

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 700 157**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2015.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.07.2004 PCT/NZ2004/000153**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.01.2005 WO05007178**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.07.2004 E 04748848 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.09.2018 EP 1653982**

54 Título: **Tratamiento de halitosis**

30 Prioridad:

18.07.2003 NZ 52707503

20.04.2004 NZ 53238204

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

14.02.2019

73 Titular/es:

**BLIS TECHNOLOGIES LIMITED (100.0%)
Level 10, Otago House, 481 Moray Place
Dunedin, NZ**

72 Inventor/es:

**TAGG, JOHN, ROBERT;
CHILCOTT, CHRISTOPHER, NORMAN y
BURTON, JEREMY, PAUL**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 700 157 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

Tratamiento de halitosis

5 Campo de la invención

En este documento se describen métodos para inhibir el crecimiento de bacterias anaerobias, particularmente bacterias que causan halitosis, y al uso de cepas de *Streptococcus salivarius* que producen BLIS, extractos de las mismas. La invención se refiere a composiciones que contienen las mismas para su uso en la prevención o
10 tratamiento de halitosis.

Antecedentes

La halitosis o mal aliento es una dolencia común caracterizada al menos en parte por la producción de compuestos de azufre volátiles. La producción de dichos compuestos en general está asociada con bacterias bucales, particularmente determinadas especies anaerobias. Estas bacterias en general habitan en las superficies bucales, y particularmente en los huecos periodontales y la superficie superior de la lengua.

La fuente principal de compuestos de azufre volátiles (CAV) de la microflora subgingival es de microorganismos que pueden ser tanto comensales como patógenos. Los estudios basados en cultivo previos han indicado que *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* (ambas especies pigmentadas de negro), *Fusobacterium nucleatum*, *Micromonas micros* (antiguamente, *Peptostreptococcus*), especies de *Bacteroides*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, especies de *Desulfovibrio*, *Treponema denticola* y especies de *Eubacterium* entre otras son responsables de la producción de CAV que contribuyen a la halitosis (como se resume por Loesche WJ, Kazor C. *Periodontol* 2000. 2002; 28:256-79. y Khaira N, Palmer RM, Wilson RF, Scott DA, Wade WG. *Oral Dis.* nov 2000;6 (6):371-5.). Sin embargo, los recientes estudios no basados en cultivo han demostrado que hay determinadas especies asociadas con sujetos que están sanos o afectados con halitosis. *Atopobium pavulum*, *Eubacterium sulci*, *Fusobacterium periodonticum*, *Dialister*, un filotipo de estreptococos, un filotipo del filo no cultivado TM7 y *Solo bacterium moorei* parecían estar presente en sujetos con halitosis. Por el contrario, *Streptococcus salivarius*, *Rothia mucilaginosa* (*Stomatococcus mucilaginosus*), y una *Eubacterium* no caracterizada (cepa FTB41) se detectaban habitualmente únicamente entre individuos sanos (Kazor, C.E. *et al.*, *J. Clin Microbiol*, feb 2003, pág. 558-563).

A lo largo de los años, se han desarrollado diversos métodos y se han probado con éxito variable, para evitar o al menos aliviar el problema de la halitosis. Los tratamientos actuales se centran en regímenes antibacterianos para reducir los números de bacterias bucales, o agentes para enmascarar o neutralizar el olor ofensivo. Los enjuagues bucales con dióxido de cloro (véase, por ejemplo, el documento WO 95/27472 y el documento US 5738840) han demostrado tener algún efecto en el control de la halitosis, pero ofrecen un alivio únicamente temporal del orden de unos pocos días. En general, los métodos actuales del tratamiento de la halitosis requieren realizar regímenes físicos complejos, químicos o caros y típicamente son únicamente de efecto a corto plazo, ya que las bacterias bucales que causan el mal olor se recuperan a los niveles anteriores después de detener el tratamiento.

Lo que se busca para tratar la halitosis es el remplazo de los organismos que causan enfermedad, con un microorganismo comensal no virulento. Para que sirva como cepa efectora en el tratamiento de remplazo, el microorganismo debe ser capaz de competir satisfactoriamente con el microorganismo patógeno mediante acción competitiva (por ejemplo, por los sitios de adhesión) y/o acción antibiótica, o inhibición por otros subproductos asociados al metabolismo.

En el documento WO 01/27143, se identifican cepas de *S. salivarius* que tienen utilidad en el tratamiento de infecciones de las vías respiratorias altas causadas por organismos estreptococos, incluyendo el tratamiento de amigdalitis causada principalmente por *S. pyogenes*, y caries dental causada al menos en parte por *S. sobrinus*. No se registró ninguna actividad contra ningún microorganismo anaerobio. Además, el tratamiento de la halitosis no se contempla en ninguna parte de ese documento.

La presente invención se refiere ampliamente a métodos para al menos inhibir el crecimiento de microorganismos anaerobios usando cepas de *S. salivarius* productoras de BLIS o composiciones que comprenden las mismas, o al menos proporciona al público una elección útil.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona una composición que comprende *S. salivarius* productora de sustancia inhibidora de tipo bacteriocina (BLIS) o un extracto de *S. salivarius* que incluye una o más de salivaricina A, A₁, A₂ y B, para su uso en el tratamiento profiláctico o terapéutico de la halitosis en un individuo que lo necesita, en la que la *S. salivarius* produce una o más de salivaricina A (codificada por la SEQ ID NO: 2), salivaricina A₁ (codificada por la SEQ ID NO: 4), salivaricina A₂ (codificada por la SEQ ID NO: 5), salivaricina B (codificada por la SEQ ID NO: 7), o

variantes funcionales que tienen al menos un 70 % de identidad con una cualquiera de las salivaricinas codificadas por las SEQ ID NO: 2, 4, 5 y 7.

5 La presente invención proporciona una composición que comprende una *S. salivarius* productora de BLIS o un extracto de *S. salivarius* que incluye una o más de salivaricina A, A₁, A₂ y B, para su uso en la preparación de una composición para controlar la incidencia y/o gravedad de la halitosis en un individuo que lo necesita, en la que la *S. salivarius* produce una o más de salivaricina A (codificada por la SEQ ID NO: 2), salivaricina A₁ (codificada por la SEQ ID NO: 4), salivaricina A₂ (codificada por la SEQ ID NO: 5), salivaricina B (codificada por la SEQ ID NO: 7), o variantes funcionales que tienen al menos un 70 % de identidad con una cualquiera de las salivaricinas codificadas por las SEQ ID NO: 2, 4, 5 y 7.

15 Por consiguiente, en este documento se describe un método para al menos inhibir el crecimiento de bacterias anaerobias sensibles a *S. salivarius* productora de BLIS, comprendiendo el método poner en contacto las bacterias sensibles con una cantidad eficaz inhibidora de una *S. salivarius* productor de BLIS, o un extracto de la misma, o una composición que comprende dicha *S. salivarius* o extracto de la misma.

20 En un aspecto adicional, la invención proporciona una composición para su uso en el tratamiento profiláctico o terapéutico de la halitosis en un individuo que lo necesita, comprendiendo el método administrar a dicho individuo una *S. salivarius* productora de BLIS, extracto de la misma o composición que comprende dicha *S. salivarius* o extracto de la misma, en una cantidad eficaz para al menos inhibir el crecimiento de bacterias anaerobias, o en una cantidad para permitir la colonización eficaz en la cavidad bucal del individuo por *S. salivarius* productora de BLIS.

Preferiblemente, las *S. salivarius* son productoras de salivaricina B.

25 Habitualmente, las bacterias anaerobias son especies pigmentadas de negro, y/o *Eubacterium* y/o *Micromonas*, especialmente especies de *Prevotella*, *Eubacterium saburreum* y *Micromonas micros*.

30 En un aspecto adicional, la invención proporciona una composición para su uso en el control de la incidencia y/o gravedad de la halitosis, comprendiendo el método introducir en la cavidad bucal de al menos un individuo susceptible a la halitosis una cantidad de una *S. salivarius* productora de BLIS, extracto de la misma o composición que comprende dicha *S. salivarius* o extracto de la misma, eficaz para controlar la incidencia o gravedad de dicha halitosis.

35 En una realización, la halitosis está causada al menos en parte por una o más especies pigmentadas de negro, *Eubacterium* y/o *Micromonas*, particularmente especies de *Prevotella*, *Eubacterium saburreum* y *Micromonas micros*.

Preferiblemente, *S. salivarius* se administra como parte de una gragea, pulverización, enjuague bucal u otro dispositivo de suministro de fármaco, golosinas (incluyendo chicle), alimento, bebida o producto nutracéutico.

40 Los métodos descritos en este documento incluyen preferiblemente la etapa preliminar de pretratar al individuo para al menos reducir la microflora bucal ya presente.

45 La invención también se refiere al uso de *S. salivarius* productora de BLIS, extractos de la misma o composiciones que comprenden la misma para su uso en los métodos analizados anteriormente. Particularmente, al uso de la *S. salivarius* en la preparación de medicamentos para su uso en el tratamiento de la halitosis.

50 En otro aspecto, la invención también se refiere al uso de *S. salivarius* productora de BLIS, extractos de la misma y composiciones que comprenden dicha *S. salivarius* o extractos de la misma en los métodos analizados anteriormente para inhibir, controlar, prevenir o tratar la halitosis causada al menos en parte por una o más especies de *Prevotella* y/o *Eubacterium saburreum* y/o *Micromonas micros*.

55 La invención también proporciona una composición para su uso en el tratamiento profiláctico terapéutico de la halitosis en un individuo que lo necesita, comprendiendo el método administrar a dicho individuo una *S. salivarius* productora de BLIS, extracto de la misma o composición que comprende dicha *S. salivarius* o extracto de la misma, eficaz para al menos inhibir el crecimiento de bacterias anaerobias, o en una cantidad para permitir la colonización eficaz en la cavidad bucal del individuo por *S. salivarius* productora de BLIS.

60 Aunque la invención es en líneas generales como se describe anteriormente, los expertos en la materia apreciarán que la invención no se limita a ello, sino que también incluye realizaciones de las que la siguiente descripción proporciona ejemplos. En particular, la invención se describirá en relación a los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

65 Figura 1. Ejemplo de efecto inhibidor de *S. salivarius* K12 sobre bacterias pigmentadas de negro (especies de *Prevotella*) de muestra de saliva.

Figura 2A. Gráfico de barras que muestra niveles de CAV de aire de la boca de dos sujetos en examen (4 y 12) durante 28 días y después del tratamiento.

5 Figura 2B. Gráfico de barras que muestra la detección de la actividad BLIS de aislados de *Streptococcus salivarius* (%) de sujetos en examen a lo largo del tiempo por el microorganismo indicador sensible *Micrococcus leuteus* (I1, sensible a SAL A y B).

Figura 2C. Recuentos bacterianos de saliva del sujeto 4.

10 Figura 2D. Recuentos bacterianos de saliva del sujeto 12.

Descripción detallada de la invención

15 Como se indica anteriormente, en este documento se describe un método para al menos inhibir el crecimiento de bacterias anaerobias sensibles a *S. salivarius* productora de BLIS. El método comprende poner en contacto las bacterias sensibles con una cantidad eficaz inhibidora de una *S. salivarius* productora de BLIS, o un extracto de la misma, o una composición que contiene la *S. salivarius* o extracto de la misma.

20 La expresión "inhibir el crecimiento de bacterias anaerobias sensibles a *S. salivarius* productora de BLIS", como se usa en este documento se refiere a la inhibición del crecimiento de al menos una cepa de una o más especies de bacterias anaerobias sensibles a *S. salivarius* productora de BLIS. La inhibición del crecimiento puede determinarse mediante ensayos de antagonismo diferido en agar como se describe por Tagg y Banister (J. Med. Microbiol. 1979; 12: 397) como se ilustra en los ejemplos adjuntos.

25 El término "poner en contacto", como se usa en este documento, se refiere a contacto tanto directo como indirecto entre las bacterias anaerobias y una *S. salivarius* productora de BLIS, extracto o composición de este documento. El contacto indirecto comprende la exposición de las bacterias anaerobias en su entorno natural, particularmente el entorno natural, a una *S. salivarius* productora de BLIS, extracto o composición de este documento.

30 Las bacterias anaerobias a tratar están preferiblemente en la cavidad bucal de un individuo.

En otra realización, la invención, por lo tanto, se refiere a composiciones para su uso en el tratamiento profiláctico o terapéutico de la halitosis, y a composiciones para su uso en el control de la incidencia y gravedad de la halitosis como se expone anteriormente.

35 Preferiblemente, las cepas de *S. salivarius* para su uso en la invención son productores naturales de salivaricina B con actividad contra bacterias anaerobias, particularmente especies pigmentadas de negro (tales como *Prevotella Eubacterium saburreum* y/o *Micromonas micros*). Las cepas productoras de BLIS de salivaricina B con actividad contra bacterias anaerobias incluyen K12 y K30, ambas depositadas en Deutsche Sammlung von Mikroorganismen Und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1 b, D-38124, Braunschweig, Alemania el 8 de octubre de 1999, y el 8 de octubre de 1999, y con los números de acceso asignados DSM 13084 y 13085, respectivamente.

40 La cepa Sal 20P3 se depositó en el Australian Government Analytical Laboratories, 1 Suakin Street, Pymble, New South Wales, Australia en julio de 1992 con el número de acceso AGAL 92/32401.

45 Sal 20P3 es un productor de salivaricina A únicamente y tiene actividad contra al menos *Micromonas*. Los productores de salivaricina B K12 y K30 tienen un intervalo más amplio de actividad contra especies pigmentadas de negro, *Eubacterium* y *Micromonas* al menos.

50 Los productores de BLIS de *S. salivarius* pueden identificarse ensayando cepas productoras potenciales en ensayos en superficie de agar como se muestra en el documento WO 01/27143. La producción de salivaricina A, A₂ y B puede confirmarse comparando la identidad de secuencia y la actividad con aquellas secuencias y datos de actividad proporcionados en el documento WO 01/27143. Por motivos de conveniencia, las secuencias de aminoácidos de salivaricinas útiles en la invención son las siguientes:

Salivaricina	Secuencia de aminoácidos y de ácido nucleico
A	MKNSKDI LNNAIEEVSEKELMEVAGG -1 KRGSGWIATITDDCPNSV FVCC (SEQ ID NO: 1) +1 ATGAATGCCATGAAAAACTCAAAGATATTTTGAACAATGCTATCGAAGAAGTTTCTGA AAAAGAACTTATGGAAGTAGCTGGTGGTAAAAGAGGTT CAGGTTGGATTGCAACTATTA CTGATGACTGTCCAAACTCAGTATTCGTTTGTGTTAA (SEQ ID NO: 2)

ES 2 700 157 T3

Salivaricina	Secuencia de aminoácidos y de ácido nucleico
A ₁	MKNSKDILTNAIEEVSEKELMEVAGG <div style="text-align: center;">-1</div> KKGSGWFATITDDCPNSVFCVCC (SEQ ID NO: 3) <div style="text-align: center;">+1</div> ATGAGTTTTATGAAAAATTCAAAGGATATTTTGACTAATGCTATCGAAGAAGTTTCT GAAAAAGAACTTATGGAAGTAGCTGGTGGTAAAAAAGGTTGAGGTTGGTTGCAACT ATTACTGATGACTGTCCGAACTCAGTATTTGTTTGTGTTAA (SEQ ID NO: 4)
A ₂	atg att gcc atg aaa aac tca aaa gat att ttg aac aat Met Ile Ala Met Lys Asn Ser Lys Asp Ile Leu Asn Asn gct atc gaa gaa gtt tct gaa aaa gaa ctt atg gaa gta Ala Ile Glu Glu Val Ser Glu Lys Glu Leu Met Glu Val gct ggt ggt aaa aga ggt aca ggt tgg ttt gca act att Ala Gly Gly Lys Arg Gly Thr Gly Trp Phe Ala Thr Ile <div style="text-align: center;">-1 +1</div> act gat gac tgt cca aac tca gta ttc gtt tgt tgt taa (SEQ ID NO: 5) Thr Asp Asp Cys Pro Asn Ser Val Phe Val Cys Cys (SEQ ID NO: 6)
B	ttg act ctt gaa gaa ctt gat aac gtt ctt ggt gct ggt Leu Thr Leu Glu Glu Leu Asp Asn Val Leu Gly Ala Gly <div style="text-align: center;">-1 +1</div> ggt gga gta atc caa acc att tca cac gaa tgt cgt atg Gly Gly Val Ile Gln Thr Ile Ser His Glu Cys Arg Met aac tca tgg cag ttc ttg ttt act tgt tgc tct taa (SEQ ID NO: 7) Asn Ser Trp Gln Phe Leu Phe Thr Cys Cys Ser (SEQ ID NO: 8)

La secuencia para salivaricina A₁ también se proporciona como una BLIS adicional útil en la invención.

La comparación de secuencias puede conseguirse usando BLASTP.

5 Más particularmente, la identidad de secuencia polipeptídica puede determinarse de la siguiente manera. La secuencia polipeptídica objeto se compara con una secuencia polipeptídica candidata usando BLASTP (del paquete de programas BLAST, versión 2.2.5 [nov de 2002]) en bl2seq, que está disponible al público en NCBI (ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/). Pueden utilizarse los parámetros por defecto de bl2seq.

10 La identidad de secuencia polipeptídica también puede calcularse sobre la longitud completa del solapamiento entre una secuencia polinucleotídica candidata y objeto usando programas de alineación de secuencias globales. EMBOSS-Needle (disponible en <http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/>) y GAP (Huang, X. (1994) On Global Sequence Alignment. Computer Applications in the Biosciences 10, 227-235) también son programas de alineación de secuencias globales adecuados para calcular la identidad de secuencia polipeptídica.

15 Se prefiere el uso de BLASTP como se describe anteriormente para su uso en la determinación de variantes polipeptídicas útiles en la presente invención.

20 Como se indica anteriormente, las especies pigmentadas de negro, *Eubacterium* y *Micromonas* se consideran agentes causantes de la halitosis. Aunque las cepas productoras de BLIS de *S. salivarius* anteriores se sabe que son activas contra bacterias aerobias grampositivas, su actividad contra bacterias anaerobias, tales como especies pigmentadas de negro, *Eubacterium* y *Micromonas* en particular, es inesperada. Sobre todo, porque los organismos productores de BLIS se sabe que típicamente actúan contra especies más estrechamente relacionadas.

25 Estas *S. salivarius* productoras de BLIS son útiles, por lo tanto, como agentes antibacterianos anaerobios *per se*, así como terapéuticamente. En este contexto, "terapéutico" incluye tratamiento profiláctico. Los usos terapéuticos incluyen el tratamiento o prevención de infecciones microbianas anaerobias, especialmente infecciones por *Eubacterium* y *Micromonas*, e infecciones por especies pigmentadas de negro. Las *S. salivarius* son particularmente adecuadas para su uso contra especies de *Prevotella* incluyendo *P. intermedia* y *P. melaninogenica*; *Eubacterium*

saburreum, *Micromonas micros*, *Streptococcus anginosus*, algunas o todas las cuales pueden estar implicadas en la halitosis. Las afecciones susceptibles a tratamiento con las cepas de *S. salivarius* incluyen halitosis (o mal aliento).

Los extractos obtenibles de las cepas de *S. salivarius* productoras de BLIS también son útiles en la invención. Los extractos incluyen aquellos en que la BLIS producida por la cepa de *S. salivarius* se proporciona en forma aislada o pura. Una BLIS "aislada" es una que se ha identificado y separado y/o recuperado de su entorno celular natural. Los extractos pueden obtenerse usando protocolos de la técnica conocidos, convenientemente por cultivo celular y centrifugación. Los métodos de aislamiento rutinarios incluyen precipitación con sulfato de amonio, cromatografía en columna, (por ejemplo, intercambio iónico, filtración en gel, cromatografía de afinidad, etc.), electroforesis y, finalmente, cristalización (véase en líneas generales " Enzyme Purification and Related Techniques". Methods in Enzymology, 22: 233-577 (1991)). La BLIS puede purificarse según lo necesario usando técnicas convencionales (véase, por ejemplo, Parente, E y Ricciardi, A. Applied Microbiol. Biotechnol 52: 628 (1999)).

La BLIS puede purificarse a más de un 95 % en peso de BLIS determinada por el método de Lowry (Lowry, O. H. *et al.*, 1951. Protein Measurement with Folin-Phenol Reagents. J. Biol. Chem. 193: 265-275). Preferiblemente la BLIS se purificará hasta un 99 % o más en peso.

Estos extractos activos pueden usarse asimismo en formulaciones terapéuticas y métodos, los extractos incluyen las BLIS antibióticas salivaricina A, A₁, A₂ y B o variantes de las mismas en forma aislada o para. Las variantes son funcionalmente equivalentes porque muestran propiedades antibióticas similares a salivaricina A, A₁, A₂ y B, los antibióticos y variantes junto con procesos para su producción se muestran en el documento WO 01/27143. El término "variante" de los polipéptidos antibióticos abarca polipéptidos de origen natural, producidos de forma recombinante y producidos de forma sintética.

Las secuencias polinucleotídicas y polipeptídicas variantes se refieren a secuencias polinucleotídicas o polipeptídicas diferentes de las secuencias de BLIS antibiótica identificadas específicamente, en las que uno o más nucleótidos o restos de aminoácido están eliminados, sustituidos o añadidos. Las variantes pueden ser variantes alélicas de origen natural o variantes de origen no natural. Las variantes pueden ser de la misma especie o de otra especie y abarcan homólogos, parálogos y ortólogos. Se contemplan tanto variantes de ADNc como de secuencia genómica. Las secuencias variantes preferiblemente muestran al menos un 70 %, preferiblemente al menos un 80 %, más preferiblemente al menos un 90 %, más preferiblemente al menos un 95 %, más preferiblemente al menos un 98 % y mucho más preferiblemente al menos un 99 % de identidad con una secuencia de BLIS útil en la presente invención. Para los polipéptidos, la identidad se encuentra sobre una ventaja de comparación de al menos 15, preferiblemente al menos 18 posiciones de aminoácido, más preferiblemente al menos 20 posiciones de aminoácidos y muchos más preferiblemente sobre la longitud completa de un polipéptido.

La identidad de secuencia puede determinarse como se analiza anteriormente.

Las sustituciones conservativas de uno o varios aminoácidos de una secuencia polipeptídica descrita sin alterar significativamente su actividad biológica también se incluyen en la invención. Un experto en la materia será consciente de los métodos para generar sustituciones de aminoácido fenotípicamente silenciosas (véase, por ejemplo, Bowie *et al.*, 1990, Science 247, 1306) y el documento WO 01/27143.

Los antibióticos y variantes útiles en la invención pueden prepararse de una diversidad de formas. Por ejemplo, mediante aislamiento de una fuente natural (tal como *S. salivarius* cepas K12 y/o K30), por síntesis usando cualquier técnica conocida adecuada (tal como se describe para la síntesis de nisina por Wakamiya *et al.*, (1991) en "Nisin and Novel Lantibiotics" ed. G. Jung and H. G. Shal, 189-203, Escom, Leiden o por síntesis en fase sólida como se describe por Merrifield (1964) J. Am. Chem. Assoc. 85, 2149-2154, o por síntesis en solución homogénea como se describe por Houbenwyl (1987), Methods of Organic Chemistry, Vol I y II) o empleando técnica de ADN recombinante tal como se describe por Sambrook *et al.* (1989), Molecular cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Press, Nueva York, EE. UU.

Las variantes tanto de BLIS nativa como de sus variantes pueden generarse asimismo mediante cualquiera de esas técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, las variantes pueden prepararse por mutagénesis específica de sitio del ADN que codifica la secuencia de aminoácidos natural como se describe por Adelman *et al.*, DNA 2, 183 (1983).

Las secuencias variantes, incluyendo variantes tanto polinucleotídicas como polipeptídicas, también pueden identificarse por métodos basados en ordenador bien conocidos para los expertos en la materia, usando algoritmos públicos de alineación de secuencias de dominio y herramientas de búsqueda de similitud de secuencias para buscar en bases de datos de secuencias (bases de datos públicas de dominios incluyen GenBank, EMBL, Swiss-Prot, PIR y otras). Véase, por ejemplo, Nucleic Acids Res. 29: 1-10 y 11-16, 2001 para ejemplos de recursos en línea. Asimismo, las búsquedas recuperan y alinean secuencias diana para la comparación con una secuencia a analizar (es decir, una secuencia de consulta). Los algoritmos de comparación de secuencias usan matrices de puntuación para asignar una puntuación global a cada una de las alineaciones.

- Una familia ejemplar de programas útiles para identificar variantes en base de datos de secuencias es el paquete de programas BLAST (versión 2.2.5 [nov de 2002]) que incluye BLASTN, BLASTP, BLASTX, tBLASTN y tBLASTX, que están disponibles al público en (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/>) o en el National Center for Biotechnology Information (NCBI), National Library of Medicine, Building 38A, Room 8N805, Bethesda, MD 20894 EE. UU. El servidor del NCBI también proporciona la función para usar los programas para cribar varias bases de datos de secuencias disponibles al público. BLASTN compara una secuencia de consulta de nucleótidos frente a una base de datos de secuencias de nucleótidos. BLASTP compara una secuencia de consulta de aminoácidos frente a una base de datos de secuencias proteínicas. BLASTX compara una secuencia de consulta de nucleótidos traducida en todos los marcos de lectura frente a una base de datos de secuencias proteínicas. tBLASTN compara una secuencia de consulta proteínica frente a una base de datos de secuencias de nucleótidos traducidas dinámicamente en todos los marcos de lectura. tBLASTX compara las traducciones de seis tramos de una secuencia de consulta de nucleótidos frente a las traducciones de seis tramos de una base de datos de secuencias de nucleótidos. Los programas BLAST puede usarse con parámetros por defectos o los parámetros pueden alterarse según lo necesario para refinar el cribado.
- El uso de la familia de algoritmos BLAST, incluyendo BLASTN, BLASTP y BLASTX, se describe en la publicación de Altschul *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402, 1997.
- Los "aciertos" para una o más secuencias de la base de datos por una secuencia consultada producidos por BLASTN, BLASTP, BLASTX, tBLASTN, tBLASTX o un algoritmo similar, alinean e identifican partes similares de secuencias. Los aciertos se ordenan en orden del grado de similitud y la longitud de solapamiento de secuencia. Los aciertos para una secuencia de la base de datos generalmente representan un solapamiento sobre únicamente una fracción de la longitud de la secuencia de la secuencia consultada.
- Los algoritmos BLASTN, BLASTP, BLASTX, tBLASTN y tBLASTX también producen valores "esperados" para alineaciones. El valor esperado (E) indica el número de aciertos que se pueden "esperar" observar por probabilidades cuando se hace una búsqueda en una base de datos del mismo tamaño que contiene secuencias contiguas aleatorias. El valor esperado se usa como umbral de significación para determinar si el acierto con una base de datos indica una similitud verdadera. Por ejemplo, un valor E de 0,1 asignado a un acierto de polinucleótidos interpreta que significa que en una base de datos del tamaño de la base de datos cribada se puede esperar la observación de 0,1 coincidencias sobre la parte alineada de la secuencia con una puntuación similar simplemente por probabilidades. Para secuencias que tienen un valor E de 0,1 o menos sobre las partes alineadas y coincidentes, la probabilidad de encontrar una coincidencia por probabilidades en esa base de datos es de un 1 % o menos usando el algoritmo BLASTN, BLASTP, BLASTX, tBLASTN o tBLASTX.
- Pueden realizarse alineaciones de secuencias múltiples de un grupo de secuencias relacionadas con CLUSTALW (Thompson, J.D., Higgins, D.G. y Gibson, T.J. (1994) CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22:4673-4680, <http://www-igbmc.u-strasbg.fr/BioInfo/ClustalW/Top.html>) o T-COFFEE (Cedric Notredame, Desmond G. Higgins, Jaap Heringa, T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment, *J. Mol. Biol.* (2000) 302: 205-217) o PILEUP, que usa alineaciones por parejas progresivas. (Feng y Doolittle, 1987, *J. Mol. Evol.* 25, 351).
- Están disponibles aplicaciones informáticas de reconocimiento de patrones para hallar motivos o secuencias características. Por ejemplo, MEME ((Multiple Em for Motif Elicitation) encuentra motivos y secuencias características en un conjunto de secuencias y MAST (Motif Alignment and Search Tool) usa estos motivos para identificar motivos similares o iguales en secuencias de consulta. Los resultados de MAST se proporcionan como una serie de alineaciones con datos estadísticos apropiados y un resumen visual de los motivos encontrados. MEME y MAST se desarrollaron en la Universidad de California, San Diego.
- PROSITE (Bairoch and Bucher, 1994, *Nucleic Acids Res.* 22, 3583; Hofmann *et al.*, 1999, *Nucleic Acids Res.* 27, 215) es un método de identificación de las funciones de proteínas no caracterizadas traducidas a partir de secuencias genómicas o de ADNc. La base de datos PROSITE (www.expasy.org/prosite) contiene patrones y perfiles biológicamente significativos y está diseñada de modo que pueda usarse con herramientas informáticas apropiadas para asignar una nueva secuencia a una familia conocida de proteínas o para determinar el dominio o dominios conocidos que están presentes en la secuencia (Falquet *et al.*, 2002, *Nucleic Acids Res.* 30, 235). Prosearch es una herramienta que puede buscar en las bases de datos SWISS-PROT y EMBL con un patrón o característica de secuencia dada.
- Además de los métodos informáticos/de bases de datos descritos anteriormente, las variantes polipeptídicas pueden identificarse por métodos físicos, por ejemplo, cribando colecciones de expresión usando anticuerpos generados contra polipéptidos antibióticos usados en la invención (Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2.^a Ed. Cold Spring Harbor Press, 1987) o identificando polipéptidos de fuentes naturales con la ayuda de dichos anticuerpos.
- Los polinucleótidos variantes útiles en este documento también hibridan o hibridan de forma alternativa con las secuencias polinucleotídicas indicadas anteriormente, o complementos de las mismas, secuencias de antisentido y

complementos de las mismas en condiciones rigurosas. Como se usa en este documento, "condiciones rigurosas" se refiere a condiciones de hibridación tales como prelavado en una solución de SSC 6x, SDS al 0,2 %; hibridación a 65 °C, SSC 6x, SDS al 0,2 durante una noche; seguido por dos lavados de 30 minutos cada uno en SSC 1x, SDS al 0,1 % a 65 °C y dos lavados de 30 minutos cada uno en SSC 0,2x, SDS al 0,1 % a 65 °C. Dichas condiciones se

5 analizan más completamente en, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular *supra*.
La producción recombinante de una BLIS útil en la invención puede conseguirse usando técnicas bien conocidas en la técnica como se muestra en el documento WO 01/27143.

10 Una "composición terapéutica" es una composición apropiada para la administración de una cepa de *S. salivarius* o extracto de este documento, a un individuo que lo necesita, particularmente un individuo susceptible a halitosis. En general, las composiciones terapéuticas están compuestas de una cepa de *S. salivarius* o extracto analizado anteriormente y un vehículo, diluyendo y/o excipiente aceptable.

15 Un "vehículo, diluyente y/o excipiente aceptable" significa un vehículo para el suministro de una cepa de *S. salivarius* o extracto, al individuo, en que el vehículo es compatible con la viabilidad de la célula bacteriana o la actividad del extracto. Los vehículos, diluyentes y excipientes aceptables adecuados para su uso en la administración de cepas de *S. salivarius* viables y extractos son bien conocidos para los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18.^a ed., Gennaro, ed., 1990, Mack Publishing Co., Easton, Pa). Los
20 vehículos adecuados generalmente son inertes y pueden ser sólidos o líquidos.

En una realización, el vehículo es un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados para su uso con las cepas de *S. salivarius* de este documento incluyen, aunque sin limitación, agua, soluciones salinas tamponadas (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato), medios de cultivo
25 farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, BACa, agar TSBCaYE) u otras soluciones que mantienen la viabilidad de la bacteria. Adicionalmente, dichos vehículos farmacéuticamente aceptables pueden ser soluciones acuosas o no acuosas, suspensiones y emulsiones. En la técnica se conoce una diversidad de vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados para administración oral de bacterias viables o liofilizadas (véase, por ejemplo, *Remington's supra.*); y la composición farmacéutica LACTINEX™ (Hynson, Westcott y Dunning, Baltimore, Md. EE. UU.), una
30 formulación disponible en el mercado para administración oral de lactobacilos viables. Los vehículos sólidos adecuados conocidos en la técnica incluyen, por ejemplo, carbonato de magnesio; estearato de magnesio; celulosas; talco; azúcares tales como fructosa, sacarosa, manitol, lactosa; almidones; harinas; oligosacáridos y leche desnatada, y polvos comestibles similares, aunque no se limitan a ellos. Los vehículos para administración de extractos son asimismo bien conocidos.

35 Son diluyentes típicos, a modo de ejemplo: almidones; lactosa; manitol; caolín; fosfato o sulfato de calcio; sales inorgánicas tales como cloruro de sodio; y azúcares o celulosas en polvo.

Las composiciones también pueden incluir excipientes tales como auxiliares de formación de comprimidos; resinas; rellenos; aglutinantes; lubricantes; disolventes; emolientes; disgregantes; conservantes; tampones; aromatizantes; colorantes; edulcorantes; y fragancias según lo apropiado. Un excipiente preferido para la fluidez y compactibilidad del comprimido es ProSolv™ (Penwest, NY, EE. UU.). un edulcorante preferido es isomaltitol.

45 Los aglutinantes típicos incluyen almidón; gelatina; azúcares tales como lactosa, fructosa y glucosa; y similares. También son convenientes gomas naturales y sintéticas, incluyendo goma arábiga; alginatos; goma garrofín; metilcelulosa; polivinilpirrolidona tragacanto; goma xantana y similares. El polietilenglicol; la etilcelulosa; y las ceras también pueden servir como aglutinantes. Un aglutinante actualmente preferido es Emdex™ (Penwest, NY, EE. UU.).

50 Los lubricantes para evitar la adhesión al troquel durante la formación incluyen sólidos deslizantes tales como talco, sílice, estearato de magnesio y de calcio, polietilenglicol, ácido esteárico y aceites vegetales hidrogenados.

Los disgregantes son sustancias que se hinchan cuando se humedecen para descomponer la composición y liberar la *S. salivarius* o extracto. Los disgregantes incluyen almidones; arcillas; celulosas; alginas y gomas; más
55 particularmente almidones de maíz y patata; metilcelulosa; agar; bentonita; celulosa de madera; resinas de intercambio catiónico; ácido algínico; goma aguar; pulpa de cítrico; carboximetilcelulosa; esponja en polvo; y lauril sulfato de sodio.

Las cepas de *S. salivarius* o extractos de este documento pueden formularse en cualquiera de una diversidad de composiciones adecuadas para administración oral. Por ejemplo, las cepas de *S. salivarius* pueden formularse para su administración como pasta liófila o celular preparada a partir de cultivo de *S. salivarius*, o pueden administrarse directamente a la cavidad bucal. La cepa o extracto también puede administrarse en forma de un enjuague bucal, colutorio, pasta de dientes, dentífrico, pulverización bucal, gárgaras, cápsula, gragea, jarabe, hilo dental, película, chicle o comprimido masticable, pero las formas no se limitan a estas.

65

Las composiciones terapéuticas pueden incluir alimento, golosinas o bebida. En una realización, el producto alimenticio o bebida es un alimento o bebida basado en producto lácteo incluyendo, a modo de ejemplo, yogur, queso, leche, leche en polvo, panecillos de leche y leches aromatizadas. En el caso de golosinas, la formulación puede ser un chicle tal como se describe en el documento WO 00/05972. Una composición preferida emplea cepas de *S. salivarius* liofilizadas de este documento, formulaciones de leche en polvo de una manera similar a lo presenta previamente para la preparación de leche en polvo con bifidobacterias (Nagawa *et al.* (1988); J. Dairy Sci. 71:1777-1782).

Una composición administrable por vía oral de *S. salivarius* es una mezcla de cepas de *S. salivarius* liofilizadas con leche desnatada en polvo o similar que se ha aromatizado para potenciar la palatabilidad.

Las composiciones administrables por vía oral actualmente preferidas de *S. salivarius* o extractos de este documento son grageas, comprimidos masticables o cápsulas. Las grageas tales como formulaciones de BLIS K12 (BLIS Technologies Limited, Wellington, Nueva Zelanda) son particularmente preferidas. Una gragea chupable preferiblemente comprende una cepa de *S. salivarius* o extracto, isomaltitol y Emdex™. La gragea puede prepararse por compresión directa, granulación en húmedo o granulación en seco. Las grageas pueden recubrirse de acuerdo con la práctica farmacéutica bien conocida.

La composición farmacéutica puede contener adicionalmente nutrientes para mantener la viabilidad de la bacteria en la formulación. Como se indica anteriormente, la composición también puede contener agentes aromatizantes, agentes colorantes, fragancias u otros compuestos que aumentan la palatabilidad de la composición y/o potencian la conformidad del paciente sin comprometer la eficacia de la composición. Los métodos para la preparación de composiciones para administración oral son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18.ª ed., *supra*).

Para uso antimicrobiano general, las composiciones también pueden producirse por otros métodos de administración incluyendo composiciones administrables por vía tópica, aunque no se limitan a ellos.

Las composiciones pueden comprender además uno o más agentes antibacterianos secundarios. Estos agentes secundarios pueden ser, por ejemplo, antibióticos u otro agente antibacteriano o microorganismos productores antibacterianos. Preferiblemente, el agente antibacteriano secundario es una BLIS o microorganismo productor de BLIS. La BLIS puede ser una o más de salivaricina A, A₁, A₂ y B.

Los agentes secundarios útiles en dicha composición pueden ser agentes que enmascaran o neutralizan el olor tales como menta, dióxido de cloro, cinc, bicarbonato u otros agentes con un propósito similar.

Otros ingredientes útiles en dicha composición son agentes anticariógenos, por ejemplo, xilitol, fluoruro y calcio.

Ingredientes adicionales útiles en dicha composición son agentes que potencian selectivamente el crecimiento de bacterias deseables sobre los organismos no deseables. Estos agentes pueden ser, por ejemplo, oligosacáridos tales como Nutriose® FB (Roquette Freres, Lestrem, Francia).

En el tratamiento de la halitosis, las cepas de *S. salivarius* o extractos pueden administrarse a cualquier individuo susceptible a halitosis, habitualmente un individuo en que especies pigmentadas de negro, *Eubacterium* y/o *Micromonas* colonizan la cavidad bucal de modo se causa la halitosis al menos en parte por una o más especies pigmentadas de negro *Eubacterium* y/o *Micromonas*.

El término "individuo", como se usa en este documento, incluye seres humanos, caballos, perros, gatos, cerdos, ovejas, ganado bovino, cabras, aunque no se limita a estos. Preferiblemente, el individuo es un ser humano. Las cepas de *S. salivarius* pueden administrarse al individuo a cualquier edad, por ejemplo, infancia, adolescencia o edad adulta.

La *S. salivarius* de este documento puede administrarse por vía oral de una diversidad de formas. Por ejemplo, en forma de composiciones analizadas anteriormente, particularmente grageas o como suspensiones, fórmulas de liberación sostenida (por ejemplo, un implante oral que contiene la cepa de *S. salivarius*) o polvos liófilos. Las cepas de *S. salivarius* también pueden administrarse por aplicación directa de un liófilo, cultivo o pasta celular a la cavidad bucal del individuo. Cualquier modo de administración es adecuado siempre que la composición se aplique a la cavidad bucal. En una realización, las *S. salivarius* o extractos se administran por aplicación directa a la lengua del individuo, por ejemplo, por cepillado.

En general, la cantidad de *S. salivarius* administrada al individuo será una cantidad eficaz para el remplazo al menos parcial de una o más especies de bacterias anaerobias causantes de halitosis, o al menos especies pigmentadas de negro, *Eubacterium* y/o *Micromonas* en la cavidad bucal del hospedador. "Una cantidad eficaz para el remplazo de cepas de bacterias anaerobias causantes de la halitosis o al menos especies pigmentada de negro, *Eubacterium* y/o *Micromonas* en la cavidad bucal del hospedador" significa una cantidad eficaz para la colonización de la cavidad bucal por la cepa de *S. salivarius*, y la reducción significativa de las bacterias anaerobias causantes de la halitosis

residentes (por ejemplo, por competición entre las bacterias por los nutrientes y los sitios de adhesión y/o mediante la producción de BLIS por la cepa de *S. salivarius*). La colonización por *S. salivarius* puede lograr una colonización a corto o largo plazo. La colonización a corto plazo es del orden de hasta un mes. La colonización a largo significa meses o incluso años.

5 Una reducción significativa en las bacterias anaerobias descrita en este documento puede medirse indirectamente como una reducción, en una lectura del promedio de CAV previa al tratamiento del individuo, de 50 ppm, preferiblemente 75 ppm y más preferiblemente 100 ppm durante al menos 7 días después del tratamiento.

10 La expresión "dosis unitaria", cuando se usa en referencia a una composición de este documento, se refiere a unidades físicamente diferenciadas adecuadas como monodosis para el individuo, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo (*S. salivarius* viable o extracto activo de la misma) calculada para producir el efecto terapéutico en asociación con el diluyente, vehículo o excipiente requerido.

15 Las dosificaciones específicas pueden variar ampliamente de acuerdo con diversas variables individuales, incluyendo el tamaño, peso, edad, gravedad de la enfermedad (por ejemplo, la constancia y/o cantidad de bacterias residentes causantes de la halitosis) y la sensibilidad al tratamiento (por ejemplo, la susceptibilidad de la cavidad bucal del individuo a la colonización). Los métodos para determinar la vía apropiada de administración y la dosificación pueden determinarse por el consumidor según lo considere apropiado, o en una base caso a caso por un dentista a cargo u otro médico. Dichas determinaciones son rutinarias para un experto en la materia (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 8.^a ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1990).

25 En general, la cantidad de *S. salivarius* administrada al individuo variará de aproximadamente 10^2 a 10^{15} bacterias, preferiblemente de aproximadamente 10^3 a 10^{14} bacterias, más preferiblemente de aproximadamente 10^5 a 10^{12} bacterias, normalmente de aproximadamente 10^9 a 10^{10} unidades formadoras de colonias (UFC) por dosis. Una formulación emplea $3,8 \times 10^9$ UFC por gragea.

30 Pueden administrarse múltiples dosis de la cepa de *S. salivarius* para conseguir la colonización de la cavidad bucal y el remplazo de las cepas residentes causantes de la halitosis, particularmente especies pigmentadas de negro, *Eubacterium* y/o *Micromonas* del individuo. La cepa de *S. salivarius* o extracto puede tener que administrarse al paciente una vez únicamente o más habitualmente de forma repetida. Los tratamientos repetidos pueden ser una vez al mes, una vez a la semana, una vez al día, dos veces al día o lo que pueda ser necesario. Convenientemente, la administración puede lograrse como parte del cuidado dental rutinario del paciente, por ejemplo, como un componente de una gragea, goma, pasta dental, hilo dental o enjuague bucal.

35 Para facilitar la colonización, en este documento se describe una etapa preliminar de pretratamiento del individuo para al menos reducir la microflora normal presente en la cavidad bucal, incluyendo los organismos causantes de la halitosis. Este pretratamiento comprende la etapa de administrar un agente antimicrobiano tal como clorhexidina, dióxido de cloro, triclosán, lactoperoxidasa, té verde o zumo de piña (liofilizado), aunque no se limita a ello. Cuando se usa un enjuague bucal de dióxido de cloro, se mezcla preferiblemente con agua o de forma deseable con zumo de frutas, especialmente zumo de naranja antes de la administración. La concentración de dióxido de cloro es convenientemente entre 2000 y 7000 ppm, más habitualmente de 2500 a 5000 ppm, y pH de 3 a 5, preferiblemente 3,5. El pretratamiento también incluye métodos de eliminación física tal como cepillado, uso del hilo dental y/o raspado de la lengua, o puede seguir un ciclo prescrito de antibióticos tales como tetraciclinas, penicilina, eritromicina, metronidazol o amoxicilina, administrados a dicho individuo. La *S. Salivarius*, o las composiciones que contienen la misma, entonces se administran al entorno despoblado para repoblar el mismo.

40 Un protocolo de tratamiento para la halitosis comprende pretratamiento por raspado de la lengua, cepillado de los dientes y la lengua con pasta dental antibacteriana (por ejemplo, Perioguard®, clorhexidina al 2 % (Colgate, Australia)); hacer gárgaras o enjuagues con clorhexidina (por ejemplo, un enjuague con clorhexidina al 0,2 %); después tomar una gragea. En un protocolo preferido para el tratamiento de la halitosis el pretratamiento comprende raspar la lengua y opcionalmente cepillar los dientes y la lengua con una pasta dental que no contiene clorhexidina (por ejemplo, la mayoría de las pastas dentales disponibles en el mercado); hacer gárgaras o enjuagues con dióxido de cloro; después tomar una gragea. En cada caso, una gragea se administra 1-4 horas, preferiblemente 2 horas después del pretratamiento. Esto va seguido de la administración de 2-5 grageas adicionales, preferiblemente 3 durante el día a intervalos de 1-4 horas, preferiblemente aproximadamente cada 2 horas. Este protocolo se sigue durante 2-4 días para facilitar la colonización. Habitualmente, en este periodo los dientes y la lengua se cepillan y se continúan las gárgaras o el enjuague. Sin embargo, el cepillado con pasta dental con clorhexidina, si se usa, se interrumpe. Con fines de mantenimiento, se toman 1, 2 o 3 grageas, habitualmente de 1 a 2 grageas cada día después del cepillado habitual de los dientes. El régimen se continua siempre que se requiera.

60 La colonización satisfactoria de la cavidad bucal del individuo por la cepa de *S. salivarius* puede establecerse cultivando las bacterias de la cavidad bucal del individuo identificando la cepa de *S. salivarius* por, por ejemplo, producción de BLIS u otros métodos bien conocidos en la técnica para identificación de cepas bacterianas.

El éxito del tratamiento puede medirse indirectamente cuando los niveles postratamiento de compuestos de azufre volátiles se reducen por debajo de los niveles pretratamiento en un individuo que se está tratando.

5 Los usos de la invención pueden comprender además el uso de uno o más agentes secundarios, incluyendo agentes antibacterianos secundarios como se analiza anteriormente.

10 Cuando el término comprende, comprenden, comprendido o comprendiendo se usan en esta memoria descriptiva, tienen que interpretarse especificando la presencia de las características, números enteros, etapas o componentes indicados mencionados, pero no excluyendo la presencia o adición de una o más características, números enteros, etapas, componentes o grupos de los mismos diferentes.

Diversos aspectos de la invención se ilustrarán ahora de manera no limitante por referencia a la siguiente sección experimental.

15 Ejemplos

Ensayo de antagonismo diferido de actividad antibacteriana

20 El espectro de actividad inhibidora de *Streptococcus salivarius* K12 y K30 se estableció mediante el uso de un ensayo de antagonismo diferido, esencialmente como se describe por Tagg y Bannister (J. Med. Microbiol. 1979; 12:397). En resumen, se inoculó un cultivo en estrías diamétrico de 1 cm de ancho de K12 y K30 (cepa productora) en medio de agar con sangre-calcio (placas de base de agar Columbia, sangre humana al 5 %, CaCO₃ al 0,1 % [BDH]). Después de incubación en una atmósfera de CO₂ al 5 %, durante 24 horas a 37 °C, se retiró el crecimiento celular macroscópico con un portaobjetos de vidrio y las células residuales en la superficie de agar se inactivaron por 25 exposición a vapores de cloroformo durante 30 minutos. La superficie de agar entonces se aireó durante 30 minutos. Las cepas indicadoras implicadas en la halitosis que habían crecido durante 48 horas en placas de agar con sangre-calcio se suspendieron en caldo de Todd Hewitt y se usaron para inocular a ángulos de 90 grados cruzando la línea del cultivo en estrías original con el uso de hisopos de algodón estériles, en condiciones anaeróbicas. Después de incubación durante 48 horas en un entorno anaeróbico a 37 °C, se registró el grado de inhibición de 30 cada cepa indicadora. El sistema de puntuación para la medición de inhibición fue el siguiente: un signo negativo (-) indicaba ausencia de inhibición del microorganismo indicado; un símbolo positivo (+) indicaba que había algo de inhibición en la placa donde había crecido el microorganismo productor, pero no exclusivamente sobre esa región completa; dos símbolos positivos (++) indicaba que la cepa indicadora se inhibía cuando la cepa productora crecía; cuando se usaban tres símbolos positivos (+++), el crecimiento de la cepa indicadora estaba al menos 5 mm desde 35 donde había crecido la cepa productora; y cuatro símbolos positivos (++++) representaba inhibición de las cepas indicadores más allá de 5 mm de crecimiento. Los resultados se muestran en la tabla 1 a continuación.

Efecto de extracto de *S. salivarius* K12 sobre bacterias

40 *S. salivarius* K12 se cultivó en caldo de leche en polvo desnatada a 33 °C durante 18 h. Las células bacterianas se recogieron por centrifugación y se liofilizaron. Se incubó 1 gramo de células liofilizadas en 10 ml de metanol al 95 %, pH 2,5 a temperatura ambiente durante 2 h. La preparación se centrifugó para retirar el material no disuelto. La toxicidad del sobrenadante se ensayó usando un ensayo de difusión en pocillo.

45 Inhibición de bacterias pigmentadas de negro (especies de *Prevotella*) en saliva por cepas de *S. salivarius*

50 Para ensayar la capacidad de *S. salivarius* contra microorganismos pigmentados de negro que se han implicado en la halitosis, se rasparon con hisopo cepas de *S. salivarius* K12 (productora de salA y B), NR (productora de salB), 20P3 (productora de salA) y MU-Neg (no productora) de placas principales en la mitad entera de varias placas de sangre de pH tamponado (placas de base de agar Columbia, sangre humana al 5 %, CaCO₃ al 0,1 % [BDH]). Las placas se incubaron durante 18 horas a 37 °C en condiciones de CO₂ al 5 %. El crecimiento bacteriano se retiró usando hisopos con punta de algodón y se usaron vapores de cloroformo para inactivar cualquier bacteria restante. Se superpusieron 15 ml de agar con sangre con vancomicina (por litro; 30 g de caldo con triptona y soja [BBL], 15 g de agar [BBL] y después autoclave, 50 ml de sangre desfibrinada y 10 ml de solución madre de vancomicina 55 esterilizada en filtro [0,014 g en 10 ml de H₂O]) en placas y se permitió que reposaran. Se diluyeron muestras de saliva reciente de dos sujetos "normales" en solución salina estéril y se sembraron en placa en espiral inmediatamente alícuotas de 50 ul en las placas de agar preparadas. Las placas se incubaron en condiciones aeróbicas a 37 °C durante 48-72 horas dependiendo del crecimiento. Ambos sectores de la placa se contaron.

60 Efecto de *S. salivarius* K12 sobre los sujetos con halitosis

Sujetos, tratamiento, instilación probiótica y recogida de muestras

65 Se seleccionaron 65 sujetos para lecturas de aliento con compuesto de azufre volátil (CAV) mediante un halímetro (Interscan Corp., Chatsworth, CA). Las lecturas de CAV en personas con aliento normal están típicamente en el intervalo de 802-150 ppm. A niveles de 200-300 ppm es apreciable un mal olor bucal por un observador que

permanece cerca del paciente. A 350-400 ppm, el olor es apreciable por un observador que permanece a varios metros del paciente. Aquellos sujetos con puntuaciones de aliento de más de 200 ppm en dos visitas diferentes se reclutaron para el estudio (n=13). Cada uno firmó un consentimiento informado según el protocolo aprobado por el Comité Ético de Otago. El sujeto tras la segunda visita empezó un tratamiento mecánico y químico de su boca en el laboratorio. Este consistía en cepillado de dientes y lengua (2 minutos con Colgate Total™ [0,3 % de triclosán p/v], Colgate-Palmolive, NY, EE. UU.), raspado de la lengua durante 30 segundos, cepillado de los dientes y la lengua con gel CHX (Colgate, Australia) (Perioguard gel bucal CHX al 2,0 %, 2 minutos) y seguido de un enjuagado con CHX de 30 segundos (0,2 % de CHX, 10 % de alcohol etanólico). Esto estuvo seguido a intervalos por chupado de una gragea (BLIS Technologies Limited, Wellington, Nueva Zelanda) (comenzando 2 horas después del tratamiento y típicamente separadas 2 horas, 4 veces al día), que contenían cada una $>1 \times 10^9$ unidades formadoras de colonia de *S. salivarius* K12 resistente a estreptomycin. En los días 2 y 3, los sujetos se cepillaron los dientes y la lengua por la mañana con Colgate Total™, usaron un enjuague de CHX de 30 segundos (0,2 % de CHX, 10 % de alcohol etanólico) y usaron grageas K12 como el primer día. Los sujetos entonces dejaron el tratamiento con clorhexidina y tomaron exactamente 2 grageas por día en los días 4 a 14 después de realizar su régimen de cuidado bucal normal, por la mañana y por la noche.

En cada visita de pretratamiento y una y dos semanas después del inicio del tratamiento los sujetos se ensayaron para los niveles de CAV y se tomaron tanto muestras de saliva como frotis de la lengua (antes de tomar la gragea de la mañana). Durante el estudio, se tomaron muestras de dos sujetos más frecuentemente y se mantuvieron con dos grageas durante un periodo de 28 días. Estos sujetos proporcionaron muestras adicionales en el día 4, 11, 21, 28 y dos semanas después de cesar la administración de K12. Todas las mediciones se tomaron por la mañana antes de que los sujetos comieran, bebiera, fumaran o usaran cualquier cuidado bucal.

Después del estudio, 4 sujetos que respondieron positivamente al tratamiento tuvieron un seguimiento de hasta 6 semanas después. Para determinar el efecto del tratamiento con clorhexidina sobre las puntuaciones de aliento se pidió a los sujetos que repitieran el estudio usando el mismo régimen de CHX de 3 días, pero sin probiótico *S. salivarius*. Como a los sujetos del estudio, se observaron en el séptimo día para las mediciones y muestras.

30 *Análisis de saliva*

Se ensayaron muestras de saliva reciente y frotis de la lengua para la hidrólisis con *N*-benzoil-DL-arginina-2-naftilamida (BANA) (BANAMet ILC, Ann Arbor, MI.), ya que las puntuaciones positivas por el ensayo BANA se han asociado previamente con la presencia de actividades enzimáticas que forman mal olor de determinadas especies de bacterias bucales (1, 3). Esto se realizó de acuerdo con las directrices del fabricante. Se realizó evaluación organoléptica en alícuotas de muestras de saliva congeladas de los sujetos. En resumen, se incubaron 300 µl de saliva descongelada a 37 °C durante 10 minutos en un tubo Eppendorf cerrado. Después de la incubación, se retiró la tapa el recipiente se mantuvo a aproximadamente 4 cm del examinador con fines de evaluación. Las muestras se calificaron de acuerdo con los mismos criterios usados para evaluar el aire del aliento de los que padecen halitosis (7), usando una escala de 0-5, siendo 0 igual a ausencia de olor detectado y 5 la más grave.

40 *Análisis de cultivo*

Las muestras de saliva recientes se diluyeron inmediatamente 10 veces en solución salina tamponada con fosfato estéril (PBS, pH 7,5). Se sembraron en espiral alícuotas de 50 µl en placas con sangre de pH tamponado (como se describe previamente), agar de *Mitis-salivarius* (Difco, selectivo de *S. salivarius*) y agar de *Mitis-salivarius* selectivo de K12 que contiene estreptomycin (100 µg/ml, Sigma, Mo. EE. UU.). las placas se incubaron en una atmósfera de CO₂ al 5 %, durante 24 horas a 37 °C. Se obtuvo una estimación de los niveles de colonización con *S. salivarius* K12 de los recuentos de colonias en el agar de *Mitis-salivarius*/estreptomycin.

50 Resultados

Efecto inhibidor

55 El ensayo de las cepas de *Streptococcus salivarius* que no eran productoras de salivaricinas o que producían salA y salB, salA, salB únicamente contra algunas de las especies bacterianas implicadas en la halitosis mostró que únicamente las bacterias grampositivas se veían afectadas cuando se ensayaban por antagonismo diferido (tabla 1).

Tabla 1. Sensibilidades de microorganismos seleccionados implicados en la halitosis a diversas cepas de *S. salivarius*

Inhibición del crecimiento de organismos implicados en la halitosis								
Cepa de <i>S. salivarius</i>	Bacteriocina(s) producida(s)	<i>Micrococcus luteus</i> I1	<i>S. anginosus</i> I3	<i>Eubacterium saburreum</i> ATCC 33271	<i>Micromonas micros</i> ATCC 33270	<i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277	<i>Porphyromonas Gingivalis</i> W50	<i>Prevotella intermedia</i> ATCC 25611
K12	Salivaricina A ₂ Salivaricina B	++++	++++	++++	++++	-	-	-
K30	Salivaricina A ₂ Salivaricina B	++++	++++	++++	++++	-	-	-
NR	Salivaricina B	++++	++++	++	++++	-	-	-
20P3	Salivaricina A	++++	-	++	-	-	-	-
MU Neg.	No productora	-	-	-	-	-	-	-

5 La cantidad máxima de inhibición de las bacterias grampositivas se produjo por la cepa K12 y K30, que produce salA y salB. *S. salivarius* cepa NR (un productor únicamente de salB) tuvo buena actividad contra la cepa de *Micromonas micros*, pero actividad reducida contra *Eubacterium saburreum* en comparación con la cepa K12 y K30. La cepa no productora de bacteriocina (MU Negativa) no inhibía ninguna de las cepas ensayadas.

10 Tabla 2. Ensayo de difusión en pocillo de extracto de *S. salivarius* K12

Extracto	Tamaño de la zona (mm)		
	<i>Micromonas micros</i> ATCC 33270	<i>Prevotella intermedia</i> ATCC 256111	<i>Prevotella intermedia</i> WS0
<i>S. salivarius</i> K12	4	4	4

La valoración del extracto de *S. salivarius* K12 contra *Micrococcus luteus* fue 128. El extracto tuvo actividad contra *Micromonas micros* y las dos cepas de *Prevotella intermedia*.

15 *Efecto contra organismos en la saliva*

En ambos sujetos la máxima reducción (8 y 37 % de los recuentos respectivos) de los microorganismos pigmentados de negro aparecían en la mitad de control de la placa de agar donde había crecido K12 (productor de salA, B) (tabla 2, figura 1).

20 En ambos sujetos, hubo reducciones sustanciales (8 % y 37 % respectivamente) en los recuentos de colonias de bacterias pigmentadas de negro en el lado de la placa donde se había cultivado previamente la cepa K12 en comparación con los recuentos en la mitad de control de la placa (tabla 2, figura 1).

25 Tabla 2. Efecto de cepas de *S. salivarius* sobre recuentos de bacterias pigmentadas de negro en muestras de saliva

Sujeto	Cepa de <i>Streptococcus salivarius</i> y cantidades de colonias pigmentadas de negro*							
	K-12	Mitad de control	NR	Mitad de control	20P3	Mitad de control	MU Neg.	Mitad de control
A	1,4 x 10 ⁵	1,7 x 10 ⁶	1,4 x 10 ⁶	3,0 x 10 ⁶	2,0 x 10 ⁶	3,5 x 10 ⁶	1,8 x 10 ⁶	2,2 x 10 ⁶
B	3,0 x 10 ⁶	7,9 x 10 ⁶	4,1 x 10 ⁶	6,9 x 10 ⁶	3,1 x 10 ⁶	6,6 x 10 ⁶	5,4 x 10 ⁶	2,6 x 10 ⁶

*UFC/ml de morfología de colonias pigmentadas de negro.

30 También hubo alguna reducción en las cantidades de colonias pigmentadas de negro en las placas en las que se habían cultivado productores solamente de salA o solamente de salB, pero poca reducción de las cantidades en la placa de control en que se había cultivado la cepa que no produce salivaricina. Varias colonias pigmentadas de negro del tipo que se ha inhibido por la presencia de las salivaricinas se cogieron de las secciones de control de las placas y se extrajo su ADN, se amplificó por PCR y se secuenció. Los resultados de secuenciación (no mostrados) indicaron que las bacterias susceptibles tenían la máxima homología con *Prevotella* sp., clon bucal BE073 (muy relacionado con *Prevotella melaninogenica*), 99 %, 152 pb (AF385551).

Datos clínicos

5 Todos los sujetos completaron el estudio de dos semanas. Las lecturas de compuesto de azufre volátil (CAV) disminuyeron en más de 100 ppm en 11/13 sujetos cuando se medían a los 7 días y 8 de estos sujetos mantuvieron niveles inferiores a los previos al tratamiento cuando se ensayaban de nuevo en el día 14 (tabla 3).

Tabla 3. Lecturas de los sujetos al inicio y después del tratamiento

Demográficas			Inicio			Segunda visita			Tratamiento					
Sujeto (n=13)	Edad	Género	CAV (ppmm)	Selección inicial BANA +/-	Organoléptica de la saliva	CAV (ppmm)	BANA +/-	Organoléptica de la saliva	CAV (ppmm)	BANA +/-	Organoléptica de la saliva	CAV (ppmm)	BANA +/-	Organoléptica de la saliva
4	18	F	386	+/-	3	504	-	ND	175	+/-	2	222	-	2
5	20	M	292	ND	ND	394	ND	ND	159	-	1	97	-	2
12	18	M	404	+	3	434	+/-	ND	59	+/-	1	364	-	2
27	25	F	324	-	3	514	-	3	128	-	1	145	-	1
35	39	M	320	-	4	200	ND	ND	631	-	5	413	+/-	4
38	69	M	363	+/-	3	290	+	3	197	+/-	2	358	-	3
46	47	M	229	+	3	327	+	4	75	+/-	2	266	+/-	4
47	64	F	307	+	3	443	+	3	126	+/-	2	183	+/-	3
52	68	M	486	+	4	312	+/-	3	109	+/-	3	56	-	2
58	68	M	408	-	3	213	+/-	3	154	+/-	2	122	-	1
59	33	F	254	+	3	206	+/-	2	304	+/-	1	303	-	2
60	41	M	433	+/-	4	381	-	3	287	-	3	244	-	3
64	43	M	286	+	3	210	+/-	2	132	-	2	135	-	1
Media (DT)	42.54 (19.59)	F=4 M=9	345.54 (75.06)		3.25 (0.45)	340.62 (113.74)		2.88 (0.60)	195.08 (149.26)		2.077 (1.12)	223.69 (112.65)		2.307 (1.03)

+/-=positivo débil.
ND=no determinado.

Las lecturas BANA también fueron inferiores en la mayoría de los sujetos después del tratamiento, donde no se detectaron positivos fuertes, mientras que se habían detectado varios anteriormente. Los cambios en las lecturas organolépticas también se correlacionaron en líneas generales con los otros parámetros clínicos que se midieron.

5 Cuatro sujetos que habían mantenido lecturas y parámetros de aliento inferiores durante el tratamiento con K12 se volvieron a convocar seis semanas después para controlar el efecto de la clorhexidina en solitario. Un sujeto se excluyó ya que sus niveles de CAV en el aliento no habían vuelto a más de 200 ppm. No hubo disminución en las lecturas de CAV, organolépticas o BANA de los tres sujetos después del tratamiento con CHX solamente (tabla 4).

10 Tabla 4. Lecturas de los sujetos de tres sujetos convocados de nuevo antes y después de clorhexidina

Sujeto	Inicio			Después de tratamiento con CHX			Cambio de CAV (ppmm) después de CHX solamente	
	Media del cambio de CAV (ppmm) en el ensayo de K12	CAV (ppmm)	Organoléptica de BANA	CAV (ppmm)	Organoléptica de la saliva	Organoléptica de la saliva		
27	-282,5	532	+/-	2	527	+	2	-5
47	-220,5	298	+/-	3	244	+/-	3	-54
60	-141,5	216	+/-	3	274	+/-	2	+58

Datos de cultivo

15 El promedio de colonización para los sujetos después del tratamiento con *S. salivarius* K12 varió de un 29 a un 95 % (tabla 5).

20 En general, no hubo cambio significativo en los recuentos bacterianos totales de los sujetos antes o después del tratamiento, sin embargo, hubo un aumento ligero, aunque no significativo en las cantidades de *S. salivarius* (tabla 5).

Tabla 5. Media de recuentos en saliva (UFC/ml) de bacterias facultativas, *S. salivarius* y *S. salivarius* K12 en 13 sujetos antes y 7 y 14 días después del inicio del tratamiento con K12

Población bacteriana	Medio	Pretratamiento*		Tratamiento*	
		Selección inicial	Segunda visita	Day 7	Day 14
Total	Agar con sangre	8,7 x 10 ⁸	2,4 x 10 ⁸	3,3 x 10 ⁸	2,3 x 10 ⁸
	Columbia-calcio	(1,4 x 10 ⁹)	(2,7 x 10 ⁸)	(4,8 x 10 ⁸)	(3,7 x 10 ⁸)
<i>S. salivarius</i>	<i>Mitis salivarius</i>	4,4 x 10 ⁷	4,5 x 10 ⁷	6,1 x 10 ⁷	6,1 x 10 ⁷
		(6,8 x 10 ⁷)	(6,2 x 10 ⁷)	(7,8 x 10 ⁷)	(6,6 x 10 ⁷)
<i>S. salivarius</i> K12	<i>Mitis salivarius</i> + estreptomycin	0	0	1,8 x 10 ⁷	5,8 x 10 ⁷
				(4,9 x 10 ⁷)	(1,4 x 10 ⁷)
Proporción de K12 a todas las <i>S. salivarius</i>		0	0	0,2951	0,9508

Los valores en paréntesis indican la desviación típica de la media.

*Los recuentos de células totales y de *S. salivarius* no fueron significativamente diferentes antes o después del tratamiento (ANOVA no paramétrico, P>0,5).

Discusión

25 *Streptococcus salivarius* K12 fue detectable en la saliva de cada sujeto en ambas muestras posteriores tomadas al menos 12 horas después de que los sujetos hubieran tomado su última dosis la noche previa.

30 Cuando se examina el porcentaje de *S. salivarius* como una proporción de la composición bacteriana total, un 85 % de los sujetos tenían un aumento en la proporción de esta bacteria como parte del recuento total, lo que sugiere que ha llegado a ser más común en la cavidad bucal.

35 Los niveles de CAV en ocho sujetos fueron significativamente inferiores cuando se ensayaban una y dos semanas después de comenzar el tratamiento. Tres sujetos obtuvieron lecturas inferiores únicamente después de una semana y los dos sujetos restantes mantuvieron niveles elevados durante todo el estudio. Se produjo reducción de la actividad BANA en la mayoría de los sujetos después del tratamiento. En estudios de antagonismo diferido, *S. salivarius* K12 inhibía las especies bacterianas grampositivas implicadas en la halitosis, e inhibía significativamente los tipos de colonias pigmentadas de negro presentes en muestras de saliva.

40 Basándose en estos resultados, el remplazo de bacterias implicadas en la halitosis con una bacteria comensal productora de bacteriocina, particularmente *S. salivarius* K12, parece proporcionar un tratamiento alternativo para la reducción a largo plazo de la halitosis.

Gragea	
Gragea	
Ingredientes	Por 945 mg de gragea
<i>S. salivarius</i>	3,8 x 10 ⁹ UFC (liofilizado)
Isomaltitol	600 mg
Emdex™	150 mg
ProSolv HD™	50 mg
Estearato de magnesio	15 mg
Aroma	10 mg

Los ingredientes se mezclan y los comprimidos se producen usando compresión en seco.

5 Aplicación industrial

Las cepas de *S. salivarius* productoras de BLIS, particularmente las cepas productoras de salivaricina B son activas contra varios microorganismos implicados en la halitosis (tablas 1, 2 y 6). Más particularmente, por primera vez se muestra que las cepas son activas en un régimen de mantenimiento, es decir, para generar un efecto acumulado contra al menos algunos organismos causantes de halitosis anaerobios durante un periodo de una semana o más. Esto es sorprendente cuando en general las cepas de *S. salivarius* se cree que son activas contra únicamente organismos aerobios muy relacionados. Los organismos causantes de halitosis son anaerobios y ocupan nichos a los que no acceden generalmente *S. Salivarius*. Las cepas y los extractos activos relacionados, formulaciones y composiciones de este documento, por lo tanto, tienen aplicación en métodos de tratamiento profiláctico o terapéutico de individuos contra los efectos perjudiciales al menos de algunas infecciones por *Eubacterium* y *Micromonas*, así como algunos tipos de colonias pigmentadas de negro, especialmente en la cavidad bucal. Estos métodos incluyen el tratamiento de la halitosis en que estos organismos son los agentes causantes principales. Los extractos de *S. salivarius* y composiciones descritas en este documento también tienen aplicación en el tratamiento de amigdalitis.

20 Listado de secuencias

<110> BLIS TECHNOLOGIES LIMITED

25 <120> Tratamiento del mal olor

<130> P024724EP

30 <140> 04748848.1
<141> 19-07-2004

<150> NZ532382
<151> 20-04-2004

35 <150> NZ527075
<151> 18-07-2003

<160> 8

40 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 48
<212> PRT

45 <213> *Streptococcus salivarius*

<400> 1

Met Lys Asn Ser Lys Asp Ile Leu Asn Asn Ala Ile Glu Glu Val Ser
1 5 10 15

Glu Lys Glu Leu Met Glu Val Ala Gly Gly Lys Arg Gly Ser Gly Trp
20 25 30

Ile Ala Thr Ile Thr Asp Asp Cys Pro Asn Ser Val Phe Val Cys Cys
35 40 45

ES 2 700 157 T3

<210> 2
 <211> 156
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus salivarius*
 5
 <400> 2
 atgaatgccca tgaaaaactc aaaagatatt ttgaacaatg ctatcgaaga agtttctgaa 60
 aaagaactta tggaagtagc tgggtgtaaa agaggttcag gttggattgc aactattact 120
 gatgactgtc caaactcagt attcgtttgt tgtaa 156
 10
 <210> 3
 <211> 48
 <212> PRT
 <213> *Streptococcus salivarius*
 15
 <400> 3
 Met Lys Asn Ser Lys Asp Ile Leu Thr Asn Ala Ile Glu Glu Val Ser
 1 5 10 15
 Glu Lys Glu Leu Met Glu Val Ala Gly Gly Lys Lys Gly Ser Gly Trp
 20 25 30
 Phe Ala Thr Ile Thr Asp Asp Cys Pro Asn Ser Val Phe Val Cys Cys
 35 40 45
 20
 <210> 4
 <211> 156
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus salivarius*
 25
 <400> 4
 atgagtttta tgaaaaattc aaaggatatt ttgactaatg ctatcgaaga agtttctgaa 60
 aaagaactta tggaagtagc tgggtgtaaa aaaggttcag gttggtttgc aactattact 120
 gatgactgtc cgaactcagt atttgtttgt tgtaa 156
 30
 <210> 5
 <211> 156
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus salivarius*
 35
 <400> 5
 atgattgccca tgaaaaactc aaaagatatt ttgaacaatg ctatcgaaga agtttctgaa 60
 aaagaactta tggaagtagc tgggtgtaaa agaggtacag gttggtttgc aactattact 120
 gatgactgtc caaactcagt attcgtttgt tgtaa 156
 40
 <210> 6
 <211> 51
 <212> PRT
 <213> *Streptococcus salivarius*
 45
 <400> 6

ES 2 700 157 T3

Met Ile Ala Met Lys Asn Ser Lys Asp Ile Leu Asn Asn Ala Ile Glu
 1 5 10 15

Glu Val Ser Glu Lys Glu Leu Met Glu Val Ala Gly Gly Lys Arg Gly
 20 25 30

Thr Gly Trp Phe Ala Thr Ile Thr Asp Asp Cys Pro Asn Ser Val Phe
 35 40 45

Val Cys Cys
 50

5 <210> 7
 <211> 114
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus salivarius*
 <400> 7

ttgactcttg aagaacttga taacgttctt ggtgctggtg gtggagtaat ccaaaccatt 60
 10 tcacacgaat gtcgatgaa ctcatggcag ttcttgttta cttggtgctc ttaa 114

15 <210> 8
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> *Streptococcus salivarius*
 <400> 8

Leu Thr Leu Glu Glu Leu Asp Asn Val Leu Gly Ala Gly Gly Gly Val
 1 5 10 15

Ile Gln Thr Ile Ser His Glu Cys Arg Met Asn Ser Trp Gln Phe Leu
 20 25 30

Phe Thr Cys Cys Ser
 35

20

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende *S. salivarius* productora de sustancia inhibidora de tipo bacteriocina (BLIS) o un extracto de *S. salivarius* que incluye una o más de salivaricina A, A₁, A₂ y B, para su uso en el tratamiento profiláctico o terapéutico de la halitosis en un individuo que lo necesita, en la que la *S. salivarius* produce una o más de salivaricina A (codificada por la SEQ ID NO: 2), salivaricina A₁ (codificada por la SEQ ID NO: 4), salivaricina A₂ (codificada por la SEQ ID NO: 5), salivaricina B (codificada por la SEQ ID NO: 7) o variantes funcionales que tienen al menos un 70 % de identidad con una cualquiera de las salivaricinas codificadas por las SEQ ID NO: 2, 4, 5 y 7,
2. Una composición que comprende una *S. salivarius* productora de BLIS o un extracto de *S. salivarius* que incluye una o más de A, A₁, A₂ y B, para su uso en la preparación de una composición para controlar la incidencia y/o gravedad de la halitosis en un individuo que lo necesita, en la que la *S. salivarius* produce una o más de salivaricina A (codificada por la SEQ ID NO: 2), salivaricina A₁ (codificada por la SEQ ID NO: 4), salivaricina A₂ (codificada por la SEQ ID NO: 5), salivaricina B (codificada por la SEQ ID NO: 7) o variantes funcionales que tienen al menos un 70 % de identidad con una cualquiera de las salivaricinas codificadas por las SEQ ID NO: 2, 4, 5 y 7,
3. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, en la que la halitosis está causada al menos en parte por una o más especies de bacterias anaerobias.
4. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en la que las bacterias anaerobias son cepas de:
- (i) especies de *Prevotella*;
 - (ii) especies de *Eubacterium*; y/o
 - (iii) especies de *Micromonas*.
5. Una composición para su uso de acuerdo la reivindicación 4, en las que las especies de *Prevotella* son *Prevotella intermedia* y/o *Prevotella melaninogenica*.
6. Una composición para su uso de acuerdo la reivindicación 4, en la que la *Eubacterium* es *Eubacterium saburreum*.
7. Una composición para su uso de acuerdo la reivindicación 4, en la que la *Micromonas* es *Micromonas micros*.
8. Una composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la *S. salivarius* produce salivaricina B (codificada por la SEQ ID NO: 7) o una variante de la misma que tiene al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 7 y la *S. salivarius* también produce salivaricina A₂ (codificada por la SEQ ID NO: 5) o una variante de la misma que tiene al menos un 70 % de identidad con la salivaricina codificada por la SEQ ID NO: 5.
9. Una composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que el productor de salivaricina es la cepa de *S. salivarius* K12, depositada en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen Und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemania, número de acceso DSM 13084.
10. Una composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que el productor de salivaricina es la cepa de *S. salivarius* K30, depositada en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen Und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemania, número de acceso DSM 13085.
11. Una composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que la composición comprende además un diluyente, vehículo y/o excipiente.
12. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en la que la composición se formula para administración oral.
13. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en la que la composición se formula como una gragea, pulverización, enjuague bucal, pasta de dientes, dentífrico, gárgaras, cápsula, hilo dental, película, chicle o comprimido masticable.
14. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en la que la composición se formula como una gragea.
15. Una composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en la que la composición está en forma de administración unitaria.
16. Una composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en la que la composición comprende además uno o más agentes antibacterianos secundarios.

17. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 16, en la que el agente o agentes antibacterianos secundarios se seleccionan de una o más sustancias inhibidoras de tipo bacteriocina (BLIS).

5 18. Una composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 de una *S. salivarius* productora de BLIS, en la que dicha *S. salivarius* se incluye un alimento, bebida o golosinas.

Figura 1

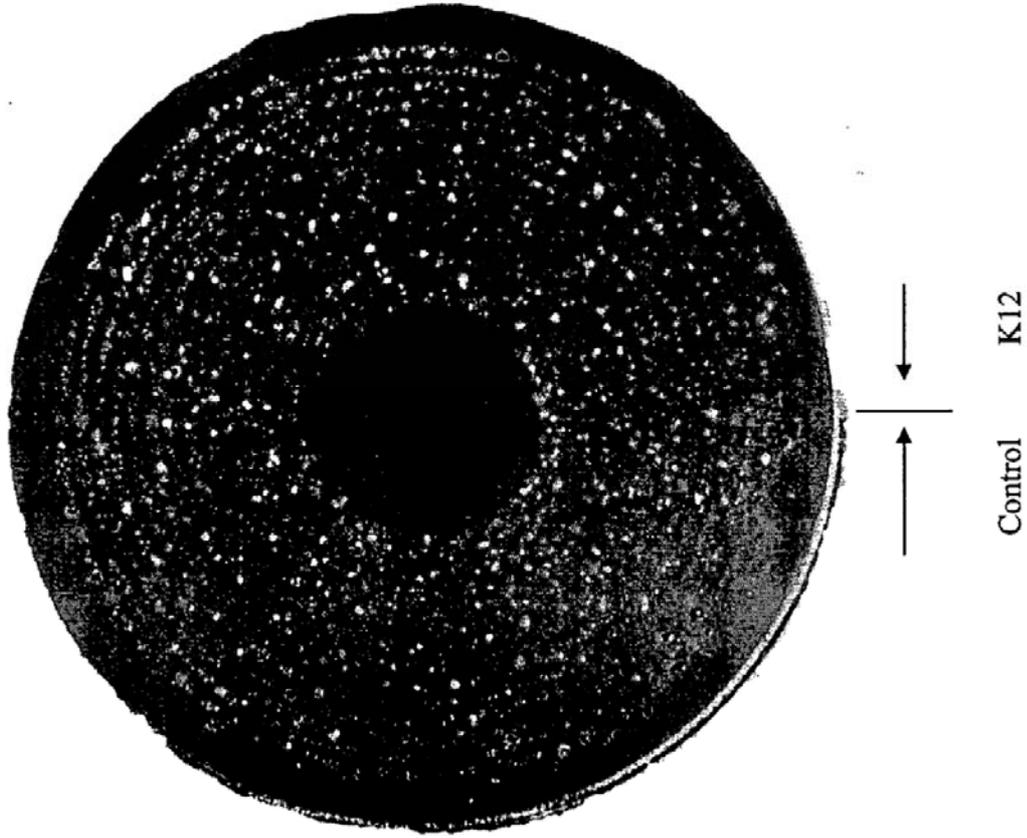


Figura 2A

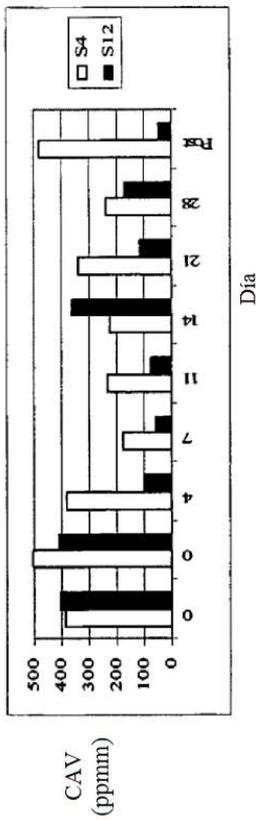


Figura 2B

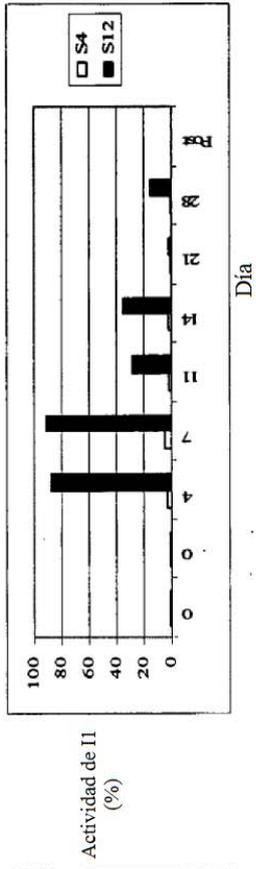


Figura 2C

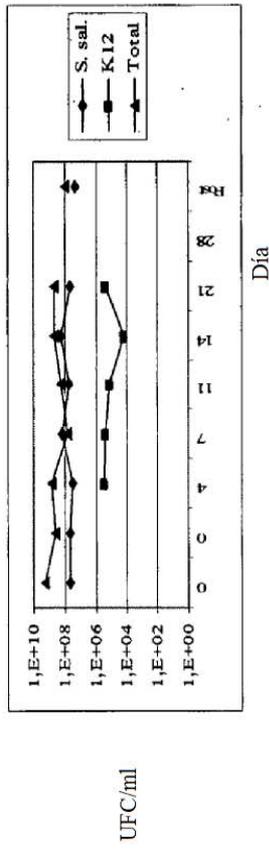


Figura 2D

