



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 994 765**

⑮ Int. Cl.:

A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/14 (2006.01)
A61K 9/19 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.07.2016 PCT/EP2016/066456**

⑦ Fecha y número de publicación internacional: **26.01.2017 WO17012905**

⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.07.2016 E 16738148 (2)**

⑩ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2024 EP 3324928**

④ Título: **Composición de autoformación de película para el cuidado oral**

⑩ Prioridad:

17.07.2015 EP 15177318

④ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

31.01.2025

⑦ Titular/es:

AB-BIOTICS, S.A. (100.00%)
Parc de recerca UAB s/n Edificio Eureka
08193 Cerdanyola del Vallés, ES

⑦ Inventor/es:

SANTAS GUTIÉRREZ, JONATAN;
LÁZARO MALLÉN, ELISABET;
CUÑÉ CASTELLANA, JORDI;
MAREQUE BUENO, JAVIER y
CALVO GUIRADO, JOSE LUIS

⑦ Agente/Representante:

CONTRERAS PÉREZ, Yahel

ES 2 994 765 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

COMPOSICIÓN DE AUTOFORMACIÓN DE PELÍCULA PARA EL CUIDADO ORAL

5 CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a los campos de la medicina y la microbiología y, particularmente, a las 10 composiciones para uso en higiene dental y terapia. Específicamente, la presente invención incluye composiciones para el tratamiento y/o prevención de la periimplantitis y otras condiciones orales relacionadas con la disbiosis microbiana.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Las lesiones inflamatorias que se desarrollan en los tejidos que rodean a los implantes se reconocen 15 colectivamente como enfermedades periimplantarias e incluyen dos entidades patológicas: mucositis y periimplantitis. La periimplantitis y la mucositis periimplantaria tienen signos similares, pero no hay pérdida ósea crestal en la mucositis periimplantaria. La mucositis se define como una modificación reversible de los tejidos blandos periimplantarios sin pérdida ósea. La periimplantitis, en cambio, afecta los tejidos blandos profundos y el periimplante óseo, y se ha definido como un proceso inflamatorio que afecta a los tejidos que están cerca de 20 un implante osteointegrado, de tal manera que causa una pérdida de pérdida de soporte óseo, así como la inflamación de la mucosa. La prevalencia de la periimplantitis depende del umbral clínico utilizado para definirla; los resultados recientes variaron entre el 6.6% y el 47% [Albertini, M. et al. 2014].

La periimplantitis es una de las principales causas del fracaso del implante. Se ha propuesto la acumulación de 25 placa y el desequilibrio bacteriano como una de las principales causas, ya que existe una correlación positiva entre la acumulación de placa y la pérdida de hueso crestal. Las bacterias, el estrés o una combinación de ambos pueden estimular la pérdida ósea alrededor de un implante en la periimplantitis. Una vez que la pérdida ósea aumenta y se forma un bolsillo profundo, se establece un entorno anaeróbico que mejorará el predominio 30 de bacterias anaeróbicas. Estos se convierten entonces en la principal causa de pérdida ósea continua. La composición microbiana de las biopelículas alrededor de la periimplantitis ha demostrado ser diferente a la presente en los implantes sanos. En general, los implantes enfermos presentan una proporción reducida de 35 especies bacterianas beneficiosas y proporciones incrementadas de supuestos patógenos en comparación con los implantes sanos. Los sitios de periimplantitis con frecuencia presentan proporciones más altas de algunos patógenos periodontales reconocidos del complejo naranja como *Fusobacterium nucleatum* o *Prevotella intermedia*. En estos sitios, están presentes otros patógenos exigentes del complejo rojo que incluyen *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* y *Tannerella forsythia* [Da Silva, E.S.C. et al. 2013]. Aunque es más controvertido, se cree que otros niveles medios de algunos patógenos periodontales como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* se asocian comúnmente con periimplantitis [Persson, G.R. et al. 2013].

40 Dado que el desarrollo de la biopelícula en la superficie de los implantes dentales juega un papel importante en la aparición de la periimplantitis, los tratamientos se basan principalmente en reducir la colonización bacteriana en la superficie de los implantes o eliminar mecánicamente la microbiota bacteriana. Ambas técnicas quirúrgicas y no quirúrgicas se han desarrollado para este efecto.

45 Los procedimientos quirúrgicos se basan en técnicas de resección para reducir la profundidad del bolsillo y asegurar la morfología de los tejidos blandos y las técnicas regenerativas basadas en la cirugía ósea guiada mediante el uso de la colocación ósea. En general, estos procedimientos son costosos, dolorosos o desagradables para el paciente, por lo que se restringe como una opción de tratamiento cuando la pérdida ósea está avanzada o persiste a pesar del tratamiento preventivo inicial provisto. [Ata-Ali, J. et al. 2011].

50 Por lo tanto, se prefieren las técnicas no quirúrgicas como una opción de tratamiento de primera línea. En términos generales, estas técnicas implican la eliminación de placa con control químico de placa en forma de enjuagues con clorhexidina al 0.12% (por ejemplo, 12 horas durante 15 días) y/o antibióticos. Sin embargo, los efectos secundarios de la clorhexidina son bien conocidos desde hace tiempo. La clorhexidina puede irritar y dañar la mucosa oral, causa decoloraciones y manchas en los dientes y otras superficies orales, aumenta la formación de cálculos y altera la percepción del gusto. También se han reportado casos de irritación oral y

síntomas de alergia local. Además, se han reportado efectos secundarios de la mucosa que incluyen estomatitis, gingivitis y úlceras. Algunos de estos efectos se han atribuido a alteraciones en la microbiota oral como resultado del efecto antiséptico de la clorhexidina [Flotra, L. et al. 1971].

5 La terapia con antibióticos puede causar diversos efectos secundarios e interacción de fármacos. Por ejemplo, los antibióticos sistémicos de amplio espectro ocasionalmente pueden desarrollar problemas de alteraciones de la microbiota comensal que pueden conducir a enfermedades asociadas a antibióticos que incluyen colitis asociada con *Clostridium difficile*, diarrea, vaginosis, vaginitis, etc. El uso de antibióticos también favorece el desarrollo de resistencias bacterianas que pueden comprometer el tratamiento e incluso pueden agravar los tratamientos adicionales [Slots, J. et al. 1990].

10 Investigaciones recientes han recurrido a los probióticos, "microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio para la salud del huésped". El impacto de los probióticos en la salud oral es relativamente nuevo, con mucha investigación en curso.

15 Un probiótico oral conocido en el mercado es *L. reuteri* Prodentis. Un estudio reciente indica que el tratamiento oral con tabletas que contienen la cepa probiótica *L. reuteri* induce una reducción significativa de la respuesta proinflamatoria de las citoquinas y la mejora de los parámetros clínicos en la mayoría de los pacientes con periodontitis crónica [Szkaradkiewicz, A.K. et al. 2014]. Otro estudio tuvo el objetivo de evaluar los efectos de

20 pastillas probióticas que contienen *L. reuteri* como un complemento a la eliminación de sarro y plastia (SRP) en pacientes con periodontitis crónica. Se observó una reducción de *Porphyromonas gingivalis* en el grupo de SRP tratado con probiótico pero no se observaron cambios en otras bacterias patógenas estudiadas [Teughels, W. et al. 2013]. Sin embargo, el efecto de *L. reuteri* en la microbiota oral sigue siendo cuestionable ya que en un estudio paralelo, la ingesta diaria de pastillas probióticas que contienen *L. reuteri* (ATCC55730 y ATCC PTA5289) no parece afectar significativamente la acumulación de placa, estado inflamatorio o composición microbiana de la biopelícula durante la gingivitis experimental [Hallstroem, H. et al. 2013].

25 La publicación reciente Flichy-Fernandez, A.J. et al. 2015, describe el efecto de las tabletas probióticas Prodentis de *L. reuteri* que contienen las cepas *L. reuteri* AT CC PTA5289 y *L. reuteri* DSM 17938, en la mucositis periimplantaria. Doce pacientes con mucositis periimplantaria se inscribieron en el estudio y consumieron tabletas probióticas durante 30 días. Los pacientes mostraron una reducción en el índice gingival que se puede atribuir principalmente a una reducción de las citoquinas inflamatorias en comparación con el placebo. El documento no menciona el efecto de *L. reuteri* sobre la periimplantitis. En comparación con la mucositis, la periimplantitis se caracteriza por un daño en la estructura ósea que se atribuye principalmente al efecto de bacterias patógenas. Dado que el documento no describe el efecto de las tabletas probióticas en la periimplantitis o en patógenos relacionados, sigue siendo cuestionable si los probióticos pueden ser útiles para tratar la periimplantitis.

30 Otro ejemplo es un estudio reciente que describe los efectos de las pastillas administradas por vía oral con *L. rhamnosus* GG y *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 sobre la cantidad de placa, la inflamación gingival y la microbiota oral en adultos jóvenes sanos. La pastilla probiótica disminuyó tanto la placa como el índice gingival, pero no se encontraron cambios inducidos por probióticos en las composiciones microbianas de la saliva en ninguno de los grupos. La conclusión es que la pastilla probiótica mejoró el estado periodontal en términos de inflamación gingival sin afectar la microbiota oral [Toivainen, A. et al. 2015].

35 45 El efecto de otros probióticos, como *Lactobacillus brevis* CD2, se ha estudiado en la periodontitis, pero no se ha demostrado su efecto en la periimplantitis y la mucositis [Maekawa, T. et al. 2014]

40 50 JP20100053062 describe composiciones orales que contienen bacterias de ácido láctico útiles para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades orales, que incluyen enfermedades periodontales y caries. Particularmente, se demuestra que las cepas de bacterias pertenecientes a las especies de *Leuconostoc mesenteroides* tienen una buena capacidad de coagulación y adhesión, por lo que pueden unirse a la mucosa e inhibir la biopelícula del patógeno.

55 55 Las composiciones orales pueden comprender las cepas y excipientes, aglutinantes, lubricantes y agentes solubilizantes formulados de acuerdo con métodos convencionales.

- Una revisión reciente en el campo [Yanine, N. et al. 2013] concluye que la eficacia de los probióticos en la prevención y el tratamiento de las enfermedades periodontales es cuestionable. Para el resultado primario, sondeando la profundidad del bolsillo, no habría ningún efecto clínico beneficioso de los probióticos. Para los resultados secundarios, los probióticos han mostrado pequeños beneficios en el índice de placa y la inflamación gingival. En resumen, se ha visto en la técnica anterior que los probióticos pueden contribuir a la mejora de la inflamación en los procesos periodontales y gingivales, pero sigue siendo cuestionable si los probióticos pueden tener un efecto en la disbiosis presente en dichos procesos, que es la principal causa de la pérdida ósea en periimplantitis.
- Otro problema asociado con la eficacia de las terapias actuales, es que las técnicas y métodos utilizados para el suministro oral de probióticos, que incluye la incorporación en alimentos, tabletas, gomas de mascar, geles o cremas dentales, tienen limitaciones importantes. Estos incluyen efectos negativos sobre la estabilidad del probiótico y una reducción de su capacidad de provocar un efecto beneficioso debido a su corto tiempo de residencia en la cavidad oral. Este es un desafío cuando los probióticos deben suministrarse en cavidades inaccesibles de la boca, como sitios alrededor de los implantes dentales, que pueden comprometer su actividad antagonista contra los patógenos orales para prevenir o tratar la periimplantitis.
- Además, las áreas del implante que están contiguas al hueso tienen a menudo una superficie bruta para ayudar a la adherencia del implante y la osteointegración, y pueden permanecer contaminadas también después de que se haya realizado un tratamiento antimicrobiano, con posterior pérdida ósea y formación de un bolsillo de periimplante. Los esfuerzos para gestionar la colonización patogénica de estas áreas se han cumplido con un éxito limitado. La higiene dental ha demostrado ser ineficaz ya que estas áreas son inaccesibles y más pequeñas que la mayoría de los cepillos y otros dispositivos. Los profilácticos sistémicos tienen efectos limitados ya que las bacterias tienden a agregarse rápidamente en grupos protegidos, lo que aumenta las posibilidades de generar bacterias resistentes a los antibióticos.
- Se requiere un sistema de suministro capaz de suministrar bacterias probióticas en sitios deseados específicos de la cavidad oral para la modulación eficiente de la microbiota oral. Un sistema de suministro debería permitir una liberación lenta de bacterias probióticas viables y metabólicamente activas a la cavidad oral, una colonización adecuada del probiótico en los sitios deseados junto con un tiempo de residencia suficiente para permitir efectos beneficiosos.
- Breve descripción de la invención
- Un problema a resolver por la presente invención se puede considerar relacionado con la provisión de un sistema de administración capaz de suministrar bacterias probióticas en sitios específicos deseados de la cavidad oral, requeridos para la modulación eficiente de la microbiota oral involucrada en condiciones patológicas en tales sitios.
- La invención se expone en el conjunto de reivindicaciones adjunto. Cualquier tema que quede fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona únicamente con fines informativos.
- La solución se basa en la provisión de una composición en forma de polvo, una fórmula reconstituida y un kit para uso oral, que permiten una colonización adecuada del probiótico en los sitios deseados junto con un tiempo de residencia suficiente para proporcionar efectos beneficiosos contra los patógenos relacionados con condiciones orales.
- Por consiguiente, un primer aspecto de la invención se refiere a una composición de autoformación de película en forma de polvo, que forma una auto-película bajo agitación en presencia de un medio líquido, la composición que comprende: (i) al menos un agente gelificante en forma de polvo, (ii) al menos un agente bioadhesivo en forma de polvo, y (iii) al menos una *Pediococcus* cepa de bacterias de ácido láctico en forma de polvo, en donde (i), (ii) y (iii) están en un contenedor único o en contenedores separados, y en donde la composición de formación de auto-película se administra tópicamente.
- Por lo tanto, la invención proporciona una composición de autoformación de película en forma de polvo, en donde la autopelícula se forma bajo agitación en presencia de un medio líquido. El término "de formación de película" significa que es capaz de formar una película después de la aplicación a una superficie sólida; es

5 decir, que deja una cobertura flexible, cohesiva y continua sobre una superficie. El término "formación de autopelícula" significa que no se necesita ningún otro componente o condición además de los indicados para formar una película. "Bajo agitación" se entiende ampliamente en esta descripción, que incluye agitación manual o por medio de un mezclador eléctrico; con agitación continua o discontinua, y durante un período de tiempo adecuado que preferiblemente está comprendido entre 5 segundos a 60 minutos, más preferiblemente entre 10 segundos a 30 minutos o entre 30 segundos a 10 minutos.

10 La película se forma sobre una superficie aumentando la viscosidad de la composición con un agente gelificante y aumentando la adhesividad de la composición con un agente bioadhesivo. El término "agente gelificante" se refiere aquí a una sustancia que aumenta la viscosidad de un líquido, formando un gel. Pueden ser capaces de disolverse en la fase líquida como una mezcla de coloides que forma una estructura interna débilmente cohesionada. También se puede hacer referencia en la técnica como espesante, estabilizador o emulsionante. El término "agente bioadhesivo" se refiere a polímeros de origen natural que actúan como adhesivos, es decir, que, aplicados a las superficies de los materiales, los unen y resisten a la separación. El gelificante preferido y los agentes bioadhesivos se describen con mayor detalle a continuación.

15 Sin limitarse a la teoría, se cree que la solución aquí propuesta permite por un lado el suministro de bacterias de ácido láctico (preferiblemente con propiedades probóticas) en cavidades inaccesibles de la boca, tales como las cavidades que rodean los implantes dentales y los huecos y la superficie bruta del implante por sí mismo, que generalmente está contaminada con bacterias patógenas. Como segundo punto ventajoso, la solución aquí propuesta permite una colonización adecuada del probiótico en los sitios deseados junto con un tiempo de residencia suficiente para permitir efectos beneficiosos contra los patógenos relacionados con las condiciones orales. Más particularmente, el gelificante y los agentes bioadhesivos incluidos en la composición, permiten y potencian el crecimiento de las bacterias del ácido láctico en los sitios deseados, formando así una biopelícula beneficiosa que sella las cavidades problemáticas (es decir, forma una barrera física contra la contaminación de patógeno adicional). Sorprendentemente, el efecto prebiótico del agente gelificante y del agente bioadhesivo es despreciable en el caso de las bacterias patógenas, que es de interés para evitar el crecimiento indeseable de patógenos. Por lo tanto, aunque se mejora el desarrollo de la biopelícula probótica beneficiosa, se reduce el desarrollo de la biopelícula patógena. Por lo tanto, la formación de la biopelícula probótica junto con la actividad antagonista de las bacterias del ácido láctico contra los patógenos orales detiene el círculo vicioso derivado de la acción de las bacterias patógenas, es decir, la pérdida ósea en el área periimplantaria.

20 35 El segundo y tercero aspectos de la invención se refieren a un proceso para preparar una fórmula reconstituida que comprende mezclar bajo agitación una composición de autoformación de película en forma de polvo del primer aspecto con un medio líquido, y la fórmula reconstituida obtenida de la misma.

25 40 Un cuarto aspecto de la invención se refiere a un kit para uso oral, que comprende: (1) la composición de autoformación de película en forma de polvo del primer aspecto, o la fórmula reconstituida del tercer aspecto; y (2) significa aplicar a la cavidad bucal la composición de autoformación de película en forma de polvo o la fórmula reconstituida.

45 50 Un quinto aspecto de la invención se refiere a una composición de autoformación de película en forma de polvo, o la fórmula reconstituida, para uso como medicamento.

Un sexto aspecto de la invención se refiere a la composición de autoformación de película en forma de polvo del primer aspecto, o la fórmula reconstituida del tercer aspecto, para uso en la prevención y/o tratamiento de una condición seleccionada del grupo que consiste de: periimplantitis, mucositis, periodontitis, enfermedad de las encías, caries, candidiasis oral, herpes labial y ampollas.

55 Un séptimo aspecto se refiere al uso sin medicamento de la composición de autoformación de película en forma de polvo o la fórmula reconstituida, para el cuidado oral.

Un octavo aspecto de la invención se refiere a una cepa aislada que pertenece al género *Pediococcus* para su uso en la prevención y/o el tratamiento de una condición seleccionada del grupo que consiste en periimplantitis y mucositis.

Un noveno aspecto de la invención se refiere a una cepa aislada que pertenece al género *Pediococcus* depositada en la Colección de Cultivos tipo española seleccionada del grupo que consiste de: cepa depositada con el número de acceso CECT 8903, cepa CECT 8904, cepa CECT 8905, cepa CECT 8906.

- 5 Un décimo aspecto de la invención se refiere a una composición de autoformación de película en forma de polvo, que forma una auto-película bajo agitación en presencia de un medio líquido, la composición que comprende: (i) al menos un agente en forma de polvo seleccionado del grupo que consiste en un agente gelificante y un agente bioadhesivo, y (ii) al menos una cepa de *Pediococcus* en forma de polvo, en donde (i) y (ii) están en un contenedor único o en contenedores separados.
- 10 10 El undécimo y duodécimo aspectos de la invención se refieren a un proceso para preparar una fórmula reconstituida que comprende mezclar bajo agitación una composición de autoformación de película en forma de polvo del décimo aspecto con un medio líquido, y la fórmula reconstituida obtenida de la misma.
- 15 15 Un decimotercer aspecto de la invención se refiere a un kit para uso oral, que comprende: (1) la composición de autoformación de película en forma de polvo del décimo aspecto, o la fórmula reconstituida del duodécimo aspecto; y (2) significa aplicar a la cavidad bucal la composición de autoformación de película en forma de polvo o la fórmula reconstituida.
- 20 20 Un decimocuarto aspecto de la invención se refiere a la composición de autoformación de película en forma de polvo del décimo aspecto, o la fórmula reconstituida del duodécimo aspecto, para uso en la prevención y/o tratamiento de una condición seleccionada del grupo que consiste de: periimplantitis, mucositis, periodontitis, enfermedad de las encías, caries, candidiasis oral, herpes labial y ampollas.
- 25 25 La descripción detallada y los ejemplos que se muestran a continuación se presentan con el propósito de proporcionar a los expertos en la técnica una explicación suficientemente clara y completa de esta invención, pero no deben considerarse limitaciones sobre los aspectos esenciales contemplados en ella, como se presentó en secciones anteriores a esta descripción.
- 30 30 Descripción detallada de la invención
- La invención proporciona composiciones de autoformación de películas en forma de polvo que comprenden *Pediococcus* bacterias de ácido láctico y un proceso para su preparación que comprende mezclar con un medio líquido.
- 35 35 En un aspecto, la composición de autoformación de película comprende al menos un agente gelificante, al menos un agente bioadhesivo y al menos una cepa de bacterias de ácido láctico. En otro aspecto, la composición de autoformación de película comprende al menos un gelificante o al menos un agente bioadhesivo, y al menos una cepa de *Pediococcus*.
- 40 40 Composición de autoformación de película en forma de polvo
- 45 45 Las bacterias de ácido láctico incluidas en la composición de autoformación de película en forma de polvo de la invención pueden estar en forma de células viables o no viables. El uso general de cepas se presenta en forma de células viables. Sin embargo, también se puede extender a células no viables tales como cultivos muertos o lisados celulares (obtenidos por ejemplo, por exposición a pH alterado, sonicación, radiación, temperatura, presión o entre otros medios para matar o lisar bacterias) o composiciones que contienen factores beneficiosos previamente producidos por cualquiera de las cepas (por ejemplo, bacteriocinas y sustancias antiinflamatorias).
- 50 50 En una modalidad particular, la al menos una cepa de bacterias de ácido láctico incluida en la composición en polvo está en una forma que comprende células viables. Esto significa que la composición está compuesta sustancialmente por células viables o está compuesta parcialmente por células viables.
- 55 55 En una modalidad particular, el al menos un agente en forma de polvo seleccionado del grupo que consiste de un agente gelificante y un agente bioadhesivo no tiene efecto bactericida contra al menos las bacterias de

- 5 ácido láctico. El término "bactericida", también conocido como "bactericida", significa que mata las bacterias, es decir, reduce el número de células viables en la composición. Por lo tanto, los agentes incluidos en la composición son aquellos que no matan a las bacterias del ácido láctico. Los expertos en la técnica saben que el número de células viables en un producto que contiene bacterias disminuye de forma natural con el tiempo dependiendo de las condiciones de almacenamiento que incluyen la temperatura, la atmósfera y el uso de agentes protectores tales como crioprotectores u otros portadores. En esta descripción, la expresión "no tiene efecto bactericida" significa que la concentración de células viables en presencia del gelificante y/o el agente bioadhesivo no se reduce en comparación con la concentración de células viables en ausencia de estos agentes cuando se almacenan o incubado bajo las mismas condiciones.
- 10 10 Preferiblemente, la concentración de células viables en la composición en polvo en presencia del gelificante y/o el agente bioadhesivo en comparación con la misma composición sin estos agentes, se reduce no más de 10000 veces (es decir, 4 logaritmos). Esto significa que si, por ejemplo, la concentración de células viables en el polvo que no contiene el gelificante y los agentes bioadhesivos es 1E+09 cfus/g, la concentración de células viables en presencia de los agentes no es inferior a 1E+05 cfus/g.
- 15 15 Más preferiblemente, la concentración de células viables en la composición en polvo en presencia de estos agentes se reduce no más de 1000 veces (3 logs), 100 veces (2 logs) o 10 veces (1 log) en comparación con la misma composición sin estos agentes.
- 20 20 En una modalidad particular, además de no tener ningún efecto bactericida, el gelificante y los agentes bioadhesivos no tienen efecto bacteriostático contra las bacterias del ácido láctico. Esto significa que los agentes no matan a las bacterias, ni inhiben el crecimiento de las bacterias (no impiden que las bacterias crezcan y se dividan). Por lo tanto, los agentes incluidos en la composición son aquellos que no evitan que las bacterias crezcan normalmente.
- 25 25 En una modalidad más particular, los agentes son aquellos que tienen un efecto prebiótico. Esto significa que mejoran o aumentan el crecimiento de las bacterias. Esta característica se muestra en los EJEMPLOS 5-7 a continuación.
- 30 30 En una modalidad incluso más particular, se estudia el efecto prebiótico del agente de interés incubando las bacterias de ácido láctico de interés en presencia del agente. Saliva artificial que contiene 1 g/l de polvo de 'Lab-lemco' (Oxoid, Basingstoke, RU), 2 g/l de extracto de levadura (Oxoid), 5 g/l de peptona de proteosa (Oxoid), 2.5 g/l de mucina gástrica de cerdo (Sigma Chemical Co., Poole, Reino Unido), 35 g/l de cloruro de sodio (BDH Chemicals Ltd, Poole, Reino Unido), 0.2 g/l de cloruro de calcio (BDH), 0.2 g/l de cloruro de potasio (BDH) en agua destilada se complementa con el agente de interés para una concentración final de 0.5% (p/v). La saliva artificial sin ingrediente de gel también se prepara para comparar el efecto del agente de interés en el crecimiento bacteriano con un medio no suplementado. Después de la esterilización en autoclave, se agregan 1.25 ml de urea al 40% en agua (p/v) por litro de medio salival artificial. Doscientos microlitros de los diferentes medios preparados se pipetean en placas de 96 pozos. Inmediatamente después de 20 microlitros de una suspensión de bacterias de ácido láctico de interés estandarizadas a 1E+07 CFU/ml en PBS se añadió. La misma cantidad de PBS sin inóculo bacteriano se usa como control negativo. Las placas se incuban durante 24 h a 37°C en anaerobiosis y se monitoriza el crecimiento bacteriano determinando la densidad óptica a 625 nm. La capacidad de los candidatos probióticos para usar el agente de interés para el crecimiento se calcula de acuerdo con la siguiente fórmula:
- 40 40
$$\Delta \text{Crecimiento} = (\Delta \text{DO}_{\text{gp}} - \text{ADO}_{\text{g}0}) - (\text{ADO}_{\text{sp}} - \text{ADO}_{\text{s}0})$$
- 45 45 en donde ADO_{gp} es la diferencia entre la densidad óptica a 625 nm después de 24 h en comparación con 0 h en los pozos complementados con el agente de interés e inoculados con candidatos de bacterias de ácido láctico (LAB) de interés;
- 50 50 $\text{ADO}_{\text{g}0}$ es la diferencia entre la densidad óptica a 625 nm a las 24 h en comparación con 0 h en los pozos complementados con el agente de interés pero que contiene PBS en lugar de LAB;
- 55 55 ADO_{sp} es la diferencia entre la densidad óptica a 625 nm a las 24 h en comparación con 0 h en los pozos no complementados con el agente de interés e inoculados con LAB; y

ADO₅₀ es la diferencia entre la densidad óptica a 625 nm a las 24 h en comparación con 0 h en los pozos no complementados con el agente de interés y que contienen PBS en lugar de LAB.

5 Basado en los ensayos detallados descritos en los EJEMPLOS 5-7, el experto en la materia puede repetir rutinariamente el ensayo para determinar objetivamente si un agente particular de interés tiene un efecto prebiótico. Es relevante observar que la descripción y las condiciones de los ensayos descritos en los EJEMPLOS 5-7 no limitan el alcance de la invención. Los ensayos son los adecuados para evaluar la capacidad de los agentes de interés para evaluar su efecto prebiótico.

10 En una modalidad particular, se considera que el agente tiene un efecto prebiótico cuando el Δ *Crecimiento* determinado como se describió anteriormente es mayor que 0.005. En una modalidad más particular, el Δ *Crecimiento* es mayor que 0.01. En una modalidad aún más particular, el Δ *Crecimiento* es mayor que 0.02.

15 Como se discutió anteriormente, la composición en forma de polvo comprende al menos un agente que puede ser un agente gelificante. En una modalidad particular, el al menos agente gelificante está en una cantidad para proporcionar viscosidad a la composición, y se selecciona del grupo que consiste de:

20 (a) un almidón, preferiblemente arroz, maíz, almidón de papa o glicolato de almidón de sodio;
 (b) una goma, preferiblemente goma tragacanto, goma arábica, goma xantano, goma ghatti, goma gellan, goma karaya, goma konjac o goma de galactomanano (particularmente goma guar, goma de algarrobo y goma de tara);
 (c) un polisacárido de algas, preferiblemente ácido algínico, alginato de sodio, agar, dextrano o carragenano;
 (d) un polisacárido seleccionado del grupo que consiste de pectina y maltodextrina;
 (e) un derivado de celulosa, preferiblemente metilcelulosa, carboximetilcelulosa, 25 carboximetilcelulosa sódica o cárlica, hidroxietilmelcelulosa, hidroxipropilmelcelulosa, etilhidroxietilmelcelulosa, etilmelcelulosa, hidroxietilmelcelulosa, acetato ftalato de celulosa o celulosa microcristalina;
 (f) un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en gelatina, colágeno y caseína; y
 (g) un polímero seleccionado del grupo que consiste en un polímero basado en acrilato, un polímero basado en vinilo (preferiblemente polivinilpirrolidona, también conocido como polividona o povidona), 30 un polisacárido catiónico (por ejemplo, acetilglucosamina catiónica, preferiblemente quitosano, ciclodextrina catiónica y dextrano catiónico) y un polialquilenglicol (preferiblemente polietilenglicol).

35 El al menos un agente también puede ser un agente bioadhesivo. Particularmente, el agente bioadhesivo está en una cantidad para proporcionar adhesividad a la composición, y se selecciona del grupo que consiste de:
 (a) una goma, preferiblemente goma de hakea, goma de xantano, goma de acacia, goma de konjac, goma de gelano o goma de galactomanano (particularmente goma de guar);
 (b) un polisacárido de algas, preferiblemente ácido algínico, alginato de sodio, agar, dextrano o carragenano;

40 (c) un derivado de celulosa, preferiblemente, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroximetilcelulosa, hidroxipropilmelcelulosa, hidroxipropilmelcelulosa, hidroterometilcelulosa, hidrotexietilmelcelulosa;
 (d) un polisacárido seleccionado del grupo que consiste de pectina y maltodextrina; y
 (e) un polímero seleccionado del grupo que consiste en un polímero basado en acrilato, un 45 polímero basado en vinilo (preferiblemente polivinilpirrolidona o povidona), un polisacárido catiónico (preferiblemente quitosano) y un polialquilenglicol (preferiblemente polietilenglicol).

Como se mencionó anteriormente, el agente gelificante está en una cantidad para proporcionar viscosidad a la composición y el agente biodhesivo está en una cantidad para proporcionar adhesividad a la composición. Los compuestos usados como gelificante y agentes bioadhesivos son bien conocidos en la técnica, por lo que las cantidades de agentes serán determinadas por los expertos en la técnica. En una modalidad particular, el agente gelificante es una goma. La goma puede ser, por ejemplo, goma xantana, goma arábica, goma guar, goma tragacanto, goma karaya, goma garrofín, goma de algarrobo, goma arábica, goma ghatti, goma gellan, goma karaya, goma konjac, goma hakea y goma tara. Tales gomas se pueden clasificar generalmente como gomas de carbohidratos que tienen una carga global negativa. Más preferiblemente, el agente gelificante es goma de guar, también conocida en el campo como goma de mascar, harina de guar y guaraná. Las gomas guar se extraen del endosperma de las semillas de ciertas plantas de la familia de las leguminosas. Son galactomananos resultantes de la formación de cadenas lineales de unidades de D-manosa unidas en (1-4),

con ramificaciones formadas por una única D-galactosa unida en (1-6). La goma guar puede modificarse o derivatizarse. Los ejemplos de derivados de goma guar son derivados hidroxipropilados o carboxihidroxipropilados, derivados catiónicos (Ecopol) y los productos resultantes de la despolimerización de las gomas guar.

5

En una modalidad particular, el agente bioadhesivo es un derivado de celulosa. Los principales derivados son éteres de celulosa, es decir, modificaciones de alquilo de celulosa, que resultan de sustituir parte de los átomos de hidrógeno de los grupos hidroxilo de las unidades de glucosa anhidra por grupos alquilo. Ejemplos no limitantes de éteres de celulosa son: metilcelulosa (MC), hidroxietilmethylcelulosa (HEMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), hidroxipropilmethylcelulosa (HPMC), hidroxietilcelulosa (HEC), etilhidroxietilcelulosa (EHEC), etilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio (CMCNa), sales de amonio cuaternario de hidroxietilcelulosa con un sustituyente de trimetilamonio (Polyquaternium 10), y copolímeros de cloruro de dimetildiallamonio (Polyquaternium A). En una modalidad más preferida, el agente bioadhesivo es hidroxietilcelulosa (HEC).

10

Ejemplos no limitantes de almidones incluyen almidón pregelatinizado (maíz, trigo, tapioca), almidón pregelatinizado con alto contenido de amilosa, almidones hidrolizados pregelatinizados (maltodextrinas, sólidos de jarabe de maíz) o almidones químicamente modificados tales como almidones sustituidos pregelatinizados (por ejemplo, almidones modificados con octenil succinato).

15

En una modalidad particular, la composición de autoformación de película en forma de polvo comprende al menos un agente gelificante y al menos un agente bioadhesivo. En una modalidad más particular, el agente gelificante es un compuesto diferente del agente bioadhesivo.

20

En una modalidad particular, el agente gelificante se selecciona del grupo que consiste de una goma y un polisacárido de algas y el agente bioadhesivo se selecciona del grupo que consiste en un derivado de celulosa y un polímero basado en vinilo.

25

Más particularmente, el agente gelificante es goma de guar o alginato y el agente bioadhesivo es hidroxietilcelulosa (HEC) o polivinilpirrolidona.

Por lo tanto, en una modalidad particular, el agente gelificante se selecciona del grupo que consiste en goma guar y alginato de sodio, y el agente bioadhesivo es HEC.

30

Las composiciones de autoformación de película de acuerdo con la invención están en forma de polvo. Particularmente, eso significa que la composición tiene un contenido de agua inferior al 10%, más preferiblemente inferior al 5%.

35

El experto en la técnica seleccionará rutinariamente las cantidades de gelificante y agentes bioadhesivos en forma de polvo para obtener una fórmula reconstituida que proporcione un grado apropiado de viscosidad y adhesividad dependiendo del volumen de la fórmula reconstituida.

40

En una modalidad particular, las cantidades de agente gelificante y agente bioadhesivo en la composición de autoformación de película son las cantidades necesarias para obtener concentraciones de cada agente de 0.05 a 20% (p/v) en la fórmula reconstituida final. Más particularmente, el agente gelificante en forma de polvo está en una cantidad para obtener una concentración de 1 a 5% (p/v), más particularmente un 2%, 3% o 4% (p/v) en la fórmula reconstituida final y el agente bioadhesivo en forma de polvo está en una cantidad para obtener una concentración de 4 a 10% (p/v), más particularmente un 6% (p/v) en la fórmula reconstituida final.

45

En una modalidad particular para la aplicación de periimplantitis, la composición de autoformación comprende la cantidad necesaria de goma guar y HEC para obtener una fórmula reconstituida final que comprende un 4% (p/v) de goma guar y un 6% (p/v) de HEC. En una modalidad particular para aplicación dental, la composición de autoformación comprende la cantidad necesaria de goma guar y HEC para obtener una fórmula reconstituida final que comprende un 2% (p/v) de goma guar y un 6% (p/v) de HEC.

50

En una modalidad particular, la composición en forma de polvo comprende entre 0.05 y 90% de agente gelificante (p/p), más particularmente de 1% a 60% (p/p). En modalidades más particulares, la cantidad de

agente gelificante es del 50%, 20%, 15% y 10% (p/p). En otra modalidad particular, la cantidad de bioadhesivo en la composición en forma de polvo está comprendida entre 0.05 y 90% (p/p), y particularmente entre 30 y 85% (p/p). En modalidades más particulares, la cantidad de bioadhesivo es del 68%, 50% y 40% (p/p).

5 La persona con experiencia seleccionará los volúmenes apropiados de medio líquido según la superficie y el estado a tratar. En una modalidad particular, el volumen utilizado para reconstituir la fórmula no es superior a 500 ml. En una modalidad particular, el volumen utilizado no es superior a 200 ml, 150 ml, 100 ml, 50 ml o 20 ml. En una modalidad más particular, el volumen usado para reconstituir la fórmula es de 6 ml. En una modalidad más particular, el volumen usado para reconstituir la fórmula está en el intervalo de 2 a 3 ml.

10 10 El experto en la técnica encontrará a continuación (sección de fórmula reconstituida y procedimiento para obtenerlo) ejemplos no limitantes de cantidades apropiadas de gelificante y agentes bioadhesivos en forma de polvo, fórmula reconstituida final y volúmenes de medio líquido.

15 15 El gelificante y los agentes bioadhesivos y las cantidades usadas en la presente invención no se usan como meros portadores, excipientes, aglutinantes, lubricantes, agentes tensoactivos o solubilizantes, agentes humectantes, sino que se seleccionan para conferir propiedades de viscosidad y adhesividad apropiadas a las composiciones reconstituidas finales para mejorar la administración de bacterias del ácido láctico. Las combinaciones apropiadas permiten administrar las bacterias de ácido láctico sin disminuir su eficacia y estabilidad, o incluso aumentarla, en un período de tiempo conveniente para la práctica clínica.

20 20 Como se discutió anteriormente, la composición de autoformación de película en forma de polvo de la invención también comprende al menos una *Pediococcus* cepa de bacterias de ácido láctico. En una modalidad particular, la cepa de bacterias de ácido láctico puede antagonizar el al menos un patógeno oral seleccionado del grupo que consiste en bacterias del género:

25 25 *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Prevotella* y *Aggregatibacter*. Más particularmente, es capaz de antagonizar al menos un patógeno oral seleccionado del grupo que consiste de: *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. La capacidad de la cepa de bacterias de ácido láctico para antagonizar patógenos orales se prueba, por ejemplo, con el ensayo de los EJEMPLOS 8-9.

30 30 La cepa de bacterias del ácido láctico pertenece al género *Pediococcus*. Más particularmente, la cepa es un *Pediococcus acidilactici* o un *Pediococcus pentosaceus*. Más particularmente, la cepa de bacterias de ácido láctico se selecciona del grupo que consiste de: cepa CECT 8903, cepa CECT 8904, cepa CECT 8905 y cepa CECT 8906.

35 35 Como se indicó anteriormente, al menos el agente gelificante, el agente al menos bioadhesivo y al menos la cepa de bacterias del ácido láctico que forman la composición en forma de polvo están en un contenedor único o en contenedores separados. El método para obtener las composiciones de aspectos previos comprende: obtener la cepa de bacterias de ácido láctico cultivándola en un medio adecuado y procesarla en forma de polvo (por ejemplo, secado por congelación) y mezclar la cepa de bacterias de ácido láctico con el agente gelificante y el agente bioadhesivo, ambos en forma de polvo, si la composición se presenta en un único contenedor. Los métodos para cultivar y tratar posteriormente las bacterias del ácido láctico se describen a continuación. La composición también se puede presentar en tres o dos contenedores diferentes que comprenden los elementos de la composición, y el usuario puede mezclarlos antes de la aplicación.

40 40 La composición de autoformación es especialmente adecuada para administración tópica. El término "tópico" tal como se usa aquí significa aplicación a superficies corporales tales como la piel o las membranas mucosas, ya sean externas o internas. Ejemplos no limitantes de rutas tópicas de administración son administraciones epikutáneas (aplicadas directamente a la piel), aplicación a la conjuntiva ocular o aplicación al oído, administración a superficies orales (por ejemplo, dientes y encías) o administraciones vaginales.

45 45 Fórmula reconstituida y proceso para obtenerla

50 50 Como se discutió anteriormente, un aspecto de la invención se refiere a un proceso para preparar una fórmula reconstituida que comprende mezclar bajo agitación la composición de autoformación de película en forma de polvo de aspectos previos con un medio líquido. Se obtiene una fórmula reconstituida. La agitación se puede

realizar por agitación manual o por medio de un mezclador eléctrico; con agitación continua o discontinua, y durante un período de tiempo adecuado. El período de mezclado preferiblemente está comprendido entre 5 segundos y 60 minutos, más preferiblemente entre 10 segundos y 30 minutos o entre 30 segundos y 10 minutos. En una modalidad más preferida, la agitación se realiza durante 1, 2, 3, 4 o 5 minutos. La fórmula se reconstituye preferiblemente justo antes del uso y se deja reposar por la gelificación previa a su administración. En una modalidad particular, después de la mezcla, la composición se deja reposar desde al menos 10 segundos. Más particularmente, la fórmula reconstituida se deja reposar durante al menos 30 segundos, más particularmente al menos 1 minuto antes de la aplicación. También puede ser conveniente evitar largos períodos de tiempo para evitar que el gel se vuelva demasiado denso antes de su aplicación, lo que puede dificultar su distribución en la superficie a tratar. Por lo tanto, en una modalidad particular, la fórmula, una vez reconstituida, se aplica sobre la superficie a tratar en un período de tiempo no mayor de 120 minutos. Más particularmente, la fórmula reconstituida se aplica en un período de tiempo no mayor de 60 minutos, más particularmente no más de 30 minutos, más particularmente no más de 10 minutos.

5

15 El medio líquido es preferiblemente aceptable en agua para consumo humano o animal. Sin embargo, el medio líquido también es, por ejemplo, cualquier suspensión en agua, un aceite, glicerol o una vaselina.

20 La fórmula reconstituida puede adoptar preferiblemente la forma de un gel con viscosidad y/o adhesividad adecuadas para ser aplicable a la cavidad oral deseada, la forma de un barniz si, por ejemplo, la fórmula se va a aplicar sobre la superficie dental, o la forma de un aerosol.

25 Las cantidades de agente gelificante y agente bioadhesivo en la fórmula reconstituida final son de 0.05 a 20% (p/v) para cada agente. Preferiblemente, la fórmula reconstituida comprende 1-5% (p/v) de gelificante, más preferiblemente un 2%, 3% o 4% (p/v de la fórmula reconstituida total) y 1-10% (p/v) de bioadhesivo, más preferiblemente un 4-10% (p/v), más preferiblemente un 6% (p/v de la fórmula reconstituida total).

30 En una modalidad particular para la aplicación de perimplantitis, la fórmula reconstituida comprende particularmente 4% p/v de goma guar y 6% de HEC. En una modalidad particular para la aplicación dental, la fórmula reconstituida comprende un 2% p/v de goma guar y un 6% de HEC.

35 Una composición preferida en forma de polvo comprende 20% (p/p) de goma guar y 30% de HEC, y las bacterias de ácido láctico están en una cantidad de 50%. Si 0.5 g de la mezcla en polvo se reconstituye con 2.5 ml de agua, las concentraciones finales en el gel son 4% (p/v) de goma guar y 6% de HEC.

40 En otra modalidad, la composición en forma de polvo comprende 15% (p/p) de alginato de sodio, 30% de HEC y 1.5% de acetato de calcio, y las bacterias de ácido láctico están en una cantidad de 53.5% (p/p). Si 0.5 g de la mezcla en polvo se reconstituyen con 2.5 ml de agua, las concentraciones finales en el gel son 3% (p/v) de alginato y 6% de HEC.

45 En otra modalidad, la composición en forma de polvo comprende 10% (p/p) de alginato de sodio, 30% de HEC y 1% de acetato de calcio, y las bacterias de ácido láctico están en una cantidad de 59% (p/p). Si 0.5 g de la mezcla en polvo se reconstituyen con 2.5 ml de agua, las concentraciones finales en el gel son 2% de alginato y 6% de HEC.

50 En otra modalidad, la composición en forma de polvo comprende 20% (p/p) de goma guar y 10% de polivinilpirrolidona, y las bacterias de ácido láctico están en una cantidad de 70% (p/p). Si 0.5 g de la mezcla en polvo se reconstituyen con 2.5 ml de agua, las concentraciones finales en el gel son 4% de goma guar (p/v) y 2% de polivinilpirrolidona.

55 En otra modalidad, la composición en forma de polvo comprende 50% (p/p) de goma guar y las bacterias de ácido láctico están en una cantidad de 50% (p/p). Si 0.5 g de la mezcla en polvo se reconstituyen con 6 ml de agua, la concentración final de goma guar en el gel es del 4% (p/v).

En otra modalidad, la composición en forma de polvo comprende 72% (p/p) de HEC y las bacterias de ácido láctico están en una cantidad de 28% (p/p). Si 0.5 g de la mezcla en polvo se reconstituyen con 6 ml de agua, la concentración final de HEC en el gel es del 6%.

5 Kit para uso oral

Una modalidad particular de la invención es un artículo de fabricación que comprende un contenedor sellado que tiene incluida la composición en polvo como se proporciona aquí, preferiblemente en una cantidad de dosificación unitaria y en una condición estéril. El contenedor tiene preferiblemente una capacidad suficiente para permitir la reconstitución de la composición *in situ*. En general, se considerará conveniente una capacidad de aproximadamente 1 ml a aproximadamente 20 ml, preferiblemente de aproximadamente 5 ml a aproximadamente 10 ml.

Por lo tanto, en algunos casos, el artículo de fabricación es solo el contenedor con la composición de autoformación de película en forma de polvo, porque el profesional tiene a su disposición los otros elementos para usar y aplicar la composición de autoformación de película al paciente (por ejemplo, medio líquido, jeringa y aguja, y medios para la aplicación).

Otro artículo del fabricante es la fórmula reconstituida que puede almacenarse refrigerada durante un corto período de tiempo hasta su uso.

Sin embargo, en algunos casos, el artículo de fabricación es un kit que comprende otros elementos para facilitar el uso y la aplicación. Por consiguiente, otro aspecto de la invención se refiere a un kit para uso oral, que comprende: (1) la composición de autoformación de película en forma de polvo como se definió anteriormente; o la fórmula reconstituida; y (2) significa aplicar a la cavidad bucal la composición de autoformación de película en forma de polvo, o la fórmula reconstituida.

La composición de autoformación de película en forma de polvo podría aplicarse directamente a la cavidad oral y reconstituirse *in situ* con la saliva, por ejemplo. Sin embargo, una modalidad preferida es reconstituir la composición justo antes del uso.

En una modalidad particular, los medios para la aplicación a la cavidad bucal se seleccionan del grupo que consiste de: un cepillo, una jeringa con una aguja de inyección, una jeringa con una aguja de punta roma y un protector bucal.

En una modalidad más particular, el medio para la aplicación es una jeringa y una aguja que tiene una punta roma similar a una sonda periodontal. Por medio de la jeringa y la aguja de punta roma, la solución reconstituida se aplica en la región afectada, es decir, en un bolsillo periimplantario.

El medio para la aplicación es un protector bucal, también conocido como férula oclusal, protector bucal, pieza de boca, protector de encías, protector de encías, protector de noche, férula de mordedura o boca, o plano de mordida. Este es un aparato dental extraíble para adaptarse a los arcos superiores o inferiores de los dientes. El protector bucal o férula bucal se llena con la composición en forma de polvo o la fórmula reconstituida y se ajusta a los dientes.

En otra modalidad, para facilitar el uso, el kit comprende además un contenedor con un medio líquido para reconstituir la composición de autoformación de película en forma de polvo.

En otra modalidad, también para facilitar el uso, el kit comprende además medios para poner el líquido en el contenedor con la composición de autoformación de película en forma de polvo. Los medios son preferiblemente una jeringa equipada con una aguja de perforación desechable que se usa para extraer el líquido de su contenedor y ponerlo en el contenedor con la composición de autoformación de película en forma de polvo.

El término "contenedor" aquí se usa para designar a cualquier receptor pequeño, que tenga un cierre que sea adecuado para envasar una cantidad de dosificación unitaria de un polvo reconstituible, preferiblemente en una condición estéril. Se entenderá que formas de envase equivalentes, tales como un vial, una ampolla, una

5 jeringa desecharable, un cartucho de jeringa o una jeringa precargada, están abarcadas por esta modalidad de la invención. Opcionalmente, el vial puede ser un vial multicompartmental que comprende, por ejemplo, dos compartimentos, uno para contener el polvo reconstituible y el otro para contener un líquido en una cantidad suficiente para disolver el polvo. En dicho vial, los dos compartimentos están interconectados por una abertura en donde se puede acoplar un tapón para evitar el contacto del polvo y el líquido solvente hasta que el vial esté listo para su uso. En uso, el líquido se pone en contacto con el polvo mediante desacoplamiento o punción del tapón por cualquier medio adecuado, por ejemplo un dispositivo tal como un émbolo que ejerce presión o impulsa una aguja a través del tapón. Ejemplos de tales viales multicompartmentales incluyen un cartucho de doble cámara para una jeringa y un vial de doble cámara, o una tapa de suministro y un vial cerrado con esta tapa.

10

15 Una implementación particular de la invención consiste en los siguientes pasos: una cantidad de la composición de autoformación de película de la invención en forma de polvo se introduce en un vial de vidrio provisto de un septo y cápsula de aluminio. Tras la adición de agua con una jeringa, preferiblemente agua desionizada o destilada, y agitación manual, el gel reconstituido se forma en muy poco tiempo. Este gel no tiene una viscosidad muy alta para ser aplicado por medio de una jeringa y tiene adhesividad adecuada para aplicaciones de implantes dentales. La fórmula reconstituida se administra luego, por ejemplo, con una jeringa y aguja, cepillo o aplicador de presión en un bolsillo periodontal o sitio quirúrgico. El profesional dental puede manipular el sistema para obtener una conformidad óptima con el sitio de tratamiento y superar las dificultades 20 de colocación inherentes a otros sistemas. Cuando se administra, el sistema de película ligera permanece en el sitio deseado, por lo que es posible sellar los espacios interiores de implante deseados con la fórmula de la invención.

25 Aplicaciones médicas

30 Como se discutió anteriormente, otro aspecto de la invención se refiere a la composición de autoformación de película en forma de polvo, o la fórmula reconstituida, para uso como un medicamento. Particularmente, la invención proporciona la composición de autoformación de película en forma de polvo o la fórmula reconstituida, para uso en la prevención y/o tratamiento de una condición relacionada con alteraciones de la microbiota oral. Más particularmente, esta condición se selecciona del grupo que consiste de: periimplantitis, mucositis, periodontitis, enfermedad de las encías, caries, candidiasis oral, herpes labial y ampollas. En una modalidad particular, la condición es periimplantitis.

35 Estos aspectos se pueden formular alternativamente como el uso de cualquiera de las composiciones de la invención para la fabricación de un producto farmacéutico, un producto veterinario, un medicamento, un producto alimenticio, un complemento alimenticio, un alimento médico o un producto de cuidado oral para la prevención y/o el tratamiento de una condición relacionada con alteraciones de la microbiota oral, preferiblemente periimplantitis, mucositis, periodontitis, enfermedad de las encías, candidiasis oral por caries, herpes labial y ampollas. Esto también puede formularse alternativamente como un método para la prevención 40 y/o el tratamiento de una condición relacionada con alteraciones de la microbiota oral, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad efectiva de cualquiera de las composiciones de la invención.

45 Aplicación en el tratamiento y la prevención de la periimplantitis

50 Las prótesis dentales generalmente incluyen dos componentes: el componente del implante (también conocido como implante o dispositivo endóseo) es un tornillo incrustado en la osteotomía. Es la porción que se encuentra debajo de la línea de las encías y puede considerarse una raíz de diente artificial. El otro componente es la corona, puente o dentadura, que se fija al componente del implante y en el caso de la corona sustituye la parte visual del diente. Se puede incluir un tercer componente, un pilar, que es un componente de cerámica o titanio que garantiza un ajuste seguro entre el implante dental y la corona. La porción del pilar es la parte que se encuentra en y encima de la línea de la encía. Entre estas estructuras hay ranuras y cavidades en las que las bacterias pueden penetrar desde la cavidad oral. Más tarde, estas bacterias pueden regresar al tejido adyacente y pueden causar periimplantitis.

55 Como una implementación específica de la invención en la prevención y tratamiento de la periimplantitis, tras la adición de agua con una jeringa al contenedor con la composición de autoformación de película en forma de polvo y la agitación manual, el gel reconstituido se forma en muy poco tiempo. El gel reconstituido se

- 5 administra, por ejemplo, con una jeringa y una aguja con punta roma a las ranuras, micro-ranuras y cavidades del implante. En particular, dado que el implante dental comprende una superficie bruta que está expuesta a fluidos orales, debido a que ha ocurrido una pérdida ósea vertical y debido al proceso inflamatorio local se ha creado un bolsillo periimplantario, la composición descrita anteriormente se aplica en tal bolsillo, de tal manera que se adhiere a la superficie bruta del implante y a la superficie mucosa del bolsillo. Por lo tanto, la solución se puede aplicar ventajosamente en un bolsillo periimplantario doblando la punta roma, imitando una sonda periodontal, colocando la punta de la aguja roma cerca de la base del bolsillo e inyectando el producto hasta que la solución llegue a la parte superior borde de la encía.
- 10 10 Ventajosamente, la composición de autoformación de película descrita anteriormente está asociada con medios para administrarla a la región periimplantaria próxima a un implante dental que se ve afectado por el proceso inflamatorio, en particular, la composición está asociada con un kit dental que comprende una aguja roma y flexible.
- 15 15 Particularmente, una implementación específica de la invención en el tratamiento de periimplantitis consiste en: eliminar la corona; administrar anestesia local al paciente; limpiar la zona a tratar; eliminar mecánicamente la placa subgingival raspando; aplicar un antibiótico tal como clorhexidina; aplicar solución salina; y aplicar la fórmula reconstituida de la invención en los alrededores y las cavidades del implante y también dentro del implante. Después de extraer la aguja del bolsillo, se aplican soluciones de solución salina y un chorro de aire (durante aproximadamente 10 segundos) en la zona tratada. Inmediatamente después, la corona se coloca en su lugar. El paciente recibe instrucciones de no cepillarse los dientes dentro de las 6 horas posteriores al tratamiento.
- 20 20 En caso de un tratamiento preventivo, consiste particularmente en: quitar la corona; opcionalmente, limpiar la zona a tratar y eliminar mecánicamente la placa subgingival raspando; y aplicar la fórmula reconstituida de la invención.
- 25 25 Otras aplicaciones orales: gingivitis y caries dental
- 30 30 La invención también se puede usar en la higiene dental de sujetos sanos para prevenir enfermedades potenciales, y en el tratamiento o prevención de condiciones orales relacionadas con la disbiosis oral, además de la periimplantitis.
- 35 35 En una modalidad particular, las soluciones de la invención se usan en la prevención y el tratamiento de la periodontitis y la gingivitis. El inicio de la gingivitis y la inflamación del periodonto y la enfermedad periodontal generalmente se asocian con un desplazamiento del equilibrio microbiano en el surco, es decir, alrededor de la cavidad del diente entre la superficie del diente y las encías. Resulta en la formación de placas bacterianas (biopelículas) y una mayor presencia de especies patógenas Gram-negativas dentro de estos depósitos. Las exotoxinas y los metabolitos producidos por estas bacterias se acumulan y causan inflamación del tejido de las encías circundantes, lo que a su vez produce inflamación y hemorragia. En el curso de la inflamación, la responsabilidad del epitelio de unión se debilita al diente, de modo que las bacterias pueden penetrar en el área subgingival. La enfermedad periodontal también ocurre en la mayoría de los mamíferos, especialmente en caballos, gatos, roedores, ganado y perros. Por ejemplo, el 80% de todos los perros mayores de 3 años tienen enfermedad periodontal.
- 40 40 45 45 La terapia periodontal generalmente elimina primero mecánicamente la placa subgingival raspando o mediante ultrasonido; mediante esta eliminación mecánica, las bacterias en la biopelícula se liberan y eliminan. En el curso de este tratamiento, se usan antibióticos y otras composiciones bactericidas hoy, que están diseñadas para evitar la recolonización por bacterias gram-negativas. Sin embargo, la desventaja de un uso regular y extenso de composiciones que contienen antibióticos es el riesgo de desarrollar resistencia a los antibióticos y los efectos secundarios a menudo desencadenados de estos productos. Como en el caso de la periimplantitis, las fórmulas reconstituidas de la invención pueden ser, por ejemplo, aplicado por medio de una jeringa, particularmente con una aguja de punta roma.
- 50 50 55 55 En otra modalidad particular, las composiciones de la invención se usan en la prevención y el tratamiento de caries. En tal caso, la fórmula reconstituida de la invención puede ser en forma de un barniz, que se aplica fácilmente sobre la superficie del diente, por medio de un cepillo por un dentista, higienista dental u otro

profesional de la salud. Los barnices se pueden aplicar al esmalte, la dentina o el cemento del diente como complemento de otras formas de tratamiento. No son barnices permanentes, pero su consistencia adhesiva les permite permanecer en contacto con las superficies dentales durante un período de varias horas, lo que permite la colonización de las bacterias probióticas y proporciona los efectos beneficiosos de la composición de la invención.

Un procedimiento de aplicación preferido se explica a continuación. Aunque no es necesario realizar una profilaxis profesional antes de la aplicación de las soluciones de la invención, se recomienda que los dientes se limpian con un cepillo de dientes y se eliminen de la placa o residuos pesados si es necesario. Los dientes deben secarse ligeramente con aire o con una gasa de algodón. Los dientes están aislados (por ejemplo, con rollos de algodón o material absorbente) para evitar la recontaminación con saliva. Se dispensa una pequeña cantidad de barniz (por ejemplo, 0.5 ml). Toda la dentición puede tratarse con tan poco como 0.3-0.6 ml. El barniz se adherirá incluso si los dientes están húmedos. Luego se usa un pincel o aplicador pequeño para aplicar el barniz. El paciente debe evitar cepillarse el resto del día. Los procedimientos normales de higiene oral pueden comenzar nuevamente al día siguiente.

En aplicaciones tales como periodontitis, gingivitis o caries, las composiciones de la invención también pueden ser aplicadas por el propio paciente. El producto comercial puede ser un kit dental como se describió anteriormente que comprende un cepillo para una fácil implementación.

En otras modalidades, las composiciones y kits de la invención son utilizados por el profesional dental en un tratamiento agudo y el paciente puede seguir un tratamiento de mantenimiento con productos de cuidado oral tales como chicles, pasta de dientes, enjuague bucal, rociado bucal, pastillas o tabletas orales dispersables que comprenden la composición de autoformación de película en forma de polvo de la invención o las bacterias de ácido láctico con excipientes comunes.

Otros usos y formas de productos

La invención también proporciona la composición de autoformación de película en forma de polvo o la fórmula reconstituida, para uso en el cuidado oral, es decir, para uso sin medicamento. Por lo tanto, las composiciones de la invención se pueden formular en forma de enjuagues bucales, aerosoles, geles orales y pastas dentales, con la ayuda de los ingredientes convencionales usados para estas formas orales, bien conocidos por los expertos en la técnica.

Como saben los expertos en la técnica, los enjuajes orales son soluciones acuosas o hidroalcohólicas para enjuagar la boca que tienen una formulación convencional bien conocida. Además de agua, pueden incluirse compuestos polihidroxilados tales como glicerina o glicoles (por ejemplo, propilenglicol, agentes tensoactivos no iónicos, etc.) y otros aditivos para mejorar la apariencia, el sabor y la conservación.

Los aerosoles son composiciones iguales o similares a los enjuagues bucales pero dispensados en frascos de aerosol para la conveniente aplicación de la dosis necesaria para humedecer y proteger la boca sin necesidad de un enjuague posterior.

Los geles orales incluyen polímeros que permiten la aplicación directa y estable a la cavidad oral. En relación con estos polímeros, para los fines de esta invención es preferible usar una combinación de polímeros genéricamente conocidos como policarbofilo y carbómero, ya que mantienen la estructura del gel estable durante tiempos muy prolongados en condiciones de temperatura extrema. Los geles también pueden incluir una cantidad de edulcorante natural no cariogénico, tal como sorbitol.

La formulación de pastas de dientes es bien conocida por los expertos en la técnica. En las composiciones de pasta de dientes, es preferible usar agentes tensoactivos no iónicos (por ejemplo, ésteres de ácidos grasos con azúcares) o anfóteros (por ejemplo, betaínas derivadas de coco), ya que los agentes tensoactivos aniónicos tienen un efecto negativo sobre el delicado tejido epitelial de las encías. En el caso de las pastas dentales, también se prefiere particularmente el uso de bicarbonato de sodio para neutralizar la acidez oral. Además, las pastas dentales pueden contener agentes espesantes tales como goma de xantano, rellenos de sílice abrasivos y otros agentes complementarios además de los que se usan normalmente en la industria de

la pasta de dientes. Preferiblemente, las bacterias de ácido láctico están encapsuladas o protegidas en otra forma para ser introducidas en una pasta de dientes.

5 Cepas de bacterias del ácido láctico

Otros aspectos de la invención se relacionan con nuevas cepas del género *Pediococcus*, especialmente beneficiosas para la prevención y el tratamiento de la periimplantitis y otras condiciones orales relacionadas con la disbiosis oral. Estas nuevas cepas son el resultado de extensos estudios de diferentes cepas de bacterias del ácido láctico aisladas de humanos sanos. *Pediococcus pentosaceus* PERI1, *Pediococcus acidilactici* PERI2, *Pediococcus pentosaceus/acidilactici* PERI3, *Pediococcus pentosaceus/acidilactici* PERI4, se depositaron el 16 de junio de 2015 en la Colección de Cultivo Tipo Español (Colección Española de Cultivos Tipo, CECT, Edificio 3 CUE, Pare Cientific Universitat de Valencia, Catedratico Agustin Escardino, 9, 46980-Paterna, Valencia, España), por el depositante AB-Biotics, S.A., ubicado en Pare de Recerca UAB, Campus UAB, s/n Edifici Eureka, 08193 Cerdanyola del Valles (Barcelona, España). Las cepas recibieron los números de acceso CECT 8903, CECT 8904, CECT 8905 y CECT 8906, respectivamente, después de que la Autoridad Internacional de Depósito declarara que las cepas eran viables.

Las cepas se seleccionaron debido a las siguientes propiedades/capacidades distintivas:

- Buena capacidad para sobrevivir en la cavidad oral ya que las cepas toleran bien la presencia de lisozima y peróxido de hidrógeno, dos agentes bactericidas comúnmente presentes en la cavidad oral.
- La capacidad de tolerar bien y crecer en presencia de un agente gelificante y/o un agente bioadhesivo. Por ejemplo, el crecimiento de la cepa seleccionada en saliva se mejora en presencia del agente gelificante tal como goma guar y/o el agente bioadhesivo tal como hidroxietilcelulosa.
- La capacidad de inhibir el crecimiento de patógenos orales. Por ejemplo, las cepas son capaces de antagonizar bacterias asociadas con periimplantitis que incluyen *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* y/o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.
- Capacidad para agregar, que es un requisito para formar una biopelícula que puede tener un efecto protector contra la colonización de otros patógenos formando una barrera natural.
- Una amplia variedad de especies bacterianas de ácido láctico tienen una larga historia de uso seguro aparente. La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria ha desarrollado un sistema que otorga el estado de "Presunción de Seguridad Calificada" (QPS), a las unidades taxonómicas con una larga historia comprobada de uso aparentemente seguro. Las cepas de la invención pertenecen a especies bacterianas que tienen el estado de QPS [Andreoletti, O. et al. 2008].

35 En resumen, se cree que ninguna técnica anterior describe cepas de *Pediococcus* y particularmente cepas de *Pediococcus acidilactici* y *Pediococcus pentosaceus* con las características mencionadas anteriormente y para uso en la prevención y/o tratamiento de la periimplantitis. Es de destacar que las cepas *Pediococcus* CECT 8903, *Pediococcus* CECT 8904, *Pediococcus* CECT 8905, *Pediococcus* CECT 8906, reúnen todas las propiedades mencionadas anteriormente juntas, por lo que son adecuadas para tratar la periimplantitis.

40 En una modalidad particular, la cepa aislada se ha fermentado en un medio artificial y se ha sometido a un tratamiento posterior después de la fermentación, para obtener células bacterianas, y las células bacterianas resultantes están en un medio líquido o en una forma sólida. Particularmente, el post-tratamiento se selecciona del grupo que consiste de: secado, congelación, liofilización, secado en lecho fluido, secado por aerosol y refrigeración en medio líquido, y más particularmente, secado por congelación.

45 Las cepas de la invención se producen cultivando (o fermentando) las bacterias en un medio artificial adecuado y en condiciones adecuadas. Por la expresión "medio artificial" para microorganismos debe entenderse un medio que contiene sustancias naturales, y opcionalmente productos químicos sintéticos tales como el alcohol polivinílico polimérico que puede reproducir algunas de las funciones de los sueros. Los medios artificiales comunes adecuados son caldos de nutrientes que contienen los elementos que incluyen una fuente de carbono (por ejemplo, glucosa), una fuente de nitrógeno (por ejemplo, aminoácidos y proteínas), agua y sales necesarias para el crecimiento bacteriano. Los medios de crecimiento pueden ser en forma líquida o a menudo mezclados con agar u otro agente gelificante para obtener un medio sólido. Las cepas se pueden cultivar solas para formar un cultivo puro, o como un cultivo mixto junto con otros microorganismos, o cultivando bacterias de diferentes tipos por separado y luego combinándolas en las proporciones deseadas.

Después del cultivo, y dependiendo de la formulación final, las cepas se pueden usar como bacterias purificadas, o alternativamente, se puede usar el cultivo bacteriano o la suspensión celular, como tal o después de un apropiado post-tratamiento. En esta descripción, el término "biomasa" se entiende como el cultivo de cepas bacterianas obtenido después del cultivo (o la fermentación como un término sinónimo de cultivo).

5

Por el término "post-tratamiento" debe entenderse en el contexto de la presente invención, cualquier procesamiento llevado a cabo en la biomasa con el objetivo de obtener células bacterianas almacenables. El objetivo del post-tratamiento es disminuir la actividad metabólica de las células en la biomasa, y por lo tanto, ralentizar la tasa de reacciones perjudiciales celulares. Como resultado del post-tratamiento, las células bacterianas pueden estar en forma sólida o líquida. En forma sólida, las células bacterianas almacenadas pueden ser un polvo o gránulos. En cualquier caso, tanto las formas sólidas como las líquidas que contienen las células bacterianas no están presentes en la naturaleza, por lo tanto, no son de origen natural, ya que son el resultado de procesos artificiales de post-tratamiento. Los procesos post-tratamiento pueden en modalidades particulares requerir el uso de uno o más de los denominados agentes de post-tratamiento. En el contexto de la presente invención, la expresión "agente de post-tratamiento" se refiere a un compuesto utilizado para llevar a cabo los procesos de post-tratamiento descritos aquí. Entre los agentes post-tratamiento deben incluirse, sin limitación, agentes deshidratantes, agentes bacteriostáticos, agentes crioprotectores (crioprotectores), rellenos inertes (también conocidos como lioprotectores), material de portador (también conocido como material de núcleo), etc., solo o en combinación.

20

Hay dos enfoques básicos para disminuir la actividad metabólica de las células bacterianas, y por lo tanto, dos enfoques para llevar a cabo el post-tratamiento. El primero es disminuir la velocidad de todas las reacciones químicas, lo que se puede hacer bajando la temperatura al refrigerar o congelar utilizando refrigeradores, congeladores mecánicos y congeladores de nitrógeno líquido. Alternativamente, se puede reducir la velocidad de todas las reacciones químicas mediante la adición de sustancias que inhiben el crecimiento de las células bacterianas, a saber, un agente bacteriostático, abreviado Bstatic.

25

El segundo enfoque para llevar a cabo el post-tratamiento es eliminar el agua de la biomasa, un proceso que puede involucrar la sublimación del agua usando un liofilizador. Las técnicas adecuadas para eliminar el agua de la biomasa son el secado, el secado por congelación, el secado por aerosol o el secado en lecho fluido. Los post-tratamientos que resultan en forma sólida pueden ser secado, congelación, secado por congelación, secado en lecho fluido o secado por aerosol.

35

El post-tratamiento es preferiblemente secado por congelación, que implica la eliminación de agua de suspensiones bacterianas congeladas por sublimación bajo presión reducida.

40

Este proceso consiste de tres pasos: pre-congelación del producto para formar una estructura congelada, secado primario para eliminar la mayor parte del agua y secado secundario para eliminar el agua unida. Debido a la variabilidad objetiva y esperada de los procesos industriales para la fabricación y el aislamiento de cultivos bacterianos liofilizados, estos últimos contienen comúnmente cierta cantidad de relleno inerte también conocida como lioprotector. Su función es estandarizar el contenido de bacterias probióticas vivas en el producto. Se usan los siguientes rellenos inertes en cultivos liofilizados disponibles comercialmente: sacarosa, sacarosa, lactosa, trehalosa, glucosa, maltosa, maltodextrina, almidón de maíz, inulina y otros rellenos no higroscópicos farmacéuticamente aceptables. Opcionalmente, otros agentes estabilizantes o protectores contra el congelamiento como el ácido ascórbico, también se usan para formar una pasta viscosa, que se somete a secado por congelación. En cualquier caso, el material así obtenido se puede triturar al tamaño apropiado, incluso a un polvo.

45

Está claro que al usar las cepas depositadas como material de partida, la persona con experiencia en la técnica puede rutinariamente, mediante mutagénesis convencional o técnicas de re-aislamiento, obtener otros mutantes de las mismas que retienen o mejoran las características y ventajas relevantes descritas aquí de las cepas que forman la composición de la invención. En una modalidad particular, los mutantes se obtienen usando tecnología de ADN recombinante. En otra modalidad, los mutantes se obtienen mediante mutagénesis aleatoria. Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere a un método para obtener un mutante de al menos una cepa de *Pediococcus*, en donde la cepa se selecciona del grupo que consiste de: cepa CECT 8903, cepa CECT 8904, cepa CECT 8905 y cepa CECT 8906, en donde el método comprende usar la cepa depositada como material de partida y aplicar mutagénesis, y en donde el mutante obtenido retiene o potencia al menos la

50

capacidad de la cepa depositada para antagonizar al menos un patógeno oral seleccionado del grupo que consiste en bacterias del género: *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Prevotella* y *Aggregatibacter*.

5 Aspectos adicionales de la invención son un producto farmacéutico, un producto veterinario, un alimento médico, un producto alimenticio, un complemento alimenticio y un producto para el cuidado bucal, que comprende una cantidad efectiva de al menos una de las cepas como se definió anteriormente, junto con cantidades apropiadas de excipientes aceptables.

10 La selección de los excipientes y los métodos más apropiados para la formulación en vista del propósito particular de la composición está dentro del alcance de las personas ordinarias con experiencia en la técnica de la tecnología farmacéutica. Las cepas de la invención se pueden formular en una forma en la que son el único agente activo o se mezclan con uno o más de otros agentes activos.

15 El término "excipiente" se entiende en su sentido amplio en esta descripción, que incluye cualquier sustancia natural o sintética formulada junto con el ingrediente activo de un producto farmacéutico, producto veterinario, un medicamento, suplemento alimenticio, alimento médico y producto de cuidado oral. Los excipientes se seleccionan, sin limitación, del grupo que comprende: rellenos/diluyentes/agentes de carga, aglutinantes, antiadherentes, disgregantes, recubrimientos, agentes anti-aglomerantes (por ejemplo, estearato de magnesio, dióxido de silicio coloidal o talco), antioxidantes, lubricantes, edulcorantes, sabores, colores, agentes tensoactivos y otras clases de excipientes aceptables farmacéuticamente y veterinariamente.

20 La cantidad efectiva de unidades formadoras de colonias (ufc) para las cepas en la composición será determinada por los expertos en la técnica y dependerá de la formulación final. Por ejemplo, cuando se administra por vía oral sin ningún otro agente activo, la cantidad total de las cepas de la invención está presente en la composición en dosis únicas en cantidad que proporciona una dosis diaria efectiva de 10^7 a 10^{12} cfu, de acuerdo con la legislación vigente, preferiblemente de 10^9 a 10^{11} cfu. El término "unidad formadora de colonias" ("ufc") se define como el número de células bacterianas según lo revelan los recuentos microbiológicos en placas de agar. Los suplementos alimenticios generalmente contienen cepas probióticas en una cantidad que varía entre 10^7 y 10^{12} ufc/g.

25 30 El término "producto farmacéutico" se entiende en su significado amplio en esta descripción, que incluye cualquier composición que comprende un ingrediente activo, en este caso, las cepas de la invención preferiblemente en forma de composición, junto con excipientes farmacéuticamente aceptables. Este término no está limitado a medicamentos. El término "farmacéuticamente aceptable" como se usa aquí se refiere a compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que, dentro del alcance de un juicio médico sólido, son adecuados para usar en contacto con los tejidos de un sujeto (por ejemplo, humano), sin toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, acorde con una relación beneficio/riesgo razonable. Cada portador, excipiente, etc., también debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación. Se pueden encontrar portadores, excipientes, etc., adecuados en textos farmacéuticos estándar.

35 45 50 El producto farmacéutico puede adoptar diferentes formas o nombres dependiendo de la ruta de aprobación del producto y también dependiendo del país. Por ejemplo, un medicamento es un producto farmacéutico particular. Un alimento médico es otro producto farmacéutico particular. Los términos "alimentos médicos" o "alimentos para propósitos médicos especiales" se utilizan en algunos países para referirse a un alimento especialmente formulado y destinado al manejo dietético de una enfermedad que tiene necesidades nutricionales distintivas que no pueden satisfacerse con una dieta normal solamente. Se definen en regulaciones tales como las Enmiendas de la Ley de fármacos huérfanos de la Administración de Alimentos y Medicamentos de 1988 en los Estados Unidos y la Directiva de la Comisión 1999/21/EC en Europa. Los alimentos médicos son distintos de la categoría más amplia de los complementos alimenticios y de los alimentos tradicionales que tienen un reclamo de salud. Por lo tanto, en una modalidad particular, las cepas de la invención se formulan como un alimento médico.

55 A menudo, las composiciones bacterianas probióticas tales como la descrita aquí, se consideran complementos alimenticios. Un complemento alimenticio, también conocido como complemento dietético o complemento nutricional, se considera otro producto farmacéutico particular. Se trata de una preparación o producto destinado a complementar la dieta, hecho a partir de compuestos utilizados generalmente en

alimentos, que proporcionan nutrientes o ingredientes beneficiosos que no suelen ingerirse en la dieta normal o que no se consumen en cantidades suficientes. En su mayoría, los complementos alimenticios se consideran productos alimenticios, pero a veces se definen como fármacos, productos naturales para la salud o productos nutracéuticos. En el sentido de la presente invención, los complementos alimenticios también incluyen 5 nutracéuticos. Los suplementos alimenticios generalmente se venden "sin receta", es decir, sin prescripción. Si el complemento alimenticio adopta la forma de una píldora, una cápsula, una tableta o un polvo, comprende excipientes que son los mismos que los utilizados en los medicamentos. Sin embargo un complemento alimenticio también puede adoptar la forma de un producto alimenticio que está fortificado con algunos 10 nutrientes (por ejemplo, una barra o yogur). Por lo tanto, en una modalidad particular, las cepas de la invención se formulan como un complemento alimenticio. El complemento alimenticio puede administrarse como tal, puede mezclarse con un líquido bebible adecuado, tal como agua, yogur, leche o jugo de frutas, o puede mezclarse con alimentos sólidos o líquidos. En este contexto, el complemento alimenticio puede estar en forma 15 de tabletas o pastillas, píldoras, cápsulas, gránulos, polvos, suspensiones, bolsitas, dulces, barras, jarabes y formas de administración correspondientes, generalmente en forma de una dosis unitaria.

Las cepas de la invención también pueden incluirse en una variedad de productos alimenticios, tales como 20 productos lácteos (un yogur, un queso, una leche fermentada, un polvo de leche, un producto fermentado a base de leche, un helado, un producto basado en cereal fermentado, un polvo a base de leche), pan, barras, untadas, galletas y cereales, una bebida, diferentes tipos de aceite o un aderezo. El término "producto alimenticio" se usa aquí en su sentido más amplio, que incluye cualquier tipo de producto, en cualquier forma 25 de presentación, que puede ser ingerido por un animal, pero excluyendo los productos farmacéuticos y veterinarios. Ejemplos de otros productos alimenticios son productos cárnicos, untadas de chocolate, rellenos y glaseados, chocolate, productos de repostería, productos horneados, salsas y sopas, zumos de frutas y blanqueadores de café. Los productos alimenticios particularmente interesantes son los complementos alimenticios y las fórmulas infantiles. El producto alimenticio preferiblemente comprende un material portador 30 tal como atole de harina de avena, alimentos fermentados con ácido láctico, almidón resistente, fibras dietéticas, carbohidratos, proteínas y proteínas glicosiladas. En una modalidad particular, las cepas de la invención están encapsuladas o recubiertas.

Las composiciones de la invención están destinadas para uso en aplicaciones de salud oral. Por consiguiente, 35 otro aspecto de la presente invención proporciona un producto para el cuidado oral que comprende la composición como se menciona anteriormente, junto con excipientes farmacéuticamente, o excipientes cosméticamente aceptables, u otros ingredientes comestibles. En este sentido, la composición es un producto oral que no se ingiere intencionadamente para la administración sistémica de agentes terapéuticos particulares, sino que se retiene en la cavidad oral durante un tiempo suficiente para contactar sustancialmente 40 con todas las superficies dentales y/o tejidos orales para fines de la actividad oral. Ejemplos no limitantes de tales productos son pastas dentales, dentífricos, polvos dentales, geles orales tópicos, enjuagues bucales, productos para dentaduras postizas, aerosoles bucales, gomas de mascar, hilo dental, cintas dentales, polvo detonante, pastas de pulido, barnices dentales, selladores de fisuras, materiales de relleno, crema o gel oral, caramelos, pastillas, tabletas o tiras dispersables, o polvo que se puede rociar directamente en la cavidad oral. Los productos para el cuidado bucal pueden comprender adicionalmente compuestos saborizantes tales como 45 mentol.

Las modalidades descritas anteriormente se aplican en el área de tratamiento, terapia y profilaxis también en medicina veterinaria, en particular, en perros, gatos, ganado, caballos, monos, ovejas, cabras. Los artículos particulares para animales son aquellos para masticar, morder y mordisquear, palos, refrigerios de animales, comida para mascotas, pellas o juguetes para mascotas.

Por lo tanto, debe entenderse que las cepas de la invención son útiles en el manejo de la disbiosis oral 50 independientemente de la forma de la composición; es decir, independientemente de ser un producto farmacéutico, un medicamento, un producto alimenticio, un complemento alimenticio, un alimento médico o un producto para el cuidado oral.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición sólida que comprende un crioprotector; 55 una biomasa secada por congelación que comprende al menos una bacteria de ácido láctico; y un portador farmacéuticamente aceptable. El portador farmacéuticamente aceptable preferiblemente se elige entre una emulsión, un gel, una pasta, gránulos, un polvo y una goma. Aspectos adicionales de la invención

proporcionan un producto para el cuidado oral, una composición farmacéutica y un producto comestible, un suplemento dietético y una composición cosmética que comprende una cantidad efectiva de la composición tal como se define en el aspecto anterior. En una modalidad particular, el producto para el cuidado oral es un chicle, una pasta dental, un aerosol para la boca, una pastilla o una tableta oral dispersable. En una modalidad particular, la composición farmacéutica, el producto comestible o el suplemento dietético, es una pastilla o una tableta dispersable por vía oral.

5 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones, la palabra "comprender" y sus variaciones no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Objetos, ventajas y características adicionales de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica tras el examen de la descripción o pueden aprenderse mediante la práctica de la invención. Además, la presente invención cubre todas las posibles combinaciones de modalidades particulares y preferidas descritas aquí. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan aquí con fines ilustrativos, y sin pretender ser limitativos de la presente invención.

10 15 Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Crecimiento (G) de cepas probióticas en saliva artificial suplementada con goma guar (GG) en comparación con saliva artificial no suplementada.

20 Figura 2: Crecimiento (G) de cepas probióticas en saliva artificial suplementada con hidroxietilcelulosa (HEC) en comparación con saliva artificial no suplementada.

25 Figura 3: Crecimiento (G) de cepas probióticas en saliva artificial suplementada con alginato de sodio (SA) en comparación con saliva artificial no suplementada.

Figura 4: Crecimiento (G) de cepas probióticas en saliva artificial suplementada con metilcelulosa (MC) en comparación con saliva artificial no suplementada.

30 Figura 5: Actividad inhibidora (In) de candidatos probióticos contra *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Figura 6: genotipificación de cepas por ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD).

Los patrones obtenidos después de la amplificación aleatoria para 1, PERI1; 2, PERI2; 3, PERI3; 4, PERI4.

35 EJEMPLOS

EJEMPLO 1

Aislamiento de los microorganismos

40 Las bacterias candidatas del ácido láctico se aislaron de las heces frescas y los hisopos orales de niños de 0 a 9 años. Las muestras se disolvieron en regulador de pH de PBS (pH 7.4), se alicuotaron y se plaquearon en MRS complementado con diversas combinaciones de antibióticos. Las cepas se cultivaron en condiciones microaerófilas (5% de CO₂) a 37 o 30°C. El tiempo de incubación dependió de la tasa de crecimiento, pero se desarrolló normalmente de 24 horas a 3 días. El aislamiento de las cepas individuales se realizó con el mismo medio de selección, y luego se realizó la tinción de Gram para obtener una primera identificación. Una vez crecidas, las cepas aisladas se almacenaron por secado por congelación en PBS 0.1x con 15% de leche desnatada en polvo.

50 EJEMPLO 2

Identificación de género y especie

55 La identificación a nivel de especie se realizó mediante la secuenciación del gen 16S ARNr. Brevemente, el ADN de las cepas se extrajo con resina Chelex® 100 de Bio-Rad Laboratories (Barcelona, España). La secuencia completa del gen del ARNr 16S se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando los cebadores universales para las eubacterias 27F y 1492R tal como se describió previamente

[Weisburg, W.G. et al. 1991; Muyzer, G. et al., 1998]. La integridad de los productos de PCR se verificó en un gel de agarosa usando colorante verde SYBR (Invitrogen, Life Technologies, Madrid, España). Los productos de PCR se secuenciaron usando iniciadores 27F, 357F, 907R y 1492 [Weisburg, W.G. et al. *supra*; Muyzer, G. et al., *supra*], un kit de secuenciación de ciclo v3.1 y un analizador genético 3130 XL (de Applied Biosystems, Life Technologies, Madrid, España). Las secuencias resultantes se alinearon y se compararon con las presentadas en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) y el RDP (Proyecto de Base de Datos Ribosómicos). Las cepas se identificaron en función de los puntajes de mayor impacto.

Las secuencias de ARNr 16S correspondieron al género *Pediococcus*. Cuando se comparó con las bases de datos NCBI y RDP, la secuencia de PERI1 correspondió a *P. pentosaceus* (100% de identidad); la secuencia de PERI2 correspondió a *P. acidilactici* (100%); la secuencia de PERI3 se correspondía con un 100% de identidad con *P. pentosaceus* o *P. acidilactici*; y la secuencia de PERI4 corresponde con un 99% de identidad con *P. pentosaceus* o *P. acidilactici*. Se depositaron en la Colección de Cultivos Tipo Español (CECT) con los números de acceso CECT 8903, CECT 8904, CECT 8905 y CECT 8906, respectivamente.

15 EJEMPLO 3

Genotipado de cepas

20 La genotipificación de la cepa se realizó mediante ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) para confirmar que las cuatro cepas de *Pediococcus* sp. depositadas eran diferentes entre ellas. RAPD se realizó como se describe por Nigatu et al. 1998. Los patrones de RAPD de las cepas se representan en la figura 6, demostrando que las cuatro cepas eran diferentes.

25 EJEMPLO 4

Supervivencia a las condiciones bucales

30 Se estudió la supervivencia de las cepas en la cavidad oral mediante la evaluación de su tolerancia a diferentes concentraciones de agentes conocidos por comprometer la supervivencia bacteriana, tal como el peróxido de hidrógeno (HP) y la lisozima. Se evaluó un número total de 50 candidatos de bacterias de ácido láctico y se compararon con cepas de probióticos comerciales, concretamente *Streptococcus salivarius* K12 (Blis Technologies, Nueva Zelanda) y *Lactobacillus reuteri* DSM17938 (Biogaia, Suecia) que se usaron como controles. Los probióticos candidatos y *L. reuteri* DSM17938 se cultivaron en medio de agar Man Rogosa Sharpe (MRSa) durante 18-24 horas a 37°C y condiciones microaerofílicas (5% de CO₂). *S. salivarius* K12 se cultivó en las mismas condiciones pero utilizando medio de infusión Brain Hearth (BHI) en lugar de MRS. Se usaron colonias aisladas para preparar una suspensión bacteriana en solución salina regulada de pH con fosfato 0.1 M (PBS) con una densidad óptica correspondiente a un estándar de McFarland de 0.5 (aproximadamente 1E+08 CFU/ml). Las suspensiones bacterianas se diluyeron posteriormente 2 veces en medios líquidos MRS o BHI. Se inocularon microplacas de 96 pozos con doscientos microlitros de la dilución resultante a la que se añadieron 50 µl de una solución que contenía lisozima o HP en PBS. Las concentraciones de lisozima probadas fueron 1x10⁶ y 5x10⁶ U/mL (concentración final en el pozo de 2x10⁵ y 1x10⁶ U/mL, respectivamente) y las concentraciones de HP fueron 5 mM y 25 mM (concentración final en el pozo de 1 mM y 5 mM, respectivamente). Las placas de micropozos se incubaron durante 6 h a 37°C en condiciones microaerófilas (5% de CO₂). El crecimiento bacteriano se controló determinando la absorbancia a 625 nm. El porcentaje de crecimiento se calculó comparando el incremento observado en la presencia de lisozima o HP en comparación con el crecimiento de la cepa bacteriana en ausencia de estos agentes (control positivo) usando la siguiente fórmula:

$$50 \quad \text{Crecimiento (\%)} = \frac{\text{OD}_{\text{LH}} - \text{OD}_{\text{C-}}}{\text{OD}_{\text{C+}} - \text{OD}_{\text{C-}}} * 100$$

donde OD_{LH} es la densidad óptica del pozo que contiene el microorganismo y la lisozima o HP,

55 OD_{C-} es la densidad óptica promedio de tres pozos con la misma cantidad de lisozima sin microorganismos,

OD_{C+} es la densidad óptica promedio de los tres pozos inoculados con bacterias pero no con lisozima ni HP (control positivo).

Resultados

5 Siete de los cincuenta candidatos probióticos no crecieron incluso en medios de MRS de control (no complementados). Por lo tanto, estas cepas se descartaron como candidatos potenciales. Los 43 restantes se clasificaron de acuerdo con su capacidad para crecer en presencia de la mayor concentración de lisozima y HP probado. Los resultados se muestran en el cuadro 1 y se expresan como medios de supervivencia en porcentaje en comparación con el crecimiento de la misma cepa en medios no complementados con lisozima ni HP.

10 CUADRO 1

Tolerancia de bacterias a las concentraciones de lisozima y peróxido de hidrógeno

		Lisozima (2E+5 U/mL)	Lisozima (1E+6 U/mL)	HP (1 mM)	HP (5 mM)
15	PERI3	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
	F2043	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
	F2002A	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
	PERI1	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
	I1003	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
	I3153	92.1	n.i.	n.i.	90.8
20	<i>L. reuteri</i> DSM17938	n.i.	n.i.	87.9	53.4
	I3145	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
	F3163	98.7	n.i.	n.i.	n.i.
	F1031	84.5	n.i.	91.7	92.3
	F2003A	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
	PERI4	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
	I3028	93.0	n.i.	86.0	86.0
	I1005	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
25	F2008A	99.8	n.i.	n.i.	n.i.
	F2006	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
	I3118	89.6	99.1	92.5	90.5
	F3166	n.i.	97.8	n.i.	n.i.
	PERI2	89.2	96.9	n.i.	92.4
	I3143	93.5	96.9	90.9	84.9
	I3030	91.3	92.0	92.0	92.8
30	I3061	92.8	91.6	93.4	90.0
	I3149	n.i.	90.6	n.i.	n.i.
	I3142	93.8	90.3	98.1	96.8

Abreviaturas: n.i. = sin inhibición (crecimiento 100%); HP = peróxido de hidrógeno.

5 Las 25 primeras bacterias que mostraron la mayor tolerancia a lisozima y HP se consideraron las mejores candidatas y se seleccionaron para una prueba *in vitro* posterior para evaluar sus propiedades probióticas. Como se puede observar, todas las cepas mostraron buena tolerancia a altas concentraciones de lisozima, mostrando una tasa de supervivencia no inferior al 86%, que fue similar a la de los controles comerciales. Los candidatos a LAB mostraron también una buena tolerancia a HP con valores superiores al 84% a una concentración de 5 mM de HP. Estos resultados se compararon bien con la relación de supervivencia de los 10 controles comerciales *L. reuteri* DSM17938 y *L. salivarius* K12 (53.4 y 80.5%, respectivamente).

EJEMPLO 5

Uso de goma guar como gelificante con efecto prebiótico

15 La capacidad de las cepas para usar goma guar e incrementar su crecimiento se estudió *in vitro*. Para este propósito, se comparó el crecimiento de candidatos probióticos en saliva artificial suplementada con goma guar con su crecimiento respectivo en saliva artificial que no se complementó. La saliva artificial contenía 1 g/L de polvo de Labémco (Oxoid, Basingstoke, RU), 2 g/l de extracto de levadura (Oxoid), 5 g/l de peptona de proteosa (Oxoid), 2.5 g/l de mucina gástrica de cerdo (Sigma Chemical Co., Poole, Reino Unido), 35 g/l de cloruro de sodio (BDH Chemicals Ltd, Poole, Reino Unido), 0.2 g/l de cloruro de calcio (BDH), 0.2 g/l de cloruro de potasio (BDH) en agua destilada. La saliva artificial se complementó con goma guar (Genox Pharma, Barcelona, España) hasta una concentración final de 0.5% (p/v). La saliva artificial sin ingrediente de gel también se preparó para comparar el efecto de la goma guar en el crecimiento bacteriano con un medio no suplementado. Después de la esterilización en autoclave, se agregaron 1.25 ml de urea al 40% por litro de medio salival artificial. Doscientos microlitros de los diferentes medios preparados se pipetaron en placas de 96 pozos. Inmediatamente después de 20 microlitros de una suspensión de candidatos probióticos estandarizados a 1E+07 CFU/mL en PBS se añadieron. Se usó la misma cantidad de PBS sin inóculo bacteriano como control negativo. Las placas se incubaron durante 24 h a 37°C en anaerobiosis y se controló el crecimiento bacteriano determinando la densidad óptica a 625 nm. La capacidad de los candidatos probióticos para usar goma guar para el crecimiento se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\Delta \text{Crecimiento} = (\text{ADO}_{gp} - \text{ADO}_{g0}) - (\text{ADO}_{sp} - \text{ADO}_{s0})$$

35 en donde ADO_{gp} es la diferencia entre la densidad óptica a 625 nm después de 24 h en comparación con 0 h en los pozos complementados con goma guar e inoculados con candidatos probióticos; ADO_{g0} es la diferencia entre la densidad óptica a 625 nm a las 24 h en comparación con 0 h en los pozos complementados con goma guar pero que contienen PBS en lugar de LAB; ADO_{sp} es la diferencia entre la densidad óptica a 625 nm a las 24 h en comparación con 0 h en los pozos no suplementados con goma guar e inoculados con candidatos probióticos; y ADO_{s0} es la diferencia entre la densidad óptica a 625 nm a las 24 h en comparación con 0 h en los pozos no suplementados con goma guar y que contienen PBS en lugar de LAB.

40 Los resultados se compararon con los obtenidos con los probióticos comerciales *L. reuteri* DSM 17938, *L. brevis* CD2, *Streptococcus salivarius* K12 y con los patógenos *Fusobacterium nucleatum* y *Porphyromonas gingivais*. El experimento se realizó por duplicado.

Resultados

50 La capacidad para usar goma guar como nutriente y potenciar su crecimiento en comparación con la saliva artificial no suplementada se representa en la figura 1. El efecto de la goma guar sobre el crecimiento de LAB fue altamente dependiente de la cepa probada. Mientras que la goma guar potenció el crecimiento de algunas cepas, tuvo un efecto perjudicial en el crecimiento de otros en comparación con la saliva no suplementada. Las cepas PERI1; PERI2; PERI3; PERI4; F3163; I1003; I1005; I3028; I3030; 13140; I3142A; 13145 e I3153 se beneficiaron de la adición de goma guar. PERI1 fue la cepa que mostró el más alto rendimiento. Entre las cepas de control probadas, *L. brevis* CD2 y *S. salivarius* K12 se beneficiaron de la adición de goma guar, aunque el efecto de la goma guar sobre el crecimiento de estas cepas fue menor que otros candidatos de LAB como

PERI1, PERI2, PERI3, F3163; I1003 y 3142A. Notablemente, el efecto de la goma guar fue insignificante en el caso de *Fusobacterium nucleatum* y *Porphyromonas gingivalis* que es de interés para evitar el crecimiento indeseable de patógenos.

5 EJEMPLO 6

Uso de hidroxietilcelulosa (HEC) como un agente adhesivo con efecto prebiótico

10 La capacidad de las cepas para usar HEC para potenciar su crecimiento se ensayó como se explicó anteriormente en el EJEMPLO 5 para la goma guar.

Resultados

15 El efecto de HEC sobre el crecimiento probiótico en comparación con la saliva no artificial se muestra en la figura 2. El crecimiento de pocas cepas se potenció mediante la adición de HEC. Las cepas, es decir, PERI4, I1005 e I3142A se beneficiaron significativamente con el uso de HEC en el gel. Otras cepas, incluidas las cepas comerciales, tenían poca capacidad para usar este ingrediente.

20 EJEMPLO 7

Uso de otros agentes gelificantes como ingrediente con efecto prebiótico

25 El uso potencial de otros agentes gelificantes para aumentar el crecimiento probiótico también se estudió utilizando la misma metodología explicada anteriormente. Particularmente, se usa alginato de sodio (SA) y metilcelulosa (MC) como potenciales agentes gelificantes con efecto prebiótico.

Resultados

30 El efecto de la suplementación de SA sobre el crecimiento bacteriano en comparación con la saliva artificial no suplementada se representa en la figura 3. Distintas cepas pudieron usar SA como nutriente para aumentar su crecimiento incluyendo PERI; PERI2; PERI3; PERI4; I1003; I1005; I3028; I3030; I3130; I3142A; I3145 e I3153. Por el contrario, *Fusobacterium nucleatum* y *Porphyromonas gingivalis* tiene baja capacidad para usar SA para crecer. Los resultados para MC están presentes en la figura 4. Ninguna de las cepas de control y patógenos pudo usar MC para aumentar el crecimiento. Por el contrario, diferentes cepas de probióticos se benefician de la suplementación de CM, que incluyen F2008A; PERI2; F2043; PERI4; I1003; I1005; I3028; I3061; I3118; I3140 e I3142A.

EJEMPLO 8

40 Antagonismo contra *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* y *Prevotella intermedia*

45 La actividad antagonista de los candidatos probióticos se evaluó frente a bacterias anormalmente abundantes en pacientes que presentaban periimplantitis. En particular, las cepas de patógenos son *Porphyromonas gingivalis* DSM-20709, *Fusobacterium nucleatum* DSM 20482 y *Prevotella intermedia* DSM-20706 DSM 8324. *L. reuteri* DSM 17938 de Biogaia (Suecia), *L. brevis* CD2 (Inersan®, VSL Pharmaceuticals, Inc., E.U.A) y *Streptococcus salivarius* K12 (BLIS Technologies, Nueva Zelanda) se usaron como controles comerciales. La capacidad de los candidatos de LAB para inhibir el crecimiento de patógenos se determinó mediante el uso del protocolo de Campbell. Brevemente, los candidatos probióticos y los controles de *Lactobacillus* se sembraron uniformemente en placas de agar MRS y se dejaron crecer hasta confluencia durante 24 horas a 37°C y 5% de CO₂. *Streptococcus salivarius* K12 se cultivó en las mismas condiciones pero utilizando medio BHI.

50 Las cepas de patógenos se cultivaron durante la noche. Se usaron colonias aisladas de estos patógenos para preparar suspensiones en medio salino regulado de pH con fosfato (PBS) y se frotaron uniformemente en un medio sólido apropiado para su crecimiento: *F. nucleatum* y *P. intermedia* se sembraron en agar sangre y *Porphyromonas gingivalis* en Schaefer Anaerobe Sheep Blood Agar. Inmediatamente, se colocaron carril a carril secciones cilíndricas de 6 mm de diámetro de la placa de agar confluente de los candidatos de LAB analizados en la placa sembrada de patógenos, enfrentando la placa sembrada de patógenos con el lado de

5 agar crecido de una de las secciones de cilindro y con el lado no crecido de la otra sección del cilindro. Las placas se incubaron durante 48 ha 37°C en condiciones anaeróbicas. Luego, las zonas de inhibición se midieron colocando la placa de agar sobre una regla plana y midiendo los halos donde se inhibía el crecimiento del patógeno (parcialmente o completamente). La actividad inhibidora del crecimiento (GI) se calculó restando el diámetro del cilindro (CD) del diámetro de la zona de inhibición (IZD) medido en milímetros. La actividad inhibidora final se calculó como un valor medio de los valores de GI para las dos secciones de cilindros mencionadas anteriormente para cada cepa probiótica, es decir, promediando los duplicados. Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

10

Resultados

15

La actividad antagonista de los diferentes probióticos candidatos se detalla en el cuadro 2. Las cepas PERI3, PERI4 y F3166 fueron las tres cepas que mostraron la mayor actividad contra *F. nucleatum*, y mostraron una actividad mayor que *L. brevis* CD2, *L. reuteri* DSM 17938 y *S. salivarius* K12. Los candidatos F1031 y PERI2 fueron los candidatos que mostraron la mayor actividad contra *P. intermedia*. Varias cepas también fueron eficaces inhibiendo *P. gingivalis*. Entre ellos, PERI1, F2006, PERI2, F3163, I1003, I3143, I3145 e I3153 mostraron una actividad mayor que los controles comerciales utilizados con fines comparativos.

20

CUADRO 2

Actividad inhibidora contra *F. nucleatum*, *P. Intermedia* y *P. gingivalis* (resultados expresados como medias ± SD en mm)

	Cepa	<i>Fusobacterium nucleatum</i>		<i>Prevotella intermedia</i>		<i>Porphyromonas gingivalis</i>	
10	F1031	n.i		4.5	± 0.7	3.5	± 0.7
	PERI1	1.5	± 0.7	2.0	± 1.4	15.0	± 1.4
	F2002A	3.0	± 0.0	1.0	± 0.0	n.i	
15	F2003A	1.5	± 0.7	n.i		n.i	
	F2006	2.0	± 1.4	n.i		17.5	± 0.7
	F2008A	3.5	± 0.7	1.0	± 0.0	11.5	± 0.7
20	PERI2	2.0	± 0.0	5.0	± 0.0	13.5	± 0.7
	F2043	3.5	± 0.7	n.i		n.i	
	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
25	I3145	3.0	± 0.0	n.i		13.5	± 0.7
	I3149	2.0	± 0.0	n.i		n.i	
	I3153	2.5	± 0.7	1.0	± 0.0	14.0	± 0.0
30	<i>L. brevis</i> CD2	3.0	± 0.0	2.5	± 0.7	12.0	± 0.0
	<i>L. reuteri</i> DSM17938	n.i		1.0	± 0.0	9.0	± 0.0
	<i>S. salivarius</i> K12	n.i		6.0	± 2.8	10.0	± 1.4
35	I3030	2.5	± 0.7	n.i		n.i	
	I3061	n.i		n.i		8.0	± 0.0
	I3118	2.0	± 0.0	n.i		n.i	
	I3140	1.5	± 0.7	n.i		9.0	± 1.4
	I3142	1.5	± 0.7	1.0	± 0.0	8.0	± 1.4
	I3142A	n.i		0.5	± 0.7	n.i	
	I3143	2.5	± 0.7	n.i		13.0	± 1.4

EJEMPLO 9

Antagonismo contra *Appreatibacter actinomycetemcomitans*

5 La actividad de los candidatos probióticos para antagonizar *Appreatibacter actinomycetemcomitans* se estudió en medio líquido. Los candidatos probióticos y *Lactobacillus sp.*, los controles se cultivaron durante la noche a 37°C en condiciones microaerófilas (5% de CO₂) en medio líquido MRS. *Staphylococcus salivarius* K12 se cultivó en las mismas condiciones pero utilizando medio BHI. Los cultivos se centrifugaron y el sobrenadante se filtró a través de 0.22 micrómetros. Se añadieron veinte microlitros de los sobrenadantes filtrados a microplacas de 96 pozos que contienen 160 µl de medio BHI. Finalmente, se añadieron 20 µl de una suspensión de *A. actinomycetemcomitans* en PBS estandarizada a 1E+05 CFU/ml a los pozos y se incubaron durante 24 h en condiciones microaerófilas (5% de CO₂) a 37°C. *A. actinomycetemcomitans* se controló determinando la absorbancia a 625 nm. La capacidad inhibidora de los sobrenadantes probióticos se determinó comparando el crecimiento de *A. actinomycetemcomitans* suplementado con sobrenadante probiótico y su crecimiento sin ser complementado (control negativo) usando la siguiente fórmula:

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{(\text{DO}_c - \text{DO}_B) - (\text{DO}_c - \text{DO}_p)}{(\text{DO}_c - \text{DO}_B)} \times 100$$

20 en donde:

25 DO_c correspondió al control negativo y fue la densidad óptica a 625 nm de pozos que contienen 160 µl de medio BHI + 20 µl de suspensión de *A. actinomycetemcomitans* + 20 µl de MRS o BHI,

DO_B correspondió al blanco y fue la densidad óptica a 625 nm de pozos que contienen 160 µl de medio BHI + 40 µl de MRS o BHI, y

30 DO_p correspondió a candidatos probióticos y era la densidad óptica a 625 nm de pozos que contienen 160 µl de BHI medio + 20 µl de suspensión de *A. actinomycetemcomitans* + 20 µl de sobrenadante probiótico.

Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

Resultados

35 La actividad inhibidora de los candidatos probióticos contra *A. actinomycetemcomitans* se representa en la figura 5. Entre las diferentes cepas, PERI3 mostró la mayor actividad, pudiendo reducir en un 77.9% el crecimiento de *A. actinomycetemcomitans*. Esta actividad fue significativamente más alta que los controles comerciales tales como *L. brevis* CD2, *L. reuteri* DSM17938 y especialmente *S. salivarius* K12 (45.6, 38.8 y 2.42%, respectivamente).

EJEMPLO 10

Capacidad para formar agregados

45 La capacidad de las bacterias para autoagregarse se considera el primer paso necesario para formar una biopelícula y se puede utilizar como una característica para evaluar la capacidad potencial de formación de biopelícula de las cepas. La formación de biopelículas permite crear una barrera protectora que puede reducir la unión del patógeno a las superficies orales. La capacidad de formar agregados se evaluó para los candidatos probióticos PERI, PERI2, PERI3, PERI4, I3142A, I1005, I3030 e I3145. Se usaron *L. brevis* CD2 y *S. salivarius* K12 como controles. Las cepas se cultivaron durante la noche en medio MRS (o BHI para *S. salivarius* K12) a 37°C y condiciones microaerófilas (5% de CO₂). Despues de este período, los cultivos se centrifugaron a 1000 g durante 5 minutos, el sobrenadante se descartó y la pella se lavó dos veces con PBS. Finalmente, se añadió PBS hasta obtener una suspensión probiótica que tenía una densidad óptica equivalente a un estándar 1 de McFarland (aproximadamente 3E+08 CFU/ml). Se transfirieron tres ml de la suspensión a cubetas espectrofotométricas y se controló la densidad óptica a 620 nm durante 3 y 6 horas. La capacidad de autoagregación en estos intervalos de tiempo se determinó usando la siguiente fórmula:

$$\text{Agregación (\%)} = \frac{DO_0 - DO_t}{DO_0} \times 100$$

5 en donde DO_0 es la absorbancia neta a 620 nm de la suspensión bacteriana al comienzo de la prueba (tiempo 0), y
 DO_t es la absorbancia neta a 620 nm de la suspensión bacteriana a las 3 o 6 horas.

10 **Resultados**
El porcentaje de agregación a las 3 y 6 h se resume en el cuadro 3. El candidato probiótico PERI4 fue la cepa que mostró la mayor capacidad de autoagregación, mientras que el candidato I3030 y *S. salivarius* K12 mostraron la actividad más baja.

15 **CUADRO 3**

Porcentaje de agregación de candidatos probióticos

	Cepas	3h	6h
20	I1005	11.2	13.3
	I3030	6.9	6.9
25	I3142A	5.7	24.5
	I3145	5.2	21.1
	PERI1	8.3	17.2
30	PERI2	6.7	19.7
	PERI3	4.3	14.7
	PERI4	3.9	27.8
35	<i>L. brevis</i> CD2	11.1	26.9
	<i>S. salivarius</i> K12	0.0	7.9

40 **EJEMPLO 11**

Preparación de un gel probiótico reconstituible en forma de polvo para aplicación de implante

45 500 g de un polvo secado por congelación que contiene *Pediococcus* CECT 8904, *Pediococcus* CECT 8905 y *Pediococcus* CECT 8906 a 4E+10 cfu/g, 200 g de goma guar y 300 g de hidroxietilcelulosa se mezclaron y homogeneizaron. Se introdujeron 0.5 g de esta mezcla en polvo en un vial de vidrio provisto de un tapón de rosca. Tras la adición de 2.5 ml de agua, preferiblemente agua desionizada o destilada, y agitación manual, se formó el gel reconstituido. La dosis final de probiótico fue 1E+10 cfus/vial. Despues de la reconstitución del gel, la concentración de goma guar en el gel fue del 4% e hidroxietilcelulosa del 6%.

50 **EJEMPLO 12**

Preparación de un gel probiótico reconstituible en forma de polvo para aplicación de implante

55 535 g de un polvo secado por congelación que contiene *Pediococcus* CECT 8904 y *Pediococcus* CECT 8905 a 3.75E+10 ufc/g, 150 g de alginato de sodio, 15 g de acetato de calcio y 300 g de hidroxietilcelulosa se mezclaron y homogeneizaron. Se introdujeron 0.5 g de esta mezcla en polvo en un vial de vidrio provisto de un

5 septo y cápsula de aluminio. Tras la adición de 2.5 ml de agua con una jeringa, preferiblemente agua desionizada o destilada, y agitación manual, se formó el gel reconstituido. La dosis final de probiótico fue 1E+10 UFC/vial. Después de la reconstitución del gel, la concentración de alginato en el gel fue del 3% y la hidroxietilcelulosa del 6%.

5 EJEMPLO 13

Preparación de un gel probiótico reconstituible en forma de polvo para aplicación de implante

10 700 g de un polvo secado por congelación que contiene *Pediococcus* CECT 8904, *Pediococcus* CECT 8905 y *Pediococcus* CECT 8906 a 2.9E + 10 ufc/g, 200 g de goma guar y 100 g de polivinilpirrolidona se mezclaron y se homogeneizaron. Se introdujeron 0.5 g de esta mezcla en polvo en un vial de vidrio provisto de un septo y cápsula de aluminio. Tras la adición de 2.5 ml de agua con una jeringa, preferiblemente agua desionizada o destilada, y agitación manual, se formó el gel reconstituido. La dosis final de probiótico fue 1E + 10 cfu/vial. Después de la reconstitución del gel, la concentración de goma guar en el gel fue del 4% y la polivinilpirrolidona del 2%.

15 EJEMPLO 14

Preparación de un gel probiótico reconstituible en forma de polvo para aplicación de implante

20 500 g de un polvo secado por congelación que contiene *Pediococcus* CECT 8904, *Pediococcus* CECT 8905 y *Pediococcus* CECT 8906 a 4E+10 ufc/g, y 500 g de goma guar fueron mezclados y homogeneizado. Se introdujeron 0.5 g de esta mezcla en polvo en un vial de vidrio provisto de un tapón de rosca. Después de la adición de 6 ml de agua, preferiblemente agua desionizada o destilada, y agitación manual, se formó el gel reconstituido. La dosis final de probiótico fue 1E+10 cfus/vial. Después de la reconstitución del gel, la concentración de goma guar en el gel fue del 4%.

25 EJEMPLO 15

30 Preparación de un gel probiótico reconstituible en forma de polvo para la aplicación de los dientes

35 600 g de un polvo secado por congelación que contiene *Pediococcus* CECT 8903 a 3.35E+10 ufc/g, 100 g de goma guar y 300 g de hidroxietilcelulosa se mezclaron y homogeneizaron. Se introdujeron 0.5 g de esta mezcla en polvo en un vial de vidrio provisto de un tapón de rosca. Tras la adición de 2.5 ml de agua, preferiblemente agua desionizada o destilada, y agitación manual, se formó el gel reconstituido. La dosis final de probiótico fue 1E+10 cfu/vial. Después de la reconstitución del gel, la concentración de goma guar en el gel fue del 2% y la hidroxietilcelulosa del 6%.

40 EJEMPLO 16

40 Preparación de un gel probiótico reconstituible en forma de polvo para aplicación de dientes

45 590 g de un polvo secado por congelación que contiene *Pediococcus* CECT 8903 a 3.4E+10 ufc/g, 100 g de alginato de sodio, 10 g de acetato de calcio y 300 g de hidroxietilcelulosa se mezclaron y homogeneizaron. Se introdujeron 0.5 g de esta mezcla en polvo en un vial de vidrio provisto de un tapón de rosca. Tras la adición de 2.5 ml de agua, preferiblemente agua desionizada o destilada, y agitación manual, se formó el gel reconstituido. La dosis final de probiótico fue 1E+10 cfu/vial. Después de la reconstitución del gel, la concentración de alginato en el gel fue del 2% y la hidroxietilcelulosa del 6%.

50 EJEMPLO 17

Preparación de un gel probiótico reconstituible en forma de polvo para la aplicación de los dientes

55 280 g de un polvo secado por congelación que contiene *Pediococcus* CECT 8906 a 7E+10 ufc/g, y 720 g de hidroxietilcelulosa se mezclaron y homogeneizaron. Se introdujeron 0.5 g de esta mezcla en polvo en un vial de vidrio provisto de un tapón de rosca. Después de la adición de 6 ml de agua, preferiblemente agua

desionizada o destilada, y agitación manual, se formó el gel reconstituido. La dosis final de probiótico fue 1E + 10 cfus/vial. Después de la reconstitución del gel, la concentración de hidroxietilcelulosa en gel fue del 6%.

5 EJEMPLO 18

Preparación de un gel probiótico reconstituible en forma de polvo para aplicación de dientes

600 g de un polvo secado por congelación que contiene *Lactobacillus brevis* CD2 a 4E+10 ufc/g, 100 g de goma guar y 300 g de hidroxietilcelulosa se mezclaron y homogeneizaron. Se introdujeron 0.5 g de esta mezcla en polvo en un vial de vidrio provisto de un tapón de rosca. Tras la adición de 2.5 ml de agua, preferiblemente agua desionizada o destilada, y agitación manual, se formó el gel reconstituido. La dosis final de probiótico fue 1E+10 cfu/vial. Después de la reconstitución del gel, la concentración de goma guar en el gel fue del 2% y la hidroxietilcelulosa del 6%.

15 EJEMPLO 19

Preparación de un gel probiótico reconstituible en forma de polvo para la aplicación de los dientes

590 g de un polvo secado por congelación que contiene *Lactobacillus brevis* CD2 a 4E+10 ufc/g, 100 g de alginato de sodio, 10 g de acetato de calcio y 300 g de hidroxietilcelulosa se mezclaron y homogeneizaron. Se introdujeron 0.5 g de esta mezcla en polvo en un vial de vidrio provisto de un tapón de rosca. Tras la adición de 2.5 ml de agua, preferiblemente agua desionizada o destilada, y agitación manual, se formó el gel reconstituido. La dosis final de probiótico fue 1E+10 cfu/vial. Después de la reconstitución del gel, la concentración de alginato en el gel fue del 2% y la hidroxietilcelulosa del 6%.

25 EJEMPLO 20

Preparación de un gel probiótico reconstituible en forma de polvo para la aplicación de los dientes

700 g de un polvo secado por congelación que contiene *Streptococcus salivarius* K12 a 2.9E + 10 ufc/g, 200 g de goma guar y 100 g de polivinilpirrolidona se mezclaron y homogeneizaron. Se introdujeron 0.5 g de esta mezcla en polvo en un vial de vidrio provisto de un septo y cápsula de aluminio. Tras la adición de 2.5 ml de agua con una jeringa, preferiblemente agua desionizada o destilada, y agitación manual, se formó el gel reconstituido. La dosis final de probiótico fue 1E+10 cfu/vial. Después de la reconstitución del gel, la concentración de goma guar en el gel fue del 4% y la polivinilpirrolidona del 2%.

35 EJEMPLO 21

Aplicación del gel probiótico reconstituible en un paciente con periimplantitis

40 Se retiró la corona y se administró anestesia local al paciente. La zona se limpió y la placa subgingival se eliminó mecánicamente. Se administró clorhexidina al 0.12% y después de eso, solución salina. El gel reconstituido del EJEMPLO 11 se obtuvo añadiendo 2.5 ml de agua estéril al polvo secado por congelación que contiene *Pediococcus* CECT 8904, *Pediococcus* CECT 8905 y *Pediococcus* CECT 8906 a 4E + 10 ufc/g, 200 g de goma guar y 300 g de hidroxietilcelulosa y mezclando vigorosamente durante 1 minuto. La mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante un período de 1 a 10 minutos y se administró al bolsillo del implante peri con una jeringa y una aguja con punta roma, colocando la punta de la aguja roma cerca de la base del bolsillo e inyectando el producto hasta que la solución alcance al borde superior de la encía. Luego, después de extraer la aguja del bolsillo, se aplicaron soluciones de solución salina y un chorro de aire (durante aproximadamente 10 segundos) en la zona tratada. Inmediatamente después, la corona se colocó en su lugar. El paciente recibió instrucciones de no cepillarse los dientes dentro de las 6 horas posteriores al tratamiento.

55 EJEMPLO 22

Aplicación del gel probiótico reconstituible en un paciente para la prevención de caries

5 Los dientes se limpian con un cepillo de dientes y se limpian de una placa o escombros pesados. Los dientes a tratar se secaron ligeramente con aire y se aislaron con rollos de algodón para evitar la recontaminación con saliva. Se dispensó una pequeña cantidad de gel (0.5 ml) después del EJEMPLO 15 por medio de un cepillo sobre los dientes. El paciente recibió instrucciones de evitar el cepillado durante el resto del día.

EJEMPLO 23

10 Aplicación del gel probiótico reconstituible en un paciente para la prevención de caries

15 Los dientes se limpian con un cepillo de dientes y se limpian de una placa o escombros pesados. Una composición de autoformación de película que comprende 50 mg de cepa probiótica, 120 mg de goma guar y 360 mg de hidroxietilcelulosa se reconstituyó con 6 ml de agua y se aspiró inmediatamente con una jeringa. El gel se dejó reposar durante 1 minuto en la jeringa y luego se distribuyó uniformemente en una férula bucal. Posteriormente, la férula se aplicó inmediatamente en la boca y se retiró después de 5 minutos. Al paciente se le proporcionaron más viales que contienen la composición de autoformación de película y se le indicó que siguiera el mismo procedimiento para autoadministrarse el gel reconstituido cada 48 horas, preferiblemente por la noche después de cepillarse los dientes, justo antes de irse a dormir. Los pacientes recibieron instrucciones de no cepillar los dientes, comer o beber después de aplicar el gel.

20 EJEMPLO 24

25 Estudio de eficacia del gel probiótico reconstituible en modelo animal

30 La eficacia del gel probiótico en la prevención de la mucositis y la periimplantitis se estudió en el perro Beagle como modelo animal. Todos los procedimientos se llevaron a cabo bajo la supervisión de un veterinario. Los animales fueron preanestesiados con acepromazina (0.12% -0.25 mg/kg), buprenorfina (0.01 mg/kg) y medetomidina (35 lg/kg) por inyección intramuscular en el cuádriceps femoral. Se insertó un catéter intravenoso (diámetro 22 o calibre 20) en la vena cefálica, y se infundió propofol a una velocidad de 0.4 mg/kg/min a una velocidad de infusión constante lenta. Se administró anestesia de infiltración dental convencional (articaína 40 mg, 1% epinefrina) en los sitios quirúrgicos. Ambos cuadrantes de las mandíbulas inferiores, segundos premolares (PM2) y primeros molares (M1) se utilizaron como sitios experimentales. Los dientes se cortaron con una broca de carburo de tungsteno y las raíces se quitaron con pinzas, sin dañar las paredes óseas restantes. Las incisiones marginales se realizaron a lo largo de las áreas vestibular y lingual contiguas a los alvéolos, separando los tejidos para hacer visibles las paredes del tejido duro de la cresta. 35 Después de dos meses de curación en el sitio, 8 implantes fueron colocados en posición crestal y se les permitió sanar por otros dos meses más con copas de curación. Después de los dos meses de curación, se colocaron ligaduras de seda alrededor de cada pilar. Los geles orales también se administraron alrededor de los implantes. Cinco perros se trataron con un gel líquido reconstituido que contiene 4% de goma guar, 6% de hidroxietilcelulosa y 4 UFC por ml de una mezcla probiótica compuesta por *Pediococcus* CECT 8904, *Pediococcus* CECT 8905 y *Pediococcus* CECT 8906 (1:1:1). Uno de los animales se trató con el mismo gel, pero no con probiótico. A continuación, se alimentó a los animales con una dieta blanda para inducir la acumulación de placa y provocar inflamación periimplantaria y pérdida de hueso. Se colocaron ligaduras adicionales sobre las anteriores y alrededor de los implantes cada dos semanas.

40 45 La cicatrización transcurrió sin incidentes después de todas las cirugías, sin exposición o cicatrización secundaria de la herida. La periimplantitis experimental dio como resultado signos de inflamación y pérdida ósea. Generalmente, los animales tratados con gel probiótico mostraron una pérdida tisular menos pronunciada, respuesta inflamatoria, profundidad de sondeo, recesión de la mucosa y hemorragia al sondaje, 50 en comparación con el animal tratado con gel que no contiene probiótico. Por lo tanto, el tratamiento probiótico mejoró los signos clínicos asociados con la periimplantitis.

EJEMPLO 25

55 Estudio de las propiedades reológicas del gelificante y agentes bioadhesivos

Se estudió la viscosidad y la adhesividad de diferentes agentes. Se estudiaron las siguientes composiciones:

5 - alginato de sodio en concentraciones que varían de 2 a 8% en agua (p/v), con o sin acetato de calcio en concentraciones (0.02-0.2%).

10 - Goma guar a concentraciones que varían de 1 al 5% en agua (p/v).

15 - Metilcelulosa en concentraciones que varían de 1 a 5% en agua (p/v).

20 - Hidroxietilcelulosa en concentraciones que varían de 1 a 6% en agua (p/v).

25 - Carboximetilcelulosa de sodio en concentraciones que varían de 1 a 3% en agua (p/v).

CUADRO 4

10 Viscosidad y capacidad de adhesividad:

Agente	Viscosidad	Adhesividad	Observaciones
Alginato de sodio	Alta	Muy baja	Formación de grumo a altas concentraciones
Goma guar	Muy alta	Muy baja	Buena solubilidad
Metilcelulosa	Baja	Muy baja	Formación de espuma bajo agitación
Hidroxietilcelulosa	Muy baja	Muy alta	Buena solubilidad
Carboximetilcelulosa	Muy baja	Baja	Buena solubilidad

30 La viscosidad y la adhesividad conferidas a las composiciones de formación de película dependían del agente utilizado, ofreciendo diferentes posibilidades dependiendo de la aplicación clínica del gel. Las combinaciones con alginato de sodio y, especialmente, goma de guar con hidroxietilcelulosa se consideraron buenas candidatas para formar geles que combinan propiedades tales como alta viscosidad y adhesividad.

35 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Literatura de patente

40 JP20100053062- Sunstar Inc. 11 de marzo 2010.

Literatura no de patente

45 Albertini, M. *et al.* "Assessment of periodontal and opportunistic flora in patients with peri-implantitis". Clinical Oral Implants Research 2014, vol. 00 p. 1-4

Da Silva, E.S.C. *et al.* "Microbial diversity of peri-implantitis biofilm by Sanger Sequencing". Clin Oral Implants Research 2013, vol. 0, p. 1-8

50 Persson, G.R. *et al.* "Cluster of Bacteria Associated with Peri-implantitis". Clinical Implant Dentistry and related research 2013, vol. 0, p. 1-11

55 Ata-Ali, J. *et al.* "Peri-implantitis: Associated microbiota and treatment". Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 201 1, vol. 16, p. 937-43

Flotra, L. *et al.* "Side effects of chlorhexidine mouth washes". Scand J Dent Res 1971, vol. 73, p. 119-125

- Slots, J. et al. "Antibiotics in periodontal therapy: advantages and disadvantages". *J Clin Periodontol* 1990, vol. 17, p. 479-493
- 5 Szkaradkiewicz, A.K. et al. "Effect of Oral Administration Involving a Probiotic Strain of *Lactobacillus reuteri* on Pro-Inflammatory Cytokine Response in Patients with Chronic Periodontitis". *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2014, vol. 62, p. 495-500
- 10 Teughels, W. et al. "Clinical and microbiological effects of *Lactobacillus reuteri* probiotics in the treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled study" *J of clinical periodontology* 2013, vol. 40 p. 1025-35
- Hallstroem, H. et al. "Effect of probiotic lozenges on inflammatory reactions and oral biofilm during experimental gingivitis". *Acta Odontologica Scandinavica* 2013, vol. 71, p. 828-833
- 15 Flichy-Fernandez, A.J. et al. "The effect of orally administered probiotic *Lactobacillus reuteri*-containing tablets in peri-implant mucositis: a double-blind randomized controlled trial". *J Periodont Res* 2015, Epub ahead of print
- 20 Toivainen, A. et al., "Impact of orally administered lozenges with *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 on the number of salivary mutans streptococci, amount of plaque, gingival inflammation and the oral microbiome in healthy adults". *Clin Oral Investig* 2015, vol. 19, p. 77-83
- Maekawa, T. et al. "Topical treatment with probiotic *Lactobacillus brevis* CD2" inhibits experimental periodontal inflammation and bone loss" *J Periodont Res* 214, vol. 44, p. 785-791
- 25 Yanine, N. et al. "Effects of probiotics in periodontal diseases: a systematic review". *Clinical oral investigations* 2013, vol. 17, p. 1627-34
- 30 Andreoletti, O. et al. "The maintenance of the list of QPS microorganisms intentionally added to food or feed. Question no: EFSA-Q-2008-006". *The EFSA Journal* 2008, vol. 923, p. 1-48
- Weisburg, W.G. et al. "16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study". *J Bacteriology* 1991, vol. 173, p. 697-703
- 35 Muyzer, G. et al., "Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology". *Antonie van Leeuwenhoeck* 1998, vol. 73, p. 127-141
- Nigatu, A. et al., "Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) for discrimination of *Pediococcus pentosaceus* and *Pediococcus acidilactici* and rapid grouping of *Pediococcus* isolates" *Letters in Applied Microbiology* 1998, vol. 26, p. 412-6.
- 40

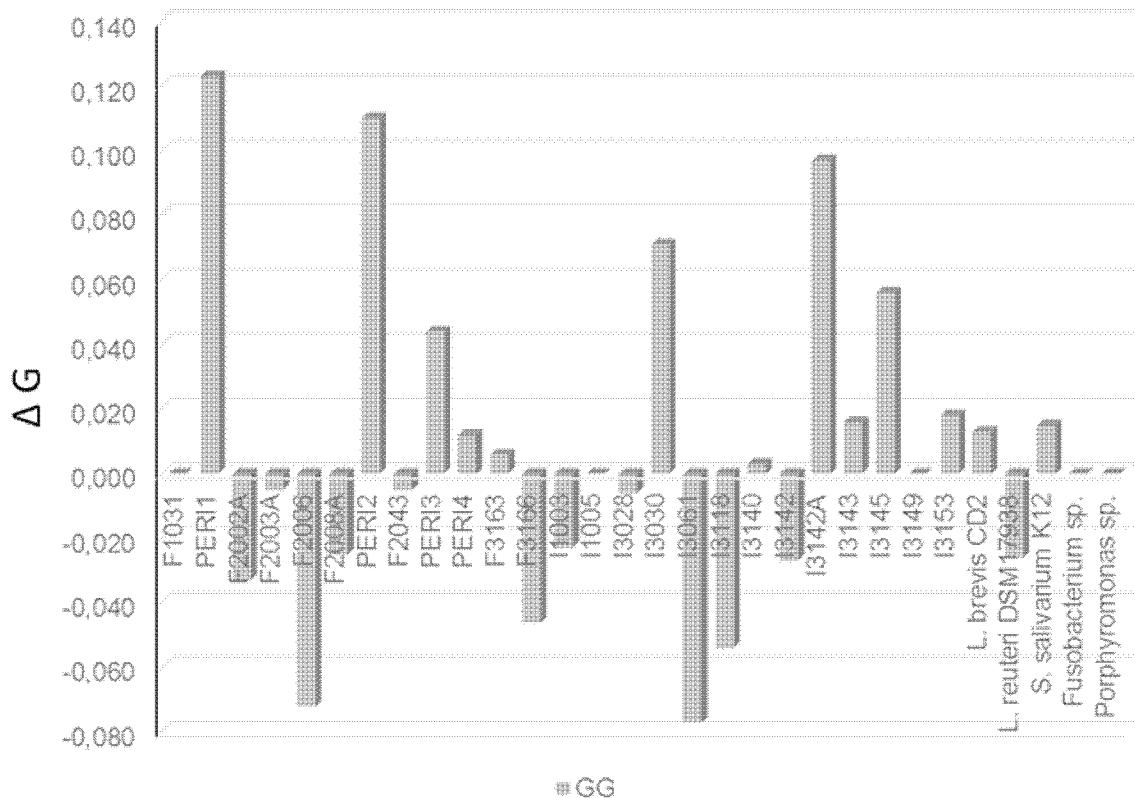
REIVINDICACIONES

1. Una composición de autoformación de película en forma de polvo, autoformación de película bajo agitación en presencia de un medio líquido, la composición que comprende:
- 5 (i) al menos un agente en forma de polvo seleccionado del grupo que consiste en un agente gelificante y un agente bioadhesivo, y
(ii) al menos una cepa de *Pediococcus* en forma de polvo,
en donde (i) y (ii) están en un contenedor individual o en contenedores separados.
- 10 2. La composición de autoformación de película en forma de polvo de conformidad con la reivindicación 1, que autoforma una película bajo agitación en presencia de un medio líquido, en donde la composición es una composición que comprende:
- (i) al menos un agente gelificante en forma de polvo,
(ii) al menos un agente bioadhesivo en forma de polvo, y
15 (iii) al menos una cepa de bacterias de ácido láctico en forma de polvo,
en donde (i), (ii) y (iii) están en un contenedor individual o en contenedores separados;
en donde la composición de autoformación de película se administra por vía tópica;
en donde el (i) al menos un agente gelificante está en una cantidad para proporcionar viscosidad a la composición, y se selecciona del grupo que consiste de: (a) un almidón, (b) una goma, (c) un polisacárido de algas, (d) un polisacárido seleccionado del grupo que consiste en pectina y maltodextrina, (e) un derivado de celulosa, (f) un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de gelatina, colágeno y caseína, y;
20 en donde el (ii) al menos un agente bioadhesivo está en una cantidad para proporcionar adhesividad a la composición, y se selecciona del grupo que consiste de: (a) una goma, (b) un polisacárido de algas, (c) un derivado de celulosa, (d) un polisacárido seleccionado del grupo que consiste de pectina y maltodextrina, y (e) un polímero seleccionado del grupo que consiste en un polímero basado en acrilato, un polímero basado en vinilo y un polisacárido catiónico, y;
25 caracterizada porque la cepa de bacterias del ácido láctico pertenece al género *Pediococcus*.
- 30 3. La composición de autoformación de película en forma de polvo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, caracterizada porque el agente gelificante y el agente bioadhesivo no tienen efecto bactericida contra la al menos una bacteria de ácido láctico.
- 35 4. La composición de autoformación de película en forma de polvo de conformidad con la reivindicación 3, caracterizada porque el agente gelificante y el agente bioadhesivo no tienen efecto bacteriostático contra la al menos una bacteria de ácido láctico.
5. La composición de autoformación de película en forma de polvo de conformidad con la reivindicación 4, caracterizada porque el agente gelificante o el agente bioadhesivo tienen un efecto prebiótico sobre al menos una bacteria de ácido láctico.
- 40 6. La composición de autoformación de película de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, caracterizada porque el agente gelificante se selecciona del grupo que consiste de una goma y un polisacárido de algas y el agente bioadhesivo se selecciona del grupo que consiste de un derivado de celulosa y un polímero basado en vinilo.
- 45 7. La composición de autoformación de película de conformidad con la reivindicación 6, caracterizada porque la cepa de *Pediococcus* se selecciona del grupo que consiste de: cepa depositada con el número de acceso CECT 8903, cepa CECT 8904, cepa CECT 8905, cepa CECT 8906.
- 50 8. Un proceso para preparar una fórmula reconstituida que comprende mezclar bajo agitación una composición de autoformación de película en forma de polvo según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 con un medio líquido.
- 55 9. Una fórmula reconstituida obtenible mediante el proceso como se define en la reivindicación 8.

10. Una composición de autoformación de película en forma de polvo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o una fórmula reconstituida como se define en la reivindicación 9, para uso como medicamento.
- 5 11. Una composición de autoformación de película en forma de polvo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o una fórmula reconstituida como se define en la reivindicación 9, para el cuidado oral.
12. Un kit para uso oral, que comprende:
- 10 1) una composición de autoformación de película en forma de polvo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o una fórmula reconstituida como se define en la reivindicación 9; y
- 2) significa aplicar a la cavidad bucal la composición de autoformación de película en forma de polvo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-7, o la fórmula reconstituida como se define en la reivindicación 9.
- 15 13. Una cepa aislada perteneciente al género *Pediococcus* para uso en la prevención y/o tratamiento de una condición seleccionada del grupo que consiste de periimplantitis y mucositis.
- 20 14. Una cepa aislada perteneciente al género *Pediococcus* depositada en la Colección de Cultivos Tipo Español seleccionada del grupo que consiste de: cepa depositada con el número de acceso CECT 8903, cepa CECT 8904, cepa CECT 8905, y cepa CECT 8906.

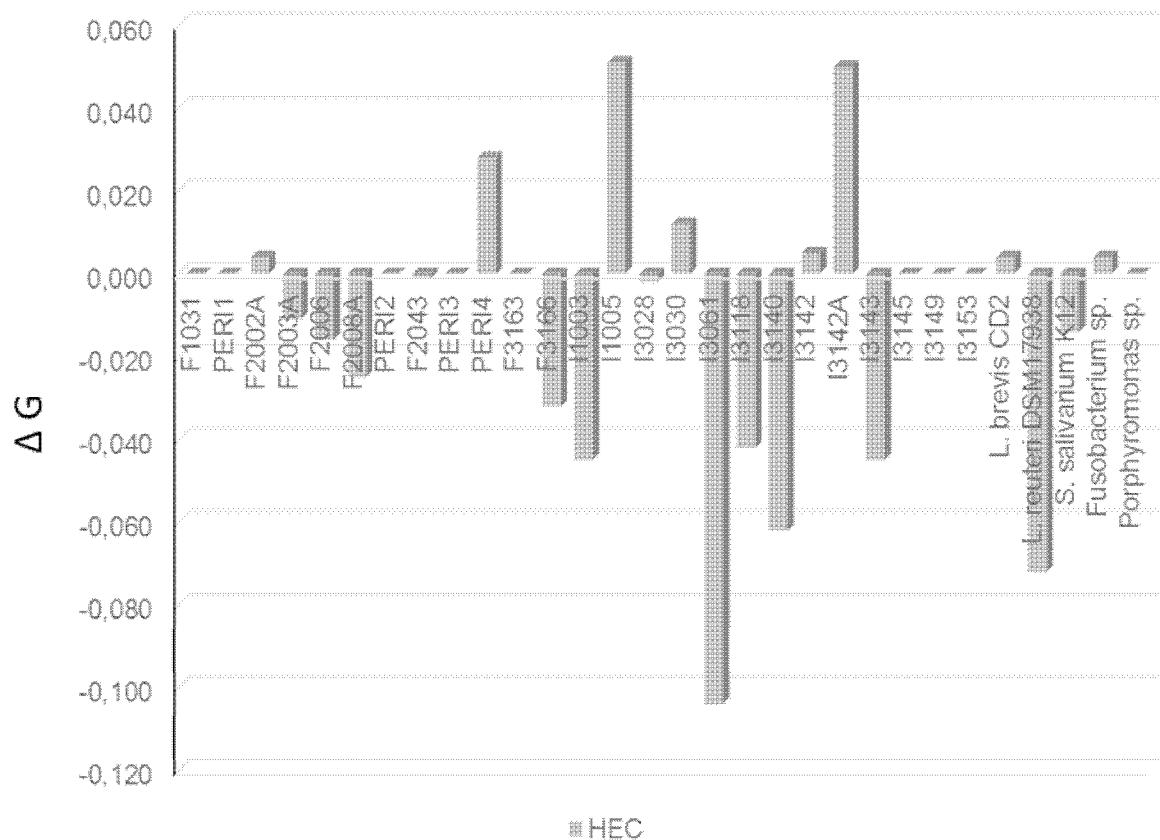
ES 2 994 765 T3

FIG. 1



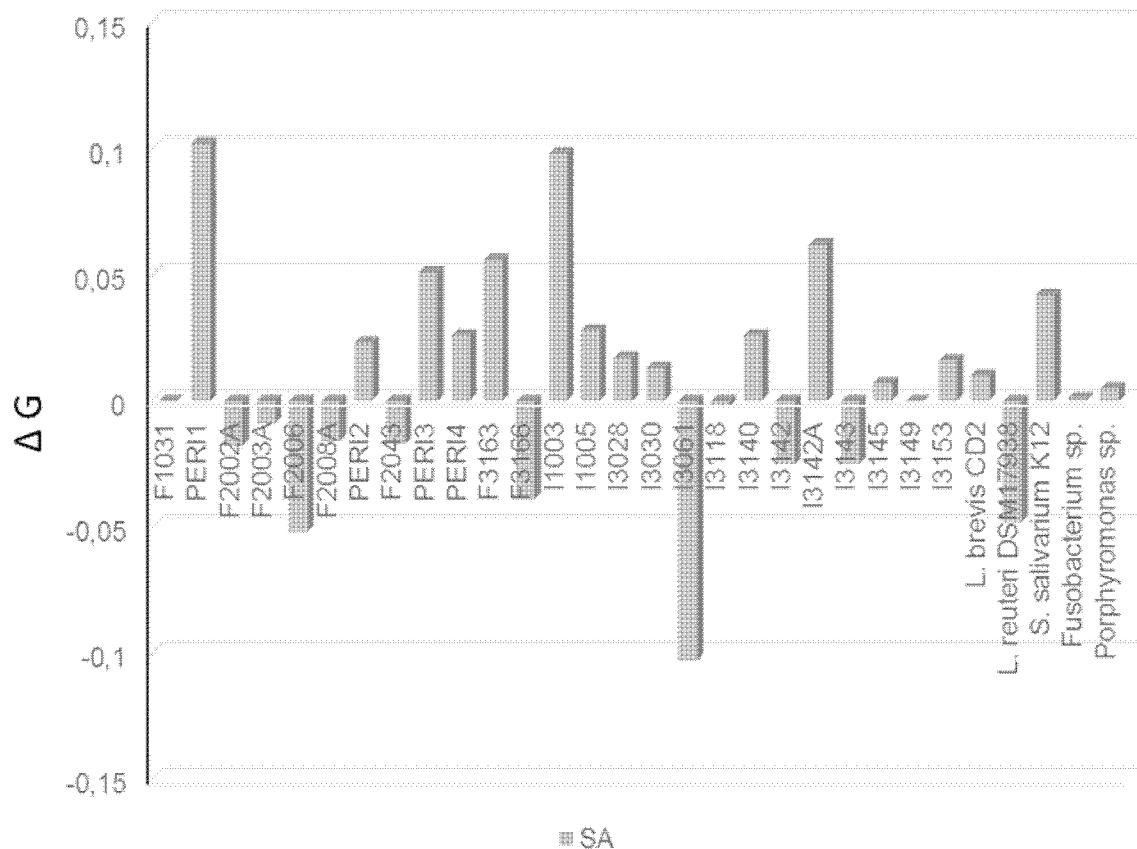
ES 2 994 765 T3

FIG. 2



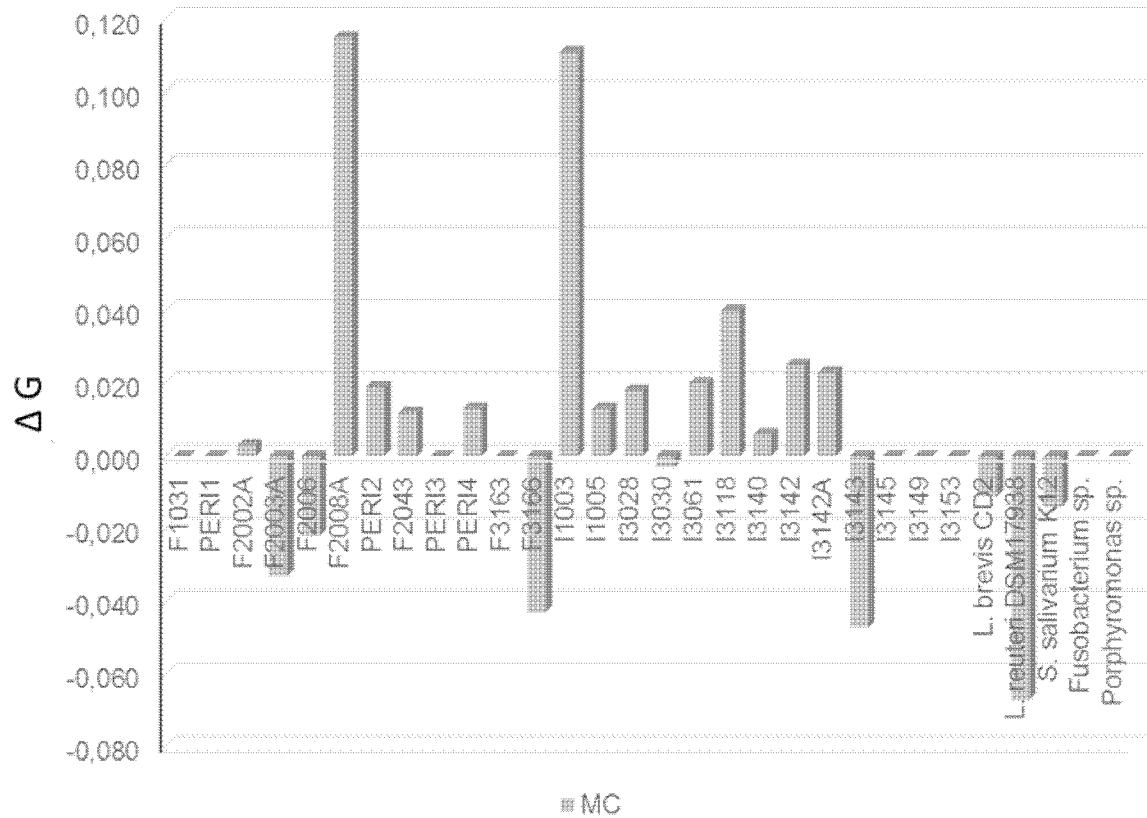
ES 2 994 765 T3

FIG. 3



ES 2 994 765 T3

FIG. 4



ES 2 994 765 T3

FIG. 5

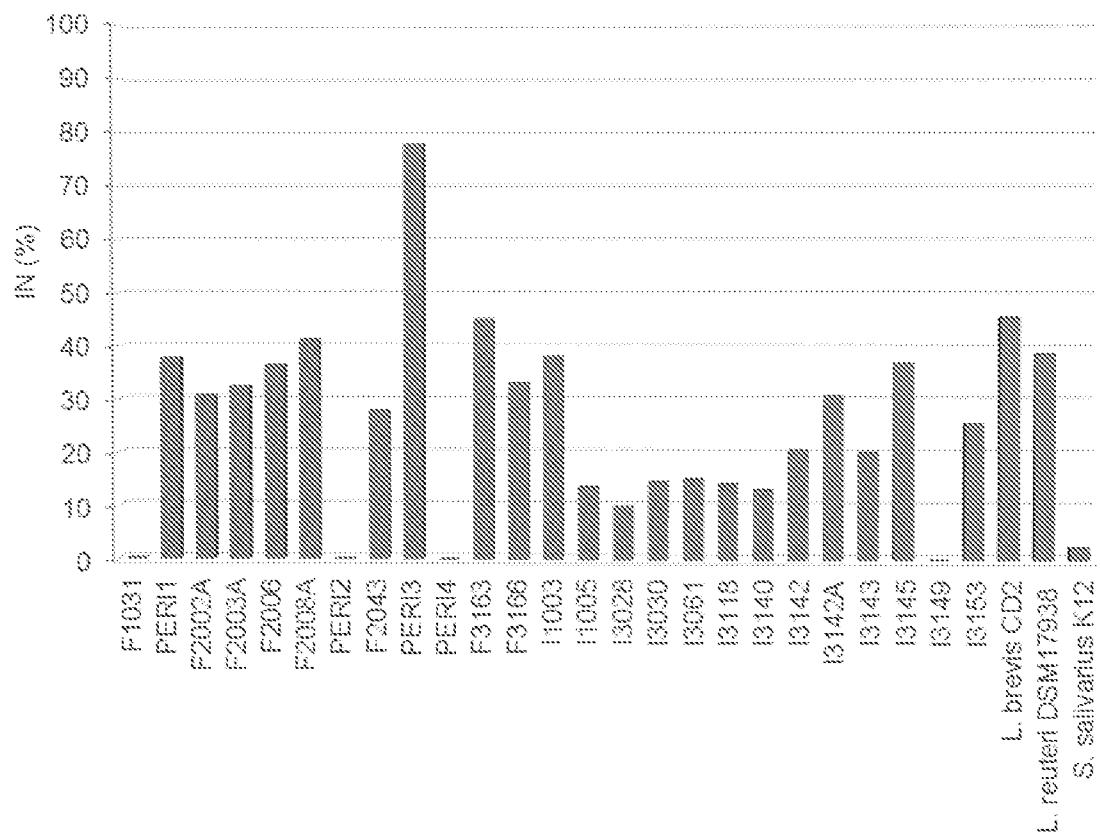


FIG. 6

