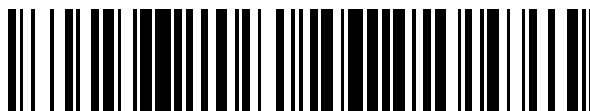


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 574 135**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

A61K 35/74 (2015.01)

A61K 8/99 (2006.01)

A61Q 11/00 (2006.01)

C12R 1/23 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.05.2009 E 09761379 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016 EP 2300598**

54 Título: **Uso y métodos para prevenir y/o tratar el mal olor bucal**

30 Prioridad:

11.06.2008 EP 08010641

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

15.06.2016

73 Titular/es:

**BASF SE (100.0%)
Carl-Bosch-Strasse 38
67056 Ludwigshafen am Rhein, DE**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 574 135 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

Uso y métodos para prevenir y/o tratar el mal olor bucal

5 La presente invención se refiere principalmente a una forma inactiva de un microorganismo perteneciente al género *Lactobacillus* que puede reducir drásticamente la concentración de péptidos en la saliva agotando así el sustrato usado por microorganismos anaerobios de la microflora bucal que son el agente causante del mal olor bucal. Además, dicha forma inactiva de dicho microorganismo puede estimular el crecimiento de *Streptococcus salivarius* pero no estimula el crecimiento de *Streptococcus mutans* y/o *Porphyromonas gingivalis*.

La presente invención también se refiere a composiciones que contienen las formas inactivas mencionadas anteriormente de dichos microorganismos, a su uso para reducir el mal olor bucal y/o la halitosis.

10 Un problema común con la higiene bucal es el mal aliento crónico (halitosis). El método prevalente para tratar la halitosis es enmascarar o neutralizar el olor desagradable mediante el uso de enjuagues bucales o gomas para mascar que contienen por ejemplo mentol. Sin embargo, estos métodos sólo son eficaces a corto plazo, pero no a largo plazo. Por tanto, existe una necesidad de métodos a largo plazo para prevenir o tratar la halitosis. Este problema se ha abordado en el estado de la técnica mediante diferentes métodos todos los cuales tienen más o
15 menos como objetivo reducir el número de bacterias anaerobias que producen "compuestos de azufre volátiles" (VSC) tales como sulfuro de hidrógeno y metil-mercaptano, por ejemplo.

Un método descrito para reducir estas bacterias es eliminar el recubrimiento de la lengua con un raspador de lengua con el fin de eliminar de la lengua sustratos para la proliferación bacteriana. Otro método es tratar la lengua con una sal de metal tal como cloruro de zinc o un desinfectante tal como alcohol o clorhexidina. Sin embargo, la desventaja
20 de estos métodos es que la sal de metal y el desinfectante también inhiben el crecimiento de otros microorganismos bucales inofensivos o incluso beneficiosos.

Un enfoque para tratar o prevenir la halitosis que se ha descrito es mantener el pH de saliva a un nivel fisiológicamente normal. Se conoce que especies microbianas asociadas con caries e infecciones mucosas favorecen un pH ácido; especies microbianas asociadas con el desarrollo de enfermedad periodontal favorecen un
25 pH por encima del normal, mientras que especies microbianas asociadas con una buena salud bucal favorecen un pH neutro. En los documentos US200707137 y US2006018843 se dan a conocer composiciones que contienen bacterias probióticas (por ejemplo *Lactobacillus* y *Streptococcus*) que usan este mecanismo. El documento WO2007/077210 da a conocer un método para el restablecimiento de una microflora bucal asociada con una buena salud bucal que usa productos probióticos débiles o que no producen ácido elegidos de un grupo de bacterias bucales de colonización temprana que están normalmente presentes en una microflora bucal sana (por ejemplo
30 *Streptococcus (oralis)*, *Eubacterium*, *Neisseria*, *Veillonella*) en combinación con sustancias que tienen sustancias de aumento del pH o de tamponamiento del pH (por ejemplo bicarbonatos, carbamidas, fosfatos, proteínas y/o sales). El documento US2006045870 da a conocer bacterias hepáticas del ácido láctico pertenecientes al género *Weissella* que inhiben el crecimiento de bacterias productoras de VSC interaccionando con las mismas y generando peróxido de hidrógeno en condiciones aerobias y anaerobias. El documento US2006171901 da a conocer otro método de
35 inhibición del crecimiento de bacterias anaerobias, particularmente bacterias que provocan halitosis, que implica cepas de *Streptococcus salivarius* productoras de BLIS (sustancias inhibidoras de tipo bacteriocina) y extractos de las mismas.

Una desventaja de los métodos que están disponibles para la prevención y el tratamiento de la halitosis es que la mayoría de estos métodos no sólo inhiben el crecimiento de las bacterias productoras de VSC que se conocen como la principal causa del mal olor bucal, sino que también inhiben el crecimiento de otros microorganismos bucales inofensivos.

El objeto de la presente invención es por tanto proporcionar medios y métodos alternativos para la prevención y/o el tratamiento del mal olor bucal y/o la halitosis.

45 Por consiguiente, en un primer aspecto la presente invención se refiere a una forma inactiva de un microorganismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2.

En una realización preferida la concentración de péptidos en un ensayo (a) o (A) se reduce por el microorganismo según la invención en al menos el 30%, más preferiblemente en al menos el 40% e incluso más preferiblemente en al menos el 50%.

50 En una realización particularmente preferida el microorganismo puede reducir la concentración de péptidos en un ensayo (A) en al menos el 60%, incluso más preferiblemente en al menos el 70%.

Por tanto, el presente texto proporciona un microorganismo que puede reducir eficazmente la concentración de

- 5 péptidos en su entorno, en particular también en la saliva, tal como se describe en los ejemplos adjuntos. Tal como se conoce, el mal olor bucal está provocado por el hecho de que la razón entre la flora bucal sana (constituida principalmente por *Streptococcus salivarius*) y la flora bucal patógena (constituida principalmente por bacterias gram-negativas anaerobias) se desplaza hacia las bacterias gram-negativas anaerobias que descomponen las proteínas presentes en la saliva para dar compuestos volátiles. Esto conduce a la producción de compuestos de azufre volátiles que provocan el mal olor bucal.

El microorganismo descrito en el presente documento puede reducir el mal olor bucal al reducir la cantidad de péptidos y de ese modo agotar el sustrato de las bacterias gram-negativas anaerobias de la flora bucal.

- 10 El término "medio sintético" se refiere a un medio químicamente definido, es decir, un medio cuya composición química se conoce. El medio sintético usado en un ensayo (a) según la presente invención es un medio con la siguiente composición:

Guanina:	0,1 g/l
Citosina:	0,1 g/l
Timidina:	0,1 g/l
2'-Desoxiadenosina:	0,1 g/l
2'-Desoxiuridina:	0,1 g/l
K ₂ HPO ₄ :	2 g/l
Acetato de sodio:	5 g/l
MgSO ₄ heptahidratado:	0,1 g/l
Hidrogenocitrato de diamonio:	2 g/l
CaCl ₂ dihidratado:	0,5 g/l
Ácido oleico:	0,1% (p/v)
Cianocobalamina:	0,02 mg/l
Riboflavina:	10 mg/l
Ácido fólico:	0,2 mg/l
5-Fosfato de piridoxal monohidratado:	10 mg/l
Ácido 4-aminobenzoico:	0,2 mg/l
D (+)-Biotina:	1 mg/l
Ácido ascórbico:	500 mg/l
Ácido nicotínico:	10 mg/l
Pantotenato de Ca:	10 mg/l
Tiamina:	1 mg/l
Nitrato de cobalto (II) hexahidratado:	500 mg/l
MnSO ₄ monohidratado:	20 mg/l
MgSO ₄ heptahidratado:	500 mg/l
Na ₂ MoO ₄ :	0,04 mg/l
Extracto de PTU (Ohly, Deutsche Hefewerke, Alemania):	15 g/l (o según se menciona en otra parte)
D-Glucosa monohidratada:	10 g/l

- 15 El término "que contiene péptidos 15 g/l" (o "que contiene péptidos 7 g/l") significa que el medio sintético al comienzo del periodo de incubación contiene péptidos 15 g/l (o péptidos 7 g/l, respectivamente). En principio, los péptidos pueden ser cualquier clase de péptidos. En una realización según la presente invención, los péptidos contenidos en el medio sintético están en forma de un extracto de levadura, más específicamente un extracto de PTU. El extracto de PTU puede adquirirse de Ohly, Deutsche Hefewerke, Alemania. Es un extracto de levadura con bajo contenido en sal ultrafiltrado con un alto contenido en péptidos fácilmente disponibles y preferiblemente muestra las siguientes características:

Análisis promedio:

- Materia seca: 96%
- Proteína (Nx6,25) en d.m.: 72,9%
- Nitrógeno total en d.m.: 11,7%
- NaCl: ≤1,0%
- Cenizas: 10%
- pH (en disolución al 2%): 5,7

Vitaminas (típico):

- Clorhidrato de tiamina x HCl (B1): 1,2 mg/100 g
- Riboflavina (B2): 7,0 mg/100 g
- Piridoxina x HCl (B6): 5,9 mg/100 g
- Ácido nicotínico: 47,8 mg/100 g
- Biotina: 0,022 mg/100 g
- D-Pantotenato de Ca: 17,9 mg/100 g

- Vitaminas (típico):
- Ácido fólico: 3,7 mg/100 g

Perfil de aminoácidos (típico): tal como se muestra en la figura 7

El término “una densidad celular inicial de células/ml” significa que el medio sintético se inocula al comienzo del periodo de cultivo con el microorganismo de modo que hay 1×10^7 células/ml presentes en el medio.

5 La concentración de péptidos puede determinarse mediante cualquier método conocido por el experto en la técnica. Métodos bien establecidos son, por ejemplo, los métodos según Biuret, Lowry o Bradford. Además, puede emplearse cualquier kit comercialmente disponible u otra herramienta para determinar la concentración de péptidos. Un ejemplo preferido son herramientas o kits basados en colorante de fluorescencia tales como el kit Quant-it Protein de Invitrogen. La reducción en la concentración de péptidos en los ensayos mencionados anteriormente (a) y/o (A) se somete a ensayo preferiblemente tal como se describe en los ejemplos adjuntos.

10 Tal como se muestra en los ejemplos adjuntos, se ha descubierto sorprendentemente que pueden identificarse bacterias del ácido láctico que tienen la capacidad de reducción de drásticamente en su entorno la concentración de péptidos. Este efecto no sólo se observa con bacterias vivas sino también con formas liofilizadas. Además, en los ejemplos se muestra que los microorganismos descritos en el presente documento muestran el efecto mencionado anteriormente no sólo en los ensayos descritos anteriormente sino también en la saliva y que la presencia del
15 microorganismo conduce a una reducción notable en la producción de H_2S cuando se añade a saliva.

En particular, en una realización preferida el microorganismo descrito en el presente documento también muestra la siguiente propiedad (d) cuando se somete al siguiente ensayo (c):

Ensayo (c):

20 (a) se cultiva el microorganismo en 100 ml de medio sintético a $37^\circ C$ durante 24 h en condiciones anaerobias con una densidad celular inicial de 1×10^7 células/ml;

(b) posteriormente se centrifugan las células a $4000 \times g$ durante 15 min y se resuspenden en 20 ml de H_2O ;

(c) posteriormente se congelan las células hasta $-80^\circ C$ y se liofilizan a vacío durante 16 h;

(d) se resuspenden 10 mg de las bacterias liofilizadas en H_2O en una placa de pocillos profundos y se centrifugan a $4000 \times g$ durante 10 min;

25 (e) se añade 1 ml de medio sintético que contiene péptidos 3 g/l al sedimento y tras 5 min de incubación a $37^\circ C$ se retiran las células mediante centrifugación a $4000 \times g$ durante 15 min;

30 (f) después se transfiere el sobrenadante a una nueva placa de pocillos profundos y posteriormente se inocula con de 10 a 100 μl , preferiblemente 50 μl de saliva humana no estéril y se incuba de manera anaerobia durante 6 h a $37^\circ C$, mientras se cubre la placa de pocillos profundos con un papel de filtro estéril impregnado con acetato de plomo;

(g) se monitoriza la producción de sulfuro de hidrógeno por los microorganismos en la reacción determinando el oscurecimiento del papel de filtro.

35 Propiedad (d): En presencia del microorganismo descrito en el presente documento el oscurecimiento del papel de filtro impregnado con acetato de plomo se reduce en comparación con un control en el que el medio no se incubó previamente con dicho microorganismo. El oscurecimiento reducido del papel de filtro es indicativo de una producción reducida de H_2S por las bacterias contenidas en la saliva humana no estéril usada para inocular el medio.

40 El término “una producción reducida de H_2S ” significa una reducción en la producción de H_2S de al menos el 10%, más preferiblemente de al menos el 20%, incluso más preferiblemente de al menos el 30% y de manera particularmente preferida de al menos el 40% o incluso de al menos el 50% en comparación con el control. La reducción puede medirse, por ejemplo, analizando por densitometría el oscurecimiento del papel de filtro. Alternativamente, la producción de sulfuro de hidrógeno en las etapas (f) y (g) no se mide mediante el uso de un papel de filtro sino que se mide mediante un análisis del espacio de cabeza usando cromatografía de gases.

45 La presente invención también se refiere, en un segundo aspecto, a una forma inactiva de un microorganismo según la reivindicación 3.

El término “estimula” en relación con el crecimiento de microorganismos de la especie *Streptococcus salivarius* significa que el crecimiento de estos microorganismos aumenta cuando se ponen en contacto con un microorganismo descrito en el presente documento. Un crecimiento aumentado significa preferiblemente un aumento en la proliferación, es decir las divisiones celulares por unidad de tiempo. Alternativamente, el término “estimula” también se refiere a un aumento en el tamaño de células individuales. El tamaño de células bacterianas puede evaluarse mediante citometría de flujo (por ejemplo citómetro de flujo FACSsort de Becton-Dickinson, San José, CA) tras teñirse con el tinte SYBR Green I (Molecular Probes, EE.UU.). El tamaño de células bacterianas se evalúa en un modo de dispersión de la luz con ángulo lateral (SSC). Por tanto, un crecimiento aumentado significa un aumento en la producción de biomasa por unidad de tiempo.

La estimulación del crecimiento del microorganismo respectivo puede observarse preferiblemente *in vitro*, más preferiblemente en un ensayo en el que se pone en contacto un microorganismo descrito en el presente documento con *Streptococcus salivarius* y se determina el crecimiento de *Streptococcus salivarius*. El crecimiento puede determinarse contando los números de células/colonias tras diferentes intervalos de tiempo de incubación y puede compararse con un control que no contiene un microorganismo descrito en el presente documento, permitiendo así determinar si hay un aumento en el crecimiento.

En los ejemplos se describe un ensayo *in vitro* para determinar la estimulación del crecimiento y comprende un denominado “ensayo de incubación conjunta fotométrico”. En resumen, un ensayo de este tipo comprende las siguientes etapas:

(a) se mezcla el microorganismo perteneciente al grupo de bacterias del ácido láctico que va a someterse a prueba con *Streptococcus salivarius* en una razón de recuento celular de 1:100 (bacteria del ácido láctico: *Streptococcus salivarius*) en medio ½ TSY;

(b) se incuba la suspensión de cultivo de manera aerobia durante 12 h a 37°C;

(c) como control se usa medio ligero MRS o medio ½ TSY sin consumir;

(d) se determina la densidad óptica máxima ($DO_{600,máx}$) y/o la velocidad de crecimiento máxima ($V_{máx}$) durante el crecimiento exponencial; y

(e) se clasifica el microorganismo como un microorganismo que puede estimular el crecimiento de *Streptococcus salivarius*, si la densidad óptica máxima ($DO_{600,máx}$) y/o la velocidad de crecimiento máxima ($V_{máx}$) aumenta en al menos el 10% en comparación con el control.

El término “medio ½ TSY” se refiere a medio TSY que se diluye en una razón de 1:1 (vol:vol) con H₂O.

En una realización preferida la incubación se lleva a cabo en una placa de 96 pocillos. En una realización adicional preferida la incubación se lleva a cabo en un espectrómetro de microplacas PowerWave de BioTek (Biotek Instruments GmbH, Alemania).

Preferiblemente la $DO_{600,máx}$ y la $V_{máx}$ se determinan de la siguiente manera:

Se mide la densidad óptica a una DO de 600 durante un periodo de tiempo prolongado, preferiblemente de aproximadamente 8 a 12 h, tras el comienzo de la incubación, a intervalos regulares, por ejemplo cada 2,5 minutos. Para la determinación de la $DO_{600,máx}$, la determinación de la DO_{600} se lleva a cabo preferiblemente durante 10 h tras la incubación.

Para la determinación de la $DO_{600,máx}$, se calcula el valor medio a partir de los tres valores medidos más altos.

$V_{máx}$ se determina preferiblemente seleccionando 15 valores consecutivos que muestran el gradiente más pronunciado. La unidad para indicar la $V_{máx}$ es mDO/min. La determinación de la DO_{600} para el cálculo de $V_{máx}$ se lleva a cabo preferiblemente a lo largo de un periodo de tiempo que permite cubrir la fase de crecimiento exponencial del microorganismo cultivado.

Preferiblemente el microorganismo descrito en el presente documento conduce a un aumento de la densidad óptica máxima ($DO_{600,máx}$) o la velocidad de crecimiento máxima ($V_{máx}$) de *Streptococcus salivarius* en el ensayo descrito anteriormente de al menos el 15%, más preferiblemente de al menos el 20%, incluso más preferiblemente de al menos el 30% y de manera particularmente preferida de al menos el 40%, el 50%, el 60%, el 70% o incluso el 80% en comparación con el control.

En una realización preferida el microorganismo descrito anteriormente no sólo estimula el crecimiento de

Streptococcus salivarius sino que también estimula el crecimiento de al menos un microorganismo adicional de la microflora bucal sana. Ejemplos para tales microorganismos son *Streptococcus oralis* y *Streptococcus epidermidis*. La estimulación de estas bacterias puede medirse mediante el ensayo tal como se describió anteriormente.

5 El microorganismo descrito anteriormente también se caracteriza porque no estimula el crecimiento de *Streptococcus mutans* y/o de *Porphyromonas gingivalis*. Se considera que un microorganismo no estimula el crecimiento de un microorganismo de la microflora patógena transitoria si no conduce a un crecimiento aumentado de *Streptococcus mutans* y/o de *Porphyromonas gingivalis* cuando se pone en contacto con la misma. La estimulación del crecimiento o su ausencia puede someterse a prueba *in vitro*. En los ejemplos se describe un ensayo *in vitro* para determinar la estimulación del crecimiento o su ausencia y comprende un denominado “ensayo de incubación conjunta fotométrico”. En resumen, un ensayo de este tipo en el caso de *Streptococcus mutans* comprende las siguientes etapas:

(a) se cultiva el microorganismo perteneciente al grupo de bacterias del ácido láctico que va a someterse a prueba en condiciones anaerobias en placas de 96 pocillos con 150 μ l de medio sintético durante 24 h a 37°C, se sedimentan las células mediante centrifugación a 4000 x g durante 15 min y se recupera el sobrenadante;

15 (b) se cultiva *Streptococcus mutans* de manera anaerobia en 5 ml de medio TSY en tubos Falcon de 15 ml cerrados durante la noche a 37°C;

(c) se mezcla el cultivo celular de *Streptococcus mutans* en una razón volumétrica de 2:1 con el sobrenadante de la etapa (a);

(d) se incuba la suspensión de cultivo de manera aerobia durante 12 h a 37°C;

20 (e) como control se usa medio ligero MRS o medio ½ TSY sin consumir;

(f) se determina la densidad óptica máxima ($DO_{600,m\acute{a}x}$) y/o se determina la velocidad de crecimiento máxima ($V_{m\acute{a}x}$) durante el crecimiento exponencial; y

25 (g) se clasifica el microorganismo como un microorganismo que no puede estimular el crecimiento de *Streptococcus mutans* si la densidad óptica máxima ($DO_{600,m\acute{a}x}$) y/o la velocidad de crecimiento máxima ($V_{m\acute{a}x}$) no aumenta en comparación con el control.

Alternativamente, un ensayo de este tipo puede comprender las siguientes etapas:

(A) se mezcla el microorganismo perteneciente al grupo de bacterias del ácido láctico que va a someterse a prueba con *Streptococcus salivarius* en una razón de recuento celular de 1:100 (lactobacilo: *S. mutans*) en medio ½ TSY;

(B) se incuba la suspensión de cultivo de manera aerobia durante 12 h a 37°C;

30 (C) como control se usa medio ligero MRS o medio ½ TSY sin consumir;

(D) se determina la densidad óptica máxima ($DO_{600,m\acute{a}x}$) y/o se determina la velocidad de crecimiento máxima ($V_{m\acute{a}x}$) durante el crecimiento exponencial; y

35 (E) se clasifica el microorganismo como un microorganismo que no puede estimular el crecimiento de *Streptococcus mutans* si la densidad óptica máxima ($DO_{600,m\acute{a}x}$) y/o la velocidad de crecimiento máxima ($V_{m\acute{a}x}$) no aumenta en comparación con el control.

En el caso de *Porphyromonas gingivalis* el ensayo comprende las siguientes etapas:

(h) se cultiva el microorganismo perteneciente al grupo de bacterias del ácido láctico que va a someterse a prueba en condiciones anaerobias en placas de 96 pocillos con 150 μ l de medio sintético durante 24 h a 37°C, se sedimentan las células mediante centrifugación a 4000 x g durante 15 min y se recupera el sobrenadante;

40 (i) se cultiva *Porphyromonas gingivalis* de manera anaerobia en 5 ml de medio FAB en tubos Falcon de 15 ml cerrados durante la noche a 37°C;

(j) se mezcla el cultivo celular de *Porphyromonas gingivalis* en una razón volumétrica de 2:1 con el sobrenadante de la etapa (h);

(k) se incuba la suspensión de cultivo de manera anaerobia durante 45 h a 37°C;

(l) como control se usa medio FAB sin consumir;

(m) se determina la densidad óptica (DO_{600}) tras 10, 15, 21, 39 y 45 h de incubación (DO_{600}); y

5 (n) se clasifica el microorganismo como un microorganismo que no puede estimular el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* si la densidad óptica (DO_{600}) en cada momento de medición no aumenta en comparación con el control.

Alternativamente, un ensayo de este tipo comprende las siguientes etapas:

(H) se mezcla el microorganismo perteneciente al grupo de bacterias del ácido láctico que va a someterse a prueba con *Porphyromonas gingivalis* en una razón de recuento celular de 1:100 (lactobacilo: *P. gingivalis*) en medio FAB;

(I) se incuba la suspensión de cultivo de manera aerobia durante 45 h a 37°C;

10 (J) como control se usa medio FAB sin consumir;

(K) se determina la densidad óptica máxima ($DO_{600,máx}$) y/o se determina la velocidad de crecimiento máxima ($V_{máx}$) durante el crecimiento exponencial; y

15 (L) se clasifica el microorganismo como un microorganismo que no puede estimular el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* si la densidad óptica máxima ($DO_{600,máx}$) y/o la velocidad de crecimiento máxima ($V_{máx}$) no aumenta en comparación con el control.

En una realización preferida la incubación en las etapas (d) y (B) se lleva a cabo en una placa de 96 pocillos. En una realización adicional preferida la incubación se lleva a cabo en un espectrofotómetro de microplaca PowerWave de BioTek (Fa. Biotek Instruments GmbH, Alemania).

20 En una realización preferida la incubación en las etapas (k) y (I) se lleva a cabo en una placa de 96 pocillos. En una realización adicional preferida la incubación se lleva a cabo en una estación de trabajo anaerobia Whitley DG250 (Meintrup-DWS, Alemania).

Con respecto a $DO_{600,máx}$ y $V_{máx}$, se aplica lo mismo que se expuso anteriormente en el presente documento.

25 Se considera que un microorganismo no estimula el crecimiento de un microorganismo de *Streptococcus mutans* o *Porphyromonas gingivalis* si el crecimiento no aumenta o sólo aumenta ligeramente cuando se pone en contacto con el primer microorganismo. "Aumenta ligeramente" significa que el crecimiento aumenta en no más del 5% en comparación con el control, más preferiblemente no más del 2% en comparación con el control. El término "no aumenta" significa que no puede encontrarse ninguna diferencia estadísticamente relevante entre el crecimiento de *Streptococcus mutans* o *Porphyromonas gingivalis* cuando se pone en contacto con un microorganismo descrito en el presente documento en comparación con el control en el que no hay ningún microorganismo de este tipo
30 presente. En una realización preferida el término "no aumenta" también incluye aquellos casos en los que un microorganismo conduce realmente a una disminución del crecimiento de *Streptococcus mutans* o *Porphyromonas gingivalis*, es decir en el que reprime el crecimiento de un microorganismo de este tipo.

35 En otra realización preferida el microorganismo no influye negativamente en el crecimiento de *Streptococcus mutans* o *Porphyromonas gingivalis*. El término "no influye negativamente" significa que no puede encontrarse ninguna inhibición del crecimiento de *Streptococcus mutans* o *Porphyromonas gingivalis* cuando se pone en contacto con un microorganismo descrito en el presente documento en comparación con el control en el que no hay ningún microorganismo de este tipo presente.

40 En una realización preferida el microorganismo no sólo no estimula el crecimiento de *Streptococcus mutans* y/o *Porphyromonas gingivalis* sino que tampoco estimula el crecimiento de al menos un microorganismo patógeno adicional de la microflora bucal. Representantes de bacterias bucales patógenas son bacterias gram-negativas anaerobias. Ejemplos adicionales son *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Actinomyces naeslundii*, *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium nucleatum polymorphum*, *Prevotella intermedia*, *Solobacterium moorei*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Tannerella forsythensis* y *Treponema denticola*.

45 La estimulación o ausencia de estimulación del crecimiento de estas bacterias puede medirse mediante los ensayos tal como se describieron anteriormente para *S. mutans* y *P. gingivalis*.

En una realización preferida los microorganismos descritos anteriormente se caracterizan porque no sólo muestran

el efecto de estimular el crecimiento de *Streptococcus salivarius* como células vivas sino también como sobrenadante de cultivo. Esto significa que un sobrenadante de cultivo obtenido a partir de un microorganismo descrito en el presente documento también muestra el efecto de estimular el crecimiento de *Streptococcus salivarius*. Preferiblemente este efecto se produce en el siguiente ensayo:

- 5 (a) se cultiva *Streptococcus salivarius* de manera anaerobia en placas de 6 pocillos con 8 ml de medio TSY durante la noche a 37°C;
- (b) se cultiva el microorganismo perteneciente al grupo de bacterias del ácido láctico que va a someterse a prueba en condiciones anaerobias en placas de 96 pocillos con 150 µl de medio sintético durante 24 h a 37°C, se sedimentan las células mediante centrifugación a 4000 x g durante 15 min y se recupera el sobrenadante;
- 10 (c) se mezcla el cultivo celular de *Streptococcus salivarius* de la etapa (a) en una razón volumétrica de 2:1 a 4:1 con el sobrenadante de la etapa (b) en medio ½ TSY;
- (d) se incuba la suspensión de cultivo de manera aerobia durante 12 h a 37°C;
- (e) como control se usa medio ½ TSY sin consumir o ligero MRS;
- 15 (f) se determina la densidad óptica máxima ($DO_{600,máx}$) y/o se determina la velocidad de crecimiento máxima ($V_{máx}$) durante el crecimiento exponencial; y
- (g) se clasifica el microorganismo como un microorganismo que puede estimular el crecimiento de *Streptococcus salivarius* si la densidad óptica máxima ($DO_{600,máx}$) y/o la velocidad de crecimiento máxima ($V_{máx}$) aumenta en al menos el 10% en comparación con el control.

20 En una realización preferida la incubación se lleva a cabo en una placa de 96 pocillos. En una realización adicional preferida la incubación se lleva a cabo en un espectrofotómetro de microplacas Bio Tek PowerWave (Biotek Instruments GmbH, Alemania).

Con respecto a $DO_{600,máx}$ y $V_{máx}$, se aplica lo mismo que se expuso anteriormente en el presente documento.

25 Preferiblemente el microorganismo descrito en el presente documento conduce a un aumento de la densidad óptica máxima ($DO_{600,máx}$) o la velocidad de crecimiento máxima ($V_{máx}$) de *Streptococcus salivarius* en el ensayo descrito anteriormente de al menos el 15%, más preferiblemente de al menos el 20%, incluso más preferiblemente de al menos el 30% y de manera particularmente preferida de al menos el 40%, el 50%, el 60%, el 70% o incluso el 80% en comparación con el control.

30 En una realización particularmente preferida la estimulación del crecimiento de *Streptococcus salivarius* mostrada por el microorganismo es resistente al tratamiento térmico, es decir también se produce cuando las células (o extractos de las mismas) o el sobrenadante de cultivo se somete a un tratamiento térmico. El tratamiento térmico es preferiblemente un tratamiento térmico a una temperatura de entre 60°C y 100°C, más preferiblemente de entre 70°C y 90°C, incluso más preferiblemente entre 75°C y 85°C y lo más preferiblemente a una temperatura de aproximadamente 80°C o de exactamente 80°C.

35 Generalmente, el tratamiento térmico debe durar durante un periodo de tiempo de al menos 1 minuto. Preferiblemente, el tratamiento térmico dura durante un periodo de tiempo de al menos n minutos, en el que n es un número entero en el intervalo de 2 a 60, prefiriéndose particularmente n=10 ó 15 ó 20. Sin embargo, en principio no hay ningún límite superior para el tiempo de incubación. Sin embargo, preferiblemente no es mayor que 4, 3, 2 ó 1 hora(s). El tratamiento térmico más preferido es durante aproximadamente 10 minutos a una temperatura de 80°C en un incubador. Se considera que el tratamiento térmico más preferido elimina cualquier función de una proteína y de cualquier vitalidad de células, lo cual distingue por tanto al microorganismo mencionado anteriormente perteneciente al grupo de bacterias del ácido láctico de otro microorganismo porque todavía puede estimular el crecimiento de *Streptococcus salivarius*. Por tanto, es muy útil para su uso en cualquier alimento, pienso, bebida o composición en el contexto de la presente invención si se desea que el microorganismo no deba estar vivo.

40

45 Tras enfriarse, se determina la capacidad del microorganismo descrito en el presente documento (o extractos del mismo) o del sobrenadante de cultivo del mismo para estimular el crecimiento de *Streptococcus salivarius* se determina en un ensayo tal como se describió anteriormente en el presente documento o tal como se describe en los ejemplos adjuntos. En el contexto con el sobrenadante de cultivo de un microorganismo descrito en el presente documento un ensayo correspondiente comprende preferiblemente las siguientes etapas:

(h) se cultiva *Streptococcus salivarius* de manera anaerobia en placas de 6 pocillos con 8 ml de medio TSY durante

la noche a 37°C;

(i) se cultiva el microorganismo perteneciente al grupo de bacterias del ácido láctico que va a someterse a prueba en condiciones anaerobias en placas de 96 pocillos con 150 µl de medio sintético durante 24 h a 37°C, se sedimentan las células mediante centrifugación a 4000 x g durante 15 min y se recupera el sobrenadante;

5 (j) se incuba el sobrenadante a 80°C durante 10 min en un incubador y posteriormente se enfría hasta temperatura ambiente;

(k) se mezcla el cultivo celular de *Streptococcus salivarius* de la etapa (a) en una razón volumétrica de 2:1 con el sobrenadante de la etapa (j) en medio ½ TSY;

(l) se incuba la suspensión de cultivo de manera aerobia durante 12 h a 37°C;

10 (m) como control se usa medio ½ TSY sin consumir o ligero MRS;

(n) se determina la densidad óptica máxima ($DO_{600,máx}$) y/o se determina la velocidad de crecimiento máxima ($V_{máx}$) durante el crecimiento exponencial; y

15 (o) se clasifica el microorganismo como un microorganismo que puede estimular el crecimiento de *Streptococcus salivarius* si la densidad óptica máxima ($DO_{600,máx}$) y/o la velocidad de crecimiento máxima ($V_{máx}$) aumenta en al menos el 10% en comparación con el control.

Además, la propiedad de no estimulación del crecimiento de *Streptococcus mutans* y/o de *Porphyromonas gingivalis* del microorganismo descrito en el presente documento también es resistente al tratamiento térmico. Con respecto a la definición del término tratamiento térmico, se aplica lo mismo que se expuso anteriormente.

20 En otra realización preferida la estimulación del crecimiento de *Streptococcus salivarius* mostrada por el microorganismo descrito en el presente documento es resistente a la liofilización, es decir también se produce cuando se someten las células a un tratamiento de liofilización. El tratamiento de liofilización es preferiblemente un tratamiento de liofilización en el que las células (o extractos de las mismas) o el sobrenadante celular se congelan en primer lugar hasta -80°C y posteriormente se liofilizan a vacío durante 16 h. Tras el tratamiento de liofilización la capacidad del microorganismo descrito en el presente documento para estimular el crecimiento de *Streptococcus salivarius* puede someterse a prueba mediante los ensayos ya descritos anteriormente o tal como se describe en los ejemplos adjuntos. En el contexto con el sobrenadante de cultivo de un microorganismo descrito en el presente documento un ensayo correspondiente comprende preferiblemente las siguientes etapas:

(p) se cultiva *Streptococcus salivarius* de manera anaerobia en placas de 6 pocillos con 8 ml de medio TSY durante la noche a 37°C;

30 (q) se cultiva el microorganismo perteneciente al grupo de bacterias del ácido láctico que va a someterse a prueba en condiciones anaerobias en 50 ml de medio sintético en frascos de 100 ml cerrados durante la noche a 37°C, se sedimentan las células mediante centrifugación a 4000 x g durante 15 min y se recupera el sobrenadante;

(r) se congelan 20 ml del sobrenadante de la etapa (q) hasta -80°C y se liofilizan a vacío durante 16 h;

(s) se resuspende el sobrenadante liofilizado en 20 ml de H₂O;

35 (t) se mezcla el cultivo celular de *Streptococcus salivarius* de la etapa (a) en una razón volumétrica de 2:1 con el sobrenadante de la etapa (s) en medio ½ TSY en placas de 96 pocillos;

(u) se incuba la suspensión de cultivo de manera aerobia durante 12 h a 37°C;

(v) como control se usa medio ½ TSY sin consumir o ligero MRS;

40 (w) se determina la densidad óptica máxima ($DO_{600,máx}$) y/o se determina la velocidad de crecimiento máxima ($V_{máx}$) o durante el crecimiento exponencial; y

(x) se clasifica el microorganismo como un microorganismo que puede estimular el crecimiento de *Streptococcus salivarius* si la densidad óptica máxima ($DO_{600,máx}$) y/o la velocidad de crecimiento máxima ($V_{máx}$) aumenta en al menos el 10% en comparación con el control.

Según una realización particularmente preferida el microorganismo descrito en el presente documento muestra tanto

las propiedades descritas en el primer como en el segundo aspecto de la invención, respectivamente, es decir muestra las propiedades (b) y/o (B) tal como se describieron en el primer aspecto (reducción drástica de la concentración de péptidos) y muestra las propiedades tal como se describieron en el segundo aspecto (estimulación del crecimiento de *Streptococcus salivarius* y no estimulación del crecimiento de *Streptococcus mutans* y/o *Porphyromonas gingivalis*).

Los microorganismos tal como se describieron anteriormente en el presente documento, debido a sus propiedades, permiten desplazar el equilibrio de la microflora bucal hacia *Streptococcus salivarius*, lo cual conduce a una mejora con respecto al desarrollo de menos mal olor.

Tal como resulta evidente a partir de lo anterior, todas las características mencionadas anteriormente hacen que el microorganismo mencionado anteriormente perteneciente al grupo de bacterias del ácido láctico sea un agente adecuado para reducir el mal olor bucal y/o la halitosis o para prevenir y/o tratar el mal olor bucal y/o la halitosis, en particular el mal olor bucal y/o la halitosis que está provocado/a por microorganismos patógenos de la flora microbiana bucal, en particular bacterias gram-negativas anaerobias. Por consiguiente, el microorganismo descrito en el presente documento tiene un efecto sobre la reducción del mal olor bucal y por tanto es un agente útil para prevenir y/o tratar el mal olor bucal y/o la halitosis.

El término "prevenir el mal olor bucal" incluye la profilaxis del mal olor bucal. Por consiguiente, un sujeto que nunca se ha encontrado con estos microorganismos, que son responsables del desarrollo del mal olor bucal, pero que puede correr el riesgo de encontrarse, es decir, infectarse con tales microorganismos, o un sujeto que todavía tiene una microflora bucal bien equilibrada, se beneficia, por ejemplo, de los microorganismos, las composiciones, los usos y los métodos descritos en el presente documento en la medida en que dicho sujeto no presentará mal olor bucal. Por tanto, los microorganismos, las composiciones, los usos y los métodos descritos en el presente documento pueden aplicarse, por ejemplo, a bebés, niños o animales jóvenes para la profilaxis del mal olor bucal ya que normalmente la cavidad bucal del bebé o animal joven está libre de microorganismos responsables del desarrollo del mal olor bucal. Sin embargo, los microorganismos y las composiciones tal como se usan en relación con la presente invención no se limitan a la administración a bebés, niños o animales jóvenes.

Los términos "tratar el mal olor bucal" y "tratar la halitosis" incluyen la administración de los microorganismos o las composiciones tal como se describen en el presente documento a un sujeto que presenta mal olor bucal y/o halitosis con el fin de disminuir la cantidad de mal olor producida.

Opcionalmente, el microorganismo descrito en el presente documento es un microorganismo probiótico que tiene, además de su efecto de reducción del mal olor bucal, efectos beneficiosos para el organismo huésped al que se administra. Un "probiótico", según la definición generalmente aceptada, es un "suplemento alimenticio microbiano vivo que afecta de manera beneficiosa al animal huésped mejorando su equilibrio microbiano intestinal".

Por consiguiente, el presente texto proporciona el uso de bacterias fácilmente administrables, que son organismos de calidad alimentaria que, además de su efecto de reducción del mal olor bucal, pueden ser útiles como probióticos.

Sorprendentemente, el efecto de los microorganismos descritos en el presente documento de eliminar eficazmente péptidos de un medio y, por tanto, también de la saliva evitando así que otro microorganismo presente en la microflora bucal que es responsable de la producción de sustancias que conducen a la generación de mal olor bucal produzca las sustancias correspondientes, también puede observarse con formas inactivadas de los microorganismos, tales como formas liofilizadas o formas resultantes de un tratamiento con radiación o luz UV.

De la manera más importante, el efecto también se produce en presencia de saliva lo que hace que el microorganismo descrito en el presente documento sea en particular adecuado para el uso en forma de aplicaciones bucales o como aditivo para alimento, pienso o bebidas. De manera notable, formas térmicamente inactivadas o liofilizadas, en particular análogos, derivados o fragmento(s) de dichos microorganismos dados a conocer en el presente documento, todavía pueden reducir eficazmente de manera específica la concentración de péptidos en los ensayos descritos anteriormente.

De manera similar, la propiedad del microorganismo según la presente invención tal como se describió en el segundo aspecto de la presente invención, es decir estimular el crecimiento de *Streptococcus salivarius* y no estimular el crecimiento de *Streptococcus mutans* y/o *Porphyromonas gingivalis*, también se produce no sólo con los propios microorganismos sino también con el sobrenadante de cultivo del microorganismo y con formas inactivadas. En particular, la propiedad de estimular el crecimiento de *Streptococcus salivarius* y no estimular el crecimiento de *Streptococcus mutans* y/o *Porphyromonas gingivalis* es resistente al tratamiento térmico y es resistente a un tratamiento de liofilización.

Estos efectos sorprendentes son ventajosos para usar dichas formas inactivadas, sobrenadantes de cultivo, análogo(s) o fragmento(s) de dichos microorganismos así como mutantes o derivados de los mismos en

composiciones para su uso en animales, preferiblemente, seres humanos o mamíferos, para prevenir y/o tratar el mal olor bucal y/o la halitosis. En particular dichas formas inactivadas, sobrenadantes de cultivo, análogos o fragmentos pueden añadirse fácilmente a cualquier composición, por ejemplo composición cosmética o farmacéutica, producto alimenticio o de pienso o bebidas y similares. Adicionalmente, la producción de tales formas inactivadas, sobrenadantes de cultivo, análogos o fragmentos es barata y fácil y pueden almacenarse durante periodos de tiempo prolongados sin perder su capacidad de reducción de la concentración de péptidos y/o estimular el crecimiento de *Streptococcus salivarius* y no estimular el crecimiento de *Streptococcus mutans* y/o *Porphyromonas gingivalis*. Una ventaja particular del microorganismo descrito en el presente documento es que conserva su capacidad de reducción de la concentración de péptidos y/o estimular el crecimiento de *Streptococcus salivarius* y no estimular el crecimiento de *Streptococcus mutans* y/o *Porphyromonas gingivalis* si se liofiliza o seca por pulverización o seca. Además, la propiedad de estimular el crecimiento de *Streptococcus salivarius* y no estimular el crecimiento de *Streptococcus mutans* y/o *Porphyromonas gingivalis* se conserva incluso tras un tratamiento térmico. Las propiedades mencionadas anteriormente hacen que el microorganismo descrito en el presente documento sea un componente favorable para su uso en las composiciones descritas en el presente documento.

Además, en una realización preferida, el microorganismo descrito en el presente documento también muestra las propiedades descritas anteriormente (es decir, reducción de la concentración de péptidos y/o estimulación del crecimiento de *Streptococcus salivarius* y no estimulación del crecimiento de *Streptococcus mutans* y/o *Porphyromonas gingivalis*) en presencia de saliva. La saliva es una secreción exógena que se sintetiza por las glándulas salivares. Es un líquido complejo que contiene, aparte de aproximadamente el 99% de agua, una multitud de compuestos orgánicos e inorgánicos. Los componentes fisiológicos de la saliva son, entre otros, enzimas, por ejemplo, amilasas, carboanhidasas, lisozima, peroxidasa o proteínas, por ejemplo, mucinas, lactoferrina, proteínas ricas en prolina, cistatinas, histatinas o estaterinas o IgA soluble. Por tanto, aunque hay una variedad de sustancias de interferencia potencial en la saliva, las propiedades anteriormente mencionadas del microorganismo descrito en el presente documento no se ven obstaculizadas por la presencia de saliva.

Las características anteriormente mencionadas del microorganismo mencionado anteriormente perteneciente al grupo de bacterias del ácido láctico hacen que sea un agente robusto y eficaz para prevenir y/o tratar el mal olor bucal y/o la halitosis ya que se administra principalmente en diversas formas a la boca incluyendo la cavidad bucal y los dientes en los que, entre otras cosas, está presente saliva que incluye determinadas proteasas y valores de pH bajos tras la ingestión de productos alimenticios que contienen hidratos de carbono. Además, la resistencia al calor y/o a la liofilización tiene efectos beneficiosos al añadir el microorganismo anteriormente mencionado perteneciente al grupo de bacterias del ácido láctico como aditivo a producto alimenticio durante la preparación de dicho producto alimenticio. Concretamente, con frecuencia se esteriliza el producto alimenticio, se precocina, se pasteuriza y similares lo cual es perjudicial para la viabilidad de microorganismos.

Debe entenderse que la terminología usada en el presente documento es únicamente con el fin de describir realizaciones particulares, y no se pretende que limite el alcance de la presente invención, que se limitará únicamente por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen los mismos significados que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica.

Preferiblemente, los términos usados en el presente documento se definen tal como se describe en "A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)", Leuenberger, H.G.W. Nagel, B. y Kölbl, H. eds. (1995), Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basilea, Suiza).

A lo largo de la totalidad de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera lo contrario, la palabra "comprender", y variaciones tales como "comprende" y "que comprende", se entenderá como que implica la inclusión de un número entero o etapa o grupo de número enteros o etapas mencionado pero no la exclusión de ningún otro número entero o etapa o grupo de número entero o etapa.

Debe observarse que, tal como se usan en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una", y "el/la", incluyen referentes en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "un reactivo" incluye uno o más de tales reactivos diferentes, y la referencia "al método" incluye referencia a etapas y métodos equivalentes conocidos por los expertos habituales en la técnica que pueden modificarse o sustituir a los métodos descritos en el presente documento.

Cuando se usa en el contexto del presente texto, el término "microorganismo perteneciente al grupo de bacterias del ácido láctico" abarca (a) microorganismo(s) perteneciente(s) a bacterias, en particular perteneciente(s) a eubacterias fermentadoras gram-positivas, más particularmente perteneciente(s) a la familia de *Lactobacteriaceae* incluyendo bacterias del ácido láctico. Además, dicho término también abarca derivados o mutantes o análogos o fragmentos, tales como extractos celulares o fracciones de membrana tal como se describe en el presente documento, de dicho(s) microorganismo(s), que conservan las propiedades descritas anteriormente (es decir reducir la concentración de péptidos y/o estimular el crecimiento de *Streptococcus salivarius* y no estimular el crecimiento de

5 *Streptococcus mutans* y/o *Porphyromonas gingivalis*). Los términos “derivado”, “mutantes”, “análogos” y “fragmentos” se describen en otra parte en el presente documento. Desde un punto de vista taxonómico, las bacterias del ácido láctico se dividen en las subdivisiones de *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* y *Lactobacillus*. El microorganismo mencionado anteriormente perteneciente al grupo de 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 de transporte de electrones y por tanto obtienen energía únicamente mediante fosforilación a nivel de sustrato. Es decir, en las bacterias del ácido láctico se sintetiza ATP mediante fermentación de hidratos de carbono. Todas las bacterias del ácido láctico crecen de manera anaerobia, sin embargo, al contrario que muchos anaerobios, la mayoría de las bacterias del ácido láctico no son sensibles al oxígeno y por tanto pueden crecer en su presencia así como en su ausencia. Por consiguiente, los microorganismos mencionados anteriormente pertenecientes al grupo de bacterias del ácido láctico son preferiblemente bacterias del ácido láctico anaerobias aerotolerantes, preferiblemente pertenecientes al género de *Lactobacillus*.

15 Las bacterias del ácido láctico mencionadas anteriormente son preferiblemente con forma de bastón o esféricas, variando de bastones largos y finos a cortos y curvados, además son preferiblemente inmóviles y/o asporógenas y producen ácido láctico como producto principal o único de metabolismo fermentador. El género *Lactobacillus* al que pertenece el microorganismo mencionado anteriormente se divide mediante las siguientes características en tres subgrupos principales, mediante lo cual se considera que la especie de *Lactobacillus* mencionada anteriormente puede pertenecer a cada uno de los tres subgrupos principales:

(a) lactobacilos homofermentativos

20 (i) que producen ácido láctico, preferiblemente el/los isómero(s) L, D o DL de ácido láctico en una cantidad de al menos el 85% a partir de glucosa a través de la ruta de Embden-Meyerhof;

(ii) que crecen a una temperatura de 45°C, pero no a una temperatura de 15°C;

(iii) que presentan forma de bastón largo; y

(iv) que tienen ácido glicerol-teicoico en la pared celular;

25 (b) lactobacilos homofermentativos

(i) que producen ácido láctico, preferiblemente el/los isómero(s) L o DL de ácido láctico a través de la ruta de Embden-Meyerhof;

(ii) que crecen a una temperatura de 15°C, que muestran un crecimiento variable a una temperatura de 45°C;

(iii) que tienen forma de bastón corto o corineforme; y

30 (iv) que tienen ribitol y/o ácido glicerol-teicoico en su pared celular;

(c) lactobacilos heterofermentativos

(i) que producen ácido láctico, preferiblemente el isómero DL de ácido láctico en una cantidad de al menos el 50% a partir de glucosa a través de la ruta de fosfato de pentosa;

(ii) que producen dióxido de carbono y etanol;

35 (iii) que muestran un crecimiento variable a una temperatura de 15°C o 45°C;

(iv) que tienen forma de bastón largo o corto; y

(v) que tienen ácido glicerol-teicoico en su pared celular.

40 Basándose en las características descritas anteriormente, los microorganismos mencionados anteriormente pueden clasificarse como pertenecientes al grupo de bacterias del ácido láctico, particularmente al género de *Lactobacillus*. Usando sistemáticas clásicas, por ejemplo, mediante referencia a las descripciones pertinentes en la obra “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology” (Williams & Wilkins Co., 1984), puede determinarse que un microorganismo pertenece al género de *Lactobacillus*. Alternativamente, los microorganismos pueden clasificarse como pertenecientes al género de *Lactobacillus* mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante su huella metabólica, es decir un resumen comparable de la capacidad de tal(es) microorganismo(s) para metabolizar azúcares o mediante otros métodos descritos, por ejemplo, en Schleifer *et al.*, System. Appl. Microb., 18 (1995), 461-

45

467 o Ludwig *et al.*, System. Appl. Microb., 15 (1992), 487-501. Los microorganismos mencionados anteriormente pueden metabolizar fuentes de azúcar, que son típicas y se conocen en la técnica para microorganismos pertenecientes al género de *Lactobacillus*. Sin embargo, preferiblemente el microorganismo mencionado anteriormente tiene una huella metabólica seleccionada del grupo que consiste en:

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

10 Preferiblemente, el microorganismo mencionado anteriormente tiene una huella metabólica seleccionada del grupo que consiste en:

- (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.

15 Evidentemente, el microorganismo mencionado anteriormente no se limita a la metabolización de los azúcares mencionados en el patrón de huella metabólica mencionado anteriormente, sino que es posible que pueda metabolizar azúcares adicionales que metabolizan comúnmente especies de *Lactobacillus*.

La afiliación de los microorganismos mencionados anteriormente al género de *Lactobacillus* también puede caracterizarse usando otros métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, usando electroforesis en gel SDS-PAGE de proteína total de las especies que van a determinarse y comparándolas con cepas conocidas y ya caracterizadas del género *Lactobacillus*. Las técnicas para preparar un perfil de proteína total tal como se describió anteriormente, así como el análisis numérico de tales perfiles, las conoce bien un experto en la técnica. Sin embargo, los resultados sólo son fiables en la medida en que cada etapa del procedimiento está suficientemente normalizada. Al enfrentarse al requisito de exactitud cuando se determina la adhesión de un microorganismo al género de *Lactobacillus*, normalmente se ponen procedimientos normalizados a disposición del público por sus autores tales como los de Pot *et al.*, tal como se presentó durante un "taller" organizado por la Unión Europea, en la Universidad de Gante, en Bélgica, del 12 al 16 de septiembre de 1994 (Fingerprinting techniques for classification and identification of bacteria, SDS-PAGE of whole cell protein). El software usado en la técnica para analizar el gel de electroforesis de SDS-PAGE es de crucial importancia ya que el grado de correlación entre las especies depende de los parámetros y algoritmos usados por este software. Sin entrar en detalles teóricos, la comparación cuantitativa de bandas medidas mediante un densitómetro y normalizadas mediante un ordenador se realiza preferiblemente con el coeficiente de correlación de Pearson. La matriz de similitud así obtenida puede organizarse con ayuda del algoritmo de UPGMA (método de grupos de pares no ponderados usando el promedio) que no sólo hace posible agrupar juntos los perfiles más similares, sino que 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 caracterizarse con respecto al ARN ribosómico en un denominado Riboprinter.RTM. Más preferiblemente, la afiliación de las especies mencionadas anteriormente 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 del ácido láctico conocidos hasta la fecha. Otra alternativa preferida para determinar la adhesión de especies al género *Lactobacillus* es el uso de cebadores de PCR específicos de la especie que seleccionan como diana la región de espaciador de ARNr 16S-23S. Otra alternativa preferida es RAPD-PCR (Nigatu *et al.* en Antonie van Leeuwenhoek (79), 1-6, 2001) gracias a que se genera un patrón de ADN específico de la cepa lo que permite determinar la afiliación de microorganismos identificados al género de *Lactobacillus*. Técnicas adicionales útiles para determinar la afiliación de un microorganismo al género de *Lactobacillus* son los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) (Giraffa *et al.*, Int. J. Food Microbiol. 82 (2003), 163-172), determinación de huellas de los 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 (Heyrman *et al.*, FEMS Microbiol. Lett. 181 (1991), 55-62). Alternativamente, pueden determinarse lactobacilos mediante determinación del tipo de lectina (Annuk *et al.*, J. Med. Microbiol. 50 (2001), 1069-1074) o mediante análisis de sus proteínas de la pared celular (Gatti *et al.*, Lett. Appl. Microbiol. 25 (1997), 345-348).

Los microorganismos mencionados anteriormente son preferiblemente bacterias del ácido láctico pertenecientes al género de *Lactobacillus*, más preferiblemente especies de *Lactobacillus* tal como se describen en el presente documento, en particular bacterias de *Lactobacillus* pertenecientes a una especie seleccionada del grupo que consiste en *acidophilus*, *fermentum*, *lactis*, *delbrueckii*, *algidus*, *brevis*, *buchneri*, *casei*, *camelliae*, *coelehominis*, *crustorum*, *diolivorans*, *heterohiochii*, *hilgardii*, *kimchii*, *lindneri*, *oris*, *pantheris*, *parabuchner* y *saerimneri*. Incluso más preferiblemente dicho *Lactobacillus* es *Lactobacillus acidophilus*. Sin embargo, las especies de *Lactobacillus* no se limitan a las mismas. Los microorganismos mencionados anteriormente pueden estar preferiblemente “aislados” o “purificados”. El término “aislado” significa que el material se retira de su entorno original, por ejemplo del entorno natural si se produce de manera natural. Por ejemplo, un microorganismo que se produce de manera natural, preferiblemente una especie de *Lactobacillus*, separado de algunos o de la totalidad de los materiales que existen con el mismo en el sistema natural, está aislado. Un microorganismo de este tipo puede ser parte de una composición, y debe considerarse como que todavía está aislado porque la composición no es parte de su entorno natural.

El término “purificado” no requiere una pureza absoluta; más bien, se entiende como una definición relativa. Microorganismos individuales obtenidos a partir de una biblioteca se han purificado convencionalmente hasta obtener homogeneidad microbiológica, es decir, se hacen crecer como colonias individuales cuando se cultivan en línea sobre placas de agar mediante métodos conocidos en la técnica. Preferiblemente, las placas de agar que se usan para este fin son selectivas para especies de *Lactobacillus*. Tales placas de agar selectivas se conocen en la técnica.

Más preferiblemente, el microorganismo mencionado anteriormente perteneciente al grupo de bacterias del ácido láctico se selecciona del grupo que consiste en *Lactobacillus acidophilus* que tiene el número de registro de DSMZ DSM 19825, DSM 19826, DSM 19827 o un mutante o derivado del mismo, en el que dicho mutante o derivado conserva la capacidad de reducción de la concentración de péptidos en el ensayo (a) y/o (A) tal como se describió anteriormente en el presente documento. El término “*Lactobacillus acidophilus* que tiene número de registro de DSMZ” se refiere a células de un microorganismo perteneciente a la especie *Lactobacillus acidophilus* depositadas por BASF AG en el Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (“DSMZ”) el 1 de noviembre de 2007 y que tiene los siguientes números de registro DSM 19825, DSM 19826, DSM 19827. El DSMZ se encuentra en Inhoffenstr. 7b, 38124 Braunschweig, Alemania.

Los depósitos de DSMZ mencionados anteriormente se realizaron según los términos del tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos para fines de procedimientos de patente.

“Un mutante o derivado” del microorganismo mencionado anteriormente perteneciente al grupo de bacterias del ácido láctico, preferiblemente del *Lactobacillus acidophilus* depositado, tiene preferiblemente las mismas características que las cepas depositadas respectivas, es decir, conserva la capacidad de reducción de la concentración de péptidos en el ensayo (a) y/o (A) tal como se describió anteriormente en el presente documento y/o conserva la capacidad de estimular el crecimiento de *Streptococcus salivarius* y no estimular el crecimiento de *Streptococcus mutans* y/o *Porphyrromonas gingivalis*. Por ejemplo, dicho derivado puede modificarse por ingeniería genética. En el contexto de la presente invención el término “modificado por ingeniería genética” se usa en su sentido más amplio para métodos que conoce el experto en la técnica para modificar ácidos nucleicos deseados *in vitro* e *in vivo* de tal manera que se producen modificaciones genéticas y se alteran genes mediante tecnología de ADN recombinante. Por consiguiente, se prefiere que dichos métodos comprendan clonación, secuenciación y transformación de ácidos nucleicos recombinantes. Con este fin los vectores apropiados incluyen vectores de expresión para especies de *Lactobacillus* tal como se describen, por ejemplo, en los documentos EP-B1 506 789, EP-B1 316 677, EP-B1 251 064, EP-B1 218 230, EP-B1 133 046 o WO 89/01970.

Pueden usarse cebadores, enzimas, células huésped adicionales para clonación de constructos intermedios y similares conocidos por el experto en la técnica. Preferiblemente, los mutantes modificados por ingeniería genética comprenden células del microorganismo mencionado anteriormente perteneciente al grupo de bacterias del ácido láctico, preferiblemente de las especies de *Lactobacillus* depositadas, que albergan ácidos nucleicos recombinantes o bien comprendidos en su cromosoma bacteriano o en un(os) plásmido(s) o bien comprendidos en su cromosoma bacteriano y/o un(os) plásmido(s). Dichos ácidos nucleicos recombinantes son preferiblemente del ácido láctico. Por “foráneo” quiere decirse que la molécula de polinucleótido o de ácido nucleico es o bien heteróloga con respecto a la célula huésped, esto significa derivada de una célula o un organismo con un contexto genómico diferente, o bien es homóloga con respecto a la célula huésped pero está ubicada en un entorno genómico diferente del equivalente que se produce de manera natural de dicha molécula de ácido nucleico. Esto significa que, si la molécula de ácido nucleico es homóloga con respecto a la célula huésped, no está ubicada en su ubicación natural en el genoma de dicha célula huésped, en particular está rodeada por genes diferentes. En este caso, el polinucleótido puede estar o bien bajo el control de su propio promotor o bien bajo el control de un promotor heterólogo. El vector o la molécula de ácido nucleico descrito anteriormente, que está presente en la célula huésped, puede o bien estar integrado en el genoma de la célula huésped o bien mantenerse en alguna forma de manera extracromosómica. Con respecto a esto, también debe entenderse que la molécula de ácido nucleico descrita anteriormente puede usarse para

restaurar o crear un gen mutante mediante recombinación homóloga.

Un mutante del microorganismo mencionado anteriormente perteneciente al grupo de bacterias del ácido láctico, preferiblemente un mutante de las cepas de *Lactobacillus* depositadas, está preferiblemente mutado de manera artificial. Según el presente texto, el término “mutado” significa una(s) modificación/mutaciones permanente(s) de material genético, es decir ácidos nucleicos, provocada(s), por ejemplo, de manera natural o por medios físicos o compuestos/sustancias/agentes químicos, tales como EMS o ENU. Dichas modificaciones incluyen mutaciones puntuales, tales como transiciones o transversiones, delección/inserción/adición de una o más bases dentro de un ácido nucleico/gen/cromosoma modificando de ese modo el ácido nucleico/gen/cromosoma lo que puede provocar, entre otras cosas, expresión/transcripción/traducción génica aberrante o productos génicos inactivos, productos génicos activos/inactivos constitutivos que conducen, por ejemplo, a efectos negativos dominantes. Preferiblemente, una mutación conduce a una capacidad aumentada de reducción de la concentración de péptidos en el ensayo (a) y/o en el ensayo (A) tal como se describió anteriormente en el presente documento. Por tanto, también se prefieren las células mutantes del microorganismo depositado que albergan una(s) mutación/mutaciones en un(os) gene(s) deseado(s) o en las que se induce(n) una(s) mutación/mutaciones en un(os) gene(s) deseado(s) mediante métodos conocidos por el experto en la técnica. También se conoce en la técnica anterior que pueden seleccionarse células bacterianas mutadas o modificadas por ingeniería genética mediante cualquier método/fenotipo adecuado. En el contexto del presente texto, un mutante que tiene una capacidad aumentada de reducción de la concentración de péptidos en el ensayo (a) y/o en el ensayo (A) tal como se describió anteriormente en el presente documento y/o que tiene la capacidad de estimular el crecimiento de *Streptococcus salivarius* y no estimular el crecimiento de *Streptococcus mutans* y/o *Porphyromonas gingivalis* puede someterse a prueba según los métodos descritos anteriormente en el presente documento o en los ejemplos adjuntos. Sin embargo, el término “mutante” también incluye células del microorganismo mencionado anteriormente perteneciente al grupo de bacterias del ácido láctico, preferiblemente células de los microorganismos depositados, que albergan mutaciones espontáneas, que se producen de manera natural, en su genoma, es decir cromosoma bacteriano. Las “mutaciones espontáneas” son mutaciones que surgen de manera natural, es decir, sin manipulación genética directa por el ser humano o mediante exposición a un mutágeno. La selección de mutantes espontáneos puede lograrse cultivando la cepa y seleccionando las variantes deseadas, por ejemplo, mediante la capacidad de la bacteria variante de mostrar una capacidad aumentada de reducción de la concentración de péptidos en el ensayo (a) y/o en el ensayo (A) tal como se describió anteriormente en el presente documento y/o de estimular el crecimiento de *Streptococcus salivarius* y no estimular el crecimiento de *Streptococcus mutans* y/o *Porphyromonas gingivalis* (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 producirse durante el cultivo, por ejemplo, durante el proceso de división celular normal acoplado con replicación de ADN o durante el pase y/o la conservación del mutante del microorganismo mencionado anteriormente perteneciente al grupo de bacterias del ácido láctico.

El presente texto también da a conocer un derivado del microorganismo mencionado anteriormente perteneciente al grupo de bacterias del ácido láctico. El término “derivado del microorganismo mencionado anteriormente perteneciente al grupo de bacterias del ácido láctico” incluye una forma inactivada, un análogo o fragmento del microorganismo mencionado anteriormente perteneciente al grupo de bacterias del ácido láctico, en el que dicha forma inactivada, análogo o fragmento conserva la capacidad de reducción de la concentración de péptidos en el ensayo (a) y/o en el ensayo (A) tal como se describió anteriormente en el presente documento y/o la capacidad de estimular el crecimiento de *Streptococcus salivarius* y no estimular el crecimiento de *Streptococcus mutans* y/o *Porphyromonas gingivalis*.

En relación con el presente texto, el término “forma inactivada” incluye una célula muerta o inactivada del microorganismo descrito en el presente documento que ya no puede formar una colonia individual sobre una placa específica para microorganismos pertenecientes al género de *Lactobacillus*. Dicha célula muerta o inactivada tiene una membrana celular o bien intacta o bien rota. En la técnica se conocen métodos para destruir o inactivar células del microorganismo mencionado anteriormente perteneciente al grupo de bacterias del ácido láctico. El-Nezami *et al.*, J. Food Prot. 61 (1998), 466-468 describe un método para inactivar especies de *Lactobacillus* mediante irradiación UV. Preferiblemente, las células del microorganismo descrito en el presente documento se inactivan térmicamente o se liofilizan tal como se describe en los ejemplos adjuntos. La liofilización de las células tal como se describió anteriormente tiene la ventaja de que pueden almacenarse fácilmente y manipularse al tiempo que conservan su capacidad de reducción de la concentración de péptidos en el ensayo (a) y/o en el ensayo (A) tal como se describió anteriormente en el presente documento y/o la capacidad de estimular el crecimiento de *Streptococcus salivarius* y no estimular el crecimiento de *Streptococcus mutans* y/o *Porphyromonas gingivalis*. Además, pueden hacerse crecer células liofilizadas de nuevo cuando se aplican en condiciones conocidas en la técnica a medios líquidos o sólidos apropiados. La liofilización se realiza mediante métodos conocidos en la técnica. Preferiblemente, se lleva a cabo durante al menos 2 horas a temperatura ambiente, es decir a cualquier temperatura entre 16°C y 25°C. De manera particularmente preferida se lleva a cabo durante 16 h a vacío. Además, las células liofilizadas del microorganismo mencionado anteriormente perteneciente al grupo de bacterias del ácido láctico son estables durante al menos 4 semanas a una temperatura de 4°C de modo que todavía pueden reducir la concentración de péptidos en el ensayo (a) y/o en el ensayo (A) tal como se describió anteriormente en el presente documento y/o

estimular el crecimiento de *Streptococcus salivarius* y no estimular el crecimiento de *Streptococcus mutans* y/o *Porphyromonas gingivalis*.

5 La inactivación térmica puede lograrse incubando las células del microorganismo mencionado anteriormente perteneciente al grupo de bacterias del ácido láctico durante al menos 10 minutos a una temperatura de 80°C. La inactivación térmica puede lograrse sometiendo dichas células y/o el sobrenadante a autoclave a una temperatura de 121°C durante al menos 20 minutos en presencia de vapor saturado a una presión atmosférica de 2 bar. Preferiblemente, la inactivación térmica de las células o del sobrenadante de cultivo se logra tal como se describió anteriormente en el presente documento en relación con el tratamiento térmico.

10 En la alternativa, la inactivación térmica de las células del microorganismo mencionado anteriormente perteneciente al grupo de bacterias del ácido láctico se logra 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 el 70%, el 75% o el 80%, más preferiblemente el 85%, el 90% o el 95% y de manera particularmente preferida al menos el 97%, el 98%, el 99% y de manera particularmente más preferida, el 99,1%, el 99,2%, el 99,3%, el 99,4%, el 99,5%, el 99,6%, el 99,7%, el 99,8% o el 99,9% y de la manera particularmente más preferida el 100% de las células del análogo del microorganismo mencionado anteriormente perteneciente al grupo de bacterias del ácido láctico estén muertas o inactivadas, sin embargo, que todavía tengan la capacidad de reducción de la concentración de péptidos en el ensayo (a) y/o en el ensayo (A) tal como se describió anteriormente en el presente documento y/o de estimular el crecimiento de *Streptococcus salivarius* y no estimular el crecimiento de *Streptococcus mutans* y/o *Porphyromonas gingivalis*. Puede someterse a prueba si la forma inactivada, análogo o fragmento del microorganismo mencionado anteriormente perteneciente al grupo de bacterias del ácido láctico está de hecho muerta o inactivada mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante una prueba de viabilidad.

15 El término "forma inactivada" o "análogo" también abarca lisados, fracciones, tales como fracciones de membrana, o extractos de los microorganismos descritos anteriormente, en los que dichos lisados, fracciones o extractos conservan la capacidad de reducción de la concentración de péptidos en el ensayo (a) y/o en el ensayo (A) tal como se describió anteriormente en el presente documento y/o de estimular el crecimiento de *Streptococcus salivarius* y no estimular el crecimiento de *Streptococcus mutans* y/o *Porphyromonas gingivalis*. Estas capacidades pueden someterse a prueba tal como se describe en el presente documento y en particular tal como se describe en los ejemplos adjuntos. En el caso de que un lisado, fracción o extracto del microorganismo, tal como se describió anteriormente en el presente documento, no pueda mostrar la capacidad de reducción de la concentración de péptidos en el ensayo (a) y/o en el ensayo (A) tal como se describió anteriormente en el presente documento y/o de estimular el crecimiento de *Streptococcus salivarius* y no estimular el crecimiento de *Streptococcus mutans* y/o *Porphyromonas gingivalis*, entonces el experto puede, por ejemplo, purificar adicionalmente dicho lisado, fracción o extracto mediante métodos conocidos en la técnica, que se muestran a modo de ejemplo a continuación en el presente documento, para eliminar sustancias que inhiben la reducción. Después de eso, el experto en la técnica puede volver a someter a prueba dicho lisado, fracción o extracto para determinar si puede reducir la concentración de péptidos en el ensayo (a) y/o en el ensayo (A) tal como se describió anteriormente en el presente documento.

20 Según el presente texto el término "lisado" significa una disolución o suspensión en un medio acuoso de células del microorganismo descrito en el presente documento. Sin embargo, no debe interpretarse que el término sea limitativo de ninguna manera. El lisado celular comprende, por ejemplo, macromoléculas, tales como ADN, ARN, proteínas, péptidos, hidratos de carbono, lípidos y similares y/o micromoléculas, tales como aminoácidos, azúcares, ácidos lipídicos y similares, o fracciones de los mismos. Adicionalmente, dicho lisado comprende residuo celular que puede ser de estructura suave o granular. Preferiblemente, dicho lisado comprende la pared celular o la membrana celular o ambas o partes o fragmentos de la pared celular o la membrana celular o ambas. En la técnica se conocen métodos para preparar lisados celulares de microorganismo, por ejemplo, empleando prensa francesa, molino celular usando perlas de vidrio o hierro o lisis celular enzimática y similares. Además, lisar células se refiere a diversos métodos conocidos en la técnica para abrir/destruir células. El método para lisar una célula no es importante y puede emplearse cualquier método que pueda lograr la lisis de las células del microorganismo mencionado anteriormente perteneciente al grupo de bacterias del ácido láctico. El experto en la técnica puede elegir uno apropiado, por ejemplo la apertura/destrucción de células puede realizarse de manera enzimática, química o física. Ejemplos no limitativos para enzimas y cócteles enzimáticos son proteasas, tales como proteinasa K, lipasas o glicosidasas; ejemplos no limitativos para productos químicos son ionóforos, detergentes, tales como dodecilsulfato de sodio, ácidos o bases; y ejemplos no limitativos de medios físicos son los de alta presión, tal como prensado por prensa francesa, osmolaridad, temperatura, tal como calor o frío. Adicionalmente, también puede usarse un método que emplea una combinación apropiada de una enzima distinta de una enzima proteolítica, un ácido, una base y similares. Por ejemplo, las células del microorganismo mencionado anteriormente perteneciente al grupo de bacterias del ácido láctico se lisan mediante congelación y descongelación, más preferiblemente congelación a temperaturas inferiores a -70°C y descongelación a temperaturas de más de 30°C, particularmente se prefiere la congelación a temperaturas inferiores a -75°C y se prefiere la descongelación a temperaturas de más de 35°C y lo más preferido son temperaturas de congelación inferiores a -80°C y temperaturas de descongelación de más de 37°C. También se prefiere que dicha congelación/descongelación se repita al menos 1 vez, más preferiblemente al menos 2 veces, incluso más preferiblemente al menos 3 veces, de manera particularmente

preferida al menos 4 veces y lo más preferido al menos 5 veces.

Por consiguiente, los expertos 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 describen es agua, solución salina fisiológica o una disolución tampón. Una ventaja de un lisado celular bacteriano es que puede producirse fácilmente y almacenarse de manera rentable ya que se necesitan instalaciones menos técnicas.

Preferiblemente, el término "extracto" significa un componente subcelular del microorganismo mencionado anteriormente perteneciente al grupo de bacterias del ácido láctico, por ejemplo, una macromolécula, tal como una proteína, ADN, ARN, un péptido, un hidrato de carbono, un lípido y similares y/o una micromolécula, tal como un aminoácido, un azúcar, un ácido lipídico y similares o cualquier otro compuesto o molécula orgánica, o una combinación de dichas macromoléculas y/o micromoléculas o cualquier fracción de las mismas, en el que dicho extracto conserva la capacidad de reducción de la concentración de péptidos en el ensayo (a) y/o en el ensayo (A) tal como se describió anteriormente en el presente documento y/o estimular el crecimiento de *Streptococcus salivarius* y no estimular el crecimiento de *Streptococcus mutans* y/o *Porphyromonas gingivalis*. Estas propiedades pueden someterse a prueba tal como se describe en el presente documento y en particular tal como se describe en los ejemplos adjuntos. Preferiblemente, dicho extracto comprende la pared celular o la membrana celular o ambas o partes 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 descritos anteriormente en un medio libre de células.

En una realización adicional preferida puede obtenerse un extracto lisando células según diversos métodos conocidos en la técnica para abrir/destruir células, tal como se describió anteriormente en el presente documento y/o como sobrenadante de un procedimiento de centrifugación de un cultivo del microorganismo mencionado anteriormente perteneciente al grupo de bacterias del ácido láctico en cualquier líquido, medio o tampón apropiado conocido por el experto en la técnica o de un lisado de tal cultivo o cualquier otra suspensión celular adecuada. Más preferiblemente, el extracto puede ser un lisado o sobrenadante de cultivo celular purificado o cualquier fracción o subparte de los mismos, en el que dicho lisado o sobrenadante de cultivo celular purificado o cualquier fracción o subparte de los mismos conserva la capacidad de reducción de la concentración de péptidos en el ensayo (a) y/o en el ensayo (A) tal como se describió anteriormente en el presente documento y/o estimular el crecimiento de *Streptococcus salivarius* y no estimular el crecimiento de *Streptococcus mutans* y/o *Porphyromonas gingivalis*. Estas propiedades pueden someterse a prueba tal como se describe en el presente documento y en particular tal como se describe en los ejemplos adjuntos. El experto en la técnica conoce métodos adecuados para el fraccionamiento y la purificación de un lisado, sobrenadante de cultivo o un extracto y comprenden, por ejemplo, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de fase inversa y cromatografía con otro material cromatográfico en métodos en columna o discontinuos, otros métodos de fraccionamiento, por ejemplo, métodos de filtración, por ejemplo, ultrafiltración, diálisis, diálisis y concentración con exclusión molecular en centrifugación, centrifugación en gradientes de densidad o matrices en etapas, precipitación, por ejemplo, precipitaciones de afinidad, solubilidad salina o precipitación salina (precipitación con sulfato de amonio), precipitaciones con alcohol o cualquier otro método adecuado de química de proteínas, biología molecular, bioquímico, inmunológico, químico o físico.

Según el presente texto, los lisados también son preparaciones de fracciones de moléculas a partir de los lisados mencionados anteriormente. Estas fracciones pueden obtenerse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, cromatografía, incluyendo, por ejemplo, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de fase inversa, y cromatografía con otro material cromatográfico en métodos en columna o discontinuos, otros métodos de fraccionamiento, por ejemplo, métodos de filtración, por ejemplo, ultrafiltración, diálisis, diálisis y concentración con exclusión molecular en centrifugación, centrifugación en gradientes de densidad o matrices en etapas, precipitación, por ejemplo, precipitaciones de afinidad, solubilidad salina o precipitación salina (precipitación con sulfato de amonio), precipitaciones con alcohol u otros métodos de química de proteínas, 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 expertos en la técnica pueden elegir un método adecuado y determinar su potencial inmunogénico haciendo referencia a las explicaciones generales anteriores y explicaciones específicas en los ejemplos en el presente documento, y modificando o alterando apropiadamente esos métodos, si es necesario.

Por consiguiente, el término "forma inactivada o análogo" también abarca filtrados del microorganismo descrito en el presente documento, en los que dichos filtrados conservan preferiblemente la capacidad de reducción de la concentración de péptidos en el ensayo (a) y/o en el ensayo (A) tal como se describió anteriormente en el presente documento y/o estimular el crecimiento de *Streptococcus salivarius* y no estimular el crecimiento de *Streptococcus mutans* y/o *Porphyromonas gingivalis*. Estas propiedades pueden someterse a prueba tal como se describe en el presente documento y en particular tal como se describe en los ejemplos adjuntos. En el caso en el que un filtrado del microorganismo mencionado anteriormente perteneciente al grupo de bacterias del ácido láctico, tal como se

describió anteriormente en el presente documento, pueda no tener la capacidad de reducción de la concentración de péptidos en el ensayo (a) y/o en el ensayo (A) tal como se describió anteriormente en el presente documento y/o estimular el crecimiento de *Streptococcus salivarius* y no estimular el crecimiento de *Streptococcus mutans* y/o *Porphyromonas gingivalis*, entonces el experto puede, por ejemplo, purificar adicionalmente dicho filtrado mediante métodos conocidos en la técnica, que se muestran a modo de ejemplo a continuación en el presente documento, para eliminar sustancias que inhiben la reducción y/o la estimulación del crecimiento. Después de eso el experto en la técnica puede volver a someter a prueba dicho filtrado para determinar si puede reducir la concentración de péptidos en el ensayo (a) y/o en el ensayo (A) tal como se describió anteriormente en el presente documento y/o estimular el crecimiento de *Streptococcus salivarius* y no estimular el crecimiento de *Streptococcus mutans* y/o *Porphyromonas gingivalis*.

El término "filtrado" también significa una disolución o suspensión libre de células del microorganismo tal como se describió anteriormente en el presente documento que se ha obtenido como sobrenadante de un procedimiento de centrifugación de un cultivo del microorganismo mencionado anteriormente perteneciente al grupo de bacterias del ácido láctico en cualquier líquido, medio o tampón apropiado conocido por el experto en la técnica. Sin embargo, el término no debe interpretarse como limitativo de ninguna manera. El filtrado comprende, por ejemplo, macromoléculas, tales como ADN, ARN, proteínas, péptidos, hidratos de carbono, lípidos y similares y/o micromoléculas, tales como aminoácidos, azúcares, ácidos lipídicos y similares, o fracciones de las mismas. En la técnica se conocen métodos para preparar filtrados de microorganismos. Además, "filtrado" se refiere a 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 tal como se describió anteriormente en el presente documento. El término filtrado también incluye sobrenadantes de cultivo, por ejemplo obtenidos sedimentando las células mediante centrifugación y recuperando el sobrenadante resultante.

En una realización particularmente preferida el filtrado, lo más preferiblemente el sobrenadante de cultivo, se trata adicionalmente, en particular mediante calor o mediante liofilización tal como se describió anteriormente en el presente documento.

Un "fragmento" del microorganismo descrito en el presente documento abarca cualquier parte de las células del microorganismo mencionado anteriormente perteneciente al grupo de bacterias del ácido láctico. Preferiblemente, dicho fragmento es una fracción de membrana obtenida mediante una preparación de membrana. Pueden obtenerse preparaciones de membrana de microorganismos pertenecientes al género de *Lactobacillus* mediante métodos conocidos en la técnica, 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 completas. Preferiblemente, el derivado o fragmento descrito en el presente documento del microorganismo mencionado anteriormente perteneciente al grupo de bacterias del ácido láctico conserva la capacidad de reducción de la concentración de péptidos en el ensayo (a) y/o en el ensayo (A) tal como se describió anteriormente en el presente documento y/o estimular el crecimiento de *Streptococcus salivarius* y no estimular el crecimiento de *Streptococcus mutans* y/o *Porphyromonas gingivalis*.

El presente texto también da a conocer una composición que comprende el microorganismo mencionado anteriormente descrito en el presente documento, forma inactivada, derivado o mutante o un análogo o fragmento del mismo. La composición es preferiblemente una composición cosmética o una composición farmacéutica, por ejemplo para el tratamiento y/o la prevención del mal olor bucal y/o la halitosis, o una composición de pienso o alimento.

En una realización preferida, dicha composición comprende un microorganismo tal como se describió anteriormente en una cantidad de entre 10^2 y 10^{12} células, preferiblemente de 10^3 a 10^8 células por mg en una forma sólida de la composición. En el caso de una forma líquida de composiciones, la cantidad de los microorganismos es de entre 10^2 y 10^{13} células por ml. Sin embargo, para composiciones específicas la cantidad del microorganismo puede ser diferente a la que describe en el presente documento.

La composición cosmética puede comprender un portador o excipiente cosméticamente aceptable o aceptable por vía bucal. La composición farmacéutica puede comprender un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable o aceptable por vía bucal. La composición de pienso o alimento puede comprender un portador o excipiente aceptable por vía bucal.

El presente texto también da a conocer el uso de un microorganismo descrito en el presente documento, forma inactivada, derivado o mutante o un análogo o fragmento del mismo para la preparación de una composición que comprende el microorganismo mencionado anteriormente, forma inactivada, derivado o mutante o un análogo o fragmento del mismo, en particular una composición cosmética, una composición de pienso o alimento o una composición farmacéutica para la prevención y/o tratamiento del mal olor bucal y/o la halitosis.

Una composición de este tipo puede producirse mediante un método que comprende la etapa de formular un

microorganismo descrito en el presente documento con un portador o excipiente cosméticamente aceptable, aceptable por vía bucal o farmacéuticamente aceptable.

El término "composición", tal como se usa según el presente texto, se refiere a una(s) composición/composiciones, que comprende(n) al menos un microorganismo o mutante o derivado tal como se describió anteriormente o una forma inactivada o análogo o fragmento de dicho microorganismo. Se prevé que las composiciones tal como se usan según el presente texto, que se describen a continuación en el presente documento, comprenden los componentes mencionados anteriormente en cualquier combinación. Opcionalmente, puede comprender al menos un componente adicional adecuado para prevenir y/o el mal olor bucal y/o la halitosis. Por consiguiente, puede comprender opcionalmente cualquier combinación de los componentes adicionales descritos a continuación en el presente documento. El término "componentes adecuados para prevenir y/o el mal olor bucal y/o la halitosis" abarca compuestos o composiciones y/o combinaciones de los mismos que se conoce en la técnica que reducen el mal olor bucal. Ejemplos son sales de metales, tales como cloruro de zinc, o desinfectantes, tales como alcohol o clorhexidina, que se usan para tratar la lengua. Otro ejemplo son compuestos que ayudan a mantener el pH de la saliva a un nivel fisiológicamente normal. Pueden ser sustancias que tienen un efecto de aumento del pH o de tamponamiento del pH (por ejemplo, bicarbonatos, carbamidas, fosfatos, proteínas y/o sales). Se conoce que especies microbianas asociadas con la caries y las infecciones mucosas favorecen un pH ácido; especies microbianas asociadas con el desarrollo de enfermedad periodontal favorecen un pH por encima del normal, mientras que especies microbianas asociadas con una buena salud bucal favorecen un pH neutro. Un ejemplo adicional son bacterias probióticas (por ejemplo *Lactobacillus* y *Streptococcus*) tal como se da a conocer en los documentos US200707137, US2006018843 o WO2007/077210 o bacterias del ácido láctico pertenecientes al género *Weissella*, que inhiben el crecimiento de bacterias productoras de VSC interaccionando con las mismas y generando peróxido de hidrógeno en condiciones aerobias y anaerobias tal como se describe en el documento US2006045870. Finalmente, en este contexto pueden mencionarse cepas de *Streptococcus salivarius* productoras de BLIS (sustancias inhibidoras de tipo bacteriocina) y extractos de las mismas (documento US2006171901).

Se observa que la composición tal como se usa según el presente texto puede comprender opcionalmente uno o más de los componentes opcionales mencionados anteriormente que son adecuados para prevenir y/o el mal olor bucal y/o la halitosis. Por tanto, dicha composición puede contener al menos dos, tres, cuatro, cinco, etc., es decir "n" componentes opcionales, en el que "n" es un número entero mayor que 2 que no está limitado. Dichos componentes opcionales pueden combinarse en cualquier combinación posible.

La composición puede estar en forma sólida, líquida o gaseosa y puede estar, entre otros, en forma de polvo(s), comprimido(s), preparación/preparaciones de película, disolución/disoluciones, aerosol(es), gránulos, pastillas, suspensiones, emulsiones, cápsulas, jarabes, líquidos, elixires, extractos, tintura o extractos de fluido o en una forma que es particularmente adecuada para su administración bucal.

Pueden prepararse preparaciones líquidas adecuadas para su administración bucal, por ejemplo jarabes, usando agua, sacáridos convencionales tales como sacarosa, sorbitol y fructosa, glicoles tales como polietilenglicol y propilenglicol, aceites tales como aceite de semilla de sésamo, aceite de oliva y aceite de soja, antisépticos tales como éster de p-hidroxibenzoato, conservantes tales como derivados de p-hidroxibenzoato, por ejemplo p-hidroxibenzoato de metilo y benzoato de sodio, y otros materiales tales como aromatizantes, por ejemplo aromatizante de fresa o menta.

Además, pueden producirse preparaciones adecuadas para su administración bucal, por ejemplo comprimidos, polvos y gránulos, usando sacáridos convencionales tales como sacarosa, glucosa manitol, y sorbitol, almidón tal como de patata, trigo y maíz, materiales inorgánicos tales como carbonato de calcio, sulfato de calcio, hidrogenocarbonato de sodio y cloruro de sodio, polvos vegetales tales como celulosa cristalina, regaliz en polvo y genciana en polvo, excipientes tales como Pinedex, disgregantes tales como almidón, agar, gelatina en polvo, celulosa cristalina, carmelosa sódica, carmelosa cálcica, carbonato de calcio, hidrogenocarbonato de sodio y alginato de sodio, lubricantes tales como estearato de magnesio, talco, aceites vegetales hidrogenados, macrogol, y aceite de silicona, aglutinantes tales como poli(alcohol vinílico), hidroxipropilcelulosa, metilcelulosa, etilcelulosa, carmelosa, gelatina, y líquido adhesivo de almidón, tensioactivos tales como éster de ácido graso, y plastificantes tales como glicerina. Puede prepararse una preparación/preparaciones de película mediante métodos conocidos en la técnica. Un ejemplo para la preparación de una película se facilita en el ejemplo 19 en el presente documento.

En el caso de la administración bucal habitual, la dosis del microorganismo descrito anteriormente o análogo o fragmento puede ser (en peso seco) tal como se describió anteriormente en el presente documento con respecto al número de células o con respecto a la masa, por ejemplo, de 1 µg a 50 g, de 1 µg a 10 g, de 1 µg a 5 mg, de 1 µg a 1 mg o cualquier otro peso por sujeto por día o en varias veces al día. Además, en el caso de administrar dosis a animales no humanos, la dosis varía dependiendo de la edad y la especie de un animal y de la naturaleza o intensidad del síntoma del mismo. Sin ninguna limitación específica, la dosis para animales es de 0,1 mg a 10 g por 1 kg de peso corporal, preferiblemente de 1 mg a 1 g por 1 kg de peso corporal una vez al día o en varias partes al día. Sin embargo, estas dosis y el número de dosificaciones varían dependiendo de las condiciones individuales.

Preferiblemente, la composición según el presente texto es una composición cosmética que comprende además un portador o excipiente cosméticamente aceptable. Más preferiblemente, dicha composición es un dentífrico, goma para mascar, pastilla para chupar, enjuague bucal, colutorio, hilo dental o cinta dental.

5 La composición cosmética según el presente texto comprende el microorganismo, forma inactivada, mutante, derivado, análogo o fragmento del mismo tal como se describió anteriormente en relación con la composición descrita en el presente documento y además un portador cosméticamente aceptable o aceptable por vía bucal. Preferiblemente, tal como se mencionó en relación con la composición según el presente texto el microorganismo, forma inactivada, mutante, derivado, análogo o fragmento del mismo es un microorganismo, forma inactivada, mutante, derivado, análogo o fragmento tal como se describió anteriormente en el presente documento.
10 Preferiblemente la composición cosmética según el presente texto es para su uso en aplicaciones bucales. Por consiguiente, puede estar en forma de pasta de dientes, dentífrico, polvos dentífricos, gel bucal tópico, colutorio, producto para dentadura postiza, aerosol bucal, pastilla para chupar, comprimido bucal, goma para mascar, hilo dental o cinta dental.

15 El término "portador aceptable por vía bucal o cosméticamente aceptable" tal como se usa en el presente documento significa un vehículo adecuado, que puede usarse para aplicar las presentes composiciones a la cavidad bucal de una manera segura y eficaz. Tal vehículo puede incluir materiales tales como fuentes de ion fluoruro, agentes antisarro adicionales, tampones, otros materiales abrasivos, fuentes de peróxido, sales de bicarbonato de metales alcalinos, materiales espesantes, humectantes, agua, tensioactivos, dióxido de titanio, sistema aromatizante, agentes edulcorantes, xilitol, agentes colorantes, y mezclas de los mismos. El término "cantidad segura y eficaz" tal como se usa en el presente documento, significa una cantidad suficiente para limpiar los dientes y reducir las manchas/placa bacteriana/gingivitis/sarro sin dañar los tejidos y estructuras de la cavidad bucal.
20

El pH de las presentes composiciones descritas en el presente documento oscila preferiblemente entre aproximadamente 3,0 y aproximadamente 9,0, siendo el pH preferido de desde aproximadamente 5,5 hasta aproximadamente 9,0 y siendo el pH más preferido de 7,0 a aproximadamente 8,5 ó 9,0.

25 La composición cosmética es un producto que, en el transcurso habitual de uso, no se traga intencionadamente con fines de administración sistémica de dichos agentes terapéuticos particulares, sino que más bien se conserva en la cavidad bucal durante un tiempo suficiente para entrar en contacto sustancialmente con todas las superficies dentales y/o tejidos bucales con fines de actividad bucal. La composición bucal puede ser una composición bucal de una única fase o puede ser una combinación de dos o más composiciones bucales.

30 El término "dentífrico", tal como se usa en el presente documento, significa formulaciones de pasta, gel o líquidas a menos que se especifique lo contrario. La composición de dentífrico puede estar en cualquier forma deseada, tal como con rayas profundas, con rayas en superficie, de múltiples capas, que tienen el gel rodeando la pasta o cualquier combinación de los mismos. La composición de dentífrico puede estar contenida en un compartimento físicamente separado de un dispensador y una al lado de la otra. Se describen composiciones de dentífrico, por ejemplo, en el documento EP-B1 0 617 608.
35

Se describen composiciones de dentífrico preferidas en los ejemplos 13 a 16. Además de los componentes descritos anteriormente, las composiciones de dentífrico descritas en el presente documento pueden contener una variedad de componentes de dentífrico opcionales, algunos de los cuales se describen a continuación. Los componentes opcionales incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a, adhesivos, agentes espumantes, agentes aromatizantes, agentes edulcorantes, agentes antiplaca bacteriana adicionales, agentes abrasivos adicionales y agentes colorantes. Estos y otros componentes opcionales se describen adicionalmente, por ejemplo, en los documentos US 5.004.597; US 4.885.155; US 3.959.458; y US 3.937.807.
40

Por ejemplo, la pasta de dientes puede incluir tensioactivos, agentes quelantes, fuentes de fluoruro, principios activos de blanqueamiento dental y sustancias modificadoras del color dental, agentes espesantes, humectantes, agentes aromatizantes y edulcorantes, sal de bicarbonato de metal alcalino, diversos portadores y/u otros agentes activos.
45

Uno de los agentes opcionales preferidos tal como se usa según el presente texto es un tensioactivo, preferiblemente uno seleccionado del grupo que consiste en tensioactivos de sarcosinato, tensioactivos de isetionato y tensioactivos de taurato. En el presente documento se prefieren para su uso sales de metales alcalinos o de amonio de estos tensioactivos. Los más preferidos en el presente documento son las sales de sodio y potasio de los siguientes: lauroilsarcosinato, miristoilsarcosinato, palmitoilsarcosinato, estearoilsarcosinato y oleoilsarcosinato.
50

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. Los agentes quelantes pueden complejar calcio encontrado en las paredes celulares de las bacterias. Los agentes quelantes también pueden alterar la placa bacteriana eliminando calcio de los puentes de calcio, lo cual ayuda a mantener esta biomasa
55

intacta.

5 Resulta común tener un compuesto de fluoruro soluble en agua adicional presente en dentífricos y otras composiciones bucales en una cantidad suficiente para dar una concentración de ion fluoruro en la composición a 25°C, y/o cuando se usa a desde aproximadamente el 0,0025% hasta aproximadamente el 5,0% en peso, preferiblemente desde aproximadamente el 0,005% hasta aproximadamente el 2,0% en peso, para proporcionar eficacia anticaries. Puede emplearse una amplia variedad de materiales que producen ion fluoruro como fuentes de fluoruro soluble en las presentes composiciones. Se encuentran ejemplos de materiales que producen ion fluoruro adecuados en los documentos 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. Se prefieren particularmente fluoruro estannoso y fluoruro de sodio, así como mezclas de los mismos.

15 Las composiciones para el cuidado bucal descritas en el presente documento también pueden comprender principios activos de blanqueo dental, incluyendo agentes decolorantes u oxidantes tales como peróxidos, perboratos, percarbonatos, peroxiácidos, persulfatos, cloritos de metales y combinaciones de los mismos. Los 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 de blanqueo adecuados incluyen persulfatos y perboratos de potasio, amonio, sodio y litio mono y tetrahidratados, y pirofosfato de sodio peroxihidratado. Los cloritos de metales 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. Principios activos de blanqueo adicionales pueden ser hipoclorito y dióxido de cloro.

20 Además de agentes decolorantes como agentes de blanqueo dental, las sustancias modificadoras del color dental pueden considerarse entre los principios activos para el cuidado bucal útiles en el presente texto. 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 esa superficie en cuanto a la absorción y/o reflexión de la luz. Tales partículas proporcionan un beneficio de aspecto cuando se aplica una película que contiene tales partículas sobre las superficies de un diente o de dientes.

30 En la preparación de pasta de dientes o geles, es necesario añadir algún material espesante para proporcionar una consistencia deseable de la composición, para proporcionar características de liberación de principios activos deseables tras su uso, para proporcionar estabilidad en almacenamiento y para proporcionar estabilidad de la composición, etc. Agentes espesantes preferidos son polímeros de carboxivinilo, carragenanos, hidroxietilcelulosa, LAPONITE® (fabricado por Rockwood Additives Limited) y sales de éteres de celulosa solubles en agua tales como carboximetilcelulosa sódica y carboximetilhidroxietilcelulosa sódica. También pueden usarse gomas naturales tales como goma karaya, goma xantana, goma arábica y goma tragacanto. Puede usarse silicato de aluminio y magnesio coloidal o sílice finamente dividida como parte del agente espesante para mejorar adicionalmente la textura.

35 Otro componente opcional de los portadores bucales tópicos de las composiciones del presente texto es un humectante. El humectante sirve para evitar que las composiciones de pasta de dientes se endurezcan tras la exposición al aire, para dar a las composiciones una sensación húmeda en la boca y, para humectantes particulares, para conferir dulzura de sabor deseable a las composiciones de pasta de dientes. El humectante, en una base de humectante puro, comprende generalmente desde aproximadamente el 0% hasta aproximadamente el 70%, preferiblemente desde aproximadamente el 5% hasta aproximadamente el 25%, en peso de las composiciones en el presente documento. Los humectantes adecuados para su uso en composiciones del presente texto incluyen alcoholes polihidroxilados comestibles tales como glicerina, sorbitol, xilitol, butilenglicol, polietilenglicol y propilenglicol, especialmente sorbitol y glicerina.

45 También pueden añadirse agentes aromatizantes y edulcorantes a las composiciones. Los agentes aromatizantes adecuados incluyen aceite de gaulteria, aceite de menta, aceite de hierbabuena, aceite de clavo, mentol, anetol, salicilato de metilo, eucaliptol, goma cassia, acetato de 1-mentilo, salvia, eugenol, aceite de perejil, oxanona, alfa-irisona, orégano, limón, naranja, propenilguaetol, canela, vainillina, timol, linalool, glicerol-acetal de cinamaldehído conocido como CGA, y mezclas de los mismos. Los agentes aromatizantes se usan generalmente en las composiciones a niveles de desde aproximadamente el 0,001% hasta aproximadamente el 5%, en peso de la composición.

50 Los agentes edulcorantes que pueden usarse incluyen sacarosa, glucosa, sacarina, dextrosa, levulosa, lactosa tal como se describió anteriormente en el presente documento, manitol, sorbitol, fructosa, maltosa, xilitol, sales de sacarina, taumatina, aspartamo, D-triptófano, dihidrochalconas, sales de ciclamato y acesulfamo, especialmente ciclamato sódico y sacarina sódica, y mezclas de los mismos. Una composición contiene preferiblemente desde aproximadamente el 0,1% hasta aproximadamente el 10% de estos agentes, preferiblemente desde aproximadamente el 0,1% hasta aproximadamente el 1%, en peso de la composición.

La composición descrita en el presente documento también puede incluir una sal de bicarbonato de metal alcalino. 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 hidrogenocarbonato de sodio, es la sal de bicarbonato de metal alcalino preferida. La presente composición puede contener desde aproximadamente el 0,5% hasta aproximadamente el 30%, preferiblemente desde aproximadamente el 0,5% hasta aproximadamente el 15%, y lo más preferiblemente desde aproximadamente el 0,5% hasta aproximadamente el 5% de una sal de bicarbonato de metal alcalino.

El agua empleada en la preparación de composiciones bucales comercialmente adecuadas debe tener preferiblemente un bajo contenido en iones y estar libre de impurezas orgánicas. El agua comprende generalmente desde aproximadamente el 10% hasta aproximadamente el 50%, y preferiblemente desde aproximadamente el 20% hasta aproximadamente el 40%, en peso de las composiciones acuosas de pasta de dientes en el presente documento. Estas cantidades de agua incluyen el agua libre que se añade más la que se introduce con otros materiales, tal como con sorbitol. También puede añadirse dióxido de titanio a la presente composición. El dióxido de titanio es un polvo blanco que añade opacidad a las composiciones. El dióxido de titanio comprende generalmente desde aproximadamente el 0,25% hasta aproximadamente el 5% en peso de las composiciones de dentífrico.

El pH de las composiciones descritas en el presente documento se ajusta preferiblemente mediante el uso de agentes tamponantes. Los agentes tamponantes, tal como se usa en el presente documento, se refieren a agentes que pueden usarse para ajustar el pH de las composiciones hasta un intervalo de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 9,5. Los agentes tamponantes incluyen fosfato de monosodio, fosfato de trisodio, hidróxido de sodio, carbonato de sodio, pirofosfato ácido de sodio, ácido cítrico y citrato de sodio. Pueden administrarse agentes tamponantes a un nivel de desde aproximadamente el 0,5% hasta aproximadamente el 10%, en peso de las presentes composiciones. El pH de composiciones de dentífrico se mide a partir de una suspensión acuosa de dentífrico de 3:1, por ejemplo, 3 partes de agua con respecto a 1 parte de pasta de dientes.

Otros agentes opcionales que pueden usarse en las presentes composiciones incluyen copolíoles de dimeticona seleccionados de copolíoles de alquil y alcoxi-dimeticona, tales como copolíoles de (alquil C12 a C20)-dimeticona y mezclas de los mismos. Se prefiere altamente el copolíol de cetil-dimeticona comercializado con el nombre comercial Abil EM90. El copolíol de dimeticona está presente generalmente en un nivel de desde aproximadamente el 0,01% hasta aproximadamente el 25%, preferiblemente desde aproximadamente el 0,1% hasta aproximadamente el 5%, más preferiblemente desde aproximadamente el 0,5% hasta aproximadamente el 1,5% en peso. Los copolíoles de dimeticona ayudan a proporcionar beneficios de sensación en los dientes positivos. Otros portadores útiles incluyen formulaciones de dentífrico bifásicas tales como las dadas a conocer en los documentos US 5.213.790; US 5.145.666; US 5.281.410; US 4.849.213 y US 4.528.180.

La composición cosmética también puede incluir otros agentes activos, tales como agentes antimicrobianos. Entre tales agentes se incluyen agentes antimicrobianos no catiónicos insolubles en agua tales como difenil éteres halogenados, compuestos fenólicos incluyendo fenol y sus homólogos, mono y poli-alquil-halofenoles y halofenoles aromáticos, resorcinol y sus derivados, compuestos bisfenólicos y salicilanilidas halogenadas, ésteres benzoicos y carbanilidas halogenadas. Los agentes antimicrobianos solubles en agua incluyen sales de amonio cuaternario y sales de bis-biguanida, entre otros. El monofosfato de triclosán es un agente antimicrobiano soluble en agua adicional. Los agentes de amonio cuaternario incluyen aquellos en los que uno o dos de los sustituyentes en el nitrógeno cuaternario tienen una longitud de cadena de carbono (normalmente grupo alquilo) de desde aproximadamente 8 hasta aproximadamente 20, normalmente desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 18 átomos de carbono mientras que los sustituyentes restantes (normalmente grupo alquilo o bencilo) tienen un número inferior de átomos de carbono, tal como desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 7 átomos de carbono, normalmente grupos metilo o etilo. Bromuro de dodeciltrimetilamonio, cloruro de tetradecilpiridinio, bromuro de domifeno, cloruro de N-tetradecil-4-etil-piridinio, bromuro de dodecil-dimetil-(2-fenoxietil)-amonio, cloruro de bencil-dimetilestearil-amonio, cloruro de cetil-piridinio, 5-amino-1,3-bis(2-etil-hexil)-5-metil-hexahidropirimidina cuaternizada, 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 da a conocer en el documento US 4.206.215. También pueden incluirse otros agentes antimicrobianos tales como bisglicinato de cobre, glicinato de cobre, citrato de zinc y lactato de zinc. Las enzimas son otro tipo de principio activo que pueden usarse en las presentes composiciones. Las enzimas útiles incluyen aquellas pertenecientes a la categoría de proteasas, enzimas líticas, inhibidores de la matriz de la placa bacteriana y oxidasas. Las proteasas incluyen papaína, pepsina, tripsina, ficina, bromelina; las enzimas líticas de la pared celular incluyen lisozima; los inhibidores de la matriz de la placa bacteriana incluyen dextranasas, mutanasas; y las oxidasas incluyen glucosa oxidasa, lactato oxidasa, galactosa oxidasa, ácido úrico oxidasa, peroxidasas incluyendo peroxidasa del rábano, mieloperoxidasa, lactoperoxidasa, cloroperoxidasa. Las oxidasas también tienen actividad de blanqueo/limpieza, además de propiedades antimicrobianas. Tales agentes se dan a conocer en el documento US 2.946.725 y en el documento US 4.051.234. Otros agentes antimicrobianos incluyen clorhexidina, triclosán, monofosfato de triclosán, y aceites aromatizantes tales como timol. El triclosán y otros agentes de este tipo se dan a conocer en los documentos US 5.015.466 y US 4.894.220. Estos agentes, que proporcionan beneficios antiplaca bacteriana, pueden estar presentes a niveles de desde aproximadamente el 0,01% hasta aproximadamente el 5,0%, en peso de la composición de dentífrico.

El término "goma para mascar" tal como se define en el presente documento significa una composición de dulce que es adecuada para mascar y que comprende cualquier cantidad adecuada de elastómero, conocido por el experto en la técnica, preferiblemente una cantidad del 2% o más, en peso de la composición. Se dan a conocer componentes de goma para mascar y de pastilla para chupar adecuados, por ejemplo, en los documentos US 4.083.955; US 6.770.264 o US 6.270.781. Pastillas para chupar preferidas son las descritas en los ejemplos 11 y 12. En el ejemplo 17 se describe una composición de goma para mascar preferida.

Las composiciones descritas en el presente documento comprenden preferiblemente un elastómero, o mezcla de varios elastómeros diferentes. En la técnica se conocen generalmente materiales elastoméricos, pero los ejemplos ilustrativos incluyen caucho de estireno-butadieno (SBR); gomas sintéticas; poliisobutileno y copolímeros de isobutileno-isopreno; gomas naturales; chicle; caucho natural; jelutong; balata; gutapercha; leche caspi; sorva; y mezclas de los mismos. Las composiciones descritas en el presente documento comprenden preferiblemente desde aproximadamente el 2% hasta aproximadamente el 30%, más preferiblemente desde aproximadamente el 5% hasta aproximadamente el 25%, en peso, de elastómero. Estos niveles están determinados por la textura final deseada de la goma para mascar ya que cuando el nivel total de elastómero es inferior a aproximadamente el 2%, la composición de base carece de elasticidad, textura para mascar y cohesión mientras que a niveles por encima de aproximadamente el 30% la formulación es dura, gomosa y es difícil de masticar. También están presentes preferiblemente disolventes de elastómeros en composiciones descritas en el presente documento ya que ayudan a ablandar el componente de elastómero. Los ejemplos preferidos de disolventes de elastómeros para su uso en el presente documento incluyen el éster de pentaeritritol de colofonia de madera parcialmente hidrogenada, éster de pentaeritritol de colofonia de madera, éster de glicerol de colofonia parcialmente dimerizada, éster de glicerol de colofonia polimerizada, éster de glicerol de aceite de bogol, colofonia de madera o goma, éster de glicerol de colofonia parcialmente hidrogenada, éster metílico de colofonia parcialmente hidrogenada, y mezclas de los mismos. Las composiciones descritas en el presente documento comprenden preferiblemente desde aproximadamente el 2% hasta aproximadamente el 50%, más preferiblemente desde aproximadamente el 10% hasta aproximadamente el 35%, en peso, de disolvente de elastómero.

Pueden prepararse pastillas para chupar descritas en el presente documento, por ejemplo, mediante técnicas reconocidas en la técnica para formar comprimidos sometidos a compresión en los que el disacárido se dispersa en un portador sólido comprimible, opcionalmente en combinación con adyuvantes de formación de comprimidos apropiados tales como un lubricante (por ejemplo, estearato de magnesio) y se comprime para obtener comprimidos. El componente de portador sólido para tales formulaciones de formación de comprimidos puede ser un sólido soluble en saliva, tal como un monosacárido o un almidón soluble en agua en frío, de modo que la pastilla para chupar se disolverá fácilmente en la boca para liberar el ácido de disacárido contenido en la disolución de saliva para entrar en contacto con, y absorberse por, la mucosa bucal/faríngea cuando se mantiene la pastilla para chupar en la boca. El pH de las formulaciones descritas anteriormente puede oscilar entre aproximadamente 4 y aproximadamente 8,5.

También pueden prepararse pastillas para chupar descritas en el presente documento usando otras técnicas de formulación de dosificaciones unitarias sólidas reconocidas en la técnica.

Un enjuague bucal o colutorio descrito en el presente documento puede ser preferiblemente de la siguiente manera:

A	Aceite de menta	1,2 partes
	Tintura de árnica	3,0 partes
	Tintura de mirra	3,0 partes
	Tween	5,0 partes
B	Alcohol al 90%	50,0 partes
C	Benzoato de sodio	0,2 partes

Agente edulcorante (por ejemplo aspartamo) 0,02 partes
Agua destilada hasta 100

A tiene que mezclarse bien, se añade B con agitación y posteriormente se añade C. El líquido transparente resultante tiene que filtrarse en el plazo de 48 horas tras la preparación. En el ejemplo 18 se describe otro enjuague bucal preferido.

Independientemente de la forma de dosificación, líquida o sólida, en una realización preferida la forma de dosificación se mantiene en la boca del paciente durante un periodo de tiempo para fomentar el contacto del microorganismo o análogo o fragmento de un microorganismo mencionado anteriormente perteneciente al grupo de bacterias del ácido láctico con la cavidad bucal del paciente.

Los términos "hilo dental" y "cinta dental" tal como se usan en el presente documento se refieren a un material para separar y eliminar material alimenticio en descomposición que se acumula en superficies interproximales y subgingivales y para separar y eliminar bacterias, placa bacteriana y/o sarro que se acumulan en la cavidad bucal. El

- hilo dental o la cinta dental también pueden contener, además de los microorganismos tal como se describieron anteriormente en el presente documento, limpiadores, abrasivos, componentes de control del tártaro, blanqueantes, tensioactivos y/o principios activos tales como fluoruros, agentes antimicrobianos, agentes quimioterápicos o antibióticos. Otros agentes adicionales son agentes antiplaca bacteriana, agentes aromatizantes y agentes colorantes. El hilo dental o la cinta dental pueden estar en cualquier forma adecuada conocida por el experto en la técnica, por ejemplo, en forma de hilos dentales de PTFE (Teflon) tal como se describe, por ejemplo, en los documentos 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 forma de dispositivos interproximales monofilamentosos tal como se describen, por ejemplo, en los documentos 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 6.027.592, o en forma de cintas con biocomponentes. Preferiblemente, el hilo dental o la cinta dental pueden estar en forma de un monofilamento recubierto con material elastomérico tal como se describe, por ejemplo, en el documento US 20050226820 o en forma de una cinta dental basada en material termoplástico orientado tal como se describe, por ejemplo, en el documento US 20020144704.
- 15 Las composiciones cosméticas tal como se describieron anteriormente en el presente documento pueden usarse en el campo de la administración bucal a seres humanos así como en el campo de la administración bucal veterinaria, preferiblemente para mamíferos no humanos, más preferiblemente para mascotas. Si la composición cosmética se usa en el campo de la administración bucal veterinaria, la composición puede contener componentes adicionales adecuados para una administración de este tipo, tal como conoce un experto en la técnica.
- 20 El presente texto también da a conocer el uso de un microorganismo según la invención o de una forma inactivada del mismo para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento y/o la profilaxis del mal olor bucal y/o la halitosis. Preferiblemente, la composición farmacéutica comprende además un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 25 Las composiciones farmacéuticas comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz del microorganismo descrito en el presente documento y pueden formularse en diversas formas, por ejemplo en forma sólida, líquida, en polvo, acuosa, liofilizada.
- 30 La composición farmacéutica puede administrarse con un portador farmacéuticamente aceptable a un paciente, tal como se describe en el presente documento. En una realización específica, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos.
- 35 El término "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el agente terapéutico. Un portador de este tipo es farmacéuticamente aceptable, es decir, no es tóxico para un receptor a la dosificación y concentración empleadas. Es preferiblemente isotónico, hipotónico o débilmente hipertónico y tiene una fuerza iónica relativamente baja, tal como se proporciona mediante una disolución de sacarosa. Tales portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de origen del petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. También pueden emplearse soluciones salinas y disoluciones acuosas de dextrosa y glicerol como portadores líquidos, particularmente para disoluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, ion de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. El excipiente puede contener lactosa tal como se describió anteriormente en el presente documento, lo más preferiblemente es sin lactosa. Si se desea, la composición también puede contener cantidades minoritarias de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes de tamponamiento del pH. Estas composiciones pueden adoptar la forma de disoluciones, suspensiones, emulsión, comprimidos, pastillas, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. La formulación bucal puede incluir portadores convencionales tales como calidades farmacéuticas de manitol, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Se describen ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E.W. Martin. También pueden emplearse leche desnatada, leche desnatada en polvo, productos que no contienen leche o que no contienen lactosa. La leche desnatada en polvo se suspende convencionalmente en solución salina tamponada con fosfato (PBS), se somete a autoclave o se filtra para erradicar contaminantes proteicos y vivos, después se seca por congelación, se seca por calor, se seca a vacío o se liofiliza. Algunos otros ejemplos de sustancias que pueden servir como portadores farmacéuticos son azúcares, tales como glucosa y sacarosa; almidones tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados tales como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetatos de celulosa; goma tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; ácidos esteáricos; estearato de magnesio; sulfato de calcio; carbonato de calcio; aceites vegetales, tales como aceites de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de teobroma; polioles tales como propilenglicol, glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; agar; ácidos alginicos; agua libre de pirógenos; solución salina isotónica; extractos de arándano y disolución de tampón fosfato; leche desnatada en polvo; así como otras sustancias compatibles no tóxicas usadas en formulaciones farmacéuticas tales como vitamina C, estrógenos y equinácea, por ejemplo. También pueden estar presentes agentes humectantes y

lubricantes tales como laurilsulfato de sodio, así como agentes colorantes, agentes aromatizantes, lubricantes, excipientes, agentes de formación de comprimidos, estabilizadores, antioxidantes y conservantes.

5 Pueden usarse diversos portadores y/o excipientes adecuados para la administración bucal que se conocen bien en la técnica para el propósito de este texto. Si se desea, la composición puede contener además diversos aditivos conocidos tales como, por ejemplo, conservantes, agentes de endurecimiento, lubricantes, emulsionantes, estabilizadores, esencias y similares. Tales composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos mencionados anteriormente, preferiblemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de portador para proporcionar la forma para su administración apropiada al paciente. La formulación debe adaptarse al modo de administración.

10 Generalmente, los componentes se suministran o bien por separado o bien mezclados entre sí en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente sellado tal como una ampolla o un sobre que indica la cantidad de agente activo. Cuando la composición va a administrarse mediante infusión, puede dispensarse con un frasco para infusión que contiene solución salina o agua de calidad farmacéutica estéril.

15 La composición farmacéutica descrita en el presente documento puede formularse como formas neutras o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas formadas con aniones tales como los derivados de los ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y aquellas formadas con cationes tales como los derivados de los hidróxidos de sodio, de potasio, de amonio, de calcio, férrico, isopropilamina, trietilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína, etc.

20 Opcionalmente pueden emplearse ensayos *in vitro* para ayudar a identificar intervalos de dosificación óptimos. La dosis precisa que va a emplearse en la formulación también dependerá de la vía de administración, y la gravedad de la enfermedad o el trastorno, y debe decidirse según el criterio del médico y las circunstancias de cada paciente. Pueden extrapolarse dosis eficaces a partir de curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de prueba *in vitro* o de modelos animales. Preferiblemente, la composición farmacéutica se administra directamente o en combinación con un adyuvante. Pueden seleccionarse adyuvantes del grupo que consiste en una cloroquina, compuestos polares próticos, tales como propilenglicol, polietilenglicol, 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 añaden en condiciones que respetan las limitaciones de pH. La composición tal como se usa según el presente texto puede administrarse a un vertebrado. Se pretende que "vertebrado" tal como se usa en el presente documento tenga el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto habitual en la técnica. Particularmente, "vertebrado" abarca mamíferos, y más particularmente seres humanos.

35 El término "administrado" significa la administración de una dosis terapéuticamente eficaz de la composición mencionada anteriormente. Por "cantidad terapéuticamente eficaz" quiere decirse una dosis que produce los efectos para los que se administra, preferiblemente este efecto es anticariogénico. La dosis exacta dependerá del propósito del tratamiento, y podrá determinarla un experto en la técnica usando técnicas conocidas. Tal como se conoce en la técnica y se describió anteriormente, pueden ser necesarios ajustes para administración sistémica frente a localizada, edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, momento de administración, interacción farmacológica y la intensidad del estado, y podrán determinarlos con experimentación rutinaria los expertos en la técnica.

40 Los métodos pueden aplicarse tanto a terapia con seres humanos como a aplicaciones veterinarias. Los compuestos descritos en el presente documento que tienen la actividad terapéutica deseada pueden administrarse en un portador fisiológicamente aceptable a un paciente, tal como se describe en el presente documento. Dependiendo de la manera de introducción, los compuestos pueden formularse de una variedad de maneras tal como se comenta a continuación. La concentración de compuesto terapéuticamente activo en la formulación puede variar desde aproximadamente el 0,1-100% en peso. Los agentes pueden administrarse solos o en combinación con otros tratamientos.

50 La administración de la composición farmacéutica puede realizarse de una variedad de maneras tal como se comentó anteriormente, incluyendo, pero sin limitarse a, por vía bucal, subcutánea, intravenosa, intraarterial, intranodular, intramedular, intratecal, intraventricular; intranasal, intrabronquial, transdérmica, intranodular, intrarrectal, intraperitoneal, intramuscular, intrapulmonar, vaginal, rectal o intraocular.

55 Preferiblemente la administración es por vía bucal o vestibular. El médico encargado y los factores clínicos determinarán la pauta posológica. Tal como se conoce bien en las ciencias médicas, las dosificaciones para cualquier paciente individual dependen de muchos factores, incluyendo el tamaño del paciente, el área de superficie corporal, la edad, el compuesto particular que va a administrarse, el sexo, el momento y la vía de administración, la salud general, y otros fármacos que estén administrándose de manera concurrente. Una dosis típica puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 0,001 a 1000 µg; sin embargo, se prevén dosis inferiores o superiores a este intervalo

a modo de ejemplo, teniendo en cuenta especialmente los factores mencionados anteriormente.

Las dosificaciones se administran preferiblemente una vez a la semana, sin embargo, durante la progresión del tratamiento, las dosificaciones pueden administrarse en intervalos de tiempo mucho más largos y si se necesita pueden administrarse en intervalos de tiempo mucho más cortos, por ejemplo, diariamente. En un caso preferido, la respuesta inmunitaria se monitoriza usando métodos descritos en el presente documento y métodos adicionales conocidos por los expertos en la técnica y las dosificaciones se optimizan, por ejemplo, en cuanto al momento, la cantidad y/o la composición. Puede monitorizarse el progreso mediante evaluación periódica. La composición farmacéutica descrita en el presente documento puede administrarse de manera local o sistémica. También se prevé que las composiciones farmacéuticas se empleen en enfoques de terapia conjunta, es decir en administración conjunta con otros medicamentos o fármacos, por ejemplo otros fármacos para prevenir, tratar o mejorar la caries, que se describen en el presente documento.

El presente texto también da a conocer el uso de un microorganismo descrito en el presente documento para la preparación de una composición para el tratamiento y/o la profilaxis del mal olor bucal y/o la halitosis, en el que la composición es un producto alimenticio o producto de pienso y a un producto alimenticio o producto de pienso que comprende un microorganismo descrito en el presente documento, forma inactivada del mismo, mutante, derivado, análogo o fragmento. Preferiblemente una composición en forma de un producto alimenticio o producto de pienso es una composición de pienso o alimento que comprende un microorganismo, forma inactivada, mutante, derivado, análogo o fragmento del mismo tal como se describió anteriormente en el presente documento que comprende además un portador o excipiente aceptable por vía bucal.

“Alimento” o “pienso” comprende cualquier producto comestible, sabroso y/o bebible para mamíferos, por ejemplo, seres humanos o animales, por ejemplo, mascotas tal como se describe en el presente documento. El producto alimenticio y de pienso se describe en otra parte en el presente documento. Un “portador aceptable por vía bucal” se describió anteriormente en el presente documento y preferiblemente no es tóxico y es de calidad alimentaria y/o para pienso. Sin embargo, este término también abarca los portadores mencionados en relación con la composición farmacéutica tal como se usa según el presente texto.

Según el presente texto, el término “producto alimenticio” abarca todos los alimentos y bebidas comestibles y bebibles. Por consiguiente, el microorganismo, forma inactivada, derivado, análogo o fragmento del mismo puede incluirse en un alimento o una bebida. Son, por ejemplo, goma, pulverización, bebida, caramelos, leche infantil, helado, postre congelado, aderezo dulce para ensaladas, preparados lácteos, queso, cuajada, yogur sin lactosa, leche acidificada, crema para el café o nata montada y similares.

Se consideran productos a base de leche dentro del contexto del presente texto. Sin embargo, se entiende que la leche significa la de origen animal, tal como de vaca, cabra, oveja, búfala, cebrá, yegua, burra o camella, y similares. La leche puede estar en estado nativo, ser una leche reconstituida, una leche desnatada o una leche suplementada con compuestos necesarios para el crecimiento de las bacterias o para el posterior procesamiento de leche fermentada, tal como grasa, proteínas de un extracto de levaduras, peptona y/o un tensioactivo, por ejemplo. El término leche también se aplica a lo que se denomina comúnmente leche vegetal, es decir extractos de material vegetal que se han tratado o de otro modo, tal como plantas leguminosas (soja, garbanzos, lentejas y similares) o semillas oleaginosas (colza, soja, sésamo, algodón y similares), extracto que contiene proteínas en disolución o en suspensión coloidal, que pueden coagularse mediante acción química, mediante fermentación ácida y/o mediante calor. Finalmente, la palabra leche también indica mezclas de leches animales y de leches vegetales.

Cuando el microorganismo descrito en el presente documento, forma inactivada, o derivado o análogo o fragmento del mismo se añade a yogur y similares que tienen contenidos similares, generalmente es suficiente añadir el microorganismo descrito en el presente documento a una concentración de aproximadamente 10^5 - 10^7 células/ml.

Tal alimento, bebida o pienso puede producirse mediante un método general para producir alimentos y bebidas o piensos, incluyendo añadir el principio activo a un material crudo o cocinado del alimento, la bebida o el pienso. El alimento, la bebida o el pienso según el presente texto puede moldearse y granularse de la misma manera que la usada generalmente para alimentos, bebidas o piensos. El método de moldeo o granulación incluye métodos de granulación tales como granulación en capa fluida, granulación por agitación, granulación por extrusión, granulación por compactación con rodillos, granulación por corriente de gas, granulación de moldeo por compactación, granulación por trituración, granulación por pulverización y granulación por inyección, métodos de recubrimiento tales como recubrimiento en paila, recubrimiento en capa fluida y recubrimiento en seco, inflado-deshidratación, método con vapor en exceso, método por capa de espuma, métodos de expansión tales como método de incubación en microondas, y métodos de extrusión con máquinas de granulación por extrusión y prensas extrusoras.

El alimento, la bebida o el pienso descrito en el presente documento incluye cualquier alimento, bebida o pienso que comprende el microorganismo descrito en el presente documento, forma inactivada, derivado o análogo o fragmento del mismo como principio activo. El principio activo en el alimento, la bebida o el pienso no está específicamente limitado a ninguna concentración siempre que el alimento, la bebida o el pienso resultante pueda ejercer su actividad

de reducción del mal olor bucal. La concentración del principio activo es preferiblemente del 0,001 al 100% en peso, más preferiblemente del 0,01 al 100% en peso y lo más preferiblemente del 0,1 al 100% en peso del alimento, la bebida o el pienso que comprende tal principio activo o con respecto al número de células de los descritos en el presente documento.

5 Las bebidas o los alimentos específicos, a los que se añade el principio activo, incluyen, por ejemplo, zumos, bebidas refrescantes, sopas, tés, bebidas de leche agria, productos lácteos tales como leches fermentadas, helados, mantequilla, queso, leche procesada y leche desnatada, productos cárnicos tales como jamón, salchichas y hamburguesas, productos de pastel de carne de pescado, ovoproductos tales rollitos de primavera aderezados y crema de huevo, dulces tales como galletas, gelatina, aperitivos y goma para mascar, panes, fideos, encurtidos, productos ahumados, pescados secos y aderezos. La forma de la bebida o el alimento incluye, por ejemplo, alimentos en polvo, alimentos a modo de láminas, alimentos embotellados, alimentos enlatados, alimentos en envases flexibles esterilizables, alimentos en cápsulas, alimentos en comprimidos y alimentos fluidos.

15 La bebida o el alimento descrito en el presente documento que va a ingerirse por lactantes son preferiblemente composiciones nutritivas para lactantes. Tal composición nutritiva para lactantes incluye leche modificada preparada para lactantes, leche con proteínas descompuestas, leche nutricionalmente modificada específica o alimentos para bebés y alimentos preparados para niños pequeños. La forma de la composición nutritiva para lactantes incluye, pero no se limita específicamente a, leches en polvo y pulverizadas y alimentos para bebés y también incluyen alimentos generales tales como helado, leche fermentada y gelatina para ingestión infantil.

20 La composición nutritiva para lactantes según el presente texto está compuesta principalmente por proteínas, lípidos, sacáridos, vitaminas y/o minerales. En la composición nutritiva, el principio activo se combina con estos componentes.

25 La proteína incluye proteínas de la leche tales como leche desnatada, 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. Además, puede usarse proteína de huevo tal como proteína de yema de huevo, proteína de clara de huevo y ovoalbúmina, o proteína de soja tal como proteína de soja desgrasada, proteína de soja separada y proteína de soja concentrada. Aparte de éstas, también pueden usarse satisfactoriamente proteínas tales como gluten de trigo, proteína de carne de pescado, proteína de carne de ganado vacuno y colágeno. Además, también pueden usarse satisfactoriamente fracciones de estas proteínas, péptidos del tratamiento con ácidos o enzimas de las mismas o libres de ácidos. Los aminoácidos libres pueden servir como fuentes de nitrógeno y pueden usarse adicionalmente para proporcionar acciones fisiológicas específicas. Tales aminoácidos libres incluyen, por ejemplo, taurina, arginina, cisteína, cistina y glutamina. El lípido incluye grasas y aceites animales tales como grasa láctea, manteca, grasa de vaca 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 palmiste, aceite de cártamo, aceite de perilla, aceite de linaza, aceite de onagra, triglicérido de ácido graso de cadena media y aceite de semilla de algodón, grasas y aceites generados por bacterias, y aceites fraccionados de los mismos, aceites hidrogenados de los mismos, y aceites sometidos a intercambio de éster de los mismos. La cantidad de lípido que va a combinarse varía dependiendo del uso.

40 El sacárido incluye, por ejemplo, uno o más de almidón, polisacáridos solubles, dextrina, monosacáridos tales como sacarosa, lactosa tal como se describe en el presente documento, maltosa, glucosa y fructosa y otros oligosacáridos. La cantidad total de tal sacárido es preferiblemente del 40 al 80% en peso con respecto al sólido total en la composición nutritiva. Además, pueden usarse satisfactoriamente edulcorantes artificiales tales como aspartamo. La cantidad de un edulcorante artificial es apropiadamente del 0,05 al 1,0% en peso por el sólido total en la composición nutritiva.

45 Las vitaminas incluyen, pero no se limitan a, licopeno como componente esencial e incluyen adicionalmente, por ejemplo, vitaminas tales como vitamina A, grupo de la vitamina B, vitaminas C, D y E y grupo de la vitamina K, ácido fólico, ácido pantoténico, nicotinamida, carnitina, colina, inositol y biotina siempre que tales vitaminas puedan administrarse a lactantes. Tales vitaminas están preferiblemente a desde 10 mg hasta 5 g en peso por el sólido total en la composición nutritiva para lactantes.

50 Además, los minerales incluyen calcio, magnesio, potasio, sodio, hierro, cobre, zinc, fósforo, cloro, manganeso, selenio y yodo. Tales minerales están preferiblemente a desde 1 mg hasta 5 g en peso por el sólido total en la composición nutritiva para lactantes.

Aparte de estos componentes descritos anteriormente, la composición nutritiva para lactantes según el presente texto puede combinarse con cualquier componente combinado de manera deseable en composiciones nutritivas, por ejemplo, fibra dietética, nucleótidos, ácidos nucleicos, aromatizantes y colorantes.

55 La bebida o el alimento descrito en el presente documento puede usarse como bebida o alimento saludable o bebida

o alimento funcional para prevenir y/o tratar el mal olor bucal.

5 Cuando se ingiere la bebida o el alimento descrito en el presente documento, la cantidad que va a ingerirse no está específicamente limitada. La cantidad que va a ingerirse es generalmente de 0,1 a 50 g, preferiblemente de 0,5 g a 20 g al día, basándose en la cantidad total de principio activo. La bebida o el alimento se ingiere de manera continua a esta cantidad durante un periodo de desde un único día hasta 5 años, preferiblemente desde 2 semanas hasta un año. En el presente documento, la cantidad ingerida puede ajustarse a un intervalo apropiado dependiendo de la intensidad del síntoma del individuo que ingiere la bebida o el alimento, la edad y el peso corporal del mismo, y similares.

10 El pienso descrito en el presente documento puede ser cualquier pienso que comprende el principio activo. El pienso incluye, por ejemplo, piensos para mascotas para perros, gatos y ratas, piensos para ganado para vacas y cerdos, piensos para pollos para pollos y pavos, y piensos para piscicultura para espáridos y peces de cola amarilla.

15 El pienso puede producirse combinando apropiadamente el principio activo tal como se describió anteriormente en el presente documento en un material de pienso crudo incluyendo, por ejemplo, cereales, salvados, harinas de semillas oleaginosas, materiales de pienso crudos derivados de animales, otros materiales de pienso crudos y productos purificados.

Los cereales incluyen, por ejemplo, sorgo, trigo, cebada, avenas, centeno, arroz integral, trigo sarraceno, mijo cola de zorro, mijo chino, hierba del Decán, maíz y soja.

Los salvados incluyen, por ejemplo, salvado de arroz, salvado de arroz desgrasado, salvado, harina de la menor calidad, germen de trigo, salvado de cebada, impurezas granulares, salvado de maíz y germen de maíz.

20 Las harinas de semillas oleaginosas incluyen, por ejemplo, harina de soja, soja en polvo, harina de linaza, harina de semilla de algodón, harina de cacahuete, harina de cártamo, harina de coco, harina de palma, harina de sésamo, harina de girasol, harina de colza, harina de kapok y harina de mostaza.

25 Los materiales de pienso crudos derivados de animales incluyen, por ejemplo, pescados en polvo, harina importada, harina integral y harina de la costa, producto soluble de pescado, carne en polvo, carne y hueso en polvo, sangre en polvo, pelo descompuesto, hueso en polvo, subproductos de matanza, harina de plumas, pupa de gusano de seda, leche desnatada, caseína, suero de leche deshidratado y kril.

30 Otros materiales de pienso crudos incluyen, por ejemplo, tallos y hojas de plantas tales como alfalfa, cubo de heno, harina de hojas de alfalfa y hoja de algarrobo en polvo, subproductos de industrias de procesamiento del maíz, tales como harina de gluten de maíz, pienso de gluten de maíz y licor de maceración del maíz, almidón, azúcar, levadura, subproductos de la industria de la fermentación tales como residuos de cerveza, raíz de malta, residuo de licor y residuo de salsa de soja, y subproductos agrícolas tales como residuo procesado de cítricos, residuo de cuajada de soja, residuo de café y residuo de cacao, mandioca, haba caballar, harina de guar, alga, 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.

35 En caso de proporcionar a animales el pienso descrito en el presente documento, la cantidad del pienso que va a ingerirse no está específicamente limitada pero es preferiblemente, por ejemplo, de 0,1 mg a 50 g por 1 kg de peso corporal al día, preferiblemente de 0,5 mg a 20 g por 1 kg de peso corporal al día, basándose en la cantidad del principio activo. El pienso se ingiere de manera continua a esta cantidad durante un periodo de desde un único día hasta 5 años, preferiblemente desde 2 semanas hasta un año. De nuevo, la cantidad ingerida puede ajustarse a un intervalo apropiado dependiendo de la especie, edad y peso corporal del animal que ingiere el pienso, y similares.

40 El presente texto también se refiere a un aditivo para alimentos, bebidas o piensos que comprende un microorganismo descrito en el presente documento, una forma inactiva del mismo, mutante, derivado, análogo o fragmento así como al uso de un microorganismo descrito en el presente documento, una forma inactiva del mismo, mutante, derivado, análogo o fragmento, para la preparación de una composición para el tratamiento y/o la profilaxis del mal olor bucal y/o la halitosis, en el que la composición es un aditivo para alimentos, bebidas o piensos. Preferiblemente, el aditivo para alimentos o bebidas incluye el aditivo para composiciones nutritivas para lactantes.

50 El aditivo para alimentos puede producirse mediante un método general para producir aditivos para alimentos, bebidas o piensos. Si es necesario, pueden añadirse satisfactoriamente aditivos para uso general en alimentos, bebidas o piensos, por ejemplo, aditivos descritos en Food Additive Handbook (The Japan Food Additives Association; publicado el 6 de enero de 1997), incluyendo edulcorantes, colorantes, conservantes, espesantes y estabilizadores, antioxidantes, agentes de fijación del color, decolorantes, antisépticos, base de goma, agentes de amargor, enzimas, agentes abrillantadores, acidificante, aderezos, emulsionantes, potenciadores, agentes para

fabricación, aromatizantes y extractos de especias. Además, pueden añadirse satisfactoriamente sacáridos, almidón, materiales inorgánicos, polvos de plantas, excipientes, disgregantes, lubricantes, aglutinantes, tensioactivos y plastificantes convencionales mencionados anteriormente para comprimidos farmacéuticos.

Los aditivos incluyen los siguientes aditivos.

- 5 Los edulcorantes incluyen aspartamo, regaliz, estevia, xilosa y rakanka (fruto de *Momordica grosvenori*). Los colorantes incluyen carotenoides y oleorresina de cúrcuma, flavonoides, color de caramelo, color de espirulina, clorofila, color de batata morada, color de boniato morado, color de perilla y color de arándano azul.

- 10 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 arábica y goma xantana, alginatos, quitina, quitosano, extracto de aloe, goma guar, hidroxipropilcelulosa, caseína sódica, almidón de maíz, carboximetilcelulosa, gelatina, agar, dextrina, metilcelulosa, poli(alcohol vinílico), microfibras de celulosa, celulosa microcristalina, celulosa de alga, poli(acrilato de sodio), polifosfato de sodio, carragenanos o pared celular de levadura.

- 15 Los antioxidantes incluyen, por ejemplo, grupo de la vitamina C, etilendiaminatetraacetato de sodio, etilendiaminatetraacetato de calcio, ácido eritórbico, orizanol, catequina, quercetina, extracto de clavo, rutina tratada con enzimas, extracto de manzana, extracto de semillas de sésamo, dibutilhidroxitolueno, extracto de hinojo, extracto de rábano, extracto de apio de agua, extracto de té, tocoferoles, extracto de colza, extracto de granos de café, extracto de semillas de girasol, ácido ferúlico, butilhidroxianisol, extracto de hojas de arándano azul, extracto de propóleos, extracto de pimiento, extracto de balsamina, ácido gálico, extracto de eucalipto y extracto de romero.

- 20 Los agentes de fijación del color incluyen, por ejemplo, nitrito de sodio. Los decolorantes incluyen, por ejemplo, sulfito de sodio.

- 25 Los antisépticos incluyen, por ejemplo, o-fenil-fenol. La base de goma incluye, por ejemplo, acetil-ricinoleato de metilo, cera de urushi, goma-éster, resina de elemí, cera de uricuri, goma de kauri, cera de carnauba, éster de ácidos grasos de glicerina, cera de espermaceti, bálsamo de copaiba, resina de copal, caucho, cera de salvado de arroz, cera de caña, goma laca, jelutong, éster de ácidos grasos de sacarosa, caucho natural despolimerizado, cera de parafina, bálsamo de abeto, éster de ácidos grasos de propilenglicol, pulpa en polvo, cáscaras de arroz en polvo, aceite de jojoba, poliisobutileno, polibuteno, cera microcristalina, almáciga, cera de abejas y fosfato de calcio.

- 30 Los agentes de amargor incluyen, por ejemplo, ácido iso-alfa-lupulínico, cafeína, extracto de kawaratake (*Coriolus versicolor*), extracto de quina de corteza roja, extracto de corteza de *Phellodendron*, extracto de raíz de genciana, extractos de especias, naringina modificada enzimáticamente, extracto de cassia de Jamaica, teobromina, naringina, extracto de cassia, extracto de absenta, extracto de *Isodonis*, té de olivo, extracto de naranja amarga (*Citrus aurantium*), extracto de lúpulo y extracto de ajeno.

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

- 35 Los agentes abrillantadores incluyen, por ejemplo, cera de urushi y cera de Japón. El acidificante incluye, 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 prolina, ácidos nucleicos tales como inosinato de sodio, uridinato de sodio, guanilato de sodio, citidilato de sodio, ribonucleótido cálcico y ribonucleótido sódico, ácidos orgánicos tales como
- 40 ácido cítrico y ácido succínico, cloruro de potasio, salmuera con cloruro de sodio reducido, cloruro de potasio en bruto, sal de suero de leche, fosfato de tripotasio, hidrogenofosfato de dipotasio, dihidrogenofosfato de potasio, hidrogenofosfato de disodio, dihidrogenofosfato de sodio, fosfato de trisodio y extracto de clorela.

- 45 Los potenciadores incluyen, por ejemplo, sales de zinc, grupo de la vitamina C, diversos aminoácidos, ácido 5-adenílico, cloruro de hierro, hesperidina, diversos calcio calcinados, diversos calcio no calcinados, dibenzoiltiamina, hidróxido de calcio, carbonato de calcio, sal de clorhidrato de tiamina, caroteno de *Dunaliella*, tocoferol, ácido nicotínico, caroteno de zanahoria, caroteno de aceite de palma, pantotenato de calcio, vitamina A, hidroxiprolina, dihidrogenopirofosfato de calcio, pirofosfato ferroso, pirofosfato férrico, ferritina, hierro de hemo, menaquinona, ácido fólico y riboflavina.

- 50 Los agentes para fabricación incluyen, por ejemplo, agentes auxiliares de procesamiento tales como acetona y resina de intercambio iónico. Los aromatizantes incluyen, por ejemplo, esencia de vainilla y los extractos de especias incluyen, por ejemplo, extracto de *Capsicum*.

Estos diversos aditivos pueden añadirse al principio activo, teniendo en cuenta el modo de administración, según el

presente texto.

La composición descrita en el presente documento abarca un microorganismo descrito en el presente documento. Se prevé que las composiciones comprenden el microorganismo en forma de un microorganismo probiótico. Concretamente, además del efecto probiótico, el microorganismo probiótico mencionado anteriormente perteneciente al grupo de bacterias del ácido láctico es útil para tratar y/o prevenir el mal olor bucal y/o la halitosis. La cantidad de dicho microorganismo probiótico es lo suficientemente alta como para modificar significativamente de manera positiva el estado que va a tratarse, preferiblemente el mal olor bucal, pero lo suficientemente baja como para evitar efectos secundarios graves (a una razón riesgo/beneficio razonable), dentro del alcance del criterio médico sensato. Una cantidad eficaz de dicho microorganismo probiótico variará con el objetivo particular que debe lograrse, la edad y el estado físico del paciente que está tratándose, la gravedad de la enfermedad subyacente, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia concurrente y el microorganismo específico empleado. Por tanto, la cantidad eficaz de dicho microorganismo probiótico será la cantidad mínima que proporcione el efecto deseado. La presencia, por ejemplo, de 1×10^9 bacterias, como células completas viables o no viables, en 0,05 ml de solución salina tamponada con fosfato, o en 0,05 ml de suspensión de agar, o el equivalente en peso seco de fragmentos de pared celular, es eficaz cuando se administra en cantidades de desde aproximadamente 0,05 ml hasta aproximadamente 20 ml.

Una ventaja práctica decisiva es que el organismo probiótico puede administrarse de una manera conveniente tal como por vía bucal. Dependiendo de la vía de administración, puede requerirse que los principios activos que comprenden dichos organismos probióticos se recubran en un material para proteger a dichos organismos frente a la acción de enzimas, ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar a dichos organismos. Con el fin de administrar organismos probióticos mediante una administración distinta de la parenteral, deben recubrirse por, o administrarse con, un material para impedir la inactivación. Por ejemplo, los organismos probióticos pueden administrarse conjuntamente con inhibidores enzimáticos o en liposomas. Los inhibidores enzimáticos incluyen inhibidor de tripsina pancreática, fluorofosfato de diisopropilo (DFP) y trasilol. Los liposomas incluyen emulsiones de P40 de agua en aceite en agua así como liposomas convencionales y diseñados específicamente que transportan lactobacilos o sus subproductos a la superficie genitourinaria. También pueden prepararse dispersiones, por ejemplo, en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos, y en aceites. Generalmente, se preparan dispersiones incorporando los diversos organismos probióticos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los demás componentes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son secado a vacío y la técnica de secado por congelación que proporcionan un polvo del principio activo más cualquier componente deseado adicional a partir de una disolución anteriormente esterilizada por filtración de los mismos. Los métodos de preparación preferidos adicionales incluyen, pero no se limitan a, liofilización y secado por calor.

La composición también abarca productos previstos para administrarse por vía bucal, o vestibular, que comprenden un portador farmacéutico aceptable tal como se describe en el presente documento al cual, o sobre el cual, se añaden células del microorganismo mencionado anteriormente perteneciente al grupo de bacterias del ácido láctico en forma fresca, concentrada o secada, por ejemplo. Evidentemente, también puede añadirse una forma inactivada, un derivado o análogo o fragmento de dicho microorganismo o cualquier combinación de dicho microorganismo, derivado y/o análogo y/o fragmento del mismo que se dan a conocer en el presente documento. Estos productos pueden proporcionarse en forma de una suspensión que puede ingerirse, un gel, un difusor, una cápsula, una cápsula de gelatina dura, un jarabe o en cualquier otra forma galénica conocida por los expertos en la técnica.

Cuando los organismos probióticos se protegen de manera adecuada tal como se describió anteriormente, el compuesto activo puede administrarse por vía bucal, por ejemplo, con un diluyente inerte o con un portador comestible asimilable, o puede encerrarse en una cápsula de gelatina de cubierta dura o blanda, o puede comprimirse para formar comprimidos diseñados para atravesar el estómago (es decir, con recubrimiento entérico), o pueden incorporarse directamente con el alimento de la dieta. Para la administración terapéutica por vía bucal, a los organismos probióticos pueden incorporárseles excipientes y usarse en forma de comprimidos que pueden ingerirse, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Las composiciones o preparaciones descritas en el presente documento se preparan de modo que una forma de dosificación bucal unitaria contiene, por ejemplo, aproximadamente 1×10^9 microorganismos viables o no viables, por ejemplo lactobacilos, por ml. El organismo probiótico se combina para una administración conveniente y eficaz en cantidades eficaces con un portador farmacéuticamente adecuado o aceptable para alimentos en una forma de dosificación unitaria tal como se dio a conocer anteriormente en el presente documento. Una forma de dosificación unitaria puede contener, por ejemplo, el compuesto activo principal en una cantidad de aproximadamente 10^9 microorganismos viables o no viables, por ejemplo lactobacilos, por ml. En el caso de composiciones que contienen componentes complementarios tales como componentes prebióticos, las dosificaciones se determinan mediante referencia a la dosis habitual y la manera de administración de dichos componentes.

El presente texto también se refiere a un método de profilaxis y/o tratamiento del mal olor bucal y/o la halitosis. Preferiblemente, el método de profilaxis y/o tratamiento comprende administrar a un sujeto un microorganismo descrito en el presente documento o una forma inactivada, o un mutante, derivado, análogo o fragmento de dicho

microorganismo tal como se describió anteriormente en el presente documento.

5 Preferiblemente, el sujeto que va a tratarse es un animal. Más preferiblemente, el animal es un mamífero, incluso más preferiblemente el mamífero es un mamífero como 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 burro, una oveja o una cabra. En otra realización preferida, el mamífero es un ser humano.

10 La administración de un microorganismo descrito en el presente documento en el contexto del método de tratamiento y/o profilaxis descrito en el presente documento puede llevarse a cabo en cualquier forma adecuada conocida por el experto en la técnica. Preferiblemente, la administración abarca el uso y la aplicación de composiciones tal como se describieron anteriormente en el presente documento, que pueden contener opcionalmente, por ejemplo, portadores o excipientes farmacéuticos o cosméticos tal como se describieron anteriormente en el presente documento. La dosificación y la evolución temporal de la administración pueden establecerse según cualquier información adecuada conocida por el experto en la técnica. Preferiblemente, dicha dosificación y evolución temporal pueden establecerse tal como se describió anteriormente en el presente documento.

15 El objeto del presente texto se ilustra mediante las figuras 1 a 7 tal como se describe a continuación:

La figura 1 muestra los resultados de un experimento que analiza la influencia de la reducción en la concentración de péptidos por lactobacilos sobre la producción de H₂S por bacterias anaerobias gram-negativas presentes en la saliva.

20 La figura 2 muestra los resultados de un experimento que analiza la influencia de sobrenadantes de lactobacilos sobre el crecimiento de *S. salivarius* tal como se describe en el ejemplo 3.

La figura 3 muestra los resultados de un experimento que analiza la influencia de lactobacilos sobre el crecimiento de *P. gingivalis* tal como se describe en el ejemplo 5.

La figura 4 muestra los resultados de un experimento que analiza la influencia de sobrenadante de lactobacilos sometidos a tratamiento térmico sobre el crecimiento de *S. salivarius* tal como se describe en el ejemplo 6.

25 La figura 5 muestra los resultados de un experimento que analiza la reducción de la concentración de péptidos por lactobacilo descrito en el presente documento.

La figura 6 muestra los resultados de un experimento que analiza la reducción de la concentración de péptidos por lactobacilos liofilizados descritos en el presente documento.

La figura 7 muestra un perfil de aminoácidos típico de extracto de PTU.

30 Se obtendrá una mejor comprensión del presente objeto del presente texto y de sus muchas ventajas a partir de los siguientes ejemplos, presentados únicamente con fines ilustrativos, y que no se pretende que limiten el alcance de la presente invención de ninguna manera.

Ejemplo 1

Medios

35 Medio TSY:
 Mezcla de TSY (Difco, EE.UU.) 30 g/l
 Extracto de levadura (Deutsche Hefewerke, Alemania) 3 g/l

Medio ligero MRS:
 Peptona tripticasa: 1,0 g/l
 Extracto de levadura: 0,5 g/l
 Hidrogenocitrato de diamonio: 0,2 g/l
 Acetato de sodio: 0,5 g/l
 MgSO₄ heptahidratado: 0,050 g/l
 MnSO₄ monohidratado: 0,025 g/l
 D-Glucosa monohidratada: 1 g/l
 K₂HPO₄: 0,2 g/l
 Ácido oleico: 0,1% (p/v)

Medio sintético:

<u>Medio sintético:</u>	
Guanina:	0,1 g/l
Citosina:	0,1 g/l
Timidina:	0,1 g/l
2'-Desoxiadenosina:	0,1 g/l
2'-Desoxiuridina:	0,1 g/l
K ₂ HPO ₄ :	2 g/l
Acetato de sodio:	5 g/l
MgSO ₄ heptahidratado:	0,1 g/l
Hidrogenocitrato de diamonio:	2 g/l
CaCl ₂ dihidratado:	0,5 g/l
Ácido oleico:	0,1% (p/v)
Cianocobalamina:	0,02 mg/l
Riboflavina:	10 mg/l
Ácido fólico:	0,2 mg/l
5-Fosfato de piridoxal monohidratado:	10 mg/l
Ácido 4-aminobenzoico:	0,2 mg/l
D-(+)-Biotina:	1 mg/l
Ácido ascórbico:	500 mg/l
Ácido nicotínico:	10 mg/l
Pantotenato de Ca:	10 mg/l
Tiamina:	1 mg/l
Nitrato de cobalto (II) hexahidratado:	500 mg/l
MnSO ₄ monohidratado:	20 mg/l
MgSO ₄ heptahidratado:	500 mg/l
Na ₂ MoO ₄ :	0,04 mg/l
Extracto de PTU (Ohly, Deutsche Hefewerke Alemania):	15 g/l (o según se menciona en otra parte)
D-Glucosa monohidratada:	10 g/l

<u>Medio FAB:</u>	
Mezcla de peptona	15,0 g/l
Extracto de levadura	10,0 g/l
Tioglicolato de sodio	0,5 g/l
Cloruro de sodio	2,5 g/l
Agar n.º 1	0,75 g/l
L-cisteína HCl	0,5 g/l
Resazurina	0,001 g/l
Bicarbonato de sodio	0,4 g/l
Hemina	0,005 g/l
Vitamina K	0,0005 g/l

Almacenamiento y crecimiento

5 El almacenamiento y crecimiento de cepas puede producirse según procedimientos habituales. Por ejemplo, pueden almacenarse cepas como disoluciones madre congeladas a -80°C. Puede hacerse crecer 1 ml de un cultivo hasta la fase estacionaria (DO₆₀₀/ml de 4 - 8) en medio MRS y mezclarse con 500 µl de una disolución de glicerina al 50% estéril y congelarse.

Se hicieron crecer cultivos de *S. salivarius* en medios TSY hasta la fase estacionaria (DO₆₀₀/ml de 1-2) y se trataron tal como se mencionó anteriormente. La cepa de *S. salivarius* usada preferiblemente en los experimentos fue *S. salivarius* DSM 20560 (Andrews y Horder, 1906).

10 Se realizó el cultivo de *S. salivarius* (DSM 20560) así como los aislados de manera anaerobia en placas de 6 pocillos con 8 ml de medio TSY durante la noche a 37°C.

Se cultivaron lactobacilos (DSM 19825, 19826, 19827) de manera anaerobia en 150 µl de medio sintético en placas de 96 pocillos durante 24 horas a 37°C.

15 Se realizó el mezclado de lactobacilos y *S. salivarius* en razones de recuento celular de 1:100 (lactobacilo:*S. salivarius*) en medio ½ TSY. Esto se realizó en placas de 96 pocillos.

Se incubó la suspensión de cultivo durante 12 h en un espectrofotómetro de microplacas PowerWave de BioTek a 37°C.

Como control, se usó medio ligero MRS o medio ½ TSY sin consumir en lugar del cultivo de lactobacilos.

La estimulación del crecimiento de *S. salivarius* fue visible comparando la densidad óptica máxima ($DO_{600,máx}$) o la velocidad de crecimiento máxima ($V_{máx}$) con y sin lactobacilos tras 10 horas de incubación ($DO_{600,máx}$) o durante el crecimiento exponencial ($V_{máx}$).

- 5 La estimulación se define como una densidad óptica máxima ($DO_{600,máx}$) o velocidad de crecimiento máxima ($V_{máx}$) aumentada en al menos el 10%.

Ejemplo 2

Clasificación taxonómica de cepas

- 10 Se realizó la clasificación taxonómica de las cepas según su patrón de fermentación de hidratos de carbono. Esto se determinó usando el sistema API 50 CH (bioMerieux, Francia) y se analizó usando el software APILAB PLUS versión 3.3.3 (bioMerieux, Francia).

Ejemplo 3

Prueba sobre la estimulación del crecimiento de *Streptococcus salivarius* con sobrenadante de lactobacilos

- 15 Se cultivaron las bacterias como en el ejemplo 1. Se obtuvo el sobrenadante de lactobacilos (en particular DSM 19826) mediante centrifugación a 4000 x g durante 15 min. Se realizó el mezclado del sobrenadante de lactobacilos con *S. salivarius* en razones volumétricas de 2:1 a 4:1 (*S. salivarius*:sobrenadante de lactobacilos) en medio ½ TSY. Esto se realizó en placas de 96 pocillos. Se incubó la suspensión de cultivo durante 12 h en un espectrofotómetro de microplacas PowerWave de BioTek a 37°C. Como control, se usó medio ligero MRS o medio ½ TSY sin consumir en lugar del sobrenadante de lactobacilos.
- 20 Se sometió a ensayo la estimulación del crecimiento como en el ejemplo 1. Pudo observarse una estimulación satisfactoria del crecimiento de *S. salivarius* con sobrenadantes de los lactobacilos. Estos resultados se muestran en la figura 2.

Ejemplo 4

Ausencia de estimulación de patógeno bucal miembro de la flora bucal *S. mutans*

- 25 Se hicieron crecer los cultivos de *S. salivarius* como en el ejemplo 1. Se hizo crecer *Streptococcus mutans* (DSM 20253) en 5 ml de medio TSY en tubos Falcon de 15 ml cerrados durante la noche. Se mezclaron las bacterias bucales en una razón volumétrica de 2:1 con sobrenadante de lactobacilos y se sometió a ensayo el crecimiento como en el ejemplo 1. Como control, se cultivaron bacterias bucales con medio ½ TSY sin consumir en lugar del sobrenadante de lactobacilos.
- 30 Pudo observarse ausencia de estimulación del crecimiento del patógeno bucal *S. mutans* por los lactobacilos.

Además, puede someterse a ensayo la ausencia de estimulación del crecimiento de *S. mutans* mediante el siguiente ensayo:

- 35 Se cultivan lactobacilos (por ejemplo DSM 19825, 19826, 19827) de manera anaerobia en 150 µl de medio sintético en placas de 96 pocillos durante 24 horas a 37°C. Se hace crecer *Streptococcus mutans* (DSM 20253) en condiciones anaerobias en 5 ml de medio TSY en tubos Falcon de 15 ml cerrados durante la noche a 37°C. Se realiza el mezclado de lactobacilos y *S. mutans* en razones de recuento celular de 1:100 (lactobacilo:*S. mutans*) en medio ½ TSY. Esto se realiza en placas de 96 pocillos. Se incubó la suspensión de cultivo de manera aerobia durante 12 h en un espectrofotómetro de microplacas PowerWave de BioTek a 37°C. Como control, se usa medio ½ TSY sin consumir en lugar del cultivo de lactobacilos.

Ejemplo 5

Ausencia de estimulación del patógeno bucal miembro de la flora bucal *P. gingivalis*

- 45 Se hicieron crecer los cultivos de *S. salivarius* como en el ejemplo 1. Se hizo crecer *Porphyromonas gingivalis* (DSM 20709) de manera anaerobia en 5 ml de medio FAB en tubos Falcon de 15 ml cerrados a 37°C durante la noche. Se mezcló *P. gingivalis* en una razón volumétrica de 2:1 con sobrenadante de lactobacilos (de DSM 19826) y se cultivó de manera anaerobia en placas de 96 pocillos. Como control, se cultivó *P. gingivalis* con medio FAB sin consumir en

lugar del sobrenadante de lactobacilos.

Se observó ausencia de estimulación del crecimiento del patógeno bucal *P. gingivalis* por los lactobacilos. Los resultados se muestran en la figura 3.

5 Además, puede someterse a ensayo la ausencia de estimulación del crecimiento de *P. gingivalis* mediante el siguiente ensayo:

10 Se cultivan lactobacilos (por ejemplo DSM 19825, 19826, 19827) de manera anaerobia en 150 µl de medio sintético en placas de 96 pocillos durante 24 horas a 37°C. Se hace crecer *Porphyromonas gingivalis* (DSM 20709) de manera anaerobia en 5 ml de medio FAB en tubos Falcon de 15 ml cerrados a 37°C durante la noche. Se realiza el mezclado de lactobacilos y *P. gingivalis* en razones de recuento celular de 1:100 (lactobacilo:*P. gingivalis*) en medio FAB. Esto se realiza en placas de 96 pocillos. Se incuba la suspensión de cultivo de manera aerobia durante 45 h en una estación de trabajo anaerobia Whitley DG250 (Meintrup-DWS, Alemania) a 37°C. Como control, se usa medio FAB sin consumir en lugar del cultivo de lactobacilos.

Ejemplo 6

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

15 Se hicieron crecer las bacterias como en el ejemplo 1. Se incubaron los sobrenadantes de lactobacilos (de DSM 19827) a 80°C durante 10 min en un incubador. Tras enfriar el sobrenadante hasta temperatura ambiente, se mezcló el sobrenadante de lactobacilos en una razón volumétrica de 1:2 con cultivos de *S. salivarius* que se hicieron crecer y se sometió a ensayo la estimulación como en el ejemplo 1 incluyendo los experimentos de control.

20 (También se sometió a ensayo la estimulación usando las bacterias patógenas bucales tal como se explicó resumidamente en los ejemplos 4 y 5. Se demostró que el comportamiento no estimulante de los lactobacilos frente a las bacterias patógenas bucales no se ve influido por el tratamiento térmico). Pudo observarse ausencia de influencia mediante tratamiento térmico sobre la actividad estimulante frente a *S. salivarius*. Los resultados se muestran en la figura 4.

Ejemplo 7

25 Sensibilidad de la estimulación frente a la liofilización

30 Se hizo crecer *S. salivarius* como en el ejemplo 1. Se cultivaron lactobacilos de manera anaerobia en 50 ml de medios sintéticos en frascos de 100 ml cerrados (Schott, Alemania) durante la noche a 37°C. Se obtuvo sobrenadante de lactobacilos mediante centrifugación a 4000 x g durante 15 min. Se congelaron 20 ml de sobrenadante hasta -80°C y se liofilizaron a vacío durante 16 h. Se resuspendió el sobrenadante liofilizado en 20 ml de H₂O. Se mezcló el sobrenadante resuspendido con cultivo de *S. salivarius* en una razón de 2:1 (*S. salivarius*:sobrenadante resuspendido) en medio ½ TSY en placas de 96 pocillos. Se sometió a ensayo la estimulación del crecimiento como en el ejemplo 1 incluyendo los experimentos de control.

La actividad estimulante no se vio disminuida por la liofilización.

Ejemplo 8

35 Reducción de la concentración de péptidos por los lactobacilos

Se cultivaron lactobacilos (DSM 19827) como en el ejemplo 1. Se cultivó el cultivo principal en medio sintético que contenía 15 g/l de péptidos (extracto de PTU). Se inoculó el medio con 10 µl de suspensión de cultivo y se cultivó de manera anaerobia a 37°C durante 24 h. Después se determinó la concentración de péptidos y resultó que había disminuido en al menos el 20% tras 24 h.

40 Los resultados mostraron una reducción eficaz de la concentración de péptidos por los lactobacilos en crecimiento y se ilustran en la figura 5.

Ejemplo 9

Sensibilidad de la reducción de la concentración de péptidos frente a la liofilización

45 Se cultivaron lactobacilos (DSM 19827) en 100 ml de medio sintético a 37°C durante 24 h. Se centrifugó el cultivo completo a 4000 x g durante 15 min y se resuspendió en 20 ml de H₂O. Se congelaron 20 ml de lactobacilos

resuspendidos hasta -80°C y se liofilizaron a vacío durante 16 h.

5 Para el ensayo de captación de péptidos, se resuspendieron 10 mg de lactobacilos liofilizados en H₂O y se centrifugaron a 4000 x g durante 10 min. Se añadió 1 ml de medio sintético que contenía péptidos 7 g/l al sedimento y, tras 5 min de incubación a 37°C, se retiraron las células mediante centrifugación. Se determinó la concentración de péptidos en el sobrenadante. La concentración de péptidos en el medio tras la retirada de las células se redujo hasta 2 g/l. Esto corresponde a una captación de 0,5 mg de péptido/mg de lactobacilos liofilizados.

Estos resultados muestran una reducción eficaz en la concentración de péptidos por los lactobacilos en un estado liofilizado tal como se ilustra en la figura 6.

Ejemplo 10

10 Influencia de la reducción de la concentración de péptidos por lactobacilos sobre la producción de H₂S por bacterias anaerobias gram-negativas

15 Se cultivaron lactobacilos y se liofilizaron como en el ejemplo 8. Para el experimento, se resuspendieron 10 mg de lactobacilos liofilizados en H₂O en una placa de pocillos profundos y se centrifugaron a 4000 x g durante 10 min. Se añadió 1 ml de medio sintético que contenía 3 g/l de péptidos al sedimento y, tras 5 min de incubación a 37°C, se retiraron las células mediante centrifugación. El pH del medio no se vio alterado por la incubación. Después se inoculó el medio con 50 µl de saliva humana no estéril y se incubó de manera anaerobia durante 6 h a 37°C. Se cubrió la placa de pocillos profundos con papel de filtro estéril impregnado con acetato de plomo. Se monitorizó la producción de sulfuro de hidrógeno por los microorganismos a partir de la saliva mediante oscurecimiento del papel de filtro.

20 Se observó una producción reducida de H₂S en medio tratado con lactobacilos mediante comparación del oscurecimiento con el experimento de control sin incubación previa con lactobacilos.

Estos resultados muestran que una incubación previa del medio con lactobacilos da como resultado una disminución en la producción de H₂S durante una posterior incubación de medio con microorganismos a partir de la saliva humana.

25 Ejemplo 11

Composición de pastilla para chupar (I)

30 La composición de pastilla para chupar se prepara preferiblemente tal como se describe en el ejemplo 4 en la página 8 del documento DE-C2 36 45 147, en el que, además de los componentes mencionados en dicho ejemplo 4, se añade el microorganismo mencionado anteriormente perteneciente al grupo de bacterias del ácido láctico en una cantidad de 10² a 10¹², preferiblemente de 10³ a 10⁸ células por mg de la pastilla para chupar.

Ejemplo 12

Composición de pastilla para chupar (II)

35 La composición de pastilla para chupar se prepara preferiblemente tal como se describe en el ejemplo 5 en la página 8 del documento DE-C2 36 45 147, en la que, además de los componentes mencionados en dicho ejemplo 5, se añade el microorganismo mencionado anteriormente perteneciente al grupo de bacterias del ácido láctico en una cantidad de 10² a 10¹², preferiblemente de 10³ a 10⁸ células por mg de la pastilla para chupar.

Ejemplo 13

Composición de dentífrico

40 La composición de dentífrico se prepara preferiblemente tal como se describe en el ejemplo 3 en la página 8 del documento DE-C2 36 45 147, en la que, además de los componentes mencionados en dicho ejemplo 3, se añade el microorganismo mencionado anteriormente perteneciente al grupo de bacterias del ácido láctico en una cantidad de 10² a 10¹², preferiblemente de 10³ a 10⁸ células por mg del dentífrico.

Ejemplo 14

Composición de dentífrico a base de creta

5 La composición de dentífrico a base de creta se prepara preferiblemente tal como se describe en el capítulo 7.1.4.4 "Rezepturbeispiel" en la página 205 del libro de texto "Kosmetik", W. Umbach (editor), 2ª edición, Thieme Verlag, 1995, en la que, además de los componentes mencionados en dicho capítulo en la página 205, se añade el microorganismo mencionado anteriormente perteneciente al grupo de bacterias del ácido láctico en una cantidad de 10^2 a 10^{12} , preferiblemente de 10^3 a 10^8 células por mg del dentífrico a base de creta.

Ejemplo 15

Dentífrico en gel basado en ácido silícico/fluoruro de sodio

10 El dentífrico en gel basado en la composición de dentífrico de ácido silícico/fluoruro de sodio se prepara preferiblemente tal como se describe en el capítulo 7.1.4.4 "Rezepturbeispiel" en la página 205 del libro de texto "Kosmetik", W. Umbach (editor), 2ª edición, Thieme Verlag, 1995, en la que, además de los componentes mencionados en dicho capítulo en la página 205, se añade el microorganismo mencionado anteriormente perteneciente al grupo de bacterias del ácido láctico en una cantidad de 10^2 a 10^{12} , preferiblemente de 10^3 a 10^8 células por mg del dentífrico en gel basado en ácido silícico/fluoruro de sodio.

Ejemplo 16

15 Composición de dentífrico contra el tártaro

20 La composición de dentífrico contra el tártaro se prepara preferiblemente tal como se describe en el capítulo 7.1.4.4 "Rezepturbeispiel" en la página 206 del libro de texto "Kosmetik", W. Umbach (editor), 2ª edición, Thieme Verlag, 1995, en la que, además de los componentes mencionados en dicho capítulo en la página 206, se añade el microorganismo mencionado anteriormente perteneciente al grupo de bacterias del ácido láctico en una cantidad de 10^2 a 10^{12} , preferiblemente de 10^3 a 10^8 células por mg del dentífrico contra el tártaro.

Ejemplo 17

Composición de goma para mascar

25 La composición de goma para mascar se prepara preferiblemente tal como se describe en el ejemplo 6 en la página 9 del documento DE-C2 36 45 147, en la que, además de los componentes mencionados en dicho ejemplo 6, se añade el microorganismo mencionado anteriormente perteneciente al grupo de bacterias del ácido láctico en una cantidad de 10^2 a 10^{12} , preferiblemente de 10^3 a 10^8 células por mg de la goma para mascar.

Ejemplo 18

Composición de enjuague bucal concentrado

30 La composición de enjuague bucal concentrado se prepara preferiblemente tal como se describe en el capítulo 7.1.4.4 "Rezepturbeispiel" en la página 206 del libro de texto "Kosmetik", W. Umbach (editor), 2ª edición, Thieme Verlag, 1995, en la que, además de los componentes mencionados en dicho capítulo en la página 206, se añade el microorganismo mencionado anteriormente perteneciente al grupo de bacterias del ácido láctico en una cantidad de 10^2 a 10^{13} , células por ml de la composición de enjuague bucal concentrado.

Ejemplo 19

35 Preparación de película

Preparación de películas:

1. fase acuosa

- calentar el agua hasta 60°C

- se añade aspartamo (edulcorante) con agitación

40 - se disuelve completamente el aspartamo

- se añaden un agente de formación de película polimérico soluble en agua, tal como, por ejemplo, Kollicoat IR (polietilenglicol sobre poli(alcohol vinílico)) o PVP (polivinilpirrolidona) o polímeros naturales tales como alginatos con agitación hasta que se disuelven

ES 2 574 135 T3

- tras 10 min, se retira el resto de la espuma
 - se añade el microorganismo mencionado anteriormente perteneciente al grupo de bacterias del ácido láctico en una cantidad de 10^2 a 10^{12} , preferiblemente de 10^3 a 10^8 células por película de aroma final tras enfriar la mezcla; alternativamente, puede añadirse el mutante o derivado del microorganismo mencionado anteriormente perteneciente al grupo de bacterias del ácido láctico o un análogo o fragmento del microorganismo mencionado anteriormente perteneciente al grupo de bacterias del ácido láctico
- 5
2. fase oleosa
- se disuelve mentol en aceite de menta
 - se añade polisorbato 80 a la mezcla de aceite de menta-mentol con agitación
- 10
- después se añade esta mezcla a propilenglicol con agitación
 - pueden añadirse colorantes opcionales (tales como pigmentos, lacas)
- 3.
- con agitación se mezcla lentamente la fase oleosa con la fase acuosa
- 4.
- 15
- se generan mecánicamente las películas delgadas usando un dispositivo de corte

Formulaciones de muestra:

	formulación I		formulación II	
	peso [g]	composición en la película [%]	peso [g]	composición en la película [%]
Fase I				
aspartamo	0,7	1,4	0,7	1,8
Kollicoat IR	35,0	68,5	25,0	65,8
ácido ascórbico	-	-	1,0	2,6
aromatizante de cereza	-	-	6,0	15,8
agua desmin.	85,0	-	80,0	
Fase II				
mentol	1,4	2,7	-	
aceite de menta	5,6	11,0	-	
polisorbato 80	0,7	1,4	-	
propilenglicol	7,0	13,7	5,0	13,2
laca verde	0,7	1,4	-	
laca de azorubina	-	-	0,3	0,8
suma	136,1	100,0	118,0	100,0
contenido sólido	51,1		38,0	

REIVINDICACIONES

- 5 1. Forma inactiva de un microorganismo perteneciente al género *Lactobacillus*, seleccionándose el microorganismo del grupo que consiste en microorganismos que tienen el número de registro de DSMZ DSM 19825, DSM 19826 o DSM 19827, caracterizada porque la forma inactivada significa una célula muerta o inactivada que ya no puede formar una colonia individual sobre una placa específica para microorganismos pertenecientes al género de *Lactobacillus* en la que dicha célula muerta o inactivada tiene una membrana celular o bien intacta o bien rota y el microorganismo muestra la siguiente propiedad (b) cuando se somete al siguiente ensayo (a):

Ensayo (a):

- 10 (a) se cultiva el microorganismo durante 24 h a 37°C en condiciones anaerobias en un medio sintético que contiene péptidos 15 g/l con una densidad celular inicial de 1×10^7 células/ml, en la que el medio sintético tiene la siguiente composición:

guanina:	0,1 g/l
citosa:	0,1 g/l
timidina:	0,1 g/l
2'-desoxiadenosina:	0,1 g/l
2'-desoxiuridina:	0,1 g/l
K ₂ HPO ₄ :	2 g/l
acetato de sodio:	5 g/l
MgSO ₄ heptahidratado:	0,1 g/l
hidrogenocitrato de diamonio:	2 g/l
CaCl ₂ dihidratado:	0,5 g/l
ácido oleico:	0,1% (p/v)
cianocobalamina:	0,02 mg/l
riboflavina:	10 mg/l
ácido fólico:	0,2 mg/l
5-fosfato de piridoxal monohidratado:	10 mg/l
ácido 4-aminobenzoico:	0,2 mg/l
D-(+)-biotina:	1 mg/l
ácido ascórbico:	500 mg/l
ácido nicotínico:	10 mg/l
pantotenato de Ca:	10 mg/l
tiamina:	1 mg/l
nitrito de cobalto (II) hexahidratado:	500 mg/l
MnSO ₄ monohidratado:	20 mg/l
MgSO ₄ heptahidratado:	500 mg/l
Na ₂ MoO ₄ :	0,04 mg/l
extracto de PTU:	15 g/l o 7 g/l
D-glucosa monohidratada:	10 g/l;

(b) se retiran las células mediante centrifugación a 4000 x g durante 15 min; y

(c) se determina la concentración de péptidos en el sobrenadante resultante;

propiedad (b):

- 15 el microorganismo conduce a una reducción de la concentración de péptidos en el medio de cultivo de modo que la concentración de péptidos en el sobrenadante tras la incubación durante 24 h se reduce en al menos el 20% en comparación con la concentración inicial de 15 g/l, es decir el microorganismo puede reducir la concentración de péptidos en el medio en el ensayo (a) en al menos el 20%,

- 20 en la que la forma inactiva muestra la propiedad de reducción en al menos el 20% de la concentración de péptidos de un medio sintético que contiene péptidos 7 g/l cuando se añade a dicho medio y se incuba durante 5 min a 37°C en condiciones aerobias.

2. Forma inactiva del microorganismo según la reivindicación 1, en la que el microorganismo muestra además la siguiente propiedad (B) cuando se somete al siguiente ensayo (A):

Ensayo (A):

- 25 (a) se cultiva el microorganismo en 100 ml de medio sintético a 37°C durante 24 h en condiciones anaerobias con

una densidad celular inicial de 1×10^7 células/ml;

(b) posteriormente se centrifugan las células a 4000 x g durante 15 min y se resuspenden en 20 ml de H₂O;

(c) posteriormente se congelan las células hasta -80°C y se liofilizan a vacío durante 16 h;

(d) se resuspenden 10 mg de las bacterias liofilizadas en H₂O y se centrifugan a 4000 x g durante 10 min;

5 (e) se añade 1 ml de medio sintético que contiene péptidos 7 g/l al sedimento celular, se resuspenden las células en el medio y tras 5 min de incubación a 37°C en condiciones aerobias se retiran las células mediante centrifugación a 4000 x g durante 15 min; y

(f) se determina la concentración de péptidos en el sobrenadante de medio resultante;

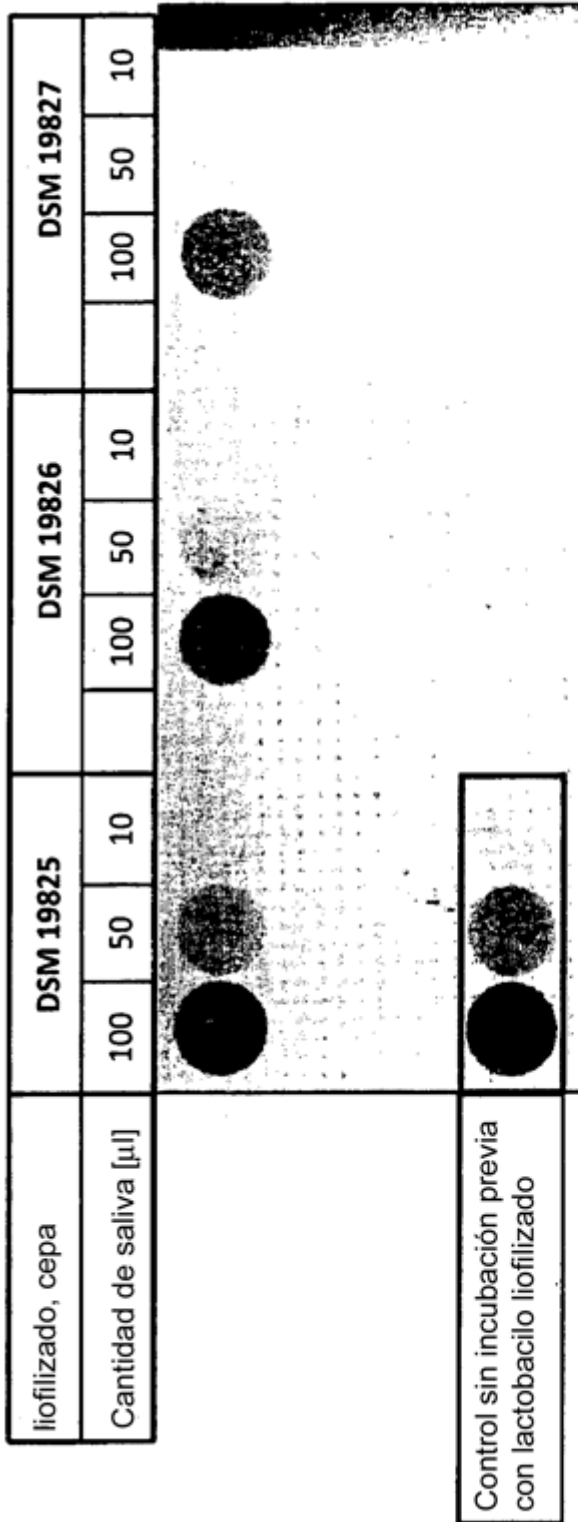
10 propiedad (B): las bacterias liofilizadas conducen a una reducción de la concentración de péptidos en el sobrenadante de medio resultante en al menos el 20% en comparación con la concentración del medio al comienzo del periodo de incubación (7 g/l).

3. Forma inactiva del microorganismo según la reivindicación 1 ó 2, en la que el microorganismo se caracteriza además porque puede estimular el crecimiento de *Streptococcus salivarius* pero no estimula el crecimiento de *Streptococcus mutans* y/o *Porphyromonas gingivalis*.

15 4. Composición que comprende una forma inactiva de un microorganismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

5. Composición según la reivindicación 4, en la que dicha composición es un dentífrico, goma para mascar, pastilla para chupar, enjuague bucal, colutorio, hilo dental o cinta dental.

20 6. Forma inactiva de un microorganismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o composición según la reivindicación 4 ó 5, para reducir de manera cosmética, terapéutica o profiláctica el mal olor bucal y/o la halitosis.



medio: medio sintético con PTU 3 g/l
 incubación previa con 10 mg de liofilizado,
 tasa de supervivencia < 0,01%

Figura 1

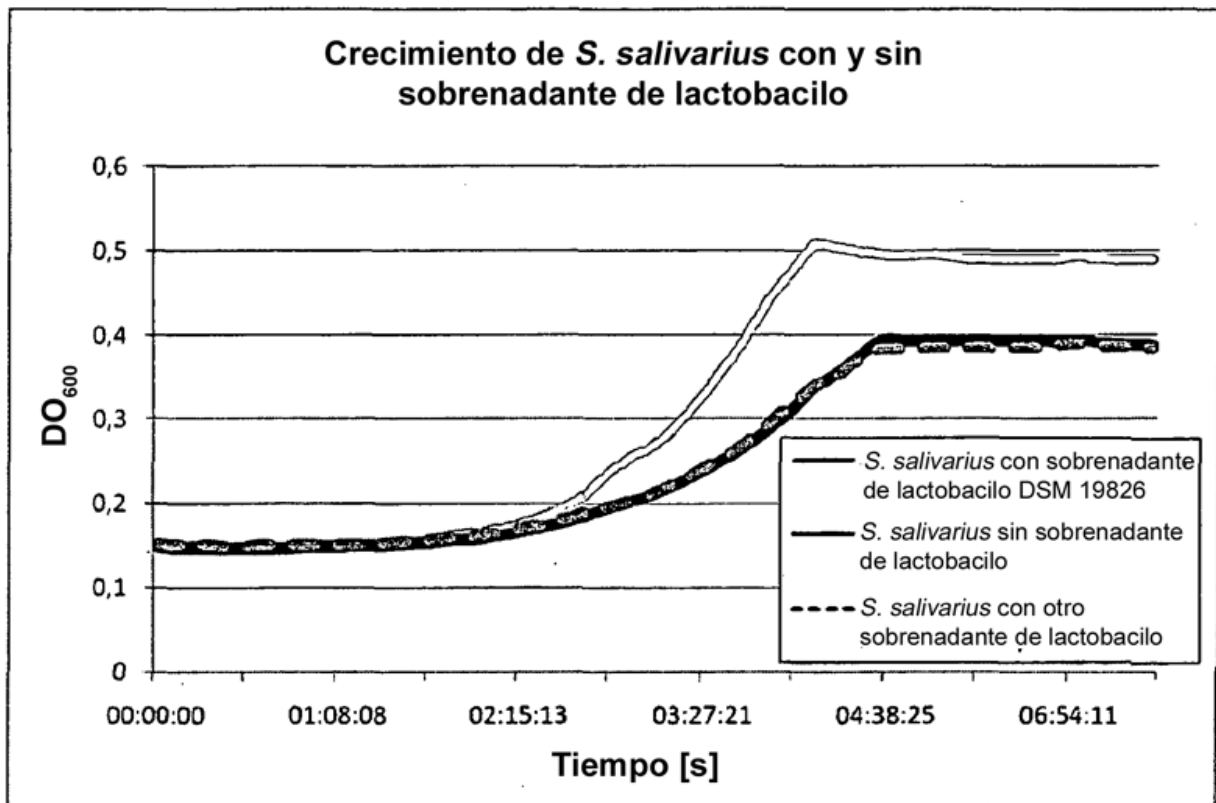


Figura 2

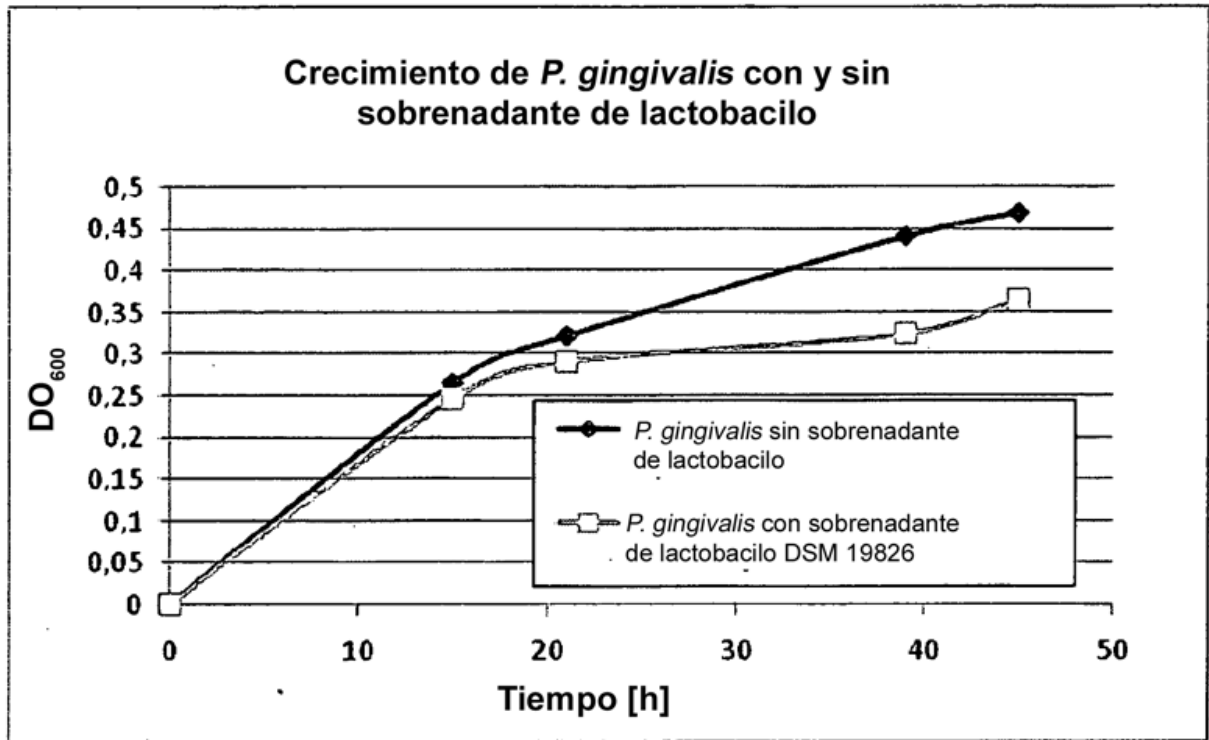


Figura 3

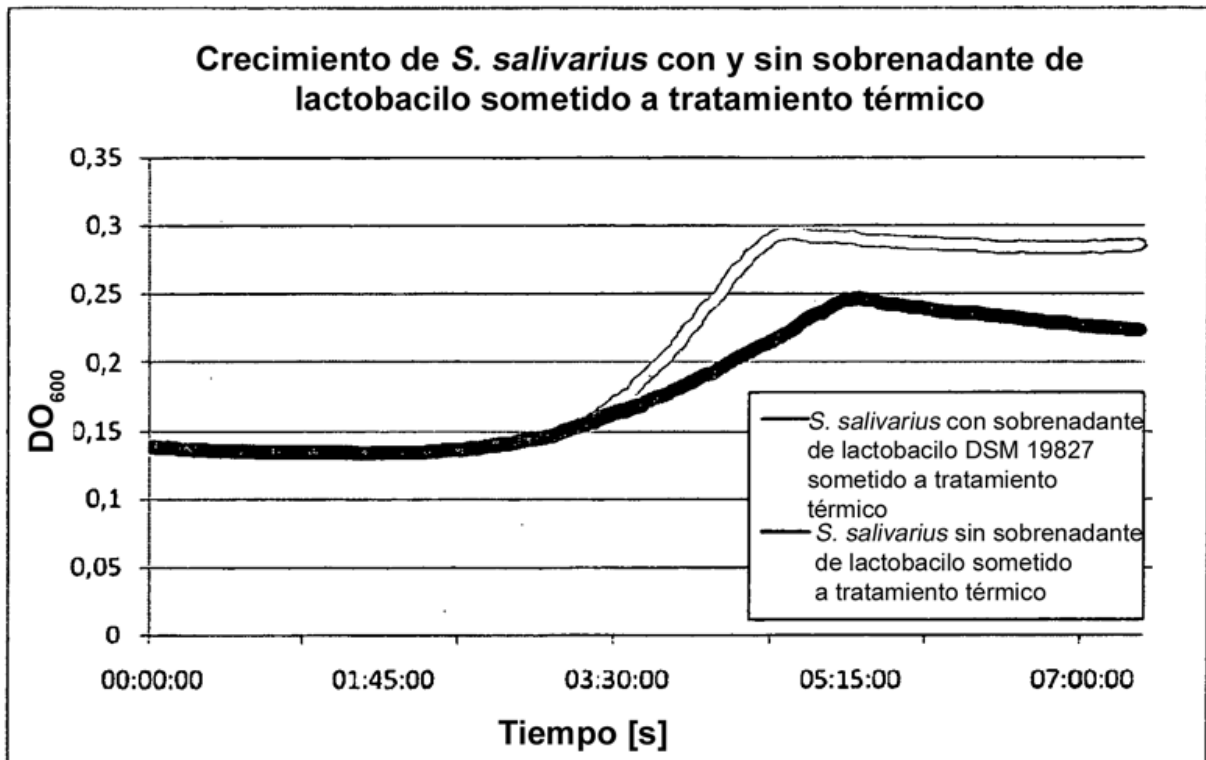


Figura 4

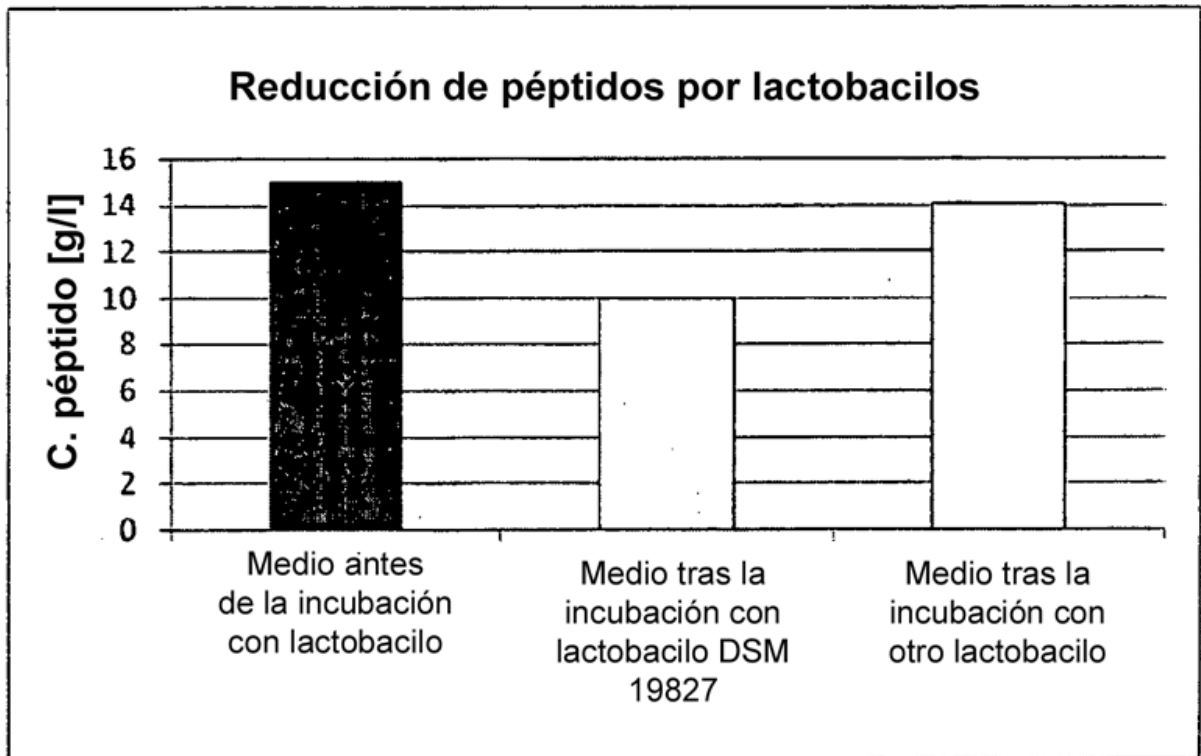


Figura 5

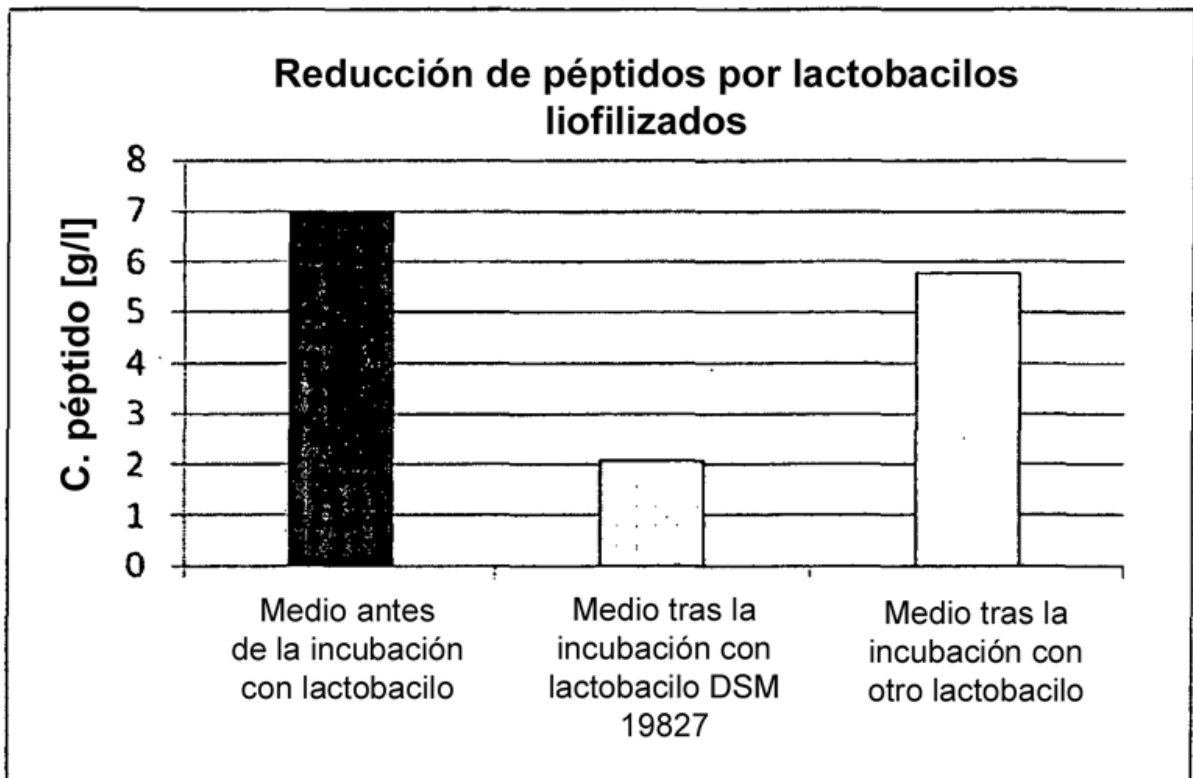


Figura 6

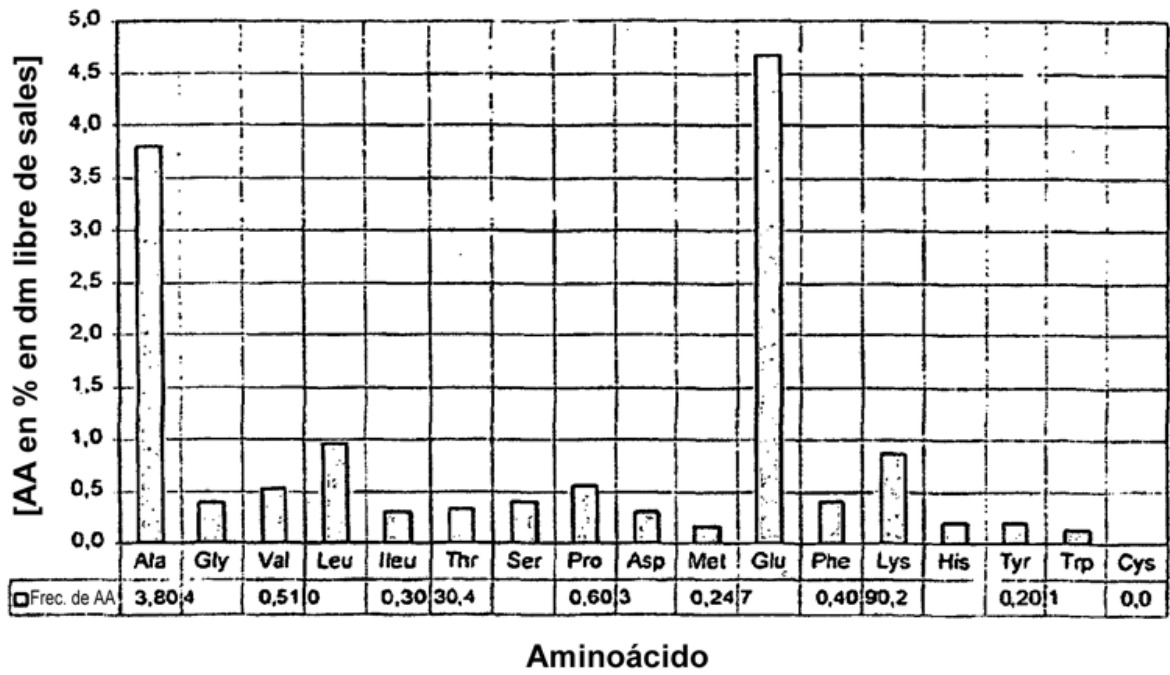


Figura 7