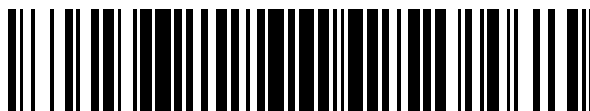


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 790 774**

51 Int. Cl.:

G01N 21/64 (2006.01)

C12Q 1/02 (2006.01)

C12Q 1/689 (2008.01)

A61B 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.09.2015 PCT/CN2015/089238**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.03.2017 WO17041244**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.09.2015 E 15903351 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2020 EP 3347703**

54 Título: **Sondas fluorescentes para evaluar productos para el cuidado bucal que contienen estannoso**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.10.2020

73 Titular/es:

THE PROCTER & GAMBLE COMPANY (100.0%)
One Procter & Gamble Plaza
Cincinnati, OH 45202, US

72 Inventor/es:

SHI, YUNMING;
STRAND, ROSS;
CHANG, JINLAN;
HE, TAO;
WHITE, JR.DONALD JAMES;
HE, YANYAN;
BARKER, MATTHEW LLOYD y
DONG, WEILI

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 790 774 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

Sondas fluorescentes para evaluar productos para el cuidado bucal que contienen estannoso

5 Campo de la invención

La presente descripción se refiere a métodos para evaluar productos para el cuidado bucal que contienen estannoso.

10 Antecedentes de la invención

En general, se han descrito métodos para cuantificar la eficacia de los productos para el cuidado bucal (p. ej., pasta de dientes, colutorio, etc.) para desplazar células de las superficies de prueba de biopelícula o inhibir o retardar la acumulación de células sobre una superficie de prueba (documentos US 6309835 B1, US 2006/275847 A1). Asimismo, las sondas fluorescentes y la confocal laser scanning microscopy (microscopía de barrido con láser confocal - CLSM) se han usado generalmente para evaluar la vitalidad bacteriana de la biopelícula. El estannoso (Sn^{2+}) se ha añadido a los productos para el cuidado bucal para prevenir la placa dental y las enfermedades bucales (documento US 2015/241409 A1). Se ha descubierto que el Sn^{2+} inhibe de manera eficaz determinadas bacterias que pueden provocar caries dentales en la placa dental interproximal humana. H. Lan y col., The Analyst, vol. 139 (20), 2014 describen la detección de la activación por fluorescencia de Sn^{2+} en células eucariotas y procariotas vivas. Sin embargo, existe la necesidad de un método específico para cuantificar la eficacia de los productos para el cuidado bucal que contienen estannoso y su eficacia bacteriostática o bactericida contra una biopelícula.

Sumario de la invención

La presente invención aborda al menos una de estas necesidades proporcionando un método para cuantificar la sorción de estannoso por las células microbianas de una biopelícula según la reivindicación 1.

La presente invención se basa, en parte, en el sorprendente descubrimiento de que determinadas sondas de estannoso se pueden usar para cuantificar la sorción de estannoso por las células microbianas de la biopelícula.

Una ventaja del presente método es que las sondas de estannoso y microbianas presentan fluorescencia en diferentes colores y, con ello, se puede determinar la localización conjunta de las sondas en las bacterias de la biopelícula.

Otra ventaja de la presente invención es que los métodos se pueden usar para identificar composiciones para el cuidado bucal más eficaces, ya que estas composiciones están relacionadas con el suministro y/o la eficacia de estannoso en la biopelícula.

Otra ventaja más de la presente invención es que los métodos se pueden usar para demostrar a los consumidores y a los odontólogos cómo funcionan los productos bucales que contienen estannoso, ya que estos productos están relacionados con el suministro y/o la eficacia de estannoso en la biopelícula.

Estas y otras características, aspectos y ventajas de realizaciones específicas serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de una lectura de la presente descripción.

45 Breve descripción de los dibujos

Las realizaciones expuestas en los dibujos son de naturaleza ilustrativa y no pretenden limitar la invención definida en las reivindicaciones. La siguiente descripción detallada de las realizaciones ilustrativas pueden entenderse al leerla con referencia a los siguientes dibujos, en los que las estructuras similares están indicadas con los mismos números de referencia, y en los que:

la Figura 1 es una vista en perspectiva de una férula bucal con discos de hidroxiapatita adheridos a la misma;

la Figura 2 es una vista en perspectiva del disco de hidroxiapatita que tiene ranuras en el mismo;

la Figura 3 es un esquema de una vista en sección transversal de la ranura con una biopelícula en la misma;

la Figura 4 es un gráfico de barras que proporciona un porcentaje de localización conjunta del estannoso en las bacterias (de la biopelícula) para varias pastas de dientes que contienen estannoso y un control negativo;

la Figura 5 es un ejemplo esquemático de cómo se determinan el porcentaje de localización conjunta del estannoso en las bacterias y un coeficiente de superposición de estannoso; y

la Figura 6 es un gráfico de barras que proporciona un coeficiente de superposición de una pasta que contiene estannoso en la biopelícula con el tiempo.

Descripción detallada de la invención

El siguiente texto muestra una descripción amplia de numerosas realizaciones diferentes de la presente descripción. La descripción debe considerarse solamente como ilustrativa y no describe todas las realizaciones posibles, ya que describir todas las realizaciones posibles resultaría poco práctico, si no imposible. Se entenderá que cualquier rasgo, característica, componente, composición, ingrediente, producto, etapa o metodología descrita en la presente memoria se puede eliminar, combinar o sustituir, en todo o en parte, con cualquier otro rasgo, característica, componente, composición, ingrediente, producto, etapa o metodología descrita en la presente memoria. Se podrían aplicar numerosas realizaciones alternativas utilizando la tecnología actual o la tecnología desarrollada después de la fecha de presentación de esta patente, que seguirían entrando en el alcance de las reivindicaciones.

Un aspecto de la presente descripción se refiere a un método para cuantificar la sorción de estannoso por las células microbianas de una biopelícula que comprende las etapas: tratar la biopelícula con un producto para el cuidado bucal que contiene estannoso; marcar las células microbianas de la biopelícula con una sonda fluorescente microbiana; incubar la biopelícula con una sonda fluorescente de estannoso; y cuantificar las células marcadas mediante la medición de la luz de fluorescencia emitida por las células marcadas mediante confocal laser scanning microscopy (microscopía de barrido con láser confocal - CLSM). Estas etapas no necesitan realizarse en ningún orden específico.

Tratamiento de la biopelícula con un producto para el cuidado bucal que contiene estannoso

El término “biopelícula” se refiere a la/s capa/s de células adheridas a una superficie. Una biopelícula puede incluir tanto células microbianas vivas y en crecimiento como células microbianas muertas. La biopelícula puede estar compuesta de un tipo de células o puede estar compuesta de dos o más tipos de células, tales como, por ejemplo, un complejo de biopelícula que es una comunidad bacteriana de múltiples especies. Un tipo específico de biopelícula es la biopelícula de placa (es decir, la biopelícula que, de forma típica, se forma sobre las superficies dentales en la boca humana). Las bacterias en una biopelícula de placa tienen características fisiológicas significativamente diferentes, p. ej., una resistencia aumentada a los detergentes y antibióticos, lo que hace que la investigación de las biopelículas sea muy importante. Se describe una lista no limitante de especies bacterianas bucales en la patente US-6.309.835 B1, columna 7, líneas 12-30. La biopelícula puede ser una biopelícula *in vitro* o una biopelícula *in situ*. Preferiblemente, la biopelícula es una biopelícula de placa *in situ* porque esta refleja de manera más precisa las condiciones de la boca humana al proporcionar una biopelícula natural y no distribuida. Un enfoque que se adapta bien a la evaluación de la retención de estannoso en la biopelícula durante un período definido de tiempo es el uso de la biopelícula de placa *in situ*.

Se contemplan varias superficies diferentes a las que se puede adherir la biopelícula. Estas superficies pueden incluir, por ejemplo, esmalte humano, esmalte bovino, dentina bovina, hidroxiapatita, vidrio pulido y titanio. Teniendo en cuenta que la rugosidad de la superficie del sustrato y su energía libre son factores importantes para la expansión *in situ* de la biopelícula de placa, el esmalte o la hidroxiapatita son las superficies preferidas para imitar un sustrato natural para el crecimiento de la biopelícula de placa. Por otro lado, debido a la autofluorescencia conocida del esmalte, la hidroxiapatita se prefiere más para la expansión *in situ* de la biopelícula de placa. La hidroxiapatita, también denominada hidroxiapatita (“HA”), es una forma mineral de la apatita de calcio que tiene, en general, la fórmula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. En un enfoque particularmente preferido, se usan las piezas que contienen HA (p. ej., discos pequeños). Estas piezas de HA son relativamente pequeñas, teniendo preferiblemente un volumen global de 7 mm^3 a 110 mm^3 , preferiblemente de 25 mm^3 a 35 mm^3 . Las piezas de HA están diseñadas con una pluralidad de ranuras (para permitir que la biopelícula de placa se adhiera dentro de la ranura). A modo de aclaración, se puede usar la biopelícula de placa *in situ* o *in vitro* para adherirse al interior de la/s ranura/s, pero se prefiere la biopelícula de placa *in situ*. La pluralidad de ranuras tiene preferiblemente unas dimensiones que son de 50 μm a 500 μm de profundidad y de 50 μm a 500 μm de anchura, más preferiblemente de 100 μm a 400 μm de profundidad y de 100 μm a 400 μm de anchura, incluso más preferiblemente al menos una de las ranuras es de 250 μm a 350 μm de profundidad y de 250 μm a 350 μm de anchura. Sin pretender imponer ninguna teoría, muchos sujetos humanos no se preocupan por tener un aparato bucal (que contiene estas piezas de HA) durante más de dos a tres días. Con ranuras más pequeñas que estas dimensiones, la ranura se rellena con la biopelícula de placa *in situ*, lo que no permite, de este modo, que el presente producto para el cuidado bucal y/o las sondas fluorescentes penetren en la ranura. Por otra parte, si las dimensiones de la ranura son demasiado grandes, entonces las ranuras no se adaptan bien a la expansión o la adhesión de las biopelículas, especialmente si el sujeto humano solo va a usar el aparato bucal durante dos a tres días. Además, estas dimensiones de ranura preferidas proporcionan una vista en sección transversal óptima mediante la CLSM convencional. En un ejemplo específico, y volviendo a la Figura 2, el disco (201) de HA tiene tres ranuras paralelas (203) (las ranuras de los dos lados (203a y 203c) son de 300 μm de anchura y 300 μm de profundidad; mientras que el bosque central (203b) (entre las dos ranuras laterales) es de 500 μm de anchura y 500 μm de profundidad). La ranura central está diseñada más ancha y más profunda que las ranuras de los dos lados de tal manera que el disco de HA se pueda separar más fácilmente en dos semidisks idénticos para fines de comparación de una cabeza a otra. La Figura 3 es un esquema de una vista en sección transversal de la ranura (2003) con la biopelícula (2005) en la misma.

Preferiblemente, la biopelícula de placa *in situ* se adhiere a la superficie de una piezas de HA como un resultado de la adhesión de las piezas de HA a un aparato bucal (p. ej., una férula bucal o una boquilla) que usan los sujetos humanos durante un período de tiempo definido. Este período de tiempo definido es preferiblemente de 6 horas a 4 días, más preferiblemente de 1 día a 3 días, alternativamente de aproximadamente 2 días. En consecuencia, el método puede

comprender la etapa de hacer que los sujetos humanos usen el aparato bucal durante 6 horas a 4 días, preferiblemente 1-3 días, más preferiblemente 2 días; en donde al menos una parte del aparato bucal comprende HA como una superficie de la biopelícula y en donde la biopelícula es una biopelícula de placa *in situ*. El término “aparato bucal” significa un dispositivo que se puede usar temporalmente dentro de la cavidad bucal (es decir, la boca) de un sujeto humano durante hasta múltiples días en un tiempo (pero que se retira temporalmente durante la alimentación o la higiene bucodental y similares). Los ejemplos no limitantes de un aparato bucal incluyen una férula bucal, una boquilla y un dispositivo de retención. El aparato bucal tiene preferiblemente una pluralidad de piezas que contienen HA (p. ej., discos pequeños) adheridas de manera desprendible al mismo. En otras palabras, el sujeto humano usa el aparato bucal para permitir que la biopelícula se adhiera/expand a las superficies y ranuras del disco de HA. Después de 6 horas a 4 días, preferiblemente 2-3 días, más preferiblemente 2 días, los discos de HA se retiran del aparato bucal que usó el sujeto humano. La Figura 1 es un ejemplo de una férula (1) que tiene una pluralidad de discos de HA (2a, 2b, 2c, 2d, 2e) adheridos de manera desprendible a la férula. La férula (1) se usa sobre los dientes de un sujeto humano (no mostrado) durante un período de tiempo definido con el objetivo de hacer que la biopelícula se expanda/adhiera a los discos de HA, preferiblemente en las ranuras de los discos de HA. En la Figura 1, la pluralidad de discos de HA está en el lado lingual interdental del solicitante bucal. Aunque no se muestra en la Figura 1, una localización preferida de las piezas de HA está en el lado bucal del aparato. Sin pretender imponer ninguna teoría, el lado bucal es aún más difícil de cepillar, lo que proporciona, de este modo, una biopelícula de placa *in situ* que probablemente sea más espesa (es decir, se expanda o se forme de manera más rápida que en otras localizaciones en la cavidad bucal). Además, también se sugiere que la biopelícula de placa *in situ* resultante del lado bucal puede ser más tóxica o patógena.

La biopelícula se puede tratar con el producto para el cuidado bucal que contiene estannoso, ya sea *in vivo* o *ex vivo*. El término “*in vivo*” significa que tiene lugar dentro del organismo, de manera específica dentro de la cavidad bucal del sujeto humano. Por ejemplo, el sujeto humano puede usar una férula bucal (y los discos de HA adheridos de manera desprendible a la misma), al tiempo que usa el producto para el cuidado bucal que contiene estannoso. El término “*ex vivo*” significa que tiene lugar fuera de un organismo, de manera específica fuera de la cavidad bucal del sujeto humano. Por ejemplo, después de usar la férula, los discos de HA se pueden retirar y, a continuación, tratar con el presente producto para el cuidado bucal que contiene estannoso. Dicho enfoque *ex vivo* es preferible cuando se evalúa la penetración del estannoso en la biopelícula o la cantidad de la deposición de estannoso en la biopelícula (p. ej., el uso de un producto que contiene estannoso individual o múltiple).

El producto para el cuidado bucal que contiene estannoso puede ser cualquier producto que esté diseñado para ser usado principalmente para la higiene bucal en los seres humanos. Dichos productos para el cuidado bucal que contienen estannoso pueden incluir dentífrico, pasta de dientes, colutorio, etc. Los productos para el cuidado bucal de la presente invención son aquellos que contienen estannoso (Sn^{2+}). Un ejemplo no limitante de un ingrediente de estannoso usado en los productos para el cuidado bucal que contienen estannoso incluye fluoruro de estannoso. Dichos productos para el cuidado bucal pueden contener, de forma típica, de 0,0025 % a 2 %, en peso de la composición, de fluoruro de estannoso.

En una realización alternativa, la biopelícula se adhiere a una pieza de prueba de superficie de esmalte de mamífero (p. ej., ser humano o bovino). Es decir, las piezas de esmalte se someten a un estudio de plazo relativamente más largo (p. ej., 5-21 días). Estas piezas también pueden adherirse de manera desprendible a un aparato para el cuidado bucal y pueden ser usadas por un sujeto humano. Este método *in situ* se puede usar para medir el suministro y/o la penetración del estannoso y/o el efecto de una composición para el cuidado bucal en la biodisponibilidad del estannoso.

Marcado de la biopelícula con una sonda fluorescente microbiana

La biopelícula se marca con una sonda fluorescente microbiana. La “sonda fluorescente microbiana” significa una sonda fluorescente que se une a los microbios de una biopelícula. Una clase de dichas sondas incluye oligonucleótidos marcados con fluorescencia, preferiblemente oligonucleótidos dirigidos al ARNr. Los ejemplos no limitantes incluyen tintes de marca SYTO™. Un ejemplo específico es SYTO-9, en donde la excitación es un 485 (ADN) y 486 (ARN) y la emisión de luz se detecta en 498 (ADN) y 501 (ARN). Dentro de esta clase de tintes de oligonucleótidos dirigidos al ARNr, se puede usar una subclase de tintes para distinguir entre los microbios muertos o vivos. Otra clase de sondas fluorescentes microbianas incluyen las tinciones o lectinas fluorescentes específicas de las extracelular polymer substances (sustancias poliméricas extracelulares - EPS). Un ejemplo comercialmente disponible de una sonda fluorescente microbiana es el de las tinciones de ensayo de fluorescencia LIVE/DEAD® BacLight™. Véase también la patente US-6.309.835 B1, en la columna 8, Tabla 1. Estas sondas fluorescentes microbianas están ampliamente disponibles, además de los detalles del procedimiento en cuanto a su uso para determinar de manera cuantitativa la cantidad de microbios, así como para determinar de manera cuantitativa qué parte de estos microbios están vivos o muertos.

Marcado de la biopelícula con una sonda fluorescente de estannoso

La biopelícula se marca con una sonda fluorescente de estannoso. Los ejemplos de una sonda fluorescente de estannoso adecuada para marcar la biopelícula puede ser uno cualquiera de los siguientes compuestos: (a) (3',6'-diamino-3-oxoespiro[isoidolin-1,9'-xanten]-2-il)carbamato de terc-butilo; (b) (3',6'-bis(dimetilamino)-3-oxoespiro[isoidolin-1,9'-xanten]-2-il)carbamato de terc-butilo; (c) (3',6'-bis(diethylamino)-3-oxoespiro[isoidolin-1,9'-xanten]-2-il)carbamato de terc-butilo; (d) (3',6'-bis(etilamino)-2',7'-dimetil-3-oxoespiro[isoidolin-1,9'-xanten]-2-

il)carbamato de terc-butilo; (e) (3',6'-diamino-2',7'-dimetil-3-oxoespiro[isoindolin-1,9'-xanten]-2-il)carbamato de terc-butilo; (f) (3-oxo-3',6'-di(pirrolidin-1-il)espiro[isoindolin-1,9'-xanten]-2-il)carbamato de terc-butilo; (g) (3-oxo-3',6'-bis(fenilamino)espiro[isoindolin-1,9'-xanten]-2-il)carbamato de terc-butilo; (h) (3-oxo-3',6'-di(piperidin-1-il)espiro[isoindolin-1,9'-xanten]-2-il)carbamato de terc-butilo; (i) (3',6'-dimorfolino-3-oxoespiro[isoindolin-1,9'-xanten]-2-il)carbamato de terc-butilo; (j) (2',7'-dibutil-3',6'-bis(dietilamino)-3-oxoespiro[isoindolin-1,9'-xanten]-2-il)carbamato de terc-butilo; (k) (2',7'-dimetil-3-oxo-3',6'-di(piperidin-1-il)espiro[isoindolin-1,9'-xanten]-2-il)carbamato de terc-butilo; (l) (3-oxo-1',2',3',4',10',11',12',13'-octahidroespiro[isoindolin-1,7'-pirano[2,3-f:6,5-f']diquinolin]-2-il)carbamato de terc-butilo; (m) (3-oxo-1',2',3',4',8',9',10',11'-octahidroespiro[isoindolin-1,6'-pirano[3,2-g:5,6-g']diquinolin]-2-il)carbamato de terc-butilo; (n) N-(3',6'-bis(dietilamino)-3-oxoespiro[isoindolin-1,9'-xanten]-2-il)propionamida; (p) N-(3',6'-bis(dietilamino)-3-oxoespiro[isoindolin-1,9'-xanten]-2-il)butiramida; y (q) N-(3',6'-bis(dietilamino)-3-oxoespiro[isoindolin-1,9'-xanten]-2-il)pentanamida. Preferiblemente, la sonda de estannoso se selecciona de: N-(3',6'-bis(dietilamino)-3-oxoespiro[isoindolin-1,9'-xanten]-2-il)propionamida; N-(3',6'-bis(dietilamino)-3-oxoespiro[isoindolin-1,9'-xanten]-2-il)butiramida; y N-(3',6'-bis(dietilamino)-3-oxoespiro[isoindolin-1,9'-xanten]-2-il)pentanamida. En general, estas sondas fluorescentes de estannoso contienen un resto de derivado de rodamina B como fluoróforo, unido mediante un resto amida a un grupo carbazato. Se describen detalles adicionales en las publicaciones de WO o de los EE. UU. de la solicitud de patente número PCT/CN2015/074142, con la fecha de presentación internacional del 13 de marzo de 2015, (caso P&G n.º AA916M, "STANNOUS FLUORESENT PROBE"). Una o más de estas sondas pueden ser comercializadas por el Dr. Tao Yi, de la Universidad de Fudan, Shanghai, China.

La presente biopelícula se incuba con la sonda de estannoso en la oscuridad durante 15-60 minutos, preferiblemente 30 minutos, y se proporciona luz de excitación a la biopelícula incubada en una longitud de onda de al menos 520 nm a 580 nm, alternativamente en 560 nm. Se detecta la emisión de luz a partir de la sonda de estannoso en una longitud de onda de al menos 560 nm a 660 nm. Los detalles del procedimiento en cuanto a cómo usar las sondas de estannoso para la determinación cuantitativa se encuentran en la publicación de patente identificada anteriormente y también pueden ser análogos a la literatura ampliamente disponible asociada a las sondas fluorescentes basadas en rodamina B en general.

Cuantificación de las células marcadas mediante la medición de la luz de fluorescencia emitida por las células marcadas

El método de la presente invención que comprende la etapa de cuantificar las células marcadas mediante la medición de la luz de fluorescencia emitida por las células marcadas. Un instrumento preferido para realizar dicha cuantificación es la confocal laser scanning microscopy (microscopía de barrido con láser confocal - CLSM). El software disponible comercialmente es capaz de cuantificar los píxeles de las imágenes tomadas del fluorescente. Las imágenes tridimensionales se pueden construir a partir de varias imágenes individuales tomadas de las células marcadas.

Ejemplos

Se proporcionan datos sobre el porcentaje de localización conjunta de estannoso en las bacterias (de la biopelícula) para varias pastas de dientes que contienen estannoso y un control negativo. También se proporcionan datos sobre el coeficiente de superposición de la pasta de dientes que contiene estannoso sobre la biopelícula con el tiempo. En primer lugar, se describe la metodología.

Se describe el sustrato para la expansión de la biopelícula. Los discos de hidroxiapatita se usan para la expansión *in situ* de la biopelícula. Se diseñan discos de HA que tienen tres ranuras paralelas (de 200 µm de anchura, 200 µm de profundidad, en el caso de las ranuras de los dos lados, mientras que de 500 µm de anchura, de 500 µm de profundidad, en el caso de la ranura central) en cada disco. Cuando se adhieren los discos a la boca del sujeto, se mantienen estas ranuras verticales, para imitar el hueco interproximal entre los dientes, el área difícil de limpiar donde se acumula la placa. Este modelo permite la recolección de placa sin perturbaciones de las ranuras. Los discos de HA son fabricados por la Shanghai Bei'erkang biomedicine limited company.

Se describen sujetos humanos que usan una férula. Cada sujeto usa hasta 12 discos de HA sobre la férula para garantizarse que estén disponibles 9 discos de HAP después de 48 horas. Se muestra un ejemplo no limitante de dicha férula y discos de HA en la Figura 1. El dispositivo (1) contiene una pluralidad de discos de HA (2a-2d). Aunque no se muestra en la Figura 1, los discos se pueden posicionar de tal manera que se retraigan en el espacio interdental entre los dientes (dado que esta localización es propensa a la placa (dada la dificultad de la limpieza, etc.)). Los sujetos retiran la férula solo durante las comidas (la férula se almacena en un recipiente opaco en condiciones de humedad) y para realizar procedimientos de higiene bucal. Inmediatamente después de eso, la férula se usa de nuevo. A los sujetos se les pide que usen una pajita cuando beban.

Se describe el procedimiento para la liberación de la biopelícula *in situ* del disco de HA. Todos los discos de HA se retiran de la férula a las 48 horas con unas pinzas. Se usan unas pinzas para sujetar el borde de los chips de HA y transferir el disco de HA a un tubo de centrifuga de 2 ml que contiene una solución PBS (phosphate buffered saline [solución salina tamponada con fosfato]). Las pinzas se lavan minuciosamente (agua; alcohol a 75 %; y, a continuación, agua desionizada) antes de cada transferencia del disco.

Se describe la preparación para el sobrenadante de pasta de dientes. Se añaden 15 gramos de agua desionizada a 5 gramos de pasta de dientes. Después de agitar minuciosamente, la mezcla se centrifuga a 12.000 rotaciones por minuto durante 20 minutos. El sobrenadante se prepara un día antes del uso y se almacena a 4 ° C.

5 Después de retirar los discos de HA de la férula, los discos de HA se usan para el tratamiento *ex vivo* mediante diferentes productos para el cuidado bucal. Después de tratarse con el presente sobrenadante y marcarse con sonda fluorescente microbiana y sonda fluorescente de estannoso, la biopelícula en las ranuras se mide mediante confocal laser scanning microscopy (microscopía de barrido con láser confocal - CLSM).

10 Se describe la preparación de discos. Los discos de HA se enjuagan en solución PBS y cada disco de HA se divide en dos mitades con las pinzas. Después de eso, cada semidisco se coloca en 500-1000 ul de solución PBS de manera estática durante 1 minuto. Cada disco se trata durante dos minutos ya sea mediante solución PBS o sobrenadante de pasta de dientes. Cada disco se lava manteniendo cada disco con las pinzas, se agita durante diez rondas de hacia adelante y hacia atrás en 1 ml de solución PBS y, a continuación, se repite este ciclo de lavado. A
15 continuación, cada disco se sumerge en 500-1000 ul de solución PBS de manera estática durante 5 minutos.

Se describe la tinción de fluorescencia y la microscopía. Se indica que el sistema LIVE/DEAD® BacLight™ es una alternativa fiable a la hora de evaluar la vitalidad bacteriana en una biopelícula de placa natural, en la que hay
20 varios tipos de bacterias presentes. El ensayo de fluorescencia LIVE/DEAD® BacLight™ tiñe las bacterias de rojo o verde, en función de la permeabilidad de su membrana. La relación de verde/rojo se correlaciona bien con la relación de vivos/muertos. Se considera que los métodos de tinción de vivos/muertos son fiables cuando se analiza la actividad del agente antimicrobiano. Después del tratamiento y la inmersión, cada semidisco se tiñe con la sonda de Sn junto con la sonda de Syto-9 (que contiene Syto-9 5 uM + Sn 5 uM de sonda) durante 30 minutos en la oscuridad y el otro semidisco se tiñe con una solución de tinte L7012 LIVE/DEAD® (que contiene Syto-9
25 5 uM + yoduro de propidio 30 uM) durante 15 minutos en la oscuridad. Después de la tinción, cada disco se sumerge en 500-1000 ul de solución PBS de manera estática durante 2 minutos. Los discos se lavan de nuevo, manteniendo cada disco con las pinzas, se agitan durante cinco rondas de hacia adelante y hacia atrás en 1 ml de solución PBS y se repiten. En las muestras teñidas con tinte L7012 LIVE/DEAD®, se usan los siguientes parámetros: λ_{ex} = 488 nm, λ_{em} =500/635 nm, lente objetivo de 20X y barrido desde la parte inferior de la
30 superficie de las bacterias durante 60 um con un tamaño de etapa=3 um. En las muestras teñidas con tinte de SYTO-9/Sn, se usan los siguientes parámetros: λ_{ex} = 488 nm/543 nm, λ_{em} =500/580 nm, lente objetivo de 20X y barrido desde la parte inferior de la superficie de las bacterias durante 60 um con un tamaño de etapa=3 um.

Se describe la Confocal Laser Scanning Microscopy (Microscopía de barrido con láser confocal - CLSM). Se usa el
35 microscopio confocal espectral Leica™ TCS SP8 AOBS. El sistema confocal consiste en un microscopio vertical Leica™ DM6000B y un microscopio invertido Leica™ DMIRE2. Se usa un soporte vertical en las aplicaciones que implican muestras para ensayo montadas en portaobjetos; mientras que el soporte invertido, que tiene una cámara de incubación a 37 °C y accesorios de enriquecimiento de CO₂, se proporciona en las aplicaciones de células vivas. Los microscopios comparten un cabezal de barrido con láser intercambiable y, además de sus propias etapas accionadas
40 por electromotor, una etapa Z de alta precisión accionada por galvanómetro que facilita la obtención rápida de imágenes en el plano focal (Z). Además de la epifluorescencia, los microscopios admiten una diversidad de métodos de contraste de la luz transmitida, incluyendo el campo brillante, la luz polarizante y el contraste de interferencia diferencial, y están equipados con lentes objetivos de 5x, 20x, 40x, 63x (aceite y seco) y 100x (aceite) Leica™.

45 Se describe el sistema de barrido y detección con láser. El sistema confocal TCS SP2 AOBS está provisto de cuatro láseres (un láser de diodo, un láser de argón y dos láseres de helio de neón), lo que permite, por tanto, la excitación de una amplia gama de fluorocromos dentro de los rangos UV, visible y rojo lejano del espectro electromagnético. El diseño del cabezal de barrido con láser, que incorpora acousto-optical tunable filters (filtros ajustables acústico-ópticos - AOTF), un acousto-optical beam splitter (divisor de haz acústico-óptico - AOBS) y cuatro detectores de espectrofotómetro de
50 prisma, permite la excitación y detección simultánea de tres fluorocromos. El microscopio vertical también tiene un detector de luz de transmisión, lo que hace posible superponer una imagen de luz transmitida sobre un registro de fluorescencia.

Se usa el software de confocal Leica™. El confocal se controla mediante un PC Pentium estándar equipado con monitores duales y ejecutando el software de confocal Leica™. El software de confocal Leica proporciona una
55 interfaz para la adquisición, el procesamiento y el análisis de series de imágenes multidimensionales, que incluye la reconstrucción y medición en 3D, el registro y análisis fisiológico, el intervalo de tiempo, la localización conjunta de fluorocromos, las técnicas de fotoblanqueo, tales como FRAP y FRET, el mezclado espectral y la restauración multicolor. Con respecto al análisis de imágenes, se eligen las muestras teñidas con tinte L7012 LIVE/DEAD® para cuantificar la relación de píxeles rojos y verdes y se eligen las muestras teñidas con tinte de SYTO-9/Sn para
60 cuantificar la eficacia de superposición de los píxeles rojos y verdes.

Volviendo a la Figura 4, el porcentaje de localización conjunta del estannoso dentro de las bacterias (de la biopelícula de placa *in situ*) se proporciona para tres productos para el cuidado bucal y un control negativo. Se usan los
65 procedimientos anteriormente descritos. En primer lugar, se trata la biopelícula con las presentes composiciones para el cuidado bucal y, a continuación, la biopelícula tratada se marca con las sondas bacteriana y de estannoso. Mediante el uso de software, se identifica la superposición de píxeles de las sondas bacterianas “verdes” y la de las sondas de

estannoso “rojas” y, a continuación, este valor se divide entre todos los píxeles no negros (que incluyen las sondas de estannoso de no superposición) para proporcionar un porcentaje de localización conjunta del estannoso en las bacterias. La Figura 5 es un esquema de un ejemplo ilustrativo de cómo determinar cómo el porcentaje de localización conjunta del estannoso en las bacterias (y un coeficiente de superposición analizado a continuación adicionalmente). La primera etapa es determinar una superposición cuantificada de estannoso en las bacterias mediante la cuantificación de la superposición de la luz de fluorescencia medida de las células marcadas con fluorescente microbiano y la luz fluorescente medida de las células marcadas con fluorescente estannoso. El software es capaz de identificar que hay dos píxeles rojos (51a, 51b) indicativos de la sonda de estannoso fuera de la bacteria (53) (pero dentro de la biopelícula). Dentro de la bacteria (53), hay siete píxeles verdes (55a-55g) indicativos de sondas bacterianas dentro de la bacteria (53). Tres píxeles superpuestos (57a-57c) indican el estannoso dentro de la bacteria (54). Una superposición cuantificada de estannoso en las bacterias es la identificación de estos píxeles superpuestos (57a-57c). A su vez, el porcentaje de localización conjunta de estannoso dentro de las bacterias se determina tomando los tres píxeles superpuestos y dividiendo entre todos los píxeles en la biopelícula (es decir, la sonda de estannoso y la sonda bacteriana, localizada tanto dentro como fuera de la bacteria). Dicho de otra manera, se toma una etapa para dividir la superposición cuantificada del estannoso en las bacterias con toda la luz fluorescente medida cuantificada (es decir, tanto de la sonda bacteriana como de la sonda de estannoso) en la biopelícula para determinar un porcentaje de localización conjunta de estannoso en las bacterias. En la Figura 5, este valor es 12. Por lo tanto, el porcentaje de localización conjunta de estannoso dentro de las bacterias en la Figura 5 es de 25 % (3/12). En general, cuanto más alto es este porcentaje, más eficaz es el producto para el cuidado bucal en el suministro de estannoso a las bacterias.

Volviendo a la Figura 4, tres productos de pasta de dientes comercialmente disponibles son: se evalúan CREST® PRO-HEALTH™ (con 0,454 % en peso de fluoruro de estannoso) (“CPH”); SENSODYNE® PROTECCIÓN COMPLETA (con 0,454 % en peso de fluoruro de estannoso) (“SSD”); CREST® CAVITY PROTECTION™ (0,243 % en peso de fluoruro de sodio) (“CCP”). Se usa Phosphate buffer solution (Solución tamponadora con fosfato - “PBS”) como control negativo. Los resultados muestran que CPH muestra un porcentaje de localización conjunta significativamente mayor que SSD. Esto concuerda tanto con la comparación de la eficacia bactericida como con la eficacia de la prevención de placa en un resultado clínico de placa de 4 días (no publicado).

En la Figura 6 se observa el efecto del tiempo de penetración en un coeficiente de superposición del estannoso cuando se usa la misma pasta que contiene estannoso. La pasta se deja sobre la superficie de la biopelícula durante 5 minutos (“5 min”) y durante 15 minutos (“15 min”). La muestra de 15 minutos demuestra un mayor coeficiente de superposición (aproximadamente de 0,84) frente a la muestra de 5 minutos (aproximadamente de 0,79) con $p < 0,05$, lo que indica que la pasta penetra en las bacterias más profundas de la biopelícula con el tiempo. A fin de determinar el coeficiente de superposición del estannoso, la superposición cuantificada del estannoso en las bacterias se determina como se ha descrito anteriormente. Sin embargo, este valor se divide con la luz fluorescente medida cuantificada de la sonda de estannoso en la biopelícula (en su totalidad). A fin de ilustrar mejor este punto, se hace referencia a la Figura 5. Los tres píxeles superpuestos (57a-57c) indican el estannoso dentro de la bacteria (54). Una superposición cuantificada de estannoso en las bacterias es la identificación de estos píxeles superpuestos (57a-57c). Hay un total de cinco píxeles rojos (es decir, dos píxeles de estannoso fuera de la bacteria (51a, 51b); y tres píxeles de estannoso dentro de la bacteria (57a-57c) (que son parte de los píxeles superpuestos) son ilustrativos de la luz fluorescente medida cuantificada de la sonda de estannoso en la biopelícula (en su totalidad). La superposición cuantificada del estannoso en las bacterias de los tres se divide entre la luz fluorescente medida cuantificada de la sonda de estannoso en la biopelícula para dar a igual 0,6. Este enfoque se usa para proporcionar los resultados de la Figura 6.

Las dimensiones y valores descritos en la presente memoria no deben entenderse como estrictamente limitados a los valores numéricos exactos indicados. Sino que, salvo que se indique lo contrario, debe considerarse que cada dimensión significa tanto el valor indicado como un intervalo funcionalmente equivalente en torno a ese valor. Por ejemplo, una dimensión descrita como “40 mm” significa “aproximadamente 40 mm.”

Aunque se han ilustrado y descrito realizaciones particulares de la presente invención, resultaría obvio para aquellos expertos en la técnica que se pudieran realizar diversos cambios y modificaciones diferentes, limitados únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un método para cuantificar la sorción de estannoso por las células microbianas de una biopelícula que comprende las etapas:
 - (a) tratar la biopelícula con un producto para el cuidado bucal que contiene estannoso;
 - (b) marcar las células microbianas de la biopelícula con una sonda fluorescente microbiana;
 - (c) incubar la biopelícula con una sonda fluorescente de estannoso; y
 - (d) cuantificar las células marcadas de la biopelícula mediante la medición de la luz de fluorescencia emitida por las células marcadas con fluorescente microbiano y mediante la medición de la luz de fluorescencia de las células marcadas con fluorescente de estannoso.
2. El método de la reivindicación 1, en donde la etapa de cuantificar las células marcadas mediante la medición de la luz de fluorescencia emitida por las células marcadas es mediante confocal laser scanning microscopy (microscopía de barrido con láser confocal - CLSM).
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde las etapas de marcar las células microbianas de la biopelícula con la sonda de fluorescente microbiano y la sonda de fluorescente de estannoso son antes de la etapa de tratar la biopelícula con el producto para el cuidado bucal que contiene estannoso.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la biopelícula es una biopelícula de placa *in situ*.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende, además, la etapa de hacer que los sujetos humanos usen un aparato bucal durante 6 horas a 4 días, preferiblemente 1-3 días; en donde al menos una parte del aparato bucal comprende hidroxilapatita (HA) como una superficie de la biopelícula, preferiblemente la biopelícula es una biopelícula de placa *in situ*, preferiblemente la HA está sobre el lado bucal del aparato bucal.
6. El método de la reivindicación 5, en donde la biopelícula *in situ* sobre la superficie de HA se trata *ex vivo* con el producto para el cuidado bucal que contiene estannoso.
7. El método de la reivindicación 5 o 6, en donde la parte del aparato bucal que comprende HA comprende además una pluralidad de ranuras, en donde una superficie interior de la ranura es dicha superficie de la biopelícula *in situ*, preferiblemente al menos una ranura es de 250 micrómetros a 350 micrómetros de profundidad y de 250 micrómetros a 350 micrómetros de anchura.
8. El método de la reivindicación 4, en donde el tratamiento de la biopelícula de placa *in situ* con el producto para el cuidado bucal que contiene estannoso se trata *in vivo*.
9. El método de la reivindicación 4, en donde el tratamiento de la biopelícula de placa *in situ* con el producto para el cuidado bucal que contiene estannoso se trata *ex vivo*.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la sonda fluorescente microbiana es un oligonucleótido dirigido al ARNr marcado con fluorescencia.
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la sonda fluorescente de estannoso se selecciona del grupo que consiste en:
 - (a) (3',6'-diamino-3-oxoespiro[isindolin-1,9'-xanten]-2-il)carbamato de terc-butilo;
 - (b) (3',6'-bis(dimetilamino)-3-oxoespiro[isindolin-1,9'-xanten]-2-il)carbamato de terc-butilo;
 - (c) (3',6'-bis(dietilamino)-3-oxoespiro[isindolin-1,9'-xanten]-2-il)carbamato de terc-butilo;
 - (d) (3',6'-bis(etilamino)-2',7'-dimetil-3-oxoespiro[isindolin-1,9'-xanten]-2-il)carbamato de terc-butilo;
 - (e) (3',6'-diamino-2',7'-dimetil-3-oxoespiro[isindolin-1,9'-xanten]-2-il)carbamato de terc-butilo;
 - (f) (3-oxo-3',6'-di(pirrolidin-1-il)espiro[isindolin-1,9'-xanten]-2-il)carbamato de terc-butilo;
 - (g) (3-oxo-3',6'-bis(fenilamino)espiro[isindolin-1,9'-xanten]-2-il)carbamato de terc-butilo;
 - (h) (3-oxo-3',6'-di(piperidin-1-il)espiro[isindolin-1,9'-xanten]-2-il)carbamato de terc-butilo;
 - (i) (3',6'-dimorfolino-3-oxoespiro[isindolin-1,9'-xanten]-2-il)carbamato de terc-butilo;
 - (j) (2',7'-dibutil-3',6'-bis(dietilamino)-3-oxoespiro[isindolin-1,9'-xanten]-2-il)carbamato de terc-butilo;
 - (k) (2',7'-dimetil-3-oxo-3',6'-di(piperidin-1-il)espiro[isindolin-1,9'-xanten]-2-il)carbamato de terc-butilo;
 - (l) (3-oxo-1',2',3',4',10',11',12',13'-octahidroespiro[isindolin-1,7'-pirano[2,3-f:6,5-f']diquinolin]-2-il)carbamato de terc-butilo;
 - (m) (3-oxo-1',2',3',4',8',9',10',11'-octahidroespiro[isindolin-1,6'-pirano[3,2-g:5,6-g']diquinolin]-2-il)carbamato de terc-butilo;
 - (n) N-(3',6'-bis(dietilamino)-3-oxoespiro[isindolin-1,9'-xanten]-2-il)propionamida;
 - (p) N-(3',6'-bis(dietilamino)-3-oxoespiro[isindolin-1,9'-xanten]-2-il)butiramida; y

- (q) N-(3',6'-bis(dietilamino)-3-oxoespiro[isoindolin-1,9'-xanten]-2-il)pentanamida;
en donde preferiblemente la excitación es a 543 nm, y preferiblemente la emisión se recoge a 560-660 nm.

- 5 12. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además la etapa de determinar una superposición cuantificada de estannoso en células microbianas de la biopelícula, en donde las células microbianas son bacterias mediante la cuantificación de la superposición de la luz de fluorescencia medida de células marcadas con fluorescente microbiano y la luz fluorescente medida de células marcadas con fluorescente de estannoso.
- 10 13. El método según la reivindicación 12, que comprende además la etapa de dividir dicha superposición cuantificada de estannoso en las bacterias con toda la luz fluorescente medida cuantificada en la biopelícula para determinar un porcentaje de localización conjunta de estannoso en las bacterias.
- 15 14. El método según la reivindicación 12, que comprende además la etapa de dividir dicha superposición cuantificada de estannoso en bacterias con la luz fluorescente medida cuantificada de la sonda de estannoso en la biopelícula para determinar un coeficiente de superposición de estannoso.

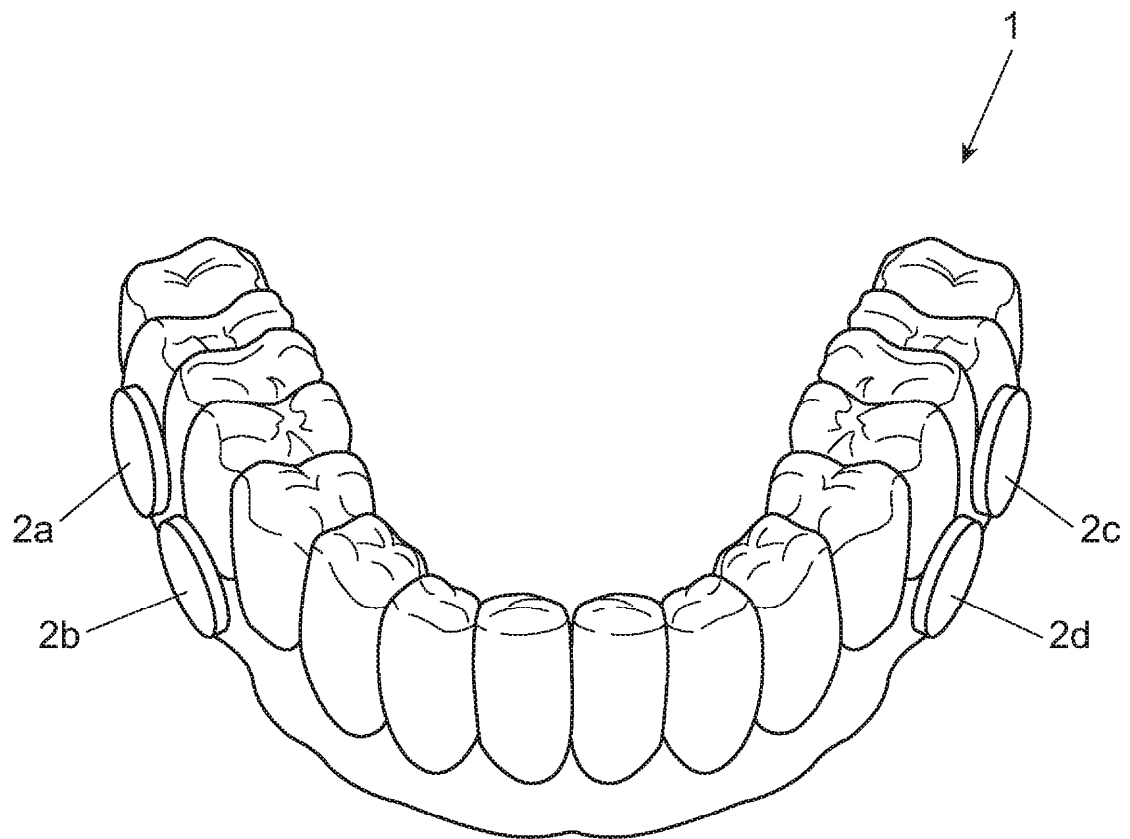


Fig. 1

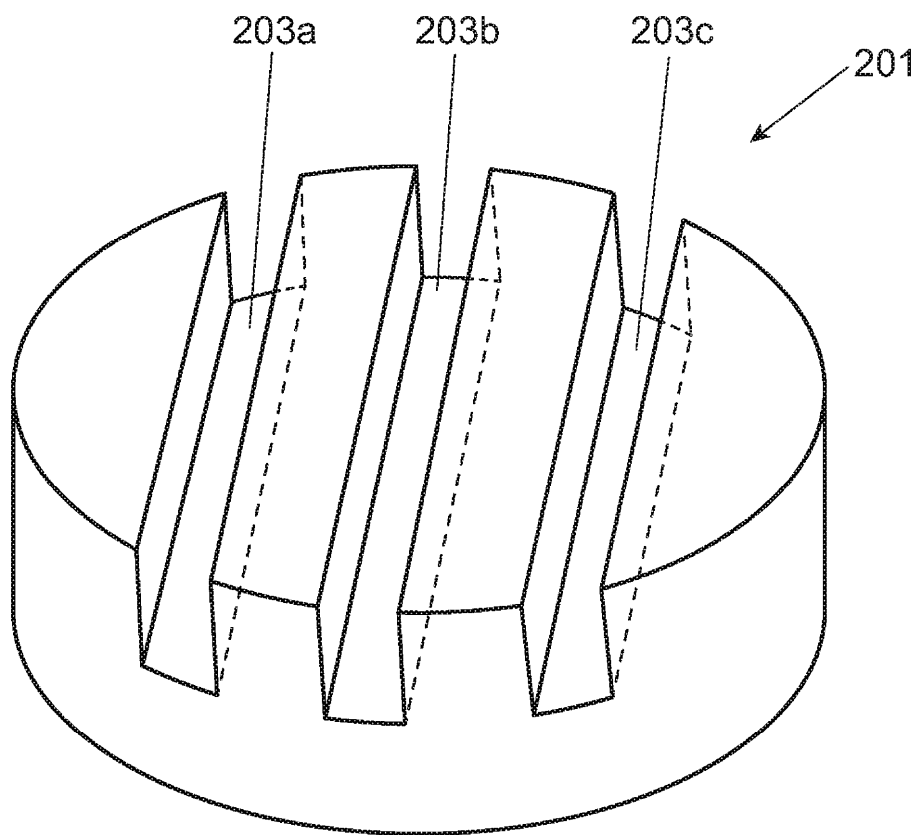


Fig. 2

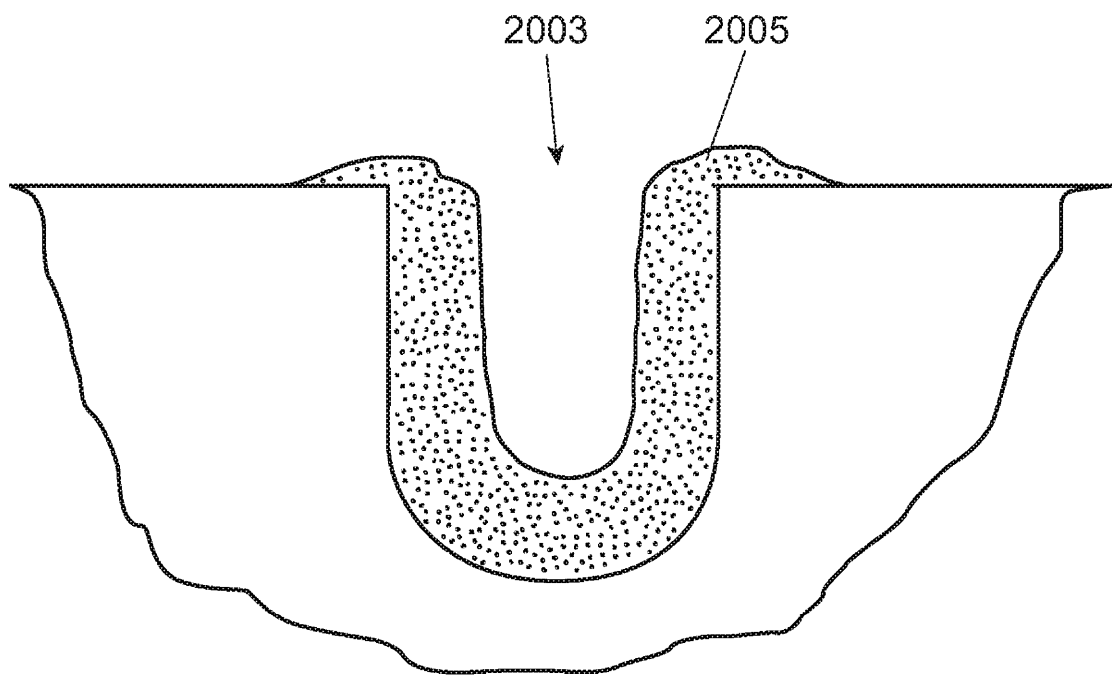


Fig. 3

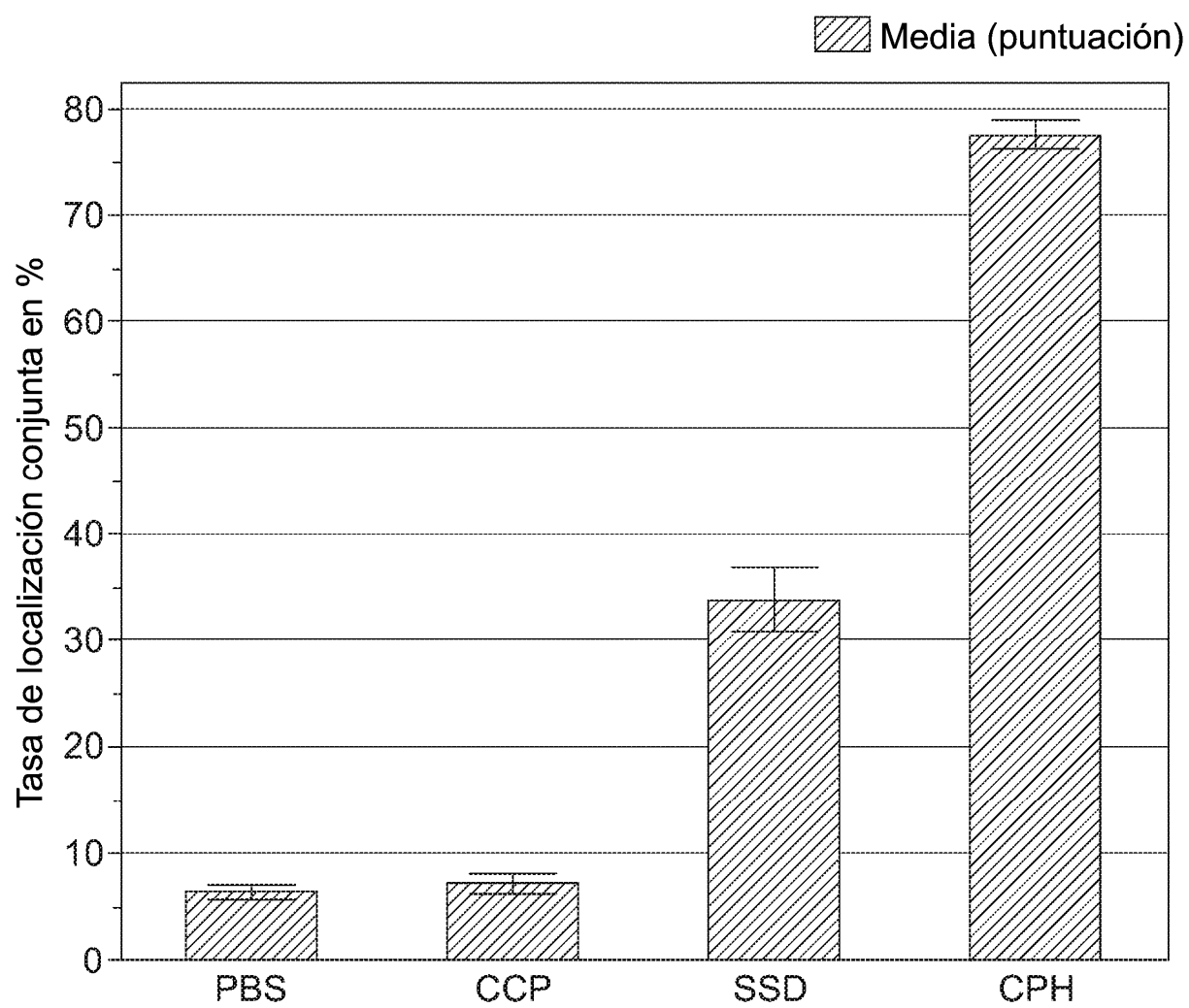


Fig. 4

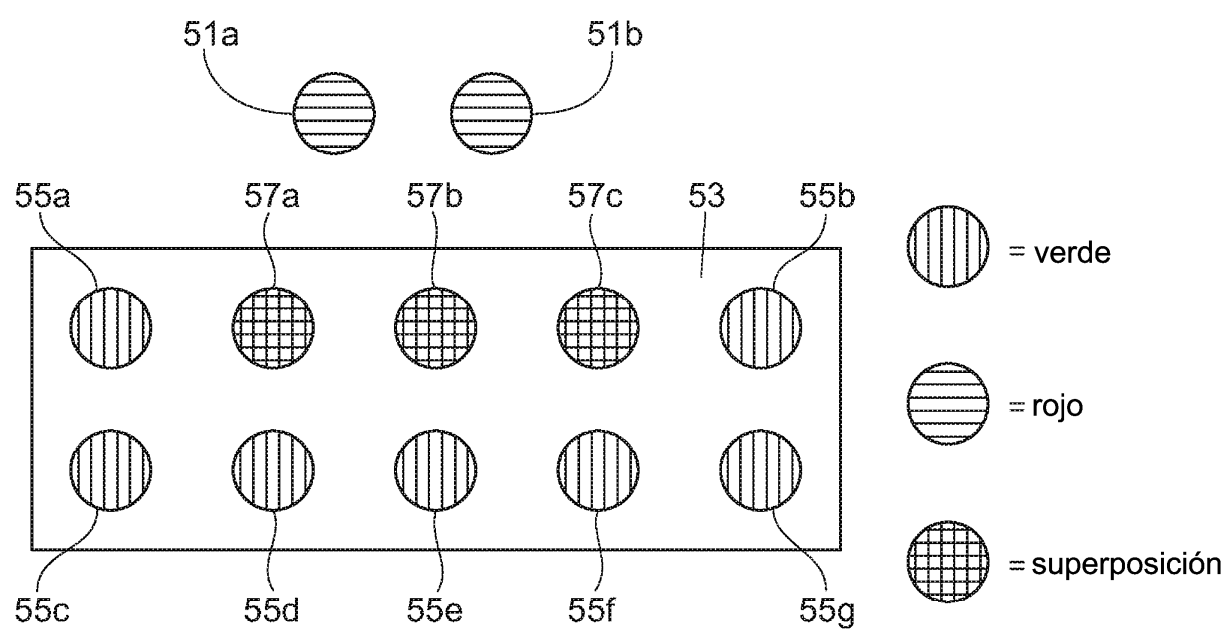


Fig. 5

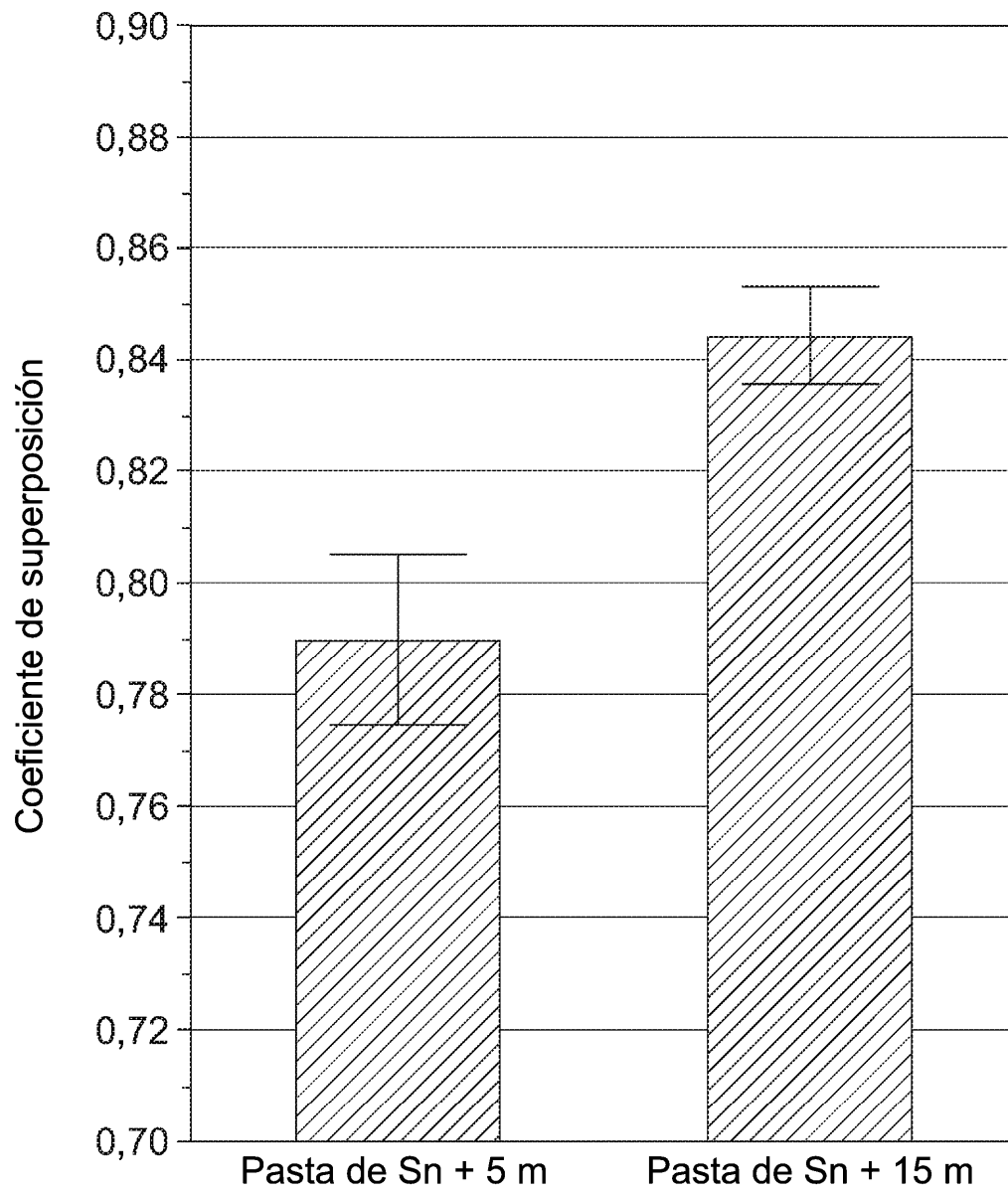


Fig. 6