados a un paciente en un vehículo fisiológicamente aceptable, tal como se describe aquí. Dependiendo de la forma de introducción, los compuestos pueden ser formulados en una variedad de formas tal como se discute más adelante. La concentración de compuesto terapéuticamente activo en la formulación puede variar desde aproximadamente 0.1-100% en peso. Los agentes pueden ser administrados solos o en combinación con otros tratamientos.

10 La administración de la composición farmacéutica puede hacerse en una variedad de formas tal como se discutió anteriormente, incluyendo, pero no limitándose a, oral, subcutánea, intravenosa, intraarterial, intranodal, intramedular, intratecal, intraventricular, intranasal, intrabronquial, transdérmica, intranodal, intrarrectal, intraperitoneal, intramuscular, intrapulmonar, vaginal, rectal, o intraocular.

15 Preferiblemente la administración es oral o bucal. El médico a cargo y los factores clínicos determinarán el régimen de dosificación. Como es bien sabido en las artes médicas, las dosificaciones para un paciente dependen de muchos factores, incluyendo el tamaño del paciente, área superficial corporal, edad, el compuesto particular que se va a administrar, sexo, tiempo y ruta de administración, salud general y otros fármacos que están siendo administrados concurrentemente. Una dosis típica puede estar, por ejemplo, en el rango de 0.001 a 1000 µg, sin embargo, las dosis por debajo o encima de este rango de ejemplo están previstas, especialmente considerando los factores antes mencionados.

20 Las dosificaciones se dan preferiblemente una vez a la semana, sin embargo, durante la progresión del tratamiento las dosificaciones pueden darse en intervalos de tiempo mucho más largos y en caso necesario pueden ser dados 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 las personas experimentadas en la técnica y se optimizan las dosificaciones, por ejemplo, en tiempo, cantidad y/o composición. El progreso puede ser monitoreado por mediciones periódicas. La composición farmacéutica de la invención puede ser administrada localmente o sistémicamente. También se prevé que las composiciones farmacéuticas se empleen en metodologías de coterapia, esto es, en coadministración con otros medicamentos o fármacos, por ejemplo otros fármacos para prevenir, tratar o mejorar la caries, los cuales se describen aquí.

25 En otra realización preferida de la presente invención se relaciona con el uso de un microorganismo perteneciente al grupo de bacterias del ácido láctico tal como se define en las reivindicaciones, los cuales son capaces de unirse específicamente a una bacteria que pertenece al grupo de mutans Streptococci tal como se define en las reivindicaciones, para la preparación de una composición anticariogénica para el tratamiento o profilaxis de caries causada por mutans Streptococci diferentes a Streptococcus mutans, a saber S. sobrinus, en donde la composición anticariogénica es un producto alimenticio o un producto de pienso. Preferiblemente una composición anticariogénica en la forma de un producto alimenticio o pienso es un alimento o composición de pienso que comprende un microorganismo, mutante, derivado o fragmento del mismo tal como se describe anteriormente y comprende adicionalmente un vehículo o excipiente oralmente aceptable. Más preferiblemente, el microorganismo, mutante, derivado o fragmento del mismo es un microorganismo depositado tal como se describió aquí anteriormente, o un mutante, derivado o fragmento del mismo.

30 "Alimento" o "pienso" comprende cualquier producto comestible, palatable y/o bebible para mamíferos, por ejemplo humanos o animales, por ejemplo mascotas tal como se describe aquí. Los alimentos y los piensos se describen aquí en diversos lugares. Un "vehículo oralmente aceptable" se describió aquí anteriormente y preferiblemente es no tóxico y es de grado alimenticio y/o de pienso. Todavía, este término también abarca los vehículos mencionados en relación con la composición farmacéutica tal como se utiliza de acuerdo con la presente invención. Una composición de alimento o pienso tal como se utiliza de acuerdo con la presente invención no contiene lactosa en un rango entre 1% (p/p) y 6% (p/p). También se prefiere que las composición de alimento o pienso contengan no más de 1% (p/p) de lactosa, por ejemplo, contenga al menos de 1%, preferiblemente menos de 0.9% (p/p), 0.8% (p/p) de lactosa, etc., o que la composición de alimento o pienso contenga más de 6%, 7%, 8%, etc. (p/p) de lactosa. Alternativamente, pero también preferido es que la composición de alimento o pienso no contenga lactosa.

35 De acuerdo con la presente invención, el término "producto alimenticio" abarca todos los alimentos y bebidas comestibles y bebibles. De acuerdo con lo anterior, el microorganismo, derivado, análogo o fragmento del mismo puede estar incluido en un alimento o bebida. Estos son, por ejemplo, gomas, aspersiones, bebidas, dulces, fórmulas infantiles, crema de helado, postres congelados, aderezos dulces para ensalada, preparaciones lácteas, queso, quark, yogur libre de lactosa, leche acidificada, crema de café o crema batida y similares.

40 Los productos basados en leche se prevén dentro del marco de la invención. La leche sin embargo se entiende que implica la de origen animal, tal como vaca, cabra, oveja, búfalo, cebra, caballo, asno o camello y similares. La leche puede estar en su estado nativo, una leche reconstituida, una leche descremada o una leche suplementada con compuestos necesarios para el crecimiento de las bacterias o para el procesamiento subsecuente de la leche

5 fermentada, tales como grasa, proteínas de un extracto de levadura, peptona y/o un surfactante, por ejemplo. El término leche también se aplica a lo que se denomina comúnmente leche vegetal, es decir extractos de material vegetal que han sido tratados o de alguna otra manera, tales como plantas leguminosas (soja, garbanzo, lenteja y similares) o semillas oleaginosas (colza, soja, sésamo, algodón y similares), cuyos extractos contienen proteínas en solución o en suspensión coloidal, y que son coagulables por acción química, por fermentación ácida y/o por calor. Finalmente, la palabra leche también denota mezclas de leches animales y de leches vegetales.

10 Cuando el microorganismo de esta invención o su derivado análogo o un fragmento del mismo se agregan a yogur y similares con contenidos similares, es suficiente agregar el microorganismo de esta invención en una concentración de aproximadamente  $10^5$  -  $10^7$  células/ml. En tal caso, es posible prevenir o inhibir completamente la caries dental inducida por las cepas cariogénicas de mutans Streptococci sin efectos colaterales significativos sobre la calidad de la bebida por se.

15 Tal alimento, bebida o pienso pueden ser producidos mediante un método general para producir alimentos y bebidas o piensos, incluyendo la adición del ingrediente activo a un material crudo o cocido del alimento, bebida o pienso. El alimento, bebida o pienso de acuerdo con la presente invención puede ser moldeado y granulado en la misma manera usada en general para alimentos, bebidas o piensos. El método de moldeado y granulación incluye métodos de granulación tales como granulación en capa fluida, granulación por agitación, granulación por extrusión, granulación por enrollamiento, granulación con corriente de gas, granulación por compactación por moldeo, granulación por ruptura, granulación por aspersión y granulación por inyección, métodos de recubrimiento tales como recubrimiento en placa, recubrimiento en capa fluida y recubrimiento en seco, secado expansivo, método de vapor en exceso, método de base de espuma, métodos de expansión tales como método de incubación por microondas y métodos de extrusión con máquinas y extrusoras de granulación por extrusión.

20 El alimento, bebida o pienso que se va a utilizar en la presente invención incluye cualquier alimento, bebida o pienso que comprenda los microorganismos de la invención, derivados o fragmentos de los mismos como ingrediente activo. El ingrediente activo en el alimento, bebida o pienso no está limitado específicamente a ninguna concentración en tanto el alimento, bebida o pienso resultantes puedan ejercer su actividad para unirse específicamente a mutans Streptococci. La concentración del ingrediente activo preferiblemente va de 0.001 a 100% en peso, más preferiblemente de 0.01 a 100% en peso y lo más preferiblemente de 0.1 a 100% en peso del alimento, bebida o pienso que comprende tal ingrediente activo o con respecto al número de células descritas aquí.

25 Alimentos o bebidas específicos, a los cuales se agrega el ingrediente activo, incluyen, por ejemplo, jugos, bebidas refrescantes, sopas, té, bebidas de leche agria, productos lácteos tales como leches fermentadas, helados, mantequilla, queso, leche procesada y leche descremada, productos cárnicos tales como tocino, salchicha y hamburguesas, productos de torta de carne de pescado, productos hechos a partir de huevos tales como rollos de huevos sazonados y cuajo de huevo, confiterías tales como galletas, gelatinas, tentempiés, y goma de mascar, panes, pastas, encurtidos, productos ahumados, pescados secos y aderezos. La forma del alimento o bebida incluye, por ejemplo, alimentos en polvo, alimentos en láminas, alimentos embotellados, alimentos enlatados, alimentos en retortas, alimentos en cápsulas, alimentos en tabletas y alimentos fluidos.

30 El alimento o bebida con una actividad para unirse específicamente a mutans Streptococci para ser ingerido por infantes, son preferiblemente composiciones nutritivas para infantes. Tales composiciones nutritivas para infantes incluyen leche modificada preparada para infantes, leche con proteína descompuesta, leche modificada nutricionalmente específica o alimentos para bebés y alimentos preparados para niños pequeños. La forma de la composición nutritiva para infantes incluye pero no se limita específicamente a leches en polvo secas y pulverizadas y alimentos para bebés y también incluye alimentos generales tales como crema de helado, leche fermentada y gelatina para ingestión infantil.

35 La composición nutritiva para infantes de acuerdo con la presente invención está compuesta principalmente de proteína, lípidos, sacáridos, vitaminas y/o minerales. En la composición nutritiva, el ingrediente activo está mezclado con estos componentes.

40 La proteína incluye proteínas de leche tales como leche descremada, caseína, suero de queso, concentrado de proteína de suero y aislados de proteína de suero y sus fracciones, tales como alfa s - caseína, beta-caseína, alfa-lactoalbúmina y beta-lactoalbúmina. Adicionalmente pueden usarse proteína de huevo tal como proteína de yema de huevo, proteína de clara de huevo y ovalbúmina, o proteína de soja tal como proteína de soja desengrasada, proteína de soja separada, y proteína de soja concentrada. Además de estas, pueden usarse también satisfactoriamente proteínas tales como gluten de trigo, proteína de torta de pescado, proteína de carne vacuna y colágeno. Adicionalmente pueden usarse también satisfactoriamente fracciones de estas proteínas, péptidos del tratamiento ácido o enzimático de las mismas, o aminoácidos libres. Los aminoácidos libres pueden servir como fuentes de nitrógeno y pueden usarse adicionalmente para dar acciones fisiológicas específicas. Tales aminoácidos libres incluyen, por ejemplo, taurina, arginina, cisteína, cistina y glutamina. Los lípidos incluye grasas y aceites animales tales como grasa de leche, cebo, grasa de res y aceite de pescado, aceites vegetales tales como aceite de soja, aceite de colza, aceite de maíz, aceite de coco, aceite de palma, aceite de semilla de palma, aceite de cártamo, aceite de perilla, aceite de lino, aceite de onagra, triglicéridos de ácidos grasos de cadena media, y aceite de algodón, grasas y aceites generados por vía bacteriana y aceites fraccionados de los mismos, aceites hidrogenados

de los mismos, y aceites con intercambio de ésteres de los mismos. La cantidad de lípidos que se va a mezclar varía dependiendo del uso.

5 Los sacáridos incluyen por ejemplo, uno o más de almidón, polisacáridos solubles, dextrina, monosacáridos, tales como sacarosa, lactosa tal 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, pueden utilizarse satisfactoriamente endulzantes artificiales. La cantidad de un endulzante artificial es apropiadamente de 0.05 a 1.0% en peso de sólidos totales en la composición nutritiva.

10 Las vitaminas incluyen, pero no se limitan a, licopeno como un componente esencial y adicionalmente incluyen, por ejemplo, vitaminas tales como vitamina A, grupo de vitaminas B, vitaminas C, D, y E y grupo de las vitaminas K, ácido fólico, ácido pantoténico, nicotinamida, carnitina, colina, inositol y biotina en tanto tales vitaminas puedan ser administradas a infantes. Tales vitaminas van preferiblemente de 10 mg a 5 g por peso del sólido total en la composición nutritiva para infantes.

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

Además de estos componentes descritos anteriormente, la composición nutritiva para infantes tal como se utiliza de acuerdo con la presente invención puede ser mezclada con cualquier componente mezclado deseablemente en composiciones nutritivas, por ejemplo, fibra de dieta, nucleótidos, ácidos nucleicos, sabores y colorantes.

20 El alimento o bebida tal como se utiliza de acuerdo con la presente invención puede ser utilizado como alimento o bebida saludables o un alimento o bebida funcionales para prevenir y/o tratar la caries causadas por mutans Streptococci diferentes a Streptococcus mutans.

25 Cuando el alimento o bebida de acuerdo con la presente invención es ingerido, la cantidad que se debe ingerir no está limitada específicamente. La cantidad que se debe ingerir va 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 de manera continua en esta cantidad durante un período de tiempo desde un solo día hasta 5 años, preferiblemente desde 2 semanas a un año. Aquí, la cantidad ingerida puede ser ajustada hasta un rango apropiado dependiendo de la severidad del síntoma o de la gestión individual del alimento o bebida, la edad y el peso corporal del mismo, y similares.

30 El pienso tal como se utiliza de acuerdo con la presente invención puede ser cualquier pienso que comprende el ingrediente activo. El pienso incluye, por ejemplo, piensos para mascotas para perros, gatos y ratas, piensos para ganado para vacas y cerdos, piensos para aves para pollos y pavos, y piensos para cultivo de peces para sargo y atún de aleta amarilla.

35 El pienso puede ser producido mediante mezcla apropiada del ingrediente activo tal como se describió aquí anteriormente con un material de pienso crudo incluyendo, por ejemplo, cereales, salvados, tortas de semillas oleaginosas, materiales de pienso crudos derivados de animales, otros materiales para pienso crudos y productos purificados.

Los cereales incluyen, por ejemplo, millo, trigo, cebada, avena, centeno, arroz integral, alforfón, millo de cola de zorra, millo chino, grama del deccan, maíz y soja.

40 Los salvados incluyen, por ejemplo, salvado de arroz, salvado de arroz desengrasado, harina de grado bajo, germen de trigo, salvado de cebada, pellas de tamizado, salvado de maíz y germen de maíz.

45 Las tortas de semillas oleaginosas incluyen, por ejemplo, torta de soja, polvo de soja, torta de linaza, torta de algodón, torta de cacahuete, torta de cártamo, torta de coco, torta de palma, torta de sésamo, torta de girasol, torta de colza, torta de kapok y torta de mostaza. Los materiales de pienso crudo derivados de animales incluyen, por ejemplo, polvo de pescado, torta importada, torta entera, y torta costera, pescado soluble, polvo de carne, polvo de carne y hueso, polvo de sangre, pelo descompuesto, polvo de hueso, subproductos de carnicería, torta de plumas, pupas de gusano de seda, leche descremada, caseína, suero seco y krill.

50 Otros materiales de pienso crudos incluyen, por ejemplo, tallos y hojas de plantas tales como alfalfa, cubo de heno, torta de hojas de alfalfa y polvo de hojas de algarrobo, subproductos de industrias de procesamiento del maíz, tales como torta de gluten de maíz, pienso de gluten de maíz y licor de maíz, almidón, azúcar, levadura, subproductos de la industria de la fermentación tales como residuos de cerveza, raíz de malta, residuos de licor y residuos de salsa de soja, subproductos agrícolas tales residuos procesados de cítricos, residuos de cuajo de soja, residuos de café, residuos de cacao, casaba, haba, torta de guar, algas, espirulina y clorela.

Los productos purificados incluyen, por ejemplo, proteínas tales como caseína y albúmina, aminoácidos, almidón, celulosa, sacáridos tales como sacarosa y glucosa, minerales y vitaminas.

5 En caso de proveer a los animales el pienso de acuerdo con la presente invención, la cantidad del pienso que va a ser ingerida no está limitada específicamente pero preferiblemente, por ejemplo, de 0.1 mg a 50 g por un kilogramo de peso corporal por día, preferiblemente 0.5 mg a 20 g por 1 kg de peso corporal por día, con base en la cantidad del ingrediente activo. El pienso se ingiere continuamente en esta cantidad durante un período desde un solo día hasta 5 años, preferiblemente desde 2 semanas a un año. De nuevo, la cantidad ingerida puede ser ajustada a un rango apropiado dependiendo de las especies, edad y peso corporal del animal que está ingiriendo el pienso, y similares.

10 En una realización adicional, la presente invención se relaciona con el uso de un microorganismo que pertenece al grupo de las bacterias del ácido láctico a saber como se define en las reivindicaciones, el cual es capaz de unirse específicamente a una bacteria perteneciente al grupo de mutans Streptococci tal como define en las reivindicaciones, para la preparación de una composición anticariogénica para el tratamiento o profilaxis de caries causada por mutans Streptococci diferentes a Streptococcus mutans, a saber S. sobrinus, en donde la composición anticariogénica es un aditivo para alimentos, bebidas y piensos. Preferiblemente, el aditivo para alimentos, bebidas y piensos, debido a la presencia de un microorganismo o derivado o mutante o fragmento del mismo tal como se describió aquí es, entre otros, capaz de unirse específicamente a mutans Streptococci de tal manera que previene y/o trata la caries causada por mutans Streptococci diferentes a Streptococcus mutans, específicamente S. sobrinus. Preferiblemente, el microorganismo, mutante, derivado o fragmento del mismo es un microorganismo depositado tal como se describió aquí anteriormente, o un mutante, derivado o fragmento del mismo. El aditivo para alimentos o bebidas incluye el aditivo para composiciones nutritivas para infantes.

20 El aditivo para alimentos puede ser producido por un método general para la producción de aditivos para alimentos, bebidas o piensos. Si es necesario, los aditivos para uso general en alimentos, bebidas o piensos, por ejemplo, los aditivos descritos en Food Additive Handbook (The Japan Food Additives Association; editado el 6 de enero de 1997) puede ser agregado satisfactoriamente, incluyendo endulzantes, colorantes, conservantes, espesantes y estabilizadores, antioxidantes, agentes para la fijación del color, blanqueadores, antisépticos, bases de goma, amargos, enzimas, agentes abrillantadores, acidificantes, sazonadores, emulsificadores, potenciadores, agentes para la manufactura, sabores y extractos de especias. Adicionalmente, pueden agregarse satisfactoriamente sacáridos convencionales, almidón, materiales inorgánicos, polvos de plantas, excipientes, desintegradores, lubricantes, aglomerantes, surfactantes y plastificantes mencionados previamente para las tabletas farmacéuticas.

Los aditivos incluyen uno de los siguientes aditivos.

30 Los endulzantes incluyen aspartame, licorís, estevia, xilosa y rakanka (fruta de la momordica grosvenoni). Los colorantes incluyen carotenoides y oleoresinas de cúrcuma, flavonoides, color caramelo, color de espirulina, clorofila, color de patata dulce púrpura, color de ñame púrpura, color de perilla y color de arándanos.

35 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 goma arábiga y goma de xantano, alginatos, quitina, quitosano, extracto de aloe, goma guar, hidroxipropil celulosa, caseína de sodio, almidón de maíz, carboximetilcelulosa, gelatina, agar, dextrina, metil celulosa, alcohol polivinílico, microfibras de celulosa, celulosa microcristalina, celulosa de algas, poliácido de sodio, polifosfato de sodio, carragenano o paredes de células de levadura.

40 Los antioxidantes incluyen, por ejemplo, el grupo de vitaminas C, etilendiaminotetraacetato de sodio, etilendiaminotetraacetato de calcio, ácido eritórbito, orizanol, catequina, quercetina, extracto de clavo, rutina tratada con enzimas, extracto de manzana, extracto de semilla de sésamo, dibutilhidroxitolueno, extracto de hinojo, extracto de rábano, extracto de apio de agua, extracto de té, tocoferoles, extracto de colza, extracto de grano de café, extracto de semilla de girasol, ácido ferúlico, butilhidroxianisol, extracto de hoja de arándanos, extracto de propóleo, extracto de pimienta, extracto de bálsamo de jardín, ácido gálico, extracto de eucalipto y extracto de romero.

45 Los agentes fijadores de color incluyen, por ejemplo, nitrito de sodio. Los blanqueadores incluyen, por ejemplo, sulfito de sodio.

50 Los antisépticos incluyen, por ejemplo, o-fenil fenol. La base de goma incluye, por ejemplo, acetil ricinooleato de metilo, cera de urushi, goma éster, resina elemi, cera de urucury, goma de kauri, cera de carnauba, ésteres de ácidos grasos de glicerina, cera de espermaceti, bálsamo de copaiba, resina de copal, goma, cera de salvado de arroz, cera de caña, shellac, jelutong, ésteres de ácidos grasos de sacarosa, goma natural despolimerizada, cera de parafina, bálsamo de abeto, ésteres de ácidos grasos de propilen glicol, pulpa pulverizada, cáscara de arroz pulverizada, aceite de jojoba, poliisobutileno, polibuteno, cera microcristalina, goma de masticar, cera de abejas y fosfato de calcio. Los agentes de amargo incluyen por ejemplo, ácido iso-alfa-amargo, cafeína, extracto de kawatake (Coriolus versicolor), extracto de corteza roja de sinchona, extracto de corteza de feladendron, extracto de raíz de genciana, extractos de especias, naringina modificada enzimáticamente, extracto de casia de Jamaica, teobromina, naringina, extracto de cassia, extracto de absent, extracto de isodonis, té de oliva, extracto de naranja amarga (Citrus aurantium), extracto de lúpulo y extracto de ajeno.

Las enzimas incluyen, por ejemplo, amilasa, tripsina o rennet.

- Los agentes abrillantadores incluyen, por ejemplo, cera de urushi y cera japonesa. Los acidificantes incluyen, por ejemplo, ácido adípico, ácido itacónico, ácidos cítricos, ácidos succínicos, acetato de sodio, ácidos tartáricos, dióxido de carbono, ácido láctico, ácido fítico, ácido fumárico, ácido málico y ácido fosfórico. Los aderezos incluyen por ejemplo aminoácidos tales como asparagina, ácido aspártico, ácido glutámico, glutamina, alanina, isoleucina, glicina, serina, cistina, tirosina, leucina, y pralina, 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 ácido cítrico y ácido succínico, cloruro de potasio, salmuera disminuida en cloruro de sodio, cloruro de potasio crudo, sal de suero, fosfato de tripotasio, hidrógeno fosfato de dipotasio, dihidrógeno fosfato de potasio, hidrógeno fosfato de disodio, dihidrógeno fosfato de sodio, fosfato trisódico y extracto de clorela.
- Los potenciadores incluyen, por ejemplo, sales de zinc, el grupo de la vitamina C, diversos aminoácidos, ácido 5-adenílico, cloruro de hierro, hespiridina, diversos calcos calcinados, diversos calcos no calcinados, dibenzoiltiamina, hidróxido de calcio, carbonato de calcio, tiamina-sal de clorhidrato, Dunallella. Oaroteno, tocoferol, ácido nicotínico, caroteno de zanahoria, caroteno de aceite de palma, pantotenato de calcio, vitamina A, hidroxiprolina, dihidrógeno fosfato de calcio, pirofosfato ferroso, pirofosfato férrico, ferritina, hierro heme, menaquinona, ácido fólico y riboflavina.
- Los agentes para manufactura incluyen, por ejemplo, auxiliares del procesamiento tales como acetona y resinas de intercambio iónico. Los sabores incluyen, por ejemplo, esencia de vainilla y extractos de especias que incluyen, por ejemplo, extracto de capsicum.
- Estos diversos aditivos pueden ser agregados al ingrediente activo, teniendo en consideración el modo de administración, de acuerdo con la presente invención. La composición anticariogénica tal como se utiliza de acuerdo con la presente invención abarca una cantidad del microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico o un derivado o mutante de los mismos o un análogo o fragmento de los mismos. Preferiblemente, el microorganismo, mutante, derivado o fragmento del mismo es un microorganismo depositado tal como se describió aquí anteriormente, o un mutante derivado o fragmento del mismo. Se prevé que las composiciones y en particular la composición anticariogénica comprenden los microorganismos antes mencionados pertenecientes al grupo de las bacterias del ácido láctico en la forma de un microorganismo probiótico. A saber, además del efecto probiótico, el microorganismo probiótico antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico es útil para tratar y/o prevenir la caries causada por mutans Streptococci diferentes a Streptococcus mutans. La cantidad de dicho microorganismo probiótico es suficientemente alta para modificar positivamente de manera significativa la condición que se va a tratar, preferiblemente la caries, pero lo suficientemente bajo como para evitar efectos colaterales serios (en una relación beneficio/riesgo razonable), dentro del alcance de un juicio médico profundo. Una cantidad efectiva de dichos microorganismos probióticos variará con la meta particular que se pretende alcanzar, la edad y condición física del paciente que está siendo tratado, 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 así la mínima cantidad que provea el efecto deseado de unión a mutans Streptococci. La presencia de, por ejemplo,  $1 \times 10^9$  bacterias, como células enteras viables o no viables, en 0.05 ml de solución de solución salina regulada con fosfato, o en 0.05 ml de suspensión de agar, o el peso seco equivalente de fragmentos de paredes celulares, es efectivo cuando se administra en cantidades que van desde aproximadamente 0.05 ml hasta aproximadamente 20 ml.
- Una ventaja práctica decidida es que el organismo probiótico puede ser administrado de manera conveniente tal como una ruta oral. Dependiendo de la ruta de administración, los ingredientes activos que comprenden dichos organismos probióticos pueden requerir un recubrimiento en un material para proteger dichos organismos de la acción de enzimas, ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar dichos organismos. Con el fin de administrar organismos probióticos por una administración diferente a la parenteral, deben ser recubiertos por, o administrados con, un material para evitar la inactivación. Por ejemplo, los organismos probióticos pueden ser coadministrados con inhibidores enzimáticos o en liposomas. Los inhibidores enzimáticos incluyen inhibidores de la tripsina pancreática, diisopropil fluorofosfato (DFP) y trasilol. Los liposomas incluyen emulsiones P40 de agua en aceite en agua así como liposomas convencionales y específicamente diseñados que transportan lactobacilos o sus subproductos a la superficie urogenital. Las dispersiones también pueden ser preparadas por ejemplo, en glicerol, polietilen glicoles líquidos y mezclas de los mismos, y en aceites. En general, las dispersiones se preparan incorporando los diversos organismos probióticos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones estériles inyectables, los métodos preferidos de preparación son secado al vacío y la técnica de secado por congelación que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución previamente esterilizada por filtración de los mismos. Métodos preferidos adicionales de preparación incluyen pero no se limitan a liofilización y secado por calor.
- La composición anticariogénica también abarca productos que pretenden ser administrados oralmente, o por vía bucal, los cuales comprenden un vehículo farmacéutico aceptable tal como se describe aquí al cual, o sobre el cual, se agregan las células del microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico en forma fresca, concentrada o seca, por ejemplo. Desde luego, puede agregarse también un derivado o análogo o fragmento de dicho microorganismo o cualquier combinación de dicho microorganismo, derivado y/o

fragmento del mismo los cuales se divulgan aquí. Estos productos pueden proveerse en la forma de una suspensión ingerible, un gel, un difusor, una cápsula, una cápsula de gelatina dura, un jarabe, o en cualquier otra forma galénica conocida para las personas experimentadas en la técnica.

5 Cuando los organismos probióticos están protegidos adecuadamente como se describe anteriormente, el compuesto activo puede ser administrado por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o con un vehículo comestible asimilable, o puede ser incluido en una cápsula de gelatina dura o blanda, o puede comprimirse en tabletas diseñadas para pasar a través del estómago (por ejemplo, con recubrimiento entérico), o puede incorporarse directamente en la comida de la dieta. Para administración terapéutica oral, los organismos probióticos pueden ser incorporados con excipientes y utilizados en la forma de tabletas ingeribles, tabletas bucales, comprimidos, 10 cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, galletas y similares. Las composiciones o preparaciones de acuerdo con la presente invención se preparan de tal manera que una forma de dosificación unitaria oral contiene, por ejemplo, aproximadamente  $1 \times 10^9$  lactobacilos viables o no viables por mililitro por ejemplo. El organismo probiótico es combinado para una administración conveniente y efectiva en cantidades efectivas con un vehículo adecuado farmacéutica o aceptable como alimento en una forma de dosificación unitaria como se describe aquí anteriormente. 15 Una forma de dosificación unitaria puede contener, por ejemplo, el compuesto activo principal en una cantidad de aproximadamente  $10^9$  lactobacilos por ejemplo, viables o no viables, por ml. En el caso de composiciones que contienen ingredientes suplementarios tales como prebióticos, las dosificaciones se determinan con referencia a la dosis usual y a la forma de administración de los dichos ingredientes

20 Otro aspecto en conexión con la presente invención se relaciona con un método de profilaxis o tratamiento de caries causadas por mutans Streptococci diferentes a Streptococcus mutans. Preferiblemente el método de profilaxis o tratamiento comprende la administración a un sujeto de un microorganismo que pertenece al grupo de las bacterias del ácido láctico, caracterizado porque dicho microorganismo es capaz de unirse específicamente a una bacteria que pertenece al grupo de mutans Streptococci o un mutante, derivado o fragmento de dicho microorganismo tal como se describe aquí anteriormente. Más preferiblemente, el microorganismo es un microorganismo tal como se describió aquí anteriormente, incluso más preferiblemente, el microorganismo es un lactobacillus depositado en el DSMZ, tal como se describió aquí anteriormente. 25

El derivado o fragmento del microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico puede ser cualquier derivado o fragmento tal como se describió aquí anteriormente.

30 Preferiblemente, el sujeto que se va a tratar es un animal. Más preferiblemente, el animal es un mamífero, incluso más preferiblemente el mamífero es un mamífero de mascota. En una realización preferida, la mascota es un perro, un gato, un hámster, un mono, una rata o un ratón. En otra realización preferida el animal es ganado, un caballo, un cerdo, un asno, una oveja o una cabra. En otra realización preferida el mamífero es un ser humano.

35 Preferiblemente, un mutans Streptococcus es un microorganismo que pertenece a la especie Streptococcus mutans, Streptococcus sobrinus, Streptococcus cricetus, Streptococcus Ratti, Streptococcus ferus o Streptococcus macacae. Incluso más preferiblemente, un mutans Streptococcus se relaciona con un microorganismo perteneciente al serotipo c de Streptococcus mutans (DSMZ 20523), serotipo e de Streptococcus mutans (NCTC 10923) serotipo f de Streptococcus mutans (NCTC 11060), Streptococcus sobrinus DSM 20742 Streptococcus ratti DSM 20564, Streptococcus cricetus DSM 20562, Streptococcus ferus DSM 20646 o Streptococcus macacae DSM 20714. La caries que se va a tratar o prevenir es causada por mutans Streptococci diferentes a Streptococcus mutans, 40 preferiblemente, la caries es causada por al menos una bacteria seleccionada del grupo consistente de Streptococcus sobrinus, Streptococcus cricatus, Streptococcus ratti, Streptococcus ferus y Streptococcus macacae. La administración de un microorganismo que pertenece al grupo de bacterias del ácido láctico tal como se describe anteriormente en el contexto del método de tratamiento o profilaxis en conexión con la presente invención puede llevarse a cabo de cualquier manera adecuada conocida para la persona experimentada en la técnica. 45 Preferiblemente, la administración abarca el uso y aplicación de composiciones tal como se describe aquí anteriormente, las cuales pueden contener opcionalmente, por ejemplo, vehículos farmacéuticos o cosméticos tal como se describieron aquí anteriormente. La dosificación y transcurso del tiempo de la administración puede establecerse de acuerdo con una información adecuada conocida para la persona experimentada en la técnica. Preferiblemente, dicha dosificación y transcurso del tiempo pueden establecer como se describió aquí anteriormente.

50 La invención se ilustra mediante las Figuras 1 a 3 tal como se describe en lo que sigue:

La Figura 1 muestra la agregación de Streptococcus mutans por especies de Lactobacillus. En particular, la figura representa una mezcla de un Lactobacillus que se agrega con S. mutans (tubo izquierdo) en comparación con una mezcla de Lactobacillus que no se agrega con S. mutans (tubo de la derecha). El experimento ha sido llevado a cabo como se describe en el Ejemplo 4 y los tubos se dejaron sin perturbación durante 20 minutos para permitir que 55 los agregados se depositen.

La Figura 2 muestra una imagen microscópica del agregado entre Lactobacillus y S. mutans mostrado en la Figura 1 (tubo de la izquierda). La imagen fue tomada con una magnificación de 1000 veces utilizando un microscopio de contraste de fases.

La Figura 3 muestra la agregación de diferentes mutans Streptococci por lactobacilos. El ensayo fue llevado a cabo como se describió en el Ejemplo 5. En resumen, los mutans Streptococci fueron teñidos utilizando una tinción con fluorescencia. Después de la agregación de los Streptococci por parte de los lactobacilos, las pellas resultantes fueron separadas por centrifugación. La cantidad de fluorescencia de las pellas fue tomada como una medida de la cantidad de mutans Streptococci agregados.

Un mejor entendimiento de la presente invención y de sus principales ventajas se obtendrá a partir de los siguientes ejemplos, ofrecidos solamente para propósitos de ilustración.

### Ejemplo 1

#### Almacenamiento y crecimiento

El almacenamiento y crecimiento de cepas puede ocurrir de acuerdo con procedimientos ordinarios. Por ejemplo, las cepas pueden ser almacenadas en reservas congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . 1 ml de un cultivo puede cultivarse en una fase estacionaria (OD<sub>600</sub>/mL 4 - 8) en medio MRS y mezclado con 500  $\mu\text{l}$  de una solución de glicerina estéril al 50% y congelarse. Los cultivos de mutans Streptococci pueden cultivarse en medio TSY en fase estacionaria (OD<sub>600</sub>/mL 1-2) y tratarse como se mencionó anteriormente.

El cultivo de mutans Streptococci (*S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. ratti*, *S. cricetus*, *S. ferus* o *S. macacae*) así como el cultivo de lactobacilos puede hacerse en 5 ml en tubos Falcon cerrados a  $37^{\circ}\text{C}$  sin agitación durante la noche.

En particular, las cepas usadas en la presente solicitud fueron almacenadas como reservas congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . 1 ml de un cultivo cultivado en fase estacionaria (OD<sub>600</sub>/mL 4 - 8) en caldo MRS se mezcló con 500  $\mu\text{l}$  de una solución de glicerol estéril al 50% y se congeló.

En particular, los cultivos de mutans Streptococci fueron cultivados en caldo TSY en fase estacionaria (OD<sub>600</sub>/mL 1-2) y tratados como se mencionó anteriormente.

El cultivo de mutans Streptococci (*S. mutans* (DSM 20523, serotipo c; NCTC 10923, serotipo e; NCTC 11060, serotipo f), *S. sobrinus* DSM 20742, *S. ratti* DSM 20564, *S. cricetus* DSM 20562, *S. ferus* DSM 20646 o *S. macacae* DSM 20714) y el cultivo de lactobacilos se hizo en 5 ml en tubos Falcon cerrados a  $37^{\circ}\text{C}$  sin agitación durante la noche. Para los ensayos de fluorescencia como se describen en el Ejemplo 5, se usó *S. mutans* DSM 20523.

Para un ensayo de agregación los lactobacilos fueron cultivados en medio MRS. Se inocularon 5 ml de medio MRS con 10  $\mu\text{l}$  de la reserva y se incubó durante 3 días a  $37^{\circ}\text{C}$  bajo condiciones aeróbicas. Se midió la densidad óptica del cultivo a 600 nm (OD<sub>600</sub>). El cultivo fue diluido entonces hasta un OD<sub>600</sub> de 2 utilizando regulador de PBS. Los mutans Streptococci fueron cultivados en 7 ml de medio TSY. Se inocularon 7 ml de medio TSY con 10  $\mu\text{l}$  de la reserva y se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  bajo condiciones anaeróbicas.

### Ejemplo 2

#### Clasificación taxonómica de las cepas

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

### Ejemplo 3

#### Tinción de las células

Después de que los lactobacilos y el mutans Streptococci fueron cultivados como se describió en el Ejemplo 1, los mutans Streptococci fueron teñidos utilizando una tinción con fluorescencia. Para esto, se midió el OD<sub>600</sub> del cultivo. El cultivo fue recolectado por centrifugación a 3200 x g durante 5 minutos. La pella fue resuspendida en regulador de PBS. La cantidad de regulador fue calculada de tal manera que la suspensión resultante tenía un OD<sub>600</sub> de 4.2 ml de esa suspensión que fue mezclada con 2  $\mu\text{l}$  de una solución de CFDA-SE (Invitrogen, USA) que fue preparada de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La tinción de las células fue llevada a cabo incubando la mezcla durante 2 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ . Las células teñidas fueron recolectadas por centrifugación a 3200 x g durante 5 minutos. Las células fueron resuspendidas subsecuentemente en 2 ml de regulador PBS.

### Ejemplo 4

#### Ensayo de agregación de pellas de mutans Streptococci

Para el ensayo, la mezcla de lactobacilos y mutans Streptococci se hizo en relaciones volumétricas de 3:1 a 60:1 (mutans Streptococci: lactobacilos), correspondiendo esto a una relación de unidades formadoras de colonia de 1:50 a 1:2.5.

5 Una densidad óptica medida a una longitud de onda de 600 nm en 1 ml significa preferiblemente para mutans Streptococci  $3 \times 10^8$  unidades formadoras de colonia y para lactobacilos preferiblemente  $7 \times 10^9$  unidades formadoras de colonia. La mezcla se hizo en un volumen de 2 ml en tubos Falcon de 15 ml. Las suspensiones de cultivo fueron diluidas con regulador de PBS para obtener las relaciones volumétricas mencionadas anteriormente a la vez que se mantenía el volumen final en 2 ml. La mezcla se sometió a vórtex durante 15 segundos. Una agregación es visible como una turbidez inmediata de la suspensión. Los tubos se dejaron sin perturbación durante 20 minutos, período después de tiempo después del cual los agregados se depositan como pellas visibles mientras que las mezclas no agregantes permanecen en suspensión.

10 Los agregados formados fueron separados por centrifugación a 500 x g durante 30 segundos. Después de esto, la cantidad de agregación fue cuantificada midiendo la cantidad de células no agregadas que permanecieron en el sobrenadante. De manera correspondientemente, se retiró 1 ml del sobrenadante cuidadosamente para medir la densidad óptica. La densidad óptica fue medida a 600 nm. El valor después de la sustracción del experimento de control respectivo sin lactobacilos representa la cantidad de células que no se han agregado.

15 Como control, se investiga siempre la autoagregación de las respectivas cepas de Lactobacillus y de las cepas de mutans Streptococcus llevando a cabo la prueba con solamente el Lactobacillus o la cepa de mutans Streptococcus agregada al tubo. Una agregación de S. mutans por Lactobacillus se muestra en las Figuras 1 (tubo izquierdo) y 2.

Las cepas de lactobacilos tal como se describen aquí anteriormente, en particular aquellas que se depositan con el DSMZ, exhibieron una agregación de todos los tipos de S. mutans sin mostrar un comportamiento de autoagregación.

20 Medios:

**Caldo MRS:**

Mezcla MRS (Difco, EEUU) 55 g/L

pH: 6.5

**Caldo TSY:**

Mezcla TSY (Difco, EEUU) 30 g/L

**Caldo MRS:**

Extracto de levadura (Deutsche Hefewerke, Alemania) 3 g/L

Regulador:

Regulador de PBS:

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

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2 g/L

NaCl 8.8 g/L

pH ajustado con HCl

25 **Ejemplo 5**

Ensayo de agregación de fluorescencia de mutans Streptococci

30 Para el ensayo, se mezclaron una suspensión del lactobacillus respectivo y de mutans Streptococcus teñido respectivo (S. mutans DSM 20523 con Lb-OB-K1 (DSM 16667), S. mutans DSM 20523 con Lb-OB-K2 (DSM 16668), S. mutans DSM 20523 con Lb-OB-K3 (DSM 16669), S. mutans DSM 20523 con Lb-OB-K4 (DSM 16670), S. mutans DSM 20523 con Lb-OB-K5 (DSM 16671), S. mutans DSM 20523 con Lb-OB-K6 (DSM 16672), S. mutans DSM 20523 con Lb-OB-K7 (DSM 16673);

35 S. sobrinus DSM 20742 con Lb-OB-K1 (DSM 16667), S. sobrinus DSM 20742 con Lb-OB-K2 (DSM 16668), S. sobrinus DSM 20742 con Lb-OB-K3 (DSM 16669), S. sobrinus DSM 20742 con Lb-OB-K4 (DSM 16670), S. sobrinus DSM 20742 con Lb-OB-K5 (DSM 16671), S. sobrinus DSM 20742 con Lb-OB-K6 (DSM 16672), S. sobrinus DSM 20742 con Lb-OB-K7 (DSM 16673);

S. cricetus DSM 20562 con Lb-OB-K1 (DSM 16667), S. cricetus DSM 20562 con Lb-OB-K2 (DSM 16668), S. cricetus DSM 20562 con Lb-OB-K3 (DSM 16669), S. cricetus, DSM 20562 con Lb-OB-K4 (DSM 16670), S. cricetus DSM 20562 con Lb-OB-K5 (DSM 16671), S. cricetus DSM 20562 con Lb-OB-K6 (DSM 16672), S. cricetus DSM 20562 con Lb-OBK7 (DSM 16673);

- 5 S. ratti DSM 20564 con Lb-OB-K1 (DSM 16667), S. ratti DSM 20564 con Lb-OB-K2 (DSM 16668), S. ratti DSM 20564 con Lb-OB-K3 (DSM 16669), S. ratti DSM 20564 con Lb-OB-K4 (DSM 16670), S. ratti DSM 20564 con Lb-OB-K5 (DSM 16671), S. ratti DSM 20564 con Lb-OB-K6 (DSM 16672), S. ratti DSM 20564 con Lb-OB-K7 (DSM 16673);

- 10 S. ferus DSM 20646 con Lb-OB-K1 (DSM 16667), S. ferus DSM 20646 con Lb-OB- K2 K2 (DSM 16668), S. ferus DSM 20646 con Lb-OB-K3 (DSM 16669), S. ferus DSM 20646 con Lb-OB-K4 (DSM 16670), S. ferus DSM 20646 con Lb-OB-K5 (DSM 16671), S. ferus DSM 20646 con Lb-OB-K6 (DSM 16672), S. ferus DSM 20646 con Lb-OB-K7 (DSM 16673);

- 15 S. macacae DSM 20724 con Lb-OB-K1 (DSM 16667), S. macacae DSM 20724 con Lb-OB-K2 (DSM 16668), S. macacae DSM 20724 con Lb-OB-K3 (DSM 16669), S. macacae DSM 20724 con Lb-OB-K4 (DSM 16670), S. macacae DSM 20724 con Lb-OB-K5 (DSM 16671), S. macacae DSM 20724 con Lb-OB-K6 (DSM 16672) and S. macacae DSM 20724 con Lb-OB-K7 (DSM 16673)). Se agregaron 50 µl de la suspensión de lactobacillus a 50 µl de mutans Streptococci teñidos en una placa de microtitulación de 96 pozos. La placa fue sometida a vórtex a velocidad total durante 12 minutos. Después de esto la placa fue centrifugada a 500 x g durante 10 segundos. El sobrenadante fue retirado cuidadosamente y descartado. La pella fue resuspendida en 100 µl de regulador de PBS.

- 20 La fluorescencia de la suspensión fue medida en un lector de fluorescencia de placa de microtitulación a una longitud de onda de 495 nm para excitación y 525 para emisión.

Como control se trataron lactobacilos solos así como mutans Streptococci teñidos y se midieron como se describe. La fluorescencia de fondo medida para los mutans Streptococci respectivos solos fue sustraída del valor medido para la agregación con el lactobacillus respectivo. Todas las mediciones fueron hechas por triplicado. Los mutans Streptococci fueron agregados por todos los lactobacilos probados (véase Figura 3).

- 25 Medios:

Caldo MRS:

Mezcla MRS (Difco, EEUU) 55 g/L

pH: 6.5

Caldo TSY:

Mezcla TSY (Difco, EEUU) 30 g/L

Extracto de levadura (Deutsche Hefewerke, Alemania) 3 g/L

Regulador:

Regulador de PBS:

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O 1.5 g/L

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 g/L

NaCl 8.8 g/L

pH ajustado con HCl

- 30 **Ejemplo 6**

Especificidad de la agregación hacia miembros típicos de la flora oral

Los cultivos de lactobacilos fueron cultivados como se describe en el Ejemplo 1.

- 35 Las bacterias orales – a saber: Streptococcus salivarius subsp. thermophilus (aislado por OrganoBalance, identificado 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) – fueron cultivados 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 antes mencionadas se mezcló preferiblemente en una relación volumétrica de 3:1 con cultivos de *Lactobacillus* y la agregación se ensayó como en el Ejemplo 4. Para cada prueba de agregación/no agregación se utiliza preferiblemente solo una de las bacterias antes mencionadas para determinar inmediatamente el resultado de la prueba.

- 5 Como control, se investigó siempre una autoagregación de la respectiva bacteria oral así como de las cepas de *Lactobacillus* probados ejecutando la prueba solamente con los lactobacilos o con las cepas de flora oral agregadas al tubo.

10 Las cepas *L. paracasei* ssp. *paracasei* strains Lb-OB-K1 (DSM 16667), Lb-OB-K2 (DSM 16668), Lb-OB-K3 (DSM 16669), Lb-OB-K4 (DSM 16670), Lb-OB-K5 (DSM 16671), no agregaron las bacterias orales mencionadas anteriormente. Las cepas *L. rhamnosus* Lb-OB-K6 (DSM 16672) y Lb-OB-K7 (DSM 16673) agregaron el *Streptococcus salivarius* subespecie *thermophilus*.

Caldo BHI:

Mezcla BHI (Difco, EEUU)	37 g/L
pH:	7.2

### Ejemplo 7

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

- 15 Las bacterias fueron cultivadas como en el Ejemplo 1.

20 Los cultivos de lactobacilos crecidos fueron incubados a 121°C a 2 bar en vapor saturado durante 20 minutos (sometidos a autoclave). Después de enfriamiento de los cultivos sometidos a autoclave hasta temperatura ambiente, los lactobacilos fueron mezclados en una relación volumétrica de 1:3 con cultivos de *S. mutans* y se probó la agregación como en el Ejemplo 4 incluyendo los experimentos de control. La agregación también se probó utilizando las bacterias orales como se delineó en el Ejemplo 6.

Se encontró que el comportamiento de agregación de los lactobacilos no cambió por los procedimiento de sometimiento a autoclave frente a los serotipos de *S. mutans* o hacia las bacterias orales probados.

### Ejemplo 8

Agregación por lactobacilos inactivados por calor

- 25 Los lactobacilos fueron cultivados como se describe en el Ejemplo 1. Los mutans *Streptococci* fueron cultivados y teñidos como se describe en los Ejemplos 1 y 3. Los cultivos de lactobacilos cultivados se ajustaron a un OD<sub>600</sub> de 2 como se describe en el Ejemplo 1. Se incubó 1 ml de esa suspensión a 121°C a 2 bar durante 20 minutos (sometido a autoclave). Después de enfriamiento de los cultivos sometidos a autoclave hasta temperatura ambiente, la agregación se midió como se describe en el Ejemplo 5 incluyendo experimentos de control. Los lactobacilos inactivados por calor aún agregaron todos los mutans *Streptococci*.

### Ejemplo 9

Dependencia de la agregación en el valor de pH

- 35 Las bacterias fueron cultivadas como en el Ejemplo 1. Se recolectaron 0.5 ml de los lactobacilos y 1.5 ml de *S. mutans* por centrifugación a 3200 \* g durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante. Las células fueron resuspendidas en su volumen original (0.5 ml y 1.5 ml, respectivamente) en diferentes reguladores de PBS ajustados a diferentes valores de pH. Los valores de pH de los reguladores fueron ajustados a valores de 7.0 hasta 3.0 en etapas de 0.5 unidades de pH. Los cultivos fueron resuspendidos en reguladores del valor de pH respectivo que se utilizó para el ensayo del comportamiento de agregación.

- 40 Después de esto los lactobacilos fueron mezclados preferiblemente en una relación volumétrica de 1:3 con cultivos de *S. mutans* y la agregación fue probada como en el Ejemplo 4 incluyendo los experimentos de control. No ocurrió agregación visible de *S. mutans* por los lactobacilos a valores de pH inferiores a 4.5.

### Ejemplo 10

Dependencia de la agregación en el valor de pH

- 45 Los lactobacilos fueron cultivados como se describe en el Ejemplo 1. Los mutans *Streptococci* fueron cultivados y teñidos como se describe en los Ejemplos 1 y 3. Después de lo anterior la agregación fue probada en diferentes valores de pH. Para este propósito se resuspendieron lactobacilos así como *estreptococos* en regulador de acetato

ajustado al respectivo pH. Los valores de pH probados fueron 4.0, 4.5 y 5.0. La agregación fue probada como se describe en el Ejemplo 5. No ocurrió agregación de mutans Streptococci a valores de pH inferiores a 4.5.

**Ejemplo 11**

Sensibilidad del comportamiento de la agregación a la liofilización

5 Las bacterias fueron cultivadas como en el Ejemplo 1.

Se cultivaron alícuotas de 1 ml de cultivos de lactobacilos por centrifugación a 3200 \* g durante 10 minutos. El sobrenadante fue descartado y las pellas fueron liofilizadas a temperatura ambiente bajo vacío durante dos horas. Las pellas secas resultantes de cada cepa de Lactobacillus probada fueron almacenadas 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, las pellas liofilizadas fueron resuspendidas en 1 ml de regulador de PBS, pH 7.0. Los lactobacilos resuspendidos fueron mezclados en una relación volumétrica de 1:3 con cultivos de S. mutans recién cultivados y se probó la agregación como en el Ejemplo 4 incluyendo los experimentos de control. El comportamiento de agregación de los lactobacilos mencionados hacia S. mutans no cambió por la liofilización o por los procedimientos de almacenamiento.

15 **Ejemplo 12**

Sensibilidad del comportamiento de agregación a la liofilización

Los lactobacilos fueron cultivados como se describe en el Ejemplo 1. Los mutans Streptococci fueron cultivados y teñidos como se describe en los Ejemplos 1 y 3. Los cultivos de lactobacilos cultivados fueron ajustados a un OD<sub>600</sub> de 2 como se describe en el Ejemplo 1. 1 mililitro de esa suspensión fue liofilizado a temperatura ambiente bajo vacío durante dos horas. Después de esto, las pellas liofilizadas fueron resuspendidas en 1 ml de regulador PBS. La agregación fue medida como se describe en el Ejemplo 5, incluyendo experimentos de control. El comportamiento de agregación de los lactobacilos mencionados hacia mutans Streptococci no cambió con la liofilización.

**Ejemplo 13**

Prueba sobre la resistencia a proteasa

25 Las bacterias fueron cultivadas como en el Ejemplo 1.

Las proteasas usadas fueron pronasa E, proteinasa K, tripsina, quimotripsina (todas obtenidos de Sigma, Alemania). Se lavaron alícuotas de 1 ml de los lactobacilos en regulador de PBS recolectando las células por centrifugación a 3200 \* g durante 10 minutos y resuspendiendo la pella en 1 ml de regulador de PBS (pH 7.0). Después esto las células fueron recolectadas de nuevo como se describió anteriormente y resuspendidas en regulador de PBS (pH 7.0) que contenía la proteasa respectiva a una concentración final de 2.5 mg/ml. La suspensión fue incubada durante 1 hora a 37°C. Después de esto las células fueron lavadas y resuspendidas en regulador de PBS (pH 7.0) como se describió anteriormente.

La agregación fue probada como en el Ejemplo 3 incluyendo los experimentos de control. El comportamiento de agregación de los lactobacilos mencionados hacia S. mutans no cambió por el tratamiento con ninguna de las proteasas mencionadas.

**Ejemplo 14**

Susceptibilidad a la proteasa del comportamiento de agregación de los lactobacilos

Los lactobacilos fueron cultivados como se describió en el Ejemplo 1. Los mutans Streptococci fueron cultivados y teñidos como se describe en los Ejemplos 1 y 3. Las proteasas usadas fueron pronasa E, proteinasa K, tripsina, quimotripsina (todas obtenidas de Sigma, Alemania). Se lavaron alícuotas de 1 ml de los lactobacilos en regulador de PBS recolectando las células por centrifugación a 3200 x g durante 10 minutos y resuspendiendo la pella en 1 ml de regulador de PBS (pH 7.0). Después de esto las células fueron recolectadas de nuevo como se describió anteriormente y resuspendidas en regulador de PBS (pH 7.0) que contenía la proteasa respectiva a una concentración final de 2.5 mg/ml. La suspensión fue incubada durante 1 hora a 37°C. Después de esto, las células fueron lavadas y resuspendidas en regulador de PBS (pH 7.0) como se describió anteriormente. La agregación fue probada como se describe en el Ejemplo 5 incluyendo experimentos de control. El comportamiento de agregación de los lactobacilos hacia mutans Streptococci no fue cambiado por el tratamiento con ninguna de las proteasas mencionadas.

**Ejemplo 15**

50 Dependencia frente a los iones del comportamiento de agregación

Las bacterias fueron cultivadas como en el Ejemplo 1.

- 5 Se lavaron alícuotas de 1 ml de los lactobacilos en 1 ml de solución de EDTA 200 mM dos veces como se describió anteriormente. Después de esto las células fueron recolectadas y resuspendidas en 1 ml de regulador de PBS (pH 7.0). La agregación fue probada como en el Ejemplo 4 y se observó una pérdida completa de la capacidad de agregación. La resuspensión de los lactobacilos en 1 ml de una solución de calcio 2 mM después del lavado de dos veces en solución de EDTA 200 mM restauró la capacidad de agregar *S. mutans*. La resuspensión de las células lavadas de EDTA en solución de magnesio hasta 100 mM no restauró la capacidad para agregar *S. mutans*.

**Ejemplo 16**

Dependencia frente a iones del comportamiento de agregación

- 10 Los lactobacilos fueron cultivados como se describe en el Ejemplo 1. Los mutans *Streptococci* fueron cultivados y teñidos como se describe en los Ejemplos 1 y 3. Se lavaron alícuotas de 1 ml de los lactobacilos en 1 ml de solución de EDTA 200 mM dos veces como se describió anteriormente. Después de esto las células fueron recolectadas y resuspendidas en 1 ml de regulador de PBS (pH 7.0).

- 15 La agregación fue probada como se describe en el Ejemplo 5 y se observó la pérdida completa de la capacidad de agregación. La resuspensión de los lactobacilos en 1 ml de una solución de calcio 2 mM después del lavado dos veces en solución de EDTA 200 mM restauró la capacidad de agregar *S. mutans*. La resuspensión de las células lavadas de EDTA en solución de magnesio hasta 100 mM no restauró la capacidad para agregar mutans *Streptococci*.

**Ejemplo 17**

Prueba de agregación en presencia de saliva

- 20 Las bacterias fueron cultivadas como en el Ejemplo 1. Se recolectaron alícuotas de 2 ml de cultivos de *S. mutans* tal como se describió anteriormente y se resuspendieron en 2 ml de saliva. La saliva fue provista por dos voluntarios y usada inmediatamente después la obtención. La agregación fue probada como en el Ejemplo 4.

El comportamiento de agregación de los lactobacilos mencionados hacia *S. mutans* no cambió en presencia de saliva.

25 **Ejemplo 18**

Agregación de mutans *Streptococci* en presencia de saliva

- 30 Se tomó una muestra de saliva fresca de voluntarios. El flujo de saliva fue inducido masticando goma de mascar libre de azúcar. Los voluntarios recolectaron 15 ml de saliva con cada muestra. La saliva recién recolectada fue diluida 1:2 con regulador de PBS para el procedimiento de ensayo. Los lactobacilos y los mutans *Streptococci* fueron cultivados como se describe en el Ejemplo 1. Los mutans *Streptococci* fueron teñidos como se describe en el Ejemplo 3, excepto que después del procedimiento de tinción las células teñidas fueron resuspendidas en saliva, en vez de regulador PBS. La agregación se midió como se describe en el Ejemplo 5 incluyendo experimentos de control. La presencia de la saliva no inhibió la agregación.

**Ejemplo 19**

- 35 Composición para tableta (I)

La composición para tableta se prepara preferiblemente como se describe en el Ejemplo 4 de la página 8 de DE-C2 36 45 147, en donde, además de los ingredientes mencionados en dicho Ejemplo 4, el microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico se agrega en una cantidad de  $10^2$  hasta  $10^{12}$ , preferiblemente  $10^3$  hasta  $10^8$  células por mg de la tableta.

40 **Ejemplo 20**

Composición para tableta (II)

- 45 La composición para tableta se prepara preferiblemente como se describe en el Ejemplo 5 en la página 8 de DE-C2 36 45 147, en donde, además de los ingredientes mencionados en dicho Ejemplo 5, el microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico se agrega en una cantidad de  $10^2$  hasta  $10^{12}$ , preferiblemente  $10^3$  hasta  $10^8$  células por mg de la tableta.

**Ejemplo 21**

Composición dentífrica

La composición dentífrica se prepara preferiblemente como se describe en el Ejemplo 3 de la página 8 de DE-C2 36 45 147, en donde, además de los ingredientes mencionados en dicho Ejemplo 3, el microorganismo antes

mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico se agrega en una cantidad de  $10^2$  hasta  $10^{12}$ , preferiblemente  $10^3$  hasta  $10^8$  células por mg del dentífrico.

**Ejemplo 22**

Composición dentífrica basada en tiza

- 5 La composición dentífrica basada en tiza se prepara preferiblemente como se describe en el capítulo 7.1.4.4 "Rezepturbeispiel" en la página 205 del libro de texto "Kosmetik", W. Umbach (editor), 2nd edition, Thieme Verlag, 1995, en donde además de los ingredientes mencionados en dicho capítulo de la página 205, el microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico se agrega en una cantidad de  $10^2$  hasta  $10^{12}$ , preferiblemente  $10^3$  hasta  $10^8$  células por mg de dentífrico basado en tiza.

10 **Ejemplo 23**

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

- 15 El dentífrico en gel sobre la base de una composición dentífrica 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 de texto "Kosmetik", W. Umbach (editor), 2nd edition, Thieme Verlag, 1995, en donde, además de los ingredientes mencionados en dicho capítulo en la página 205, el microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico se agrega en una cantidad de  $10^2$  a  $10^{12}$ , preferiblemente  $10^3$  hasta  $10^8$  células por mg del dentífrico en gel con base de ácido silícico/fluoruro de sodio.

**Ejemplo 24**

Composición dentífrica contra tártaro

- 20 La composición dentífrica contra tártaro se prepara preferiblemente como se describe en el capítulo 7.1.4.4 "Rezepturbeispiel" en la página 206 del libro de texto "Kosmetik", W. Umbach (editor), 2nd edition, Thieme Verlag, 1995, en donde, además de los ingredientes mencionados en dicho capítulo en la página 206, el microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico se agrega en una cantidad de  $10^2$  hasta  $10^{12}$ , preferiblemente  $10^3$  hasta  $10^8$  células por mg del dentífrico contra tártaro.

25 **Ejemplo 25**

Composición de goma de mascar

- 30 La composición de goma de mascar se prepara preferiblemente como se describe en el Ejemplo 6 en la página 9 de DE-C2 36 45 147, en donde, además de los ingredientes mencionados en dicho Ejemplo 6, el microorganismo mencionado anteriormente pertenecientes al grupo de las bacterias de ácido láctico se agregan en una cantidad de  $10^2$  hasta  $10^{12}$ , preferiblemente  $10^3$  hasta  $10^8$  células por mg de la goma de mascar.

**Ejemplo 26**

Composición concentrada para lavado bucal

- 35 La composición concentrada para lavado bucal se prepara preferiblemente como se describe en el capítulo 7.1.4.4 "Rezepturbeispiel" de la página 206 del libro de texto "Kosmetik", W. Umbach (editor), 2nd edition, Thieme Verlag, 1995, en donde, además de los ingredientes mencionados en dicho capítulo en la página 206, el microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico se agrega en una cantidad de  $10^2$  hasta  $10^{13}$  células por ml de la composición concentrada para lavado bucal.

**Ejemplo 27**

Preparación de película

- 40 Preparación de películas:

1. fase acuosa

- calentar agua a 60°C

- aspartame (endulzante) se agrega bajo agitación

- el aspartame se disuelve completamente

- 45 - se agregan un formador de película polimérico soluble en agua, como, por ejemplo, Kollicoat IR (polietilen glicol o polivinil alcohol) o PVP (polivinilpirrolidona) o polímeros naturales tales como alginatos bajo agitación hasta que se disuelven

- después de 10 minutos, se retira el resto de la espuma

- el microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico puede agregarse en una cantidad de  $10^2$  hasta  $10^{12}$ , preferiblemente  $10^3$  hasta  $10^8$  células por película de aroma final se agrega después de enfriar la mezcla; alternativamente, el mutante o derivado del microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico o un análogo o fragmento del microorganismo antes mencionado perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico.

5

2. fase oleosa

- se disuelve mentol en aceite de menta

- se agrega polisorbato 80 a la mezcla aceite de menta - mentol - bajo agitación

10

- esta mezcla se agrega a propilen glicol bajo agitación

- pueden agregarse colorantes opcionales (tales como pigmentos, escamas)

3.

- bajo agitación la fase oleosa se mezcla lentamente con la fase acuosa

4.

15 - las películas se generan mecánicamente utilizando un dispositivo de corte

Formulaciones de muestra:

	formulación I		formulación II	
	peso [g]	Composición en película [%]	peso [g]	Composición en película [%]
<b>Fase I</b>				
aspartame	0.7	1.4	0.7	1.8
Kollicoat IR	35.0	68.5	25.0	65.8
ácido ascórbico	-	-	1.0	2.6
sabor de cereza			6.0	15.8
agua desmineralizada	85.0	-	80.0	
<b>Fase II</b>				
mentol	1.4	2.7	-	
aceite de menta	5.6	11.0	-	
polisorbato 80	0.7	1.4	-	
propilen glicol	7.0	13.7	5.0	13.2
escamas verdes	0.7	1.4	-	
escamas de azorrubina	-	-	0.3	0.8
	peso [g]	Composición en película [%]	peso [g]	Composición en película [%]
Suma	136.1	100.0	118.0	100.0
Contenido de sólidos	51.1		38.0	

Se entiende que la especificación y ejemplos deben considerarse a manera de ejemplo solamente con el alcance verdadero de la invención indicado por las siguientes reivindicaciones.

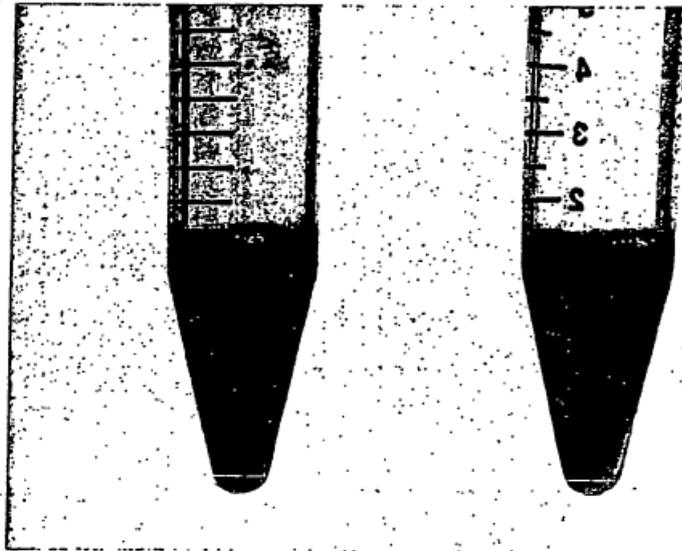
20

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Uso de un microorganismo perteneciente al género *Lactobacillus* o un mutante o derivado del mismo, caracterizado porque es capaz de unirse específicamente a una bacteria perteneciente al grupo de mutans *Streptococci*, en donde la unión específica es
- (i) resistente al tratamiento por calor, en donde dicho tratamiento por calor se lleva a cabo a una temperatura de más de 95°C durante al menos 20 minutos; y
- (ii) resistente al tratamiento con proteasa, en donde dicho tratamiento con proteasa es un tratamiento con una proteasa seleccionada del grupo consistente de pronasa E, proteinasa K, tripsina y quimiotripsina; y
- 10 (iii) dependiente del calcio; y
- (iv) formado dentro de un rango de pH entre 4.5 y 8.5; y
- (v) formado en la presencia de saliva,
- para la preparación de una composición anticariogénica para el tratamiento o prevención de caries causada por *Streptococcus sobrinus* uniéndose a dicho *Streptococcus sobrinus*,
- 15 en donde dicho derivado del microorganismo es una forma inactiva de dicho microorganismo o un fragmento de dicho microorganismo, siendo inactivado dicho microorganismo térmicamente o liofilizado, en donde dicho fragmento es una fracción de membrana obtenida mediante la preparación de una membrana y en donde dicha forma inactivada o dicho fragmento retiene la capacidad de unirse específicamente a una bacteria perteneciente al grupo de mutans *Streptococci*.
- 20 2. El uso de la reivindicación 1, en donde la unión específica puede probarse como sigue:
- (a) cultivar dicho microorganismo en una fase estacionaria;
- (b) mezclar dicho microorganismo con una bacteria perteneciente al grupo de mutans *Streptococci* la cual ha sido cultivada en fase estacionaria;
- 25 (c) incubar la mezcla obtenida en la etapa (b) bajo condiciones que permiten la formación de agregados de dicho microorganismo y una bacteria del grupo de mutans *Streptococci*; y
- (d) detectar agregados mediante la presencia de una pella.
3. El uso de la reivindicación 1 o 2, en donde dicho microorganismo es un *Lactobacillus paracasei* seleccionado del grupo consistente de *Lactobacillus paracasei* 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 número de acceso DSMZ DSM 16671, o un mutante o derivado del mismo, en donde dicho mutante o derivado retiene la capacidad de unirse a una bacteria perteneciente al grupo de mutans *Streptococci*, o en donde dicho *Lactobacillus* es un *Lactobacillus rhamnosus* seleccionado del grupo consistente de *Lactobacillus rhamnosus* que tiene un número de acceso DSMZ DSM 16672 y número de acceso DSMZ DSM 16673 o un mutante o derivado del mismo, en donde dicho mutante o derivado retiene la capacidad de unirse a una bacteria que pertenece al grupo de mutans *Streptococci*.
- 30 35
4. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho microorganismo es capaz de unirse a al menos una bacteria seleccionada del grupo consistente de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus cricatus*, *Streptococcus rattii*, *Streptococcus ferus* y *Streptococcus macacae*.
5. El uso de la reivindicación 4, en donde dicho microorganismo es capaz de unirse a
- 40 (a) *Streptococcus mutans* serotipo c (DSMZ 20523) y/o serotipo e (NCTC 10923) y serotipo f (NCTC 11060), o
- (b) *Streptococcus sobrinus* DSM 20742, o
- (c) *Streptococcus rattii* DSM 20564, o
- (d) *Streptococcus cricetus* DSM 20562, o
- (e) *Streptococcus ferus* DSM 20646, o
- 45 (f) *Streptococcus macacae* DSM 20714.

6. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicha composición anticariogénica es una composición cosmética o farmacéutica, la cual adicionalmente comprende un vehículo o excipiente farmacéutica u oralmente aceptable.
  7. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en dicha composición anticariogénica es un dentífrico, goma de mascar, tableta, lavado bucal, enjuague bucal, hilo dental o cinta dental, o es un producto alimenticio o de pienso anticariogénico, o es un aditivo para alimento, pienso o bebidas.
- 5

**Figura 1**



**Figura 2**

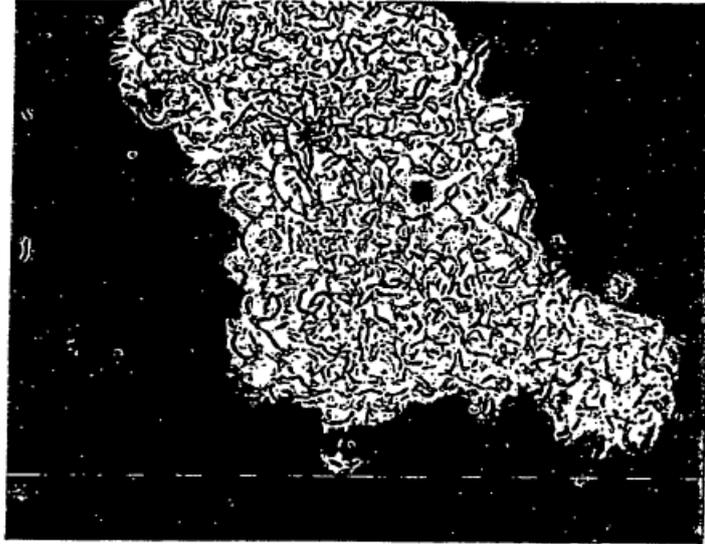


Figura 3

