

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 935 858**

51 Int. Cl.:

A61K 35/747 (2015.01)

A61P 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.05.2017 PCT/EP2017/061099**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.11.2017 WO17194564**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2017 E 17721191 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.11.2022 EP 3454873**

54 Título: **Composición probiótica y usos de la misma**

30 Prioridad:

09.05.2016 EP 16168814

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

13.03.2023

73 Titular/es:

ADM DENMARK A/S (100.0%)

**Bogbinderivej 6
3390 Hundested, DK**

72 Inventor/es:

BRANDBORG, ERIK

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 935 858 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición probiótica y usos de la misma

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una cepa de *Lactobacillus curvatus*. En particular, la presente invención se refiere a una composición que comprende una cepa de *Lactobacillus curvatus* en combinación con otro *Lactobacillus* y al uso de la misma en el tratamiento de afecciones inflamatorias en la cavidad bucal.

10

Antecedentes de la invención

El Proyecto Microbioma Humano ha permitido determinar que las biopelículas dentro y fuera de nuestros cuerpos han coevolucionado con la humanidad y desempeñan un papel importante en la salud. Lo mismo ocurre con la cavidad bucal, en la que la microbiota no desempeña un papel pasivo, sino que contribuye activamente al mantenimiento de la salud bucodental. Sin embargo, ciertos cambios ecológicos en el microbioma permiten que los patógenos se manifiesten y causen enfermedades bucales. Según la hipótesis de la placa ecológica, la caries y la periodontitis son el resultado de una hiperproliferación de especies acidúricas y proteolíticas inducida por factores ambientales, respectivamente.

15

20

La bacterioterapia es el término usado cuando una cepa efectora inocua es implantada en la microflora del huésped para mantener o restaurar un microbioma natural mediante la interferencia y/o inhibición de otros microorganismos y, especialmente, de patógenos. Esto podría abrir vías alternativas para combatir las enfermedades infecciosas con efectos secundarios menos nocivos y también podría ayudar en el tratamiento de trastornos que parecen no tener nada que ver con las bacterias, tales como asma, obesidad y diabetes. Las bacterias probióticas, definidas como "microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio a la salud del huésped" (OMS), son los candidatos sugeridos habitualmente para la bacterioterapia. Los posibles mecanismos de acción aún no se conocen del todo, pero parece evidente que existen efectos locales (directos) así como sistémicos (indirectos). Según Reid (2011) las posibles rutas son: i) coagregación con patógenos e inhibición del crecimiento, ii) producción de bacteriocinas y peróxido de hidrógeno, iii) exclusión competitiva por actividades antagonistas en los sitios de adhesión y nutrición, iv) inmunomodulación sistémica.

25

30

Los estudios *in vitro* han demostrado un efecto sobre la coagregación y la inhibición del crecimiento y los estudios clínicos han demostrado el efecto sobre los parámetros clínicos de la inflamación gingival (Twetman, 2012), pero aún se sabe poco sobre el efecto inmunomodulador en la cavidad bucal. Sin embargo, los estudios han sugerido que la citocina proinflamatoria TNF- α en el líquido crevicular gingival puede reducirse tras la ingesta a corto plazo de lactobacilos probióticos (Twetman *et al.*, 2009) y que la concentración de IgA secretora puede regularse por incremento (Ericson *et al.*, 2013).

35

40

Koll-Klais *et al.*, Oral Microbial Immunol (2005) divulgan que se recogieron 238 aislados de *Lactobacillus* obtenidos de la saliva y de zonas subgingivales de periodontitis crónica y de sujetos sanos. Las cepas se caracterizaron por medio de un análisis de restricción rápido del ADN ribosómico amplificado y se evaluó la actividad antimicrobiana frente a *Streptococcus mutans*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella intermedia*. El sesenta y nueve por ciento de los lactobacilos examinados inhibieron *S. mutans*, el 88 % *A. actinomycetemcomitans*, el 82 % *P. gingivalis* y el 65 % *P. intermedia*. La mayor actividad antimicrobiana se asoció a *Lactobacillus paracasei*, *L. plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus salivarius*. Las cepas procedentes de pacientes periodontalmente sanos mostraron una menor actividad antimicrobiana frente a *S. mutans* que las cepas procedentes de pacientes con periodontitis crónica.

45

50

El documento US 2014/0065218 A1 divulga un microorganismo del orden de las bacterias ácidolácticas con la capacidad de coagregarse con *Streptococcus pyogenes* y propone que una composición que contiene el microorganismo pueda usarse en la higiene personal y en el tratamiento de enfermedades.

55

El documento WO 2012/118535 A1 divulga composiciones antibiopelícula que comprenden uno o más organismos probióticos, miel antimicrobiana, y otros ingredientes tales como compuestos prebióticos, otros productos de colmena, derivados del té verde, otros derivados vegetales y vitamina D3.

60

Como consecuencia, existe la necesidad de composiciones que contribuyan al mantenimiento de la salud bucodental. En particular, existe la necesidad de composiciones que presenten un efecto inmunomodulador en la cavidad bucal y que puedan usarse en el tratamiento y la prevención de enfermedades periodontales tales como inflamación gingival o periodontitis.

Sumario de la invención

65

La presente invención se realizó en vista de la técnica anterior descrita anteriormente, y el objeto de la presente invención es proporcionar una composición probiótica, que pueda usarse en el mantenimiento de la salud bucodental

o en la prevención o el tratamiento de afecciones inflamatorias en la cavidad bucal, tales como inflamación gingival.

5 Para resolver el problema, la presente invención proporciona composiciones que comprenden la cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* (DSM 32307) y métodos de uso de las mismas. Es decir, los inventores de la presente invención han hallado que la composición de la presente invención que comprende la cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* (DSM 32307) es capaz de inhibir el crecimiento de cepas bacterianas patógenas conocidas por estar asociadas a enfermedades periodontales tales como gingivitis. La composición de la presente invención también presenta una alta relación de IL10/12 en un ensayo *in vitro* en células dendríticas inmaduras derivadas de monocitos. Los datos extraídos de un estudio *in vivo* demuestran que la composición de la presente invención que comprende la cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* (DSM 32307) reduce el volumen del líquido crevicular gingival (LCG) durante un periodo de 4 semanas. El estudio *in vivo* proporciona de este modo pruebas de que la composición de la presente invención es capaz de modular al menos un marcador clínico de inflamación gingival.

15 Un primer aspecto de la presente invención proporciona la cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus*. La cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* (también denominada P2-2 en el presente documento) fue depositada ante la DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Inhoffenstr. 7 B, D-38124 Braunschweig, Alemania) el 4 de mayo de 2016 a efectos de depósito de patentes conforme al Tratado de Budapest. El número de depósito de la cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* es DSM 32307.

20 Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un cultivo que comprende la cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* (DSM 32307).

Un tercer aspecto de la presente invención hace referencia a una composición que comprende la cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* (DSM 32307).

25 Un cuarto aspecto hace referencia a un nutracéutico que comprende la composición de la presente invención.

Un quinto aspecto hace referencia a un complemento nutritivo que comprende la composición de la presente invención.

30 Un sexto aspecto de la presente invención proporciona un recipiente que contiene la composición de la presente invención.

Un séptimo aspecto de la presente invención hace referencia a un kit que comprende una pluralidad de recipientes de la presente invención.

35 Se divulga un método para el mantenimiento de la salud bucodental de un sujeto, comprendiendo dicho método la etapa de

40 - proporcionar una cantidad terapéutica eficaz de la composición de la presente invención a un sujeto que lo necesite.

Se divulga también un método para reducir la inflamación gingival en un sujeto, comprendiendo dicho método la etapa de

45 - proporcionar una cantidad terapéutica eficaz de la composición de la presente invención a un sujeto que lo necesite.

Breve descripción de los dibujos

50 La Figura 1 muestra las relaciones de IL10/12 de un panel de cepas candidatas probióticas obtenidas mediante ensayos en células dendríticas inmaduras derivadas de monocitos procedentes de tres donantes diferentes (para más detalles, véase el Ejemplo 3)

55 La Figura 2 muestra la expresión de IL10 e IL12 inducida por cepas candidatas probióticas seleccionadas (PB-01, L33, P2-2 y P3-1) con ensayo en células dendríticas inmaduras derivadas de monocitos procedentes de tres donantes diferentes. El NCFM se incluye como referencia. Para más detalles, véase el Ejemplo 3.

60 La Figura 3 muestra las relaciones de IL10/12 obtenidas por las cepas candidatas probióticas seleccionadas (PB-01, L33, P2-2 y P3-1) con ensayo en células dendríticas inmaduras derivadas de monocitos procedentes de tres donantes diferentes. Para más detalles, véase el Ejemplo 3.

La Figura 4 muestra el volumen de líquido crevicular gingival (LCG) en función del tiempo de la intervención (probiótico vs. placebo). Para más detalles, véase el Ejemplo 4 (estudio *in vivo*). 1: Valor de referencia, 2: dos semanas, 3: tres semanas.

65 La Figura 5 muestra la digestión por Ascl (50 U durante la noche a 37 °C) del ADN genómico aislado de la cepa

bacteriana *Lactobacillus curvatus* denominada P2-2 (depositada ante la DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig, Alemania) el 4 de mayo de 2016 con el nombre de cepa, cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* - número de depósito DSM 32307).

5 La Figura 6 muestra el efecto de la composición probiótica en el líquido crevicular gingival en comparación con el tratamiento con placebo. El asterisco (*) indica la aplicación de un modelo ANOVA mixto bidireccional, que confirma que existe una interacción estadísticamente significativa entre la intervención y el tiempo en el LCG, $p < 0,05$.

10 La Figura 7 muestra los resultados de las mediciones de ELISA de IL10 (barra izquierda) e IL12p70 (barra derecha) tras la exposición a diferentes cepas probióticas y la posterior respuesta Th1 inducida por cócteles.

15 La Figura 8 muestra los resultados de las mediciones de ELISA de IL10 (barra izquierda) e IL12p70 (barra derecha) tras la exposición a cepas probióticas en diferentes dosis y mezclas y la posterior respuesta Th1 inducida por cócteles (Donante 16).

La Figura 9 muestra los resultados de las mediciones de ELISA de IL10 (barra izquierda) e IL12p70 (barra derecha) tras la exposición a cepas probióticas en diferentes dosis y mezclas y la posterior respuesta Th1 inducida por cócteles (Donante 17).

20 La Figura 10 muestra los resultados de las mediciones de ELISA de IL10 (barra izquierda) e IL23 (barra derecha) tras la exposición a diferentes cepas probióticas y la posterior respuesta Th17 inducida por cócteles.

25 La Tabla 1 muestra la puntuación de las cepas probióticas de los estudios clínicos. Puntuaciones de las cepas probióticas individuales en relación con los criterios definidos en el Ejemplo 6. La escala de puntuación va de 0 a 4 y se define como una puntuación relativa donde 4 es la mejor en relación con la obtención de un efecto antiinflamatorio potencial.

Descripción detallada de la invención

30 En la descripción de las realizaciones de la invención, se recurrirá a terminología específica por motivos de claridad. Sin embargo, la invención no pretende limitarse a los términos específicos así seleccionados, y se entiende que cada término específico incluye todos los equivalentes técnicos que funcionan de manera similar para conseguir un propósito similar.

35 El inventor sometió un panel de cepas bacterianas candidatas a un ensayo de interferencia por superposición de agar para identificar cepas bacterianas entre las candidatas, que fueran capaces de inhibir el crecimiento de cepas bacterianas patógenas conocidas por estar asociadas a enfermedades periodontales.

40 El panel de cepas bacterianas candidatas incluía las cepas bacterianas S1-P1, S1-P2, S1-P3, P2-1, P2-2, P2-3, P3-1, P3-2, P5-1 que se aislaron de una muestra de frotis bucal obtenida de un individuo sano. El panel de cepas bacterianas candidatas incluía además incluía DSM15224, la cepa WCFS-1 de *Lactobacillus plantarum*, la cepa EB01 de *Lactobacillus gasseri* (DSM 14869) y la cepa L33 JCM 1231 de *Lactobacillus salivarius* (ATCC SD5208) (Véase el Ejemplo 1). La cepa bacteriana P2-2 también se denomina cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* (DSM 32307).

45 Los resultados del ensayo de interferencia de superposición de agar se divulgan en el Ejemplo 2. El inventor descubrió que varias cepas tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de las cepas patógenas incluso si se siembran en placas a baja densidad (10^1 UFC).

50 El panel de cepas bacterianas candidatas se sometió posteriormente a un ensayo de modulación inmunitaria *in vitro*, en donde se evaluó la capacidad de las cepas bacterianas candidatas para estimular las células dendríticas inmaduras derivadas de monocitos a fin de secretar IL-10 e IL-12. Una alta relación de IL10/12 puede correlacionarse con un efecto protector frente a la inflamación gingival. En el estudio se incluyó como referencia la cepa bacteriana probiótica *Lactobacillus acidophilus* NCFM (ATCC 700396). Los resultados del ensayo de modulación inmunitaria se divulgan en el Ejemplo 3.

55 Nueve cepas de las 14 cepas ensayadas presentaron una relación de IL10/12 superior a 5 y cuatro cepas presentaron una relación de IL10/12 superior a 50. El inventor descubrió que aunque varias cepas ponen de manifiesto una inhibición del crecimiento de cepas bacterianas patógenas conocidas por estar asociadas a enfermedades periodontales, esta capacidad no se correlaciona necesariamente con una alta relación de IL10/12 y, por tanto, con un efecto protector frente a la inflamación. Por ejemplo, las cepas candidatas DSM15224, P5-1, WCFS-1 y L33 inhiben el crecimiento de cepas bacterianas patógenas incluso cuando las cepas candidatas se siembran en placas a baja densidad, pero no consiguen presentar una alta relación de IL10/12 en el ensayo de modulación inmunitaria.

65 Las cepas de la cepa P3-1 de *Lactobacillus curvatus*, P2-2 de *Lactobacillus curvatus* (DSM 32307) y PB01 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 14870) se seleccionaron para estudios posteriores (basándose en la puntuación resumida en la Tabla 1). El inventor descubrió que la cepa P3-1 de *Lactobacillus curvatus* no podía producirse a gran

escala para pruebas clínicas, por lo que el estudio posterior se limitó a *Lactobacillus rhamnosus* P2-2 (DSM 32307) y *Lactobacillus rhamnosus* PB01(DSM 14870)

5 La cepa bacteriana P2-2 de *Lactobacillus curvatus* (DSM 32307), también denominada cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus*, fue seleccionada para pruebas clínicas en combinación con *Lactobacillus rhamnosus* PB01 (DSM 14870). Los resultados del estudio clínico se divulgan en el Ejemplo 4. Los datos demuestran que la composición que comprende la cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* (DSM 32307) es capaz de reducir el volumen de líquido crevicular gingival (LCG), un marcador clínico de la inflamación gingival, durante un periodo de 4 semanas. El estudio clínico respalda de esta manera el uso de una composición que comprende la cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* (DSM 32307) como una composición antiinflamatoria, que puede usarse para prevenir o tratar afecciones inflamatorias en la cavidad bucal, tales como enfermedades periodontales, en particular, gingivitis.

15 Un primer aspecto de la presente invención proporciona una cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* (DSM 32307). La cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* aislada se depositó ante la DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig, Alemania) el 4 de mayo de 2016 a efectos de depósito de patentes conforme al Tratado de Budapest. La cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* (DSM 32307) también se denomina en el presente documento cepa P2-2 de *Lactobacillus curvatus*. El análisis de la secuencia 16S se realizó usando un fragmento amplificado por PCR del gen de ARNr 16S de la cepa. La secuencia se comparó por blast a través del NCBI con las bases de datos de secuencias, lo que confirma que una secuencia de 698 bases tiene un 100 % de identidad con el ARNr 16S de *Lactobacillus curvatus*.

25 *Lactobacillus curvatus* EB10 (DSM 32307) se aisló originalmente de la cavidad bucal, es decir, de la mucosa bucal de donantes humanos sanos. La cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* ha sido caracterizada genéticamente y clasificada adecuadamente como *Lactobacillus curvatus* por laboratorios independientes usando los métodos genotípicos más recientes, incluyendo el análisis de la secuencia del gen de ARNr 16S y PFGE en relación con la caracterización de la cepa (Véase el Ejemplo 6 para los datos de PFGE).

30 La morfología de la cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* (DSM 32307) se ha evaluado mediante microscopía. La cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* (DSM 32307) aparece como una colonia de color gris mate. Las células son bastoncitos largos que forman cadenas de dos o cadena corta de más células, que no forman esporas.

35 En una realización, la cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* aislada (DSM 32307) se proporciona en su forma aislada pura. En otra realización, la cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* (DSM 32307) se proporciona en su forma aislada esencial.

40 Un segundo aspecto de la presente invención proporciona un cultivo microbiano, caldo de cultivo o fermento que comprende la cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* (DSM 32307) de la presente invención. Las células de la cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* (DSM 32307) comprendidas en el cultivo microbiano, caldo de cultivo o fermento son en un principio esencialmente todas viables. Por esencialmente todas viables se entiende que al menos el 50 % de las bacterias presentes en el cultivo microbiano, caldo de cultivo o fermento inmediatamente después de la preparación del mismo son viables, tal como al menos el 75 %, por ejemplo, al menos el 85 %, tal como al menos el 90 %, por ejemplo, al menos el 95 %.

45 La viabilidad de las bacterias puede confirmarse sembrando en placas las bacterias en un medio adecuado (por ejemplo, agar solidificado en una placa de Petri de tamaño estándar) y determinando el número de colonias formadas. La medición, unidades formadoras de colonias (o UFC), se usa para cuantificar la cantidad de bacterias viables (vivas) en la composición (lo que refleja la capacidad de las bacterias para replicarse).

50 Las bacterias comprendidas en el cultivo microbiano, caldo de cultivo, fermento y composición de la presente invención otorgan un beneficio a la salud del sujeto, cuando son ingeridas en cantidades adecuadas por un sujeto (tal como en la forma de una formulación como se describe en el presente documento). De ello se desprende que las bacterias no son patógenas y no otorgan ningún efecto perjudicial en las cantidades ingeridas. Las bacterias también se denominan bacterias probióticas.

55 En una realización de la presente invención, el cultivo microbiano, caldo de cultivo o fermento es puro o esencialmente puro, en el sentido de que el único organismo o esencialmente el único organismo presente es la cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* (DSM 32307).

60 En otra realización, el cultivo microbiano, caldo de cultivo o fermento comprende al menos un microorganismo probiótico adicional, preferentemente una bacteria probiótica. Preferentemente la al menos una bacteria probiótica adicional es un *Lactobacillus* sp. Más preferentemente, el cultivo microbiano, caldo de cultivo o fermento comprende la cepa PB01 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 14870). En otra realización más, el cultivo microbiano, caldo de cultivo o fermento comprende además la cepa LS33 de *Lactobacillus salivarius* (ATCC SD5208). En una realización, las bacterias presentes en el cultivo microbiano, caldo de cultivo o fermento consiste esencialmente en la cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* (DSM 32307), cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* (DSM 32307) y cepa PB01 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 14870), cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* (DSM 32307) y cepa LS33 de *Lactobacillus salivarius*

(ATCC SD5208) o cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* (DSM 32307) y cepa PB01 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 14870) y cepa LS33 de *Lactobacillus salivarius* (ATCC SD5208). Los microbios presentes en el cultivo microbiano, caldo de cultivo o fermento están preferentemente equilibrados de modo que la cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* (DSM 32307) no sea superada en número por otras bacterias incluidas en el cultivo microbiano, caldo de cultivo o fermento. Por ejemplo, las CFU en el cultivo microbiano, caldo de cultivo o fermento pueden estar distribuidas uniformemente entre los microbios presentes.

En otra realización, al menos el 50 % de las UFC es la cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* (DSM 32307), tal como al menos el 60 %, por ejemplo, al menos el 70 %, tal como al menos el 80 %, por ejemplo, al menos el 90 %, tal como al menos el 95 % de las UFC es la cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* (DSM 32307). En una realización adicional, aproximadamente el 50 % de las UFC es la cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* (DSM 32307) y aproximadamente el 50 % de las UFC es la cepa PB01 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 14870). En otra realización adicional más, aproximadamente el 50 % de las UFC es la cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* (DSM 32307) y aproximadamente el 50 % de las UFC es la cepa LS33 de *Lactobacillus salivarius* (ATCC SD5208).

Un tercer aspecto proporciona una composición que comprende la cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* (DSM 32307). En una realización de la presente invención, la composición es pura o esencialmente pura, en el sentido de que el único organismo o esencialmente el único organismo presente es la cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* (DSM 32307).

En otra realización, la composición comprende al menos otro microorganismo probiótico, preferentemente una bacteria probiótica. Preferentemente la al menos una bacteria probiótica adicional es un *Lactobacillus sp.* Más preferentemente, la composición comprende la cepa PB01 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 14870). En otra realización más, la composición comprende además la cepa LS33 de *Lactobacillus salivarius* (ATCC SD5208). En una realización, las bacterias presentes en la composición consisten esencialmente en la cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* (DSM 32307), cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* (DSM 32307) y cepa PB01 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 14870), cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* (DSM 32307) y cepa LS33 de *Lactobacillus salivarius* (ATCC SD5208) o cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* (DSM 32307) y cepa PB01 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 14870) y cepa LS33 de *Lactobacillus salivarius* (ATCC SD5208). Los microbios presentes en la composición están preferentemente equilibrados de modo que la cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* (DSM 32307) no sea superada en número por otras bacterias incluidas en la composición. Por ejemplo, las CFU en la composición pueden estar distribuidas uniformemente entre los microbios presentes.

En otra realización, al menos el 50 % de las UFC es la cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* (DSM 32307), tal como al menos el 60 %, por ejemplo, al menos el 70 %, tal como al menos el 80 %, por ejemplo, al menos el 90 %, tal como al menos el 95 % de las UFC es la cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* (DSM 32307). En una realización adicional, aproximadamente el 50 % de las UFC es la cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* (DSM 32307) y aproximadamente el 50 % de las UFC es la cepa PB01 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 14870). En otra realización adicional más, aproximadamente el 50 % de las UFC es la cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* (DSM 32307) y aproximadamente el 50 % de las UFC es la cepa LS33 de *Lactobacillus salivarius* (ATCC SD5208).

Las unidades formadoras de colonias (UFC) iniciales y la estabilidad y viabilidad continuas de la composición están influidas por diversos factores. La estabilidad de una composición probiótica examinada en el momento de la fabricación dependerá de una combinación de factores. Las variaciones en el envasado, la temperatura y la humedad afectarán a la viabilidad de los productos probióticos antes de su consumo. Los factores de protección que ayudan a preservar la frescura y viabilidad de las cepas probióticas de un complemento incluyen refrigeración, envase resistente y almacenamiento en un lugar fresco y seco. Si una composición probiótica se mantiene en condiciones que son muy cálidas o húmedas, las UFC en la composición disminuyen. Por tanto, la estabilidad y viabilidad continuas dependen de que se limite su exposición a condiciones ambientales estimulantes tales como calor y humedad.

En una realización de la presente invención, la composición comprende al menos 10^5 UFC de *Lactobacillus* por gramo de dicha composición, tal como al menos 10^6 UFC de *Lactobacillus* por gramo de dicha composición, por ejemplo al menos 10^7 UFC de *Lactobacillus* por gramo de dicha composición, tal como al menos 10^8 UFC de *Lactobacillus* por gramo de dicha composición, por ejemplo al menos 10^9 UFC de *Lactobacillus* por gramo de dicha composición, tal como al menos 10^{10} UFC de *Lactobacillus* por gramo de dicha composición.

En una realización de la presente invención, la composición comprende de 10^5 a 10^{13} UFC de *Lactobacillus* por gramo de dicha composición. En otra realización de la presente invención, la composición comprende de 10^6 a 10^{12} UFC de *Lactobacillus* por gramo de dicha composición. En otra realización más, la composición comprende de 10^7 a 10^{11} UFC de *Lactobacillus* por gramo de dicha composición. En una realización adicional, la composición comprende de 10^8 a 10^{10} UFC de *Lactobacillus* por gramo de dicha composición, tal como 10^9 *Lactobacillus* por gramo de dicha composición.

En una realización preferida, la composición comprende la cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* (DSM 32307) y la cepa PB01 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 14870). En una realización, la composición comprende al menos 10^7 UFC de la cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* (DSM 32307) por gramo de dicha composición, tal como al menos 10^8

UFC de la cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* (DSM 32307) por gramo de dicha composición, por ejemplo al menos 10^9 UFC de la cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* (DSM 32307) por gramo de dicha composición, tal como al menos 10^{10} UFC de la cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* (DSM 32307) por gramo de dicha composición.

5 En una realización adicional, la composición comprende además la cepa PB01 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 14870), por ejemplo al menos 10^7 UFC de la cepa PB01 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 14870) por gramo de dicha composición, tal como al menos 10^8 UFC de la cepa PB01 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 14870) por gramo de dicha composición, por ejemplo al menos 10^9 UFC de la cepa PB01 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 14870) por gramo de dicha composición, tal como al menos 10^{10} UFC de la cepa PB01 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 14870) por gramo de dicha composición.

15 En otra realización adicional más, la composición comprende además la cepa LS33 de *Lactobacillus salivarius* (ATCC SD5208), por ejemplo al menos 10^7 UFC de la cepa LS33 de *Lactobacillus salivarius* (ATCC SD5208) por gramo de dicha composición, tal como al menos 10^8 UFC de la cepa LS33 de *Lactobacillus salivarius* (ATCC SD5208) por gramo de dicha composición, por ejemplo al menos 10^9 UFC de la cepa LS33 de *Lactobacillus salivarius* (ATCC SD5208) por gramo de dicha composición, tal como al menos 10^{10} UFC de la cepa LS33 de *Lactobacillus salivarius* (ATCC SD5208) por gramo de dicha composición.

20 Las cepas de *Lactobacillus* de la composición de la presente invención pueden proporcionarse en cualquier forma adecuada dependiendo de la formulación de la composición. En una realización preferida, el *Lactobacillus* se encuentra en forma liofilizada o secada por pulverización.

Excipientes

25 En una realización de la presente invención, la composición comprende además al menos un excipiente. En otra realización, el al menos un excipiente se selecciona del grupo que consiste en un agente espesante, un aglutinante, un agente de recubrimiento, un edulcorante y un aroma.

30 En el contexto de la presente invención, la expresión "agente espesante" se refiere a un aditivo que aumenta el volumen o el peso de la composición manteniendo intacta su utilidad o funcionalidad. En una realización de la presente invención, la composición comprende al menos un agente espesante seleccionado del grupo que consiste en xilitol, sorbitol, eritritol, maltitol, lactitol, inositol y manitol, celulosa microcristalina e isomalt.

35 En el contexto de la presente invención, el término "aglutinante" se refiere al material aglutinante que mantiene unidos los componentes de la composición, estabiliza una forma o estado o provoca la coalescencia de una mezcla. En una realización de la presente invención, la composición comprende al menos un aglutinante seleccionado del grupo que consiste en maltodextrina y carboximetilcelulosa sódica.

40 En el contexto de la presente invención, la expresión "agente de recubrimiento" se refiere a una sustancia natural o sintética que proporciona un revestimiento ceroso, homogéneo, con el fin de proporcionar protección a la composición. En una realización de la presente invención, la composición comprende al menos un agente de recubrimiento seleccionado del grupo que consiste en mono- y diglicéridos de ácidos grasos, dióxido de silicio, ácido esteárico, cera de abeja, cera de candelilla, cera de carnauba, goma laca, cera microcristalina, cera cristalina, lanolina, cera de polietileno oxidada, ésteres de colofonia, parafina.

45 La composición de la presente invención puede comprender además al menos un edulcorante. En una realización, el al menos un edulcorante es un edulcorante bajo en calorías.

50 En una realización, el edulcorante bajo en calorías se selecciona de la lista que consiste en un edulcorante de carga y un edulcorante intenso. En una realización más, el edulcorante bajo en calorías es un alcohol de azúcar. En una realización adicional, el edulcorante bajo en calorías se selecciona de la lista que consiste en xilitol, sorbitol, eritritol, maltitol, lactitol, isomalt, inositol y manitol.

55 La composición puede comprender una combinación de edulcorantes bajos en calorías, tal como una combinación de alcoholes de azúcar como se ha descrito anteriormente. Como alternativa, la composición también puede comprender una combinación de uno o más edulcorantes de carga y uno o más edulcorantes intensos.

60 En una realización, la composición comprende un edulcorante intenso seleccionado de la lista que consiste en sacarina, aspartamo, estevia, un glucósido de esteviol tal como esteviósido, sucralosa y acesulfamo, tal como acesulfamo potásico (Ace-K). En otra realización, el edulcorante se selecciona del grupo que consiste en rebaudiósido, aspartamo, neotamo, sacarina y advantame.

65 La composición de la presente invención comprende al menos un aroma. Puede incluirse más de un aroma para proporcionar una experiencia gustativa más compleja. En una realización, dicho al menos un aroma es al menos un aroma seleccionado del grupo que consiste en ácido cítrico, aroma de limón, aroma de melón chino, aroma de arándano, aroma de melocotón, aroma de fresa, aroma de frambuesa, aroma de cola, aroma de chocolate, aroma de

menta, aroma de cereza, aroma de lima, aroma de naranja, aroma de vainilla, aroma de mandarina, aroma de regaliz, aroma de albaricoque, aroma de eucalipto, aroma de té verde, aroma de jengibre y aroma de arándano. La cantidad de compuestos aromatizantes en la composición puede variar. En una realización, el al menos un aroma está presente en una cantidad del 1 al 10 % p/p en dicha composición.

5

En una realización preferida, la composición de la invención comprende:

- (i) agentes espesantes en forma de xilitol y celulosa microcristalina, isomalt,
- (ii) aglutinantes en forma de maltodextrina y carboximetilcelulosa sódica,
- 10 (iii) agentes de recubrimiento en forma de mono- y diglicéridos de ácidos grasos y dióxido de silicio,
- (iv) un edulcorante en forma de glucósido de esteviol, y
- (v) aromas en forma de ácido cítrico y aroma de limón.

15

La composición también puede comprender un prebiótico que estimule la proliferación del microorganismo en el tracto GI del sujeto que ingiere la composición. En una realización, la composición comprende además al menos un prebiótico seleccionado del grupo que consiste en sialooligosacáridos (SOS), fructooligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOS), isomaltooligosacáridos (IMO), xilooligosacáridos (XOS), arabinoxilooligosacáridos (AXOS), mananoligosacáridos (MOS), oligosacáridos de soja, glucosilsacarosa (GS), lactosacarosa (LS), sialil-lactosa (SL), fucosil-lactosa (FL), lacto-N-neotetraosa (LNNT), lactulosa (LA), palatinosa-oligosacáridos (PAO),

20

Formulación de la composición de la invención

25

La composición puede proporcionarse en cualquier formulación adecuada. Preferentemente, la composición se proporciona en una formulación adecuada para administración oral. En una realización, la composición se encuentra en forma de un comprimido, una cápsula, polvo, comprimido efervescente, polvo efervescente, granulado, un producto microencapsulado, una suspensión, pulverización, un gel o una crema. En una realización preferida, la composición está formulada como un comprimido, preferentemente un comprimido masticable.

30

En una realización, la combinación de la presente invención está formulada como una composición farmacéutica, que comprende al menos un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Uso de la composición de la invención

35

Un aspecto de la presente invención proporciona la composición para su uso como un medicamento. El inventor ha descubierto que la composición de la presente invención es capaz de reducir el volumen de líquido crevicular gingival (LCG), un marcador clínico de la inflamación gingival, durante un periodo de 4 semanas. El estudio *in vitro* demuestra además que la composición de la presente invención presenta una alta relación de IL10/12, lo que sugiere un efecto protector frente a inflamación tal como inflamación gingival.

40

Los datos proporcionados de este modo corroboran el uso de una composición que comprende la cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* (DSM 32307) como una composición antiinflamatoria, que puede usarse para prevenir o tratar afecciones inflamatorias en la cavidad bucal, tales como enfermedades periodontales, en particular, gingivitis.

45

Por tanto, un aspecto de la presente invención se refiere a la composición de la presente invención para su uso en el tratamiento de una afección inflamatoria. En una realización, la dicha enfermedad inflamatoria es una afección inflamatoria en la cavidad bucal. En una realización adicional, la afección inflamatoria es enfermedades periodontales tales como gingivitis o periodontitis. En una realización preferida, la afección inflamatoria es gingivitis.

50

La composición puede ser destinada a administración como una dosis diaria. Por consiguiente, la composición puede formularse de este modo, por ejemplo, como una dosis unitaria diaria. La composición también puede ser destinada a administración como una dosis dos veces al día, una dosis tres veces al día o incluso a una administración de varias veces al día. De ello se desprende que la composición puede formularse de este modo según la pauta posológica. En una realización de la presente invención, la composición se administra dos veces al día.

55

En una realización, la composición comprende al menos 10^7 UFC de *Lactobacillus* por dosis diaria, tal como en el intervalo de 10^7 a 10^{10} UFC de *Lactobacillus* por dosis diaria, tal como de 10^8 a 10^9 UFC de *Lactobacillus* por dosis diaria.

60

En una realización, la composición comprende al menos 10^7 UFC de la cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* (DSM 32307) por dosis diaria, por ejemplo al menos 5×10^7 UFC de la cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* por dosis diaria, tal como en el intervalo de 10^7 a 10^{10} UFC de la cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* por dosis diaria, tal como de 10^8 a 10^9 UFC de la cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* por dosis diaria.

65

En otra realización, la composición comprende además la cepa PB01 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 14870). En una realización, la composición comprende además al menos 10^7 UFC de la cepa PB01 de *Lactobacillus rhamnosus*

(DSM 14870) por dosis diaria, por ejemplo al menos 5×10^7 UFC de la cepa PB01 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 14870) por dosis diaria, tal como en el intervalo de 10^7 a 10^{10} UFC de la cepa PB01 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 14870) por dosis diaria, tal como de 10^8 a 10^9 UFC de la cepa PB01 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 14870) por dosis diaria.

5 En una realización, la composición comprende al menos 10^7 UFC de la cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* (DSM 32307) por dosis diaria, tal como al menos 5×10^7 UFC de la cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* por dosis diaria y al menos 1×10^7 UFC de la cepa PB01 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 14870) por dosis diaria, tal como al menos 5×10^7 UFC de la cepa PB01 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 14870) por dosis diaria.

10 En otra realización, la composición comprende además la cepa LS33 de *Lactobacillus salivarius* (ATCC SD5208). En una realización, la composición comprende además al menos 10^7 UFC de la cepa LS33 de *Lactobacillus salivarius* (ATCC SD5208) por dosis diaria, por ejemplo al menos 5×10^7 UFC de la cepa LS33 de *Lactobacillus salivarius* (ATCC SD5208) por dosis diaria, tal como en el intervalo de 10^7 a 10^{10} UFC de la cepa LS33 de *Lactobacillus salivarius* (ATCC SD5208) por dosis diaria, tal como de 10^8 a 10^9 UFC de la cepa LS33 de *Lactobacillus salivarius* (ATCC SD5208) por dosis diaria.

15 En una realización, la composición comprende al menos 10^7 UFC de la cepa LS33 de *Lactobacillus salivarius* (ATCC SD5208) por dosis diaria, tal como al menos 5×10^7 UFC de la cepa LS33 de *Lactobacillus salivarius* (ATCC SD5208) por dosis diaria y al menos 1×10^7 UFC de la cepa LS33 de *Lactobacillus salivarius* (ATCC SD5208) por dosis diaria, tal como al menos 5×10^7 UFC de la cepa LS33 de *Lactobacillus salivarius* (ATCC SD5208) por dosis diaria.

20 En una realización, la composición comprende al menos 10^7 UFC de la cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* (DSM 32307) por dosis diaria, tal como al menos 5×10^7 UFC de la cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* por dosis diaria y al menos 1×10^7 UFC de la cepa LS33 de *Lactobacillus salivarius* (ATCC SD5208) por dosis diaria, tal como al menos 5×10^7 UFC de la cepa LS33 de *Lactobacillus salivarius* (ATCC SD5208) por dosis diaria.

25 En una realización de la presente invención, la composición para el uso según la invención se administra por vía oral. Con este fin, la composición puede proporcionarse en la forma de un comprimido, una cápsula, polvo, comprimido efervescente, polvo efervescente, granulado, un producto microencapsulado, una suspensión, pulverización, un gel o una crema. En una realización preferida, la composición está formulada como un comprimido, preferentemente un comprimido masticable.

30 Se divulga además un método para el mantenimiento de la salud bucodental de un sujeto, comprendiendo dicho método la etapa de

- proporcionar una cantidad terapéutica eficaz de una composición según la presente invención a un sujeto que lo necesite.

35 Se divulga además un método para reducir la inflamación gingival en un sujeto, comprendiendo dicho método la etapa de

- proporcionar una cantidad terapéutica eficaz de una composición según la presente invención a un sujeto que lo necesite.

40 Se divulga un método para reducir el volumen de líquido crevicular gingival (LCG) en un sujeto, comprendiendo dicho método la etapa de

- proporcionar una cantidad terapéutica eficaz de una composición según la presente invención a un sujeto que lo necesite.

45 Los métodos divulgados pueden incluir una etapa adicional de toma de muestras y control del volumen de líquido crevicular gingival (LCG) durante el tratamiento, por ejemplo, por referencia al volumen de líquido crevicular gingival (LCG) antes del comienzo del tratamiento.

50 Los métodos anteriores comprenden preferentemente la administración diaria de la composición de la presente invención. En una realización, la composición proporcionada al sujeto comprende al menos 10^7 UFC de *Lactobacillus* por dosis diaria, tal como en el intervalo de 10^7 a 10^{10} UFC de *Lactobacillus* por dosis diaria, tal como de 10^8 a 10^9 UFC de *Lactobacillus* por dosis diaria.

55 La composición comprende al menos 10^7 UFC de la cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* (DSM 32307) por dosis diaria, por ejemplo al menos 5×10^7 UFC de la cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* por dosis diaria, tal como en el intervalo de 10^7 a 10^{10} UFC de la cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* por dosis diaria, tal como de 10^8 a 10^9 UFC de la cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* por dosis diaria.

60 La composición comprende además la cepa PB01 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 14870). En una realización, la

composición comprende además al menos 10^7 UFC de la cepa PB01 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 14870) por dosis diaria, por ejemplo al menos 5×10^7 UFC de la cepa PB01 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 14870) por dosis diaria, tal como en el intervalo de 10^7 a 10^{10} UFC de la cepa PB01 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 14870) por dosis diaria, tal como de 10^8 a 10^9 UFC de la cepa PB01 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 14870) por dosis diaria.

5 La composición comprende al menos 10^7 UFC de la cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* (DSM 32307) por dosis diaria, tal como al menos 5×10^7 UFC de la cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* por dosis diaria y al menos 1×10^7 UFC de la cepa PB01 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 14870) por dosis diaria, tal como al menos 5×10^7 UFC de la cepa PB01 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 14870) por dosis diaria.

10 Complementos

En el contexto de la presente invención, un complemento nutritivo (o un complemento dietético) es un producto destinado a la ingestión que contiene un "ingrediente dietético" destinado a añadir valor nutritivo adicional a la dieta (o complemento).

Un aspecto de la presente invención proporciona un complemento nutritivo que comprende la composición de la presente invención.

20 En el contexto de la presente invención, el término "nutracéutico" se refiere a un producto derivado de fuentes alimentarias con los beneficios adicionales para la salud descritos en el presente documento, además del valor nutritivo básico que se encuentra en los alimentos. Los nutracéuticos de la presente invención pueden contribuir al mantenimiento de la salud bucodental en un sujeto y a reducir el riesgo de tener una afección inflamatoria de la cavidad bucal, tal como enfermedad periodontal, por ejemplo gingivitis. Los nutracéuticos de la presente invención también pueden reducir el volumen de líquido crevicular gingival (LCG), un marcador clínico de la inflamación gingival y contribuir de este modo a la prevención o tratamiento de la inflamación gingival.

Un aspecto de la presente invención proporciona un nutracéutico que comprende la composición de la presente invención. En una realización, el nutracéutico se proporciona en forma de un alimento funcional. El alimento funcional es una categoría que incluye alimentos enteros y fortificados con la composición de la presente invención. En otra realización, el nutracéutico se proporciona en forma de un alimento médico. El alimento médico está formulado para ser consumido o administrado internamente, bajo la supervisión de un médico cualificado. El complemento nutritivo puede proporcionarse en muchas formas, tales como comprimidos (tales como comprimidos masticables), comprimido efervescente, polvo efervescente, cápsulas, cápsulas blandas, cápsulas de gel, líquidos o polvos.

30 El complemento nutritivo de la presente invención puede contribuir al mantenimiento de la salud bucodental en un sujeto y a reducir el riesgo de tener una afección inflamatoria en la cavidad bucal, tal como enfermedad periodontal, por ejemplo gingivitis. El complemento nutritivo de la presente invención también puede reducir el volumen de líquido crevicular gingival (LCG), un marcador clínico de la inflamación gingival y contribuir de este modo a la prevención o tratamiento de la inflamación gingival.

Envasado

La composición de la presente invención está normalmente envasada en un recipiente, que preferentemente está cerrado herméticamente, que proporciona una barrera frente al oxígeno y a la humedad para mantener la integridad de la composición.

En consecuencia, un aspecto de la presente invención hace referencia a un recipiente que contiene la composición de la presente invención. Los ejemplos no limitativos de recipientes adecuados incluyen un envase alveolado (tal como un envase alveolado de comprimidos), una barra, bolsa, bolsita o cápsula. En una realización preferida, el recipiente es una lámina de aluminio o una barra de polietileno, que normalmente se sella por soldadura. La barra está normalmente configurada para una fácil apertura por rasgado. La barra puede tener una línea punteada de corte. Por tanto, la barra puede ser desechada tras la ingestión de la composición. Preferentemente, el recipiente, tal como en forma de una barra o envase alveolado de comprimidos, comprende una dosis única de la composición.

55 El recipiente puede comprender un desecante que induzca o mantenga un estado de sequedad (desecación) de la composición. Los desecantes pueden encontrarse en formas distintas a la sólida, y pueden funcionar a través de otros principios, tales como la unión química de las moléculas de agua.

60 El desecante puede ser cualquier desecante adecuado para aplicaciones alimentarias o farmacéuticas. Los ejemplos de desecantes incluyen sílice, carbón vegetal y tamices moleculares.

En un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un kit, en donde dicho kit comprende una pluralidad de recipientes, cada uno comprendiendo la composición de la presente invención. Preferentemente, cada recipiente del kit comprende una dosis única de la composición. Cada recipiente del kit puede comprender la misma composición. Como alternativa, los recipientes pueden comprender composiciones diferentes, por ejemplo, las composiciones

pueden comprender diferentes aromas.

5 Cuando se describen las realizaciones de la presente invención, no se han descrito explícitamente las combinaciones y permutaciones de todas las posibles realizaciones. No obstante, el simple hecho de que determinadas medidas se indiquen en diferentes reivindicaciones dependientes mutuamente diferentes o se describan en diferentes realizaciones, no indica que una combinación de estas medidas no pueda usarse para sacar provecho. La presente invención contempla todas las posibles combinaciones y permutaciones de las realizaciones descritas.

10 Las expresiones "que comprende", "comprender" y "comprende" en el presente documento están pensadas por los inventores para ser opcionalmente sustituibles por las expresiones "que consiste en", "consistir en" y "consiste en", respectivamente, en cada caso.

Ejemplos

15 Ejemplo 1

Cepas bacterianas

Cepas probióticas candidatas

| ID de la cepa | | Número de depósito |
|---------------|--|--------------------|
| S1-P1 | <i>Lactobacillus fermentum</i> | |
| S1-P2 | <i>Lactobacillus fermentum</i> | |
| S1-P3 | <i>Lactobacillus paracasei</i> | |
| DSM15224 | nd | |
| P2-1 | <i>Lactobacillus rhamnosus</i> | |
| P2-2 | <i>Lactobacillus curvatus</i> | DSM 32307* |
| P2-3 | <i>Lactobacillus curvatus</i> | |
| P3-1 | <i>Lactobacillus curvatus</i> | |
| P3-2 | <i>Lactobacillus curvatus</i> | |
| P5-1 | <i>Lactobacillus rhamnosus</i> | |
| WCFS-1 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | |
| PB01 | <i>Lactobacillus rhamnosus</i> | DSM 14870 |
| EB01 | <i>Lactobacillus gasseri</i> | DSM 14869 |
| LS33 | Cepa JCM 1231 de <i>Lactobacillus salivarius</i> | ATCC SD5208 |

20 *) La cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* (también denominada en el presente documento P2-2) se depositó ante la DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig, Alemania) el 4 de mayo de 2016 a efectos de depósito de patentes conforme al Tratado de Budapest.

25 Las cepas S1-P1, S1-P2, S1-P3, P2-1, P2-2, P2-3, P3-1, P3-2, P5-1 se aislaron de una muestra de frotis bucal obtenida de un individuo sano.

En el presente estudio *in vitro* se usaron seis cepas bacterianas patógenas orales:

30 Dos cepas patógenas asociadas a la caries: El gen de ARN ribosómico 16S de *Streptococcus mutans* ChDC YM31 (CCUG 17824) y *Streptococcus gordonii* (CCUG 25608).

35 Cuatro cepas patógenas asociadas a la gingivitis: *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 332779), la cepa OH5061 de *Prevotella intermedia* (CCUG 27725), HK1651 de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, y *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 49256).

40 Se ha demostrado que las dos cepas de estreptococos están implicadas en el inicio y el desarrollo de la caries dental. Especialmente *S. mutans* es una de las principales cepas indicadoras de una biopelícula acidúrica. *P. intermedia* y *F. nucleatum* pertenecen ambas al "complejo naranja", cuya presencia en la biopelícula suele preceder a la de las bacterias del "complejo rojo". El complejo rojo se encuentra con mayor frecuencia en las bolsas periodontales profundas. *P. gingivalis* pertenece al "complejo rojo". *A. actinomycetemcomitans* se asocia al desarrollo de la afección poco frecuente periodontitis agresiva. Se cree que tanto *P. intermedia* como *P. gingivalis* contribuyen a la halitosis debido a su producción de compuestos volátiles de azufre.

45 Ejemplo 2 - Ensayo de interferencia por superposición de agar

Cultivo

50 Los lactobacilos del Ejemplo 1 se cultivaron inicialmente durante 16-20 h en agar MRS (Oxoid Ltd., Hampshire, Reino Unido). A continuación, se transfirió una colonia distinta de cada bacteria a 4,5 ml de caldo MRS (Oxoid Ltd., Hampshire, Reino Unido) durante otras 16-20 horas de incubación. Los patógenos se cultivaron en placas TSA (Oxoid

Ltd., Hampshire, Reino Unido) complementadas con cisteína, menadiona y sangre de caballo durante 16-20 h y, al día siguiente, se transfirieron colonias puras de cada bacteria a 2 ml de caldo BHI (Oxoid Ltd., Hampshire, Reino Unido) y se incubaron durante otras 16-20 h. El cultivo de las bacterias se realizó en una cámara anaeróbica a 37 °C.

5 *Pruebas de interferencia por superposición de agar*

La densidad óptica de los cultivos de caldo de lactobacilos se ajustó a 1,8 a 630 nm (Genesis 10 uv, Thermo Scientific, Madison, WI, EE.UU.). A continuación, los cultivos se diluyeron en serie en etapas de 10 veces. Las suspensiones no diluidas y las suspensiones celulares correspondientes a 10⁵, 10³ y 10¹ UFC/ml se usaron en el ensayo de inhibición. Se añadió un mililitro de cada suspensión de lactobacilos a 24 ml de agar MRS estéril fundido (aproximadamente 45 °C) y se vertieron las placas. Como placas de control se usaron placas sin lactobacilos añadidos. Cuando el agar estaba endurecido, las placas se incubaron durante la noche en atmósfera anaeróbica. Al día siguiente (después de 20 h) se vertió una segunda capa de 23 ml de agar TSA (Oxoid Ltd., Hampshire, Reino Unido) complementado con cisteína, menadiona y sangre de caballo sobre el agar MRS con lactobacilos cultivados. Las placas se dejaron secar durante 3 h a temperatura ambiente. Los cultivos de caldo de los patógenos cultivados en caldo BHI se diluyeron con el mismo medio y se midió la DO a 500 nm y se ajustó a 0,2. Las suspensiones de los patógenos se marcaron en las placas con el replicador de Steer (CMI-Promex ICN, Pedricktown, NJ, EE.UU.). Las placas se dejaron secar a temperatura ambiente durante 1 h y posteriormente se incubaron durante la noche a 37 °C en la cámara anaeróbica. A continuación se comparó el crecimiento de los patógenos en las placas con lactobacilos añadidos con el de las placas de control. Los resultados de la prueba de superposición de agar se clasificaron según Simark-Mattsson *et al.*

[2007]: puntuación 0 = inhibición completa (sin colonias visibles), puntuación 1 = ligera inhibición (al menos una colonia visible, pero en cantidades definitivamente menores que en la placa de control) y puntuación 2 = ninguna inhibición (el mismo crecimiento que en la placa de control). La evaluación de las placas fue realizada por dos observadores independientes, en caso de desacuerdo, se llegó a un consenso tras una discusión. Todos los ensayos de inhibición del crecimiento se repitieron en tres ocasiones diferentes.

Resultados de la interferencia por superposición de agar en las cepas patógenas de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus gordonii*.

| | <i>S. mutans</i> | | | <i>S. gordonii</i> | | |
|----------|------------------|-----------------|-----------------|--------------------|-----------------|-----------------|
| | 10 ¹ | 10 ³ | 10 ⁵ | 10 ¹ | 10 ³ | 10 ⁵ |
| Control | + | + | | + | | |
| S1-P1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| S1-P2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| S1-P3 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| DSM15224 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| P2-1 | 2 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| P2-2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| P2-3 | 2 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| P3-1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| P3-2 | nd | 1 | 0 | nd | 0 | 0 |
| P5-1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| WCFS-1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| PB01 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| EB01 | 2 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| LS33 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Resultados de la interferencia por superposición de agar en las cepas patógenas de la cepa de *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, y *Fusobacterium nucleatum*.

| | <i>P. intermedia</i> | | | <i>A. actinom</i> | | | <i>F. nucleatum</i> | | |
|----------|----------------------|-----------------|-----------------|-------------------|-----------------|-----------------|---------------------|-----------------|-----------------|
| | 10 ¹ | 10 ³ | 10 ⁵ | 10 ¹ | 10 ³ | 10 ⁵ | 10 ¹ | 10 ³ | 10 ⁵ |
| Control | + | | | + | | | + | | |
| S1-P1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| S1-P2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| S1-P3 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| DSM15224 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| P2-1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| P2-2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| P2-3 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| P3-1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| P3-2 | nd | 0 | 0 | nd | 0 | 0 | nd | 0 | 0 |
| P5-1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

(continuación)

| Control | + | | | + | | | + | | |
|---------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| WCFS-1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| PB01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| EB01 | 2 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| LS33 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Ejemplo 3 - Inmunomodulación - estudio *in vitro*

5 Células dendríticas inmaduras derivadas de monocitos de tres donantes diferentes fueron expuestas a los candidatos probióticos del Ejemplo 1 a 100 µg/ml, en cultivo durante 24 horas. Se incluyó como referencia la cepa bacteriana probiótica *Lactobacillus acidophilus* NCFM (ATCC 700396). Posteriormente, en sobrenadantes de cultivo celular, las secreciones de IL-10 e IL-12 inducidas por probióticos, respectivamente, se midieron usando ELISA.

10 Un estudio anterior ha demostrado que la modulación inmunitaria probiótica *in vitro* del equilibrio IL10/12 es predictiva del efecto protector *in vivo* en un modelo de colitis de ratón inducida por TNBS (B. Foligne *et al.*, World J Gastroenterol 2007, 13:236-243). Esta correlación ha sido confirmada por otros y ha mostrado un valor general para predecir la modulación antiinflamatoria potencial mediada por probióticos.

15 En la Figura 1 se presentan las relaciones IL10/12 de un panel de cepas candidatas probióticas obtenidas mediante ensayos en células dendríticas inmaduras derivadas de monocitos de tres donantes diferentes.

Los datos muestran que nueve cepas de las 14 cepas ensayadas presentaban una relación de IL10/12 superior a 5 y cuatro cepas presentaban una relación de IL10/12 superior a 50.

20 Los datos de PB01, P2-2, P3-1, LS33 y NCFM obtenidos se presentan con más detalle en las Figuras 2 y 3. Los datos demostraron que las relaciones IL10/12 eran muy parecidas (media ~20) en los sobrenadantes de los probióticos de PB01 y LS33, en contraste con la baja relación encontrada en el sobrenadante de NCFM (mediciones por triplicado). El equilibrio IL10/12 en P2-2 y P3-1 fue incluso más pronunciado que en PB01 y LS33, alcanzando niveles superiores a 100.

25 En el estudio de Warren *et al.*, en sobrenadantes de PBMC tratadas durante 24 horas con LS33, la relación relativamente alta de IL10/12 (mediana ~20) se correlacionó con un efecto protector en un modelo de colitis de ratón en comparación con NCFM, que indujo *in vitro* una baja relación IL-10/12 (mediana ~2) e *in vivo* no ofreció protección.

30 El presente estudio *in vitro* sugiere que PB01, P2-2 y P3-1 pueden ejercer las mismas propiedades antiinflamatorias que las demostradas para LS33, ya que ambos probióticos inducen *in vitro* a las células dendríticas inmaduras a secretar niveles similares de IL-10 e IL-12.

Ejemplo 4: Estudio de ensayo clínico

35

Objetivo

El objetivo del estudio era investigar el efecto de los comprimidos que contienen cepas candidatas probióticas sobre el grado de inflamación gingival.

40

Diseño del estudio

El estudio se planificó y llevó a cabo como un ensayo aleatorizado con enmascaramiento doble controlado con placebo con dos brazos paralelos. Se planificó que el periodo de intervención fuera de 4 semanas. El plan del estudio se sometió a aprobación ética.

45

Grupo de estudio

50 Los participantes fueron reclutados entre los pacientes de la clínica de la Facultad de Odontología y a través de www.forsosqsperson.dk. Se invitó a 50 participantes de entre 18 y 50 años, que se inscribieron tras recibir información verbal y escrita. Después del consentimiento informado, los participantes fueron asignados aleatoriamente al grupo probiótico o al grupo placebo con ayuda de un programa informático.

Los criterios de inclusión fueron:

55

- i) presencia de al menos dos zonas marginales bucales con inflamación gingival moderada a grave y con una profundidad de sondaje de ≤5 mm
- ii) sangrado al sondaje (SAS)

60 Los criterios de exclusión fueron

- i) ingesta habitual de bacterias probióticas
- ii) fumar de forma habitual
- iii) embarazo
- iv) ingesta de antibióticos en los dos meses anteriores al inicio del estudio
- v) baja tasa de saliva estimulada (0,8 ml/min)
- vi) putrefacción activa con varias lesiones de caries abiertas sin tratar.

Métodos

10 *Intervención:* Después del consentimiento informado, del examen basal y de la toma de muestras, los participantes fueron asignados aleatoriamente a uno de los grupos del estudio y se les suministraron comprimidos probióticos o comprimidos placebo.

15 Los comprimidos probióticos contenían *Lactobacillus rhamnosus* PB01 y *Lactobacillus curvatus* EB10 a una dosis de 10^9 UFC/comprimido. Los comprimidos placebo eran idénticos en tamaño y composición pero sin la adición de las cepas probióticas. Ambos comprimidos fueron proporcionados por Bifodan A/S. Se indicó a los participantes que tomaran un comprimido por la mañana y otro por la noche, treinta minutos después de lavarse los dientes. Los comprimidos se envasaron en frascos idénticos con un código de colores. El código se mantendrá oculto a los investigadores hasta que finalicen los análisis.

20 Tras el registro inicial, se indicó a los participantes que tomaran dos comprimidos al día durante cuatro semanas y se les pidió que llevaran un archivo de registro de la ingesta. Los registros de seguimiento se llevaron a cabo a las dos semanas, cuatro semanas y seis semanas.

25 *Procedimientos clínicos:* En cada visita, se recogió el LCG y el índice de placa (IP), el índice gingival (IG) y el sangrado al sondaje (SAS).

30 LCG: Para la recogida de LCG, se seleccionaron dos zonas bucales contralaterales de los incisivos superiores, caninos o premolares de cada participante. Se eliminó la placa supragingival visual de los dientes seleccionados y se secaron las zonas con torundas de algodón. El LCG se recogió usando tiras de periopaper (ProFlow, Amityville, NY, EE.UU.) insertadas cuidadosamente en el surco gingival durante 20 s. El volumen del LCG se registró con un Peritron 8000 (ProFlow) y se expresó en μ l. A continuación, las tiras se transfirieron a tubos de plástico y se almacenaron a -80 hasta su posterior análisis.

35 *Métodos estadísticos:* Todos los datos se procesaron con el software SPSS (v 22.0; Chicago, III, EE.UU.). Los valores de seguimiento se compararon con el valor de referencia dentro de cada grupo mediante la prueba de Wilcoxon apareada bilateral y las diferencias entre grupos se analizaron mediante la prueba de Wilcoxon no apareada. Los datos categóricos se compararon con pruebas de chi-cuadrado. Un valor de $p < 0,05$ se considera estadísticamente significativo.

Importancia científica

45 Los datos demuestran que existe una interacción estadísticamente significativa entre la intervención y el tiempo sobre el LCG, $p < 0,05$ (modelo de ANOVA mixto bidireccional), véase la Figura 4 y la Figura 6.

El estudio aporta pruebas de este modo de que los comprimidos probióticos influyen en al menos un marcador clínico de la inflamación gingival y/o en las citocinas pro- y antiinflamatorias, lo que puede conducir a un nuevo tratamiento complementario de la gingivitis.

Ejemplo 5 – Comprimido

| COMPOSICIÓN | | | |
|---|--|------------------|--|
| Nombre del constituyente | Añadido por comprimido (mg) | Función | Referencia respecto a las normas |
| Sustancias activas | | | |
| Cultivo secado por congelación de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> PB01 | Al menos 10^9 UFC de lactobacilos en total | Principio activo | Cultivo microbiano interno 04/30/01613 |
| Cultivo secado por congelación de <i>Lactobacillus curvatus</i> EB10 | | Principio activo | Cultivo microbiano interno 04/30/01724 |
| Excipiente en orden descendente | | | |
| Xilitol | | Agente espesante | Aditivo alimentario |

(continuación)

| COMPOSICIÓN | | | |
|--|-----------------------------|-------------------------|----------------------------------|
| Nombre del constituyente | Añadido por comprimido (mg) | Función | Referencia respecto a las normas |
| Excipiente en orden descendente | | | |
| Celulosa microcristalina | | Agente espesante | |
| Isomalt | | Agente espesante | Aditivo alimentario, E953 |
| Mono- y diglicéridos de ácidos grasos | | Agente de recubrimiento | Aditivo alimentario, E471 |
| Aroma de limón | | Aroma | Aroma natural |
| Maltodextrina | | Aglutinante | Aditivo alimentario |
| Carboximetilcelulosa sódica | | Aglutinante | Aditivo alimentario |
| Ácido cítrico | | Aroma | Aditivo alimentario |
| Dióxido de silicio | | Agente de recubrimiento | Aditivo alimentario |
| Glucósido de esteviol | | Sabor dulce | Aditivo alimentario, E960 |

Ejemplo 6 - Caracterización de las cepas bacterianas

5 ADN aislado de la cepa bacteriana *Lactobacillus curvatus* denominada P2-2 (también denominada en el presente documento EB10), la cepa P3-1 de *Lactobacillus curvatus* y PB01 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 14870) se digirió durante la noche a 37 °C con 50 U de digestión por Ascl. El ADN digerido por Ascl se cargó en agarosa al 1,1 % y se ejecutó en tampón TBE 0,5X (Tiempo de impulso: 2-30 s, 5,3 V/cm). Los resultados se muestran en la Figura 5.

Ejemplo 7 - Supresión de la respuesta Th1 y Th17

10 Se probaron células dendríticas humanas de tres donantes diferentes según los procedimientos descritos previamente (Gad *et al.* FEMS Immunol Med Microbiol 2011, 63:93-107). La capacidad de las cepas probióticas para inhibir o reducir las respuestas proinflamatorias Th1 y Th17 inducidas por cócteles se midió según los procedimientos descritos anteriormente (Gad *et al.* FEMS Immunol Med Microbiol 2011, 63:93-107; Jensen & Gad, Journal of Inflammation 2010, 7:37). Las cepas probióticas (100 µg de microgránulo secado por congelación) se expusieron a células dendríticas durante 6 horas, después de lo cual se añadió un cóctel Th1 (Gad *et al.* FEMS Immunol Med Microbiol 2011, 63:93-107) o un cóctel Th17 (Jensen & Gad, Journal of Inflammation 2010, 7:37) y se incubó durante 24 horas. Como controles en estos experimentos se usaron células dendríticas no expuestas a las cepas probióticas. Después de 24 horas de incubación, se midió la secreción de IL-10 e IL-12p70 en relación con la respuesta Th1, y la de IL-23 e IL-12p70 en relación con la respuesta Th17 se midió mediante ELISA como se describió anteriormente (Gad *et al.* FEMS Immunol Med Microbiol 2011, 63:93-107). Los resultados de estas mediciones para los tres donantes se muestran en la Figura 7 y en la Figura 10, respectivamente.

25 Para evaluar el potencial de la capacidad de las cepas probióticas para reducir una respuesta proinflamatoria Th1 o Th17, se definieron los siguientes criterios. Se busca una relación IL-10/IL12p70 alta tras la exposición a DC inmaduras. Tras la exposición al probiótico y la subsiguiente respuesta Th1 inducida por cócteles, se busca un nivel bajo de IL12p70 y una relación IL-10/IL12p70 alta. Tras la exposición al probiótico y la subsiguiente respuesta Th17 inducida por cócteles, se busca un nivel bajo de IL23 y un aumento de IL-10/IL-23. El cumplimiento de estos criterios se puntuó posteriormente como se presenta en la Tabla 1, con muestras sin exposición a probióticos como referencia.

30 Además de estos experimentos, también se realizó un estudio dosis-respuesta con cepas seleccionadas (P2-2, P3-1 y PB01) para estudiar el efecto de la dosis de probiótico y el efecto de mezclar cepas con la capacidad de reducir la respuesta Th1 inducida por cócteles. El resultado de este experimento en dos donantes diferentes se muestra en la Figura 8 y en la Figura 9.

Bibliografía

Reid G, Younes JA, Van der Mei HC, Gloor GB, Knight R, Busscher HJ. Microbiota restoration: natural and supplemented recovery of human microbial communities. Nat Rev Microbiol. 2011; 9: 27-38.

40 Twetman S, Keller MK. Probiotics for caries prevention and control. Adv Dent Res. 2012; 24: 98-102.

45 Twetman S, Derawi B, Keller M, Ekstrand K, Yucel-Lindberg T, Stecksén-Blicks C. Short-term effect of chewing gums containing probiotic *Lactobacillus reuteri* on the levels of inflammatory mediators in gingival crevicular fluid. Acta Odontol Scand. 2009; 67: 19-24.

Ericson D, Hamberg K, Bratthall G, Sinkiewicz-Enggren G, Ljunggren L. Salivary IgA response to probiotic bacteria

and mutans streptococci after the use of chewing gum containing *Lactobacillus reuteri*. *Pathog Dis.* 2013; 68: 82-7.

REIVINDICACIONES

1. Cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* (DSM 32307).
- 5 2. Un cultivo que comprende la cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* (DSM 32307).
3. El cultivo según la reivindicación 2 que comprende al menos otro *Lactobacillus* sp., tal como la cepa PB01 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 14870).
- 10 4. Una composición que comprende la cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* (DSM 32307).
5. La composición según la reivindicación 4 que comprende al menos otro *Lactobacillus* sp., tal como la cepa PB01 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 14870).
- 15 6. La composición según la reivindicación 4 o 5, en donde dicha composición comprende de 10^5 a 10^{13} UFC de *Lactobacillus* por gramo de dicha composición, tal como de 10^6 a 10^{12} UFC de *Lactobacillus* por gramo de dicha composición, por ejemplo de 10^7 a 10^{11} UFC de *Lactobacillus* por gramo de dicha composición, tal como de 10^8 a 10^{10} UFC de *Lactobacillus* por gramo de dicha composición, tal como 10^9 *Lactobacillus* por gramo de dicha composición.
- 20 7. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, que comprende la cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* (DSM 32307) y la cepa PB01 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 14870) tal como al menos 10^7 UFC de la cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* (DSM 32307) por gramo de dicha composición y al menos 10^7 UFC de la cepa PB01 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 14870) por gramo de dicha composición.
- 25 8. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha composición se encuentra en forma de un comprimido, una cápsula, polvo, comprimido efervescente, polvo efervescente, un granulado, un producto microencapsulado, una suspensión, pulverización, un gel o una crema.
- 30 9. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso como un medicamento.
10. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en el tratamiento de una afección inflamatoria tal como una afección inflamatoria en la cavidad bucal.
- 35 11. La composición para su uso según la reivindicación 10, en donde dicha afección inflamatoria es enfermedades periodontales tales como gingivitis o periodontitis.
- 40 12. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 10 y 11, en donde dicha composición comprende de 10^7 a 10^{10} UFC de *Lactobacillus* por dosis diaria, tal como de 10^8 a 10^9 UFC de *Lactobacillus* por dosis diaria.
- 45 13. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 10 y 12, en donde dicha composición comprende al menos 5×10^7 UFC de la cepa EB10 de *Lactobacillus curvatus* (DSM 32307) por dosis diaria y opcionalmente la composición comprende además al menos 5×10^7 UFC de la cepa PB01 de *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 14870) por dosis diaria.
14. Un nutracéutico o complemento nutritivo que comprende la composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1-8.

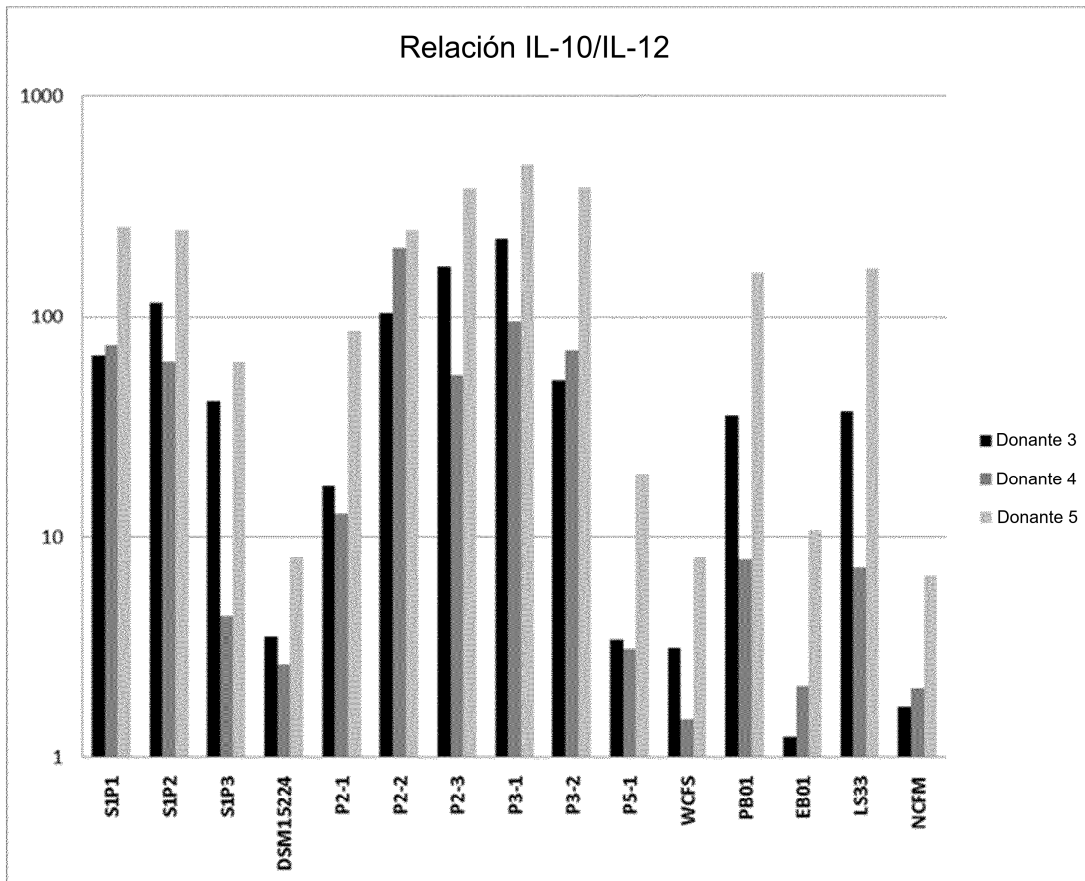


Figura 1

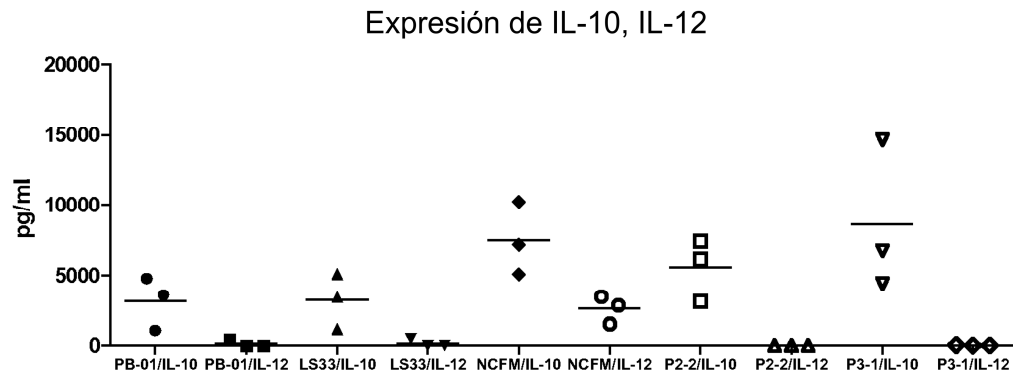


Figura 2

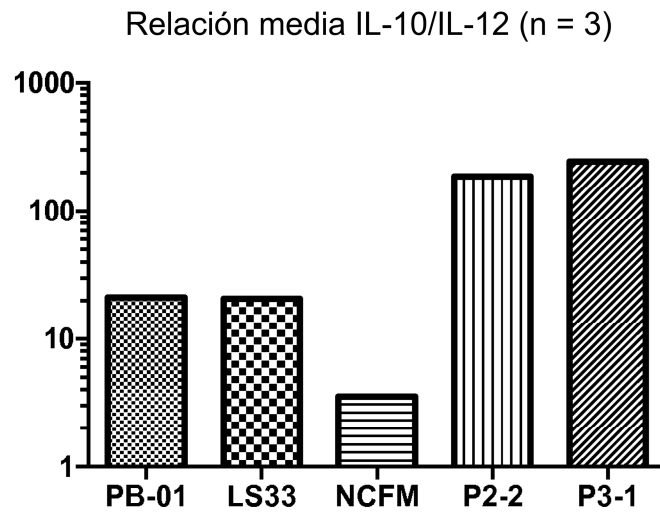


Figura 3

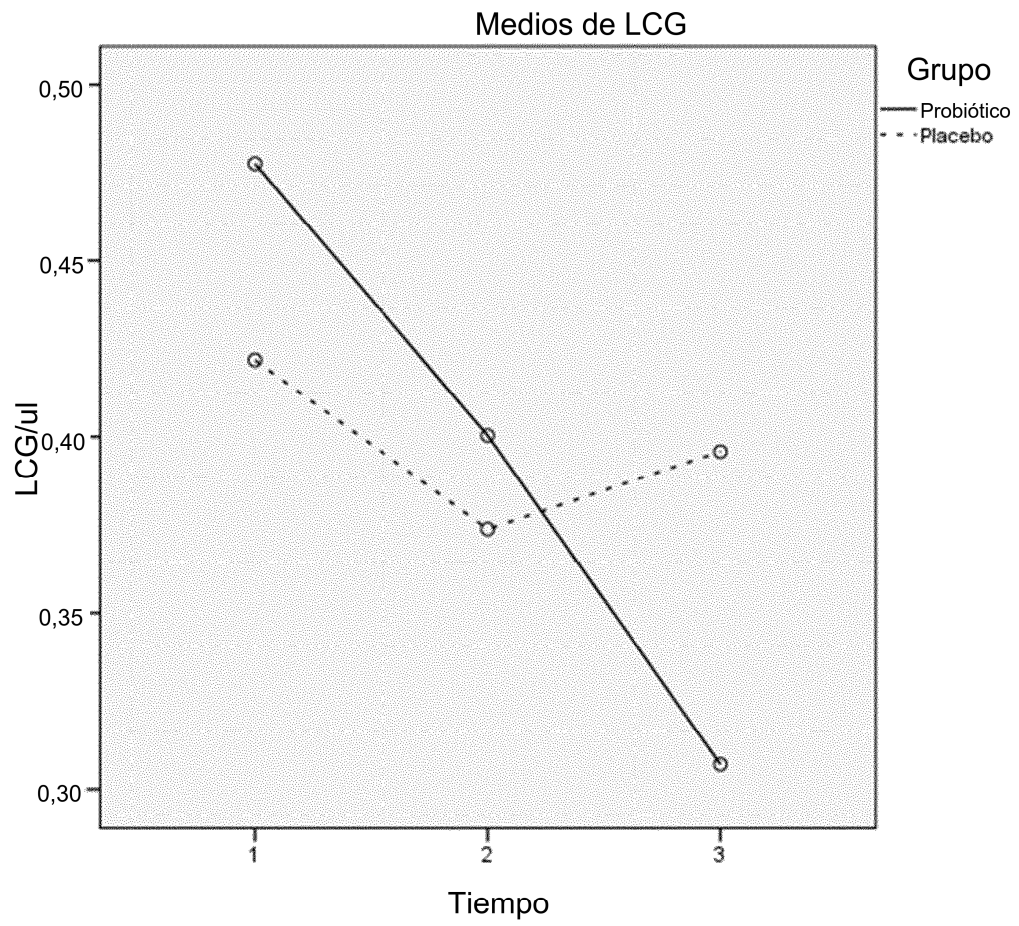


Figura 4

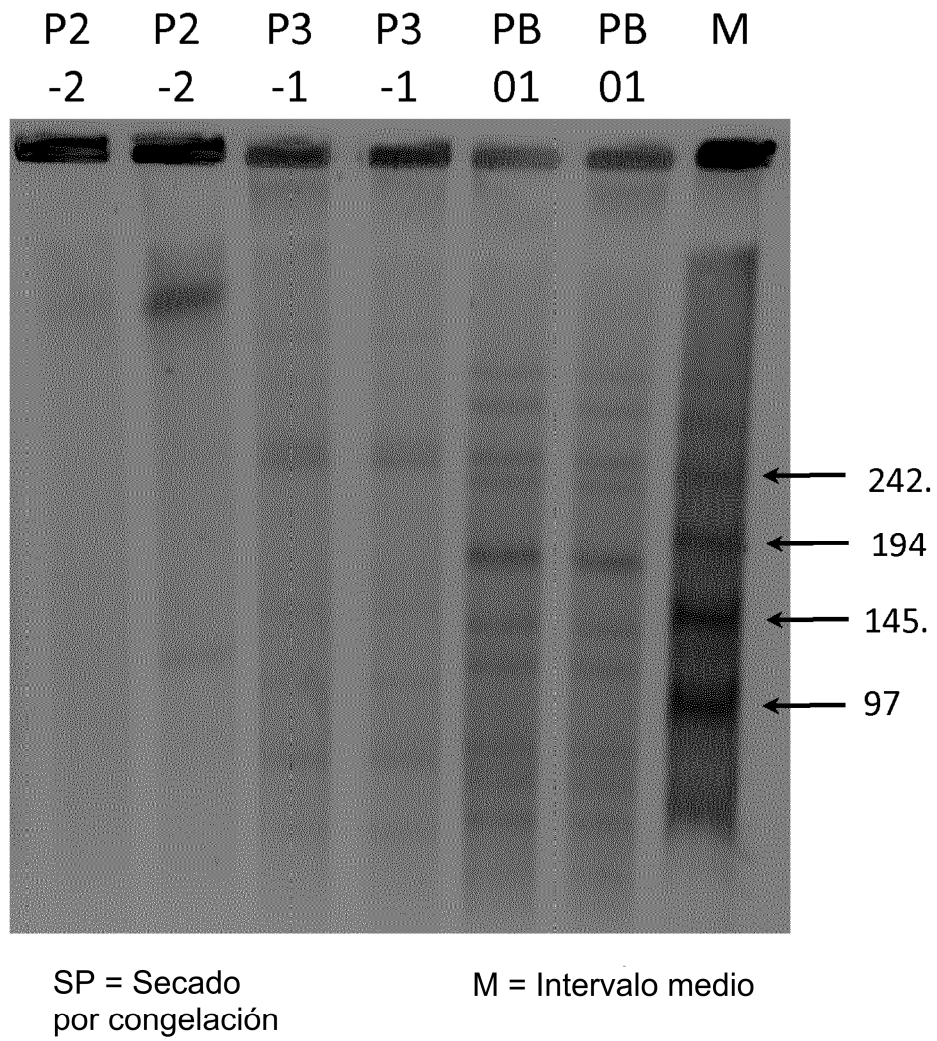


Figura 5

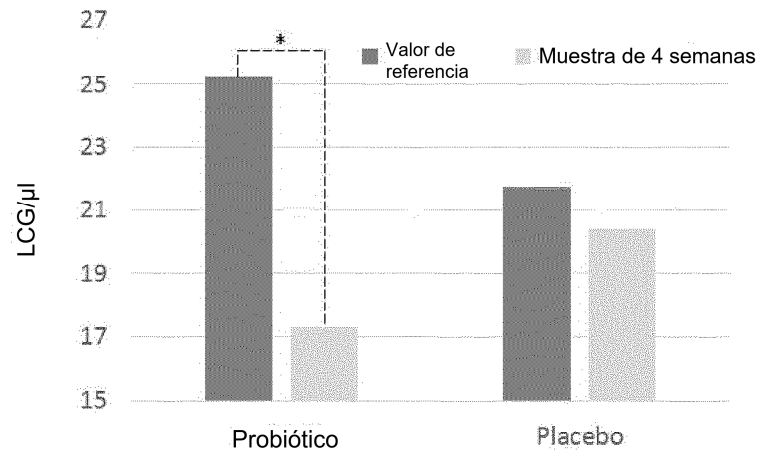


Figura 6

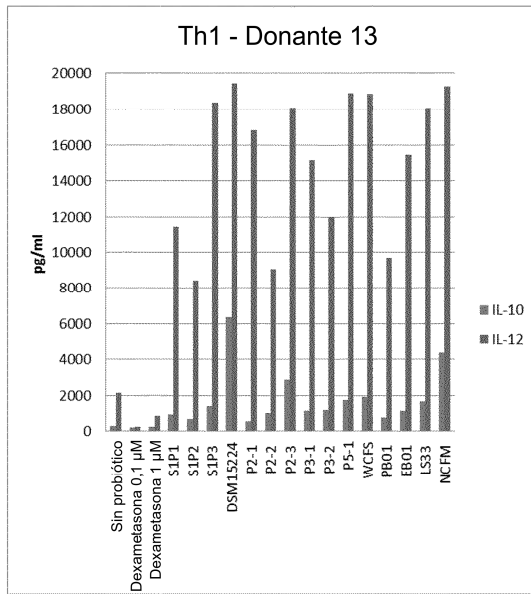
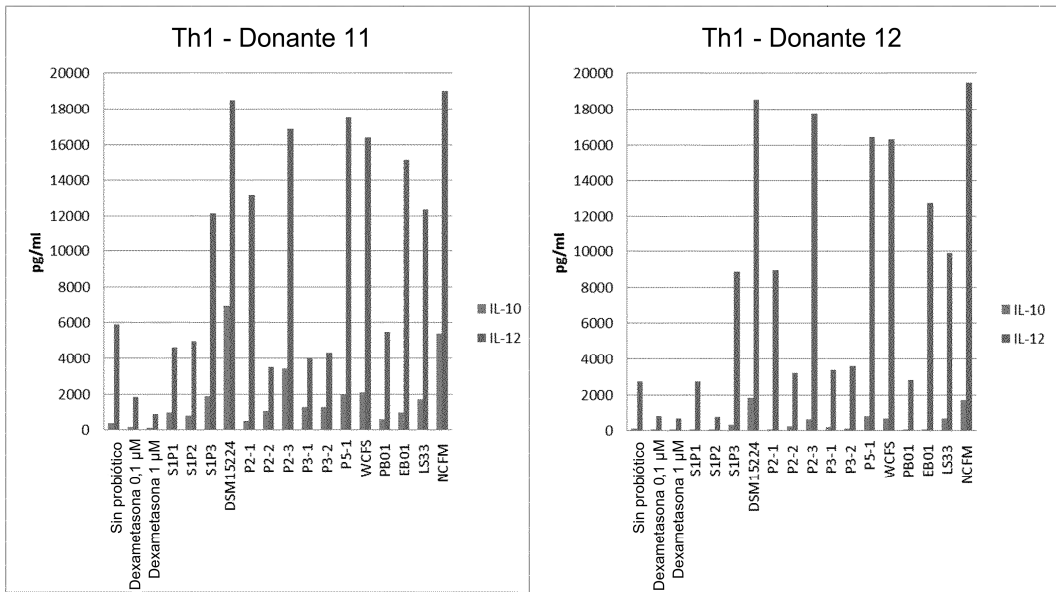


Figura 7

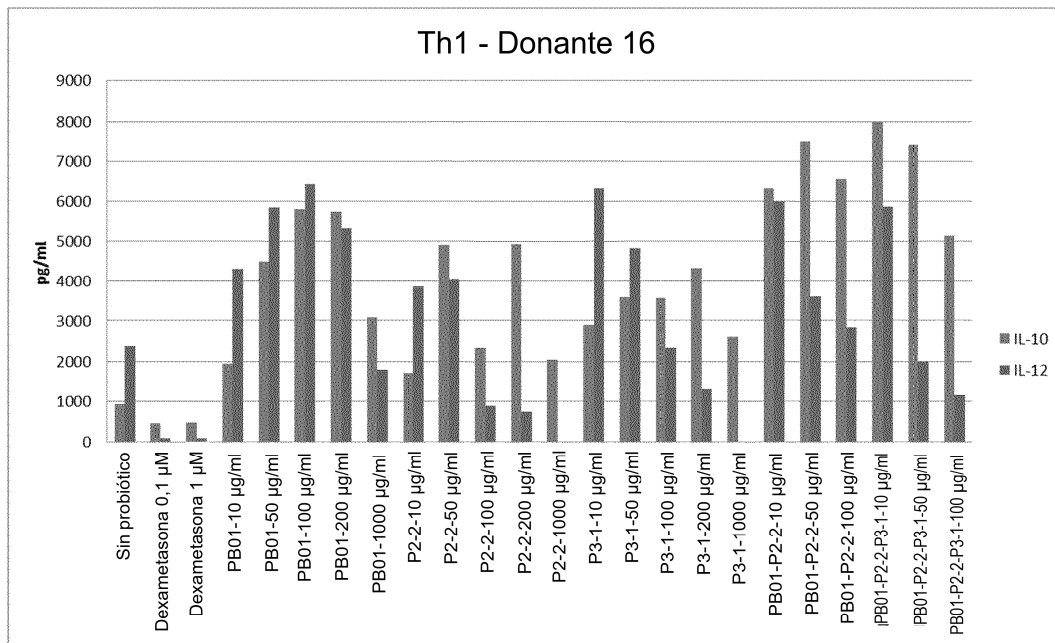


Figura 8

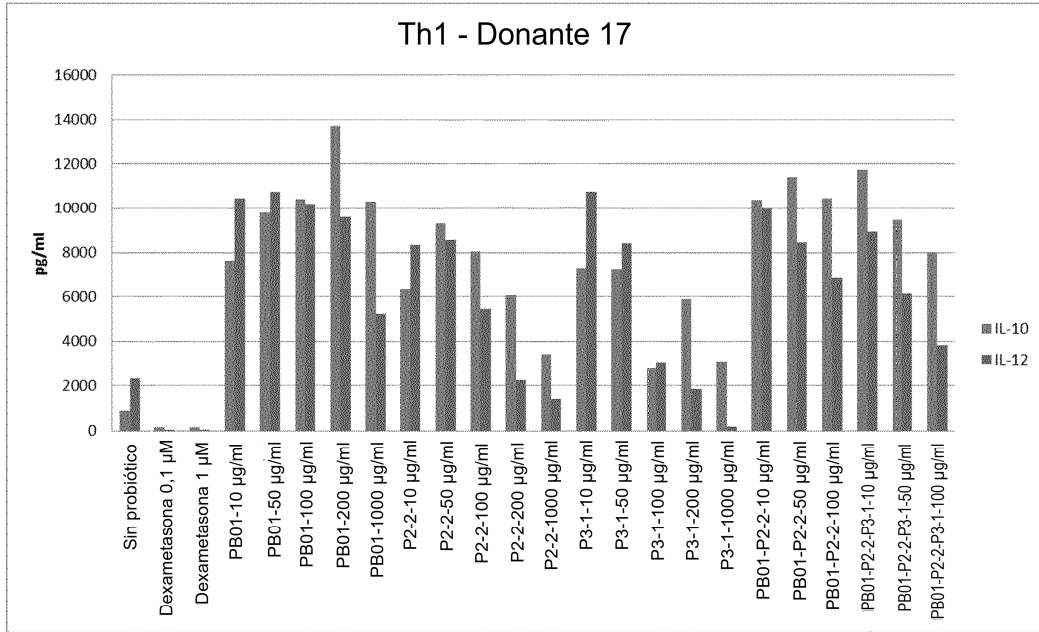


Figura 9

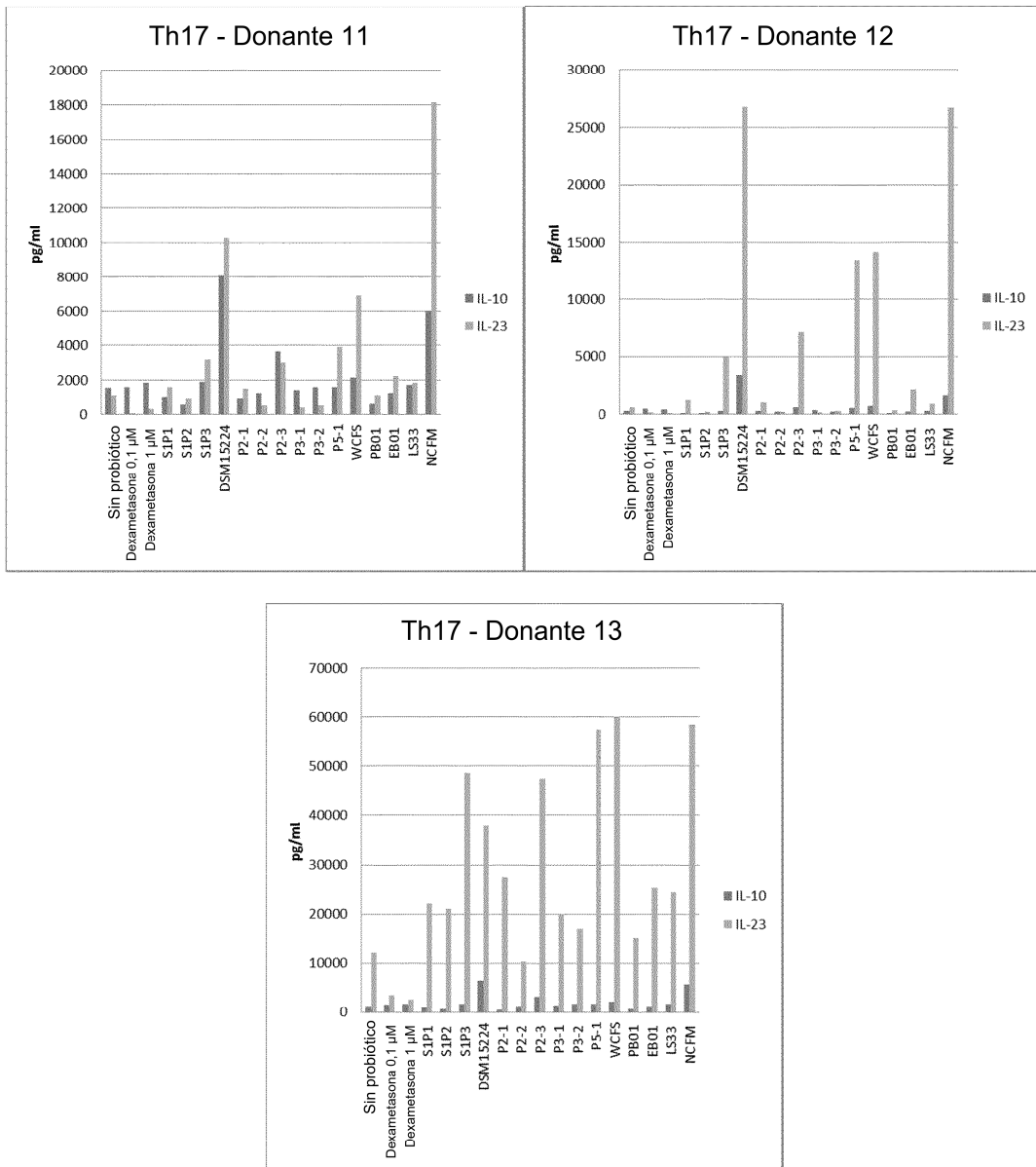


Figura 10

| | Estimulación con DC | | Cóctel Th1 | | Cóctel Th17 | | Total |
|-----------------|---------------------|------------------------------|------------|---------------------------------------|-------------|---------------------------------------|-----------|
| | Baja IL-12 | Alta relación de IL-10/IL-12 | Baja IL-12 | Aumento de la relación de IL-10/IL-12 | Baja IL-23 | Aumento de la relación de IL-10/IL-23 | |
| S1P1 | 4 | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 18 |
| S1P2 | 4 | 3 | 3 | 2 | 3 | 1 | 16 |
| S1P3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 11 |
| DSM15224 | 0 | 1 | 0 | 4 | 2 | 4 | 11 |
| P2-1 | 3 | 2 | 2 | 1 | 3 | 1 | 12 |
| P2-2 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 24 |
| P2-3 | 3 | 3 | 1 | 3 | 2 | 2 | 14 |
| P3-1 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 2 | 21 |
| P3-2 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 | 3 | 20 |
| P5-1 | 2 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 8 |
| WCFS | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 2 | 8 |
| PB01 | 3 | 2 | 3 | 2 | 3 | 2 | 15 |
| EB01 | 1 | 1 | 1 | 1 | 3 | 2 | 9 |
| LS33 | 3 | 2 | 2 | 2 | 3 | 3 | 15 |
| NCFM | 0 | 1 | 0 | 4 | 1 | 3 | 9 |

Tabla 1