

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 497 569**

51 Int. Cl.:

A23L 1/30 (2006.01)
A61K 8/99 (2006.01)
A61K 35/74 (2006.01)
A61Q 11/00 (2006.01)
A61P 1/02 (2006.01)
C12R 1/225 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.10.2010 E 10771064 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.08.2014 EP 2498627**

54 Título: **Preparación favorable para la salud y método de producción**

30 Prioridad:

10.11.2009 EP 09014070

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.09.2014

73 Titular/es:

BASF SE (100.0%)
67056 Ludwigshafen, DE

72 Inventor/es:

COOPER, BRYAN

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 497 569 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

Preparación favorable para la salud y método de producción

La invención se refiere al campo de las preparaciones favorables para la salud y de los métodos de su producción.

Streptococcus mutans desempeña un papel central en el desarrollo de caries. La bacteria convierte azúcares capaces de fermentarse en ácidos orgánicos y de esta manera genera un microambiente ácido. Los ácidos orgánicos son capaces de desmineralizar el esmalte dental y de esta manera provocan o promueven las lesiones por caries. Además, S. mutans genera una matriz de glucano hidrofóbico. Esta matriz apoya el desarrollo y la adhesión de placa y la adhesión de S. mutans a la superficie de los dientes. Además, se ha mostrado que otras bacterias también se encuentran frecuentemente en lesiones por caries, pero siempre conjuntamente con S. mutans. Por consiguiente, S. mutans es considerada en la actualidad como necesaria para el desarrollo de lesiones de caries.

Existe una demanda constante de productos con los cuales pueda impedirse el desarrollo de lesiones de caries. En este contexto, la invención pretende indicar productos con los cuales pueda actuarse sobre S. mutans a fin de impedir, de detener o de retrasar la formación de lesiones de caries. La invención también pretende indicar procedimientos de producción para los correspondientes productos.

Para combatir lesiones de caries, principalmente para evitar o retrasar al menos su aparición, en el pasado se han ensayado una serie de productos. El experto en la materia conoce principalmente productos químicos para combatir la caries y microorganismos asociados con caries tal como han sido usados en pastas dentífricas y/o enjuagues bucales y/u otros productos para el cuidado dental. Adicionalmente, sin embargo, también se ha intentado controlar microorganismos asociados con caries por medio de otros microorganismos o sus productos, principalmente se ha intentado disminuir sus cantidades sobre los dientes o en la cavidad oral, o influir de otra manera en la génesis de caries. Un enfoque de este tipo se describe, por ejemplo, en la WO 2006/027265 A1. Sin embargo, la desventaja es que el uso de microorganismos vivos en productos de cuidado dental con frecuencia es rechazado por los consumidores o completamente prohibido por los legisladores. Además, los microorganismos vivos pueden influir en el sabor y/o la apariencia de un producto que los contiene debido a los productos de su metabolismo; esta influencia puede no desearse para cada producto para controlar lesiones de caries. Además, el uso de organismos vivos en productos diseñados para controlar lesiones de caries limita el tiempo de vigencia de almacenamiento de dichos productos.

Por lo tanto, de manera muy general, en los campos técnicos más variados, se ha intentado usar microorganismos metabólicamente inactivos, principalmente microorganismos liofilizados, en lugar de microorganismos vivos. Sin embargo en este caso es problemático que microorganismos de este tipo pueden volverse de nuevo metabólicamente activos en condiciones adecuadas para ellos, por ejemplo si se meten en un medio acuoso favorable. Por consiguiente, el uso de microorganismos metabólicamente inactivos implica limitaciones serias de la posible composición de un producto que los contiene.

Por eso se ha intentado en otros campos técnicos producir productos con microorganismos muertos en lugar de microorganismos vivos o metabólicamente activos. De esta manera, por ejemplo, la WO 01/95741 A1 enseña un alimento para promover el balance intestinal y el producto alimenticio contiene lactobacilos no viables. Los lactobacilos pueden hacerse inviables por medio de tratamiento térmico, por ejemplo mediante pasteurización o esterilización. Sin embargo, en este documento se indica el riesgo de perder algunos efectos de los microorganismos que siendo benéficos para la salud, pueden lograrse de otra manera. Mientras que el documento explica que estos efectos promotores de salud pueden eliminarse "selectivamente", en realidad el documento no enseña nada acerca de cómo evitar la pérdida de una característica promotora de salud deseada durante el tratamiento térmico de los microorganismos. Considerando este documento, la persona versada en la materia no puede entonces predecir ni hacer conjeturas de una manera sensata sobre cuáles efectos promotores de salud se pierden por un tratamiento térmico de microorganismos y cuáles no. Principalmente no es previsible ni estimable si un efecto contra la caries se pierde como resultado del tratamiento térmico.

Por lo tanto, el objeto de la presente invención es indicar medios para combatir lesiones de caries, principalmente medios para evitar o retrasar la formación de lesiones de caries. Principalmente, los medios deben ser adecuados para provocar el efecto deseado. Deben ser reproducibles de manera sencilla y económica y las desventajas descritas anteriormente deben evitarse en lo posible por reducirse a su mínima medida.

De acuerdo con la invención, por lo tanto, se indica un método para producir una preparación de lactobacilo no vivo, con habilidad de enlazamiento específica con Streptococcus mutans, que comprende los siguientes pasos:

i) calentar una suspensión de células de un lactobacilo o de una mezcla de lactobacilos con capacidad de enlazamiento específica con Streptococcus mutans, en cuyo caso el enlazamiento específico

- a) es resistente al tratamiento térmico y/o
- b) es resistente a tratamiento con proteasa y/o
- c) es dependiente de calcio y/o
- d) tiene lugar en un intervalo de pH entre 4,5 y 8,5, y/o

5 e) tiene lugar en presencia de saliva,

desde una temperatura de partida por debajo de 40 °C hasta una temperatura de pasteurización de 75 a 85 °C con un cambio de temperatura desde 0,5 hasta 2°C/min.,

ii) mantener la suspensión caliente a temperatura de pasteurización por un período desde 20 hasta 40 minutos,

10 iii) enfriar la suspensión mantenida en el paso ii) a una temperatura final por debajo de 40 °C con una modificación de temperatura desde 0,5 hasta 2°C/min.

Tales lactobacilos se divulgan en WO 2006/027265 A1, cuyo contenido se incorpora completamente por referencia a la presente para propósitos de divulgación de la presente invención.

15 De manera sorprendente se ha enseñado que con los lactobacilos seleccionados según la invención, mediante una pasteurización en condiciones suaves, de conformidad con los pasos del método de la invención, se logra producir una preparación que está completamente o esencialmente libre de microorganismos de lactobacilo metabólicamente activos que aún tienen capacidad de enlazamiento específica para *Streptococcus mutans*. Una preparación producida de acuerdo con la invención es, por lo tanto, adecuada para ejercer un efecto anti caries y, por consiguiente, es útil como producto para impedir y/o tratar caries. Los términos "caries" y "lesión de caries" se emplean en el contexto de este documento de manera intercambiable y designan una enfermedad infecciosa crónica que se caracteriza por la formación de sitios ablandados sobre o en un diente y que conduce progresivamente a la muerte del diente. La caries puede diagnosticarse mediante métodos conocidos; para este propósito, una persona versada en la materia puede acudir, por ejemplo, a la divulgación de Angmar-Mansson y ten Bosch, Adv. Dent. Res. 7 (1993), 70 hasta 79.

25 Para los propósitos de la presente invención, la expresión "combatir caries" o "combatir lesiones de caries" incluye la profilaxis de caries. Por lo tanto, las personas cuyas cavidades orales estarían libres de *S. mutans*, también pueden beneficiarse de las composiciones que se preparan de acuerdo con la invención en la medida que estas composiciones enlazan las células de *S. mutans* producidas de manera aleatoria y de esta manera facilitan la remoción de estas últimas.

30 En el contexto de esta invención, la expresión "tratamiento de caries" también significa la administración de preparaciones producidas según la invención a una persona enferma de caries con el propósito de reducir la cantidad de células de *S. mutans* y opcionalmente para eliminar completamente *S. mutans* de la boca, principalmente de toda la cavidad de la boca, incluidos los dientes y los espacios interdientales.

35 Con respecto a la habilidad de enlazar *S. mutans*, los microorganismos seleccionados de acuerdo con la invención son muy estables al calor. Esto permite mantener el efecto promotor de salud del enlazamiento a *S. mutans*, que ha sido descrito en la WO 2006/027265 para células vivas de lactobacilo, incluso después de la pasteurización según la invención y no perderla, por ejemplo. Esto es particularmente extraordinario ya que básicamente se esperaría que al pasteurizar los microorganismos, se desnaturalizara una parte considerable de sus proteínas, por ejemplo, y se disolvieran otros componentes celulares o se dañaran, de modo que se perdieran los efectos promotores de salud de los microorganismos después de pasteurizar. En realidad, la ya mencionada WO 01/95741 A1 sólo enseña que es posible que algunos lactobacilos mantengan un efecto promotor de salud en la flora intestinal a pesar de la pasteurización. Sin embargo, en términos de estructura, contenido y uso, la cavidad oral es completamente diferente al intestino, de modo que una persona versada en la materia no habría aplicado los hallazgos del documento mencionado de último a la presente invención.

45 De acuerdo con otro aspecto de la invención, por consiguiente se indica una composición de lactobacilo con capacidad específica de enlazar a *Streptococcus mutans*, y esta preparación puede obtenerse o se obtiene mediante un proceso de producción de acuerdo con la invención. Una preparación de este tipo realiza las ventajas descritas previamente del procedimiento de producción según la invención, principalmente es adecuado para preparar un producto contra la generación de caries para aplicar en el cuerpo humano.

50 Las células de lactobacilo se seleccionan preferiblemente de entre células de cepas de *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus* o una mezcla de las mismas. El método de producción según la invención pueden

entonces llevarse a cabo con una suspensión de un cultivo puro de una cepa lactobacilo, principalmente de una cepa de *Lactobacillus paracasei* o *Lactobacillus rhamnosus*, pero también con una mezcla de dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o más cepas. Para el proceso según la invención particularmente se prefieren las especies y cepas de lactobacilos mencionadas en la WO 2006/027265 A1, principalmente aquellas con uno de los números DSMZ: 5 DSMZ 16667, DSMZ 16668, DSMZ 16669, DSMZ 16670, DSMZ 16671, DSMZ 16672 y DSMZ 16673, respectivamente depositadas en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares [Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen], Mascheroder Weg 1b, Brunswick, Alemania, el 26 de agosto de 2004. En la medida que en el contexto de esta invención se hable de células de lactobacilo, con esto también se quiere decir al menos preferiblemente células de las cepas acabadas de mencionar y mezclas de dos, tres, cuatro, 10 cinco, seis o siete de las cepas mencionadas. El experto en la materia comprende que en lugar de o adicionalmente a las células de una de las cepas mencionadas, también puede emplearse un mutante o una línea celular derivada en el proceso de la invención, en cuyo caso el mutante o las líneas celulares derivadas han guardado la habilidad de enlazarse específicamente con *S. mutans*.

Las células de lactobacilo poseen preferiblemente una capacidad específica de enlazarse con *Streptococcus mutans* serotipo c (DSMZ 20523) y/o serotipo e (NCTC 10923) y/o serotipo F (NCTC 11060). 15

Un mutante, principalmente un mutante de una de las cepas de lactobacilo mencionadas previamente, posee una o varias modificaciones capaces de heredarse permanentemente, usualmente su(s) ácido(s) nucleico(s). Tales modificaciones habitualmente también abarcan mutaciones puntuales tales como transiciones o transversiones, pero también supresiones, inserciones y adiciones de una o de varias bases de un ácido nucleico, por lo cual se modifica 20 el ácido nucleico y se produce una expresión génica y/o transcripción y/o traslación o inactivación de productos génicos, las cuales se desvían de lo normal. Las mutaciones pueden ocurrir espontáneamente o pueden provocarse mediante accionamiento de agentes tales como, por ejemplo, productos químicos o radiación. Métodos para seleccionar y obtener mutantes y líneas celulares derivadas se describen, por ejemplo, en Sambrook, "Molecular cloning, a laboratory manual", Cold Spring Harbour Laboratory, NY, (2001) así como en Ausubel, "Current protocols in molecular biology", Green Publishing Associates and Wiley Interscience NY, (1989). El especialista en el tema 25 puede inferir más indicaciones de la WO 2006/027265 A1.

En el sentido de esta invención, "enlazamiento específico" o "capacidad de enlazamiento específica" con *Streptococcus mutans*, significa que las células de lactobacilo usadas según la invención o las células pasteurizadas de acuerdo con la invención se enlazan a *S. mutans*, pero no se enlazan a la mayoría de, o a todos, los demás 30 organismos que existen en la cavidad oral habitualmente en cantidades significativas. Los microorganismos seleccionados de acuerdo con la invención no se enlazan preferentemente a células de *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus salivarius thermophilus*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis* y/o *Streptococcus sanguinis*. De modo particularmente preferido, las células de lactobacilo usadas de acuerdo con la invención no se enlazan con *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* API 50 CH (Biomerieux, Francia), *Streptococcus oralis* DSMZ 20066, 35 *Streptococcus oralis* DSMZ 20395, *Streptococcus oralis* DSMZ 20627, *Streptococcus mitis* DSMZ 12643 y/o *Streptococcus sanguinis* DSMZ 20567. Asimismo, se prefiere si las células de lactobacilo usadas según la invención no se enlazan a bacterias de otros géneros tales como *Streptococcus*, es decir que no se enlazan, por ejemplo, a células del género *Staphylococcus*. De modo particularmente preferido no se enlazan a *Staphylococcus epidermidis* DSMZ 1798 y/o *Staphylococcus epidermidis* DSMZ 20044. Para ensayar la capacidad de enlazamiento, el 40 especialista procede tal como se describe en la WO 2006/027265 A1, mezclando las bacterias mencionadas con los lactobacilos seleccionados de acuerdo con la invención o con los residuos pasteurizados de acuerdo con la invención en una proporción volumétrica de 3:1 y observando una agregación eventual causada por lactobacilo. Un método correspondiente está descrito en el documento WO mencionado, en el ejemplo 3.

Por consiguiente, se prefiere un método de acuerdo con la invención en el que las células de una o más cepas 45 preferidas de lactobacilo, principalmente *L. paracasei* o *L. rhamnosus* y preferentemente de una o varias de las cepas DSMZ 16667, DSMZ 16668, DSMZ 16669, DSMZ 16670, DSMZ 16671, DSMZ 16672 und DSMZ 16673 y particularmente preferible de al menos DSM 16671, y/o de uno de los mutantes o línea celular derivada como las descritas anteriormente, se calientan en una suspensión, como un primer paso, desde una temperatura de partida por debajo de los 40 °C a una temperatura de pasteurización de 75 a 85 °C con un cambio de temperatura de 0,5 a 50 2°C, en un segundo paso se mantienen de 20 a 40 minutos a la temperatura de pasteurización (tiempo de pasteurización) y la suspensión, en un siguiente tercer paso, se enfría a una temperatura final por debajo de 40 °C con un cambio de temperatura de 0,5 a 2°C.

La temperatura de pasteurización en el paso i) es preferentemente de 78 a 80°C, particularmente preferible de 80°C. A estas temperaturas de pasteurización se logra una destrucción rápida y, por consiguiente, económica en energía, 55 y aun así segura de las células de lactobacilo seleccionadas de acuerdo con la invención simultáneamente con una pérdida muy pequeña de la capacidad de enlazamiento en comparación con un cultivo no pasteurizado de células vivas de lactobacilo.

El tiempo de pasteurización es preferentemente de 25 a 35 minutos y especialmente preferible de 30 minutos. Se ha comprobado que principalmente a una temperatura de pasteurización de 78 a 80 °C (preferiblemente 80 °C), es

posible una destrucción rápida de las células de lactobacilo seleccionadas de acuerdo con la invención con una pérdida mínima de la capacidad de enlazamiento de *S. mutans* en comparación con un cultivo vivo de las células de lactobacilo.

Asimismo se prefiere cuando el cambio de temperatura en el paso i) o iii) es de 0,8 a 1,2°C por minuto, preferiblemente 1 °C por minuto. De esta manera, el tiempo de calentamiento hasta lograr la temperatura de pasteurización puede mantenerse ventajosamente corto de modo que pueda ahorrarse energía, sin por esto arriesgar la destrucción de las células de lactobacilo o tener que aceptar una gran pérdida de capacidad de enlazamiento con *S. mutans*.

Principalmente se prefiere entonces un método según la invención en el que las células de una o de varias cepas preferidas de lacto bacilo: *L. paracasei* o *L. rhamnosus*, preferentemente de una o de varias de las cepas DSMZ 16667, DSMZ 16668, DSMZ 16669, DSMZ 16670, DSMZ 16671, DSMZ 16672 y DSMZ 16673 y particularmente preferible de al menos DSM 16671, y/o de uno de los mutantes o líneas celulares derivadas, tal como se describieron con anterioridad, se calientan en una suspensión, en un primer paso, desde una temperatura de partida por debajo de los 40 °C a una temperatura de pasteurización de 78 a 80°C, preferiblemente 80°C, con un cambio de temperatura de 0,8 a 1,2°C, preferentemente de 1°C, en un segundo paso se mantienen a la temperatura de pasteurización (tiempo de pasteurización) de 25 a 35 minutos y preferiblemente 30 minutos, y durante el cual la suspensión en un tercer paso siguiente se enfría a una temperatura final por debajo de los 40 °C con un cambio de temperatura de 0,8 a 1,2°C, preferentemente de 1°C.

Las células pasteurizadas un la invención se encuentran preferentemente en una fase de crecimiento post-exponencial. En el paso i) del método de producción de la invención particularmente se prefiere usar células de un medio de cultivo que primero ha permitido un crecimiento exponencial, aunque en el cual la concentración de glucosa ha caído a un valor de máximo 1 mM de glucosa. En tal caso se prefiere usar tales células, cuya concentración de glucosa ha caído desde hace no más de una hora a un valor de máximo 1 mM de glucosa, ya que de otra manera comienza a perderse la capacidad de enlazar específicamente con *Streptococcus mutans* que tiene el producto del procedimiento de producción según la invención, es decir el resultado del paso iii), opcionalmente del paso de lavado o del secado por pulverización tal como se describe más adelante.

El método de acuerdo con la invención comprende preferiblemente además un paso de lavado en el cual la suspensión obtenida en el paso (iii) se centrifuga para concentrar las células pasteurizadas; las células concentradas obtenidas de esta manera se mezclan con agua y nuevamente se centrifugan para concentrar las células nuevamente. Las células concentradas obtenidas están presentes como una sustancia con un contenido de materia seca de 10 a 30% en peso de sustancia, preferiblemente de 18 a 22% en peso.

De acuerdo con la invención particularmente se prefiere un método tal que además de los pasos i) a iii) (principalmente aplicado a una cepa o a una mezcla de dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete de las cepas de lactobacilo DSM 16667, DSM 16668, DSM 16669, DSM 16670, DSM 16671, DSM 16672 y DSM 16673 o de uno de los mutantes o líneas celulares derivadas, tal como se describieron anteriormente, o de una cepa de *L. paracasei* o *L. rhamnosus*) y opcionalmente lavado, comprende los siguientes pasos:

iv) mezclar la suspensión obtenida en el paso iii), y preferiblemente lavada, con un soporte para producir una mezcla de secado por pulverización (lío-filización), en cuyo caso el soporte se selecciona de sulfatos de metal alcalino y alcalinotérreo, preferentemente sulfato de sodio, de potasio o de calcio, y mezclas de dos o más de estos sulfatos, y en cuyo caso la cantidad de soporte se selecciona de tal manera que el contenido seco de la mezcla de secado por pulverización sea de 10 a 30% en peso, y

v) secar por pulverización la mezcla de secado por pulverización obtenida en el paso iv).

El secado por pulverización expone al material a secarse a condiciones muy duras y principalmente a temperaturas de, por ejemplo, 70°C a 200°C. De las células de lactobacilo seleccionadas según la invención no se conocía si resistirían las condiciones duras que ocurren durante el secado por pulverización (lío-filización) sin una pérdida significativa de capacidad de enlazamiento específica con *S. mutans*. Hay que agregar que en el caso de cantidades altas de soporte según la invención en el paso iv) se habría esperado que las estructuras superficiales de lactobacilo, las cuales son responsables del enlazamiento con *S. mutans*, se desnaturalizaran o se dañarían de alguna otra manera. Sorprendentemente se ha comprobado que en las condiciones seleccionadas es posible el secado por pulverización de la suspensión obtenida en el paso iii) sin pérdida esencial de la capacidad de enlazamiento con *S. mutans*.

Algunas ventajas del método de secado por pulverización (lío-filización) según la invención y de la preparación secada por pulverización, producida según la invención, ameritan una atención particular: en contraste con la simple pasteurización, el secado por pulverización según la invención permite obtener una preparación no pegajosa o higroscópica. Higroscópico significa en este contexto que durante un almacenamiento abierto por un lapso de tiempo

de 12 meses a una temperatura de 20 °C y una humedad relativa del aire de 50%, el peso de la preparación no se incrementa en más de 2%. Por eso, la preparación producida de acuerdo con la invención de esta manera es particularmente adecuada para seguir procesándose en productos secos; ésta no afectará desventajosamente las propiedades de estos productos como resultado de extracción de agua o por una pegajosidad particular.

Además, el proceso de producción de acuerdo con la invención hace posible producir una preparación según la invención que fluya libremente. Las preparaciones en forma de partículas que fluyen libremente son particularmente sencillas de almacenar y de procesar y pueden incorporarse a una muy amplia gama de productos mientras que son capaces de dosificarse de modo muy preciso. Las preparaciones de acuerdo con la invención, obtenidas mediante el método de secado por pulverización según la invención, pueden incorporarse de esta manera a un espectro de productos mucho más amplio a una escala económicamente importante que la suspensión obtenida directamente después del paso iii).

Como soporte en el paso iv) particularmente se prefiere el sulfato de sodio. La cantidad de soporte, particularmente preferible de sulfato de sodio, es preferiblemente de cuatro veces la masa seca de la suspensión empleada del paso iii). La mezcla de secado por pulverización empleada para secar por pulverización en el paso v) tiene entonces un contenido de aproximadamente 20% en peso del total de la materia seca.

En el paso v) se efectúa el secado por pulverización (lío-filización) preferiblemente a una temperatura de entrada de gas de un gas empleado para secado por pulverización de 180 a 250°C y una temperatura de salida de gases de la zona provista para secado, usualmente una torre de secado, de 70 a 100°C, preferentemente 85°C, en cuyo caso el tiempo promedio de residencia del material que va a secarse en la zona de actuación del gas de secado por pulverización es de 10 a 60 segundos, preferiblemente 20 a 40 segundos. El especialista en la materia puede orientarse en lo sucesivo acerca del secado por pulverización (lío-filización) por las indicaciones de la WO 01/25411 A1. Este documento describe en general métodos de lío-filización adecuados en general para la preparación de productos enzimáticos liofilizados. Sorprendentemente se ha comprobado ahora que el secado por pulverización sin pérdida sustancial de la capacidad de enlazamiento con *S. mutans* es posible incluso a las temperaturas superiores que se prefieren de acuerdo con la invención. Esto no era de esperarse con base en la WO 01/25411 A1, principalmente porque allí no se describe ni un único ejemplo de un secado por pulverización que funcione después de la pasteurización y desde el punto de vista de un especialista en la materia, el documento es especulativo respecto de la idoneidad del secado por pulverización para una clase supuestamente muy amplia de enzimas.

Por lo tanto, un método de acuerdo con la invención que se prefiere especialmente es uno en el cual:

(i) las células de una o de varias cepas preferidas de lactobacilo, en particular *L. paracasei* o *L. rhamnosus*, preferiblemente de una o varias de las cepas DSMZ 16667, DSMZ 16668, DSMZ 16669, DSMZ 16670, DSMZ 16671, DSMZ 16672 y DSMZ 16673 y particularmente preferible al menos DSM 16671, y/o un mutante o línea celular derivada en una fase de crecimiento post-exponencial como se describió anteriormente, se calientan en un primer paso en una suspensión desde una temperatura de partida por debajo de los 40 °C a una temperatura de pasteurización de 78 a 80°C, preferentemente 80°C, con un cambio de temperatura de 0,8 a 1,2°C, preferentemente de 1°C, y a continuación

(ii) la suspensión se mantiene durante 25 a 35 min y preferiblemente 30 min a la temperatura de pasteurización, y a continuación

(iii) la suspensión se enfría a una temperatura final por debajo de 40 °C con un cambio de temperatura de 0,8 a 1,2°C, preferentemente de 1°C, a continuación se lava con agua tal como se describió anteriormente y mediante centrifugación se ajusta a un contenido de material seco de 10 a 30% en peso, preferentemente 18 a 22% en peso, y a continuación

(iv) la suspensión se mezcla con un soporte para producir una mezcla de secado por pulverización (lío-filización), en cuyo caso el soporte se selecciona de sulfato de sodio, sulfato de potasio y sulfato de calcio y mezclas de dos o más de estos y particularmente se prefiere sulfato de sodio, y en cuyo caso la cantidad de soporte se selecciona de tal manera que el contenido de material seco de la mezcla de secado por pulverización sea de 10 a 30% en peso, y a continuación

(v) se seca por pulverización la suspensión provista con soporte, obtenida en el paso (iv) a una temperatura de entrada de gas, de un gas de lío-filización empleado para el secado, de 180 a 250°C y una temperatura de entrada de gas desde la zona provista para secado, usualmente una torre de pulverización, de 70 a 100°C, preferentemente 85°C, en cuyo caso el tiempo de residencia promedio del producto a secar en la zona de actuación del gas de secado por pulverización es de 10 a 60 segundos, preferiblemente 20 a 40 segundos.

Este método realiza las ventajas de la invención descritas anteriormente.

La preparación de lactobacilo con capacidad específica de enlazamiento con *Streptococcus mutans*, la cual puede obtenerse o se obtiene mediante un método con los pasos i) a iii) y opcionalmente iv) a v), preferiblemente se incorpora a un producto para aplicarse en el cuerpo humano. Al aplicarse al cuerpo humano, principalmente mediante incorporación a la cavidad bucal y/o poniéndose en contacto con los dientes, puede efectuarse efectivamente una profilaxis de la caries con las preparaciones de la invención.

De manera conveniente, los productos contienen la preparación en una cantidad suficiente para enlazarse con *S. mutans* y/o para lograr un efecto contra la caries. Esta cantidad depende del tipo del producto respectivo así como de presentación farmacéutica. La cantidad también depende principalmente de la medida deseada respectivamente del posible enlazamiento con *S. mutans* o del efecto posible contra la caries. Mediante investigación rutinaria, según el producto, el especialista en la materia puede determinar fácilmente aquella cantidad de preparación según la invención que es suficiente respecto de la medida deseada del efecto, la naturaleza del producto y la presentación farmacéutica. El especialista en la materia tomará en cuenta principalmente que un producto con la preparación de la invención puede estar recubierto o puede contener esta preparación incorporada mediante mezclado.

El producto puede seleccionarse del grupo compuesto por productos alimenticios, productos estimulantes, bebidas, productos semi-preparados, para la higiene oral, productos cosméticos y farmacéuticos. Los productos correspondientes se describen en la WO 2006/027265 A1.

Otros productos son goma de mascar, pasta dental, enjuagues bucales y caramelos.

A continuación, la invención se describe con mayor detalle por medio de ejemplos sin que los ejemplos deban limitar el campo de protección de las reivindicaciones.

Ejemplo 1: Método de producción general

Células de lactobacilo con capacidad específica de enlazamiento con *Streptococcus mutans*, en cuyo caso el enlazamiento específico

a) es resistente a tratamiento térmico y/o

b) es resistente a tratamiento con proteasa y/o

c) es dependiente de calcio y/o

d) tiene lugar en un intervalo de pH entre 4,5 y 8,5, y/o

e) se efectúa en presencia de saliva,

se cultivan en un medio nutriente acuoso adecuado a 37 °C. Un medio nutriente adecuado contiene glucosa, extracto de levadura, Tween 80 y sales. El cultivo se efectúa en operación de lotes alimentados como una suspensión acuosa.

Tan pronto como el contenido de glucosa del medio nutriente ha caído por debajo de 1 mM, o hasta una hora después de este punto en el tiempo, se calienta la suspensión hasta una temperatura de pasteurización desde 75 a 85 °C, preferiblemente de 78 a 80 °C. En este contexto, se calienta la suspensión con un cambio de temperatura desde 0,5 hasta 1,2°C/min, preferentemente desde 0,8 hasta 1,2°C/min.

La suspensión calentada se mantiene a la temperatura de pasteurización durante 20 a 40 minutos, preferiblemente 25 a 35 minutos y particularmente preferible durante 30 minutos.

A continuación se enfría la suspensión por debajo de 40 °C. En este contexto, el cambio de temperatura es de 0,5 a 2°C/min, preferentemente 0,8 a 1,2°C/min.

La suspensión enfriada se concentra a continuación por medio de centrifugación hasta un contenido de materia seca de 10 a 30% en peso. El concentrado obtenido de esta manera se suspende de nuevo en agua y se concentra de nuevo mediante centrifugación hasta un contenido de materia seca de 10 a 30% en peso. La re-suspensión y la concentración se llevan a cabo hasta 8 veces en total. Al final se obtiene una composición lavada con un contenido de materia seca de 10 a 30% en peso.

Esta composición contiene todavía la capacidad de enlazarse específicamente con *Streptococcus mutans*, tal como se ha descrito al principio en el ejemplo. La composición puede incorporarse como tal a productos alimenticios, productos estimulantes, bebidas, productos semi-preparados, productos para la higiene oral, productos cosméticos o

farmacéuticos, a fin de equipar el producto para combatir la caries o a fin de apoyar su capacidad preexistente para combatir la caries.

Ejemplo 2: Producción de una composición para el cuidado oral (no reivindicado)

Un cultivo de *L. paracasei* o de *L. rhamnosus* con la capacidad de enlazamiento específica con *Streptococcus mutans* se cultiva, se pasteuriza y se lava tal como se describió en el ejemplo 1. La temperatura de pasteurización es de 80 °C, el tiempo de pasteurización de 30 minutos. La modificación de la temperatura es respectivamente de 0,8 a 1,2°C/min. La suspensión concentrada, obtenida después de la primera centrifugación se suspende de nuevo adicionando agua hasta un contenido de materia seca de 5% en peso de la resuspensión. La resuspensión obtenida de esta manera se centrifuga de nuevo hasta un contenido de materia seca de 20% en peso.

La composición lavada y concentrada, obtenida de esta manera, se mezcla con un soporte acuoso y con saborizantes. De esta manera se obtiene un enjuague bucal para combatir la caries.

De la misma manera se producen composiciones concentradas y lavadas a partir de DSMZ 16667, DSMZ 16668, DSMZ 16669, DSMZ 16670, DSMZ 16671, DSMZ 16672 o DSMZ 16673. Estas composiciones también son mezcladas respectivamente con un soporte acuoso y con saborizantes a fin de obtener respectivamente un enjuague bucal para combatir la caries.

En lugar de un enjuague bucal se producen gomas de mascar, pastas dentales y caramelos para combatir la caries incorporando las composiciones respectivas, lavadas y concentradas, en la composición base de la goma de mascar, la composición base de pasta dental y la composición base de caramelos, así como adicionando los saborizantes deseados.

Ejemplo 3: Proceso general de secado por pulverización

Se producen una solución base de secado por pulverización preparando una solución acuosa de sulfato de metal alcalino y/o alcalinotérreo al 10 hasta 30%. La composición lavada y concentrada, obtenida de acuerdo con el ejemplo 1, cierre suspende en una cantidad que es de cuatro veces la solución base para el secado por pulverización para formar una mezcla de secado por pulverización, de tal modo que a partir de 100 unidades de volumen de la composición se obtienen 500 unidades de volumen de la mezcla para secado por pulverización (liofilización).

La mezcla para secado por pulverización se liofiliza introduciéndose a una torre de pulverización. La torre de pulverización se carga con un gas para liofilización, en cuyo caso el gas para liofilización tiene una temperatura de entrada a la torre de liofilización de 180 a 250°C y una temperatura de salida de la torre de liofilización de 70 a 100°C. La mezcla para secado por pulverización tiene un tiempo de residencia medio de máximo 60 segundos en la torre de pulverización.

El material liofilizado obtenido mantiene aún la capacidad para enlazarse de modo específico con *Streptococcus mutans*, tal como se describió al principio en el ejemplo 1. El material liofilizado obtenido puede incorporarse como tal al producto alimenticio, producto estimulante, bebidas, productos semi-terminados, productos de higiene bucal, productos cosméticos o farmacéuticos, con el fin de equipar el producto respectivo para combatir la caries o con el fin de apoyar su capacidad preexistente para combatir la caries.

Ejemplo 4: Producción de otra preparación para el cuidado oral (no reivindicada)

Un cultivo de *L. paracasei* o *L. rhamnosus* con la capacidad de enlazamiento específica con *Streptococcus mutans*, definida de acuerdo con la invención, se cultiva, se pasteuriza y se lava tal como se describió en el ejemplo 1. La temperatura de pasteurización es de 80 °C, el tiempo de pasteurización es de 30 minutos. El cambio de temperatura es respectivamente de 0,8 a 1,2°C/min. La suspensión concentrada, obtenida después de la primera centrifugación, se resuspende adicionando agua hasta un contenido de material seco de 5% en peso de la resuspensión. La resuspensión obtenida de esta manera se centrifuga de nuevo hasta un contenido de materia seca de 20% en peso.

A continuación, la re suspensión se liofiliza en un proceso de liofilización según el ejemplo 3. La solución base para liofilización es una solución acuosa de sulfato de sodio al 20%. La temperatura de entrada del gas de liofilización a la torre de pulverización es de 70-100°C. El tiempo de residencia promedio de la mezcla de liofilización en la torre de pulverización es de 10 segundos.

Se obtiene una materia liofilizada. La materia liofilizada se mezcla con un soporte acuoso y saborizantes. Se obtiene de esta manera un enjuague bucal para combatir la caries.

De la misma manera se produce una materia liofilizada a partir de DSMZ 16667, DSMZ 16668, DSMZ 16669, DSMZ 16670, DSMZ 16671, DSMZ 16672 o DSMZ 16673.

Esta materia también se mezcla respectivamente con un soporte acuoso y con saborizantes a fin de obtener respectivamente un enjuague bucal para combatir la caries.

- 5 En lugar de un enjuague bucal se producen gomas de mascar, pastas dentales y caramelos para combatir la caries incorporando la materia respectiva a la composición base de goma de mascar, la composición base de pasta dental y la composición base de caramelos, y adicionando saborizantes deseados.

REIVINDICACIONES

1. Método para producir una preparación de lactobacilo no vivo con capacidad de enlazamiento específica con *Streptococcus mutans*, el cual comprende los pasos de:
 - i) calentar una suspensión de células de un lactobacilo o una mezcla de lactobacilos, con capacidad de enlazamiento específica con *Streptococcus mutans*, en cuyo caso el enlazamiento específico
 - a) es resistente frente al tratamiento térmico y/o
 - b) es resistente frente al tratamiento con proteasa y/o
 - c) es dependiente de calcio y/o
 - d) tiene lugar en un intervalo de pH entre 4,5 y 8,5, y/o
 - ii) mantener la suspensión calentada a la temperatura de pasteurización durante un lapso de tiempo de 20 a 40 minutos,
 - iii) enfriar la suspensión obtenida en el paso ii) a una temperatura final debajo de 40 °C con un cambio de temperatura de 0,5 a 2°C/min.
2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque las células de lactobacilo se seleccionan de células de *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, o de una mezcla de las mismas.
3. Método de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado porque las células de lactobacilo se seleccionan de células de *Lactobacillus paracasei* o *Lactobacillus rhamnosus*, preferentemente con un número de DSMZ (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares): DSMZ 16667, DSMZ 16668, DSMZ 16669, DSMZ 16670, DSMZ 16671, DSMZ 16672 y DSMZ 16673, o un mutante o una línea celular derivada, en cuyo caso el mutante o línea celular derivada aguarde la capacidad de enlazarse de modo específico con *Streptococcus mutans*.
4. Método según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el lactobacilo tiene una capacidad de enlazamiento específica con *Streptococcus mutans* serotipo c (DSMZ 20523) y/o serotipo e (NCTC 10923) y/o serotipo f (NCTC 11060).
5. Método según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque en el paso i) la temperatura de pasteurización es de 78 a 80°C.
6. Método según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el cambio de temperatura en el paso i) y/o iii) es de 0,8 a 1,2°C/min.
7. Método según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque en el paso i) el medio de la suspensión contienen máximo 10 mmol de glucosa/l.
8. Método según una de las reivindicaciones precedentes, que comprende además los pasos de:
 - iv) mezclar la suspensión obtenida en el paso iii) con un soporte para producir una mezcla de secado por pulverización (liofilización), en cuyo caso el soporte se selecciona de sulfatos de metal alcalino y metal alcalinotérreo, y en cuyo caso la cantidad se selecciona de tal modo que el contenido de sustancias seca en la suspensión de secado por pulverización (liofilización) es de 10 a 30% en peso,
 - v) secado por pulverización (liofilización) de la mezcla de liofilización obtenida en el paso iv).
9. Método de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado porque el secado por pulverización (liofilización) se efectúa a una temperatura de entrada del gas de liofilización, empleado para secado, de 180 a 250°C y a una temperatura de salida del gas de la zona prevista para secado, usualmente una torre de pulverización, de 70 a 100°C, preferentemente 85°C, en cuyo caso el tiempo de residencia promedio del material a secar en una zona de actuación del gas de liofilización es de 10 a 60 segundos, preferentemente 20 a 40 segundos.