



INPI
Assinado
Digitalmente

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO EXTERIOR E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº PI 0719279-7

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: PI 0719279-7

(22) Data do Depósito: 18/12/2007

(43) Data da Publicação do Pedido: 26/06/2008

(51) Classificação Internacional: C12N 1/20; A23G 3/36; A23G 4/12; A23L 33/135; A61K 8/99; A61K 35/747; A61Q 11/00; C12R 1/225.

(52) Classificação CPC: C12N 1/20; A23G 3/366; A23G 4/123; A23L 33/135; A61K 8/99; A61K 35/747; A61Q 11/00; C12R 1/225.

(30) Prioridade Unionista: EP 06026301.9 de 19/12/2006.

(54) Título: USO DE UM MICROORGANISMO PERTENCENDO AO GRUPO DE BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁTICO OU A UM MUTANTE OU DERIVADO DO MESMO

(73) Titular: BASF SE, Companhia Alemã. Endereço: 67056 Ludwigshafen, ALEMANHA(DE)

(72) Inventor: ANDREAS REINDL; CHRISTINE LANG; MEWES BÖTTNER; MARKUS VEEN.

Prazo de Validade: 10 (dez) anos contados a partir de 04/12/2018, observadas as condições legais

Expedida em: 04/12/2018

Assinado digitalmente por:
Liane Elizabeth Caldeira Lage
Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

“USO DE UM MICROORGANISMO PERTENCENDO AO GRUPO DE BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁTICO OU A UM MUTANTE OU DERIVADO DO MESMO”

A presente invenção refere-se ao uso de um microorganismo
5 pertencendo ao grupo de bactérias do ácido lático ou a um mutante ou derivado do mesmo, caracterizado pelo fato de que é capaz de se ligar especificamente em uma bactéria pertencendo ao grupo de *Streptococcus* mutantes, sendo que a ligação específica é (i) resistente ao tratamento térmico; e/ou (ii) resistente ao tratamento com protease; e/ou (iii) dependente
10 de cálcio; e/ou (iv) formada dentro de uma faixa de pH entre 4,5 e 8,5; e/ou (v) formada na presença de saliva, para a preparação de uma composição anticariogênica para o tratamento ou a prevenção de cáries causadas por *Streptococcus* mutantes diferentes de *Streptococcus mutans*. Preferivelmente, a ligação específica pode ser ensaiada como segue:

- 15 (a) crescer dito microorganismo até fase estacionária;
- (b) misturar dito microorganismo com uma bactéria pertencendo ao grupo de *Streptococcus* mutantes que tem sido crescido até fase estacionária;
- (c) incubar a mistura obtida em etapa (b) sob condições
20 permissoras da formação de agregados de dito microorganismo e uma bactéria do grupo de *Streptococcus* mutantes; e
- (d) detectar agregados pela ocorrência de uma pelota.

Outro aspecto da presente invenção é um método de profilaxia ou tratamento de cáries causadas por *Streptococcus* mutantes diferentes de
25 *Streptococcus mutans*, compreendendo administrar um microorganismo pertencendo ao grupo de bactérias do ácido lático caracterizado pelo fato de que dito microorganismo é capaz de se ligar especificamente em uma bactéria pertencendo ao grupo de *Streptococcus* mutantes ou um mutante, derivado,

análogo ou fragmento de dito microorganismo.

Estreptococos mutantes colonizam o hospedeiro após a primeira erupção de dentes (Carlson et al., Caries Res. 9 (1975), 333-339).
 Estão localizados sobre as superfícies dos dentes, e sua abundância na placa é
 5 mais alta sobre lesões iniciais (Duchin e van Houte Arch. Biol. Biol. 23 (1978) 779-786). Seu nível de colonização dentro da placa é aumentado pelo consumo de sacarose (Staat et al., J. Dent. Res. 54 (1975) 872-880). São capazes de sintetizar certas macromoléculas a partir de sacarose que reforçam sua fixação nos dentes (Tanzer et al., Infect. Immun. 10 (1974) 197-203).
 10 Estreptococos mutantes são produtores rápidos de ácido a partir de carboidratos simples, incluindo sacarose, e são tolerantes ao pH baixo (Edwardsson, Arch. Biol. 13 (1968) 637-646). Ademais, são essencialmente sempre recuperados sob cultivo de sítios de lesão cariados iniciais ou estabelecidos (Littleton et al., Arch. Oral. Biol. 15 (1979) 461-463). Interesse
 15 neles cresceu após a demonstração de suas indução e progressão potentes de lesões cariadas em uma variedade de animais experimentais, incluindo gnotobiotos monoinfectados. Sua expressão de virulência está fortemente associada com consumo de carboidratos, especialmente de sacarose.

O papel de outras espécies bacterianas que estão conectadas ao
 20 desenvolvimento de cárie como as bactérias do ácido láctico ou actinomicetos não é conclusivo. Estas bactérias são muitas vezes encontradas em lesões cariadas, mas apenas em associação com Estreptococos mutantes. De acordo com o conhecimento presente a presença de Estreptococos mutantes é uma condição indispensável de cariogênese (Tanzer et al., J. Dent. Educ. 65 (2001)
 25 1028-1037). O grupo de Estreptococos mutantes tem sido definido como compreendendo pelo menos *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. cricetus*, *S. rattii*, *S. ferus* e *S. macacae* (Loesche et al., Microbio. Rev. 50 (4) (1986) 353-380). Devido ao fato de que *Streptococcus mutans* é o representante mais abundante de Estreptococos mutantes em humanos, a maioria da pesquisa de cárie

microbiológica bem como medidas anti-cárie concentram-se sobre esta espécie específica.

A ligação inicial de *S. mutans* na superfície dos dentes ocorre via dois mecanismos. O primeiro mecanismo é ligação de *S. mutans* via o antígeno estreptocócico I/II (SA I/II) - uma proteína de superfície também conhecida pelos sinônimos B, IF, P1, SR, MSL-1 ou PAc - na película, uma camada de proteínas de saliva sobre a superfície dos dentes. Tem sido mostrado que anticorpos contra esta proteína previnem a adesão de *S. mutans* in vitro.

Consequentemente, o antígeno estreptocócico I/II (SA I/II) é um alvo para vacinação. Em combinações recombinantes diferentes - o antígeno completo, a região de ligação de saliva, a proteína copulada na toxina do cólera ou expressado sobre a superfície de uma cepa de *Salmonella avirulenta* - uma imunização bem sucedida de animais tem sido mostrada. Isto resultou em títulos altos de IgA e uma redução de colonização de *S. mutans* (Huang et al., Infect. Immun. 69 (2001), 2154-2161). Resultados comparativos têm sido obtidos usando uma vacina de DNA codificador de SA I/II (Fan et al., J. Dent. Res. 81 (2002), 784 - 787). Imunidade passiva tem sido alcançada pela expressão recombinante de anticorpos anti-SA I/II sobre a superfície de bactérias do ácido láctico. Estes lactobacilos agregam *S. mutans* e administração das bactérias a ratos acarretou uma redução de desenvolvimento de cárie (Krueger et al., Nature Biotechnology 20 (2002), 702 - 706).

WO 06/027265 proporciona bactérias do ácido láctico capazes de ligação em *S. mutans* com o objetivo de suprimir a adesão nos dentes.

O parceiro de ligação mais importante do antígeno estreptocócico é a aglutinina de saliva, uma proteína similar à glicoproteína de pulmão gp-340 da superfamília rica em cisteína de receptor removedor (Prakobphol et al., J. Biol. Chem. 275 (2000) 39860-39866).

O papel de aglutinina em cariogênese não está inteiramente entendido até agora. Pode levar à adesão de *S. mutans* quando presente ligado em superfícies, e pode levar a uma agregação de *S. mutans* quando presente em um estado solúvel. O último poderia resultar em uma remoção de *S. mutans* agregado da boca pelo fluxo de saliva. Uma concentração alta de aglutinina em saliva leva in vitro a um aumento na adesão de *S. mutans*, enquanto que in vivo não há correlação clara entre a concentração de aglutinina em saliva e o risco de cárie (Stenudd et al., J. Dent. Res. 80 (2001), 2005-2010). Anticorpos monoclonais contra aglutinina bloqueiam completamente a ligação de *S. mutans* em hidróxi-apatita revestida de saliva in vitro e previnem a agregação dependente de aglutinina (Carlen e Olsson. J. Dent. Res. 74 (1995), 1040-1047; Carlen et al., J. Dent. Res. 77 (1998), 81-90). Brady et al., Infect. Immun. 60 (1992), 1008-1017 mostraram que a adesão em superfície e a agregação podem ser independentemente inibidas por anticorpos diferentes. Isto indica que epítomos de aglutinina diferentes são responsáveis por estes dois efeitos.

Outras proteínas de saliva frequentemente conectadas com o desenvolvimento de cárie são proteínas ricas em prolina (PRPs). Contudo, o papel destas proteínas na adesão de bactérias cariogênicas é controversamente discutido. Estas proteínas são codificadas por dois locais de gene (PRH-1 e PRH-2) e ocorrem em variantes diferentes que diferem em apenas uns poucos aminoácidos (PRP-1, PRP-2, PIF. *Db-double band* [banda dupla]). Estas variantes podem ser clivadas proteoliticamente, resultando nas denominadas PRPs pequenas (PRP-3, PRP-4. PIF-f e Db-f). PRPs medeiam uma ligação forte de comensais como *Actinomyces naeslundii* ou *Streptococos* não-mutantes. De modo interessante, esta ligação ocorre apenas após adesão da proteína na superfície do dente, resultando em um deslocamento conformacional tornando os sítios de ligação acessíveis. *S. mutans* é apenas fracamente ligado. A PRP-variante Db é de relevância para a ligação eficaz de

S. mutans. Uma concentração alta de Db correlaciona-se com uma adesão alta de S. mutans e um desenvolvimento forte de caria. Uma parte reduzida de PRP-Db de uma concentração total alta de PRP correlaciona-se com um desenvolvimento baixo de cárie (Stenudd et al., J. Dent. Res. 80 (2001), 2005-
5 2010). É desconhecido, se S. mutans liga-se diretamente em PRPs.

O segundo modo de S. mutans aderir na superfície do dente é via uma adesão dependente de sacarose. S. mutans expressa três diferentes glicosiltransferases (GTFs) que são capazes de sintetizar o polímero de açúcar glicano. Glicanos existem em uma forma solúvel em água (ligação 1-6
10 glicosídica) e uma forma não-solúvel chamada de mutana (ligação 1-3 glicosídico). Mutana não pode ser degradada quer por bactérias orais quer por enzimas em saliva. Forma uma matriz adesiva dentro da placa dental que é a base da adesão dependente de sacarose de S. mutans. As glicosiltransferases GTFB e GTFC, as enzimas prevaletentes responsáveis para formação de
15 mutana, estão localizadas sobre a superfície celular de S. mutans. Em contraste, a glicosiltransferase GTFD sintetiza o glicano solúvel e é secretada por S. mutans. Experimentos usando mutantes de S. mutans deficientes em GTF mostram que uma interação de todas as três enzimas é necessária para uma adesão dependente de sacarose (Ooshima et al., J. Dent. Res. 80 (2001),
20 1672-1677). Glicosiltransferases têm um sítio de ligação de glicose N-terminal e um sítio de ligação de glicano C-terminal. Anticorpos contra a enzima ou contra o sítio de ligação de glicano acarreta uma inibição da adesão de S. mutans dependente de sacarose. Não tem sido possível bloquear o sítio de ligação de sacarose N-terminal usando anticorpos (Yu et al., Infect.
25 Immun. 65 (1997), 2292-2298).

Uma inibição de glicosiltransferases seguida por uma adesão reduzida de S. mutans também pode ser alcançada por alguns flavonóides ou terpenóides (US 2004/0057908) ou extratos de própolis (Duarte et al., Biol. Pharmacol. Bull. 26 (2003), 527 - 531).

Têm sido encontradas bactérias do ácido láctico chamadas de S11, que reduzem a formação de mutana e, portanto, a adesão de *S. mutans* in vitro. Como descrito acima, formação de mutana é essencial para *S. mutans* aderir na superfície do dente. Consequentemente, Chung et al. (Oral Microbiol. Immunol. 19 (2004), 214 - 216) têm encontrado células separadas de *S. mutans* quando têm sido incubadas com as bactérias do ácido láctico de cepa S11 que, como citado, reduzem a formação de mutana. A ligação de *S. mutans* em mutana ocorre via proteínas de ligação bacterianas (proteína de ligação de glicano). O mecanismo exato desta ligação tem que ser determinado (Sato et al., Infect. Immun. 65 (1997), 668-675).

Os fungos *Trichoderma harzianum* e *Penicillium purpurogenum* produzem alfa-1,3-glicanases homólogas (Fuglsang et al., J. Biol. Chem. 275 (2000), 2009-2018). O uso de espécies *Enterococcus*, *Lactobacillus* e *Lactococcus* efetivas contra produção de glicano e formação de placa é descrito(US 6.036.952). O mecanismo de ação tem que ser elucidado.

Uma outra abordagem para inibir cárie é neutralizar o pH baixo na placa. Uréia e arginina são componentes de saliva. Uréia está presente em concentrações de 3 - 10 mmol/L sem diferenças maiores entre pessoas livres de cárie e afetadas por cárie. A concentração de arginina livre difere entre 4 e 40 μ mol/L. Indivíduos livres de cárie têm uma média mais alta de concentrações de arginina livre em saliva do que pessoas afetadas por cárie (van Wuyckhuysse et al., J. Dent. Res. 74 (1995), 686-690). Algumas bactérias de placa como *Streptococcus sanguis* e *Actinomyces naeslundii* são capazes de clivar uréia ou arginina resultando na formação de amônia. O amônio alcalino aumenta o pH da placa e portanto reduz a cárie (Curran et al., Appl. Environm. Microbiol. 61 (1995), 4494-4496; Morou-Bermudez e Burne, Infect. Immun. 68 (2000), 6670-6676). Consequentemente, é sugerido que estas bactérias sejam usadas para tratar cárie. Outra abordagem sugerida

para tratar cárie é que por proteólise de PRP-1 e PRP-3 peptídeos ricos em arginina sejam criados, que podem, após proteólise adicional por bactérias da saliva como *S. sanguis*, *S. oralis* e *S. mitis*, levar a um pH mais alto na placa. Pela aplicação de uma variante recombinante destes peptídeos, é inibido o

5 decréscimo do pH dependente de sacarose (Li et al., Infect. Immun. 68 (2000), 5425-5429). Além disso, é descrito que pelo uso de uma goma de mascar contendo uréia após a ingestão de sacarose a queda de pH pode ser inibida e, Consequentemente, por exemplo, *S. mutans* pode não contribuir tanto para cárie.

10 Contudo, como é evidente do discutido acima, a técnica anterior concentra-se em medidas anti-cárie direcionadas contra *Streptococcus mutans*. Não há medidas descritas que permitiriam selecionar *Streptococcus* mutantes diferentes de *Streptococcus mutans* apesar de seu possível papel em cariogênese. Como consequência, há uma necessidade de

15 meios e métodos que atendam os critérios desejáveis anteriormente mencionados e que sejam úteis para prevenir e/ou tratar cárie causada por bactérias diferentes de *Streptococcus mutans*. O problema técnico subjacente à presente invenção é portanto satisfazer às necessidades descrita acima. A solução para dito problema técnico é alcançada pelo fornecimento de

20 modalidades como caracterizadas nas reivindicações.

Consequentemente, em um primeiro aspecto a presente invenção refere-se ao uso de um microorganismo pertencendo ao grupo de bactérias do ácido lático ou a um mutante ou derivado do mesmo, caracterizado pelo fato de que é capaz de se ligar especificamente em uma

25 bactéria pertencendo ao grupo de *Streptococcus* mutantes, sendo que a ligação específica é (i) resistente ao tratamento térmico; e/ou (ii) resistente ao tratamento com protease; e/ou (iii) dependente de cálcio; e/ou (iv) formada dentro de uma faixa de pH entre 4,5 e 8,5; e/ou (v) formada na presença de saliva, para a preparação de uma composição anticariogênica para o

tratamento ou a prevenção de cáries causadas por *Streptococos* mutantes diferentes de *Streptococcus mutans*. Preferivelmente, a ligação específica pode ser ensaiada como segue:

(a) crescer dito microorganismo até fase estacionária;

5 (b) misturar dito microorganismo com uma bactéria pertencendo ao grupo de *Streptococos* mutantes que tem sido crescido até fase estacionária;

(c) incubar a mistura obtida em etapa (b) sob condições permissoras da formação de agregados de dito microorganismo e uma bactéria
10 do grupo de *Streptococos* mutantes; e

(d) detectar agregados pela ocorrência de uma pelota.

Em uma modalidade preferida a bactéria pertencendo ao grupo de *Streptococos* mutantes usada em um tal ensaio é *Streptococcus mutans*.

A ligação específica é preferivelmente ensaiada como descrito
15 em Exemplo 4 aqui abaixo. Em particular, para um ensaio de agregação por pelotização de *Streptococos* mutantes como descrito em Exemplo 4, infra, microorganismos pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico são preferivelmente misturados com *Streptococos* mutantes em razões volumétricas de 3:1 a 60:1 (*Streptococos* mutantes: lactobacilos). Ambos, as
20 bactérias do ácido láctico e *Streptococos* mutantes são crescidos até fase estacionária como descrito em Exemplo 1. Preferivelmente, a densidade óptica é medida fotometricamente em um comprimento de onda de 600 nm. As razões mencionadas correspondem a uma razão de unidades de formação de colônia de 1:50 a 1:2.5. Preferivelmente, uma $OD_{600}=1$ em 1 mL correlaciona-se com 3×10^8 unidades de formação de colônia de um
25 *Streptococos* mutante. Preferivelmente, uma $OD_{600}=1$ em 1 mL correlaciona-se com 7×10^9 de unidades de formação de colônia de lactobacilos como descrito aqui abaixo. Preferivelmente, para ensaiar a reação de agregação por pelotização, as bactérias estão em um volume de 2 mL em tubos Falcon de 15

mL. Se necessário, as suspensões de cultura são diluídas com tampão-PBS para obter razões volumétricas mencionadas acima, enquanto se mantém o volume final em 2 mL. Preferivelmente, a mistura é agitada por cerca de 15 segundos e então deixada em repouso por pelo menos 5, 10, 15 minutos e mais preferivelmente por pelo menos 20 minutos na temperatura ambiente, i.e. qualquer temperatura entre 16°C e 25°C. Uma agregação é visível como uma turbidez intermediária da suspensão e, após pelo menos 20 minutos uma agregação é visível por agregados que se sedimentam como uma pelota visível (exemplarmente mostrada em Figura 1, Tubo Falcon da esquerda), enquanto que misturas de agregação de *Streptococos* não-mutantes permanecem em suspensão (exemplarmente mostrado em Figura 1, tubo Falcon da direita). Como um controle, auto-agregação da bactéria do ácido láctico respectiva e da cepa de *Streptococo* mutante pode ser ensaiada pela omissão de quer o *Streptococo* mutante quer da bactéria do ácido láctico.

A agregação de um lactobacilo e de um *Streptococo* mutante de acordo com o ensaio descrito acima pode ser quantificada pela separação por centrifugação dos agregados formados, e.g. a 500 x g por 30 segundos. Subsequentemente, a quantidade de agregação pode ser determinada por medição da quantidade de células não-agregadas que são deixadas no sobrenadante. A determinação pode ser realizada por qualquer meio adequado conhecido pela pessoa experiente na técnica. Preferivelmente, a determinação é realizada pela remoção de um certo volume do sobrenadante, e.g. 1 mL. Subsequentemente, a densidade óptica do sobrenadante removido pode ser medida em qualquer comprimento de onda, conhecido pela pessoa experiente na técnica, e.g. a 600 nm. O valor medido após subtração de um valor correspondendo ao teste de controle sem lactobacilos representa a quantidade de células que não têm sido agregadas.

Alternativamente, com o objetivo de solucionar o possível problema de auto-agregação de uma cepa, preferivelmente uma cepa

fluorescente, pode ser utilizada. Assim, em uma modalidade mais preferida, a ligação específica pode ser ensaiada como segue:

(a) crescer dito microorganismo até fase estacionária;

(b) misturar dito microorganismo com uma bactéria pertencendo ao grupo de *Streptococos* mutantes que tem sido crescido até fase estacionária e que tem sido corada usando uma cepa adequada, preferivelmente uma cepa fluorescente;

(c) incubar a mistura obtida em etapa (b) sob condições permissoras da formação de agregados de dito microorganismo e uma bactéria do grupo de *Streptococos* mutantes; e

(d) detectar agregados pela detecção da cepa, preferivelmente uma cepa fluorescente.

De novo, em uma modalidade preferida a bactéria pertencendo ao grupo de *Streptococos* mutantes usada em um tal ensaio é *Streptococcus* mutans. Preferivelmente um tal ensaio de agregação pode ser realizado como descrito em Exemplo 5, aqui abaixo. Em particular, para um ensaio de agregação de *Streptococos* mutantes como descrito em Exemplo 5, infra, ambas, as bactérias do ácido láctico e *Streptococos* mutantes são crescidos até fase estacionária como descrito em Exemplo 1. Preferivelmente, a densidade óptica é medida fotometricamente em um comprimento de onda de 600 nm. Preferivelmente, uma $OD_{600}=1$ em 1 mL correlaciona-se com 3×10^8 unidades de formação de colônia de um *Streptococo* mutante. Preferivelmente, uma $OD_{600}=1$ em 1 mL correlaciona-se com 7×10^9 unidades de formação de colônia de lactobacilos como descrito aqui abaixo. Subsequentemente, os *Streptococos* mutantes são corados. Em uma outra modalidade preferida, os lactobacilos são corados, enquanto que os *Streptococos* não são corados. Como cepa qualquer cepa adequada pode ser usada, preferivelmente uma cepa fluorescente conhecida pela pessoa experiente na técnica pode ser usada. Preferivelmente, uma cepa fluorescente

específica ou não específica pode ser utilizada, por exemplo, CFDA-SE. Especificamente, as células são colhidas, e.g. por centrifugação, preferivelmente a 3200 x g por 5 min. Subsequentemente, a pelota obtida pode ser ressuspensa em qualquer tampão adequado conhecido pela pessoa experiente na técnica, preferivelmente em um tampão-PBS. A quantidade de tampão pode ser calculada de modo que a suspensão resultante tenha uma OD₆₀₀ de, e.g., 4,2/mL. Subsequentemente, a suspensão pode ser misturada com uma cepa adequada, e.g. uma cepa fluorescente, preferivelmente com diacetato de 5,6-carbóxi-fluoresceína, succinimidil-éster (CFDA-SE), mais preferivelmente com 2 µL de uma solução de CFDA-SE (Invitrogen). Subsequentemente, as células podem ser incubadas por um período de tempo adequado, como conhecido pela pessoa experiente na técnica, e.g. por 2 horas, em uma temperatura adequada como conhecida pela pessoa experiente na técnica, por exemplo, a 37°C. Em uma outra etapa, as células coradas podem ser colhidas, e.g. por centrifugação. Preferivelmente, a centrifugação é realizada a 3200 x g por 5 min. As células podem ser então ressuspensas em um tampão adequado, como conhecido pela pessoa experiente na técnica, e.g. em 2 mL de um tampão-PBS. Para a agregação, microorganismos pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico são preferivelmente misturados com *Streptococos* mutantes em razões volumétricas de 3:1 a 1:3 (*Streptococos* mutantes: lactobacilos). Mais preferivelmente, a razão volumétrica da mistura é 1:1. As razões mencionadas correspondem a uma razão de unidades de formação de colônia de 1:50 a 1:150. Para ensaiar a reação de agregação via medição da coloração, preferivelmente da fluorescência, os lactobacilos e os *Streptococos* mutantes são usados em qualquer volume adequado conhecido pela pessoa experiente, preferivelmente, em um volume de 50 µL. Preferivelmente, a mistura é realizada em uma placa de microtítulo, e.g. em uma placa de microtítulo de 96 cavidades. Subsequentemente, a mistura pode ser agitada, preferivelmente por

12 min em velocidade total. Depois, a mistura pode ser centrifugada, e.g. por 10 segundos a 500 x g. O sobrenadante pode ser então removido e a pelota pode ser ressuspensa em qualquer tampão adequado conhecido pela pessoa experiente na técnica, preferivelmente em tampão-PBS em qualquer volume adequado, e.g. em 100 μ L. A coloração da suspensão pode ser medida na 5 mistura por qualquer meio adequado conhecido pela pessoa experiente. Preferivelmente, no caso de fluorescência, a fluorescência pode ser detectada em uma leitora de fluorescência, e.g. em um comprimento de onda de 495 nm para excitação e de 525 nm para emissão. Como controles, lactobacilos 10 sozinhos e *Streptococos* mutantes corados sozinhos podem ser ensaiados. Qualquer coloração de fundo, e.g. fluorescência, pode ser medida para os *Streptococos* mutantes testados sozinhos e pode ser preferivelmente subtraída do valor para a agregação com o lactobacilos respectivo. Um efeito de agregação está presente se a coloração de fundo, e.g. fluorescência, medida 15 como indicado aqui acima, for subtraída da coloração medida, e.g. fluorescência, em uma amostra contendo um lactobacilo como descrito aqui acima e um *Streptococo* mutante testado, como descrito aqui acima, e o valor resultante estiver pelo menos acima de zero. Mais preferivelmente, um efeito de agregação está presente se o valor resultante estiver reproduzivelmente 20 acima de zero em uma série de testes, realizados descrito aqui acima. Uma "série de experimentos" significa pelo menos 2, preferivelmente 3, mais preferivelmente 4 e muito mais preferivelmente 5 testes.

A ligação específica descrita acima não exige magnésio. Esta característica pode ser testada como descrito nos Exemplos anexados.

25 Como mostrado nos Exemplos anexados, tem sido surpreendentemente verificado que as bactérias do ácido láctico que haviam sido originalmente identificadas e isoladas pelos ensaios de ligação mencionados acima por causa de sua capacidade para se ligarem em *Streptococcus mutans* enquanto que não se ligam em outras espécies de

Streptococcus S. salivarius, S. oralis, S.mitis e/ou S. sanguinis (veja WO 06/27265), mostram a capacidade para agregar vários outros Estreptococos mutantes, e.g. Streptococcus sobrinus, Streptococcus cricetus, Streptococcus rattus, Streptococcus ferus e Streptococcus macacae. Assim, a identificação de

5 bactérias do ácido láctico que mostram as características de ligação descritas acima em relação a Streptococcus mutans e sendo que a ligação é preferivelmente avaliada pelos ensaios descritos acima proporciona bactérias do ácido láctico que não apenas têm a capacidade para agregar Streptococcus mutans mas também têm a capacidade para também agregar outros

10 Estreptococos mutantes, i.e. espécies Streptococcus que têm as características comuns como descrito adicionalmente abaixo e que também estão em conexão com desenvolvimento de cárie. Assim, tem sido verificado que bactérias do ácido láctico, que mostram as características de ligação citadas acima versus um tipo de bactéria pertencendo ao grupo de Estreptococos

15 mutantes (e.g. Streptococcus mutans) são capazes de agregar também outras bactérias pertencendo ao grupo de Estreptococos mutantes e podem, assim, ser usadas para prevenir e/ou tratar cárie causada por tais outras bactérias. Assim, os ensaios identificados acima para testar a ligação de bactérias do ácido láctico em uma bactéria pertencendo ao grupo de Estreptococos mutantes

20 também para identificar bactérias do ácido láctico que também se ligam em/agregam outras bactérias do grupo de Estreptococos mutantes. Assim, a presente invenção proporciona um aperfeiçoamento importante no fornecimento de meios e métodos para solucionar cárie, que é causada por Estreptococos mutantes diferentes de Streptococcus mutans.

25 Como é evidente do discutido acima, todas as características acima mencionadas tornam o microorganismo mencionado acima pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico um agente adequado para prevenir e/ou tratar cárie, em particular cárie que é causada por Estreptococos mutantes, diferentes de Streptococcus mutans. Consequentemente, o

microorganismo mencionado acima pertencendo ao grupo de bactérias de ácido láctico exerce um efeito anticariogênico e é assim um agente útil para prevenir e/ou tratar cáries, em particular cáries causadas por Estreptococos mutantes diferentes de Streptococcus mutans. "Cárie" ou "cárie dental" ou "cavidade" são termos intercambiáveis para uma doença infecciosa crônica associada com área deteriorada mole em um dente que progressivamente leva à morte de um dente. Normalmente ocorre em crianças e adultos jovens mas pode afetar qualquer pessoa. É a causa mais importante de perda de dente em pessoas jovens. Cárie pode ser diagnosticada por métodos conhecidos na técnica (veja, por exemplo, Angmar-Mansson e ten Bosch. Adv. Dent. Res. 7 (1993), 70-79).

O termo "Estreptococo mutante" refere-se a um microorganismo do grupo taxonômico de Streptococcus, que é encontrado em placa na cavidade oral e que fermenta manitol e sorbitol. Preferivelmente, é um microorganismo com as características mencionadas acima que adicionalmente é capaz de produzir glicanos extracelulares a partir de sacarose. Preferivelmente, dito microorganismo é cariogênico, em particular em modelos humanos e/ou animais. Mais preferivelmente, o termo refere-se a um microorganismo, que mostra todas as características mencionadas acima. A fermentação de sorbitol e manitol pode ser testada pelo uso de qualquer teste conhecido pela pessoa experiente na técnica, por exemplo um teste API 20 Strep (Biomérieux, França).

Mais preferivelmente, o termo refere-se a um microorganismo pertencendo à espécie Streptococcus mutans, Streptococcus sobrinus, Streptococcus cricetus, Streptococcus rattus, Streptococcus ferus ou Streptococcus macacae. Ainda mais preferivelmente, o termo refere-se a um microorganismo pertencendo a Streptococcus mutans serotipo c (DSMZ 20523) Streptococcus mutans sorotipo e (NCTC 10923) Streptococcus mutans sorotipo f (NCTC 11060), Streptococcus sobrinus DSM 20742, Streptococcus

ratti DSM 20564, Streptococcus cricetus DSM 20562, Streptococcus ferus DSM 20646 ou Streptococcus macacae DSM 20714. O termo "Estreptococos mutantes" refere-se a pelo menos um microorganismo do grupo de Estreptococo mutante, como descrito aqui acima. Preferivelmente, o termo
5 refere-se a qualquer combinação e sub-agrupamento de microorganismos pertencendo ao grupo de Estreptococo mutante como descrito aqui acima.

O termo "prevenir cárie" inclui profilaxia de cárie. Consequentemente, um indivíduo que nunca tenha se deparado com Estreptococos mutantes, os agentes causadores de cárie, mas esteja sob um
10 risco de ser deparado, i.e. infectado com Estreptococos mutantes se beneficia, por exemplo, dos usos e métodos da presente invenção na medida em que o dito indivíduo não sofrerá de cárie. Consequentemente, os usos e métodos da presente invenção podem, por exemplo, ser aplicados em bebês, crianças ou animais jovens para profilaxia de cárie porque a cavidade oral de bebê ou
15 animal jovem está normalmente livre de Estreptococos mutantes. Contudo, as composições como usadas de acordo com a presente invenção não são limitadas à administração a bebês, crianças ou animais jovens.

O termo "tratar cárie" inclui administração das composições como descrito aqui abaixo a um indivíduo sofrendo de cárie para o propósito
20 de diminuir a quantidade de células de Estreptococos mutantes e/ou para completamente eliminar Estreptococos mutantes da boca, em particular da cavidade oral incluindo os dentes. Claro que após ter sido corado dos Estreptococos mutantes, é considerado que o respectivo indivíduo se beneficie dos usos e métodos da presente invenção no que diz respeito a um efeito
25 profilático anti-cárie exercido sobre Estreptococos mutantes. Opcionalmente, o microorganismo mencionado acima pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico é um microorganismo probiótico que tem, além de seus efeitos anticariogênicos, efeitos benéficos para o organismo hospedeiro ao qual é administrado. Um "probiótico", pela definição geralmente aceita, é um

"suplemento alimentício microbiano vivo que benéficamente afeta o animal hospedeiro por melhoria de seu equilíbrio microbiano intestinal".

Estreptococos mutantes ocorrem como parte da flora normal na boca. Estão envolvidos na causa de cárie dental em humanos e fossas dos dentes adjacentes às gengivas. Consiste inicialmente de glicoproteína, que é precipitada e é adsorvida sobre o esmalte do dente. Bactérias orais então se tornam associadas com a glicoproteína. Sacarose de dieta é um contribuinte importante para produção de cárie, particularmente se sacarose estiver na forma de alimentos doces aderentes alguns dos quais podem permanecer na boca por algum tempo. A sacarose é assim completamente mais metabolizada pelos Estreptococos mutantes para formar ácidos. Bebidas, que contêm sacarose são engolidas e assim a sacarose permanece menos tempo na boca. É essencial que placa dental seja controlada pelo uso de escovação dental regular e o uso de palitos de dente e de fio dental. A adição de 1 ppm de fluoreto em água potável tem se mostrado muito eficaz na redução de cárie. Além disso, a possibilidade de usar uma vacina contra Streptococcus mutans foi contemplada na comunidade científica. Assim, além dos esquemas gerais de higiene oral, que afetam a maioria das bactérias na cavidade oral, a técnica anterior quase inteiramente focaliza medidas específicas contra Streptococcus mutans. Contudo, pela surpreendente descoberta da presente invenção que microorganismos naturalmente ocorrentes pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico preferivelmente do gênero Lactobacillus que têm sido identificadas por sua capacidade de ligar Streptococcus mutans, também têm a capacidade para ligar cepas de Estreptococos mutantes como e.g. Streptococcus sobrinus, Streptococcus cricetus, Streptococcus rattus, Streptococcus ferus ou Streptococcus macacae, é agora possível efetivamente prevenir e/ou tratar cárie causada por Estreptococos mutantes diferentes de Streptococcus mutans, porque os microorganismos mencionados acima pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico são capazes de agregar e

eliminar *Streptococos* mutantes como, e.g. *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus cricetus*, *Streptococcus rattii*, *Streptococcus ferus* ou *Streptococcus macacae*. Consequentemente, a presente invenção proporciona o uso de bactérias facilmente administráveis, que são organismos de grau alimentício que podem, em adição às suas propriedades anticariogênicas, ser úteis como probióticos.

Em particular, quando se analisam os microorganismos pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico, preferivelmente do gênero *Lactobacillus*, que haviam sido originalmente identificadas por causa de sua capacidade para ligar em *Streptococcus mutans* mas não *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis* e *Streptococcus sanguinis* tem sido verificado de modo surpreendente que ditos microorganismos não são apenas capazes de ligação em *Streptococcus mutans*, mas também ligam em outras espécies de *Streptococos* mutantes, como e.g. *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus cricetus*, *Streptococcus rattii*, *Streptococcus ferus* ou *Streptococcus macacae*, que são os agentes causadores de cárie. Pela ligação nestes *Streptococos* mutantes, o microorganismo pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico, preferivelmente do gênero de *Lactobacillus* como aqui descrito, inter alia, se liga em e agrega um *Streptococo* mutante e assim, em consequência, elimina um *Streptococo* mutante pelo fluxo natural de saliva, deste modo prevenindo e/ou tratando cárie. Acima disto, os microorganismos mencionados acima pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico do preferivelmente não se ligam em outros microorganismos que não pertencem ao grupo de *Streptococos* mutantes, presentes na cavidade oral como é aqui descrito e em particular em Exemplo 6 aqui abaixo. Assim, o microambiente da cavidade oral não é perturbado porque apenas *Streptococos* mutantes como os agentes causadores de cárie são reduzidos. Para o melhor entendimento, *Streptococos* mutantes não têm quaisquer efeitos benéficos sobre a cavidade oral e, assim, sua perda não tem efeito

adverso para o respectivo hospedeiro.

Surpreendentemente, a ligação específica do microorganismo mencionado acima pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico, em particular da espécie *Lactobacillus* aqui descrito, em *Streptococcus* mutantes é resistente ao tratamento térmico e/ou resistente ao tratamento com protease. Em adição, a ligação específica é dependente de cálcio e/ou independente de magnésio e estável em um ponto ácido de 4,5 e ocorre na presença de saliva que a torna em particular adequada para o uso na forma de aplicações orais ou como um aditivo para alimento, ração ou bebidas que podem conter concentrações mais altas de cálcio, tal como leite. Notavelmente, análogos, derivados ou (um) fragmento(s) termalmente inativado(s) ou liofilizado(s), de ditos microorganismos aqui mostrados ainda são capazes de se ligarem em especificamente *Streptococcus* mutantes. Este efeito surpreendente é vantajoso para o uso de dito(s) análogo(s) ou fragmento(s) de ditos microorganismos bem como seus mutantes ou derivados para uso em animais, preferivelmente, humanos ou mamíferos, para prevenir e/ou tratar cárie. Em particular ditos análogos ou fragmentos podem ser facilmente adicionados em qualquer composição, e.g. composição farmacêutica ou cosmética, alimento ou ração ou bebidas e semelhantes. Consequentemente, a produção de tais análogos ou derivados é barata e fácil e podem ser armazenados por períodos de tempo prolongados sem perder sua capacidade para se ligarem especificamente em *Streptococcus* mutantes. Uma outra vantagem do microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico é que ele mantém sua capacidade para se ligar especificamente em *Streptococcus* mutantes se for liofilizado ou seco por pulverização ou seco. Isto torna-o um ingrediente favorável para uso nas composições aqui descritas.

Outras modalidades e vantagens da invenção são demonstradas em parte na descrição aqui, em parte, podem ser óbvias a partir da descrição,

ou podem ser aprendidas da prática da invenção.

Antes de a presente invenção ser descrita em detalhe, é para ser entendido que esta invenção não é limitada à metodologia particular, aos protocolos particulares, às bactérias particulares, aos vetores particulares, e aos reagentes particulares etc. aqui descritos porque estes podem variar. Também é para ser entendido que a terminologia aqui usada é para o propósito de descrição apenas de modalidades particulares, e não é intencionada para limitar o escopo da presente invenção, que será limitado apenas pelas reivindicações anexadas. A não ser que sejam definidos de outro modo, todos os termos técnicos e científicos aqui usados têm os mesmos significados como comumente entendidos por uma pessoa ordinariamente experiente na técnica.

Preferivelmente, os termos aqui usados são definidos como descrito em "A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations", Leuenberger, H.G.W, Naqel, B. e Kolbl. H. eds. (1995), Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basel, Suíça). Em todo este relatório descritivo e nas reivindicações que seguem, a não ser que o contexto exija de outra maneira, a palavra "compreender" e variações tais como "compreende", "compreendem" e "compreendendo", serão entendidas para implicarem a inclusão de um número inteiro ou etapa ou grupo de números inteiros ou etapas enunciados mas não a exclusão de qualquer outro número inteiro ou etapa ou grupo de números inteiros ou etapas.

Vários documentos são citados em todo o texto deste relatório descritivo. Cada um dos documentos aqui citados (incluindo todas as patentes, pedidos de patente, publicações científicas, especificações de fabricante, instruções, etc.), quer supra quer infra, são deste modo aqui incorporados como referências em suas totalidades. Nada aqui é para ser entendido como uma admissão de que a invenção não é autorizada para antecipar tal revelação em virtude da invenção anterior.

É preciso ser notado que com aqui usado e nas reivindicações anexadas, as formas no singular de "um", "uma", "o" e "a", incluem as referências no plural a não ser que o contexto indique claramente o contrário. Assim, por exemplo, referência a um "reagente" inclui um ou mais de tais reagentes diferentes, e referência ao "método" inclui referência às etapas e aos métodos equivalentes conhecidos por aquelas pessoas ordinariamente experientes na técnica que poderiam ser modificados ou substituir os métodos aqui descritos.

Quando usado no contexto da presente invenção, o termo "microorganismo pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico" inclui (a) microorganismo(s) que pertence(m) às bactérias, em particular pertencendo a eubactérias fermentativas gram-positivas, mais particularmente pertencendo à família de lactobacteriaceae incluindo bactérias do ácido láctico. Em adição, dito termo também inclui derivados ou mutantes ou análogos ou fragmentos, tais como uma fração de membrana como aqui descrito, de dito(s) microorganismo(s), que mantém a capacidade para se ligar(em) especificamente em *Streptococos* mutantes. Os termos "derivado", "mutantes", "análogos" e "fragmentos" são descritos aqui alhures. Bactérias do ácido láctico são de um ponto de vista taxonômico divididas em até as subdivisões de *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Lactobacillus*. O microorganismo mencionado acima pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico é preferivelmente uma espécie de *Lactobacillus*. Membros do grupo das bactérias do ácido láctico normalmente são faltantes de porfirinas e citocromos, não realizam fosforilação para transporte de elétrons e como consequência obtêm energia apenas por fosforilação em nível de substrato. I.e. em bactérias do ácido láctico ATP é sintetizado através de fermentação de carboidratos. Todas as bactérias do ácido láctico crescem anaerobicamente, contudo, diferentemente e muitos anaeróbios, as bactérias do ácido láctico em sua maioria não são sensíveis ao oxigênio e podem assim crescer em sua

presença bem como em sua ausência. Consequentemente, os microorganismos mencionados acima pertencendo ao grupo de bactérias do ácido lático são preferivelmente bactérias do ácido lático anaeróbicas aerotolerantes, preferivelmente pertencendo ao gênero de *Lactobacillus*.

5 As bactérias do ácido lático mencionadas acima são preferivelmente de formato de bastão ou esféricas, variando de longas e finas a bastões curtos encurvados, são além disso preferivelmente imóveis e/ou esporogêneas e produzem ácido lático como o único ou maior produto de metabolismo de fermentação. O gênero *Lactobacillus* ao qual pertence o
10 microorganismo mencionado acima é dividido pelas seguintes características em três grupos maiores, de forma que é considerado que a espécie *Lactobacillus* mencionada acima pode pertencer a cada um dos três subgrupos maiores:

(a) lactobacilos homofermentativos

15 (i) produzem ácido lático, preferivelmente os L-, D- ou DL-isômero(s) de ácido lático em uma quantidade de pelo menos 85% a partir de glicose via a rota de Embden-Meyerhof;

(ii) crescem em uma temperatura de 45°C, mas não em uma temperatura de 15°C;

20 (iii) são de forma de bastão longo; e

(iv) têm ácido glicerol-teicóico na parede celular;

(b) lactobacilos homofermentativos

(i) produzem ácido lático, preferivelmente os L- ou DL-isômero(s) de ácido lático via a rota de Embden-Meyerhof;

25 (ii) crescem em uma temperatura de 15°C, mostrando crescimento variável em uma temperatura de 45°C;

(iii) são de forma de bastão curto ou corineformes; e

(iv) têm ácido ribitol e/ou glicerol teicóico em sua parede celular;

(c) lactobacilos heterofermentativos

(i) produzem ácido láctico, preferivelmente o DL-isômero de ácido láctico em uma quantidade de pelo menos 50% a partir de glicose via a rota de pentose-fosfato;

5 (ii) produzem dióxido de carbono e etanol

(iii) mostram crescimento variável em uma temperatura de 15°C ou 45°C;

(iv) são de forma de bastão longo ou curto; e

(v) têm ácido glicérol teóico em sua parede celular.

10 Baseado nas características descritas acima, os microorganismos mencionados acima podem ser classificados como pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico, particularmente do gênero *Lactobacillus*. Pelo uso de sistemática clássica, por exemplo, ao se referir às descrições pertinentes em "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology"

15 (Williams & Wilkins Co., 1984), pode ser determinado que um microorganismo pertence ao gênero de *Lactobacillus*. Alternativamente, os microorganismos podem ser classificados como pertencendo ao gênero de *Lactobacillus* por métodos conhecidos na técnica, por exemplo, por sua impressão digital metabólica, i.e. uma visão geral comparável da capacidade

20 de (um) tal(ais) microorganismo(s) para metabolizar açúcares ou por outros métodos descritos, por exemplo, em Schleifer et al., System. Appl. Microb., 18 (1995), 461-467 ou Ludwig et al., System. Appl. Microb., 15 (1992), 487-501. Os microorganismos mencionados acima são capazes de metabolizar fontes de açúcar, que são típicas e conhecidas na técnica para

25 microorganismos pertencendo ao gênero de *Lactobacillus*. Preferivelmente, contudo, o microorganismo acima mencionado tem uma impressão digital metabólica selecionado do grupo consistindo de:

(i) metaboliza D-lactose, mas não L-sorbose e/ou D-sacarose e/ou D-inulina,

(ii) metaboliza inulina,

(iii) metaboliza L-sorbose, mas não D-lactose e/ou D-sacarose e/ou inulina, e

(iv) metaboliza L-sorbose, D-lactose e inulina.

5 Preferivelmente, o microorganismo acima mencionado tem uma impressão digital metabólica selecionada do grupo consistindo de:

(i) metaboliza D-lactose, mas não L-sorbose, D-sacarose e inulina,

10 (ii) metaboliza L-sorbose, D-lactose e inulina, mas não D-sacarose,

(iii) metaboliza L-sorbose, mas não D-lactose, D-sacarose e inulina, e

(iv) metaboliza L-sorbose, D-lactose, D-sacarose, mas não inulina.

15 Claro que o microorganismo acima mencionado não é limitado à metabolização de açúcares mencionados no padrão de impressão digital metabólica anteriormente citado, mas pode ser capaz de metabolizar outros açúcares que são comumente metabolizados pela espécie *Lactobacillus*.

20 A afiliação dos microorganismos acima mencionados ao gênero de *Lactobacillus* também pode ser caracterizada pelo uso de outros métodos conhecidos na técnica, por exemplo, usando eletroforese em gel SDS-PAGE da proteína total das espécies a serem determinadas e comparando-as com cepas conhecidas e já caracterizadas do gênero *Lactobacillus*. As técnicas para preparar um perfil de proteína total =como
25 descrito acima, bem como a análise numérica de tais perfis, são bem conhecidas por uma pessoa experiente na técnica. Contudo, os resultados são apenas confiáveis desde que cada estágio do processo seja estandardizado. Faceado com a exigência de acurácia quando se determina a fixação de um microorganismo no gênero de *Lactobacillus*, procedimentos estandardizados

são regularmente formados disponíveis ao público por seus autores tais como aquele de Pot et al., como apresentado durante um "workshop" organizado pela União Européia, na University of Ghent, em Bélgica, aos 12 a 16 de Setembro de 1994 ("Fingerprinting techniques for classification and identification of bacteria, SDS-PAGE of whole cell protein"). O programa de computador usado na técnica para analisar o gel de eletroforese SDS-PAGE é de importância crucial porque o grau de correlação entre as espécies depende dos parâmetros e algoritmos usados por este programa de computador. Sem entrar em detalhes teóricos, comparação quantitativa de bandas medidas por um densitômetro e normalizadas por um computador é preferivelmente feita com o coeficiente de correlação de Pearson. A matriz de similaridade assim obtida pode ser organizada com o auxílio do algoritmo UPGMA ("*unweighted pair group method using average linkage*") que não apenas torna possível agrupar juntos perfis mais similares, mas também construir dendogramas (veja Kersters, "Numerical methods in the classification and identification of bacteria by electrophoresis", em Computer-assisted Bacterial Systematics, 337-368, M. Goodfellow, A. G. O'Donnell Ed., John Wiley e Sons Ltd, 1985).

Alternativamente, a afiliação de ditos microorganismos ao gênero de *Lactobacillus* pode ser caracterizada com relação ao RNA ribossomal em um denominado Riboprinter.RTM. Mais preferivelmente, a afiliação das espécies acima mencionadas ao gênero *Lactobacillus* é demonstrada pela comparação da sequência de nucleotídeos do RNA ribossomal 16S de ditas bactérias, ou de seu DNA genômico que codifica o RNA ribossomal 16S, com aquelas de outros gêneros e espécies de bactérias do ácido láctico conhecidos até agora. Outra alternativa preferida para determinar a ligação de espécies ao gênero de *Lactobacillus* é o uso de iniciadores de PCR espécie-específicos que selecionam a região de espaçador 16S-23S rRNA. Outra alternativa preferida é RAPD-PCR (Niqatu et al. em Antonie van Leeuwenhoek (79), 1-6, 2001) em virtude do fato de que é

gerado um padrão de DNA específico de cepa que permite determinar a afiliação de um microorganismo identificado ao gênero de *Lactobacillus*. Outras técnicas para determinar a afiliação de um microorganismo ao gênero de *Lactobacillus* são polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP) (Giraffa et al., Int. J. Food Microbiol. 82 (2003), 163-172), impressão digital dos elementos repetitivos (Gevers et al., FEMS Microbiol. Lett. 205 (2001) 31-36) ou análise do padrão de metil-éster de ácido graxo (FAME) de células de bactéria (Havrman et al., FEMS Microbiol. Lett. 181 (1991), 55-62). Alternativamente, lactobacilos podem ser determinados por tipificação de lectina (Annuk et al., J. Med. Microbiol. 50 (2001), 1069-1074) ou por análise de suas proteínas de parede celular (Gatti et al., Lett. Appl. Microbiol. 25 (1997), 345-348).

Os microorganismos acima mencionados são preferivelmente bactérias do ácido láctico pertencendo ao gênero de *Lactobacillus*, mais preferivelmente espécie *Lactobacillus* como aqui descrito. Ainda mais preferivelmente dito *Lactobacillus* é *Lactobacillus paracasei* ou *Lactobacillus rhamnosus*. Contudo, as espécies *Lactobacillus* não limitadas às mesmas. Os microorganismos acima mencionados podem ser preferivelmente "isolados" ou "purificados". O termo "isolado" significa que o material é removido de seu ambiente original, e.g. o ambiente natural se for naturalmente ocorrente. Por exemplo, um microorganismo naturalmente ocorrente, preferivelmente uma espécie *Lactobacillus*, separado de alguns ou todos os materiais coexistentes no sistema natural, é isolado. Um tal microorganismo poderia ser parte de uma composição, e ser considerado como ainda sendo isolado pelo fato de a composição não ser parte de seu ambiente natural.

O termo "purificado" não exige pureza absoluta; em vez disso, é intencionado como uma definição relativa. Microorganismos individuais obtidos de uma biblioteca têm sido convenientemente purificados até homogeneidade microbiana, i.e. eles crescem como colônias únicas quando

espalhados sobre placas de ágar por métodos conhecidos na técnica. Preferivelmente, as placas de ágar que são usadas para este propósito são seletivas para espécie *Lactobacillus*. Tais placas de ágar seletivas são conhecidas na técnica.

5 Mais preferivelmente, o microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico é selecionado do grupo consistindo de *Lactobacillus paracasei* ou *Lactobacillus rhamnosus* tendo número de acesso em DSMZ de DSM 16667 (*L. paracasei* ssp. *paracasei* Lb-Ob-K1), tendo número de acesso em DSMZ de DSM 16668 (*L. paracasei* ssp. *paracasei* Lb-Ob-K2), tendo número de acesso em DSMZ de DSM 16669 (*L. paracasei* ssp. *paracasei* Lb-Ob-K3), tendo número de acesso em DSMZ de DSM 16670 (*L. paracasei* ssp. *paracasei* Lb-Ob-K4), tendo número de acesso em DSMZ de DSM 16671 (*L. paracasei* ssp. *paracasei* Lb-Ob-K5), tendo número de acesso em DSMZ de DSM 16672 (*L. rhamnosus* Lb-Ob-K6) e número de acesso DSM de DSM 16673 (*L. rhamnosus* Lb-Ob-K7) ou a um mutante ou derivado do mesmo, sendo que dito mutante ou derivado mantém a capacidade para se ligar especificamente em *Streptococcus* mutantes. O termo "*Lactobacillus paracasei* ou *Lactobacillus rhamnosus* tendo número de acesso em DSMZ de" refere-se às células de um microorganismo pertencendo à espécie *Lactobacillus paracasei* ou *Lactobacillus rhamnosus* depositada na Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH ("DSMZ") aos 26 de Agosto de 2004 e tendo os seguintes números de depósito DSM 16667, 16668, 16669, 16670, 16671, 16672 ou 16673. A DSMZ está localizada em Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Alemanha. Os depósitos em DSMZ anteriormente mencionados foram feitos de acordo com os termos do Tratado de Budapeste sob reconhecimento internacional de depósito de microorganismos para propósitos de procedimento de patente.

"Um mutante ou derivado" do microorganismo acima

mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico, preferivelmente das células depositadas de *Lactobacillus paracasei* ou *Lactobacillus rhamnosus* tem preferivelmente as mesmas características das cepas depositadas respectivas, i.e. mantém a capacidade para se ligar especificamente em *Streptococos* mutantes, preferivelmente com as características de ligação como descrito aqui acima. Por exemplo, dito derivado pode ser geneticamente engenhado. No contexto da presente invenção o termo "geneticamente engenhado" é usado em seu sentido mais amplo para métodos conhecidos pela pessoa experiente na técnica para modificar ácidos nucleicos desejados *in vitro* e *in vivo* de tal modo que modificações genéticas sejam afetadas e genes sejam alterados por tecnologia de DNA recombinante. Consequentemente, é preferido que ditos métodos compreendam clonagem, sequenciamento e transformação de ácidos nucleicos recombinantes. Para este propósito vetores apropriados incluindo vetores de expressão para espécie *Lactobacillus* as, por exemplo, são descritos em EP-B1 506.789, EP-B1 316.677, EP-B1 251.064, EP-B1 218.230, EP-B1 133.046 ou WO 89/01970.

Iniciadores, enzimas, outras células hospedeiras para clonagem de construtos intermediários e semelhantes podem ser usados e são conhecidos pelo técnico experiente. Preferivelmente, mutantes geneticamente engenhados compreendem células do microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico, preferivelmente da espécie *Lactobacillus* depositada hospedando ácidos nucleicos recombinantes quer compreendidos em seu cromossomo bacteriano ou em (um) plasmídeo(s) quer compreendidos em seu cromossomo bacteriano e/ou (um) plasmídeo(s). Ditos ácidos nucleicos recombinantes são preferivelmente estranhos ao microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico. "Estranho" significa que o polinucleotídeo ou a molécula de ácido nucleico é quer heterólogo(a) com respeito à célula hospedeira, isto

significa derivado de uma célula ou um organismo com um *background* genômico, ou é homólogo com respeito à célula hospedeira mas localizado em um ambiente genômico diferente da contra-parte naturalmente ocorrente de dita molécula de ácido nucleico. Isto significa que, se a molécula de ácido nucleico for homóloga com respeito à célula hospedeira, ele não estará localizada em sua localização natural no genoma de dita célula hospedeira, em particular estará rodeada por genes diferentes. Neste caso o polinucleotídeo pode estar quer sob o controle de seu próprio promotor quer sob o controle de um promotor heterólogo. O vetor ou a molécula de ácido nucleico acima descrito(a), que está presente na célula hospedeira pode estar quer integrado(a) no genoma da célula hospedeira quer pode estar mantido(a) em alguma forma extracromossomicamente. Com respeito a isto, também é para ser entendido que a molécula de ácido nucleico acima descrita pode ser usada para restaurar ou criar um gene mutante via recombinação homóloga.

Plasmídeos podem ser plasmídeos de números de cópias baixos, médios ou altos. Ditos mutantes geneticamente engenhados podem hospedar ácidos nucleicos codificadores de uma glicanase ou mutanase que é capaz de degradar a ligação 1,3-glicosídica específica mutante de subunidades de sacarose. Glicanases fúngicas são, por exemplo, descritas em Fuglsang et al., J. Biol. Chem. 275 (2000), 2009-2018. Também é considerado que mutantes geneticamente engenhados compreendem células hospedando ácidos nucleicos recombinantes codificadores de anticorpos que são preferivelmente secretados ou estão ancorados na parede celular bacteriana. O termo "anticorpo" inclui anticorpos intactos bem como seus fragmentos de anticorpo, como, cadeias leves e pesadas separadas, Fab, Fab/c, Fv, Fab', F(ab')₂. O termo "anticorpo" também compreende anticorpos humanizados, anticorpos bifuncionais e construtos de anticorpo, como Fvs de cadeia única (scFv) ou proteínas de fusão - anticorpo. Também é considerado dentro do contexto desta invenção que o termo "anticorpo" compreenda construtos de

anticorpo que podem ser expressados em células do derivado do microorganismo depositado acima mencionado, e.g. construtos de anticorpo que podem ser transformados via, inter alia, vetores por métodos conhecidos na técnica. É em particular considerado que tais construtos de anticorpo especificamente reconhecem, por exemplo, o antígeno estreptococcíco I/II. Uma tal abordagem, por exemplo, é descrita em Krueger et al., Nat. Biotechnol. 20 (2002), 702-706 ou Shiroza, Biochim Biophys Acta 1626 (2003), 57-64. Secreção do anticorpo expressado é preferivelmente realizada por ligação operacional do ácido nucleico codificador de um anticorpo em uma sequência de sinal de secreção. Ancoragem na parede celular bacteriana poderia ser realizada fazendo-se uso do mecanismo da enzima sortase. A saber, proteínas de superfície de bactérias gram-positivas são ligadas na parede celular bacteriana por um mecanismo que envolve clivagem de um motivo conservado Leu-Pro-X-Thr-Gly (LPXTG) e que ocorre durante montagem da parede celular de peptidoglicano. Consequentemente, a molécula de ácido nucleico codificadora de um anticorpo pode ser fusionada em uma sequência codificadora do motivo conservado acima mencionado, que é usado por sortase para ancorar proteínas na parede celular bacteriana.

Também é considerado que o microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico, preferivelmente a espécie *Lactobacillus* depositada seja geneticamente modificado para hospedar uma molécula de ácido nucleico codificadora de reuterina que é uma substância antimicrobiana eficaz, inter alia, contra *Streptococcus mutans*. Reuterina é, por exemplo, descrita em Talarico et al., Chemother. 33 (1989), 674-679.

Um mutante do microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico, preferivelmente um mutante das cepas de *Lactobacillus* depositadas é preferivelmente artificialmente mutado. De acordo com a presente invenção, o termo

"mutado" significa (a) modificação(ões) permanente(s) de material genético, i.e. ácidos nucleicos, causada(s), por exemplo, naturalmente ou por meio físico ou agentes/substâncias/compostos químicos, tais como EMS ou ENU. Ditas modificações incluem mutações pontuais, como transições ou transversões, deleção/inserção/adição de uma ou mais bases dentro de um cromossomo/gene/ácido nucleico modificando deste modo o cromossomo/gene/ácido nucleico que pode causar, inter alia, tradução/transcrição/expressão de gene aberrante ou produtos de gene inativos, produtos de gene inativos/ativos constitutivos levando a e.g. efeitos negativos-dominantes. Preferivelmente, uma mutação leva a uma capacidade aumentada de ligação específica em *Streptococos* mutantes. Assim, também é preferido que as células mutantes do microorganismo depositado que hospeda (a) mutação(ões) em (a) gene(s) desejado(s) ou no qual (a) mutação(ões) em (a) gene(s) desejado(s) seja(m) induzida(s) por métodos conhecidos pela pessoa experiente na técnica. Também é conhecido na técnica anterior que células bacterianas mutadas ou geneticamente engenhas podem ser selecionadas por qualquer fenótipo/método adequado. No contexto da presente invenção, um mutante tendo uma capacidade para se ligar especificamente em *Streptococos* mutantes pode ser testado de acordo com os métodos descritos nos Exemplos anexados. O termo "mutante", contudo, também inclui células do microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico, preferivelmente células do microorganismo depositado, que hospedam mutações espontâneas, naturalmente ocorrentes em seu genoma, i.e. cromossomo bacteriano. "Mutações espontâneas" são mutações que aparecem naturalmente, i.e., sem manipulação genética direta pelo homem, ou por exposição a um mutágeno. Seleção de mutantes espontâneos pode ser realizada pelo cultivo da cepa e seleção das variantes desejadas, por exemplo, pela capacidade da bactéria variante em mostrar uma ligação melhorada em *Streptococos* mutantes.

Métodos para seleção de mutantes espontâneas são bem conhecidos na técnica (veja, por exemplo, Sambrook, Russell "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (2001); Ausubel. "Current Protocols in Molecular Biology", Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989)). Por exemplo, tais mutações podem ocorrer durante cultivo, por exemplo, durante o processo de divisão celular normal acoplado com replicação de DNA ou durante passagem e/ou preservação do mutante do microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico.

A cavidade oral é lar de muitas espécies diferentes de estreptococos e não é surpreendente, considerando que compartilham o mesmo hábitat, que têm muitas características em comum. Assim, é preferível que o microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico se ligue especificamente em *Streptococos* mutantes. Consequentemente, o termo "se liga especificamente" no contexto da presente invenção significa que o microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico, preferivelmente um microorganismo pertencendo ao gênero de *Lactobacillus* se liga em um *Streptococo* mutante, em particular *Streptococcus mutans*, mas não se liga na maioria das outras espécies, preferivelmente em nenhuma das outras espécies pertencendo ao gênero *Streptococcus*, sendo que as outras espécies pertencendo ao gênero de *Streptococcus* são aquelas descritas em Exemplo 6. A saber, o microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico preferivelmente não se liga em bactérias pertencendo à espécie de *Streptococcus salivarius*, preferivelmente pertencendo à subespécie *thermophilus*, à espécie *Streptococcus oralis*, às espécies *Streptococcus mitis* e/ou à espécie *Streptococcus sanguinis*. Mais preferivelmente, não se liga em *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* (identificada por API 50 CH (Biomerieux, França), *Streptococcus oralis* (DSMZ 20066), *Streptococcus*

oralis (DSMZ 20395), Streptococcus oralis (DSMZ 20627), Streptococcus mitis (DSMZ 12643) e/ou Streptococcus sanguinis (DSMZ 20567). Em adição, dito microorganismo preferivelmente não se liga em bactérias pertencendo aos gênero diferentes de Streptococcus, e.g. pertencendo ao gênero de Staphylococcus. Mais preferivelmente, não se liga à bactérias pertencendo à espécie Staphylococcus epidermidis. Muito mais preferivelmente, não se liga em Staphylococcus epidermidis (DSMZ 1798) e/ou Staphylococcus epidermidis (DSMZ 20044).

Como já mencionado acima, tem sido verificado de modo surpreendente que bactérias do ácido láctico que são selecionadas por causa de sua ligação em Streptococcus mutans embora não se liguem em outras espécies de Streptococcus Streptococcus salivarius, Streptococcus oralis, Streptococcus mitis e/ou Streptococcus sanguinis, mostram a capacidade para também se ligarem em outros Streptococcus mutantes, i.e. outras espécies Streptococcus que mostram as características comum acima mencionadas e que também são suspeitas como agentes causadores de cárie. Assim, bactérias do ácido láctico que mostram as características de ligação específicas mencionadas acima para Streptococcus mutans mostram a capacidade também para serem usadas em conexão com a profilaxia ou o tratamento de cárie causada por Streptococcus mutantes diferentes de Streptococcus mutans. Assim, em uma modalidade preferida as bactérias do ácido láctico são caracterizadas pelo fato de que exibem características de ligação descritas acima (i.e. (i) resistência ao tratamento térmico; e/ou (ii) resistência ao tratamento com protease; e/ou (iii) dependência de cálcio; e/ou (iv) formação de ligação com uma faixa de pH entre 4,5 e 8,5; e/ou (v) formação da ligação na presença de saliva) em relação a Streptococcus mutans e a ligação é testada em um ensaio como descrito aqui acima no qual Streptococcus mutans é usado como uma bactéria pertencendo ao grupo de Streptococcus mutantes.

Para o teste de ligação específica, preferivelmente cada uma

das bactérias orais anteriormente mencionadas são preferivelmente misturadas em uma razão volumétrica de 3:1 com culturas de *Lactobacillus* como descrito aqui acima e agregação é ensaiada como aqui descrito e por exemplo em Exemplo 4 ou Exemplo 5, preferivelmente como descrito em Exemplo 5.

- 5 Foi mostrado que o acima mencionado *Lactobacillus paracasei*, preferivelmente *L. paracasei* ssp. *paracasei* não agrega qualquer uma das bactérias orais acima mencionadas pertencendo ao gênero de *Streptococcus* e não liga as bactérias pertencendo ao gênero de *Staphylococcus* aqui acima mencionadas. Foi mostrado que as cepas de *Lactobacillus rhamnosus* acima
- 10 mencionadas não agregam todas as espécies acima mencionadas de *Streptococcus* e *Staphylococcus*, à parte de *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*. Preferivelmente o termo "ligação especificamente" também significa que o microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido lático se liga em tais cepas de *Estreptococos* mutantes que
- 15 têm a capacidade para ser um patógeno dental cariogênico.

- A reação de ligação específica compreende ligar e, preferivelmente, agregar células de *Estreptococo* mutante como aqui descrito pelo microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido lático na boca. A ligação específica acarreta, em consequência, para
- 20 eliminar as células de *Estreptococo* mutante, por exemplo, pelo fluxo de saliva ou por um enxaguatório bucal ou um colutório e semelhante como aqui descrito. A boca define a cavidade oral de mamíferos, preferivelmente humanos ou animais tais como animais de estimação, composta de mucosa oral (gengivas, lábios, bochechas, palato e base da boca), a língua e os dentes
- 25 (incluindo estruturas artificiais). Preferivelmente, a reação de ligação específica do microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido lático *Estreptococos* mutantes previne que células de *Estreptococo* mutante se fixem na superfície de um dente ou de dentes (ou embora não se baseie em teoria poderia acarretar soltura de células de

Estreptococo da superfície de um dente ou dos dentes). Em consequência, a reação de ligação específica resulta em eliminação de células de Estreptococo mutante da boca, diminuindo deste modo o agente causador de cárie e, assim, prevenindo e/ou tratando cárie.

5 Acredita-se que o microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico pode ser ligar especificamente no antígeno estreptococcíco I/II que também é conhecido como antígeno B, IF, P1, SR, MSL-1 ou PAc. Contudo, o microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico pode ser
10 ligar em outra proteína ou estrutura de superfície de Estreptococos mutantes, agregando deste modo Estreptococos mutantes e eliminando-os da cavidade oral como aqui descrito. É sabido que o Streptococcus mutans se liga via dito antígeno estreptococcíco I/I na película. Consequentemente, quando o microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do
15 ácido láctico pode ser ligar, por exemplo, em dito antígeno estreptococcíco I/II, Streptococcus mutans bem como outros microorganismos pertencendo ao grupo de Estreptococos mutantes são impedidos de se ligarem na superfície dos dentes que deste modo ajuda a prevenir e/ou tratar cárie.

 A película é um revestimento fino, transparente contendo
20 proteínas e lipídeos (gorduras) encontrados na saliva. É formada dentro de segundos após uma superfície de dente ser limpa. Formação de película é a primeira etapa em formação de placa dental. Placa dental é um depósito macio que se acumula sobre os dentes. Placa pode ser definida como uma comunidade microbiana complexa, com mais do que 10^{10} bactérias por
25 miligrama. Tem sido estimado que tanto quanto 400 espécies bacterianas distintas podem ser encontradas em placa. Em adição às células bacterianas, placa contém um número pequeno de células epiteliais, leucócitos, e macrófagos. As células estão contidas dentro de uma matriz extracelular, que é formada dos produtos bacterianos e saliva. A matriz extracelular contém

proteína, polissacarídeo e lipídeos. Uma das proteínas presente na saliva é aglutinina que é por um lado considerada causadora de uma remoção parcial de *Streptococcus mutans* da boca, contudo, por outro lado é suspeita de ser facilitadora da adesão de *Streptococcus mutans* na superfície dos dentes, facilitando deste modo a fixação inicial de *Streptococcus mutans* nos dentes e, assim, o início de cárie. Se o microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico se liga especificamente em *Streptococcus mutans* como definido aqui acima pode ser facilmente testado, inter alia, por comparação da reação de dito microorganismo com células de *Streptococcus mutans* com um microorganismo também pertencendo ao gênero de *Lactobacillus* que, contudo, não se liga especificamente em *Streptococcus mutans* pelo emprego preferivelmente do método como descrito aqui acima e nos Exemplos anexados aqui abaixo.

Preferivelmente, o microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico é capaz de se ligar especificamente em *Streptococcus mutans* sorotipo c (DSMZ 20523) e/ou sorotipo e (NCTC 10923) e/ou sorotipo f (NCTC 11060) e/ou *Streptococcus sobrinus* DSM 20742 e/ou *Streptococcus rattus* DSM 20564 e/ou *Streptococcus cricetus* DSM 20562 e/ou *Streptococcus ferus* DSM 20646 e/ou *Streptococcus macacae* DSM 20714.

Isto significa que o microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico se liga preferivelmente em pelo menos um microorganismo selecionado do grupo consistindo de *Streptococcus mutans* sorotipo c (DSMZ 20523), sorotipo e (NCTC 10923), sorotipo f (NCTC 11060), *Streptococcus sobrinus* DSM 20742, *Streptococcus rattus* DSM 20564, *Streptococcus cricetus* DSM 20562, *Streptococcus ferus* DSM 20646 e *Streptococcus macacae* DSM 20714. Mais preferivelmente, o microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico se liga em qualquer combinação, agrupamento de subgrupo das

bactérias acima mencionadas. Ainda mais preferivelmente, o microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico liga-se em todas as bactérias acima mencionadas. De acordo com a presente invenção um "sorotipo" é uma propriedade antigênica de uma célula bacteriana, preferivelmente de uma célula de *Streptococcus mutans* ou *Streptococcus sobrinus* identificada por métodos sorológicos conhecidos na técnica.

Como descrito acima, a ligação específica do microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico em *Streptococos* mutantes é resistente ao tratamento térmico.

Consequentemente, o microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico é tratado com calor, por exemplo, em uma temperatura acima de 15°C ou 37°C. Mais preferivelmente, as células são incubadas em uma temperatura de maior do que 55°C, ainda mais preferivelmente de maior do que 65°C, particularmente preferivelmente maior do que 95°C e muito mais preferivelmente a 121°C. Após esfriamento, a capacidade do microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico para se ligar especificamente em *Streptococos* mutantes é determinada como aqui descrito.

A temperatura correspondente pode ser dependente da espécie específica de *Lactobacillus* mas pode ser facilmente determinada pela pessoa experiente pro experimentação rotineira, e.g. por incubação das células correspondentes em temperaturas diferentes e determinação da quantidade de células de *Lactobacillus* que ainda são capazes de se ligarem especificamente em *Streptococos* mutantes pelo uso dos métodos como descrito aqui nos exemplos.

Geralmente, o tratamento térmico deve durar por um período de tempo de pelo menos 1 minuto. Preferivelmente, o tratamento térmico dura por um período de tempo de pelo menos n minutos, sendo que n é um número inteiro dentro da faixa de 2 a 60, com n=20 sendo particularmente preferido.

Contudo, em princípio não há limite superior para o tempo de incubação. Contudo, é preferivelmente não ser mais longo do que 4, 3, 2 ou 1 hora(s). O tratamento térmico mais preferido é de pelo menos 20 minutos em uma temperatura de 121°C em um vapor saturado tendo uma pressão atmosférica de 200 kPa. O tratamento térmico mais preferido é considerado como revogador de qualquer função de uma proteína e de qualquer vitalidade de células, que assim distingue o microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico do outro microorganismo que ainda é capaz de se ligar especificamente em *Streptococos* mutantes. Como consequência, é muito útil para uso em qualquer alimento, ração, bebida ou composição no contexto da presente invenção se for desejado que o microorganismo não deva estar vivo.

Preferivelmente, microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico, que tem sido submetido a um tratamento térmico como descrito aqui acima, tem uma capacidade aumentada de ligação específica em uma bactéria pertencendo ao grupo de *Streptococos* mutantes. O termo "capacidade aumentada" significa um aumento da ligação, como mensurável, por exemplo, por um ensaio como descrito aqui acima, preferivelmente como descrito em Exemplo 5, em pelo menos 5%, preferivelmente pelo menos 10%, mais preferivelmente pelo menos 20% e muito mais preferivelmente pelo menos 30%. Em uma modalidade preferida, um microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico, que tem uma capacidade aumentada de ligação específica em uma bactéria pertencendo ao grupo de *Streptococos* mutantes ao ter sido submetido a um tratamento térmico pertence à espécie *Lactobacillus paracasei*, mais preferivelmente a *L. paracasei* ssp. *paracasei* e muito mais preferivelmente a *L. paracasei* ssp. *paracasei* Lb-Ob-K5 (DSM 16671).

A ligação específica do microorganismo acima mencionado

pertencendo ao grupo de bactérias do ácido lático é adicionalmente caracterizada por sua resistência ao tratamento com protease que é tratamento com uma protease selecionada do grupo consistindo de pronase E, proteinase K, tripsina e quimiotripsina. Estas proteinases são proteases, que não mostram especificidade, e assim, são consideradas como degradadoras de qualquer proteína que estiver sobre a superfície celular de um microorganismo. Outras proteases, que conhecidamente têm preferência por certos padrões de resíduos de aminoácido são elastase, trombina, aminopeptidase I, carboxipeptidase, do tripsina, endoproteinase, papaína, pepsina ou proteases. As últimas proteases também poderia ser usadas para testar se a ligação específica do microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido lático em *Streptococcus* mutantes é resistente às últimas proteases mais específicas. Assim, após tratamento com protease, que é descrito nos Exemplos anexados, o microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido lático ainda é capaz de se ligar especificamente em *Streptococcus* mutantes.

Em adição, a ligação específica do microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido lático é adicionalmente caracterizada por sua dependência de cálcio. Preferivelmente, a ligação específica ocorre na presença de uma concentração de íons cálcio entre 0,05 mM e 500 mM, preferivelmente entre 1 mM e 100 mM. Particularmente preferido a concentração de íon cálcio está entre 2 mM e 30 mM. A dependência de cálcio da ligação específica pode ser testada como descrito nos Exemplos anexados.

Além disso, a ligação específica no microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido lático é mantida sobre uma faixa de pH entre 4,0 e 9,0, preferivelmente entre 4,0 e 7,0. Em particular, o valor de pH no qual a ligação específica ainda ocorre é preferivelmente 4,5. Ensaio da manutenção da ligação específica sobre a faixa

de pH descrita acima é mostrado nos Exemplos anexados. Ademais, a ligação específica é independente de magnésio. Assim, não é necessário que íons magnésio ou sais de magnésio estejam presentes o que é demonstrado nos Exemplos anexados.

5 Ainda uma outra característica da ligação específica é sua ocorrência na presença de saliva. Saliva é uma secreção exógena que é sintetizada pelas glândulas salivares. É um líquido complexo contendo, à parte de cerca de 99% de água uma multiplicidade de compostos orgânicos e inorgânicos. Ingredientes fisiológicos da saliva são, inter alia, enzimas, e.g.,
10 amilases, carboanidrases, lisozima, peroxidases ou proteínas, e.g., mucinas, lactoferrina, proteínas ricas em prolina, cistatinas, histatinas ou estaterinas ou IgA solúvel. Assim, embora uma variedade de substâncias potencialmente interferentes esteja presente em saliva, a ligação específica do microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico não foi perturbada ou impedida. Para testar a ligação específica
15 na presença de saliva, é preferido que seja usada a saliva que contém preferivelmente a espécie *Streptococcus* descrita em Exemplo 6 e/ou a espécie *Staphylococcus* de Exemplo 6. Se, contudo, espécie *Lactobacillus rhamnosus* como descrito acima for testada para ligação específica em *Estreptococos*
20 mutantes na presença de saliva, é preferido que *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* seja omitido. A ligação específica é ensaiada como aqui descrito.

 As características anteriormente mencionadas do microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico tornam um agente eficaz e robusto para prevenir e/ou tratar cárie
25 porque é principalmente administrado em várias formas na boca incluindo a cavidade oral e os dentes onde, inter alia, está presente saliva incluindo certas proteases e valores de pH baixo após digestão de gêneros alimentícios contendo carboidrato. Além disso, a resistência ao calor tem efeitos benéficos

em adição o microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico como aditivo para gêneros alimentícios durante a preparação de ditos gêneros alimentícios. A saber, gêneros alimentícios são muitas vezes esterilizados por calor, pré-cozidos, pasteurizados e semelhante o que é prejudicial para a viabilidade de microorganismos.

Em outro aspecto da presente invenção um derivado do microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico é utilizado no uso descrito. O termo "derivado do microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico" significa um análogo, fragmento ou uma forma inativada do microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico, que está termicamente inativado ou liofilizado, sendo que dito análogo, fragmento ou forma inativada, mantém a capacidade de se ligar especificamente em *Streptococos* mutantes. De acordo com a presente invenção o termo "análogo ou forma inativada do microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico" inclui uma célula morta ou inativada do microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico, preferivelmente da espécie *Lactobacillus* aqui mostrada que não é mais capaz de formar uma colônia única sobre uma placa específica para microorganismos pertencendo ao gênero de *Lactobacillus*. Dita célula morta ou inativada pode ter uma membrana celular intacta ou rompida. Métodos para matar ou inativar células do microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico são conhecidos na técnica. El-Nezami et al., J. Food Prot. 61 (1998), 466-468 descreve um método para inativar espécie *Lactobacillus* por irradiação-UV. Preferivelmente, as células do microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico são termicamente inativadas ou liofilizadas como descrito nos Exemplos anexados. Liofilização das células como descrito acima tem a vantagem de

que elas podem ser facilmente armazenadas e manuseadas enquanto mantêm sua capacidade de se ligarem especificamente em *Estreptococos* mutantes. Além disso, células liofilizadas podem ser crescidas de novo quando aplicadas sob condições conhecidas na técnica em meios líquidos ou sólidos apropriados. Liofilização é feita por métodos conhecidos na técnica. Preferivelmente, é realizada por pelo menos 2 horas na temperatura ambiente, i.e. qualquer temperatura entre 16°C e 25°C. Além disso, as células liofilizadas do microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico são estáveis por pelo menos 4 semanas em uma temperatura de 4°C de modo a ainda se ligarem especificamente em *Estreptococos* mutantes como é mostrado em Exemplo 7 ou 8, aqui abaixo. Inativação térmica pode ser realizada por incubação das células do microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico por pelo menos 2 horas em uma temperatura de 170°C. Ainda, inativação térmica é preferivelmente realizada por esterilização em autoclave de ditas células em uma temperatura de 121°C por pelo menos 20 minutos na presença de vapor saturado em uma pressão atmosférica de 200 kPa. Na alternativa, inativação térmica das células do microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico é realizada por congelamento de ditas células por pelo menos 4 semanas, 3 semanas, 2 semanas, 1 semana, 12 horas, 6 horas, 2 horas ou 1 hora a -20°C. É preferido que pelo menos 70%, 75% ou 80%, mais preferivelmente 85%, 90% ou 95% e particularmente preferido pelo menos 97%, 98%, 99% e mais particularmente preferido, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% ou 99,9% e mais particularmente preferido 100% das células do análogo do microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico estejam mortas ou inativadas, contudo, ainda têm a capacidade para se ligarem especificamente em *Estreptococos* mutantes. Se a forma, o análogo ou o fragmento inativada(o) do microorganismo acima

mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico está de fato morto ou inativado pode ser testado por métodos conhecidos na técnica, por exemplo, por um teste de viabilidade.

O termo "análogo ou forma inativado(a) do microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico" também inclui lisados, frações ou extratos do microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico, preferivelmente da espécie *Lactobacillus* aqui mostrada, sendo que ditos lisados, frações ou extratos são preferivelmente capazes de se ligarem especificamente em uma bactéria pertencendo ao grupo de *Streptococos* mutantes. Esta capacidade de ligação pode ser testada como aqui descrito e em particular como descrito nos Exemplos anexados. No caso, um lisado, uma fração ou um extrato do microorganismo de acordo com o aspecto (i) da invenção, como descrito aqui acima, pode não se ligar especificamente em uma bactéria pertencendo ao grupo de *Streptococos* mutantes, então a pessoa experiente pode, por exemplo, adicionalmente purificar dito lisado, fração ou extrato por métodos conhecidos na técnica, que são exemplificados aqui abaixo, de modo a remover substâncias que inibem a ligação. Mais tarde a pessoa experiente na técnica pode de novo testar dito(a) lisado, fração ou extrato para verificar se ele(a) se liga especificamente em uma bactéria pertencendo ao grupo de *Streptococos* mutantes.

De acordo com a presente invenção o termo "lisado" significa uma solução ou suspensão em um meio aquoso de células do microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico que são rompidas. Contudo, o termo não deve ser entendido em nenhum modo limitante. O lisado de célula compreende, e.g., macromoléculas, como DNA, RNA, proteínas, peptídeos, carboidratos, lipídeos e semelhantes e/ou micromoléculas, como aminoácidos, açúcares, ácidos lipídicos e semelhantes, ou suas frações. Adicionalmente, dito lisado compreende fragmentos celulares

que podem ser de estrutura lisa ou granular. Preferivelmente, dito lisado compreende a parede celular ou a membrana celular ou ambas ou porções ou fragmentos de parede celular ou de membrana celular ou de ambas. Métodos para preparar lisados de células de microorganismo são conhecidos na técnica, por exemplo, pelo emprego de prensa francesa, moinho de células usando glóbulos de vidro ou de ferro ou lise enzimática de célula e semelhantes. Em adição, lise de células relaciona-se com vários métodos conhecidos na técnica para abrir/destruir células. O método para lise de uma célula não é importante e qualquer método que pode realizar lise das células do microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico pode ser empregado. Um apropriado pode ser escolhido pela pessoa experiente na técnica, e.g. abertura/destruição de células pode ser feita enzimática, química ou fisicamente. Exemplos não limitantes de enzimas e coquetéis de enzimas são proteases, como proteinase K, lipases ou glicosidases; exemplos não limitantes de agentes químicos são ionosferas, detergentes, como dodecil-sulfato de sódio, ácidos ou bases; e exemplos não limitantes de meios físicos são pressão alta, como prensa francesa, osmolaridade, temperatura, como calor ou frio. Adicionalmente, um método empregando uma combinação apropriada de uma enzima diferente da enzima proteolítica, um ácido, uma base e semelhante também pode ser utilizado. Por exemplo, as células do microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico são lisadas por congelamento e descongelamento, mais preferivelmente congelamento em temperaturas abaixo de -70°C e descongelamento em temperaturas maiores do que 30°C , particularmente congelamento é preferido em temperaturas abaixo de -75°C e descongelamento é preferido em temperaturas maiores do que 35°C e mais preferidas são as temperaturas para congelamento abaixo de -80°C e temperaturas para descongelamento acima de 37°C . Também é preferido que dito congelamento/descongelamento seja repetido por pelo menos 1 vez, mais

preferivelmente por pelo menos 2 vezes, ainda mais preferido por pelo menos 3 vezes, particularmente preferido por pelo menos 4 vezes e muito mais preferido por pelo menos 5 vezes.

Consequentemente, aquelas pessoas experientes na técnica podem preparar os lisados desejados ao se referirem às explicações gerais acima, e apropriadamente modificando ou alterando aqueles métodos, se necessário. Preferivelmente, o meio aquoso usado para os lisados como descrito é água, solução salina fisiológica, ou uma solução tampão. Uma vantagem de um lisado de célula bacteriana é que ele pode ser produzido e armazenado eficientemente em termos de custo porque não necessárias menos instalações técnicas.

Preferivelmente, o termo "extrato" significa um componente subcelular do microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico, e.g., uma macromolécula, como uma proteína, DNA, RNA, um peptídeo, um carboidrato, um lipídeo e semelhantes e/ou uma micromolécula, como um aminoácido, um açúcar, um ácido de lipídeo e semelhantes ou qualquer outro(a) composto ou molécula, ou uma combinação de ditas macromoléculas e/ou micromolécula ou qualquer sua fração, sendo que dito extrato mantém a capacidade de ligação específica em uma bactéria pertencendo ao grupo de *Streptococos* mutantes. Esta ligação específica pode ser testada como aqui descrito e em particular como descrito nos Exemplos anexados. Preferivelmente, dito extrato compreende a parede celular ou a membrana celular ou ambas ou porções ou fragmentos da parede celular ou da membrana celular ou de ambas. Mais preferivelmente, o termo "extrato" refere-se a qualquer um dos componentes subcelulares descritos acima em um meio livre de células.

Em uma outra modalidade preferida um extrato pode ser obtido por lise de células de acordo com vários métodos conhecidos na técnica para abrir/destruir células, como descrito aqui acima e/ou como

sobrenadante de um procedimento de centrifugação de uma cultura do microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico em qualquer tampão, meio ou líquido apropriado conhecido pela pessoa experiente na técnica ou de um lisado de uma tal cultura ou de qualquer outra suspensão de célula adequada. Mais preferivelmente, o extrato pode ser um sobrenadante de cultura celular ou lisado purificado ou qualquer sua fração ou subporção, sendo que dito sobrenadante de cultura celular ou lisado purificado ou qualquer sua fração ou subporção mantém a capacidade de ligação específica em uma bactéria pertencendo ao grupo de *Streptococos* mutantes. Esta ligação pode ser testada como aqui descrito e em particular como descrito nos Exemplos anexados. Métodos adequados para fracionamento e purificação de um lisado, sobrenadante de cultura ou um extrato são conhecidos pela pessoa experiente na técnica e compreendem, por exemplo, cromatografia de afinidade, cromatografia de troca iônica, cromatografia de exclusão de tamanho, cromatografia em fase reversa, e cromatografia com outro material cromatográfico em coluna ou métodos em batelada, outros métodos de fracionamento, e.g., métodos de filtração, e.g., ultrafiltração, diálise, diálise e concentração com exclusão de tamanho em centrifugação, centrifugação em gradientes de densidade ou matrizes de grau, precipitação, e.g., precipitações por afinidade, solubilização por sais ou precipitação por sais (precipitação por sulfato de amônio), precipitações alcoólicas ou qualquer outro método de química de proteínas, de biologia molecular, bioquímico, imunológico, químico ou físico adequado.

De acordo com a invenção, lisados também são preparações de frações de moléculas dos lisados acima mencionados. Estas frações podem ser obtidas por métodos conhecidos por aquelas pessoas experientes na técnica, e.g., cromatografia incluindo, e.g., cromatografia de afinidade, cromatografia de troca iônica, cromatografia de exclusão de tamanho, cromatografia em fase reversa, e cromatografia com outro material cromatográfico em coluna ou

modos em batelada, outros métodos de fracionamento, e.g., métodos de filtração, e.g., ultrafiltração, diálise, diálise e concentração com exclusão de tamanho em centrifugação, centrifugação em gradientes de densidade ou matrizes degrau, precipitação, e.g., precipitações por afinidade, solubilização por sais ou precipitação por sais (precipitação por sulfato de amônio), precipitações alcoólicas ou qualquer outro método de química de proteínas, de biologia molecular, bioquímico, imunológico, químico ou físico adequado para separar os componentes dos lisados acima. Em uma modalidade preferida aquelas frações, que são mais imunogênicas do que outras são preferidas. Aquelas pessoas experientes na técnica são capazes de escolher um método adequado e determinar seu potencial imunogênico ao se referirem às explicações gerais acima e às explicações específicas nos exemplos aqui, e apropriadamente modificando ou alterando aqueles métodos, se necessário.

Consequentemente, o termo "análogo ou forma inativada(o) do microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico" também inclui filtrados do microorganismo da invenção, como descrito aqui acima, preferivelmente da espécie *Lactobacillus* aqui mostrada, sendo que ditos filtrados preferivelmente mantêm a capacidade de ligação específica em uma bactéria pertencendo ao grupo de *Streptococcus* mutantes. Esta ligação pode ser testada como aqui descrito e em particular como descrito nos Exemplos anexados. No caso, um filtrado do microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico, como descrito aqui acima, pode não se ligar especificamente em uma bactéria pertencendo ao grupo de *Streptococcus* mutantes, então a pessoa experiente pode, por exemplo, adicionalmente purificar dito filtrado por métodos conhecidos na técnica, que são exemplificados aqui abaixo, de modo a remover as substâncias que inibem a ligação. Depois a pessoa experiente na técnica pode de novo testar o dito filtrado para verificar se ele especificamente se liga em uma bactéria pertencendo ao grupo de

Estreptococos mutantes.

O termo "filtrado" significa uma suspensão ou solução livre de células do microorganismo da invenção, como descrito aqui acima que tem sido obtido como sobrenadante de um procedimento de centrifugação de uma cultura do microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico em qualquer líquido, meio ou tampão apropriado conhecido pela pessoa experiente na técnica. Contudo, o termo não deve ser entendido em qualquer modo limitante. O filtrado compreende, e.g., macromoléculas, como DNA, RNA, proteínas, peptídeos, carboidratos, lipídeos e semelhantes e/ou micromoléculas, como aminoácidos, açúcares, ácidos de lipídeo e semelhantes, ou suas frações. Métodos para preparar filtrados de microorganismos são conhecidos na técnica. Em adição, "filtrado" relaciona-se com vários métodos conhecidos na técnica. O método exato não é importante e qualquer método que pode realizar filtração das células do microorganismo da invenção, como descrito aqui acima, pode ser utilizado.

"Um fragmento do microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico" inclui qualquer parte das células do microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico. Preferivelmente, dito fragmento é uma fração de membrana obtida por uma preparação de membrana. Preparações de membrana de microorganismos pertencendo ao gênero de *Lactobacillus* podem ser obtidas por métodos conhecidos na técnica, por exemplo, pela utilização do método descrito em Rollan et al., *Int. J. Food Microbiol.* 70 (2001), 303-307, Matsuquchi et al., *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10 (2003), 259-266 ou Stentz et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2000), 4272-4278 ou Varmanen et al., *J. Bacteriology* 182 (2000), 146-154. Alternativamente, uma preparação de célula inteira também é considerada. Preferivelmente, o derivado ou fragmento aqui descrito do microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico mantém a capacidade de

ligação específica em *Streptococos* mutantes que é descrita aqui em detalhe.

Em um aspecto a presente invenção refere-se ao uso do microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico derivado, ou mutante ou um análogo ou fragmento do mesmo para a preparação de uma composição anticariogênica, preferivelmente uma composição cosmética ou farmacêutica, para o tratamento ou a prevenção de cárie causada por *Streptococos* mutantes diferentes de *Streptococcus mutans*. Preferivelmente, a composição compreende um microorganismo pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico, que é capaz de se ligar especificamente em *Streptococos* mutantes ou um mutante, derivado, análogo ou fragmento deste microorganismo. Mais preferivelmente, este microorganismo é um microorganismo depositado como descrito aqui acima ou um mutante ou derivado do mesmo ou um análogo ou fragmento de dito microorganismo. Em uma outra modalidade preferida, dita composição compreende um microorganismo como descrito acima em uma quantidade entre 10^2 to 10^{12} células, preferivelmente 10^3 a 10^8 células por mg em uma forma sólida da composição. No caso de uma forma líquida da composição, a quantidade de microorganismos está entre 10^2 e 10^{13} células por mL. Contudo, para composições específicas a quantidade de microorganismo pode ser diferente daquela aqui descrita. Uma composição anticariogênica preferida da presente invenção não contém lactose dentro de uma faixa entre 1% (p/p) e 6% (p/p). Também é preferido que a composição não contenha mais do que 1%(p/p) de lactose, e.g. contenha menos do que 1%, preferivelmente menos do que 0,9% (p/p), 0,8% (p/p) de lactose, etc. ou que a composição contenha mais do que 6%, 7%, 8% etc. (p/p) de lactose. Alternativamente, mas também é preferido que a composição não contenha lactose.

Em um outro aspecto, uma tal composição anticariogênica pode ser produzida pela inclusão das etapas de formular um microorganismo pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico que é capaz de se ligar

especificamente em *Estreptococos* mutantes ou um mutante, derivado, análogo ou fragmento deste microorganismo com um excipiente ou veículo cosmética, oral ou farmaceuticamente aceitável. Preferivelmente, este microorganismo é um microorganismo depositado como descrito aqui acima ou um mutante, derivado, análogo ou fragmento do mesmo. Uma composição anticariogênica preferida como usada de acordo com a presente invenção não contém lactose dentro de uma faixa entre 1% (p/p) e 6% (p/p). Também é preferido que a composição não contenha mais do que 1%(p/p) de lactose, e.g. contenha menos do que 1%, preferivelmente menos do que 0,9% (p/p), 0,8% (p/p) de lactose, etc. ou que a composição anticariogênica contenha mais do que 6%, 7%, 8% etc. (p/p) de lactose. Alternativamente, mas também é preferido que a composição não contenha lactose.

O termo "composição", como usado de acordo com a presente invenção, refere-se à(s) (a) composição(ções), que compreende(m) pelo menos um microorganismo ou mutante ou derivado como descrito acima, preferivelmente um microorganismo depositado como descrito acima ou um análogo ou fragmento de dito microorganismo. É considerado que as composições como usadas de acordo com a presente invenção, que são descritas aqui abaixo compreendem os ingredientes anteriormente mencionados em qualquer combinação. Ela pode, opcionalmente, compreender pelo menos um outro ingrediente adequado para prevenir e/ou tratar cárie. Consequentemente, pode opcionalmente compreender qualquer combinação dos outros ingredientes descritos aqui adiante. O termo "ingredientes adequados para prevenir e/ou tratar cárie" inclui compostos ou composições e/ou suas combinações que tanto inibem a ligação de *Estreptococos* mutantes na superfície dos dentes, em películas e/ou que quanto inativam *Estreptococos* mutantes. Mais preferivelmente, dito termo inclui compostos ou composições e/ou suas combinações que podem inibir a adesão de *Estreptococos* mutantes na superfície dos dentes, inibem a atividade

de glicosiltransferases de Estreptococos mutantes, inibem ou inativam Estreptococos mutantes, inibem a ligação dependente de aglutinina de Estreptococos mutantes e/ou inibem a ligação dependente de sacarose de Estreptococos mutantes como será descrito abaixo.

5 Em particular, é considerado que a composição opcionalmente adicionalmente compreende compostos que inibem a adesão de Estreptococos mutantes na superfície do dente. Consequentemente, é considerado que um tal composto é um inibidor do peptídeo de sinal competente (CSP) de Streptococcus mutans. Dito inibidor é descrito em CA 2.302.861 como sendo
10 um derivado ou fragmento de dito CSP, que competitivamente inibe a ligação de dito CSP em seu receptor natural, um receptor de histidina cinase, ou que é um anticorpo contra dito CSP. Dito inibidor previne o desenvolvimento de um ambiente de biofilme de placa dental sobre a superfície dos dentes e, assim, previne a ligação de Estreptococos mutantes. Alternativamente, a composição
15 como usada de acordo com a presente invenção pode opcionalmente adicionalmente compreender fragmentos de polipeptídeo de antígeno I/II de Streptococcus mutans que são úteis em tratamento e/ou prevenção de cárie dental. Tais fragmentos de polipeptídeo são descritos em US 6.500.433. A saber, ditos fragmentos de polipeptídeo podem ter a capacidade para aderir na
20 superfície de dente de mamífero pela ligação em aglutinina em uma maneira competitiva com o antígeno I/II naturalmente ocorrente de Streptococcus mutans, prevenindo ou diminuindo assim a adesão de S. mutans no dente. Tem sido mostrado que alguns dos peptídeos de US 6.500.433 inibem adesão de S. mutans em um modelo de superfície de dente (saliva de humano inteira
25 adsorvida em cavidades de placas de microtítulo de poliestireno ou glóbulos de hidróxi-apatita). Consequentemente, US 6.500.433 descreve que estes peptídeos compreendem um ou mais sítios de adesão e aderirão em um dente de mamífero em uma maneira competitiva com AS I/II naturalmente ocorrente. Outro ingrediente opcional da composição como usada de acordo

com a presente invenção é a proteína de adesão fimbrial-associada de Streptococcus mutans, SmaA, ou um seu fragmento como descrito em WO 00/66616. A proteína SmaA é uma proteína de adesão de fímbrias de S. mutans que medeia a ligação das bactérias na película salivar, criada em ser via ligação na proteína salivar de 52 kd, amilase. A proteína SmaA madura tem um peso molecular de cerca de 65 quilodaltons (kd) medido sobre um gel de poliacrilamida redutor, exibe a capacidade de se ligar em amilase, e é a proteína fimbrial imunodominante maior de S. mutans. Consequentemente, é crido que SmaA compete com Estreptococos mutantes pelos sítios de adesão sobre a superfície dos dentes.

Como descrito acima, é considerado que compostos que inibem atividade de glicosiltransferase de Streptococos mutantes estão opcionalmente adicionalmente compreendidos na composição como usada de acordo com a presente invenção. Por exemplo, US 2004/0057908 descreve uma mistura de terpenóides e flavonóides que inibem a atividade de ditas glicosiltransferases. Duarte et al., Biol. Pharm. Bull. 26 (2003), 527-531 descrevem um tipo novo de própolis e suas frações químicas sobre glicosiltransferases e sobre crescimento e aderência de Streptococcus mutans. Consequentemente, dito tipo novo de própolis e suas frações químicas são contemplados para serem um outro ingrediente opcional da composição como usada de acordo com a presente invenção. Koo et al., J. Antimicrob. Chemother. 52 (2003), 782-789 descrevem que apigenina e tt-farnesol inibem acúmulo de biofilme de Streptococcus mutans e produção de polissacarídeo. Como consequência, apigenina e tt-farnesol são contemplados para estarem opcionalmente incluídos na composição como usada de acordo com a presente invenção. Visto que é descrito em Devulapalle et al., Carbohydr. Res. 339 (2004), 1029-1034 que ésteres de ácido graxo - carboidrato afetam a atividade de glicosiltransferase, ditos ésteres de ácido graxo - carboidrato são contemplados para estarem incluídos na composição como usada de acordo

com a presente invenção.

Inibição direta de *Streptococcus mutans* é, por exemplo, descrita em WO 2004/000222. A saber, bacteriófagos geneticamente modificados específicos para *Streptococcus mutans* são usados para tratar cárie bacteriana causada por *Streptococcus mutans*. WO 2004/017988 descreve uma composição de protease biologicamente ativa e pelo menos uma glicosidase biologicamente ativa que é usada para tratar cárie bacteriana. Imazato et al., Biomaterials 24 (2003), 3605-3609 descreve que brometo de metacriloil-óxi-dodecil-piridínio (MDPB) é útil para inibir o crescimento de *Streptococcus mutans*. Consequentemente, é considerado que os compostos anteriormente mencionados podem estar opcionalmente adicionalmente incluídos na composição como usada de acordo com a presente invenção.

Lactoferrina de leite bovino descrita por Mitoma et al., J. Biol. Chem. 276 (2001), 18060-18065 ou extratos de *Helichrysum italicum* descritos por Nostro et al., Lett. Appl. Microbiol. 38 (2004), 423-427 que inibem a ligação dependente de aglutinina ou dependente de sacarose de *Streptococcus mutans* são contemplados para estares opcionalmente adicionalmente incluídos na composição como usada de acordo com a presente invenção.

Além disso, a composição como usada de acordo com a presente invenção pode opcionalmente adicionalmente incluir uma mutanase (1,3-glicanase) que é, por exemplo, descrita em DE 2152620 ou Fuglsang (2000), loc. cit. ou um antibiótico contra *Streptococcus mutans*, por exemplo, aqueles descritos em US 6.342.385; US 5.932.469; US 5.872.001 ou US 5.833.958. Em adição, é notado que a composição como usada de acordo com a presente invenção pode opcionalmente compreender um ou mais dos ingredientes opcionais anteriormente mencionados que são adequados para prevenir e/ou tratar cárie. Assim, dita composição pode conter pelo menos dois, três, quatro, cinco, etc., i.e. "n" ingredientes opcionais, sendo que "n" é

um número inteiro maior do que 2 que não é limitado. Ditos ingredientes ocasionais podem ser combinados em qualquer combinação possível.

A composição pode estar na forma sólida, líquida ou gasosa e pode estar, inter alia, na forma de (a) pó(s), (a) comprimido(s), (a) 5 preparação(ões) de filme, (uma) solução(ções) (um) aerossol(óis), grânulos, pílulas, suspensões, emulsões, cápsulas, xaropes, líquidos, elixires, extratos, tintura ou extratos de fluido ou em uma forma que é particularmente adequada para administração oral.

Preparações de líquido adequadas para administração oral, por 10 exemplo xaropes podem ser preparadas, usando água, sacarídeos convencionais tais como sacarose, sorbitol e frutose, glicóis tais como poli(etileno-glicol) e propileno-glicol, óleos tais como óleo de gergelim, azeite de oliva e óleo de feijão-soja, antissépticos tal como éster de p-hidróxi-benzoato, conservantes tais como derivados de p-hidróxi-benzoato, por 15 exemplo p-hidróxi-benzoato de metila e benzoato de sódio, e outros materiais tais como flavorizantes, por exemplo flavor de morango ou hortelã-pimenta.

Ademais, preparações adequadas para administração oral, por exemplo comprimidos, pós e grânulos podem ser produzidas, usando 20 sacarídeos convencionais tais como sacarose, glicose, manitol, e sorbitol, amido tal como batata, trigo e milho, materiais inorgânicos tais como carbonato de cálcio, sulfato de cálcio, hidrogeno-carbonato de cálcio, e cloreto de sódio, pós de planta tais com celulose cristalina, pó de alcaçuz e pó de genciana, excipientes tal como pinedex, desintegrantes tais como amido, ágar, pó de gelatina, celulose cristalina, carmelose de sódio, carmelose de 25 cálcio, carbonato de cálcio, hidrogeno-carbonato de cálcio e alginato de sódio, lubrificantes tais como estearato de magnésio, talco, óleos vegetais hidrogenados, macrogol, e óleo de silicone, aglutinantes tais como poli(vinil-álcool), hidróxi-propil-celulose, metil-celulose, etil-celulose, carmelose, gelatina, e fluido de cola de amido, tensoativos tal como éster de ácido graxo,

e plastificantes tal como glicerina. Uma preparação(ções) de filme pode ser preparada por métodos conhecidos na técnica. Um exemplo para a preparação de um, filme é fornecido aqui em Exemplo 27.

No caso de administração oral ordinária, a dose do
5 microorganismo ou análogo ou fragmento descrito acima poderia ser (em peso seco) como aqui acima descrito com respeito ao número de células ou com respeito à massa, por exemplo, 1 µg a 50 g, 1 µg a 10 g, 1 µg a 5 mg, 1 µg a 1 mg ou qualquer outro peso por indivíduo por dia ou em várias porções diárias. No caso de dosagem a animais não-humanos, em adição, a dose varia
10 dependendo da idade e da espécie de um animal e da natureza ou severidade de seu sintoma. Sem qualquer limitação específica, a dose para animais é 0,1 mg a 10 g por 1 kg de peso corporal, preferivelmente 1 mg a 1 g por 1 kg de peso corporal uma vez ao dia ou em várias porções diárias. Contudo, estas doses e o número de dosagens podem variar dependendo das condições
15 individuais.

Preferivelmente, a composição anticariogênica como usada de acordo com a presente invenção é uma composição cosmética adicionalmente compreendendo um excipiente ou cosmético cosmeticamente aceitável. Mais preferivelmente, dita composição cosmética é um dentifrício, goma de
20 mascar, pastilha, colutório, enxaguatório bucal, fio dental ou fita dental que tem uma atividade contra *Streptococos* mutantes. Uma composição cosmética preferida como usada de acordo com a presente invenção não contém lactose em uma faixa entre 1% (p/p) e 6% (p/p). Também é preferido que a composição cosmética não contenha mais do que 1%(p/p) de lactose,
25 e.g. contenha menos do que 1%, preferivelmente menos do que 0,9% (p/p), 0,8% (p/p) de lactose, etc. ou que a composição cosmética contenha mais do que 6%, 7%, 8% etc. (p/p) de lactose. Alternativamente, mas também é preferido que a composição cosmética não contenha lactose.

A composição cosmética como usada de acordo com a

presente invenção compreende o microorganismo, mutante, derivado, análogo ou fragmento adicionalmente um veículo cosmética ou oralmente aceitável. Preferivelmente, como mencionado em conexão com a composição como usada de acordo com a presente invenção os microorganismo, mutante, derivado, análogo ou fragmento do mesmo é um microorganismo, mutante, derivado, análogo ou fragmento como descrito aqui acima. Preferivelmente a composição cosmética como usada de acordo com a presente invenção é para uso em aplicações orais. Consequentemente, ela pode estar na forma de uma pasta de dente, dentifrício, pó dental, gel oral tópico, enxaguatório bucal, produto de dentadura, borrifo bucal, pastilha, comprimido oral, goma de mascar, fio dental ou fita dental.

O termo "veículo oral ou cosmeticamente aceitável" como aqui usado significa um veículo adequado, que pode ser usado para aplicar as presentes composições na cavidade oral em uma maneira segura e eficaz. Tal veículo pode incluir materiais tais como fontes de íon flúor, agentes anti-cálculo adicionais, tampões, outros materiais abrasivos, fontes de peróxido, sais de bicarbonato de metal alcalino, materiais espessantes, umectantes, água, tensoativos, dióxido de titânio, sistema flavorizante, xilitol, agentes colorantes, e suas misturas. O termo "quantidade segura e eficaz" como aqui usado, significa uma quantidade suficiente para limpar dentes e reduzir mancha/placa/gengivite/cálculo sem prejudicar os tecidos e as estruturas da cavidade oral.

O pH das presentes composições aqui descritas varia preferivelmente de cerca de 3,0 a cerca de 9,0, com o pH preferido sendo de cerca de 5,5 a cerca de 9,0 e o pH mais preferido sendo 7,0 a cerca de 8,5 ou 9,0.

A composição cosmética é um produto, que no curso ordinário de uso, não é intencionalmente engolida para propósitos de administração sistêmica de agentes terapêuticos particulares, mas em vez disso é mantida

dentro da cavidade oral por um tempo suficiente para contato substancial com todas as superfícies dentais e/ou tecidos orais para propósitos de atividade oral. A composição oral pode ser uma composição oral de fase única ou pode ser uma combinação de duas ou mais composições orais.

5 O termo "dentifrício", como aqui usado, significa pasta, gel, ou formulações líquidas a não ser que especificado de outro modo. A composição de dentifrício pode estar em qualquer forma desejada, tal como profundamente listrada, superficialmente listrada, em multicamadas, tendo o gel circundando a pasta, o qualquer combinação das mesmas. A composição
10 de dentifrício pode estar condita em um compartimento fisicamente separado de um dispensador e dispensada lado-a-lado. Composições de dentifrício são, por exemplo, descritas em EP-B1 0.617.608.

Composições de dentifrício preferidas são descritas em Exemplos 21 a 24. Em adição aos componentes descritos acima, as
15 composições de dentifrício desta invenção podem conter uma variedade de ingredientes de dentifrício opcionais alguns dos quais são descritos abaixo. Ingredientes opcionais incluem, por exemplo, mas não são limitados a, adesivos, agentes espumantes, agentes flavorizantes, agentes adoçantes, agentes anti-placa adicionais, e agentes colorantes. Estes e outros
20 componentes opcionais são adicionalmente descritos, por exemplo, em US 5.004.597; US 4.885.155; US 3.959.458; e US 3.937.807.

Por exemplo, a pasta de dente pode incluir tensoativos, agentes quelantes, fontes de fluoreto, agentes ativos branqueadores de dentes e substâncias modificadores da cor de dentes, agentes espessantes, umectantes,
25 agentes flavorizantes e adoçantes, sal de bicarbonato de metal alcalino, vários veículos e/ou outros agentes ativos.

Um dos agentes opcionais preferidos como usados de acordo com a presente invenção é um tensoativo, preferivelmente um selecionado do grupo consistindo de tensoativos de sarcosinato, tensoativos de isetionato e

tensoativos de taurato. Preferidos para uso aqui são os sais de metal alcalino ou de amônio destes tensoativos. Mais preferidos aqui são os sais de sódio e de potássio dos seguintes: lauroil-sarcosinato, miristoil-sarcosinato, palmitoil-sarcosinato, estearoil-sarcosinato e oleoil-sarcosinato.

5 Outro agente opcional preferido é um agente quelante tal como ácido tartárico e seus sais farmaceuticamente aceitáveis, ácido cítrico e citratos de metal alcalino e suas misturas. Agentes quelantes são capazes de complexar cálcio encontrado nas paredes celulares das bactérias. Agentes quelantes também podem destruir placa pela remoção de cálcio das pontes de cálcio, que ajudam a manter intacta esta biomassa.

10 É comum haver um composto de fluoreto solúvel em água adicional presente em dentifrícios e outras composições orais em uma quantidade suficiente para dar uma concentração de íon fluoreto na composição a 25°C, e/ou quando é usada de cerca de 0,0025% a cerca de 15 5,0% em peso, preferivelmente de cerca de 0,005% a cerca de 2,0% em peso, para proporcionar efetividade anticárie adicional. Uma ampla variedade de materiais dando íon fluoreto pode ser empregada como fontes de fluoreto solúvel nas presentes composições. Exemplos de materiais dando íon fluoreto adequados são encontrados em US 3.535.421 e US 3.678,154. Fontes de íon 20 fluoreto representativas incluem fluoreto de estanho, fluoreto de sódio, fluoreto de potássio, monofluoro-fosfato de sódio e muitos outros. Fluoreto de estanho e fluoreto de sódio são particularmente preferidos, bem como suas misturas.

25 As composições para cuidado oral como usadas de acordo com a presente invenção também podem compreender agentes ativos branqueadores de dentes, incluindo agentes alvejante ou oxidantes tais como peróxidos, perboratos, percarbonatos, peróxi-ácidos, persulfatos, cloritos de metal, e suas combinações. Compostos de peróxido adequados incluem peróxido de hidrogênio, peróxido de uréia, peróxido de cálcio, e suas

misturas. Um percarbonato adequado é percarbonato de sódio. Outros agentes branqueadores adequados incluem persulfatos e perbotato mono- e tetra-hidratados de potássio, de amônio, de sódio e de lítio, e pirofosfato de sódio peróxi-hidratado. Cloritos de metal adequados incluem clorito de cálcio, clorito de bário, clorito de magnésio, clorito de lítio, clorito de sódio, e clorito de potássio. O clorito preferido é clorito de sódio. Agentes ativos branqueadores adicionais podem ser hipoclorito e dióxido de cloro.

Em adição aos agentes branqueadores como agentes branqueadores de dentes, substâncias modificadoras da cor de dentes podem ser consideradas dentre os agentes ativos para o cuidado oral úteis na presente invenção. Estas substâncias são adequadas para modificar a cor dos dentes para satisfazer o consumidor. Estas substâncias compreendem partículas que quando aplicadas sobre a superfície do dente modificam aquela superfície em termos de absorção e, ou reflexão de luz. Tais partículas proporcionam um benefício de apresentação externa quando um filme contendo tais partículas é aplicado sobre as superfícies de um dente ou de dentes.

Na preparação de pasta de dente ou geles, é necessário adicionar um pouco de material espessante para proporcionar uma consistência desejável da composição, para proporcionar características de liberação de agente ativo desejáveis sob uso, para proporcionar estabilidade em prateleira, e para proporcionar estabilidade da composição, etc. Agentes espessantes preferidos são polímeros de carbóxi-vinila, carragenano, hidróxi-etil-celulose, LAPONITE® (fabricado pela Rockwood Additives Limited) e sais solúveis em água de éteres de celulose tais como sódio-carbóxi-metil-celulose e sódio-carbóxi-metil-hidróxi-etil-celulose. Gomas naturais tais como goma caraia, goma xantana, goma arábica, e goma tragacanto também podem ser usadas. Silicato de alumínio e magnésio coloidal ou sílica finamente dividida podem ser usados como parte do agente espessante para adicionalmente melhorar a textura.

Outro componente opcional de veículos tópicos, orais das

composições da presente invenção é umectante. O umectante serve para evitar que as composições de pasta de dente endureçam ao serem expostas ao ar, para dar às composições uma sensação úmida na boca, e, para umectantes específicos, para proporcionar às composições de pasta de dente doçura de sabor desejável. O umectante, em uma base de umectante puro, geralmente compreende de cerca de 0% a cerca de 70%, preferivelmente de cerca de 5% a cerca de 25%, em peso da composição aqui. Umectantes adequados para uso em composições da presente invenção incluem álcoois poliídricos edíveis tais como glicerina, sorbitol, xilitol, butileno-glicol, poli(etileno-glicol), e propileno-glicol, especialmente sorbitol e glicerina.

Agentes flavorizantes e adoçantes também podem ser adicionados nas composições. Agentes flavorizantes adequados incluem óleo de gaultéria, óleo de hortelã-pimenta, óleo de hortelã, óleo de cravo-da-índia, mentol, anetol, salicilato de metila, eucaliptol, cássia, acetato de 1-mentila, salva, eugenol, óleo de salsa, oxanona, alfa-irisona, manjerona, limão, laranja, propenil-guaetol, canela, baunilha, timol, linalool, cinamaldeído-glicerol-acetato conhecido como CGA, e suas misturas. Agentes flavorizantes são em geral usados nas composições em níveis de cerca de 0,001% a cerca de 5%, em peso da composição.

Agentes adoçantes que podem ser usados incluem sacarose, glicose, sacarina, dextrose, levulose, lactose como descrito aqui acima, manitol, sorbitol, frutose, maltose, xilitol, sais de sacarina, taumatina, aspartame, D-triptofano, diidro-calconas, acesulfame e sais de ciclamato, especialmente ciclamato de sódio e sacarina sódica, e suas misturas. A composição preferivelmente contém de cerca de 0,1% a cerca de 10% destes agentes, preferivelmente de cerca de 0,1% a cerca de 1%, em peso da composição.

A presente invenção também pode incluir um sal de bicarbonato de metal alcalino. Sais de bicarbonato de metal alcalino são

solúveis em água e a não ser que estejam estabilizados, tendem a liberar dióxido de carbono em um sistema aquoso. Bicarbonato de sódio, também conhecido como hidrogeno-carbonato de sódio, é o sal de bicarbonato de metal alcalino preferido. A presente composição pode conter de cerca de 0,5% a cerca de 30%, preferivelmente de cerca de 0,5% a cerca de 15%, e mais preferivelmente de cerca de 0,5% a cerca de 5% de um sal de bicarbonato de metal alcalino. Água empregada na preparação de composições orais comercialmente adequadas deve ser preferivelmente de baixo teor de íon e estar livre de impurezas orgânicas. Água geralmente compreende de cerca de 10% a cerca de 50%, e preferivelmente de cerca de 20% a cerca de 40%, em peso das composições aquosa de pasta de dente aqui. Estas quantidades de água incluem a água livre que é adicionada mais aquela que é introduzida com outros materiais, tal como com sorbitol. Dióxido de titânio também pode ser adicionado na presente composição. Dióxido de titânio é um pó branco, que proporciona opacidade às composições. Dióxido de titânio geralmente compreende de cerca de 0,25% a cerca de 5% em peso das composições de dentifrício.

O pH das presentes composições é preferivelmente ajustado através do uso de agentes tampão. Agentes tampão, como aqui usados, referem-se aos agentes que podem ser usados para ajustar o pH das composições para uma faixa de cerca de 4,5 a cerca de 9,5. Agentes tampão incluem fosfato monossódico, fosfato trissódico, hidróxido de sódio, carbonato de sódio, pirofosfato ácido de sódio, ácido cítrico, e citrato de sódio. Agentes tampão podem ser administrados em um nível de cerca de 0,5% a cerca de 10%, em peso das presentes composições. O pH das composições de dentifrício é medido de uma pasta fluida aquosa 3:1 de dentifrício, e.g., 3 partes de água para 1 parte de pasta de dente.

Outros agentes opcionais que podem ser usados nas presentes composições incluem copolióis de dimeticona selecionados de copolióis de

alquil- e alcóxi-dimeticona, tais como copolióis de C12 a C20 alquil-dimeticona e suas misturas. Elevadamente preferido é copoliol de cetil-dimeticona comercializado sob o Nome Comercial Abil EM90. O copoliol de dimeticona está geralmente presente em um nível de cerca de 0,01% a cerca de 25%, preferivelmente de cerca de 0,1% a cerca de 5%, mais preferivelmente de cerca de 0,5% a cerca de 1,5% em peso. Os copolióis de dimeticona ajudam a proporcionar benefícios positivos de sensação dental. Outros veículos úteis incluem formulações de dentifrício bifásicas tais como aqueles mostrados em US 5.213.790: US 5.145.666: US 5.281.410: US 4.849.213 e US 4.528.180.

As presentes composições cosméticas também podem incluir outros agentes ativos, tais como agentes antimicrobianos. Incluídos dentre tais agentes estão agentes antimicrobianos não-catiônicos insolúveis em água tais como difenil-éteres halogenados, compostos fenólicos incluindo fenol e seus homólogos, mono- e poli-alquil-halo-fenóis e halo-fenóis aromáticos, resorcinol e seus derivados, compostos bisfenólicos e salicilanilidas halogenadas, ésteres benzóicos, e carbanilidas halogenadas. Os agentes antimicrobianos solúveis em água incluem sais de amônio quaternário e sais de bis-biguanida, dentre outros. Monofosfato de triclosan é um agente antimicrobiano solúvel em água adicional. Os agentes de amônio quaternário incluem aqueles nos quais um ou dois dos substituintes do nitrogênio quaternário têm um comprimento de cadeia de carbono (tipicamente grupo alquila) de cerca de 8 a cerca de 20, tipicamente de cerca de 10 a cerca de 18 átomos de carbono enquanto que os substituintes restantes (tipicamente grupo alquila ou benzila) têm um número menor de átomos de carbono, tal como de cerca de 1 a cerca de 7 átomos de carbono, tipicamente grupos metila ou etila. Brometo de dodecil-trimetil-amônio, cloreto de tetradecil-piridínio, brometo de dimifeno, cloreto de N-tetradecil-4-etil-piridínio, brometo de dodecil-dimetil-(2-fenóxi-etil)-amônio, cloreto de benzil-dimetil-estearil-amônio,

cloreto de cetil-piridínio, 5-amino-1,3-bis(2-etil-hexil)-5-metil-hexa-hidro-pirimidina quaternizada, cloreto de benzalcônio, cloreto de benzetônio e cloreto de metil-benzetônio são agentes antibacterianos de amônio quaternário típicos. Outros compostos são bis[4-(R-amino)-1-piridínio]-alcanos como

5 mostrados em US 4.206.215. Outros agentes antimicrobianos tais como bisglicinato de cobre, glisinato de cobre, citrato de zinco, e lactato de zinco também podem ser incluídos. Enzimas são outro tipo de agente ativo que pode ser usado nas presentes composições. Enzimas úteis incluem aquelas que pertencem à categoria de proteases, enzimas líticas, inibidores de matriz

10 de placa e oxidases: Proteases incluem papaína, pepsina, tripsina, ficina, bromelina; enzimas líticas de parede celular incluem lisozima; inibidores de matriz de placa incluem dextrases, mutanases; e oxidases incluem glicose oxidase, lactato oxidase, galactose oxidase, ácido úrico oxidase, peroxidases incluindo peroxidase de rábano, mieloperoxidase, lactoperoxidase,

15 cloroperoxidase. As oxidases também têm atividade branqueadora/limpadora, em adição às propriedades antimicrobianas. Tais agentes são mostrados em US 2.946.725 e em US 4.051.234. Outros agentes antimicrobianos incluem clorexidina, triclosan, monofosfato de triclosan, e óleos flavorizantes tal como timol. Triclosan e outros agentes deste tipo são mostrados em US 5.015.466 e

20 US 4.894.220. Estes agentes, que proporcionam benefícios de anti-placa, podem estar presentes em níveis de cerca de 0,01% a cerca de 5,0%, em peso da composição de dentifrício.

O termo "goma de mascar" como aqui definido significa uma composição de confeito que é adequada para mastigar e que compreende

25 alguma quantidade adequada de elastômero, conhecido pela pessoa experiente na técnica, preferivelmente uma quantidade de 2% ou maior, em peso da composição. Componentes adequados de pastilha e goma de mascar são, por exemplo, mostrados em US 4.083.955; US 6.770,264 ou US 6.270.781. Pastilhas adequadas são aquelas descritas em Exemplos 19 e 20. Uma

composição preferida de goma de mascar é descrita em Exemplo 25.

Composições como usadas de acordo com a presente invenção preferivelmente compreendem um elastômero, ou misturas de vários elastômeros diferentes. Materiais elastoméricos são geralmente conhecidos na técnica mas exemplos ilustrativos incluem borracha de estireno-butadieno (SBR); gomas sintéticas; poliisobutileno e copolímeros de isobutileno-isopreno; gomas naturais; chicle; borracha natural; jelutong; balata; guttapercha; lechi caspi; sorva; e suas misturas. Composições como usadas de acordo com a presente invenção preferivelmente compreendem de cerca de 2% a cerca de 30%, mais preferivelmente de cerca de 5% a cerca de 25%, em peso, de elastômero. Estes níveis são determinados pela textura final desejada da goma de mascar porque quando o nível total de elastômero está abaixo de cerca de 2% a composição base é falta de elasticidade, textura de mascar, e coesividade enquanto que em níveis acima de cerca de 30% a formulação é dura, borrachosa e mantém uma mastigação tensa. Solventes de elastômero também estão preferivelmente presentes em composições como usadas de acordo com a presente invenção porque ajudam a amaciar o componente elastômero. Exemplos preferidos de solventes de elastômero para uso aqui incluem o pentaeritritol-éster de breu de madeira parcialmente dimerizado, glicerol-éster de breu polimerizado, glicerol-éster de talol, breu de goma ou de madeira, glicerol-éster de breu parcialmente hidrogenado, metil-éster de breu parcialmente hidrogenado, e suas misturas. Composições como usadas de acordo com a presente invenção preferivelmente compreendem de cerca de 2% a cerca de 50%, mais preferivelmente de cerca de 10% a cerca de 35%, em peso, de solvente de elastômero.

Pastilhas para uso de acordo com esta invenção podem ser preparadas, por exemplo, por técnicas reconhecidas na técnica para formar comprimidos prensados onde o dissacarídeo é dispersado sobre um veículo sólido comprimível, opcionalmente combinado com alguns auxiliares de

formação de comprimido tal como um lubrificante (e.g., estearato de magnésio) e é comprimido em comprimidos. O componente veículo sólido para tais formulação de formação de comprimido pode ser um sólido solúvel em saliva, tal como um monossacarídeo ou amido solúvel em água fria, de modo que a pastilha se dissolva prontamente na boca para liberar o dissacarídeo contido na solução de saliva para contato com e adsorção pela mucosa oral/faríngea quando a pastilha for mantida dentro da boca. O pH das formulações descritas acima pode variar de cerca de 4 a cerca de 8,5.

Pastilhas para uso de acordo com a presente invenção também podem ser preparadas utilizando outras técnicas de formulação de dosagem unitária sólida reconhecidas na técnica.

Um colutório ou enxaguatório bucal como usado de acordo com a presente invenção poderia preferivelmente ser como segue:

A	Olium menthae	1,2 partes
	Tinctura Arnicae	3,0 partes
	Tinctura Myrrhae	3,0 partes
	Tween	5,0 partes
B	Spiritus 90%	50,0 partes
C	Benzoato de Sódio	0,2 partes
	Agente edulcorante (e.g. aspartane)	0,02 partes
	Água destilada	ad 100

A é para ser bem misturado, B é adicionado sob agitação e C é adicionado subsequentemente. O líquido transparente resultante é para ser filtrado dentro de 48 horas após preparação. Outro colutório preferido é descrito em Exemplo 26.

Independente da forma de dosagem, líquida ou sólida, em uma modalidade preferida da presente invenção a forma de dosagem é mantida dentro da boca do paciente por um período de tempo para promover contato do microorganismo ou análogo ou fragmento de um microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico com a cavidade oral do paciente.

Os termos "fio dental" e "fita dental" como aqui usados referem-se a um material para desalojar e remover material de alimento em decomposição que se acumulou nas superfícies subgengivais e interproximais e para desalojar e remover bactérias, placa e/ou cálculo que se acumulou na cavidade oral. O fio dental ou fita dental pode adicionalmente conter, em adição aos microorganismos de acordo com a presente invenção como descrito aqui acima, agentes limpadores, abrasivos, ingredientes de controle de tártaro, agentes branqueadores, tensoativos e/ou ingredientes ativos como fluoretos, agentes antimicrobianos, agentes quimioterapêuticos ou antibióticos. Outros agentes adicionais são agentes anti-placa, agentes flavorizantes e agentes colorantes. O fio dental ou fita dental pode estar em qualquer forma adequada, conhecida pela pessoa experiente na técnica, por exemplo, na forma de fios dentais de PTFE (Teflon) como descrito, por exemplo, em US 3.664.915, US 3.953.566, US 3.962.153, US 4.096.227, US 4.187.390, US 4.256.806, US 4.385.093, US 4.478.665, US 4.776.358, US 5.033.488, US 5.209.251, US 5.220.932, US 5.518.012, US 5.718.251, US 5.765.576 ou US 5.911.228, na forma de dispositivos interproximais de monofilamento como descritos, por exemplo, em US 3.800.812, US 4.974.615, US 5.760.117, US 5.433.226, US 5.479.952, US 5.503.842, US 5.755.243, US 5.884.639, US 6.003.525 ou US 6.027.592, ou na forma de fitas de bicomponentes. Preferivelmente, o fio dental ou fita dental pode estar na forma de um monofilamento revestido elastomérico como descrito, por exemplo, em US 20050226820 ou na forma de uma fita dental baseada em termoplástico orientado como descrito, por exemplo, em US 20020144704.

As composições cosméticas anticariogênicas como descrito aqui acima podem ser usadas no âmbito de administração oral a humano bem como no âmbito de administração oral veterinária, preferivelmente para animais não-humanos, mais preferivelmente para animais de estimação. Se a composição cosmética anticariogênica é usada no âmbito de administração

oral veterinária, a composição pode conter outros ingredientes adequados para uma tal administração, conhecidos por uma pessoa experiente na técnica.

Em outro aspecto a presente invenção refere-se ao uso de um microorganismo pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico, que é capaz de se ligar especificamente em uma bactéria pertencendo ao grupo de *Streptococos* mutantes como descrito aqui acima, para a preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento ou a profilaxia de cárie causada por *Streptococos* mutantes diferentes de *Streptococcus mutans*. Preferivelmente, uma tal composição farmacêutica compreende um microorganismo ou um derivado ou mutante ou um análogo ou fragmento do mesmo como descrito acima. Mais preferivelmente, uma composição farmacêutica adicionalmente compreende um excipiente ou veículo farmaceuticamente aceitável.

Composições farmacêuticas compreendem uma quantidade terapeuticamente efetiva do microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico ou de um derivado, mutante ou um análogo ou fragmento de dito microorganismo descrito em conexão com a composição como usada de acordo com a presente invenção e podem ser formuladas em várias formas, e.g. em forma sólida, líquida, de pó, aquosa, liofilizada.

A composição farmacêutica pode ser administrada com um veículo farmaceuticamente aceitável a um paciente, como aqui descrito. Em uma modalidade específica, o termo "farmaceuticamente aceitável" significa aprovado por uma agência regulatória ou outra farmacopéia geralmente reconhecida para uso em animais, e mais particularmente em humanos. Uma composição farmacêutica preferida como usada de acordo com a presente invenção não contém lactose em uma faixa entre 1% (p/p) e 6% (p/p). Também é preferido que a composição farmacêutica não contenha mais do que 1%(p/p) de lactose, e.g. contenha menos do que 1%, preferivelmente

menos do que 0,9% (p/p), 0,8% (p/p) de lactose, etc. ou que a composição farmacêutica contenha mais do que 6%, 7%, 8% etc. (p/p) de lactose. Alternativamente, mas também é preferido que a composição farmacêutica não contenha lactose.

5 O termo "veículo" refere-se a um diluente, adjuvante, excipiente, ou agente de transporte com o qual o agente terapêutico é administrado. Um tal veículo é farmaceuticamente aceitável, i.e. é não-tóxico para um paciente recipiente na dosagem e na concentração empregadas. É preferivelmente isotônico, hipotônico ou fracamente hipertônico e tem uma
10 força iônica relativamente baixa, tal como proporcionado por uma solução de sacarose. Tais veículos farmacêuticos podem ser líquidos estéreis, tais como água e óleos, incluindo aqueles de origem em petróleo, animal, vegetal ou sintética, tal como óleo de amendoim, óleo de feijão-soja, óleo mineral, óleo de gergelim e semelhantes. Soluções salinas e soluções aquosas de dextrose e
15 glicerol também podem ser utilizadas como veículos líquidos, particularmente para soluções injetáveis. Excipientes farmacêuticos adequados incluem amido, glicose, sacarose, gelatina, malte, arroz, farinha de trigo, giz, gel de sílica, estearato de sódio, monoestearato de glicerol, talco, íon sódio, leite desnatado em pó, glicerol, propileno-glicol, água, etanol e semelhantes. O
20 excipiente pode conter lactose como descrito aqui acima, mais preferivelmente ele está livre de lactose. A composição, se desejado, também pode conter quantidades menores de agentes umectantes ou emulsificadores, ou agentes tampão de pH. Estas composições podem tomar a forma de soluções, suspensões, emulsão, comprimidos, pílulas, cápsulas, pós,
25 formulações de liberação prolongada e semelhantes. Formulação oral pode incluir veículos padrão tais como graus farmacêuticos de manitol, amido, estearato de magnésio, sacarina sódica, celulose, carbonato de magnésio, etc. Exemplos de veículos farmacêuticos são descritos em "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E.W. Martin. Leite desnatado, leite desnatado

em pó, produtos não contendo leite ou não contendo lactose também podem ser utilizados. O leite desnatado em pó é convencionalmente suspenso em solução salina tamponada com fosfato (PBS), esterilizado em autoclave para erradicar contaminantes proteináceos e vivos, então é seco por congelamento, seco por calor, seco a vácuo, ou liofilizado. Alguns outros exemplos de substâncias que podem servir como veículos farmacêuticos são açúcares, tais como glicose e sacarose; amidos tais como amido de milho e amido de batata; celulose e seus derivados tais como sódio-carbóxi-metil-celulose, etil-celulose e acetatos de celulose; tragacanto em pó; malte; gelatina; talco; ácidos esteáricos; estearato de magnésio; sulfato de cálcio; carbonato de cálcio; óleos vegetais, tais como óleos de amendoim, óleo de semente de algodão, óleo de gergelim, azeite de oliva, óleo de milho e óleo de teobroma; polióis tais como propileno-glicol, glicerina, sorbitol, manitol, e poli(etileno-glicol); ágar; ácidos algínicos; água livre de pirógeno; solução salina isotônica; oxicoco, extratos e solução de tampão fosfato; leite desnatado em pó; bem como outras substâncias compatíveis não-tóxicas usadas em formulações farmacêuticas tais como Vitamina C, estrogênio e echinacea, por exemplo. Agentes umectantes e lubrificantes tal como lauril-sulfato de sódio, bem como agentes colorantes, agentes flavorizantes, lubrificantes, excipientes, agentes de formação de comprimido, estabilizadores, antioxidantes e conservantes, também podem estar presentes.

Preferivelmente, a formulação oral contém lactose como aqui descrito e está mais preferivelmente livre de lactose. Vários veículos e/ou excipientes adequados para administração oral que são bem conhecidos na técnica podem ser usados para o propósito desta invenção. A composição não-cariogênica pode, se desejado, adicionalmente conter vários aditivos tais como, por exemplo, conservantes, agentes endurecedores, lubrificantes, emulsificadores, estabilizadores, essência e semelhantes. Tais composições conterão uma quantidade terapeuticamente efetiva dos compostos

anteriormente mencionados, preferivelmente na forma pura, junta com uma quantidade adequada de veículo de modo a proporcionar a forma para administração apropriada ao paciente. A formulação deve se ajustar ao modo de administração.

5 Geralmente, os ingredientes são fornecidos quer separadamente quer misturados juntos em forma de dosagem unitária, por exemplo, como um pó liofilizado seco ou concentrado livre de água em um recipiente hermeticamente vedado tal como uma ampola ou sachê indicando a quantidade de agente ativo. Onde a composição é para ser administrada por
10 infusão, ela pode ser dispersada em uma garrafa de infusão contendo solução salina ou água de grau farmacêutico estéril.

 A composição farmacêutica da invenção pode ser formulada como uma forma neutra ou salina. Sais farmaceuticamente aceitáveis incluem aqueles formados com ânions tais como aqueles derivados de ácidos
15 clorídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., e aqueles formados com cátions tais como aqueles derivados de hidróxidos de sódio, potássio, amônio, cálcio, férrico, isopropil-amina, trietil-amina, 2-etil-amino-etanol, histidina, procaina, etc.

 Ensaios in vitro podem ser opcionalmente utilizados para
20 ajudar a identificar faixas de dosagem ótimas. A dose precisa a ser utilizada na formulação também dependerá da rota de administração, e da severidade da doença ou do distúrbio, e deve ser decidida de acordo com o julgamento do médico e cada uma das circunstâncias do paciente. Doses efetivas podem ser extrapoladas das curvas de dose-resposta derivadas de sistemas de teste de
25 modelo animal ou in vitro. Preferivelmente, a composição farmacêutica é administrada diretamente ou em combinação com um adjuvante. Adjuvantes podem ser selecionados do grupo consistindo de uma cloroquina, compostos polares próticos, tais como propileno-glicol, poli(etileno-glicol), glicerol, EtOH, 1-metil-L-2-pirrolidona ou seus derivados, ou compostos polares

apróticos tais como dimetil-sulfóxido (DMSO), dietil-sulfóxido, di-n-propil-sulfóxido, dimetil-sulfona, sulfolano, dimetil-formamida, dimetil-acetamida, tetrametil-uréia, acetonitrila ou seus derivados. Estes compostos são adicionados em condições respeitando as limitações de pH. A composição

5 como usada de acordo com a presente invenção pode ser administrada a um vertebrado. "Vertebrado" como aqui usado é intencionado para ter o mesmo significado como comumente entendido por uma pessoa ordinariamente experiente na técnica. Particularmente, "vertebrado" inclui mamíferos, e mais particularmente humanos.

10 O termo "administrado" significa administração de uma dose terapêuticamente efetiva da composição anteriormente mencionada. "Quantidade terapêuticamente efetiva" significa uma dose que produz os efeitos para os quais ela é administrada, preferivelmente este efeito é anticariogênico. A dose exata dependerá do propósito do tratamento, e será

15 verificável por uma pessoa experiente na técnica usando técnicas conhecidas. Como é conhecido na técnica e descrito acima, ajustes para liberação localizada versus sistêmica, idade, peso corporal, saúde geral, sexo, dieta, tempo de administração, interação de droga e a severidade da condição podem ser necessários, e serão verificáveis com experimentação de rotina por aquelas

20 pessoas experientes na técnica.

Os métodos são aplicáveis a ambas aplicações veterinária e de terapia de humano. Os compostos aqui descritos tendo a atividade terapêutica desejada podem ser administrados em um veículo fisiologicamente aceitável a um paciente, como aqui descrito. Dependendo da maneira de introdução, os

25 compostos podem ser formulados em uma variedade de modos como discutido abaixo. A concentração de composto terapêuticamente ativo na formulação pode variar de cerca de 0,1-100% em peso. Os agentes podem ser administrados sozinhos ou em combinação com outros tratamentos.

A administração da composição farmacêutica pode ser feita

em uma variedade de modos como discutido acima, incluindo, mas não limitados a, oral, subcutânea, intravenosa, infra-arterial, intranodal, intramedular, intratecal, intraventricular, intranasal, intrabronquial, transdermal, intranodal, intrarretal, intraperitoneal, intramuscular, intrapulmonar, vaginal, retal, ou intraocularmente. Preferivelmente a administração é oral u bucal. O médico atendente e fatores clínicos determinarão o regime de dosagem. Como é bem conhecido nas artes médicas, dosagens para qualquer um paciente depende de muitos fatores, incluindo tamanho do paciente, área de superfície corporal, idade, o composto particular a ser administrado, sexo, tempo e rota de administração, saúde geral, e outras drogas sendo administradas concorrentemente. Uma dose típica pode estar, por exemplo, dentro da faixa de 0,001 a 1.000 (ig; contudo, doses abaixo ou acima desta faixa exemplar são consideradas, especialmente considerando os fatores anteriormente mencionados.

As dosagens são preferivelmente dadas uma vez por semana, contudo, durante a progresso do tratamento as dosagens podem ser dadas em intervalos de tempo muito mais longos e em necessidade podem ser dadas em intervalos de tempo muito mais curtos, e.g., diariamente. Em um caso preferido a resposta imune é monitorada usando os métodos aqui descritos e outros métodos conhecidos por aquelas pessoas experientes na técnica e dosagens são otimizadas, e.g., em tempo, quantidade e/ou composição. Progresso pode ser monitorado por avaliação periódica. A composição farmacêutica da invenção pode ser administrada local ou sistemicamente. Também é considerado que as composições farmacêuticas são utilizadas em abordagens de co-terapia, i.e. em co-administração com outros medicamentos ou drogas, por exemplo outras drogas para prevenir, tratar ou melhorar cárie, que são aqui descritos.

Em outra modalidade preferida a presente invenção refere-se ao uso de um microorganismo pertencendo ao grupo de bactérias do ácido

lático, que é capaz de se ligar especificamente em uma bactéria pertencendo ao grupo de Estreptococos mutantes como descrito aqui acima, para a preparação de uma composição anticariogênica para o tratamento ou a profilaxia de cárie causada por Estreptococos mutantes diferentes de Streptococcus mutans, sendo que a composição anticariogênica é um gênero alimentício ou uma ração. Preferivelmente uma composição anticariogênica na forma de um gênero alimentício ou uma ração é uma composição de alimento ou de ração compreendendo um microorganismo, mutante, derivado, análogo ou fragmento do mesmo como descrito aqui acima adicionalmente compreendendo um excipiente ou veículo oralmente aceitável. Mais preferivelmente, o microorganismo, mutante, derivado, análogo ou fragmento do mesmo é um microorganismo depositado como aqui descrito acima ou um mutante, derivado ou fragmento do mesmo.

"Alimento" ou "ração" compreende qualquer coisa comestível, palatável e/ou bebível para mamíferos, por exemplo, humanos ou animais, e.g., animais de estimação como aqui descrito. Alimento e ração são aqui descritos alhures. Um "veículo oralmente aceitável" é descrito aqui acima e é preferivelmente não tóxico e de grau de alimento e/ou de ração. Ainda, este termo também inclui os veículos mencionados em conexão com a composição farmacêutica como usada de acordo com a presente invenção. Uma composição de alimento ou ração preferida como usada de acordo com a presente invenção não contém lactose em uma faixa entre 1% (p/p) e 6% (p/p). Também é preferido que a composição de alimento ou ração não contenha mais do que 1% (p/p) de lactose, e.g. contenha menos do que 1%, preferivelmente menos do que 0,9% (p/p), 0,8% (p/p) de lactose, etc. ou que a composição de alimento ou ração contenha mais do que 6%, 7%, 8% etc. (p/p) de lactose. Alternativamente, mas também é preferido que a composição de alimento ou ração não contenha lactose.

De acordo com a presente invenção, o termo "gênero

alimentício" inclui todo alimento comestível e bebível e bebidas. Consequentemente, o microorganismo, derivado, análogo ou fragmento do mesmo pode estar incluído em um alimento ou em uma bebida. Estes são, por exemplo, goma, borrifo, bebida, confeitos, fórmula infantil, sorvete, sobremesa congelada, molho para salada doce, preparações de leite, queijo, queijo-ricota, iogurte livre de lactose, leite acidulado, creme para café e semelhantes.

Produtos baseados em leite são considerados dentro do escopo da invenção. Leite é entendido para significar aquele de origem animal, tal como de vaca, cabra, ovelha, búfala, zebra, égua, macaca, ou camela, e semelhantes. O leite pode estar no estado nativo, ser um leite reconstituído, um leite desnatado ou um leite suplementado com compostos necessários para o crescimento de bactérias ou para o processamento subsequente de leite fermentado, tais como gordura, proteínas de um extrato de levedo, peptona e/ou um tensoativo, por exemplo. O termo leite também aplica-se ao que é comumente chamado de leite vegetal, que se refere aos extratos de material de planta que tem sido tratado ou diferentemente, tais como plantas leguminosas (feijão-soja, grão-de-bico, lentilha e semelhantes) ou sementes oleosas (colza, feijão-soja, gergelim, algodão e semelhantes), cujo extrato contém proteínas em solução ou em suspensão coloidal, que são coaguláveis por ação química, por fermentação ácida e/ou por calor. Finalmente, a palavra leite também denota misturas de leites animais e de leites vegetais.

Onde o microorganismo desta invenção ou derivado ou análogo ou fragmento do mesmo é adicionado em iogurte e semelhantes tendo teores similares, é suficiente adicionar o microorganismo desta invenção em uma concentração de cerca de 10^5 - 10^7 células/mL. Em um tal caso, é possível completamente prevenir ou inibir cáries dentais induzidas por cepas cariogênicas de *Streptococos* mutantes sem efeito colateral significativo sob a qualidade da bebida per se.

Tal alimento, bebida ou ração pode ser produzido(a) por um método geral para produzir alimentos e bebidas ou rações, incluindo adição de ingredientes ativos em um material cru ou cozido do alimento, da bebida ou da ração. O alimento, a bebida ou a ração de acordo com a presente invenção

5 pode ser moldado(a) e granulado(a) na mesma maneira como geralmente usada para alimentos, bebidas ou rações. O método de moldagem e granulação inclui métodos de granulação tais como granulação de camada fluida, granulação por agitação, granulação por extrusão, granulação por rolo, granulação em corrente de gás, granulação por moldagem por compactação,

10 granulação por craqueamento, granulação por pulverização, e granulação por injeção, métodos de revestimento tais como revestimento em recipiente, revestimento em camada fluida, e revestimento com secagem, secagem por sopro, método de vapor em excesso, método de esteira de espuma, métodos de expansão tal como método de incubação em microondas, e métodos de

15 extrusão com extrusores e máquinas de granulação por extrusão.

O alimento, a bebida ou a ração a ser usado(a) na presente invenção inclui qualquer alimento, bebida ou ração que compreende o microorganismo da invenção, derivado ou análogo ou fragmento do mesmo como ingrediente ativo. O ingrediente ativo no alimento, bebida ou ração não

20 é especificamente limitado a qualquer concentração desde que o alimento, bebida ou ração resultante possa exercer sua atividade de se ligar especificamente em *Streptococos* mutantes. A concentração do ingrediente ativo é preferivelmente 0,001 a 100 % em peso, mais preferivelmente 0,01 a 100 % em peso e muito mais preferivelmente 0,1 a 100 % em peso de

25 alimento, bebida ou ração compreendendo tal ingrediente ativo ou com respeito ao número de células daquelas aqui descritas.

Alimentos ou bebidas específicos, nos quais o ingrediente ativo é adicionado, incluem, por exemplo, sucos, bebidas refrescantes, sopas, chás, bebidas de leite coalhado, produtos lácteos tais como leites fermentados,

sorvetes, manteiga, queijo, leite processado e leite desnatado, produtos de carne tais como presunto, linguiça, e hambúrguer, produtos de bolo de carne de peixe, produtos de ovo tais como pastéis e coalho de ovo condimentados, confeitos tais como biscoito, geléia, petiscos, e goma de mascar, pães, talharins, pickles, produtos defumados, peixes fritos e condimentos. A forma do alimento ou da bebida inclui, por exemplo, alimentos em pó, alimentos em folha, alimentos engarrafados, alimentos enlatados, alimentos esterilizados, alimentos em cápsula, alimentos em comprimido e alimentos fluidos.

O alimento ou a bebida com uma atividade para se ligar especificamente em *Streptococos* mutantes para ser ingerido(a) por bebês, são preferivelmente composições nutricionais para bebês. Tais composições nutricionais para bebês incluem leite modificado preparado para bebês, leite decomposto em proteína, leite nutricionalmente modificado específico ou alimentos para bebê e alimentos preparados para crianças entre um e três anos. A forma da composição nutricional para bebês inclui mas não é especificamente limitada aos leites em pó secos e pulverizados e alimentos para bebê e também inclui alimentos gerais tais como sorvete, leite fermentado, e geléia para ingestão infantil.

A composição nutricional para bebês de acordo com a presente invenção é principalmente composta de proteína, lipídeo, sacarídeo, vitaminas e/ou minerais. Na composição nutricional, o ingrediente ativo é misturado com estes componentes. A proteína inclui proteínas de leite tais como leite desnatado, caseína, soro de leite de queijo, concentrado de proteína de soro de leite e isolados de proteína de soro de leite e suas frações tais como alfa s-caseína, beta-caseína, alfa-lactoalbumina e beta-lactoglobulina. Ademais, proteína de ovo tal como proteína de gema de ovo, proteína de clara de ovo, e ovalbumina, ou proteína de feijão-soja tal como proteína de feijão-soja desengordurada, proteína de feijão-soja separada, e proteína de feijão-soja concentrada podem ser usadas. Diferente destas, proteínas tais como glúten de

trigo, proteína de carne de peixe, proteína de carne bovina e colágeno também podem ser usadas satisfatoriamente. Ademais, frações destas proteínas, peptídeos de seu tratamento por ácido ou enzima, ou aminoácidos livres também podem ser usados satisfatoriamente. Os amino ácidos livres podem servir como fontes de nitrogênio e podem ser adicionalmente usados para dar ações fisiológicas específicas. Tais aminoácidos livres incluem, por exemplo, taurina, arginina, cisteína, e glutamina. O lipídeo inclui óleos e gorduras animais tais como gordura de leite, toicinho, gordura bovina e óleo de peixe, óleos vegetais tais como óleo de feijão-soja, óleo de colza, óleo de milho, óleo de coco, óleo de palmeira, óleo de semente de palmeira, óleo de cártamo, óleo de perila, óleo de linhaça, óleo de onagrácea, triglicerídeo de ácido graxo de cadeia média, e óleo de semente de algodão, óleos e gordura bacterialmente gerados, e seus óleos fracionados, seus óleos hidrogenados, e seus óleos transesterificados. A quantidade de lipídeo a ser misturada varia dependendo do uso. O sacarídeo inclui, por exemplo, um ou mais de amido, polissacarídeos solúveis, dextrina, monossacarídeos tais como sacarose, lactose como aqui descrito, maltose, glicose, e frutose e outros oligossacarídeos. A quantidade total de tal sacarídeo é preferivelmente 40 a 80% em peso por sólido total na composição nutricional. Ademais, adoçantes artificiais tal como aspartame podem ser usados satisfatoriamente. A quantidade de um edulcorante artificial é apropriadamente 0,05 a 1,0 % em peso por sólido total na composição nutricional.

As vitaminas incluem, mas não são limitadas a, licopeno como um componente essencial e adicionalmente incluem, por exemplo, vitaminas tais como vitamina A, grupo de vitaminas B, vitaminas C, D, e E e grupo de vitaminas K, ácido fólico, ácido pantotênico, nicotinamida, carnitina, colina, inositol e biotina desde que tais vitaminas possam ser administradas a bebês. Tais vitaminas são preferivelmente de 10 mg a 5 g em peso por sólido total na composição nutricional para bebês.

Ademais, os minerais incluem cálcio, magnésio, potássio, sódio, ferro, cobre, zinco, fósforo, cloro, manganês, selênio e iodo. Tais minerais são preferivelmente de 1 mg a 5 g em peso por sólido total na composição nutricional para bebês.

5 Diferentes daqueles componentes descritos acima, a composição nutricional para bebês como usada de acordo com a presente invenção pode ser misturada com qualquer componente desejavelmente misturado em composições nutricionais, por exemplo, fibra dietética, nucleotídeos, ácidos nucleicos, flavorizantes, e colorantes.

10 O alimento ou a bebida como usado(a) de acordo com a presente invenção pode ser utilizado(a) como um alimento ou bebida saudável ou um alimento ou bebida funcional para prevenir e/ou tratar cárie causada por *Estreptococos* mutantes diferentes de *Streptococcus mutans*.

15 Quando o alimento ou bebida de acordo com a presente invenção é ingerido, a quantidade a ser ingerida não é particularmente limitada. A quantidade a ser ingerida é geralmente 0,1 a 50 g, preferivelmente 0,5 g a 20 g diariamente, baseada na quantidade total de ingrediente ativo. O alimento ou bebida é continuamente ingerido nesta quantidade por um período de um único dia até 5 anos, preferivelmente de 2 semanas a um ano.

20 Aqui, a quantidade ingerida pode ser ajustada para uma faixa apropriada dependendo da severidade do sintoma do indivíduo ingerindo o alimento ou a bebida, a idade e o peso corporal do mesmo, e semelhantes.

 A ração como usada de acordo com a presente invenção pode ser qualquer ração compreendendo o ingrediente ativo. A ração inclui, por

25 exemplo, rações de animais de estimação para cães, gatos e ratos, rações de gado para porcos e vacas, rações para galinha e perus, e rações para cultura de peixes como pargo e olho-de-boi.

 A ração pode ser produzida por misturação apropriada do ingrediente ativo como descrito aqui acima em uma matéria-prima de ração

incluindo, por exemplo, cereais, farelo de milho, farinhas de semente oleosa, matérias-primas para ração derivadas de animal, outras matérias-primas para ração e produtos purificados.

Os cereais incluem, por exemplo, milho, trigo, cevada, aveia, centeio, arroz integral, trigo-mouro, painço rabo-de-raposa, painço chinês, gramínea Deccan, cereal, e feijão-soja.

Os farelos incluem, por exemplo, farelo de arroz, farelo de arroz desengordurado, farelo de milho, farelo de trigo de grau mais baixo, germe de trigo, farelo de cevada, farelo de cereais, alimpaduras, e germe de milho.

As farinhas de semente oleosa incluem, por exemplo, farinha de feijão-soja, pó de feijão-soja, farinha de linhaça, farinha de semente de algodão, farinha de amendoim, farinha de cártamo, farinha de coco, farinha de palma, farinha de gergelim, farinha de girassol, farinha de colza, farinha de semente de paineira, e farinha de mostarda.

As matérias-primas de ração derivadas de animal incluem, por exemplo, pós de peixe, farinha importada, farinha integral, e farinha de pesca, peixe solúvel, pó de carne, pó de carne e osso, pó de sangue, pêlo decomposto, pó de ossos, subprodutos de matadouro, farinha de pena, pupa de bicho-da-seda, caseína, soro de leite seco e krill.

Outras matérias-primas para ração incluem, por exemplo, caules e folhas de planta tais como alfafa, hey cube, farinha de folha de alfafa, e pó de folha de alfarrobeira, subprodutos de indústrias de processamento de milho, tais como farinha de glúten de milho, ração de glúten de milho e licor de macerado de milho, amido, açúcar, levedura, subprodutos da indústria de fermentação tais como resíduo de cerveja, raiz de malte, resíduo de licor e resíduo de molho de soja, e subprodutos agrícolas tais como resíduo processado de cítrico, resíduo de coalho de feijão-soja, resíduo de café, e resíduo de cacau, mandioca, fava-de-cavalo, farinha de guar, alga marinha,

espirulina e clorela.

Os produtos purificados incluem, por exemplo, proteínas tais como caseína e albumina, aminoácidos, amido, celulose, sacarídeos tais como sacarose e glicose, minerais e vitaminas.

5 No caso fornecimento de ração de acordo com a presente invenção a animais, a quantidade da ração a ser ingerida não é significativamente limitada, mas é preferivelmente, por exemplo, 0,1 mg a 50 g por 1 kg de peso corporal por dia, preferivelmente 0,5 mg a 20 g per 1 kg de peso corporal por dia, baseado na quantidade do ingrediente ativo. A ração é
10 continuamente ingerida nesta quantidade por um período de um único dia a até 5 anos, preferivelmente de 2 semanas a um ano. De novo, a quantidade ingerida pode ser ajustada para uma faixa apropriada dependendo da espécie, idade e peso corporal do animal ingerindo a ração, e semelhantes.

 Em uma outra modalidade, a presente invenção refere-se ao
15 uso de um microorganismo pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico, que é capaz de se ligar especificamente em uma bactéria pertencendo ao grupo de Estreptococos mutantes como descrito aqui acima, para a preparação de uma composição anticariogênica para o tratamento ou a profilaxia de cárie causada por Estreptococos mutantes diferentes de Streptococcus mutans,
20 sendo que a composição anticariogênica é um aditivo para alimentos, bebidas e rações. Preferivelmente, o aditivo para alimentos, bebidas e rações, devido à presença de um microorganismo ou derivado ou mutante ou análogo ou fragmento do mesmo como descrito aqui acima é, inter alia, capaz de se ligar especificamente em Estreptococos mutantes de modo a para prevenir e/ou
25 tratar cárie causada por Estreptococos mutantes diferentes de Streptococcus mutans. Preferivelmente, o microorganismo, mutante, derivado, análogo ou fragmento do mesmo é um microorganismo depositado como descrito aqui acima, ou um mutante, derivado ou fragmento do mesmo. O aditivo para alimentos ou bebidas inclui o aditivo para composições nutricionais para

bebês.

O aditivo para alimentos pode ser produzido por um método geral para produzir aditivos para alimentos, bebidas ou rações. Se necessário, aditivos para uso geral em alimentos, bebidas ou rações, por exemplo, aditivos descritos em Food Additive Handbook (The Japan Food Additives Association; publicado aos 6 de Janeiro de 1997) pode ser adicionado satisfatoriamente, incluindo adoçantes, colorantes, conservantes, espessantes e estabilizadores, antioxidantes, agentes fixadores de cor, alvejantes, antissépticos, base de goma, flavorizantes amargos, enzimas, agentes
10 abrilhantadores, acidulante, condimentos, emulsificadores, agentes para manufatura, flavorizantes, e extratos de tempero. Ademais, convencionais sacarídeos, amido, materiais inorgânicos, pós de planta, excipientes, desintegrantes, lubrificantes, aglutinantes, tensoativos, e plastificantes previamente mencionados para comprimidos farmacêuticos podem ser
15 adicionados satisfatoriamente.

Os aditivos incluem os seguintes aditivos.

Os adoçantes incluem aspartame, alcaçuz, stévia, xilose e rakanka (fruta de *Momordica grosvenori*). Os colorantes incluem carotenóide e oleorresina de cúrcuma, flavonóide, corante de caramelo, corante de
20 espirulina, clorofila, corante de batata doce púrpura, corante de inhame púrpura, corante de perila, e corante de mirtilo.

Os conservantes incluem, por exemplo, sulfito de sódio, benzoatos, extrato de benzoína, sorbatos, propionatos. Os espessantes e estabilizadores incluem, por exemplo, gomas tais como goma arábica e goma
25 xantana, alginatos, quitina, quitosana, extrato de aloe, goma guar, hidróxi-propil-celulose, caseína sódica, amido de milho, carbóxi-metil-celulose, gelatina, ágar, dextrina, metil-celulose, pol(vinil-álcool), celulose em microfibra, celulose microcristalina, celulose de alga marinha, poli(acrilato de sódio), polifosfato de sódio, carragenano ou parede celular de levedura.

Os antioxidantes incluem, por exemplo, grupo de vitamina C, etileno-diamino-tetraacetato de sódio, etileno-diamino-tetraacetato de cálcio, ácido eritóbico, orizanol, catequina, quercetina, extrato de cravo-da-índia, rutina tratada por enzima, extrato de maçã, extrato de semente de gergelim, 5 dibutil-hidróxi-tolueno, extrato de erva-doce, extrato de aipo, extrato de chá, tocofeóis, extrato de colza, extrato de grão de café, extrato de semente de girassol, ácido ferúlico, butil-hidróxi-anisol, extrato de folha de mirtilo, extrato de própolis, extrato de pimenta, extrato de balsamo de jardim, ácido gálico, extrato de eucalipto, e extrato de alecrim.

10 Os agentes fixadores de cor incluem, por exemplo, nitrito de sódio. Os alvejantes incluem, por exemplo, sulfito de sódio.

Os antissépticos incluem, por exemplo, o-fenil-phenol. A goma base inclui, por exemplo, acetil-ricinoleato de metila, cera de urushi, goma de éster, resina de elemi, cera de urucuri, goma de cauri, cera de 15 carnaúba, éster de glicerina - ácido graxo, cera de espermacete, bálsamo de copaíba, resina de copal, borracha, cera de farelo de arroz, cera de cana, shellac, jelutong, éster de sacarose - ácido graxo, borracha natural despolimerizada, cera parafínica, bálsamo de abeto, éster de propileno-glicol - ácido graxo, polpa em pó, cascas de arroz em pó, óleo de jojoba, 20 poliisobutileno, polibuteno, cera microcristalina, goma mástique, cera de abelha e fosfato de cálcio.

Os flavorizantes amargos incluem, por exemplo, ácido iso-alfa-amargo, cafeína, extrato de kawaratake (*Coriolus versicolor*), extrato de chincona de casca vermelha, extrato de casca de *Phellodendron*, extrato de 25 raiz de genciana, extratos de tempero, naringina enzimaticamente modificada, extrato de cássia Jamaica, teabromina, naringina, extrato de cássia, extrato de absinto, extrato de isodonis, chá de oliveira, extrato de laranja amarga (*Citrus aurantium*), extrato de lúpulo e extrato de losna.

As enzimas incluem, por exemplo, amilase, tripsina ou coalho.

Os agentes abrillantadores incluem, por exemplo, cera de urushi e cera japonesa. O acidulante inclui, por exemplo, ácido adípico, ácido de itacania, ácidos cítricos, ácidos succínicos, acetato de sódio, ácidos tartáricos, dióxido de carbono, ácido láctico, ácido fítico, ácido fumárico, ácido málico e ácido fosfórico, os temperos incluem, por exemplo, aminoácidos tais como asparagina, ácido aspártico, ácido glutâmico, glutamina, alanina, isoleucina, glicina, serina, cistina, tirosina, leucina, e pralina, ácidos nucleicos tais como inosinato de sódio, uridinato de sódio, guanilato de sódio, citidilato de sódio, cálcio-ribonucleotídeo e sódio-ribonucleotídeo, ácidos orgânicos tais como ácido cítrico e ácido succínico, cloreto de potássio, salmoura diminuída em cloreto de sódio, cloreto de potássio bruto, sal de soro de leite, fosfato de tripotássio, hidrogeno-fosfato de dipotássio, di-hidrogeno-fosfato de potássio, hidrogeno-fosfato de dissódio, di-hidrogeno-fosfato de sódio, fosfato de trissódio e extrato de chlorella.

Os intensificadores incluem, por exemplo, sais de zinco, grupo de vitamina C, vários aminoácidos, ácido 5-adenílico, cloreto de ferro, hesperidina, vários cálcios calcinados, vários cálcios não-calcinados, dibenzoil-tiamina, hidróxido de cálcio, carbonato de cálcio, sal de cloridrato de tiamina, Dunallella. Oarotene, tocoferol, ácido nicotínico, caroteno de cenoura, caroteno de óleo de palmeira, pantotenato de cálcio, vitamina A, hidróxi-prolina, di-hidrogeno-pirofosfato de cálcio, pirofosfato ferroso, pirofosfato férrico, ferritina, heme-ferro, menaquinona, ácido fólico e riboflavina.

Os agentes para manufatura incluem, por exemplo, auxiliares de processamento tais como acetona e resina de troca iônica. Os flavorizantes incluem, por exemplo, essência de baunilha e os extratos de tempero incluem, por exemplo, extrato de cápsico.

Estes vários aditivos podem ser adicionados no ingrediente ativo, levando-se em consideração o modo de administração, de acordo com a

presente invenção. A composição anticariogênica como usada de acordo com a presente invenção inclui uma quantidade do microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido lático ou um derivado ou mutante do mesmo ou análogo ou fragmento do mesmo.

- 5 Preferivelmente, o microorganismo, mutante, derivado, análogo ou fragmento do mesmo é um microorganismo depositado como descrito aqui acima, ou um mutante, derivado ou fragmento do mesmo. É considerado que as composições e em particular a composição anticariogênica compreende o microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido lático na forma de um microorganismo probiótico.

- A saber, em adição ao efeito probiótico, o microorganismo probiótico acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido lático é útil para tratar e/ou prevenir cárie causada por *Streptococcus* mutantes diferentes de *Streptococcus mutans*. A quantidade de dito microorganismo probiótico é suficientemente alta para significativamente positivamente modificar a condição a ser tratada, preferivelmente cárie, mas suficientemente baixa para evitar efeitos colaterais sérios (em uma razão de benefício/risco razoável), dentro do escopo do julgamento médico correto. Uma quantidade efetiva de dito microorganismo probiótico variará com o objetivo particular a ser alcançado, a idade e a condição física do paciente sendo tratado, a severidade da doença subjacente, a duração do tratamento, a natureza da terapia concorrente e o microorganismo específico utilizado. A quantidade efetiva de dito microorganismo probiótico assim será a quantidade mínima que proporcionará a ligação específica em *Streptococcus* mutantes. A presença de, por exemplo, 1×10^9 bactérias, como células inteiras viáveis ou não-viáveis, em 0,05 mL de solução salina tamponada de fosfato, ou em 0,05 mL de suspensão de ágar, ou o equivalente de peso seco de fragmentos de parede celular, é efetiva quando administrada em quantidades de cerca de 0,05 mL a cerca de 20 mL.

Uma vantagem prática decidida é que o organismo probiótico pode ser administrado em uma maneira conveniente tal como pela rota oral. Dependendo da rota de administração, pode ser exigido que os ingredientes ativos que compreendem ditos organismos probióticos sejam revestidos em um material para proteger os ditos organismos da ação de enzimas, ácidos e outras condições naturais que podem inativar ditos organismos. Com o objetivo de administrar organismos probióticos por administração diferente de parenteral, eles devem ser revestidos por, ou administrados com, um material para prevenir inativação. Por exemplo, organismos probióticos podem ser co-administrados com inibidores de enzima ou em lipossomos. Inibidores de enzima incluem inibidor de tripsina pancreática, diisopropil-fluoro-fosfato (DFP) e trasilol. Lipossomos incluem emulsões de água-em-óleo de P40 bem como lipossomos convencionais e especificamente planejados que transportam lactobacilos ou seus subprodutos para a superfície urogenital. Dispersões também podem ser preparadas, por exemplo, em glicerol, poli(etileno-glicóis) líquidos, e suas misturas, e em óleos. Geralmente, dispersões são preparadas pela incorporação de organismos probióticos esterilizados em uma vesícula estéril que contém o meio de dispersão básico e os outros ingredientes exigidos daqueles enumerados acima. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injetáveis estéreis, os métodos preferidos de preparação são secagem a vácuo e a técnica de secagem por congelamento que dão um pó do ingrediente ativo mais qualquer ingrediente desejado adicional da sua solução previamente esterilmente filtrada. Métodos preferidos adicionais de preparação incluem mas não são limitados à liofilização e à secagem por calor.

A composição anticariogênica também inclui produtos intencionados para serem administrados oralmente, ou bucalmente, que compreendem um veículo farmaceuticamente aceitável como aqui descrito no qual, ou sobre o qual, células do microorganismo acima mencionado

pertencendo ao grupo de bactérias do ácido lático são adicionadas na forma fresca, concentrada ou seca, por exemplo. Claro que, também um derivado ou análogo ou fragmento de dito microorganismo pode ser adicionado ou qualquer combinação de dito microorganismo, derivado e/ou análogo e/ou fragmento do mesmo que são aqui mostrados. Estes produtos podem ser fornecidos na forma de uma suspensão ingerível, um gel, um difusor, uma cápsula, uma cápsula de gelatina dura, um xarope, ou em qualquer outra forma galênica conhecida por pessoas experientes na técnica.

Quando os organismos probióticos são adequadamente protegidos como descrito acima, o composto ativo pode ser oralmente administrado, por exemplo, com um diluente inerte ou com um veículo edível assimilável, ou ele pode ser encerrado dentro de uma cápsula de gelatina de casca mole ou dura, ou ele pode ser comprimido em comprimidos planejados para passarem pelo estômago (i.e., revestidos entericamente), ou ele pode ser incorporado diretamente com o alimento da dieta. Para administração terapêutica oral, os organismos probióticos podem ser incorporados com excipientes e usados na forma de comprimidos ingeríveis, comprimidos bucais, pastilhas, cápsulas, elixires, suspensões, xaropes, bolachas, e semelhantes. Composições e preparações de acordo com a presente invenção são preparadas de modo que uma forma de unidade de dosagem oral contenha, por exemplo, cerca de 1×10^9 células viáveis ou não-viáveis e.g., lactobacilos por mL. O organismo probiótico é composto para administração conveniente e efetiva em quantidades efetivas com um veículo adequado farmacêuticamente aceitável ou aceitável para alimento na forma de dosagem unitária como anteriormente aqui mostrado. Uma forma de dosagem unitária pode, por exemplo, conter o composto ativo principal em uma quantidade de aproximadamente 10^9 células viáveis ou não-viáveis, e.g., lactobacilos, por mL. No caso de composições contendo ingredientes suplementares tais como prebióticos, as dosagens são determinadas referindo-se à dosagem costumeira

e à maneira de administração de ditos ingredientes.

Em uma outra modalidade, a presente invenção refere-se a um método de profilaxia ou tratamento de cárie causada por Estreptococos mutantes diferentes de Streptococcus mutans. Preferivelmente o método de profilaxia ou tratamento compreende administrar a um indivíduo um microorganismo pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico, caracterizado pelo fato de que dito microorganismo é capaz de se ligar especificamente em uma bactéria pertencendo ao grupo de Estreptococos mutantes ou um mutante, derivado, análogo ou fragmento de dito microorganismo como descrito aqui acima. Mais preferivelmente, o microorganismo é um microorganismo como descrito aqui acima, ainda mais preferivelmente, o microorganismo é um lactobacilo depositado na DSMZ, como descrito aqui acima. O análogo ou fragmento do microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico pode ser qualquer análogo ou fragmento como descrito aqui acima.

Preferivelmente, o indivíduo a ser tratado é um animal. Mais preferivelmente, o animal é um mamífero, ainda mais preferivelmente o mamífero é um animal de estimação. Em uma modalidade preferida, o animal de estimação é um cão, um gato, um hamster, um macaco, um rato, ou um camundongo. Em outra modalidade preferida o animal um bovino, um cavalo, um porco, um macaco, uma ovelha ou uma cabra. Em outra modalidade preferida o mamífero é um ser humano.

Preferivelmente, um Estreptococo mutante é um microorganismo pertencendo à espécie Streptococcus mutans, Streptococcus sobrinus, Streptococcus cricetus, Streptococcus rattii, Streptococcus ferus ou Streptococcus macacae. Ainda mais preferivelmente, a Estreptococo mutante refere-se a um microorganismo pertencendo a Streptococcus mutans sorotipo c (DSMZ 20523) Streptococcus mutans sorotipo e (NCTC 10923) Streptococcus mutans sorotipo f (NCTC 11060), Streptococcus sobrinus DSM

20742 *Streptococcus ratti* DSM 20564, *Streptococcus cricetus* DSM 20562, *Streptococcus ferus* DSM 20646 ou *Streptococcus macacae* DSM 20714. A cárie a ser tratada ou prevenida é causada por *Estreptococos* mutantes diferentes de *Streptococcus mutans*, preferivelmente, a cárie é causada por pelo menos uma bactéria selecionada do grupo consistindo de, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus cricatus*, *Streptococcus ratti*, *Streptococcus ferus* e *Streptococcus macacae*. A administração de um microorganismo pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico como descrito acima no contexto do método de tratamento ou profilaxia da presente invenção pode ser realizada em qualquer forma adequada conhecida pela pessoa experiente na técnica. Preferivelmente, a administração inclui o uso e a aplicação de composições como descrito aqui acima, que podem opcionalmente conter, por exemplo, excipientes ou veículos cosméticos ou farmacêutico como descrito aqui acima. A dosagem e o curso de tempo da administração podem ser estabelecidos de acordo com qualquer informação adequada conhecida pela pessoa experiente na técnica. Preferivelmente, a dita dosagem e o dito curso de tempo podem ser estabelecidos como descrito aqui acima.

A invenção é ilustrada pelas Figuras 1 a 3 como descrito a seguir:

Figura 1 mostra a agregação de *Streptococcus mutans* pela espécie *Lactobacillus*. Em particular, a figura exhibe uma mistura de um *Lactobacillus* agregando com *S. mutans* (tubo da esquerda) em comparação com uma mistura de *Lactobacillus* não-agregando com *S. mutans* (tubo da direita). O experimento tem sido realizado como descrito em Exemplo 4 e os tubos foram deixados em repouso por 20 minutos para permitir a sedimentação dos agregados.

Figura 2 mostra uma fotografia microscópica do agregado entre *Lactobacillus* e *S. mutans* mostrado em Figura 1 (tubo da esquerda). A fotografia foi tirada em uma amplitude de 1000 vezes usando um microscópio

de contraste de fase.

Figura 3 mostra a agregação de diferentes *Streptococcus* mutantes por lactobacilos. O ensaio foi realizado como descrito em Exemplo 5. Resumidamente, os *Streptococcus* mutantes foram corados usando uma cepa fluorescente. Após agregação dos *Streptococcus* pelos lactobacilos, as pelotas resultantes foram separadas por centrifugação. A quantidade de fluorescência das pelotas foi considerada como uma medida da quantidade de *Streptococcus* mutantes agregados.

Em entendimento melhor da presente invenção e de suas vantagens será obtido dos seguintes exemplos, oferecidos apenas para propósito ilustrativo, e não são intencionados em nenhuma maneira para limitarem o escopo da presente invenção.

Exemplo 1

Armazenagem e crescimento

Armazenagem e crescimento de cepas podem ocorrer de acordo com procedimentos ordinários. Por exemplo, cepas podem ser armazenadas como estoques congelados a -80°C . 1 mL de uma cultura pode ser crescido até fase estacionária ($\text{OD}_{600}/\text{mL}$ 4 - 8) em Meio-MRS e misturado com 500 μL de uma solução estéril de glicerinato 50% e congelado. Culturas de *Streptococcus* mutantes podem ser crescidas em meio-TSY até a fase estacionária ($\text{OD}_{600}/\text{mL}$ 1-2) e serem tratados como mencionado acima.

Cultivo de *Streptococcus* mutantes (*S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. rattii*, *S. cricetus*, *S. ferus* ou *S. macacae*) bem como cultivo de lactobacilos podem ser feitos em 5 mL em tubos Falcon fechados a 37°C sem agitação durante a noite.

Em particular, as cepas usadas no presente pedido foram armazenadas a -80°C . 1 mL de uma cultura crescida até fase estacionária ($\text{OD}_{600}/\text{mL}$ 4 - 8) em caldo-MRS foi misturado com 500 μL de uma solução estéril de glicerol 50% e congelado.

Em particular, culturas de *Streptococcus* mutantes foram crescidas em caldo-TSY até fase estacionária (OD_{600}/mL 1-2) e tratadas como mencionado acima.

Cultivo de *Streptococcus* mutantes (*S. mutans* (DSM 20523, sorotipo c; NCTC 10923, sorotipo e; NCTC 11060, sorotipo f), *S. sobrinus* DSM 20742, *S. ratti* DSM 20564, *S. cricetus* DSM 20562, *S. ferus* DSM 20646 ou *S. macacae* DSM 20714) e cultivo de lactobacilos foram feitos em 5 mL em tubos alcon fechados a 37°C sem agitação durante a noite. Para ensaios de fluorescência como descritos em Exemplo 5 foi usado *S. mutans* DSM 20523.

Para um ensaio de agregação os lactobacilos foram crescidos em meio-MRS. 5 mL de meio-MRS foram inoculados com 10 μL de estoque e incubados por 3 dias a 37°C sob condições aeróbicas. A densidade óptica da cultura a 600 nm (OD_{600}) foi medida. A cultura foi então diluída para uma OD_{600} de 2 usando tampão-PBS. Os *Streptococcus* mutantes foram crescidos em 7 mL de meio-TSY. 7 mL de meio-TSY foram inoculados com 10 μL do estoque e incubados a 37°C sob condições anaeróbicas.

Exemplo 2

Classificação taxonômica de cepas

A classificação taxonômica das cepas foi feita de acordo com seu padrão de fermentação de carboidrato. Este foi determinado usando o sistema API 50 CH (bioMérieux, França) e analisado usando um programa de computador APILAB PLUS versão 3.3.3 (bioMérieux, França).

Exemplo 3

Coloração de células

Após os lactobacilos e os *Streptococcus* mutantes terem sido crescidos como descrito em Exemplo 1, os *Streptococcus* mutantes foram corados usando uma cepa fluorescente. Para isto, a OD_{600} da cultura foi medida. A cultura foi colhida por centrifugação a 3200 x g por 5 min. A

pelota foi ressuspensa em tampão-PBS. A quantidade de tampão foi calculada de modo que a suspensão resultante tivesse uma OD₆₀₀ de 4. 2 mL daquela suspensão foram misturados com 2 µL de uma solução de CFDA-SE (Invitrogen, USA) que foi preparada de acordo com as instruções do fabricante. Coloração das células foi realizada incubando a mistura por 2 h a 37°C. As células coradas foram colhidas por centrifugação a 3200 x g por 5 min. As células foram subsequentemente ressuspensas em 2 mL de tampão-PBS.

Exemplo 4

10 Ensaio de agregação por pelotização de *Streptococos* mutantes

Para o ensaio, misturação de lactobacilos e *Streptococos* mutantes foi feita em razões volumétricas de 3:1 a 60:1 (*Streptococos* mutantes: lactobacilos), esta corresponde a uma razão de unidades de formação de colônia de 1:50 a 1:2,5.

15 Uma densidade óptica medida em um comprimento de onda de 600 nm em 1 mL significa preferivelmente para *Streptococos* mutantes 3×10^8 unidades de formação de colônia e para lactobacilos preferivelmente 7×10^9 unidades de formação de colônia. Misturação foi feita em volume de 2 mL em tubos Falcon de 15 mL. As suspensões de cultura foram diluídas com
20 tampão-PBS para obter as razões volumétricas mencionadas acima simultaneamente mantendo o volume final em 2 mL. A mistura foi agitada por 15 segundos. Uma agregação é visível em uma turbidez imediata da suspensão. Os tubos foram deixados em repouso por 20 min, após aquele período de tempo os agregados sedimentam como uma pelota visível
25 enquanto que as misturas não-agregadas permanecem em suspensão. Os agregados formados foram separados por centrifugação a 500 x g por 30 segundos. Depois, a quantidade de agregação foi quantificada pela medição de células não-agregadas que foram deixadas no sobrenadante. Correspondentemente, 1 mL do sobrenadante foi cuidadosamente removido

para medir a densidade óptica. A densidade óptica foi medida a 600 nm. O valor após subtração do respectivo experimento de controle sem lactobacilos representa a quantidade de células que não têm sido agregadas.

5 Como um controle, auto-agregação da respectiva cepa de Lactobacillus e das cepas de Estreptococo mutante foi sempre investigada pela realização do teste com apenas o Lactobacillus ou a cepa de Estreptococo mutante adicionada no tubo. Uma agregação de S. mutans por Lactobacillus é mostrada em Figuras 1 (tubo da esquerda) e 2.

10 As cepas de lactobacilos como descrito aqui acima, em particular aquelas depositadas na DSMZ, exibiram agregação de todos os sorotipos de S. mutans sem mostrarem um comportamento de auto-agregação.

Meios:

Caldo-MRS:

Mistura-MRS (Difco, USA) 55g/L

pH: 6,5

Caldo-TSY:

Mistura-TSY (Difco,USA) 30g/L

Extrato de Levedo (Deutsche Hefewerke, Alemanha) 3g/L

pH ajustado com HCl

Tampão:

Tampão-PBS:

Na₂HPO₄*2H₂O 1,5 g/L

KH₂PO₄ 0,2 g/L

NaCl 8,8 g/L

PH ajustado com HCl.

Exemplo 5

Ensaio de agregação com fluorescência de Estreptococos mutantes

15 Para o ensaio, suspensão do respectivo lactobacilo e do respectivo Estreptococo mutante corado (S. mutans DSM 20523 com Lb-OB-K1 (DSM 16667), S. mutans DSM 20523 com Lb-OB-K2 (DSM 16668), S. mutans DSM 20523 com Lb-OB-K3 (DSM 16669), S. mutans DSM 20523

com Lb-OB-K4 (DSM 16670), *S. mutans* DSM 20523 com Lb-OB-K5 (DSM 16671), *S. mutans* DSM 20523 com Lb-OB-K6 (DSM 16672), *S. mutans* DSM 20523 com Lb-OB-K7 (DSM 16673); *S. sobrinus* DSM 20742 com Lb-OB-K1 (DSM 16667), *S. sobrinus* DSM 20742 com Lb-OB-K2 (DSM 16668), *S. sobrinus* DSM 20742 com Lb-OB-K3 (DSM 16669), *S. sobrinus* DSM 20742 com Lb-OB-K4 (DSM 16670), *S. sobrinus* DSM 20742 com Lb-OB-K5 (DSM 16671), *S. sobrinus* DSM 20742 com Lb-OB-K6 (DSM 16672), *S. sobrinus* DSM 20742 com Lb-OB-K7 (DSM 16673); *S. cricetus* DSM 20562 com Lb-OB-K1 (DSM 16667), *S. cricetus* DSM 20562 com Lb-OB-K2 (DSM 16668), *S. cricetus* DSM 20562 com Lb-OB-K3 (DSM 16669), *S. cricetus* DSM 20562 com Lb-OB-K4 (DSM 16670), *S. cricetus* DSM 20562 com Lb-OB-K5 (DSM 16671), *S. cricetus* DSM 20562 com Lb-OB-K6 (DSM 16672), *S. cricetus* DSM 20562 com Lb-OB-K7 (DSM 16673); *S. ratti* DSM 20564 com Lb-OB-K1 (DSM 16667), *S. ratti* DSM 20564 com Lb-OB-K2 (DSM 16668), *S. ratti* DSM 20564 com Lb-OB-K3 (DSM 16669), *S. ratti* DSM 20564 com Lb-OB-K4 (DSM 16670), *S. ratti* DSM 20564 com Lb-OB-K5 (DSM 16671), *S. ratti* DSM 20564 com Lb-OB-K6 (DSM 16672), *S. ratti* DSM 20564 com Lb-OB-K7 (DSM 16673); *S. ferus* DSM 20646 com Lb-OB-K1 (DSM 16667), *S. ferus* DSM 20646 com Lb-OB-K2 (DSM 16668), *S. ferus* DSM 20646 com Lb-OB-K3 (DSM 16669), *S. ferus* DSM 20646 com Lb-OB-K4 (DSM 16670), *S. ferus* DSM 20646 com Lb-OB-K5 (DSM 16671), *S. ferus* DSM 20646 com Lb-OB-K6 (DSM 16672), *S. ferus* DSM 20646 com Lb-OB-K7 (DSM 16673); *S. macacae* DSM 20724 com Lb-OB-K1 (DSM 16667), *S. macacae* DSM 20724 com Lb-OB-K2 (DSM 16668), *S. macacae* DSM 20724 com Lb-OB-K3 (DSM 16669), *S. macacae* DSM 20724 com Lb-OB-K4 (DSM 16670), *S. macacae* DSM 20724 com Lb-OB-K5 (DSM 16671), *S. macacae* DSM 20724 com Lb-OB-K6 (DSM 16672) e *S. macacae* DSM 20724 com Lb-OB-K7 (DSM 16673)) foram misturadas. 50 µL da suspensão de lactobacilo foram adicionados em 50 µL

de *Streptococcus* mutantes corados em uma placa de microtítulo de 96 cavidades. A placa foi agitada em velocidade total por 12 minutos. Depois a placa foi centrifugada a 500 x g por 10 segundos. O sobrenadante foi cuidadosamente removido e descartado. A pelota foi ressuspensa em 100 mL de tampão-PBS. A fluorescência da suspensão foi medida em uma leitora de fluorescência de placa de microtítulo em um comprimento de onda de 495 nm para excitação e 525 nm para emissão. Como controles lactobacilos sozinhos bem como *Streptococcus* mutantes corados foram tratados e medidos como descrito. A fluorescência de fundo medida para os respectivos *Streptococcus* mutantes sozinhos foi subtraída do valor medido para a agregação com o respectivo lactobacilo. Todas as medições foram feitas três vezes. Os *Streptococcus* mutantes foram agregados por todos os lactobacilos testados (veja Figura 3).

Meios:	
Caldo-MRS:	
Mistura-MRS (Difco, USA)	55g/L
pH: 6,5	
Caldo-TSY:	
Mistura-TSY (Difco, USA)	30g/L
Extrato de Levedo (Deutsche Hefewerke, Alemanha)	3g/L
Tampão:	
Tampão-PBS:	
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	1,5 g/L
KH ₂ PO ₄	0,2 g/L
NaCl	8,8 g/L
pH ajustado com HCl	

Exemplo 6

15 Especificidade da agregação para membros típicos da flora oral

As culturas de *Lactobacillus* foram cultivadas como descrito em Exemplo 1.

As bactérias orais - a saber: *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (isolada por OrganoBalance, identificada por API 50 CH

(Biomerieux, França) de acordo com instruções dos fabricantes); Streptococcus oralis (DSMZ 20066); Streptococcus oralis (DSMZ 20395); Streptococcus oralis (DSMZ 20627); Staphylococcus epidermidis (DSMZ 1798); Staphylococcus epidermidis (DSMZ 20044); Streptococcus mitis (DSMZ 12643); Streptococcus sanguinis (DSMZ 20567) - foram crescidas em 5 mL de meio-BHI em tubos Falcon de 15 mL fechados a 37°C durante a noite. Cada uma das bactérias orais mencionadas acima foi preferivelmente misturada em uma razão volumétrica de 3:1 com culturas de Lactobacillus e agregação foi ensaiada como em Exemplo 4. Para cada teste de agregação/não-agregação apenas uma das bactérias anteriormente mencionadas é preferivelmente usada para imediatamente determinar o resultado do teste.

Como um controle, uma auto-agregação das respectivas bactérias orais bem como das cepas de Lactobacillus testadas sempre foi investigada pela realização do teste com apenas os lactobacilos ou as cepas da flora oral adicionadas no tubo.

As cepas *L. paracasei* ssp. *paracasei* Lb-OB-K1 (DSMZ 16667), Lb-OB-K2 (DSMZ 16668), Lb-OB-K3 (DSMZ 16669), Lb-OB-K4 (DSMZ 16670), Lb-OB-K5 (DSMZ 16671), não agregaram as bactérias orais mencionadas acima. As cepas *L. rhamnosus* Lb-OB-K6 (DSMZ 16672) e Lb-OB-K7 (DSMZ 16673) agregaram *Streptococcus salivarius* subsp *thermophilus*.

Caldo-BHI:

Mistura BHI (Difco, USA)	37g/L
	pH: 7,2

Exemplo 7

Resistência à temperatura da capacidade de agregação dos lactobacilos

As bactérias foram crescidas como em Exemplo 1.

As culturas de lactobacilos crescidas foram incubadas a 121°C em 200 kPa em vapor saturado por 20 min (autoclavadas). Após esfriamento

das culturas autoclavadas para a temperatura ambiente, os lactobacilos foram misturados em uma razão volumétrica de 1: 3 com culturas de *S. mutans* crescidas e agregação foi ensaiada como em Exemplo 4 incluindo os experimentos de controle.

5 Agregação também foi ensaiada usando as bactérias orais como esboçado em Exemplo 6.

Foi verificado que o comportamento de agregação dos lactobacilos não foi modificado pelo procedimento de autoclavagem para os sorotipos de *S. mutans* testados ou para as bactérias orais.

10 **Exemplo 8**

Agregação por lactobacilos inativados por calor

Os lactobacilos foram crescidos como descrito em Exemplo 1. Streptococos mutantes foram crescidos e corados como descrito em Exemplos 1 e 3. As culturas de lactobacilos crescidas foram ajustadas para
15 uma OD₆₀₀ de 2 como descrito em Exemplo 1. 1 mL daquela suspensão foram incubados a 121°C a 200 kPa por 20 min (autoclavado). Após esfriamento as culturas autoclavadas para a temperatura ambiente, a agregação foi medida como descrito em Exemplo 5 incluindo experimentos de controle. Os lactobacilos inativados por calor ainda agregaram todos os Streptococos
20 mutantes.

Exemplo 9

Dependência da agregação do valor de pH

As bactérias foram crescidas como em Exemplo 1. 0,5 mL dos lactobacilos e 1,5 mL de *S. mutans* foram colhidos por centrifugação a 3200 *
25 g por 10 min e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em seu volume original (0,5 mL e 1,5 mL, respectivamente) em tampões-PBS diferentes ajustados para valores de pH diferentes. Os valores de pH dos tampões foram ajustados para valores de 7,0 a 3,0 em degraus de 0,5 unidade de pH. Culturas foram ressuspensas em tampões do respectivo valor de pH

que foi para ser usado para o ensaio de comportamento de agregação

Depois os lactobacilos foram preferivelmente misturados em uma razão volumétrica de 1:3 com culturas de *S. mutans* e a agregação foi ensaiada como em Exemplo 4 incluindo os experimentos de controle. Não ocorreu agregação visível de *S. mutans* pelos lactobacilos em valores de pH menores do que 4,5.

Exemplo 10

Dependência da agregação do valor de pH

Os lactobacilos foram crescidos como descrito em Exemplo 1. Streptococos mutantes foram crescidos e corados como descrito em Exemplos 1 e 3. Depois a agregação foi ensaiada em valores de pH diferentes. para este propósito os lactobacilos bem como os estreptococos foram ressuspensos em tampão acetato ajustado para o pH respectivo. Os valores de pH testados foram 4,0, 4,5 e 5,0. A agregação foi ensaiada como descrito em Exemplo 5. Nenhuma agregação de Streptococos mutantes ocorreu em valores de pH abaixo de 4,5.

Exemplo 11

Sensibilidade do comportamento de agregação à liofilização

As bactérias foram crescidas como em Exemplo 1.

Alíquotas de 1 mL de culturas de lactobacilos foram colhidas por centrifugação a 3200 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as pelotas foram liofilizadas na temperatura ambiente sob vácuo por duas horas. Pelotas secas resultantes de cada cela de *Lactobacillus* testada foram armazenadas na temperatura ambiente e a 4°C, respectivamente, por 1 dia, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas e 4 semanas. Após o tempo de armazenagem, pelotas liofilizadas foram ressuspensas em 1 mL de tampão-PBS, pH 7,0. Os lactobacilos ressuspensos foram misturados em uma razão volumétrica 1: 3 com culturas de *S. mutans* recém-crescidas e agregação foi ensaiada como Exemplo 4 incluindo os experimentos de controle. O comportamento de

agregação dos lactobacilos mencionados em relação a *S. mutans* não foi modificado pela liofilização ou pelos procedimentos de armazenagem.

Exemplo 12

Sensibilidade do comportamento de agregação à liofilização

5 Os lactobacilos foram crescidos como descrito em Exemplo 1. Estreptococos mutantes foram crescidos e corados como descrito em Exemplos 1 e 3. As culturas de lactobacilos crescidas foram ajustadas para uma OD₆₀₀ de 2 como descrito em Exemplo 1. 1 mL daquela suspensão foi liofilizado na temperatura ambiente sob vácuo por duas horas. Depois, as
10 pelotas liofilizadas foram ressuspensas em 1 ml de tampão-PBS. Agregação foi medida como descrito em Exemplo 5, incluindo experimentos de controle.

O comportamento de agregação dos lactobacilos mencionados em relação aos *Estreptococos* mutantes não foi mudado pela liofilização.

Exemplo 13

15 Teste sobre resistência à protease

As bactérias foram crescidas como em Exemplo 1.

Proteases usadas foram Pronase E, Proteinase K, Tripsina, Quimiotripsina (todas obtidas de Sigma, Alemanha). Alíquotas de 1 mL dos lactobacilos foram lavadas em tampão-PBS pela colheita das células por
20 centrifugação a 3200 * g por 10 minutos e ressuspensão da pelota em 1 mL de tampão-PBS (pH 7,0). Depois as células foram colhidas de novo como descrito acima e ressuspensas em tampão-PBS (pH 7,0) contendo a protease respectiva em uma concentração final de 2,5 mg/mL A suspensão foi incubada por 1 hora 37°C. Depois as células foram lavadas e ressuspensas em
25 tampão-PBS (pH 7,0) como descrito acima.

A agregação foi ensaiada como em Exemplo 3 incluindo os experimentos de controle. O comportamento de agregação dos lactobacilos mencionados em relação a *S. mutans* não foi mudado pelo tratamento com qualquer uma das proteases mencionadas.

Exemplo 14**Suscetibilidade à protease do comportamento de agregação dos lactobacilos**

Os lactobacilos foram crescidos como descrito em Exemplo 1.

- 5 Estreptococos mutantes foram crescidos e corados como descrito em Exemplos 1 e 3. Proteases usadas foram Pronase E, Proteinase K, Tripsina, Quimiotripsina (todas obtidas de Sigma, Alemanha). Alíquotas de 1 mL dos lactobacilos foram lavadas em tampão-PBS pela colheita das células por centrifugação a 3200 * g por 10 minutos e ressuspensão da pelota em 1 mL de
- 10 tampão-PBS (pH 7,0). Depois as células foram colhidas de novo como descrito acima e ressuspensas em tampão-PBS (pH 7,0) contendo a protease respectiva em uma concentração final de 2,5 mg/mL. A suspensão foi incubada por 1 hora 37°C. Depois as células foram lavadas e ressuspensas em tampão-PBS (pH 7,0) como descrito acima. A agregação foi ensaiada como
- 15 em Exemplo 5 incluindo os experimentos de controle. O comportamento de agregação dos lactobacilos mencionados em relação a Estreptococos mutantes não foi mudado pelo tratamento com qualquer uma das proteases mencionadas.

Exemplo 15**20 Dependência iônica do comportamento de agregação**

As bactérias foram crescidas como em Exemplo 1.

Alíquotas de 1 mL dos lactobacilos foram lavadas em 1 mL de solução de EDTA 200 mM duas vezes como descrito acima. Depois as células foram colhidas e ressuspensa em 1 mL de tampão-PBS (pH 7.0).

- 25 A agregação foi ensaiada com em Exemplo 4 e uma perda completa da capacidade de agregação foi observada. Ressuspensão dos lactobacilos em 1 mL de uma solução de cálcio 2 mM após a lavagem dupla em solução de EDTA 200 mM restaurou a capacidade de agregar S. mutans. Ressuspensão das células lavadas com EDTA em solução de magnésio de até

100 mM não restaurou a capacidade para agregar S. mutans.

Exemplo 16

Dependência iônica do comportamento de agregação

Os lactobacilos foram crescidos como descrito em Exemplo 1.

- 5 Estreptococos mutantes foram crescidos e corados como descrito em Exemplos 1 e 3. Aliquotas de 1 mL de lactobacilos foram lavadas duas vezes em 1 mL de solução de EDTA 200 mM como descrito acima. Depois as células foram colhidas e ressuspensas em 1 mL de tampão-PBS (pH 7,0). A agregação foi ensaiada como descrito em Exemplo 5 e uma perda completa da
- 10 capacidade de agregação foi observada. Ressuspensão dos lactobacilos em 1 mL de uma solução de cálcio 2 mM após lavagem dupla em solução de EDTA 200 mM restaurou a capacidade de agregar S. mutans. Ressuspensão das células lavadas com EDTA em solução de magnésio de até 100 mM não restaurou a capacidade de agregar Estreptococos mutantes.

Exemplo 17

Teste de agregação na presença de saliva

As bactérias foram crescidas como em Exemplo 1.

- Aliquotas de 2 mL de culturas de S. mutans foram colhidas como descrito acima e ressuspensas em 2 mL de saliva. A saliva foi fornecida
- 20 por dois voluntários e usada imediatamente após sua colheita.

A agregação foi ensaiada as in Exemplo 4.

O comportamento de agregação dos lactobacilos mencionados em relação a S. mutans não mudou na presença de saliva.

Exemplo 18

Agregação de Estreptococos mutantes na presença de saliva

Saliva fresca foi amostrada de voluntários. Fluxo de saliva foi induzido por mastigação de goma de mascar livre de açúcar. Voluntários colheram 15 mL de saliva em cada amostragem. A saliva recém-colhida foi diluída 1:2 com tampão-PBS para o procedimento de ensaio. Lactobacilos e

Estreptococos mutantes foram cultivados como descrito em Exemplo 1. Estreptococos mutantes foram corados como descrito em Exemplo 3, exceto que após o procedimento de coloração as células coradas foram ressuspensas em saliva, em vez de no tampão-PBS. A agregação foi medida como descrito em Exemplo 5 incluindo experimentos de controle. A presença de saliva não inibiu a agregação.

Exemplo 19

Composição de pastilha (I)

A composição de pastilha é preferivelmente preparada como é descrito em Exemplo 4 na página 8 de DE-C2 36 45 147, na qual, em adição aos ingredientes mencionados em dito Exemplo 4, o microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido lático é adicionado em uma quantidade de 10^2 a 10^{12} , preferivelmente 10^3 a 10^8 células por mg de pastilha.

Exemplo 20

Composição de pastilha (II)

A composição de pastilha é preferivelmente preparada como descrito em Exemplo 5 na página 8 de DE-C2 36 45 147, na qual, em adição aos ingredientes mencionados em dito Exemplo 5, o microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido lático é adicionado em uma quantidade de 10^2 a 10^{12} , preferivelmente 10^3 a 10^8 células por mg de pastilha.

Exemplo 21

Composição de dentifrício

A composição de dentifrício é preferivelmente preparada como descrito em Exemplo 3 na página 8 de DE-C2 36 45 147, na qual, em adição aos ingredientes mencionados em dito Exemplo 3, o microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido lático é adicionado em uma quantidade de 10^2 a 10^{12} , preferivelmente 10^3 a 10^8 células por mg de

dentifrício.

Exemplo 22

Composição de dentifrício baseado em giz

A composição de dentifrício baseado em giz é preferivelmente preparada como descrito em capítulo 7.1.4.4 "Rezepturbeispiel" na página 205 do livro-texto "Kosmetik", W. Umbach (editor), 2ª edição, Thieme Verlag, 1995, na qual, em adição aos ingredientes mencionados em dito capítulo na página 205, o microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico é adicionado em uma quantidade de 10^2 a 10^{12} , preferivelmente 10^3 a 10^8 células por mg de dentifrício baseado em giz.

Exemplo 23

Gel-Dentifrício baseado em ácido silícico/fluoreto de sódio

O gel-dentifrício baseado em composição de dentifrício de ácido silícico/fluoreto de sódio é preferivelmente preparado como descrito em capítulo 7.1.4.4 "Rezepturbeispiel" na página 205 do livro-texto "Kosmetik", W. Umbach (editor), 2ª edição, Thieme Verlag, 1995, no qual, em adição aos ingredientes mencionados em dito capítulo na página 205, o microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico é adicionado em uma quantidade de 10^2 a 10^{12} , preferivelmente 10^3 a 10^8 células por mg de gel-dentifrício baseado em ácido silícico/fluoreto de sódio.

Exemplo 24

Composição de dentifrício contra tártaro

A composição de dentifrício contra tártaro é preferivelmente preparada como descrito em capítulo 7.1.4.4 "Rezepturbeispiel" na página 206 do livro-texto "Kosmetik", W. Umbach (editor), 2ª edição, Thieme Verlag, 1995, na qual, em adição aos ingredientes mencionados em dito capítulo na página 206, o microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico é adicionado em uma quantidade de 10^2 a 10^{12} , preferivelmente 10^3 a 10^8 células por mg de dentifrício contra tártaro.

Exemplo 25**Composição de goma de mascar**

A composição de goma de mascar é preferivelmente preparada como descrito em Exemplo 6 na página 9 de DE-C2 36 45 147. na qual, em
 5 adição aos ingredientes mencionados em dito Exemplo 6, o microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico é adicionado em uma quantidade de 10^2 a 10^{12} , preferivelmente 10^3 a 10^8 células por mg de goma de mascar.

Exemplo 26**10 Composição de colutório concentrada**

A composição de colutório concentrada é preferivelmente preparada como descrito em capítulo 7.1.4.4 "Rezepturbeispiel" na página 206 do livro-texto "Kosmetik", W. Umbach (editor), 2ª edição, Thieme Verlag, 1995, na qual, em adição aos ingredientes mencionados em dito
 15 capítulo na página 206, o microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico é adicionado em uma quantidade de 10^2 a 10^{13} , células por mL de da composição de colutório concentrada.

Exemplo 27**Preparação de filme****20 Preparação de filmes:****1. fase aquosa**

- aquecer água para 60°C.
- aspartame (edulcorante) é adicionado sob agitação.
- aspartame é dissolvido completamente.
- 25 - um agente formador de filme polimérico solúvel em água, como, por exemplo, Kollicoat IR (poli(etileno-glicol) em poli(vinil-álcool) ou PVP (poli(vinil-pirrolidona) ou polímeros naturais tais como alginatos são adicionados sob agitação até estarem dissolvidos.
- após 10 min. o restante de espuma é removido.

- o microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico em uma quantidade de 10^2 a 10^{12} , preferivelmente 10^3 a 10^8 células por filme de flavor final é adicionado após esfriamento da mistura, o mutante ou derivado do microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico ou um análogo ou fragmento do microorganismo acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico pode ser adicionado.

2. fase oleosa

- mentol é dissolvido em óleo de hortelã-pimenta.

- polissorbato 80 é adicionado na mistura de mentol - óleo de hortelã sob agitação.

- esta mistura é então adicionada em propileno-glicol sob agitação.

- colorantes opcionais (tais como pigmentos, lacas) podem ser adicionados.

3. - sob agitação a fase oleosa é lentamente misturada na fase aquosa.

4. - os filmes finos são mecanicamente gerados usando um dispositivo de corte.

Formulações de amostra:

	formulação I		formulação II	
	peso [g]	composição em filme [%]	peso [g]	composição em filme [%]
Fase I				
aspartame	0,7	1,4	0,7	1,8
Kollicoat IR	35,0	68,5	25,0	65,8
ácido ascórbico	-	-	1,0	2,6
flavor de cereja			6,0	15,8
água desmineralizada	85,0	-	80,0	
Fase II				
mentol	1,4	2,7	-	
óleo de hortelã-pimenta	5,6	11,0	-	

polissorbato 80	0,7	1,4	-	
propileno-glicol	7,0	13,7	5,0	13,2
laca verde	0,7	1,4	-	
laca de azorubina	-	-	0,3	0,8
soma	136,1	100,0	118,0	100,0
teor de sólidos	51,1		38,0	

Outras modalidades e outros usos da invenção serão evidentes para aquelas pessoas experientes na técnica a partir da consideração do relatório descritivo e da prática da invenção aqui mostrados. Todas as referências aqui citadas, por qualquer motivo, incluindo todas publicações, 5 todas patentes U.S. e patentes estrangeiras e todos os pedidos de patente U.S. e pedidos de patente estrangeiros, são específica e inteiramente incorporados como referências para todos os propósitos. É intencionado que o relatório descritivo e os exemplos sejam considerados apenas exemplares com os escopo e espírito verdadeiros da invenção indicados pelas patentes seguintes.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de um microorganismo pertencendo ao grupo de bactérias do ácido lático ou a um mutante ou derivado do mesmo, caracterizado pelo fato de ser capaz de se ligar especificamente em uma
5 bactéria pertencendo ao grupo de Streptococos mutantes, sendo que a ligação específica é

- (i) resistente ao tratamento térmico; e/ou
 - (ii) resistente ao tratamento com protease; e/ou
 - (iii) dependente de cálcio; e/ou
 - 10 (iv) formada dentro de uma faixa de pH entre 4,5 e 8,5; e/ou
 - (v) formada na presença de saliva,
- para a preparação de uma composição anticariogênica para o tratamento ou prevenção de cárie causada por Streptococos mutantes que não Streptococcus mutans através da ligação aos ditos Streptococcus mutans.

15 2. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a ligação específica pode ser ensaiada como segue:

- (a) crescer dito microorganismo até fase estacionária;
- (b) misturar dito microorganismo com uma bactéria pertencendo ao grupo de Streptococos mutantes que tem sido crescido até
20 fase estacionária;
- (c) incubar a mistura obtida em etapa (b) sob condições permissoras da formação de agregados de dito microorganismo e uma bactéria do grupo de Streptococos mutantes; e
- (d) detectar agregados pela ocorrência de uma pelota.

25 3. Uso de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que dito microorganismo é um microorganismo pertencendo ao gênero de Lactobacillus.

4. Uso de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que dito microorganismo é um Lactobacillus paracasei selecionado do

grupo consistindo de *Lactobacillus paracasei* tendo número de acesso em DSMZ de DSM 16667, tendo número de acesso em DSMZ de DSM 16668, tendo número de acesso em DSMZ de DSM 16669, tendo número de acesso em DSMZ de DSM 16670 e tendo número de acesso em DSMZ de DSM 16671, ou um mutante ou derivado do mesmo, sendo que dito mutante ou derivado mantém a capacidade para se ligar a uma bactéria pertencendo ao grupo de *Streptococcus* mutantes ou em que dito *Lactobacillus* é um *Lactobacillus rhamnosus* selecionado do grupo consistindo de *Lactobacillus rhamnosus* tendo número de acesso em DSMZ de DSM 16672 e tendo número de acesso em DSMZ de DSM 16673 ou um mutante ou derivado do mesmo, sendo que dito mutante ou derivado mantém a capacidade de se ligar em uma bactéria pertencendo ao grupo de *Streptococcus* mutantes.

5. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que dito microorganismo é capaz de se ligar em pelo menos uma bactéria selecionada do grupo consistindo de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus cricatus*, *Streptococcus ratti*, *Streptococcus ferus* e *Streptococcus macacae*.

6. Uso de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que dito *Streptococcus mutans* é

(a) *Streptococcus mutans* sorotipo c (DSMZ 20523) e/ou sorotipo e (NCTC 10923) e/ou sorotipo f (NCTC 11060), ou

(b) *Streptococcus sobrinus* DSM 20742, ou

(c) *Streptococcus ratti* DSM 20564, ou

(d) *Streptococcus cricetus* DSM 20562, ou

(e) *Streptococcus ferus* DSM 20646, ou

(f) *Streptococcus macacae* DSM 20714.

7. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que dito tratamento térmico é realizado em uma temperatura entre 4°C e 121°C por pelo menos 20 minutos, e/ou em que dito

tratamento com protease é tratamento com uma protease selecionada do grupo consistindo de pronase E, proteinase K, tripsina e quimiotripsina.

8. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que dito derivado do microorganismo é um análogo ou fragmento de dito microorganismo, que está termicamente inativado ou liofilizado, sendo que dito análogo ou fragmento mantém a capacidade para se ligar especificamente em uma bactéria pertencendo ao grupo de *Streptococcus* mutantes.

9. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, sendo que dita composição anticariogênica é uma composição cosmética ou farmacêutica, que adicionalmente compreende um excipiente ou veículo cosmética, farmacêutica ou oralmente aceitável.

10. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que dita composição anticariogênica é um(a) dentífrico, goma de mascar, pastilha, colutório, enxaguatório bucal, fio dental ou fita dental, ou é um gênero alimentício anticariogênico ou uma ração anticariogênica, ou é um aditivo para alimento, ração ou bebidas.

FIGURA 1

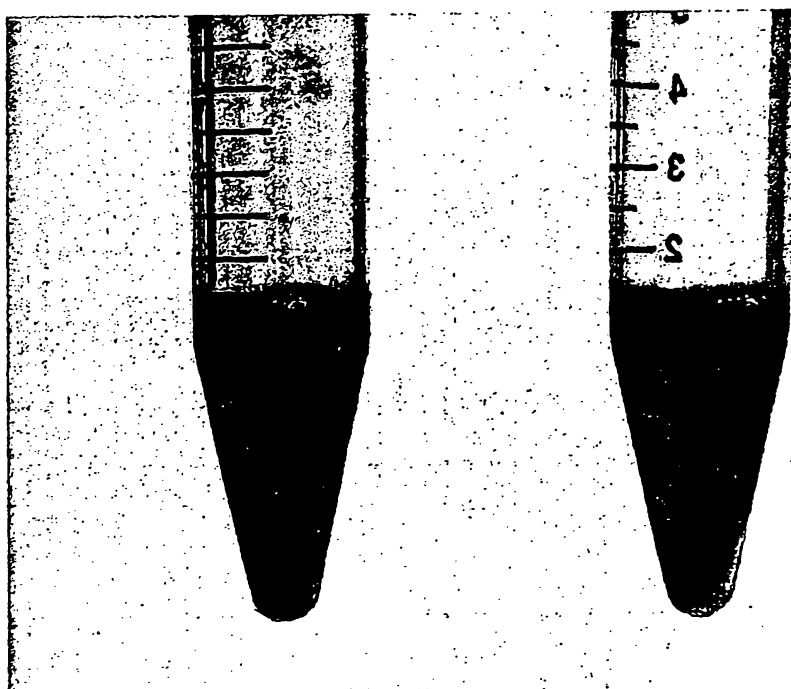


FIGURA 2

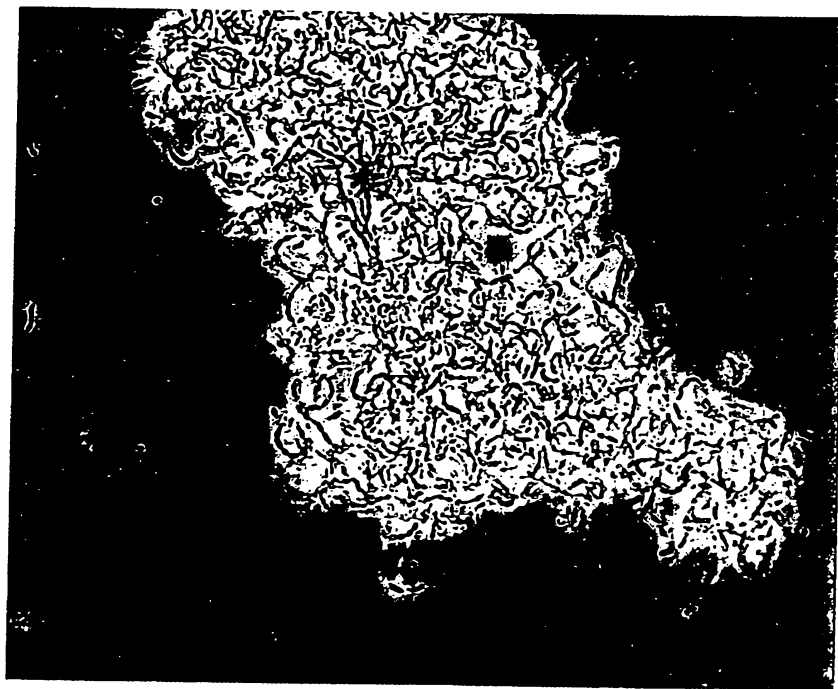


FIGURA 3

