

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 913**

51 Int. Cl.:

C12R 1/24 (2006.01)

C12R 1/25 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.08.2011 PCT/EP2011/064173**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.02.2012 WO12022773**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.08.2011 E 11749151 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.10.2017 EP 2606155**

54 Título: **Composición probiótica para la salud oral**

30 Prioridad:

18.08.2010 EP 10173286

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

22.02.2018

73 Titular/es:

**AB-BIOTICS S.A. (100.0%)
Parc de recerca UAB-Campus UAB s/n, Edificio
Eureka- Despacho P2M1, Bellaterra
08193 Cerdanyola del Vallés, Barcelona, ES**

72 Inventor/es:

CUÑÉ CASTELLANA, JORDI

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 655 913 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

Composición probiótica para la salud oral

La presente invención se refiere a los campos de la medicina, la microbiología y la nutrición y, particularmente, a una nueva combinación de cepas probióticas de *Lactobacillus* y composiciones útiles en el campo de la salud oral.

5 **Antecedentes de la invención**

Las enfermedades relacionadas con la placa dental, particularmente la gingivitis, la periodontitis y la caries, representan una parte principal de la carga global de las enfermedades orales.

Las enfermedades periodontales (gingivitis y periodontitis) están principalmente causadas por infecciones de bacterias gram-negativas anaerobias específicas, lo que lleva a la destrucción inicial del tejido conectivo blando, y subsecuentemente, a la disrupción del hueso alveolar subyacente y el ligamento que sostiene los dientes. Las bacterias de la especie *Porphyromonas gingivalis* se han implicado como un agente etiológico principal en el desarrollo y la progresión de la periodontitis. Otras especies que también contribuyen a la inflamación gingival son *Treponema denticola*, *Prevotella denticola* y *Fusobacterium nucleatum*. En base a las encuestas de la Organización Mundial de la Salud, la mayoría de niños presentan signos de gingivitis, y entre los adultos las etapas iniciales de la enfermedad periodontal son altamente prevalentes. Por ejemplo, en Europa, se estima que el 15-35% de la población adulta padece esta enfermedad multifactorial.

La caries dental (también conocida como deterioro dental) es una enfermedad donde procesos bacterianos dañan la estructura dura del diente. *Streptococcus mutans* es uno de los pocos organismos especializados equipados con receptores que ayudan a una mayor adhesión a la superficie del diente, siendo por lo tanto un colonizador primario de la superficie dental y el contribuyente más significativo de la caries. El crecimiento y el metabolismo de esta especie pionera crea un ambiente ácido en la boca que provoca que el esmalte dental altamente mineralizado sea vulnerable al deterioro.

Además de lo anterior, se cree que hay otro trastorno oral que podría afectar a una gran proporción de la población: la halitosis. También conocida como mal aliento, la halitosis está causada por una cantidad de compuestos volátiles que derivan de la degradación bacteriana de los aminoácidos que contienen azufre. Las bacterias implicadas (principalmente *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas intermedia* y *Treponema denticola*) se localizan en áreas estancadas de la cavidad oral, tales como la parte dorsal de la superficie de la lengua, los huecos periodontales y las áreas inter-proximales. Esta afección tiene un impacto significativo - personal y socialmente - para aquellos que lo padecen, y se estima que es el tercer motivo más frecuente de búsqueda de ayuda dental, seguido del deterioro dental y la enfermedad periodontal.

Las bacterias orales forman una biopelícula (placa dental) en todos los tejidos orales duros y blandos, lo que se considera el principal agente etiológico de afecciones patológicas de la boca. La acumulación de bacterias dentro de la biopelícula, propiciada por un mantenimiento pobre de la salud oral, predispone a desplazamientos alogénicos en la comunidad microbiana, dado lugar al inicio de la inflamación periodontal y la formación de la caries, así como contribuyendo a la halitosis.

Las levaduras, y particularmente, *Candida albicans*, también pueden ser la causa de trastornos en la cavidad oral. Las personas mayores son vulnerables a la infección por *Candida* provocada por enfermedades crónicas, medicación, higiene oral pobre, flujo salivar reducido, o deficiencias en el sistema inmune. Pese a que la colonización por *Candida* puede ser asintomática, un crecimiento elevado conlleva usualmente candidiasis local, con varios tipos de lesiones y síntomas en la mucosa.

Modificar el potencial patógeno de la microbiota dentro de la cavidad oral podría ser una estrategia interesante para combatir estos trastornos. En esta dirección, la introducción de lactobacilos probióticos para reemplazar parcialmente microorganismos patógenos es una manera prometedora de controlar las infecciones orales. No obstante, en comparación con las afecciones gastrointestinales, el uso de probióticos para aplicaciones de salud oral ha sido escasamente estudiado. Actualmente, se comercializan muy pocos productos comerciales que contengan probióticos que incorporen tales aplicaciones para la salud.

Uno de estos productos es Prodentis® de BioGaia. Prodentis es una goma de mascar que contiene una cepa probiótica *L. reuteri* ATCC 55730 y ha demostrado reducir la gingivitis en un estudio clínico (Tvetman S, et al. "Short-term effect of chewing gums containing probiotic *Lactobacillus_reuteri* on the levels of inflammatory mediators in gingival cervical fluid". Acta Odontol Scand, 2009, vol. 67, p. 19-24). Se ha descrito que esta misma cepa, *L. reuteri* ATCC 55730, ejerce una fuerte actividad antagonista frente al cariogénico *Streptococcus mutans* (Caglar E, et al. "Salivary mutans streptococci and lactobacilli levels after ingestion of the probiotic bacterium *Lactobacillus_reuteri* ATCC 55730 by straws or tablets". Acta Odontol Scand, 2009, vol. 64, p. 314-318). No obstante, se sabe poco sobre el impacto de *L. reuteri* ATCC 55730 sobre otros patógenos orales. Además, *L. reuteri* se ha aislado del intestino, no de la cavidad oral, y no se sabe si esta cepa tiene la capacidad de formar biopelículas, o coloniza de otra forma este entorno para tener un efecto más duradero. Se ha demostrado que la capacidad de *Lactobacillus* sp. de adherirse a superficies cubiertas de saliva en un modelo que mimetiza las condiciones de la cavidad oral varía

considerablemente (Stamatova I, et al. "In vitro evaluation of yoghurt starter lactobacilli and *Lactobacillus rhamnosus* GG adhesion to saliva-coated surfaces". Oral Microbiol Immunol, 2009, vol. 24, p. 218–223).

Streptococcus salivarius K12 es otro probiótico comercial pensado para ser utilizado en la cavidad oral. *S. salivarius* K12 se aisló de la saliva de un niño sano y se ha visto que presenta actividad antimicrobiana *in vitro* contra varias especies bacterianas implicadas en la etiología de la halitosis (Burton JP, et al. "Preliminary study of the effect of probiotic *Streptococcus salivarius* K12 on oral malodor parameters". J Appl Microbiol, 2006, vol. 100, p. 754-764). No obstante, los efectos beneficiosos de esta cepa se limitan a la mejora de los síntomas de la halitosis.

Twetman et al. describe la capacidad de diferentes bacterias de ácido láctico (*L. plantarum* 299v, *L. acidophilus* CCUG 5917, *L. rhamnosus* GG y LB21, *L. paracasei* F19 y *L. reuteri* PTA5289), para coagregarse con streptococci mutans asociados con caries, siendo *L. acidophilus* la más propensa a reaccionar y coagregarse. Los autores concluyen que, desde el punto de vista de la agregación, ninguna de las cepas comerciales parece tener una ventaja clara sobre las otras bajo las presentes condiciones experimentales (Twetman S, et al. "Coaggregation between probiotic bacteria and caries-associated strains: An in vivo study". Acta Odontologica Scandinavica, Oslo, vol. 67, no. 5, 1 2009, páginas 284-288).

Yang Y. et al describe las características probióticas de *L. plantarum* HO-69 en la cavidad oral. Los patógenos estudiados incluyen *S. mutans* y otros patógenos no orales, pero no se describe actividad frente a patógenos de gingivitis y periodontales (Yang et al. "Probiotic characteristics of *Lactobacillus plantarum* HO-69 applied in oral cavity" Huaxi.Kouqiang-Yixue-Zazhi; Wcjs = West China Journal Of Stomatology, vol. 26, 1 2008, páginas 482-485,489).

Los probióticos tienen, en consecuencia, potencial para proporcionar efectos beneficiosos para la cavidad oral, siempre y cuando se identifiquen cepas probióticas adecuadas. Con este propósito, es necesario considerar los beneficios potenciales para el huésped, pero también la seguridad de la cepa, así como los posibles efectos adversos en la cavidad oral. Estos últimos adquieren una especial relevancia cuando se contempla el uso oral de lactobacilos, dado que se ha descrito que ciertos lactobacilos orales son cariogénicos debido a un elevado potencial acidogénico que favorece la degradación de los tejidos duros, tales como el esmalte y la dentina.

Pese a los avances en el campo de los probióticos orales, en base a lo anterior está claro que se necesitan nuevas cepas probióticas las cuales, teniendo un amplio espectro de beneficios en la cavidad oral, no presenten efectos adversos.

Resumen de la invención

Los inventores han aislado nuevas cepas de la microbiota oral humana. Estas cepas, *Lactobacillus plantarum* CECT 7481 y *Lactobacillus brevis* CECT 7480, presentan varias propiedades funcionales que las hacen apropiadas para su uso en la mejora de la salud oral. Tales propiedades incluyen no sólo unas buenas propiedades antagónicas contra patógenos orales, sino también la capacidad de colonizar la cavidad oral y un bajo perfil de acidificación. Como se discute a continuación, también se ha encontrado que, cuando ambas cepas se utilizan en una combinación única, los beneficios de salud para la cavidad oral son remarcables.

Así, en un primer aspecto la presente invención proporciona una composición que comprende *Lactobacillus plantarum* CECT 7481 y *Lactobacillus brevis* CECT 7480.

Queda claro que, usando las cepas depositadas como material de partida, un experto en la materia puede rutinariamente, por mutagénesis convencional o técnicas de re-aislamiento, obtener otros mutantes o derivados de éstos que retengan o aumenten las características y las ventajas relevantes descritas en la presente memoria de las cepas que forman la composición de la invención. Estos mutantes o derivados pueden ser modificados genéticamente o aparecer de manera natural. El experto en la materia decidirá sobre el método adecuado a emplear para determinar las actividades funcionales de las cepas. En los ejemplos a continuación se muestran ejemplos de posibles métodos para medir estas actividades.

En consecuencia, por "*Lactobacillus plantarum* CECT 7481" se entiende la cepa *Lactobacillus plantarum* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo bajo el número de registro CECT 7481, así como microorganismos mutantes o derivados que hayan sido obtenidos por técnicas conocidas en el estado de la técnica utilizando como material de partida la cepa depositada, donde dichos mutantes o derivados conservan al menos las características y ventajas relevantes de la cepa *Lactobacillus plantarum* CECT 7481 descritas en la presente memoria. Por "*Lactobacillus brevis* CECT 7480" se entiende la cepa de *Lactobacillus brevis* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo bajo el número de registro CECT 7480, así como microorganismos mutantes o derivados que hayan sido obtenidos por técnicas conocidas en el estado de la técnica utilizando como material de partida la cepa depositada, donde dichos mutantes o derivados conservan al menos las características y ventajas relevantes de la cepa *Lactobacillus brevis* CECT 7480 descritas en la presente memoria.

Las cepas de la presente invención tienen la ventaja de ser particularmente útiles como probióticos.

El término "probiótico" se conoce en el estado de la técnica como un microorganismo que, cuando es administrado en las cantidades adecuadas, confiere un beneficio para la salud al huésped. Un microorganismo probiótico debe

satisfacer varios requerimientos relacionados con la falta de toxicidad, viabilidad, adhesión y efectos beneficiosos. Estas propiedades probióticas son dependientes de la cepa, incluso entre bacterias de la misma especie. En consecuencia, es importante encontrar aquellas cepas que presentan un rendimiento mejor en todos los requerimientos probióticos.

5 Preferiblemente, las cepas de la invención son útiles como probióticos orales, por ejemplo, probióticos que mejoran la salud oral. Se ha visto que *Lactobacillus plantarum* CECT 7481 y *Lactobacillus brevis* CECT 7480 presentan una actividad inhibitoria significativa contra un amplio número de patógenos de la cavidad oral que están involucrados en el desarrollo de trastornos orales, tales como la gingivitis, periodontitis, caries y halitosis, mientras que presentan un antagonismo mínimo contra cepas comensales comunes de la flora oral humana. Además, estas dos cepas no muestran actividad inhibitoria entre ellas, permitiendo en consecuencia su uso combinado en una única fórmula. Adicionalmente, como puede verse en los siguientes ejemplos, la combinación de estas cepas en una única fórmula (es decir, la composición de la invención) tiene la ventaja de presentar una mayor actividad antagonista contra patógenos orales en comparación con la actividad de las cepas individuales utilizadas por separado. Por lo tanto, las cepas de la invención presentan una actividad cooperativa contra patógenos orales y son especialmente útiles cuando se usan de forma combinada.

Antagonizando microorganismos que están implicados en afecciones patológicas de la cavidad oral, tales como *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Prevotella denticola* y *Fusobacterium nucleatum*, estas cepas tienen el efecto de alterar el perfil microbiológico oral por un perfil más saludable, beneficiando así las condiciones de salud oral.

20 No obstante, la capacidad singular de una cepa bacteriana de antagonizar patógenos orales no es suficiente para asegurar un efecto probiótico en la cavidad oral. Las cepas de la composición de la invención son buenos probióticos orales ya que, además de una fuerte capacidad antagonista, presentan una buena capacidad de colonizar la cavidad oral. Como puede verse a continuación en el ejemplo 7 *Lactobacillus plantarum* CECT 7481 y *Lactobacillus brevis* CECT 7480 son capaces de crecer en presencia de lisozima y peróxido de hidrógeno. Ventajosamente, estas cepas también tienen una buena capacidad de adherirse a tejidos orales.

Además, las cepas de la invención tienen la ventaja de presentar una elevada capacidad de formar agregados. Esto es importante porque permite a dichas cepas inhibir o reducir la placa dental interfiriendo con la formación de biopelícula de patógenos. Se sabe que las cepas probióticas de bacterias acidolácticas con capacidad de agregación pueden inhibir o reducir la formación de placa dental por bacterias patógenas, la cual es el resultado de la agregación de bacterias patógenas entre ellas y también con otros microorganismos. Como se ha mencionado antes, la biopelícula formada por patógenos orales en tejidos orales duros y blandos se considera un agente etiológico importante en condiciones patológicas de la boca, lo que conlleva el inicio de la inflamación periodontal, formación de caries y halitosis. La formación de agregados por las cepas de la invención se incrementa cuando ambas cepas se combinan en una composición, lo que significa que las cepas son más efectivas desplazando bacterias patógenas cuando se combinan en un única fórmula.

Sorprendentemente, los inventores también encontraron que las cepas CECT 7481 y CECT 7480 presentan un perfil de acidificación particularmente bajo. Las especies de *Lactobacillus*, como la mayoría de bacterias acidolácticas, se caracterizan por una elevada producción de ácidos volátiles como resultado de la fermentación de azúcares de la dieta humana. No obstante, las propiedades acidogénicas de estas bacterias pueden ser un posible efecto secundario en la cavidad oral, ya que aumenta el riesgo de caries. De hecho, muchos lactobacilos han sido considerados cariogénicos. En consecuencia, la reducida producción de ácidos mostrada por las cepas de *Lactobacillus* que constituyen la composición de la invención las hace particularmente adecuadas para aplicaciones de salud en la cavidad oral.

45 Por encima de las propiedades beneficiosas comentadas previamente, las cepas de la invención tienen la ventaja de no producir, o producir bajas cantidades de, compuestos malolientes, tales como compuestos volátiles de azufre, ácido valérico, ácido butírico y putrescina. Esto también es relevante cuando se aplica la composición de la invención en la cavidad oral.

Adicionalmente, como corresponde a las cepas usadas como probióticos, las cepas que forman la composición de la invención pertenecen a especies bacterianas que tienen el estatus de "Presunción Calificada de Seguridad" (QPS, por sus siglas en inglés), como se define por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, por sus siglas en inglés). Además, los inventores han encontrado que estas cepas no presentan ninguna resistencia significativa a antibióticos de importancia humana y/o veterinaria (ampicilina, gentamicina, estreptomycin, eritromicina, tetraciclina, clindamicina, y cloranfenicol), descartando así el riesgo de una potencial transferencia de resistencia a antibióticos a especies patógenas.

55 Teniendo en cuenta lo anterior, las cepas de la invención tienen un mejor rendimiento para todos los parámetros relevantes como probiótico oral cuando se compara con cepas comerciales que son conocidas en el estado de la técnica como probióticos orales. Como se muestra en los ejemplos a continuación, las nuevas cepas son más resistentes a las condiciones orales, tienen una mayor capacidad de formar agregados, una mayor (y más amplia) actividad antagonista, una mejor adhesión y/o perfil de acidificación inferior que *Streptococcus salivarius* K12 y

Lactobacillus reuteri ATTC 55730 y *Lactobacillus brevis* CD2. Los protocolos para determinar cada una de dichas propiedades se incluyen más abajo. Adicionalmente, la combinación de ambas cepas de la invención en una única composición resulta generalmente en un rendimiento cooperativo de las cepas en funcionalidades relevantes. En consecuencia, una composición que comprenda ambas cepas es particularmente apropiada para ser usada como un probiótico oral.

Al ejercer varios efectos beneficiosos en el huésped humano, la composición del primer aspecto de la invención es útil como medicamento. Particularmente, cuando se administra la composición que comprende *Lactobacillus plantarum* CECT 7481 y *Lactobacillus brevis* CECT 7480, es útil para la prevención y/o tratamiento de trastornos de la cavidad oral y, preferiblemente, para la prevención y/o el tratamiento de trastornos causados por patógenos de la cavidad oral.

Sin pretender la vinculación a teoría, el efecto beneficioso de las cepas que forman la composición de la invención es el resultado de la mejora del perfil microbiológico de la cavidad oral a favor de una flora oral más saludable. El crecimiento en la cavidad oral de estas bacterias beneficiosas induce una presión ambiental que inhibe el crecimiento de microorganismos patógenos comunes y/o oportunistas. Esta presión ambiental deriva de la competición para sitios de adhesión y nutrientes, la producción de compuestos antimicrobianos y el desplazamiento de patógenos por la agregación de bacterias probióticas.

Un ítem adicional a tener en cuenta es la capacidad de las bacterias probióticas de modular la respuesta inmune. Los mecanismos por los cuales los probióticos modulan la inmunidad han sido ampliamente estudiados en estructuras gastrointestinales. Las especies probióticas han mostrado su capacidad de alterar el equilibrio de citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias secretadas por las células epiteliales. Los probióticos también regulan la respuesta inmune aumentando la inmunidad innata y modulando la inflamación inducida por patógenos a través de vías de señalización reguladas por receptores semejantes a toll. El aumento de la respuesta inmune local, así como de las respuestas inmunes sistémicas por probióticos puede ofrecer nuevas oportunidades para los probióticos en la prevención de infecciones en las superficies de las mucosas periféricas, tales como las de la cavidad oral.

En consecuencia, en un tercer aspecto, la invención proporciona una composición que comprende las cepas de la invención para su uso como un medicamento.

En un cuarto aspecto, la invención proporciona la composición como se define en el primer aspecto de la invención para su uso en la prevención y/o tratamiento de un trastorno de la cavidad oral causado por patógenos orales en un animal, incluyendo un ser humano. Alternativamente, este aspecto puede ser formulado como el uso de una composición como se define en el primer aspecto de la invención para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de un trastorno de la cavidad oral causado por patógenos orales en un animal, incluyendo un ser humano.

La invención también proporciona un método para la prevención y/o tratamiento de un trastorno de la cavidad oral causado por patógenos orales en un animal, incluyendo un ser humano, que comprende la administración a dicho animal que lo necesite de una composición como se define en el primer aspecto de la invención.

El término "trastorno de la cavidad oral causado por patógenos orales" es utilizado en la presente memoria en su más amplio significado como cualquier trastorno o anomalía que puede encontrarse en la cavidad oral que ha sido causado por un patógeno oral tales como bacterias, virus o levaduras. Dicho trastorno puede ser una afección patológica seria, así como una afección trivial o un malestar. De manera ilustrativa caries, gingivitis, periodontitis, candidiasis, herpes y úlceras, así como halitosis, manchas dentales, sensibilidad dental, entre otros, son ejemplos no limitantes de "trastorno de la cavidad oral causado por un patógeno oral".

En una realización del cuarto aspecto de la invención, la composición es usada para el tratamiento y/o la prevención de un trastorno relacionado con la placa dental. Preferiblemente, el trastorno relacionado con la placa dental se selecciona del grupo que consiste en caries, sensibilidad dental, gingivitis y periodontitis.

En otra realización del cuarto aspecto de la invención, la composición es usada para el tratamiento y/o prevención de la halitosis.

En una realización adicional del cuarto aspecto de la invención, la composición es usada para el tratamiento y/o la prevención de la candidiasis.

La composición de acuerdo con la invención que comprende las cepas de la invención puede ser formulada como un producto comestible, cosmético o farmacéutico. Dicha composición puede comprender, además de las cepas de la invención, uno o más agentes activos adicionales y/o excipientes cosméticamente aceptables (en el caso de una composición cosmética), excipientes farmacéuticamente aceptables (en el caso de una composición farmacéutica) o ingredientes comestibles adecuados (en el caso de una composición comestible). En una realización particular de la invención, la composición de la invención comprende además uno o más agentes activos. Preferiblemente, el agente o los agentes activos adicionales son otras bacterias probióticas que no sean antagonistas a las cepas que forman la composición de la invención. Más preferiblemente, el agente o los agentes activos adicionales son adecuados para

tratar y/o prevenir halitosis, candidiasis, caries, sensibilidad dental y/o enfermedades periodontales. Dependiendo de la formulación, las cepas pueden ser añadidas como bacterias purificadas, como un cultivo bacteriano, como parte de un cultivo bacteriano, como un cultivo que ha sido post-tratado, y solas o en combinación con vehículos o ingredientes adecuados. También podrían añadirse prebióticos.

5 La composición puede estar en forma sólida, líquida o gaseosa y entre otros, en forma de polvos, comprimidos, preparaciones en forma de película, soluciones, aerosoles, granulados, pastillas, píldoras, suspensiones, emulsiones, cápsulas, jarabes, líquidos, elixires, extractos, tinturas o extractos fluidos o en una forma que sea particularmente adecuada para la administración oral.

10 En otros aspectos, la invención proporciona una composición farmacéutica que contiene la composición de la invención, junto con excipientes farmacéuticamente aceptables. A este respecto, el producto farmacéutico puede prepararse en cualquier forma adecuada que no afecte negativamente a la biodisponibilidad de las cepas que forman la composición de la invención. La selección de los excipientes y de los métodos más apropiados para la formulación a la vista del propósito particular de la composición está dentro del alcance de los expertos en la materia de la tecnología farmacéutica.

15 El término "farmacéuticamente aceptable", como se usa en la presente memoria, se refiere a compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance del buen juicio médico, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de un sujeto (bien un ser humano o animal no humano) sin una toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación excesivos, en proporción a una relación beneficio/riesgo razonable. Cada vehículo, excipiente, etc. también debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros
20 ingredientes de la formulación. Pueden encontrarse vehículos, excipientes, etc. adecuados en los textos farmacéuticos convencionales.

Otro aspecto de la invención proporciona una composición cosmética que contiene la composición de invención en combinación con excipientes cosméticamente aceptables. En la prevención y/o tratamiento de trastornos orales causados por bacterias patológicas, la composición de la invención es útil para la mejora y/o prevención de los
25 síntomas producidos por estos trastornos. Dichos síntomas incluyen, pero no están limitados a, mal aliento y manchas dentales.

El término "cosméticamente aceptable" se refiere a compuestos, materias, composiciones, y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance del buen juicio médico, adecuados para ser usados en contacto con la piel humana sin toxicidad, incompatibilidad, inestabilidad y respuesta alérgica, entre otros, excesivas. Cada vehículo, excipiente, etc.
30 "cosméticamente aceptable" también debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación cosmética. Pueden encontrarse vehículos, excipientes, etc. adecuados para la formulación cosmética en los textos convencionales.

Las cepas de la invención también pueden incluirse en una diversidad de productos comestibles, tales como productos lácteos, un yogur, una cuajada, un queso (por ejemplo, tipo quark, nata, procesado, blando y duro), una
35 leche fermentada, una leche en polvo, un producto fermentado a base de leche, un helado, un producto a base de cereal fermentado, un polvo a base de leche, una bebida, un aliño y un alimento para mascotas. El término "producto comestible" se usa en la presente memoria en su sentido más amplio, incluyendo cualquier tipo de producto en cualquier forma de presentación que puede ser ingerido por un animal, pero excluyendo productos cosméticos, farmacéuticos y veterinarios. Son ejemplos de otros productos comestibles los productos cárnicos (por ejemplo, paté de hígado, salchichas tipo frankfurt y embutidos de salami o pastas de carne), pastas de chocolate, rellenos (por
40 ejemplo, trufa, nata) y escarchados, chocolate, dulces (por ejemplo, caramelo, glaseados, fondants o toffee), productos horneados (tartas, pasteles), salsas y sopas, zumos de frutas y blanqueadores de café. También se incluyen en el alcance de la invención forrajes para alimentación animal. Las composiciones de la invención también podrían usarse como ingrediente en otros productos alimenticios. Los alimentos funcionales y las fórmulas infantiles
45 son productos comestibles particularmente interesantes.

Por consiguiente, en otro aspecto de la invención, se proporciona una composición comestible que contiene la composición de la invención junto con otros ingredientes comestibles.

El término "ingredientes comestibles" se refiere a ingredientes aptos para ser consumidos, es decir, ser usados como alimento por un animal, preferiblemente pero no de manera limitada a un ser humano, ganado o animales de
50 compañía.

Habitualmente, las composiciones de bacterias probióticas como la descrita en la presente memoria, son consideradas complementos alimenticios. Los complementos alimenticios, también conocidos como suplementos alimenticios o suplementos nutricionales, proporcionan ingredientes beneficiosos que no son habitualmente ingeridos en una dieta normal. Muchos complementos alimenticios son considerados productos para la alimentación,
55 pero en ocasiones son definidos como fármacos, productos naturales saludables, o productos nutraceuticos. En el sentido de la presente invención, los complementos alimenticios también incluyen nutraceuticos. Los complementos alimenticios se venden habitualmente "fuera del mercado regulado", es decir, sin prescripción. En una realización preferida, la composición de la invención es un complemento alimenticio.

Si la composición de acuerdo con la invención se usa como complemento alimenticio, puede administrarse como tal, puede mezclarse con un líquido bebible adecuado, tal como agua, yogur, leche o zumo de frutas, o puede mezclarse con alimentos sólidos o líquidos. En este contexto, el complemento alimenticio puede estar en forma de comprimidos, píldoras, cápsulas, gránulos, polvos, suspensiones, sobres, pastillas, dulces, barritas, jarabes y formas de administración correspondientes, habitualmente en forma de una dosis unitaria. Preferentemente, el complemento alimenticio que comprende la composición de la invención se administra en forma de comprimidos, pastillas, capsulas o polvos, fabricados en procedimientos convencionales de preparación de complementos alimenticios.

Como se puede deducir de lo anterior, los productos que comprendan la composición están destinados para uso en aplicaciones de la salud oral, bien para la prevención o tratamiento de un trastorno oral, o para la mejora de los síntomas derivados de estos trastornos. Por consiguiente, otro aspecto de la presente invención proporciona un producto de cuidado oral que comprende la composición como se menciona con anterioridad, conjuntamente con excipientes farmacéuticos, o excipientes cosméticamente aceptables u otros ingredientes comestibles.

En el sentido de la presente invención, bien puede ser que la composición sea un producto oral, que en su uso común no se traga intencionadamente para propósitos de administración sistémica de los agentes terapéuticos particulares, sino que se retiene en la cavidad oral durante un tiempo suficiente para estar sustancialmente en contacto con todas las superficies dentales y/o tejidos orales para finalidades de actividad oral. Ejemplos no limitantes de tales productos son pasta de dientes, dentífricos, polvos dentales, geles orales tópicos, enjuagues orales, productos para dentaduras postizas, pulverizadores orales, gomas de mascar, hilo dental o cintas dentales. La composición oral puede ser una composición oral de una fase o puede ser una combinación de dos o más composiciones orales.

En una realización, el producto de cuidado oral es una goma de mascar, una pasta dentífrica, un pulverizador oral, una pastilla o un comprimido de dispersión oral. Preferiblemente, los productos de cuidado oral están en la forma de pastillas o comprimidos de dispersión oral.

Los productos de cuidado oral de la presente invención pueden también comprender otros agentes oralmente activos, tales como productos blanqueadores dentales, incluyendo agentes blanqueadores u oxidantes tales como peróxidos, perboratos, percarbonatos, peroxiácidos, persulfatos, cloritos metálicos, y sus combinaciones. Las sustancias modificadoras del color de los dientes también pueden considerarse entre los agentes activos para el cuidado oral útiles en la presente invención. Los productos de cuidado oral pueden adicionalmente comprender compuestos aromáticos como el mentol.

Las cepas que forman la composición de la invención están preferiblemente en forma de células viables. No obstante, las cepas de la invención también pueden estar en forma de células no viables tales como cultivos inactivados o composiciones que contengan factores beneficiosos producidos por *Lactobacillus plantarum* CECT 7481 y *Lactobacillus brevis* CECT 7480. Pueden incluirse microorganismos inactivados térmicamente o microorganismos inactivados por exposición a un pH alterado, sonicación, radiación o sometidos a presión. Con un producto de células no viables la preparación es más simple, las células pueden ser incorporadas fácilmente en un producto comercial y los requerimientos de almacenamiento son mucho menos limitados que con células viables.

Cuando se usan en la forma de la composición de la invención, las cepas pueden estar en cualquier relación de concentración adecuada para el uso deseado. Por ejemplo, las bacterias pueden estar en una relación de concentración que esté comprenda entre 3:1 y 1:3 (*Lactobacillus plantarum* CECT 7481 : *Lactobacillus brevis* CECT 7480). Preferiblemente, la relación de concentración es 1:1. Además, las cepas de la invención se incluyen en la composición en una cantidad eficaz para el uso requerido.

El término "cantidad eficaz" como se usa en la presente memoria es la cantidad de unidades formadoras de colonias (cfu, por sus siglas en inglés) para cada cepa en la composición que es suficientemente elevada para modificar significativamente de manera positiva la afección a tratar, pero suficientemente baja para evitar efectos secundarios serios (en una relación beneficio/riesgo razonable), dentro del alcance del buen juicio médico. Una cantidad eficaz de dicho microorganismo probiótico será determinada por un experto en la materia y variará dependiendo de la finalidad particular a conseguir, la edad y las condiciones físicas del paciente a ser tratado, la severidad del trastorno subyacente, y la formulación final. Por ejemplo, en productos de salud oral, la cepa o cepas están presentes en una cantidad de aproximadamente 10^5 cfu/g a aproximadamente 10^{12} cfu/g, preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 10^7 cfu/g a aproximadamente 10^{11} cfu/g. El término "unidad formadora de colonias" ("cfu") se define como número de células bacterianas determinado por los recuentos microbiológicos en placas de agar. En una realización particular, la composición de la invención es un producto de cuidado oral que comprende entre 10^7 - 10^{10} cfu/g.

Los complementos alimenticios contienen habitualmente cepas probióticas en una cantidad que oscila entre las 10^5 y las 10^{12} cfu/g. En una realización particular, la composición de la invención es un complemento alimenticio que comprende entre 10^7 - 10^{10} cfu/g.

Las cepas de la invención se producen por cultivo de las bacterias en un medio adecuado y en condiciones adecuadas. Las cepas pueden cultivarse en solitario para formar un cultivo puro, o como un cultivo mixto junto con

otros microorganismos, o por cultivo de bacterias de diferentes tipos por separado y después combinando las mismas en las proporciones deseadas. Después del cultivo, la suspensión celular se recupera y se usa como tal o es tratada de la forma deseada, por ejemplo, por concentración o liofilización, para emplearse después en la preparación de los productos. A veces la preparación probiótica se somete a un procedimiento de inmovilización o encapsulación para mejorar la vida útil. En el estado de la técnica se conocen varias técnicas para la inmovilización o encapsulación de bacterias. En una realización particular, las cepas que forman parte de una composición de la invención se incorporan en un producto de cuidado oral como bacterias encapsuladas.

Como será evidente para un experto en la materia, el *Lactobacillus plantarum* CECT 7481 y el *Lactobacillus brevis* CECT 7480 son efectivos no sólo cuando son combinados en una única composición, sino también cuando son usados por sí solos, o en dos composiciones diferentes administradas simultáneamente, secuencialmente o de manera separada después de un cierto periodo de tiempo. Además, el experto en la materia entenderá que una de las cepas puede ser prescrita para ser usada conjuntamente con la otra cepa para la salud oral para la prevención o el tratamiento de trastornos orales, particularmente trastornos que son producidos por patógenos orales, más preferiblemente trastornos relacionados con la placa dental y/o la halitosis y/o la candidiasis.

En consecuencia, otro aspecto más de la invención proporciona *Lactobacillus plantarum* CECT 7481.

Finalmente, otro aspecto de la invención proporciona *Lactobacillus brevis* CECT 7480.

Las cepas de la invención se describen en la presente memoria por primera vez y por lo tanto son nuevas. Como se muestra en la FIG 1, ambas cepas, *Lactobacillus plantarum* CECT 7481 y *Lactobacillus brevis* CECT 7480, tienen diferentes patrones de electroforesis en gel de campo pulsante que cepas de lactobacilos comerciales estrechamente relacionadas, tales como *Lactobacillus plantarum* 299v, *Lactobacillus plantarum* VSL#3, *Lactobacillus casei* VSL#3 y *Lactobacillus casei* DN 114.001.

Algunos documentos del estado de la técnica describen composiciones que comprenden cepas de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus brevis*. No obstante, la composición de la invención es nueva con respecto a dichas composiciones.

En particular, KR100780030 describe una leche de soja fermentada que comprende cepas de *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus plantarum*. Las cepas descritas se aíslan del kimchi, una comida típica de Corea que consiste en vegetales fermentados. Por el contrario, las cepas de la invención fueron aisladas a partir de saliva de niños de una región en vías de desarrollo de Sudamérica, donde no se consume kimchi. Por lo tanto, las cepas de *L. brevis* y *L. plantarum* de la invención tienen un origen completamente diferente, lo que significa que ni *Lactobacillus plantarum* CECT 7481 ni *Lactobacillus brevis* CECT 7480 son las mismas que las cepas coreanas a las que se hace referencia.

Otra solicitud de patente coreana, KR100866504, describe un ginseng rojo fermentado usando *Lactobacillus plantarum* P2 (número de depósito de microorganismo KCTC11391BP) y/o *Lactobacillus brevis* M2 (número de depósito de microorganismo KCTC11390BP). Estas cepas se aíslan del ginseng. De nuevo, las cepas coreanas descritas tienen un origen completamente diferente que las cepas de la invención, ya que fueron aisladas de una planta que no se consume en regiones en vías de desarrollo de Sudamérica. Esto hace imposible que *Lactobacillus plantarum* CECT 7481 o *Lactobacillus brevis* CECT 7480 sean las mismas que las cepas coreanas a las que se hace referencia.

Las solicitudes internacionales de patente WO2005/082157 y WO02/39825, describen nuevamente combinaciones de cepas de *L. plantarum* y *L. brevis*. La cepa *L. brevis* LBR01 descrita en la composición de WO2005/082157 fue aislada de pepinillos encurtidos en mostaza de Taiwan. El *L. brevis* C21 descrito en las composiciones de WO 02/39825 se aisló de un tofu de Mongolia. Al igual que antes, de acuerdo al origen completamente diferente de estas cepas de *L. brevis* es imposible que sean la misma cepa que la de la presente invención. Además, las cepas *L. brevis* LBR01 y *L. brevis* C21 descritas no parecen estar accesibles al público.

Adicionalmente, WO 2006/080035 describe una composición ginecológica que contiene *Lactobacillus brevis* CD2 y una cepa de *Lactobacillus plantarum* no especificada, junto con una cepa de *L. salivarius*. No obstante, la cepa *L. brevis* CD2 es diferente del *Lactobacillus brevis* CECT 7480. Como se muestra en la TABLA 4, cuando se combina la cepa *Lactobacillus plantarum* CECT 7481 con *L. brevis* CD2 se observa un efecto antagonista con respecto a la capacidad de formar agregados. Por el contrario, la combinación de *Lactobacillus plantarum* CECT con *Lactobacillus brevis* CECT 7480 conlleva una mayor capacidad de formar agregados. Adicionalmente, se ha demostrado que la cepa *L. brevis* de la invención tiene un perfil de acidificación significativamente más bajo en comparación con la cepa comercial *L. brevis* CD2 (ver TABLA 5). Por lo tanto, *Lactobacillus brevis* CECT 7480 no solo es diferente de *L. brevis* CD2, sino que también son más adecuadas para aplicaciones de salud oral. En conjunto, teniendo efectos diferentes, la combinación de la invención es diferente de la descrita en WO 2006/080035.

Ricci et al. describe los efectos anti-inflamatorios de *L. brevis* (CD2) en enfermedades periodontales (Riccia D. N. Della et al. Anti-inflammatory effects of *L. brevis* (CD2) on periodontal disease" Oral Diseases 2007, vol. 13, no. 4, páginas 376-385). La cepa de *L. brevis* CECT 7480 presenta una actividad inhibitoria ventajosa frente a los patógenos de la gingivitis y periodontales sobre *L. brevis* CD2.

WO 02/018542 menciona que las cepas de *Lactobacillus* encontradas frecuentemente en el queso cheddar incluyen *L. brevis* y *L. plantarum* y la solicitud de patente FR2448865 (página 10, líneas 11-17) describe una composición que contiene *L. plantarum* a la cual puede añadirse *L. brevis*. No obstante, estos documentos no describen una composición que contenga una cepa de *L. brevis* específica y una cepa de *L. plantarum* específica. Por lo tanto, la composición de la invención que comprende una cepa de *L. brevis* específica, es decir *Lactobacillus brevis* CECT 7480, y una cepa de *L. plantarum* específica, es decir *Lactobacillus plantarum* CECT 7481, es nueva.

La capacidad de antagonizar tanto *Fusobacterium nucleatum* como *Treponema denticola* por una cepa de *Lactobacillus* no se ha descrito en la técnica anterior. Además, esta característica no es inherente a *Lactobacillus* ya que se demuestra por la existencia de otras cepas de *Lactobacillus* que no tienen esta característica. Testa et al. describe que ninguna de las cepas de *Lactobacillus* (*L. casei*, *L. salivarius*, *L. rhamnosus* o *L. plantarum*) aisladas de saliva, inhibieron el crecimiento de cepas de *F. nucleatum* (y *P. intermedia*) aisladas de bolsillos periodontales, independientemente del método o medio de cultivo usados (Testa M.M. et al. "Antagonistic interactions among *Fusobacterium nucleatum* and *Prevotella intermedia* with oral *Lactobacilli*", Research in Microbiology, vol. 154 (2003), p. 669-675).

A lo largo de la descripción y reivindicaciones, la palabra "comprende" y sus variaciones no pretenden excluir otras características, aditivos, componentes o etapas técnicas. Los objetos, ventajas y características adicionales de la invención se harán evidentes para los expertos en la materia tras el examen de la descripción o pueden aprenderse mediante la práctica de la invención. Además, la presente invención abarca todas las combinaciones posibles de realizaciones particulares y preferidas descritas en la presente memoria. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo ilustrativo, y no se pretende que sean limitantes de la presente invención.

Breve descripción de las figuras

FIG. 1. Patrones de electroforesis de campo pulsante de ADN genómico digerido por restricción con *Sfi*-I (A, B) y *Sma*-I (C, D) de: 1, *Lactobacillus plantarum* CECT 7481 (F2096); 2, *Lactobacillus plantarum* 299V; 3, *Lactobacillus plantarum* VSL#3; 4, *Lactobacillus brevis* CECT 7480 (I3141); 5, *Lactobacillus casei* VSL#3; 6, *Lactobacillus casei* DN 114.001. M significa marcador molecular.

Ejemplos

Las siguientes secciones describen la caracterización de las cepas de la invención y sus características probióticas específicas en relación a aplicaciones de salud oral.

1. Aislamiento de microorganismos

Las nuevas cepas F2096 y 12141 se aislaron de la saliva de niños de 0-5 años de una región tropical en vías de desarrollo de Sudamérica. La saliva se disolvió en tampón PBS (pH 7,4), se alicuotó y sembró en placas de agar MRS (Man Rogosa Sharp, Sigma-Aldrich Chem, España) suplementado con 10 µg/ml de vancomicina (SIGMA). Las cepas se cultivaron en condiciones microaerófilas (5% CO₂) a 37°C. Una vez crecidas, las cepas aisladas se guardaron por liofilización en PBS 0,1X con un 15% de polvo de leche desnatada.

Las cepas F2096 y 13141 fueron identificadas como *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus brevis*, respectivamente (ver sección 2 a continuación). Ambas cepas fueron depositadas en la Colección Española de Cultivos Tipo (Universidad de Valencia, Campus de Burjassot, Edif. de Investigación, 46100 Burjassot, Valencia, España). Se depositó el *Lactobacillus plantarum* (cepa F2096) el 21.01.2009 y se le proporcionó el número de acceso 7481. Se depositó el *Lactobacillus brevis* (cepa I3141) el 18.02.2009 y se le proporcionó el número acceso 7480. Las dos cepas depositadas son viables y mantienen todas sus características relativas a su depósito.

Tal y como se usa de aquí en adelante, la cepa F2096 corresponde a *Lactobacillus plantarum* CECT 7481 y la cepa 13141 a *Lactobacillus brevis* CECT 7480.

Pediococcus acidilactici F2019 (en adelante denominada *P. acidilactici*), *Lactobacillus paracasei* 13152 (en adelante denominada *L. paracasei*) y *Pediococcus pentosaceus* 154 (en adelante denominada *P. pentosaceus*) fueron aisladas de la saliva humana como se ha explicado anteriormente. El *Streptococcus salivarius* K12 fue aislado a partir del producto comercial BLIS K12[®] en TBS (caldo de soja con tripticasa) y cultivado en condiciones aeróbicas a 37°C. La cepa de *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 se aisló del producto comercial Reuteri Drops[®], *Lactobacillus plantarum* 299v de Poviva[®], *Lactobacillus brevis* CD2 de Inersan[®], *Lactobacillus plantarum* VSL#3 y *Lactobacillus casei* VSL#3 de VSL#3[®], y *Lactobacillus casei* DN 114.001 de Actimel[®]. Todas estas últimas cepas se aislaron en MRS, y se cultivaron a 37°C con un 5% de CO₂. Las cepas potencialmente patógenas *Porphyromonas gingivalis* CIP 103683, *Fusobacterium nucleatum* CIP 104988, *Treponema denticola* CIP 103917 y *Prevotella denticola* CIP 104478T se obtuvieron del Instituto Pasteur, y se cultivaron de acuerdo a las instrucciones del proveedor. El *Streptococcus mutans* de origen clínico se cultivó en Agar Corazón-Cerebro a 37°C y 5% de CO₂. La identificación de las cepas se realizó por secuenciación.

55

2. Caracterización taxonómica de las cepas

2.1. Identificación genética de género y especie.

A) Métodos

Las cepas de la invención se cultivaron durante la noche en medio MRS (pH 6,4) a 37°C en una atmósfera que contenía un 5% de CO₂. Las bacterias se recuperaron, se lavaron y resuspendieron en tampón de pre-lisis (480 µl de EDTA 50 mM pH 8,0; 120 µl de lisozima 10 mg/ml), y fueron posteriormente incubadas a 37°C durante 60 minutos. El ADN se extrajo usando un kit de purificación de ADN genómico Wizard (Promega). Tras la centrifugación de las bacterias pre-tratadas a 14.000 g durante 2 minutos para eliminar el sobrenadante, se siguió el protocolo de Promega. Brevemente, las bacterias fueron resuspendidas en Solución de Lisis Nuclear y se incubaron a 80°C durante 5 minutos, después se enfriaron a temperatura ambiente. Los lisados celulares se incubaron en una solución de ARNasa a 37°C durante 60 minutos y las proteínas se precipitaron añadiendo Solución de Precipitación Proteica y agitando con vórtex a alta velocidad. Las muestras se enfriaron y centrifugaron a 15.000 g durante 3 minutos. Los sobrenadantes que contenían el ADN se transfirieron a tubos de microcentrifuga de 1,5 ml limpios y se mezclaron por inversión con 600 µl de isopropanol. El ADN se recuperó por centrifugación a 15.000 g durante 2 minutos y eliminando por vertido cuidadosamente el sobrenadante. Las muestras de ADN se lavaron con 600 µl de etanol al 70% invirtiendo suavemente el tubo varias veces. El etanol se eliminó por aspiración, después de centrifugar a 15.000 g durante 2 minutos. Finalmente, el sedimento de ADN se resuspendió en 100 µl de Solución de Rehidratación incubando a 65°C durante 1h. Las muestras se almacenaron a 2-8°C.

El 16S ARNr fue amplificado por PCR usando los cebadores universales Eub27f y Eub1492r, que producen un fragmento cercano a la secuencia completa de 16S (más de 1.000 nucleótidos) (TABLA 1). Después, el ADN obtenido como se ha explicado anteriormente se lavó usando el kit Quiquick (Quiagene).

Para cada muestra se realizaron cuatro reacciones consecutivas de secuenciación en un Analizador Genético 3130 (Applied Biosystems) utilizando un kit BigDye v.3.1, utilizando los cebadores que se muestran en la TABLA 1. La recogida de datos y cromatogramas se realizó utilizando el software DNA Sequence Analysis v.5.2. (Applied Biosystems) y se revisó por análisis visual con Chromas (Technelysium Pty Ltd.) y BioEdit (Ibis Biosciences).

La identificación del género se realizó mediante la herramienta Ribosomal Database Project (Wang Q, et al., "Naive Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy", Appl Environ Microbiol, 2007, vol. 73, p. 5261-5267). La identificación de la especie se realizó por comparación de la secuencia obtenida con secuencias 16S de organismos conocidos a partir de las bases de datos RefSeq (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>) mediante un BLASTN, y del Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/>, J.R. Cole et al., "The Ribosomal Database Project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data", Nucl. Acids Res., 2007, vol. 35, p. 169-172).

Tabla 1. Cebadores usados para la amplificación y secuenciación del gen 16S

Etapa	Cebador	Orientación	Secuencia 5' → 3'
Amplificación	Eub27f	directa	GAGTTTGATCCTGGCTCAG (SEQ ID NO: 1)
	Eub1492r	inversa	TACGGYTACCTTGTTACGACTT (SEQ ID NO: 2)
Secuenciación	27f	directa	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG (SEQ ID NO: 3)
	357f	directa	CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGGCCCGCC
			GCCCCGCCCCCTACGGGAGGCAGCAG (SEQ ID NO: 4)
	907r	inversa	CCGTCAATTCCTTTGAGTTT (SEQ ID NO: 5)
	1492r	inversa	GGTTACCTTGTTACGACTT (SEQ ID NO: 6)

B) Resultados

La herramienta RDP (Ribosomal Database Project) identificó la cepa F2096 como perteneciente a la especie *Lactobacillus plantarum* y la cepa 13141 perteneciente a la especie *Lactobacillus plantarum*.

2.2. Genotipado de las cepas

A) Métodos

La caracterización se realizó por digestión genómica y electroforesis en gel de campo pulsante. Las cepas F2096 y 13141 fueron sometidas a un protocolo descrito previamente (Rodas AM, et al. "Polyphasic study of wine *Lactobacillus* strains: taxonomic implications", Int J Syst Evol Microbiol, 2005, vol. 55, p. 197-207). Las cepas comerciales *Lactobacillus plantarum* 299V, *Lactobacillus plantarum* VSL#3, *Lactobacillus casei* VSL#3 y

Lactobacillus casei DN 114.001 también fueron incluidas en el ensayo como cepas control. Todas las cepas se crecieron en placas de agar MRS e incubadas a 37°C, 5% de CO₂ durante 18h. Las células fueron recuperadas y lavadas 3 veces en 8 ml de PET (Tris 10 mM pH 7,6, NaCl 1 M), y posteriormente centrifugadas 10 min a 6.000 rpm. Los sedimentos fueron resuspendidos en 700 µL de tampón de lisis (Tris 6 mM, NaCl 1 M, EDTA 0,1 M, SLS 0,5%, ácido desoxicólico 0,2%; 1 mg/ml de lisozima; 40 U/ml de mutanolisina; 20 (g/ml ARNasa). A las células resuspendidas se añadió un volumen igual de agarosa de bajo punto de fusión al 1,6% (FMC BioProducts, Rockland, ME, EEUU) y se permitió la solidificación a 4°C durante 1h. Los insertos fueron transferidos a 2 ml de tampón de lisis II (EDTA 0,5 M pH 9,2, 1% N-lauril sarcosina y 1 mg/ml pronasa) e incubados a 50°C durante 48 h. A continuación, se lavaron los insertos a temperatura ambiente con tampón TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM pH 8,0). La digestión total del ADN se realizó mediante enzimas de restricción *Sfi*-I y *Sma*-I (Roche Diagnostics).

La electroforesis de campo pulsante se realizó utilizando un aparato CHEF DRIII (BioRad Laboratories). Los insertos se cargaron en un gel de agarosa al 1% (SeaKem ME agarose, FMC BioProducts, ME, EEUU). La TABLA 2 describe las condiciones de electroforesis para cada enzima. Los marcadores de peso molecular de ADN fueron Lambda ladder PFG Marker y Low Range PFG Marker (New England Biolabs). Después de la electroforesis, las cepas fueron teñidas con bromuro de etidio y UV usando GelDoc System (BioRad).

Tabla 2. Condiciones de electroforesis para el ADN genómico digerido por restricción con *Sfi*-I y *Sma*-I de las cepas F2096 y 13141.

Enzima	Bloque	Pulso Inicial (seg)	Pulso final (seg)	Tiempo (horas)
<i>Sfi</i> -I	1	2	10	10
	2	15	25	6
<i>Sma</i> -I	1	0,5	5	16

B) Resultados

Como se muestra en la FIG. 1, los patrones de restricción con *Sfi*-I y *Sma*-I por electroforesis de campo pulsante para la cepa F2096 fueron diferentes de los de las cepas comerciales *Lactobacillus plantarum* 299v y *Lactobacillus plantarum* VSL#3, mientras que los patrones de restricción para 13141 fueron diferentes de los de las cepas comerciales estrechamente relacionadas de *Lactobacillus casei*. Por lo tanto, se puede concluir que las cepas F2096 y 13141 son cepas nuevas.

3. Capacidad de antagonizar patógenos

A) Métodos

Con la finalidad de evaluar si las cepas F2096 y 13141 presentan capacidad antagonista, se siguió el protocolo de Campbell utilizando placas de agar sembradas con bacterias patógenas en medio Oxoid. Los patógenos utilizados para el estudio fueron seleccionados entre los comúnmente presentes en la cavidad oral humana (ver TABLA 1). Resumidamente, F2096, 13141 y *P. acidilactici*, otra cepa aislada de la saliva humana, fueron cultivadas durante la noche, cada una en las condiciones específicas comentadas con anterioridad. Tras la incubación, los cultivos se estandarizaron a 10⁸ cfu/ml y se prepararon los siguientes cultivos mixtos: F2096 + 13141, F2096 + *P. acidilactici*, y 13141 + *P. acidilactici*. Los cultivos mixtos contenían una misma cantidad de cada una de sus cepas constituyentes y la misma concentración de bacterias total que los cultivos de las cepas por separado, es decir, 10⁸ cfu/ml. Un volumen fijo de cada uno de los cultivos de las cepas por separado y los cultivos mixtos se sembró en placas uniformemente y se creció hasta la confluencia a las temperaturas apropiadas en un incubador con un 5% de CO₂. Después, las secciones de cilindros de tamaño uniforme de las placas de agar confluyentes se situaron cara a cara sobre las placas de patógenos y se incubaron durante la noche a 37°C.

Al día siguiente, se midieron las zonas de inhibición situando las placas de agar sobre una regla plana. Las propiedades antagonistas de las cepas se midieron como la actividad inhibidora del crecimiento (GIA, por sus siglas en inglés), que se calculó sustrayendo el diámetro del cilindro (CD, por sus siglas en inglés) del diámetro de la zona de inhibición (IZD, por sus siglas en inglés) y dividiendo esta diferencia entre dos siguiendo la fórmula $GIA = (IZD - CD) / 2$. Las capacidades inhibidoras de las cepas de esta invención fueron comparadas con las de las cepas probióticas orales comerciales *Streptococcus salivarius* K12 y *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730.

B) Resultados

Las actividades inhibidoras del crecimiento de las cepas F2096 y 13141 se muestran en la TABLA 3. Los resultados son el promedio de experimentos realizados por triplicado.

Tabla 3. Actividad inhibidora del crecimiento contra patógenos orales

	<i>P. gingivalis</i>	<i>F.nucleatum</i>	<i>T.denticola</i>	<i>P.denticola</i>	<i>S.mutans</i>	F2096	13141
F2096	1	4	4,5	NI	2	-	NI
13141	NI	7	1	0,5	2	NI	-
F2096 + 13141	1,5	9	4,5	1	4	-	-
F2096 + <i>P.acidilactici</i>	0,5	1	4	NI	1	-	-
13141+ <i>P.acidilactici</i>	NI	5	0,5	NI	NI	-	-
<i>S. salivarius</i>	NI	NI	1	0.5	1	-	-
<i>L. reuteri</i>	NI	0,5	NI	0,75	1	-	-
NI, no inhibición							

Como puede observarse por los presentes resultados, P2096 y 13141 tienen un amplio patrón de inhibición contra patógenos orales. Esto es especialmente relevante para *P. gingivalis*, dado que un estudio preliminar mostró que la actividad antagonista contra este patógeno es poco común (resultados no mostrados). Además, cabe mencionar que la combinación de F2096 y 13141 en un cultivo mixto presenta una actividad antagonista superior contra patógenos orales en comparación con la actividad de las cepas individuales usadas por separado como cultivos individuales - cabe destacar que la concentración de cada cepa en los cultivos mixtos es la mitad que la usada en los cultivos individuales, en consecuencia el efecto antagonista de la combinación es superior a la suma de los efectos individuales de estas cepas-. Este efecto sinérgico no tiene lugar cuando cada una de las cepas se combina con otra cepa colonizadora de la cavidad oral, *P. acidilactici*. Por lo tanto, las cepas de la invención presentan una actividad sinérgica contra patógenos orales y son especialmente útiles cuando se utilizan en una única fórmula.

Cuando se comparan con los probióticos comerciales *Streptococcus salivarius* K12 y *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730, las cepas de la invención tienen una capacidad antagonista significativamente superior. Finalmente, F2096 y 13141 presentaron un antagonismo mínimo entre ellas o cepas comensales comunes de la flora oral humana.

4. Formación de agregados

A) Métodos

La capacidad de formar agregados fue evaluada monitorizando la disminución de la densidad óptica a 620 nm de cultivos de toda la noche debido a la formación de agregados y precipitación. El valor de la capacidad de agregación porcentual (%AC) se obtuvo usando la siguiente fórmula: $\%AC = (1 - (DO_f / DO_{i0}) / 100$, donde DO_f y DO_{i0} son las densidades ópticas a tiempo final e inicial, respectivamente. La DO a tiempo inicial se ajustó de manera que todos los cultivos contenían un número equivalente de cfu/ml. Los cultivos combinados se prepararon mezclando una cantidad apropiada de las cepas individuales para obtener las cfu/ml totales deseadas que contuviesen un 50% de cada cepa.

B) Resultados

La capacidad de formar agregados es importante para cepas probióticas con aplicaciones para la salud oral porque permite que dichas cepas inhiban o reduzcan la placa dental interfiriendo con la formación de biopelícula de patógenos.

Los valores promedio de la capacidad de agregación para las nuevas cepas y su combinación entre ellas o con *P. acidilactici* o *L. brevis* CD2 en comparación a las cepas control se muestran en la TABLA 4. Estos resultados demuestran claramente que las nuevas cepas aisladas mostraron una capacidad de agregación muy buena, significativamente superior que ambos controles comerciales *S. salivarius* K12 y *L. reuteri* ATCC 55730. Además, la formación de agregados por las cepas de la invención incrementa cuando las dos cepas se combinan en un cultivo mixto, lo que significa que las cepas son más efectivas desplazando las bacterias patógenas cuando se combinan en una única composición. Sin embargo, esta cooperación no está presente cuando las cepas de la invención son combinadas por separado con otras cepas con una buena capacidad de agregación, tales como *P. acidilactici* y *L. brevis* CD2. Adicionalmente, cuando se combinan las cepas de la invención con *L. brevis* CD2, se observa un efecto antagonista, lo que significa que las cepas de la invención son menos efectivas desplazando bacterias patógenas cuando se combinan con *L. brevis* CD2.

Tabla 4. Capacidad de agregación (%)

CEPA	Capacidad de agregación (%)
F2096	56,00
I3141	22,73
F2096 + I3141	64,73
F2096 + <i>P. acidilactici</i>	55,50
I3141 + <i>P. acidilactici</i>	23,30
<i>L. brevis</i> CD2	24,70
F2096 + <i>L. brevis</i> CD2	36,31
I3141 + <i>L. brevis</i> CD2	28,50
<i>S. salivarius</i>	16,67
<i>L. reuteri</i>	0,00

5. Producción de ácido

A) Métodos

5 Se evaluó la capacidad de las nuevas cepas para producir ácido cuando se crecen en medio de cultivo suplementado con diferentes azúcares presentes en la dieta humana. Las cepas se crecieron durante 18 h a 37°C y un 5% de CO₂ en el siguiente medio: MRS y medio mínimo suplementado con un 4% de glucosa, 4% de fructosa, 4% de lactosa ó 4% de sacarosa. El medio mínimo contenía 2 g/L de agua peptonada, 2 g/L de extracto de levadura, 0,1 g/L de NaCl, 0,04 g/L de K₂HPO₄, 0,04 g/L de KH₂PO₄, 0,01 g/L de MgSO₄*7H₂O, 0,01 g/L de CaCl₂*6H₂O, 2 g/L de NaHCO₃, 0,05 g/L de hemina (disuelta en unas pocas gotas de NaOH 1mol/L), 0,5 g/L de cisteína HCl, 0,5 g/L de sales biliares, 2 g/L de Tween 80, y 10 µl de vitamina K1 (todos los componentes se obtuvieron en Sigma-Aldrich Chem, España). Se ajustaron los cultivos a pH 7 con HCl. El pH y el número de células viables (cfu/ml) se midieron al final del tiempo de incubación. El valor de producción de ácido para cada medio de cultivo se obtuvo mediante la siguiente fórmula: valor PA= pH * log (cfu/ml).

15 B) Resultados

De acuerdo con la fórmula representada anteriormente, los valores bajos corresponden a cepas altamente acidogénicas. Una producción elevada de ácido es un efecto secundario indeseado para los probióticos orales, ya que promueve la formación de caries. El valor de producción de ácido para F2096 y I3141 y varias cepas control de probióticos crecidas en diferentes azúcares puede observarse en la TABLA 5, junto con los valores obtenidos para cepas comerciales. MM indica medio mínimo.

Tabla 5. Producción de ácido

cepa	MRS	MM+Gluc	MM+Fruc	MM+Lac	MM+Sac
F2096	32,7	30,34	28,56	31,45	31,67
I3141	42,04	48,28	45,24	58,24	59,12
<i>L. brevis</i> CD2	26,45	31,24	24,24	21,45	24,20
<i>S. salivarius</i>	41,37	29,69	31,31	28,03	29,85
<i>L. reuteri</i>	36,75	49,19	45,67	34,01	57,39
<i>L. paracasei</i>	27,38	19,53	8,21	5,98	20,52
<i>P. pentosaceus</i>	24,7	11,34	13,23	12,56	17,45
<i>P. acidilactici</i>	22,6	15,61	11,10	16,45	22,14

Estos resultados demuestran que el crecimiento de las cepas F2096 y 13141 en diferentes azúcares conlleva una producción de ácido remarcablemente pobre en comparación con otras cepas bacterianas que también han sido aisladas de la cavidad oral, concretamente, *L. paracasei*, *P. pentosaceus* y *P. acidilactici*. Las cepas de la invención son también menos acidogénicas que las cepas probióticas orales comerciales *S. salivarius* K12. Adicionalmente, la cepa 13141 tiene un perfil de acidificación inferior en comparación a *L. reuteri* ATCC 55730, el cual es conocido por ser particularmente poco acidogénico y se comercializa como un probiótico anti-cariogénico. También vale la pena destacar que la cepa de *L. brevis* 13141 de la invención tiene un perfil de acidificación significativamente inferior en comparación con *L. brevis* CD2 comercial. En consecuencia, las cepas F2096 y 13141 tienen un perfil de acidificación bajo, siendo por lo tanto adecuadas para aplicaciones de salud oral.

6. Producción de compuestos volátiles malolientes

A) Métodos

La producción de compuestos volátiles malolientes por parte de las nuevas cepas se determinó por medio de una evaluación sensorial cuando se crecieron en un medio de cultivo parecido a la dieta humana. Resumidamente, las cepas se crecieron en el medio que contenía glucosa (0,5% p/v), fructosa (0,5% p/v), extracto de levadura (1% p/v), extracto de carne (1% p/v), células eucariotas (200 células/ml) y pectina (0,5% p/v) durante 48 h a 37°C y un 5% de CO₂. Se asignó un valor de producción de mal olor a las cepas entre 1 y 5, donde 1 es ausencia de mal olor y 5 es un olor muy desagradable.

B) Resultados

La producción de compuestos malolientes es muy indeseable para un probiótico oral. Sin embargo, las cepas de la invención no produjeron ningún olor desagradable cuando se crecieron en un medio de cultivo parecido a la dieta humana.

Tabla 6. Producción de olores desagradables

Cepa	Valor de mal olor
F2096	2
13141	2
<i>S. salivarius</i>	2
<i>L. reuteri</i>	3

7. Supervivencia en condiciones orales

A) Métodos

La supervivencia de las cepas en la cavidad oral se estudió sometiéndolas a condiciones de estrés oral. $5 \cdot 10^7$ cfu de cada cepa bacteriana se inoculó en placas de cultivo de 96 pocillos en 200 µl de medio MRS, en el caso de F2096, 13141 y *L. reuteri* ATCC 55730, o Caldo de Soja Tríptico (TSB, Oxoid) en el caso de *S. salivarius* K12. Los cultivos se suplementaron con concentraciones fisiológicas de lisozima (Sigma-Aldrich Chem, España) o peróxido de hidrógeno (Sigma-Aldrich Chem, España). Las placas fueron incubadas a 37°C y un 5% de CO₂ durante seis horas. El crecimiento bacteriano fue cuantificado midiendo la densidad óptica a 620 nm. El valor de crecimiento bacteriano se obtuvo por comparación con el crecimiento conseguido por la misma cepa en medio MRS estándar sin suplementos.

B) Resultados

Un valor de supervivencia global porcentual (% SV) se calculó como sigue: $\% SV = [(DO_{tf} - DO_{t0} \text{ (con suplemento)}) / (DO_{tf} - DO_{t0} \text{ (sin suplemento)})] \cdot 100$, donde DO es la densidad óptica, y tf y t0 son el tiempo final y el tiempo inicial, respectivamente. Los siguientes valores son el promedio de los resultados por triplicado:

Tabla 7. Supervivencia a las condiciones orales

	MRS/TSB	MRS/TSB	MRS/TSB
Cepa	Lisozima 2x10 ⁵ U/ml	H ₂ O ₂ 1mM	H ₂ O ₂ 2,5mM
F2096	44,41	98,78	62,60
I3141	0,58	42,06	84,28
<i>S. salivarius</i>	0,50	18,89	28,78
<i>L. reuteri</i>	-17,46	31,32	-8,03

Las nuevas cepas F2096 y 13141 mostraron una resistencia al estrés oral mejor que las cepas comerciales *S. salivarius* K12 y *L. reuteri* ATCC 55730.

5 8. Capacidad de adherencia a los tejidos orales

A) Métodos

10 Se realizó un ensayo de adhesión *in vitro* de F2096, 13141 y cepas control comerciales a lengua de cerdo, células Caco-2 (para simular la encía) y perlas de hidroxiapatita (HA) (para simular los dientes). Cada cepa fue incubada toda la noche con 10µl/ml de 5-[3H]timidina (1,0 µCi/ml, Amersham Biosciences, Reino Unido). Las preparaciones fueron centrifugadas y los sedimentos se resuspendieron en tampón PBS a una concentración de 10⁸ cfu/ml. La señal de tritio incorporado a los microorganismos se calcula a partir de la señal inicial de tritio y la señal del sobrenadante en un lector de centelleo (Wallac 1410). La relación entre este número (señal incorporada a la biomasa) y el número total de microorganismos en los cultivos resulta en cpm/cfu (señal/bacteria).

15 La determinación de la adhesión se realizó mediante la adición de 3,3 ml de 10⁸ cfu de cada cepa marcada radioactivamente a fragmentos de 1.05*0,5 cm de lengua de cerdo o células Caco-2 pre-incubadas ó 50 mg de perlas HA (80 µm de diámetro) en placas ELISA. Después de 45 minutos, los sobrenadantes se eliminaron cuidadosamente. Las perlas HA (junto con las células adheridas) se recuperaron por centrifugación. La lengua o las células Caco-2 junto con las bacterias adheridas se rasparon de los pocillos ELISA. Finalmente, se lisaron las bacterias recuperadas para calcular la radioactividad específica (cpm/cfu).

20 Todos los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como el número de bacterias adheridas por cm². Dado que *S. salivarius* presentó mejores resultados para la mayoría de las propiedades investigadas (ver resultados anteriores), esta cepa fue utilizada como cepa control para el ensayo de adhesión.

B) Resultados

Tabla 8. Adhesión a tejidos orales

Cepa	lengua (cfu/cm ²)	Caco-2 (cfu/cm ²)	Perlas HA (cfu/cm ²)
F2096	8,84E+06	1,00E+06	2,30E+06
I3141	2,70E+06	3,78E+04	5,51E+05
<i>S. salivarius</i>	1,72E+06	8,83E+04	2,34E+05

25 Estos resultados demuestran que las cepas F2096 y 13141 tienen una mejor capacidad de adhesión global a tejidos orales en comparación con la cepa probiótica oral *S. salivarius* K12. La capacidad de adherirse a los tejidos orales es una característica relevante para las cepas que se van a usar como probióticos dado que proporciona a estas bacterias una ventaja competitiva cuando compiten por sitios de adhesión contra patógenos y favorece la permanencia en la cavidad oral. Como resultado, las cepas que presentan una buena adhesión a los tejidos orales contribuyen a desplazar a los patógenos de la cavidad oral y promueven una flora oral más saludable.

9. Susceptibilidad a antibióticos

A) Métodos

35 La susceptibilidad a antibióticos de las cepas F2096 y 12141 se estudió siguiendo la guía técnica proporcionada por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ("Update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance". The EFSA Journal, 2008, vol. 732, p. 1-15). Las

condiciones de cultivo de las cepas fueron las siguientes: crecimiento en la superficie de placas de agar MRS conteniendo las concentraciones de antibióticos recomendadas por la EFSA a 37°C y 5% CO₂.

B) Resultados

5 El crecimiento de las cepas en medios que contienen antibióticos se presenta en la TABLA 9. Las concentraciones para cada antibiótico a ser ensayado en base a las recomendaciones de la EFSA se proporcionan en mg/ml. La EFSA no especifica unos valores indicados de concentraciones de antibióticos para la especie *L. brevis*, por lo tanto, la resistencia a antibióticos en la cepa *L. brevis* 13141 se ensayó usando las concentraciones recomendadas para lactobacilos heterofermentativos estrictos, grupo al cual pertenece esta especie.

10 Los resultados indican que F2096 y 12141 no presentan resistencia a antibióticos. Son por lo tanto adecuadas para el consumo humano.

Tabla 9. Resistencia a antibióticos de las cepas F2096 y 13141.

	Concentración EFSA para <i>L. plantarum</i>	Crecimiento de F2096	Concentración EFSA para lactobacilos heterofermentativos estrictos	Crecimiento de 13141
Ampicilina	2	ninguno	2	ninguno
Gentamicina	16	ninguno	16	ninguno
Kanamicina	64	ninguno	16	ninguno
Estreptomicina	n.r.	ninguno	64	ninguno
Eritromicina	1	ninguno	1	ninguno
Clindamicina	1	ninguno	1	ninguno
Quinuspristina/ Dalfopristina	4	ninguno	4	ninguno
Tetraciclina	32	ninguno	8	ninguno
Cloranfenicol	8	ninguno	4	ninguno

n.r., no recomendado por la EFSA

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Twetman S, et al. "Short-term effect of chewing gums containing probiotic *Lactobacillus reuteri* on the levels of inflammatory mediators in gingival crevicular fluid". *Acta Odontol Scand*, 2009, vol. 67, p. 19-24.
- 15 Caglar E, et al. "Salivary mutans streptococci and lactobacilli levels after ingestion of the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 by straws or tablets". *Acta Odontol Scand*, 2009, vol. 64, p. 314-318.
- Stamatova I, et al. "*In vitro* evaluation of yoghurt starter lactobacilli and *Lactobacillus rhamnosus* GG adhesion to saliva-coated surfaces". *Oral Microbiol Immunol*, 2009, vol. 24, p. 218–223.
- 20 Burton JP, et al. "Preliminary study of the effect of probiotic *Streptococcus salivarius* K12 on oral malodor parameters". *J Appl Microbiol*, 2006, vol. 100, p. 754-764.
- Wang Q, et al., "Naive Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy", *Appl Environ Microbiol*, 2007, vol. 73, p. 5261-5267.
- Ribosomal Database Project: <http://rdp.cme.msu.edu/>
- 25 J.R. Cole et al., "The Ribosomal Database Project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data", *Nucl. Acids Res.*, 2007, vol. 35, p. 169-172.
- Rodas AM, et al. "Polyphasic study of wine *Lactobacillus* strains: taxonomic implications", *Int J Syst Evol Microbiol*, 2005, vol. 55, p. 197-207.
- "Update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance". *The EFSA Journal*, 2008, vol. 732, p. 1-15.
- 30 Twetman L. et al. "Coaggregation between probiotic bacteria and caries-associated strains: An in vitro study" *Acta Odontologica Scandinavica*, Oslo, vol. 67, no. 5, 1 2009, páginas 284-288.

Yang Y. et al. "Probiotic characteristics of Lactobacillus plantarum H0-69 applied in oral cavity" Huaxi-Kouqiang-Yixue-Zazhi: Wcjs=West China Journal Of Stomatology, vol. 26, 1 2008, páginas 482-485,489.

Riccia D. N. Della et al. "Anti-inflammatory effects of L. brevis (CD2) on periodontal disease" Oral Diseases 2007, vol. 13, no. 4, páginas 376-385.

- 5 Testa M.M. et al. "Antagonistic interactions among Fusobacterium nucleatum and Prevotella intermedia with oral lactobacilli", Research in Microbiology, vol. 154 (2003), p. 669-675.

Listado de secuencias

<110> AB-BIOTICS S.A.

- 10 <120> Composición probiótica para la salud oral

<130> P1755PC00

<160> 6

- 15 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 19

- 20 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador directo Eub27f

- 25 <400> 1
gagttgatc ctggctcag 19

<210> 2

- 30 <211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

- 35 <223> cebador inverso Eub1492r

<400> 2

tacggytacc ttgttacgac tt 22

- 40 <210> 3

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

- 45 <220>

<223> cebador directo 27f

<400> 3

- 50 **agagttgat cctggctcag 20**

<210> 4

<211> 57

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

- 55 <220>

<223> cebador directo 357f

<400> 4

- 60 **cgcccgcgcg ccccgcgcc cggcccgcgc ccccgcgcc cctacgggag gcagcag 57**

<210> 5

ES 2 655 913 T3

<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<223> cebador inverso 907r

<400> 5
ccgtcaattc cttgagtt 20

10 <210> 6
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> cebador inverso 1492r

20 <400> 6
ggttacctg ttacgact 19

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende *Lactobacillus plantarum* CECT 7481 y *Lactobacillus brevis* CECT 7480.
2. La composición como se ha definido en la reivindicación 1, para usarse como probiótico.
- 5 3. La composición como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, para usarse como un medicamento.
4. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, para usarse en la prevención y/o tratamiento de un trastorno de la cavidad oral que está causado por patógenos orales en un animal, incluyendo un ser humano.
5. La composición según el uso de la reivindicación 4, en la que el trastorno de la cavidad oral es un trastorno relacionado con la placa dental.
- 10 6. La composición según el uso de la reivindicación 5, en la que el trastorno relacionado con la placa dental se selecciona del grupo que consiste en gingivitis, periodontitis, caries y sensibilidad dental.
7. La composición según el uso de la reivindicación 4, en la que el trastorno de la cavidad oral es la halitosis.
8. La composición según el uso de la reivindicación 4, en la que el trastorno de la cavidad oral es la candidiasis.
- 15 9. Una composición farmacéutica que comprende la composición como se ha definido en la reivindicación 1, junto con excipientes farmacéuticamente aceptables.
10. Una composición comestible que comprende la composición como se ha definido en la reivindicación 1, junto con otros ingredientes comestibles.
11. Una composición comestible según la reivindicación 10 o una composición farmacéutica según la reivindicación 9, que es un complemento alimenticio.
- 20 12. Una composición cosmética que comprende la composición como se ha definido en la reivindicación 1, junto con excipientes cosméticamente aceptables.
13. Un producto de cuidado oral que comprende una cantidad eficaz de la composición farmacéutica como se ha definido en la reivindicación 9, o del producto comestible como se ha definido en la reivindicación 10, o de la composición cosmética como se ha definido en la reivindicación 12.
- 25 14. El producto de cuidado oral según la reivindicación 13, que es una goma de mascar, una pasta de dientes, un pulverizador bucal, una pastilla o un comprimido oral dispersable.
15. *Lactobacillus plantarum* CECT 7481.
16. *Lactobacillus brevis* CECT 7480.

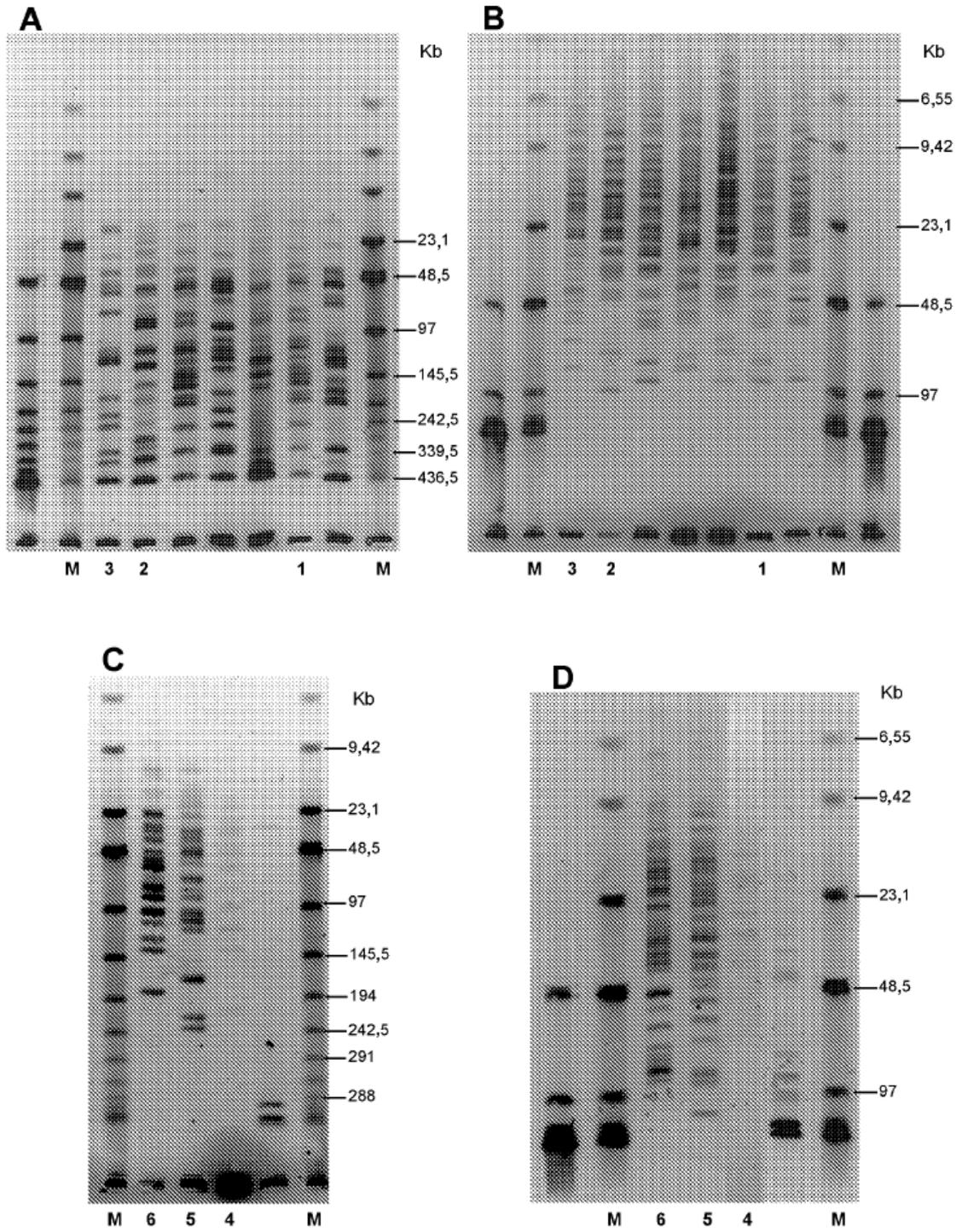


FIG. 1