

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 847 273**

51 Int. Cl.:

C12R 1/46 (2006.01)

A61K 35/744 (2015.01)

A23L 33/135 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.11.2017 PCT/EP2017/080416**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.05.2018 WO18096118**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.11.2017 E 17838121 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.11.2020 EP 3545110**

54 Título: **Cepa antimicrobiana**

30 Prioridad:

24.11.2016 EP 16382565

24.11.2016 EP 16200473

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.08.2021

73 Titular/es:

SERVIZO GALEGO DE SAÚDE (SERGAS) (50.0%)
Edificio Administrativo San Lazaro s/n
15703 Santiago de Composteia- A Coruña, ES y
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA (USC) (50.0%)

72 Inventor/es:

MARTÍNEZ LAMAS, LUCÍA;
ÁLVAREZ FERNÁNDEZ, MAXIMILIANO;
DIZ DIOS, PEDRO y
LIMERES POSSE, JACOBO

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 847 273 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

Cepa antimicrobiana

5 **Campo de la invención**

La presente invención pertenece al campo de la biotecnología, y se refiere a nuevas bacterias del género *Streptococcus* que son útiles como agentes antimicrobianos, particularmente como agentes anticaries. La invención se refiere a composiciones y alimentos funcionales que comprenden las nuevas bacterias.

10

Antecedentes de la invención

Según el informe anual de la OMS de 2003, la salud oral se integra con la salud general de las personas y es un determinante de la calidad de vida (Bresciani, E. et al., Salud bucal y calidad de vida, *Sallusvita*, Bauru, v. 24, n. 1, p. 137-148, 2005).

15

La caries y la enfermedad periodontal son dos enfermedades importantes con una prevalencia muy alta, que condicionan la salud oral de muchas personas en todo el mundo. Según el Instituto Nacional de Investigación Odontológica y Craneofacial de EE.UU., el 92% de los adultos de 20 a 64 años de edad han tenido caries en sus dientes permanentes (Fuente: Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (NHANES)). De acuerdo con la misma fuente, el 47% de los adultos de 30 años o más tiene algún tipo de enfermedad periodontal.

20

La caries y la enfermedad periodontal son causadas por bacterias patógenas que causan infecciones en la cavidad oral. Por ejemplo, *Streptococcus oralis*, *Veillonella parvula*, *Actinomycesnaes lundii*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* pueden estar implicadas en la acumulación de placa dental que promueve el desarrollo de la enfermedad periodontal.

25

S. mutans da su nombre a un grupo de siete especies estrechamente relacionadas denominadas colectivamente estreptococos mutans. Tiene un papel crucial en el desarrollo de la caries. Por lo general, la aparición de *S. mutans* en las cavidades de los dientes implica la aparición de caries después de 6-24 meses (Forssten, S.D. et al., *Streptococcus mutans*, Caries and Simulation Models, Nutrients 2010, 2, 290-298).

30

Existen varios métodos disponibles para el tratamiento de la caries y de las complicaciones infecciosas relacionadas con la enfermedad periodontal, incluida la terapia con antibióticos. Sin embargo, los antibióticos destruyen tanto las bacterias útiles como las nocivas en la cavidad oral, dando lugar a desequilibrios microbianos no deseados.

35

Se ha explorado en los últimos años el uso de bacterias para el tratamiento de enfermedades infecciosas de la cavidad oral, como la caries y la enfermedad periodontal.

Por ejemplo, el documento WO 2003/070919 describe el uso de cepas de *Streptococcus salivarius* productoras de BLIS con actividad frente a *Streptococcus mutans*, que causan caries dentales, incluyendo *S. Salivarius*.

40

Sin embargo, las cepas de *S. salivarius* están prácticamente ausentes en las superficies dentales, y se ha demostrado que sólo están presentes en la superficie de la lengua. Por lo tanto, sería deseable una cepa que pueda adherirse a las superficies dentales, ya que sería capaz de competir con bacterias patógenas y por lo tanto, prevenir y/o tratar infecciones de la cavidad oral tales como caries y enfermedad periodontal.

45

En consecuencia, existe la necesidad de un agente antimicrobiano que esté presente en la microflora oral de sujetos sanos, particularmente en superficies dentales, preferiblemente en placa dental, y que tenga un efecto antimicrobiano contra varios microorganismos patógenos implicados en infecciones orales, tales como *S. mutans*, *A. naeslundii*, *V. parvula* y *A. actinomycetemcomitans*, que sea útil en el tratamiento de infecciones orales tales como caries y/o enfermedad periodontal.

50

Resumen de la invención

La presente invención pertenece al campo de la microbiología y, en particular, a una cepa bacteriana específica adecuada para uso en el tratamiento profiláctico o terapéutico de enfermedades infecciosas de la cavidad oral.

55

En un primer aspecto, la presente invención proporciona una cepa bacteriana depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) por el Servicio Galego de Saúde (SERGAS), el 20 de julio de 2016, con el número de acceso CECT 9174.

60

La presente invención proporciona además un extracto y un sobrenadante derivado del cultivo de la cepa bacteriana de la presente invención.

65

Además, la presente invención proporciona la cepa bacteriana de la presente invención, el extracto o el sobrenadante

para su uso como medicamento, en particular para su uso como medicamento antimicrobiano, preferiblemente en el tratamiento profiláctico o terapéutico de enfermedades infecciosas de la cavidad oral, tales como caries y/o enfermedad periodontal.

5 La presente invención también proporciona la cepa bacteriana de la presente invención, el extracto o el sobrenadante para su uso como probiótico, composición alimenticia para uso médico o alimento funcional para mejorar la salud oral.

También es objeto de la presente invención una composición farmacéutica y/o una composición para la salud oral que comprende la cepa bacteriana de la presente invención, con el número de depósito CECT 9174, y/o el extracto y/o el sobrenadante de la presente invención. La presente invención proporciona además el uso de la composición farmacéutica o composición para la salud oral o alimento funcional de la presente invención como un medicamento, en particular en el tratamiento profiláctico o terapéutico de enfermedades infecciosas de la cavidad oral, tales como caries y / o enfermedad periodontal

15 Breve descripción de la figuras

Figura 1. Área de inhibición del crecimiento para CECT 9174 en las placas de agar BHI inoculadas con *S. mutans*.

Figura 2. Curva de crecimiento de *S. mutans* y CECT 9174 (promedio OD600, 6 repeticiones) en medio líquido THY.

Figura 3. Diferencia de crecimiento de CECT 9174 y *S. mutans* en medio líquido puro y en cultivo THY después de 24 horas de incubación a atmósfera de CO₂ al 5%.

Figura 4. Micrografías obtenidas con lentes de aumento Leica, objetivo 1X, con CO₂ al 5% durante 96 h, del cultivo de la nueva cepa de *Streptococcus* spp. (CECT 9174), inoculado en las superficies del agar BHI como un botón y: A, B) *Actinomyces naeslundii*, C, D) *Veillonella parvula*, E, F) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, inoculado sobre las placas con un hisopo, frotándolo sobre sus superficies para asegurar una buena distribución de los inóculos. Las áreas de inhibición del crecimiento alrededor de la nueva cepa de *Streptococcus* spp. (CECT 9174) para *A. naeslundii*, *V. parvula* y *A. actinomycetemcomitans*.

Figura 5. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) de biofilms orales formados *in vitro* sobre discos de hidroxiapatita. Los biofilms, formados después de 72 h de incubación, se componían de: (A, B) *Streptococcus oralis*, *Veillonella parvula*, *Actinomyces naeslundii*, *Fusobacterium nucleatum*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas gingivalis*; (C,D) la nueva cepa de *Streptococcus* spp. junto con *Streptococcus oralis*, *Veillonella parvula*, *Actinomyces naeslundii*, *Fusobacterium nucleatum*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas gingivalis*; (E,F) la nueva cepa de *Streptococcus* sp., *Veillonella parvula*, *Actinomyces naeslundii*, *Fusobacterium nucleatum*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas gingivalis*. La disposición bacteriana así como la estructura tridimensional de los diferentes biofilms muestran: (A, B) un biofilm compacto bien estructurado; (C, D) un biofilm bien estructurado pero con densidad menor que la observada en las imágenes A, B; (E, F) ausencia de una comunidad bien estructurada, siendo la nueva cepa de *Streptococcus* spp. la especie bacteriana predominante sobre la superficie de los discos de hidroxiapatita. Aumento (A,C,E): 500X; (B,D,F): 1,000X.

Figura 6. Perfil del bioanalizador Agilent 2100 para la librería resultante.

Figura 7. Calidad media y rango intercuartílico y media para cada una de las posiciones de las lecturas. La muestra en la dirección R1 se presenta en el lado izquierdo y la muestra en la dirección R2 se presenta en el lado derecho. El panel A es para secuencias sin procesar y el panel B para secuencias recortadas.

Figura 8. Representación de la calidad media con respecto al número de lecturas que tienen dicha calidad media. La muestra en la dirección R1 se presenta en el lado izquierdo y la muestra en la dirección R2 se presenta en el lado derecho. El panel A es para secuencias sin procesar y el panel B para secuencias recortadas.

Figura 9. Representación de la cantidad de indeterminaciones (N) en cada una de las posiciones de las secuencias que se han examinado. La muestra en la dirección R1 se presenta en el lado izquierdo y la muestra en la dirección R2 se presenta en el lado derecho. El panel A es para secuencias sin procesar y el panel B para secuencias recortadas.

Figura 10. GC distribución de contenido de las secuencias con respecto a una distribución teórica. La muestra en la dirección R1 se presenta en el lado izquierdo y la muestra en la dirección R2 se presenta en el lado derecho. El panel A es para secuencias sin procesar y el panel B para secuencias recortadas.

Figura 11. Topología basada en la Identidad Nucleotídica Promedio (ANI) para localizar la cepa CECT 9174 en estudio.

Figura 12. Resultados de la prueba de competición en placas BHI.

Figura 13. Diseño del ensayo de inhibición del sobrenadante.

Figura 14. La actividad inhibidora de S. CECT 9174 no se ve afectada por la actividad de la proteínasa K. A) S. CECT 9174 (parte central), PBS (lado derecho), proteínasa K (lado izquierdo). *S. mutans* lado izquierdo y derecho. B) Control negativo *S. dentisani*, PBS lado derecho e izquierdo, *S. mutans* lado derecho e izquierdo. C) Control positivo *S. dentisani*, proteínasa K lado derecho e izquierdo, *S. mutans* lado derecho e izquierdo.

Figura 15. A) Muestra el ensayo de inhibición y B) muestra el control de crecimiento. 1. *L. ivanovii*, 2. *S. pyogenes*, 3. *S. pneumoniae*, 4. *S. galactiae*, 5. *Lactobacillus*, 6. *S. aureus*, 7. *S. warnerii*, 8. *E.coli*. CECT 9174 inhibe: *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *S. agalactiae*, *S. aureus*, *S. warnerii*, *S. mutans*.

Figura 16. Inhibición de CECT 9174 sobre *Fusobacterium nucleatum*.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente invención tienen el significado comúnmente entendido por un experto en la técnica al que pertenece esta invención.

El término “aproximadamente” significa el valor indicado $\pm 1\%$ de su valor, o el término “aproximadamente” significa el valor indicado $\pm 2\%$ de su valor, o el término “aproximadamente” significa el valor indicado $\pm 5\%$ de su valor, o el término “aproximadamente” significa el valor indicado $\pm 10\%$ de su valor, o el término “aproximadamente” significa el valor indicado $\pm 20\%$ de su valor, o el término “aproximadamente” significa el valor indicado $\pm 30\%$ de su valor; preferiblemente el término “aproximadamente” significa exactamente el valor indicado ($\pm 0\%$).

Los términos “tratamiento” o “terapia” abarcan tanto métodos profilácticos como curativos de enfermedades, ya que ambos están dirigidos al mantenimiento o la restauración de la salud. Independientemente del origen del dolor, malestar o incapacidad, su alivio, mediante la administración de un agente apropiado, debe interpretarse como terapia o uso terapéutico en el contexto de la presente solicitud.

Se entiende que la “infección” en la presente invención es aquella patología causada por la invasión de cualquier tejido del huésped por bacterias patógenas. Se entiende por “enfermedades infecciosas de la cavidad oral” aquellas infecciones bacterianas que afectan a los tejidos bucales duros y/o blandos, tales como, por ejemplo, infecciones que se producen en los dientes y/o en las encías y/o en la lengua y/o en la mucosa que recubre los labios, las mejillas y las encías. Ejemplos de enfermedades infecciosas de la cavidad oral son la caries (que destruye los tejidos duros del diente) y la enfermedad periodontal o periodontitis (que destruye los tejidos de soporte del diente).

En el contexto de la presente invención, un “medicamento antimicrobiano” es una sustancia, composición o microorganismo capaz de inhibir el crecimiento de otros microorganismos, en particular de microorganismos patógenos.

En el contexto de la presente invención, se entiende por “composición alimenticia para uso médico” una composición alimenticia especialmente formulada y destinada al tratamiento dietético de una enfermedad que tiene necesidades nutricionales distintivas que no pueden ser satisfechas sólo por una dieta normal.

En el contexto de la presente invención, el término “probiótico” se refiere a microorganismos vivos que proporcionan beneficios para la salud cuando se consumen. Los microorganismos vivos se pueden añadir a los alimentos (por ejemplo, productos lácteos tales como leche, yogures, etc.), suplementos dietéticos o pueden tomarse solos. Los probióticos permanecen activos y ejercen sus efectos sobre el sujeto que los toma. Cuando se toman en cantidades suficientes, los probióticos tienen efectos beneficiosos, en el caso particular de la presente invención tiene efectos beneficiosos sobre la salud oral, en el tratamiento y/o prevención de infecciones de la cavidad oral, tales como caries.

En el contexto de la presente invención, se entiende por “alimento funcional” un alimento natural o procesado que contiene compuestos biológicamente activos conocidos, tales como microorganismos beneficiosos, que proporcionan un beneficio para la salud, tal como la prevención y/o el tratamiento de enfermedades, en el caso particular de la presente invención, el tratamiento y/o prevención de infecciones de la cavidad oral, tales como caries.

Como se usa en el presente documento, la expresión “vehículo farmacéuticamente aceptable” significa un disolvente, dispersante, excipiente, adyuvante u otro material no tóxico que se mezcla con el compuesto de la presente invención con el fin de permitir la formación de una composición farmacéutica, por ejemplo una forma de dosificación capaz de administrarse al paciente.

Como se usa en el presente documento, una “composición para la salud oral” significa una composición que mantiene y/o mejora la salud de la cavidad oral, por ejemplo previniendo, reduciendo y/o eliminando infecciones en la cavidad oral, incluyendo caries y enfermedad periodontal.

Durante la descripción y las reivindicaciones, la palabra “que comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras

características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Además, el término “*que comprende*” también puede abarcar el término “*que consiste en*”.

Cepa bacteriana de la invención

La presente invención se refiere a una nueva cepa bacteriana depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), situada en la Universidad de Valencia, *Parc Científic Universitat de València*, Catedrático Agustín Escardino, 9, 46980 Paterna (Valencia). La nueva cepa bacteriana fue depositada por el *Servicio Galego de Saúde* (SERGAS), con domicilio en el Edificio Administrativo San Lázaro, 15703, Santiago de Compostela, A Coruña, el 20 de julio de 2016 y se le asignó el número de acceso CECT 9174. La referencia asignada por el depositante es S6. A partir de ahora, esta cepa puede ser referida en el presente documento como la “*cepa bacteriana de la presente invención*”, CECT 9174.

La presente invención se refiere además a una cepa bacteriana cuyo genoma tenga al menos un 95% de identidad nucleotídica promedio (ANI, Richter M and Roselló-Mora R. 2009. PNAS 106: 19126-131), tales como 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la secuencia de ADN del genoma completo de la cepa bacteriana de la presente invención, CECT 9174.

El grado de identidad entre dos secuencias se puede determinar por métodos convencionales, por ejemplo, mediante algoritmos de alineación de secuencia estándar conocidos en el estado de la técnica, tales como, por ejemplo BLAST (Altschul S.F. *et al.* Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 1990 Oct 5; 215(3):403-10).

Esta cepa bacteriana con número de acceso CECT 9174, se aisló de la cavidad oral, en particular de la placa dental de humanos adultos jóvenes con baja prevalencia de caries. La nueva cepa CECT 9174 tiene un efecto antimicrobiano, en particular contra el microorganismo cariogénico *S. mutans*. Se ha demostrado que la cepa bacteriana de la presente invención, CECT 9174, es capaz de secretar al medio extracelular una o más sustancias con efecto antimicrobiano, en particular capaz de inhibir el crecimiento de *S. mutans*, véase, el Ejemplo 4. Además, la nueva cepa CECT 9174 tiene un efecto antimicrobiano contra los periodontopatógenos, concretamente, contra las bacterias implicadas en la patogénesis y el desarrollo de la enfermedad periodontal, tales como por ejemplo *Veillonella parvula*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Actinomyces naeslundii*.

Se ha demostrado que la cepa bacteriana de la presente invención afecta al desarrollo de un biofilm constituido por *Streptococcus oralis*, *Veillonella parvula*, *Actinomyces naeslundii*, *Fusobacterium nucleatum*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas gingivalis*. Además, se ha demostrado que la cepa bacteriana de la presente invención inhibe el desarrollo de un biofilm maduro constituido por *V. parvula*, *A. naeslundii*, *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*. Por consiguiente, se ha demostrado que la cepa bacteriana de la presente invención tiene un potente efecto inhibidor contra patógenos periodontales. La cepa bacteriana de la presente invención es un agente útil en la prevención y tratamiento de la enfermedad periodontal.

La cepa bacteriana de la presente invención pertenece a una nueva especie, ya que tiene una identidad nucleotídica promedio (ANI) > 10% con respecto a todas las especies de *Streptococcus* secuenciadas (ver Ejemplo 3), clasificándose junto con *Streptococcus oralis* y *Streptococcus oligofermentans*. Un análisis taxonómico del rRNA 16S de CECT 9174 (la cepa bacteriana de la presente invención) indicó que esta cepa está estrechamente relacionada con *Streptococcus mitis* y algunos clones orales de *Streptococcus* spp. Un análisis taxonómico del rRNA 23S de CECT 9174 (la cepa bacteriana de la presente invención) indicó que esta cepa está estrechamente relacionada con *Streptococcus dentisani* 7747 y *Streptococcus igurinus* (véase el Ejemplo 3).

La cepa bacteriana de la presente invención es un coco Gram-positivo, anaerobio facultativo, catalasa negativo, que forma cadenas al crecer. Fenotípicamente, se clasifica como perteneciente al grupo de *mitis/oralis* ((Ruoff KL. Miscellaneous Catalase-Negative, Gram-Positive Cocci: Emerging Opportunists. Journal of Clinical Microbiology. 2002;40(4):1129- 1133. doi:10.1128/JCM.40.4.1129-1133.2002.; Facklam R. What Happened to the Streptococci: Overview of Taxonomic and Nomenclature Changes. Clinical Microbiology Reviews. 2002;15(4):613-630. doi:10.1128/CMR.15.4.613-630.2002) y genéticamente se agrupa según el valor ANI junto a *Streptococcus oralis* y *Streptococcus oligofermentans*.

La presente invención se refiere además a un cultivo biológicamente puro de un nuevo *Streptococcus* spp. , depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), por el *Servicio Galego de Saúde* (SERGAS), con el número de acceso CECT 9174 (la cepa bacteriana de la presente invención), o una cepa bacteriana cuyo genoma tenga al menos un 95% de identidad nucleotídica promedio, tal como 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la secuencia de ADN del genoma completo de la cepa bacteriana de la presente invención, CECT 9174.

Sobrenadante y extracto de la presente invención

La presente invención proporciona además un extracto que comprende la cepa bacteriana de la presente invención, o una cepa bacteriana cuyo genoma tenga al menos un 95% de identidad nucleotídica promedio, tal como 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la secuencia de ADN del genoma completo de la cepa bacteriana de la presente invención,

CECT 9174.

5 El extracto o extracto crudo de la presente invención puede prepararse cultivando la cepa bacteriana de la presente invención, o una cepa bacteriana cuyo genoma tenga al menos un 95% de identidad nucleotídica promedio, tal como 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la secuencia de ADN del genoma completo de la cepa bacteriana de la presente invención, CECT 9174, para alcanzar una cantidad suficiente de células (UFC/ml), tal como, por ejemplo, 10^8 - 10^9 UFC/ml, y homogeneizando la fracción celular del cultivo. Como sabe cualquier experto, la fracción celular puede obtenerse, por ejemplo, centrifugando el cultivo y descartando el sobrenadante.

10 Cualquier experto en la materia conoce las técnicas de homogeneización de bacterias. Por ejemplo, las bacterias se pueden homogeneizar usando un tampón de lisis que rompe la pared celular.

El homogeneizado es el extracto o extracto crudo de acuerdo con la presente invención.

15 La presente invención proporciona además un sobrenadante derivado del cultivo de la cepa bacteriana de la presente invención o una cepa bacteriana cuyo genoma tenga al menos un 95% de identidad nucleotídica promedio, tal como 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la secuencia de ADN de todo el genoma de la cepa bacteriana de la presente invención, CECT 9174.

20 El sobrenadante de la presente invención se puede preparar como sigue; la cepa bacteriana de la presente invención (CECT 9174) o una cepa bacteriana cuyo genoma tenga al menos un 95% de identidad nucleotídica promedio, tal como 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la secuencia de ADN de todo el genoma de la bacteria de la presente invención, se cultiva con el fin de alcanzar una cantidad suficiente de células (UFC/ml), tal como, por ejemplo, 10^8 - 10^9 UFC/ml; a continuación, el cultivo se centrifuga y el sobrenadante se recupera y se filtra preferentemente utilizando, por ejemplo, un filtro de 0,22 μ m. De esta manera, el sobrenadante recuperado está libre de bacterias.

30 Se ha demostrado que la cepa bacteriana de la presente invención, CECT 9174, es capaz de segregar a los medios extracelulares una o más sustancias con efecto antimicrobiano, en particular capaces de inhibir el crecimiento de *S. mutans* (véase, por ejemplo, el Ejemplo 4). Por consiguiente, el sobrenadante derivado del cultivo de la cepa bacteriana de la presente invención (CECT 9174), o una cepa bacteriana cuyo genoma tenga al menos un 95% de identidad nucleotídica promedio, tal como 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la secuencia de ADN del genoma completo de la cepa bacteriana de la presente invención, tiene actividad bactericida que es útil en el mantenimiento y/o mejora del estado de salud de la cavidad oral.

35 Composiciones, probióticos y alimentos medicinales de la invención

La presente invención proporciona composiciones que comprenden la cepa bacteriana de la presente invención.

40 Por ejemplo, la presente invención proporciona una composición que comprende la cepa bacteriana de la presente invención, o una cepa bacteriana cuyo genoma tenga al menos un 95% de identidad nucleotídica promedio, tal como 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la secuencia de ADN del genoma completo de la cepa bacteriana de la presente invención (CECT 9174), o cultivo, o extracto, o sobrenadante de la presente invención. La composición puede ser una composición farmacéutica, una composición para la salud oral, un probiótico, una composición alimentaria médica o un alimento funcional.

45 Las composiciones de la presente invención pueden comprender además otros agentes antimicrobianos tales como antibióticos u otros microorganismos con actividad antibacteriana.

50 La cepa o cultivo bacteriano de la presente invención o una cepa bacteriana cuyo genoma tenga al menos un 95% de identidad nucleotídica promedio, tal como 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la secuencia de ADN de todo el genoma de la bacteria de la presente invención (CECT 9174), o cultivo, o extracto, o sobrenadante puede estar comprendido en una formulación terapéutica o composición farmacéutica, que es una formulación o composición adecuada para la administración de la cepa o cultivo bacteriano de la presente invención a un sujeto que lo necesite, preferiblemente un sujeto susceptible de padecer infecciones orales tales como caries y/o enfermedad periodontal. En general, las formulaciones terapéuticas y composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención comprenden la cepa o cultivo bacteriano de la presente invención y un vehículo, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

60 En la presente memoria, la expresión "*vehículo, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable*" significa un vehículo, tal como un disolvente no tóxico, dispersante, excipiente, adyuvante u otro material para el suministro de la cepa bacteriana o cultivo de la presente invención, el cual es compatible con la viabilidad o actividad de las células bacterianas o cultivo. Los vehículos, diluyentes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables para uso en la presente invención son bien conocidos por los expertos en la técnica.

65 La cepa bacteriana de la presente invención o una cepa bacteriana cuyo genoma tenga al menos un 95% de identidad nucleotídica promedio, tal como 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la secuencia de ADN del genoma completo de la cepa bacteriana de la presente invención (CECT 9174), o cultivo, o extracto, o sobrenadante de la presente invención,

se pueden formular en muchas formas adecuadas para administración oral. Por ejemplo, la cepa o cultivo bacteriano de la presente invención o una cepa bacteriana cuyo genoma tenga al menos una identidad nucleotídica promedio del 95%, tal como 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la secuencia de ADN del genoma completo de la cepa bacteriana de la presente invención (CECT 9174), o cultivo, o extracto, o sobrenadante de la presente invención puede ser administrado directamente a la cavidad oral. Por ejemplo, la cepa bacteriana de la presente invención o una cepa bacteriana cuyo genoma tenga al menos un 95% de identidad nucleotídica promedio, tal como 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la secuencia de ADN del genoma completo de la cepa bacteriana de la presente invención (CECT 9174), o cultivo, o extracto, o sobrenadante de la presente invención, puede ser aplicada a la cavidad oral en forma de una spray. También se puede administrar en forma de pasta de dientes, enjuague bucal, enjuague para hacer gárgaras, cápsulas, jarabe, goma de mascar, pastillas, tabletas, tabletas masticables, etc.

La cepa bacteriana de la presente invención o una cepa bacteriana cuyo genoma tenga al menos un 95% de identidad nucleotídica promedio, tal como 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la secuencia de ADN del genoma completo de la cepa bacteriana de la presente invención, CECT 9174, o cultivo, o extracto, o sobrenadante de la presente invención pueden estar comprendida en una composición de salud oral, es decir, una composición adecuada para administración oral que mantiene y/o mejora el estado de salud de la cavidad oral. Preferiblemente, la composición de salud oral de la presente invención se administra a un sujeto que lo necesite, en particular un sujeto susceptible de padecer infecciones causadas por bacterias Gram-negativas y/o Gram-positivas, en particular por *S. mutans*, tales como caries y/o infecciones causadas por patógenos periodontales, tales como enfermedad periodontal. La composición de salud oral de la presente invención puede ser formulada como un líquido, spray, pasta dentífrica, enjuague bucal, enjuague para gargarismo, jarabe, etc. La composición de salud oral de la presente invención puede comprender además agentes antimicrobianos, cepas con actividad antibacteriana, agentes anticariógenos tales como xilitol o fluoruro, etc.

La cepa bacteriana de la presente invención o una cepa bacteriana cuyo genoma tenga al menos un 95% de identidad nucleotídica promedio, tal como 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la secuencia de ADN del genoma completo de la cepa bacteriana de la presente invención (CECT 9174), o cultivo, o extracto, o sobrenadante de la presente invención puede usarse como probióticos. Los probióticos de la presente invención pueden añadirse a alimentos tales como productos lácteos (por ejemplo, leche, yogur), o pueden consumirse por sí mismos, por ejemplo en forma de pastillas, tabletas, cápsulas, polvo, etc. También pueden agregarse a los suplementos dietéticos.

La cepa bacteriana de la presente invención o una cepa bacteriana cuyo genoma tenga al menos un 95% de identidad nucleotídica promedio, tal como 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la secuencia de ADN del genoma completo de la cepa bacteriana de la presente invención (CECT 9174), o cultivo, o extracto, o sobrenadante de la presente invención puede estar comprendido en una composición de alimento médico o un alimento funcional.

Usos médicos de la cepa bacteriana de la presente invención

Los inventores de la presente solicitud han encontrado sorprendentemente que la cepa bacteriana depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) por el *Servicio Galego de Saúde* (SERGAS), el 20 de julio de 2016, con el número de acceso CECT 9174, muestra efectos ventajosos para la salud humana, en particular para la salud oral. Además, los inventores de la presente solicitud han encontrado que el sobrenadante o medio derivado del cultivo de la cepa bacteriana de la presente invención muestra efectos ventajosos para la salud humana, en particular para la salud oral. La cepa bacteriana de la presente invención, CECT 9174, es capaz de segregar a los medios extracelulares una o más sustancias con efecto antimicrobiano, en particular capaz de inhibir el crecimiento de *S. mutans* (véase, el Ejemplo 4).

Se ha demostrado que la cepa bacteriana de la presente invención tiene un efecto antibacteriano, en particular contra *S. mutans*, que es una de las especies estreptocócicas que habitan en la placa dental, considerada como uno de los principales agentes causales de las infecciones orales, en particular de la caries.

Además, se ha demostrado que la cepa bacteriana de la presente invención tiene actividad antibacteriana frente a patógenos periodontales, tales como *A. naeslundii*, *V. parvula* y *A. actinomycetemcomitans*. Además, se ha demostrado que la cepa bacteriana de la presente invención afecta al desarrollo de un biofilm constituido por *Streptococcus oralis*, *Veillonella parvula*, *Actinomyces naeslundii*, *Fusobacterium nucleatum*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas gingivalis*. Además, se ha demostrado que la cepa bacteriana de la presente invención inhibe el desarrollo de un biofilm maduro que comprende *V. parvula*, *A. naeslundii*, *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*. Por consiguiente, se ha demostrado que la cepa bacteriana de la presente invención tiene un potente efecto inhibidor contra patógenos periodontales. La cepa bacteriana de la presente invención es un agente útil en la prevención y tratamiento de la enfermedad periodontal.

Por consiguiente, la presente invención proporciona además la cepa bacteriana de la presente invención, o una cepa bacteriana cuyo genoma tenga al menos 95% de identidad nucleotídica promedio, tal como 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la secuencia de ADN del genoma completo de la cepa bacteriana de la presente invención (CECT 9174), o el cultivo, o el extracto, o el sobrenadante, o la composición (composición farmacéutica, composición para la salud oral, composición médica de alimentos) o alimento probiótico o funcional de la presente invención para uso como medicamento, preferentemente un medicamento antimicrobiano, en particular contra infecciones causadas por

bacterias Gram-positivas y/o Gram-negativas, particularmente contra *S. mutans* y/o contra patógenos periodontales.

La presente invención proporciona además la cepa bacteriana de la presente invención, o una cepa bacteriana cuyo genoma tenga al menos un 95% de identidad nucleotídica promedio, tal como 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la secuencia de ADN del genoma completo de la cepa bacteriana de la presente invención (CECT 9174), o el cultivo, o el extracto, o el sobrenadante, o la composición (composición farmacéutica, composición para la salud oral, composición de alimento médica) o alimento probiótico o funcional de la presente invención para su uso en el tratamiento profiláctico o terapéutico de enfermedades infecciosas de la cavidad oral, preferentemente infecciones causadas por bacterias Gram-positivas y/o Gram-negativas, en particular por *S. mutans* y/o infecciones causadas por patógenos periodontales, más preferiblemente caries y/o enfermedad periodontal. Por consiguiente, la presente invención proporciona un método para la prevención y/o tratamiento de enfermedades infecciosas de la cavidad oral, preferiblemente infecciones causadas por bacterias Gram-positivas y/o Gram-negativas, en particular por *S. mutans* y/o infecciones causadas por patógenos periodontales, más preferiblemente caries y/o enfermedad periodontal, que comprende, o alternativamente, consiste en administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de la cepa bacteriana de la presente invención o de una cepa bacteriana cuyo genoma tenga al menos un 95% de identidad nucleotídica promedio, tal como el 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la secuencia de ADN del genoma completo de la cepa bacteriana de la presente invención (CECT 9174), o el cultivo, o el extracto o el sobrenadante, o la composición (composición farmacéutica, composición para la salud oral, composición de alimentos médica) o alimento probiótico o funcional de la presente invención.

La presente invención proporciona además el uso de la cepa bacteriana de la presente invención o de una cepa bacteriana cuyo genoma tenga al menos un 95% de identidad nucleotídica promedio, tal como 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la secuencia de ADN del genoma completo de la cepa bacteriana de la presente invención (CECT 9174), o el cultivo, o el extracto, o el sobrenadante, o la composición (composición farmacéutica, composición para la salud oral, composición médica de alimentos) o alimento probiótico o funcional de la presente invención para mantener y/o mejorar la salud oral. Por ejemplo, la presente invención proporciona el uso de la cepa bacteriana de la presente invención, o de una cepa bacteriana cuyo genoma tenga al menos un 95% de identidad nucleotídica promedio, tal como 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la secuencia de ADN del genoma completo de la cepa bacteriana de la presente invención (CECT 9174), o el cultivo, o el extracto, o el sobrenadante, o la composición (composición farmacéutica, composición para la salud oral, composición médica de alimentos) o probiótico, o alimento funcional de la presente invención para prevenir el desarrollo de infecciones orales, tales como caries y/o enfermedad periodontal, o para reducir o eliminar la presencia de infecciones orales.

Para los expertos en el estado de la técnica, otros objetos, ventajas y características de la invención se detallan en la sección de la descripción y práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan como material ilustrativo y no pretenden limitar la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1.

Aislamiento y caracterización de una nueva cepa bacteriana (la cepa bacteriana de la presente invención, depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), por el Servicio Galego de Saúde (SERGAS), con dirección postal en Edificio Administrativo San Lázaro, 15703, Santiago de Compostela, A Coruña, el 20 de Julio de 2016, con el número de acceso CECT 9174).

La presente invención proporciona una cepa bacteriana específica que presenta una actividad inhibidora contra microorganismos cariogénicos *S. mutans*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas y condiciones de cultivo bacteriano

Se tomaron muestras de la placa dental supragingival y saliva de los pacientes seleccionados. Las muestras fueron transportadas en hisopos con medio Amies (Copan Diagnostics Inc.) para su transporte al laboratorio de Microbiología del Complejo Hospitalario Universitario de Vigo (España). A su llegada se sembraron por agotamiento en placas de agar (Biomérieux): chocolate (CH), agar sangre (AS), agar sangre con colistina y ácido nalidíxico (ANC) selectivo para Gram-positivo y agar MacConkey (MCK) selectivo para Gram-negativos.

Las muestras fueron incubadas bajo las siguientes condiciones: CH, AS y ANC en condiciones aeróbicas con 5% de CO₂ y MCK en atmósfera aeróbica, a 75-37°C durante 24 horas.

Después del período de incubación las colonias fueron seleccionadas para su estudio basándose en la morfología de la colonia (tamaño, forma y pigmentación de las colonias). La morfología celular se seleccionó principalmente con *Streptococcus* α -hemolíticos sospechosos de pertenecer al grupo viridans. Para obtener cultivos puros, los diferentes aislamientos se subcultivaron sobre placas de agar chocolate y se incubaron aeróbicamente con CO₂ al 5% a 35-37

°C durante 24 horas.

El análisis bioquímico y las características de fermentación de azúcares de los aislados se determinaron mediante sistemas API®20 API®50 Strept y CHL (bioMérieux) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La positividad y negatividad de la prueba bioquímica se evaluó de acuerdo con el código de color especificado en el sistema API.

Se utilizó medio Todd-Hewitt suplementado con 5% de extracto de levadura y 5% de suero bovino fetal (THY) para la curva de crecimiento e inhibición en medio líquido.

10 *Ensayo de inhibición de crecimiento en un cultivo tipo césped de S. mutans*

0,3 de la suspensión McFarland de *S. mutans* CECT 479 se inoculó en placas de infusión de cerebro-corazón (BHI) (Conda) para obtener un tapiz de modo de crecimiento. CECT 9174 se depositó como un botón de 10µL, después del crecimiento en agar de chocolate durante 24 horas. *S. oralis* CECT 907T se utilizó como un control negativo y *S. dentisani* CECT 8312 y *S. dentisani* 8313 se utilizaron como controles positivos. Las placas se incubaron en atmósfera de CO₂ al 5%. Después de 48 horas se evalúa la presencia de zonas de inhibición producidas por cada una de ellas.

Ensayo de inhibición de crecimiento en cultivos mixtos

20 Se inocularon dos o tres unidades formadoras de colonias (UFC) de CECT 9174 de un cultivo en placa puro en medio CH (Biomérieux) en 10 ml de caldo THY en tubos de 50 ml (BD Falcon) y se incubaron en un horno agitador a 35°C y 100 rpm. El tamaño del inóculo para el cultivo mixto se ajustó mediante la lectura de OD600 en un espectrómetro (UnicamHelios β), de manera que el UFC en el cultivo mixto de *S. mutans* y de cada aislado estudiado alcanzase 10⁸ UFC/ml. Para determinar el tamaño del inóculo, se realizaron diluciones en serie en placas en medio CH, como se describe a continuación.

30 El cultivo mixto se realizó incubando 100 µl de cada inóculo de microorganismo, después del ajuste de acuerdo con OD600 en THY fresco, en 10 ml de medio en un tubo de 50 ml. La concentración final en el cultivo mixto fue 10⁵ UFC/mL. Después de la incubación durante 24 horas en un horno a 35 ° C y 100 rpm, se determinó el número resultante de UFC mediante diluciones seriadas (10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷) en THY, inoculando 100 µl de cada dilución en CH y estriando el inóculo con un asa de inoculación Drigalski. Con el fin de conocer el número de UFC resultantes del cultivo independiente de cada uno de los estreptococos presentes en el cultivo mixto, cada uno se incubó independientemente a una concentración de 10⁵ UFC/ml, durante 24 horas en un horno agitador a 35°C y a 100 rpm. La determinación del número resultante de UFC se realizó como se ha descrito anteriormente, mediante diluciones en serie en placas CH. Todas las pruebas se realizaron en 3 réplicas diferentes para asegurar la reproducibilidad de los resultados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

40 *Aislamiento de CECT 9174*

45 El aislado de CECT fue obtenido en muestras de placa dental de un grupo de voluntarios atendidos por la Unidad de Odontología para pacientes con necesidades especiales de la Universidad de Santiago de Compostela (España). Se seleccionaron pacientes con buena salud oral, sin evidencia de caries, entre una población de baja prevalencia de caries. El estado de la salud oral fue evaluado por un dentista siguiendo las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la nomenclatura en los Estudios de Salud Oral.

Ensayo de inhibición de crecimiento: método de siembra en césped e inóculo de las colonias a estudiar con asa ("spot-on-the-lawn")

50 El estudio de la actividad de una nueva cepa de *Streptococcus* para inhibir el crecimiento de *S. mutans in vitro* se realizó mediante el método "spot-on-the-lawn" en un cultivo sólido BHI, ensayado bajo dos condiciones atmosféricas (anaerobiosis y 5% de atmósfera de CO₂). Se definió como resultado positivo la presencia de un halo de inhibición de crecimiento (cepa sensible).

55 La Figura 1 muestra el halo de inhibición producido por CECT 9174 en un cultivo césped de *S. mutans*. Los resultados muestran un halo de inhibición de crecimiento de *S. mutans* en presencia de CECT 9174.

Ensayo de inhibición de crecimiento: cultivos mixtos en medio líquido

60 El presente ensayo se realizó como se ha descrito anteriormente en "*Ensayo de inhibición de crecimiento en cultivos mixtos*".

65 Se ha demostrado que la capacidad de crecimiento en medio líquido es mucho mayor para *S. mutans* que para CECT 9174 (la cepa bacteriana de la presente invención), como se ilustra en sus curvas de crecimiento de la Figura 2.

Ambos aislamientos (*S. mutans* y CECT 9174 (la cepa bacteriana de la presente invención)) se combinaron en medio líquido a la misma concentración ($\approx 10^5$ UFC/mL) y se observó el crecimiento en UFC/mL tras 24 horas de incubación.

5 La cantidad de CECT 9174 aumentó tras 24 horas de incubación, mientras que la cantidad de *S. mutans* detuvo su crecimiento en el cultivo mixto, a pesar de que este microorganismo muestra un mayor crecimiento en cultivo líquido (Figura 3).

Ejemplo 2.

10 Evaluación de la capacidad de la nueva cepa de *Streptococcus* spp. para inhibir el crecimiento bacteriano de otras especies bacterianas en un modelo de biofilm *in vitro*.

El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antibacteriana de la nueva especie de *Streptococcus* spp. (la cepa de la presente invención) contra bacterias implicadas en el desarrollo de un modelo oral de biofilm *in vitro*.

15

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas y condiciones de cultivo bacteriano

20 Se emplearon cepas de referencia estándar de *Streptococcus oralis* CECT 907T, *Veillonella parvula* NCTC 11810, *Actinomyces naeslundii* ATCC 19039, *Fusobacterium nucleatum* DMSZ 20482, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* DSMZ 8324 y *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277. Las bacterias se cultivaron en placas de agar sangre (Blood Agar Oxoid No 2, Oxoid, Basingstoke, Reino Unido), suplementadas con sangre de caballo estéril al 5% (v/v) (Oxoid), 5.0 mg ml⁻¹ hemin (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.) y 1.0 mg ml⁻¹ de menadiona (Merck, Darmstadt, Alemania) en condiciones anaeróbicas (10% H₂, 10% CO₂ y balance N₂) a 37°C durante 72 h. La nueva cepa de *Streptococcus* spp. se cultivó en las mismas condiciones descritas anteriormente.

25

Ensayo de inhibición de crecimiento en cultivos puros de las seis cepas de referencia estándar promovido por la actividad antimicrobiana de la nueva cepa de Streptococcus spp.

30

Se cultivaron inóculos de cada una de las 6 cepas de referencia estándar y del nuevo *Streptococcus* spp. en condiciones anaeróbicas (10% H₂, 10% CO₂ y balance N₂) a 37°C durante 24 horas en medio BHI modificado, un medio rico en proteínas que contenía infusión cerebro-corazón (BHI) (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.), suplementado con 2,5 g L⁻¹ de mucina (Oxoid), 1,0 g L⁻¹ de extracto de levadura (Oxoid), 0,1 g L⁻¹ de cisteína (Sigma), 2,0 g L⁻¹ de bicarbonato sódico (Merck), 5,0 mg mL⁻¹ hemin (Sigma), 1,0 mg mL⁻¹ de menadiona (Merck) y 0,25% (v/v) de ácido glutámico (Sigma).

35

El crecimiento bacteriano se registró en la fase final-exponencial (medida por espectrofotometría). El ensayo de inhibición se realizó por el método de "spot-on-the-lawn" sobre dos medios de cultivo sólidos. Las seis cepas de referencia se inocularon en placas de agar sangre y BHI con un hisopo, estriando sobre sus superficies para asegurar una buena distribución del inóculo sobre la superficie del medio. Posteriormente, la nueva cepa de *Streptococcus* spp. se inoculó sobre las superficies inoculadas del agar como un botón, recogiendo un asa a partir de un cultivo fresco de cepa en placas de agar sangre.

40

45 Las placas se incubaron en condiciones anaeróbicas (10% H₂, 10% CO₂ y balance N₂) y atmósfera de al 5% de CO₂ (5% de CO₂, 20,07% de O₂) a 37°C durante 96 h. Después de la incubación, se midió el diámetro de las zonas de inhibición del crecimiento alrededor del nuevo *Streptococcus* spp.

45

Ensayo de inhibición in vitro del desarrollo de biofilm promovido por la nueva cepa de Streptococcus spp.

50

Se generaron los biofilms aplicando el método descrito por Sánchez y colaboradores (Sánchez MC, Llama-Palacios A, Blanc V, León R, Herrera D, Sanz M; "Structure, viability and bacterial kinetics of an in vitro biofilm model using six bacteria from the subgingival microbiota", *J Period Res*, 2011 Apr;46(2):252-60) con concentraciones bacterianas ligeramente diferentes al preparar la suspensión bacteriana. En resumen, los cultivos planctónicos de las seis cepas de referencia y de la nueva cepa de *Streptococcus* spp. fueron cultivadas anaeróbicamente en medio BHI suplementado descrito anteriormente. Después de alcanzar la fase exponencial media (medida por espectrofotometría), se preparó una suspensión mixta de bacterias en medio BHI modificado que contenía 10³ unidades formadoras de colonias (UFC) mL⁻¹ para *S. oralis* y/o la nueva cepa de *Streptococcus* spp., 10⁵ UFC mL⁻¹ para *V. parvula* y *A. naeslundii* y 10⁷ UFC mL⁻¹ para *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*. A continuación, se colocaron discos estériles de hidroxipatita (HA) de 7 mm de diámetro y 1,8 mm de grosor (desviación estándar, SD = 0,2) (Clarkson Chromatography Products, Williamsport, PA, EE.UU.) en los pocillos de un cultivo de tejidos de 24 pocillos (GreinerBio-one, Frickenhausen, Alemania). Cada pocillo se inoculó con 1,5 ml de suspensión de bacterias mixtas preparadas e incubadas en condiciones anaeróbicas (10% H₂, 10% CO₂ y balance N₂) a 37°C durante 72 h. Las placas empleadas para evaluar la esterilidad del medio de cultivo se usaron como controles.

55

60

65

Se prepararon tres suspensiones independientes que contenían respectivamente:

- (1) *S. oralis*, *V. parvula*, *A. naeslundii*, *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*;

5 - (2) La nueva cepa de *Streptococcus* spp. (CECT 9174), *S. oralis*, *V. parvula*, *A. naeslundii*, *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*;

- (3) La nueva cepa de *Streptococcus* spp. (CECT 9174), *V. Parvula*, *A. naeslundii*, *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*.

10 *Análisis con Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)*

15 Antes del análisis con MEB, los discos cubiertos con biofilms cultivados *in vitro* durante 72 h se fijaron en paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 2,5% durante 4 h a 4°C. A continuación, los discos se lavaron una vez en PBS y una vez en agua estéril (tiempo de inmersión por lavado 10 min) y se deshidrataron a través de una serie de soluciones de etanol graduadas (50, 60, 70, 80, 90 y 100%). Luego se secaron las muestras, se recubrieron con oro y se analizaron por microscopía electrónica JSM 6400 (JSM6400; JEOL, Tokio, Japón) con un detector de electrones retrodispersado y una resolución de imagen de 25 KV. Los análisis se realizaron en el Centro Nacional ICTS de Microscopía Electrónica (Campus de Excelencia Internacional de Moncloa, Universidad Complutense de Madrid).

20 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayo de inhibición de crecimiento

25 El estudio de la actividad de la nueva cepa de *Streptococcus* spp. para inhibir el crecimiento de las seis cepas de referencia implicadas en la formación de un biofilm oral *in vitro* se realizó por el método "spot-on-the-lawn" en dos cultivos sólidos, BHI y agar sangre suplementado, ensayados en dos condiciones atmosféricas (anaerobiosis o 5% de atmósfera de CO₂). Se definió como resultado positivo la presencia de un halo de inhibición de crecimiento (cepas sensibles).

30 En la Tabla 1. se detallan los resultados de la inhibición de crecimiento. La nueva cepa de *Streptococcus* spp. claramente inhibe el crecimiento de *A. naeslundii*, *V. Parvula* y *A. Actinomycetemcomitans* en condiciones de atmósfera al 5% de CO₂ y usando BHI como medio de cultivo (Figura 4). No se observó actividad antibacteriana frente a estas especies bacterianas en otras circunstancias estudiadas. Para *S. oralis*, *F. nucleatum*, y *P. gingivalis*, no se observó actividad antibacteriana en ninguno de los escenarios estudiados.

35 *Análisis con Microscopía Electrónica de Barrido*

40 Se realizó una evaluación adicional de la actividad antibacteriana de la nueva cepa de *Streptococcus* spp. frente a especies bacterianas implicadas en el desarrollo de un biofilm oral *in vitro* en condiciones anaeróbicas mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), lo que indicó que esta bacteria produce un importante efecto en la formación del biofilm bajo las condiciones empleadas, específicamente inhibiendo el desarrollo del mismo, como se puede observar en la Figura 5 (A-F).

Se testaron tres combinaciones diferentes de bacterias:

45 (1) Cuando el biofilm contiene las seis especies bacterianas convencionalmente usadas en el modelo de biofilm (*S. oralis*, *V. parvula*, *A. naeslundii*, *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*) las bacterias desarrollaron una comunidad bacteriana bien estructurada. Se pueden reconocer varillas fusiformes, sugestivas de *F. nucleatum*, que parece desempeñar un papel importante en el mantenimiento del andamiaje del biofilm (Figuras 5A y 5B).

50 (2) Cuando se adicionó la nueva cepa de *Streptococcus* spp. (CECT 9174) junto con las seis cepas de referencia estándar (*S. oralis*, *V. parvula*, *A. naeslundii*, *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*), la estructura presentó una menor densidad (Figuras 5C y 5D) pero sin diferencias relevantes cuando se compara con la estructura del biofilm de referencia (Figuras 5A y 5B). A lo largo del biofilm, el material HA se observa bajo la biomasa (Figura 5D), como bloques irregulares. Este hallazgo no se observó en el biofilm de referencia por su mayor densidad (Figura 5B); por lo tanto, se puede especular que la presencia de la nueva cepa, *Streptococcus* spp. (CECT 9174), afecta el desarrollo del biofilm.

60 (3) Cuando la nueva cepa de *Streptococcus* spp. (CECT 9174) es adicionado junto con cinco de las cepas de referencia estándar (*V. parvula*, *A. naeslundii*, *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*), excluyendo *Streptococcus oralis*, se observó una notoria inhibición del desarrollo de un biofilm maduro (Figuras 5E y 5F). Las bacterias aparecían escasamente unidas a la superficie de la HA. Las células bacterianas se disponían como cadenas estreptocócicas cortas, células aisladas o como agregados pluricelulares pobres. Las células bacterianas se dispusieron en la superficie sin la estructura típica del biofilm, con menos presencia de células bacterianas en comparación con el biofilm de referencia. Además, se pudo observar que la especie bacteriana predominante sobre la superficie de HA era la nueva cepa de *Streptococcus* spp. (CECT 9174).

Tabla 1. Ensayo de inhibición de crecimiento de las seis cepas bacterianas de referencia implicadas en la formación del biofilm *in vitro* promovido por la nueva cepa de *Streptococcus* spp. (CECT 9174). Se considera un resultado positivo cuando se observa un halo de inhibición de crecimiento (cepa sensible).

5

Atmósfera	Medio de cultivo	Bacterias a button	Las bacterias sembradas sobre la superficie de la placa. Presencia de un halo de inhibición de crecimiento					
			So	An	Vp	Fn	Aa	Pg
5% CO ₂	BHI	CECT 9174	-	+	+	-	+	-
	Agar sangre	CECT 9174	-	-	-	-	-	-
Anaeróbico	BHI	CECT 9174	-	-	-	-	-	-
	Agar sangre	CECT 9174	-	-	-	-	-	-

So: *Streptococcus oralis*; An: *Actinomyces naeslundii*; Vp: *Veillonella parvula*; Fn: *Fusobacterium nucleatum*; Aa: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; Pg: *Porphyromonas gingivalis*.

10 Ejemplo 3.

Comparación entre el genoma de CECT 9174, y el resto de los miembros del género *Streptococcus* que se había secuenciado hasta Marzo del 2015.

15 El presente ejemplo está dirigido a secuenciar y comparar el genoma de la nueva bacteria del género *Streptococcus* (la cepa bacteriana de la presente invención, con número de acceso CECT 9174) con respecto a todas las bacterias conocidas y anotadas del género *Streptococcus* que se realizará por el programa JSpecies mediante el cálculo del indicador ANI para bacterias anotadas en bases de datos.

20 Una muestra de ADN genómico de la cepa bacteriana, designada por el código interno como se indica en la tabla que enumera las mediciones de calidad de la muestra después del recorte (la mitad de la muestra inicial, 141936, se recorta mediante el kit Roche High Pure en un intento de mejorar la relación A260/230).

Tabla 2. La relación calidad-cantidad de la muestra 141936 que fue designada como 141936A después de recortar.

25

Código interno	Otras ref.	ng/ul	A260/280	A260/230	ng totales
141936A	1A-S6	19,2	1,85	1,70	597

Se cuantificó entonces la muestra 141936A fluorométricamente usando QubitdsDNA BR Assay Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.), dando un resultado de 6,5 ng/μl. Utilizando esta cuantificación como referencia, el protocolo de preparación de la muestra de ADN Nextera XT se comenzó con 250 pg de DNA total para el desarrollo de bibliotecas. La Figura 6 muestra el perfil del bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE.UU.) para la biblioteca Nextera que se ha obtenido.

30

La cuantificación de la biblioteca que se obtuvo mediante el perfil indicado en la figura anterior y que pertenece a la representación de la biblioteca en un Bioanalizador Agilent, estaba a una concentración de 16,2 nM, con fragmentos que tenían aproximadamente 564 pb en promedio. Basándose en esta cuantificación, la biblioteca se diluyó a 4 nM para la secuenciación 300PE en IlluminaMiSeq (Illumina Inc., San Diego, CA, EE.UU.).

35

Secuenciación y procesamiento de calidad de secuencias

40 La biblioteca se carga en el secuenciador IlluminaMiSeq y se realiza la secuenciación 300PE, como se indicó anteriormente, obteniéndose más de 1 Gb de información de secuencia total. Los resultados de secuenciación en términos del número de lecturas, longitud media y calidad media de las lecturas obtenidas en el secuenciador se muestran en la Tabla 3.

45 Tabla 3. Resultados de secuenciación de las muestras para el experimento ADNseq de la CECT 9174 (No. de secuencias: número de secuencias; Total secuenciado: cantidad total de secuencias obtenidas).

Código interno	Otras ref.	Dirección	No. secuencias	Longitud media	Total secuenciado	Calidad media
141936A	1A-S6	R1	4.829.330	217,00	1.051,00	35,81
		R2	4.829.330	219,00	1.060,00	33,18

Al igual que en toda la secuenciación de pares de Illumina, las secuencias leídas en la dirección R2 (inversa) suelen tener una calidad media inferior.

50

Los archivos que contenían las secuencias para cada una de las direcciones para la muestra de prueba fueron recortados de adaptadores y filtrados por calidad, eliminando archivos que son de menor calidad Q20 y adaptadores Illumina para bibliotecas NexteraDNAseq.

Este procesamiento se realizó utilizando el programa cutadapt, versión v1.4, (<http://code.google.com/p/cutadapt/>). El resultado de las secuencias recortadas, la longitud media y la calidad media de dichas secuencias se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Resultados de las secuencias después de filtrar el experimento DNAseq por calidad. (No. secuencias: número de secuencias; Total secuenciado: cantidad total de secuencias obtenidas).

Código interno	Otras ref.	Dirección	No. secuencias	Longitud media	Total secuenciado	Calidad media
141936A	1A-S6	R1	4.683.023	184,00	865,00	36,13
		R2	4.683.023	205,00	963,00	36,11

El resto del análisis bioinformático fue realizado con secuencias recortadas.

Análisis bioinformático

Control de calidad de secuencias

Las secuencias crudas y recortadas se examinaron con el programa FastQC, versión 0.10.1, (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), el resultado de calidad se puede ver en las siguientes figuras mostrándose un ejemplo de control de calidad.

La Figura 7 muestra que las calidades de las bases secuenciadas de todas las secuencias sin procesar y recortadas, después del ajuste del adaptador. La calidad media de las lecturas mejora después de la eliminación de secuencias de baja calidad, pero en general, los valores que estamos viendo indican un proceso de secuenciación de alta calidad y particularmente un análisis bioinformático posterior altamente confiable llevado a cabo sobre estas secuencias. Esta calidad es superior a Q30, que es el valor utilizado como referencia para las secuencias obtenidas en proyectos con plataformas Illumina, excepto en los extremos finales de la secuenciación, donde la calidad cae, y la menor calidad del extremo R2 también se puede ver. Los paneles A y B de las figuras del lado derecho muestran la eliminación de las secuencias y adaptadores de calidad, respectivamente, antes y después. Otras formas de representar la calidad media se muestran en las Figuras 8 y 9.

La Figura 8 muestra que la calidad media de las bases secuenciadas está próxima a Q35 antes del ajuste del adaptador y de la calidad, aumentando el número de secuencias dentro de esa calidad media (la distribución se lleva a cabo una vez que se ha realizado el recorte). No hay indeterminación en ningún caso, como se muestra en la Figura 9.

La distribución del contenido de GC en los datos crudos y "recortados" se superpone a la distribución teórica, por lo que el sesgo de contenido de GC durante la secuenciación no plantearía un problema, aunque hay de hecho más secuencias que tienen un porcentaje específico de contenido de G + C de lo esperado. Estos datos, junto con los resultados de la calidad de la secuencia, nos llevan al siguiente nivel de análisis.

Ensamblaje

Las secuencias ajustadas al adaptador y de calidad se ensamblaron mediante el programa Abyss (<http://www.bcgsc.ca/platform/bioinfo/software/abyss>), utilizando las opciones por defecto y optimizando solamente K-mer que proporciona el mejor ensamblaje, es decir, el conjunto que da un número menor de contigs, en inglés "contigs", un mayor número de contigs largos (> 500 nts) y donde se maximiza la longitud del contigo más largo del conjunto. Estos resultados se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5. Resultados de los ensamblajes con diferentes k-mers (contigos totales: número total de contigos; mediana: mediana de longitud contigo; N50: N50 de longitud contigo; > 500: número de contigos con más de 500 nts; mediana> 500: mediana de la longitud del número de contigos con más de 500 nts; longitud máxima: contigo más largo)

Kmer	total contigs	median	N50	>500	median >500	max. length
kmer49	285	86	86	18	44963	546746
kmer53	243	195	95	18	44983	546297
kmer57	216	102	102	15	45003	680805
kmer61	186	110	110	15	45023	680419
kmer63	170	114	114	14	54575	680509
kmer64	166	116	116	14	54454	679929

Basándose en los resultados de las estadísticas de ensamblaje, se puede concluir que el ensamblaje con kmer 63 es el montaje óptimo para su uso en el resto del análisis.

5 Se obtienen diez contigs, de los cuales el más grande tiene 118,268 kb. Basado en los contigs, el genoma tiene un tamaño de 1,916,980 nt y un porcentaje de GC del 41.13%.

Anotación

10 Usando los contigs obtenidos con los parámetros por defecto y Kmer 63, se predijeron los marcos de lectura abiertos (ORFs) usando el programa GLIMMER, versión 3.02 (<https://ccb.jhu.edu/software/glimmer/>). GLIMMER es el programa más utilizado para realizar búsquedas de ensamblajes de genomas en microorganismos (predicción de genes). Del mismo modo, RNAmmer, versión 1.2, se utilizó para la predicción de rRNA y la herramienta tRNAscan, versión 1.21, se utilizó para predicción de tRNA.

Los ORFs identificados se asociaron con una proteína específica, y funcionalmente se anotaron por medio de la asociación de cada ORF con sus términos GO relacionados utilizando BLAST2GO (<https://www.blast2go.com/>).

20 Una vez que los ORFs fueron anotados y teniendo en cuenta la ubicación de los rRNAs y tRNAs, se construyó un archivo GFF para que pueda ser utilizado en el futuro para experimentos RNAseq.

Clasificación por medio de ANI

25 Con el genoma anotado de la especie bajo estudio, denominada CECT 9174, dicha especie puede clasificarse mediante el cálculo de la Identidad Nucleotídica Promedio (ANI). Se utilizó el programa JSpecies, versión 1.2.1, (<http://imedea.uib-csic.es/jspecies/>) para permitir llevar a cabo este análisis.

30 Los pasos a seguir fueron la introducción del genoma anotado de la especie estudiada (CECT 9174) y la selección subsiguiente del género (en este caso *Streptococcus*) sobre la base de la cual se seleccionaron todas las bacterias secuenciadas y anotadas para el cálculo de la ANI.

De acuerdo con la clasificación, teniendo en cuenta la topología que hemos identificado mediante el uso del programa JSpecies, la especie de ensayo se clasifica junto con *Streptococcus oralis* y *Streptococcus oligofermentans*.

35 La Figura 11 representa la clasificación de la bacteria teniendo en cuenta el ANI.

Clasificación por medio de la filogenia de 16s rRNA y 23s rRNA

40 Dado que disponemos del genoma del organismo y que los rRNAs contenidos en el mismo se han identificado, decidimos construir la filogenia utilizando estas las regiones 16s rRNA y 23s rRNA del genoma, ya que son las regiones más utilizadas para la clasificación de microorganismos. Los pasos seguidos en el análisis se describen en <http://www.phylogeny.fr/documentation.cgi>. Brevemente, alineamos las secuencias con MUSCLE 3.8.31, y posteriormente usamos el programa Gblocks 0.91.b para refinar la alineación. Con la alineación refinada, comenzamos a construir el árbol filogenético usando el programa phyML, versión 3.1. Con el árbol filogenético más plausible, utilizamos el programa de simios (<http://cran.r-project.org/web/packages/ape/ape.pdf>) del paquete estadístico R para dibujar el árbol. Se seleccionaron todos los rRNAs 16s y 23s pertenecientes al género *Streptococcus* de la base de datos SILVA para permitir llevar a cabo la alineación y se añadió la secuencia de la muestra en estudio.

50 Si tenemos en cuenta la secuencia 16S basada en rRNA, la cepa en estudio está cerca de *Streptococcus mitis* y de algunos clones de *Streptococcus spp. oral*.

Según la clasificación basada en el rRNA 23s, la especie bajo estudio, CECT 9174, está cerca de *Streptococcus dentisani* 7747 y de *Streptococcus igurinus*.

55 Ejemplo 4.

Ensayo de competición en placa

Se inocularon 5 µL de CECT 9174 a una concentración de 1 McFarland en placas BHI (condiciones de nutrición adecuadas) y BHI ½ (condiciones de restricción nutricional), y se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% durante 16 horas. Luego, a una distancia de 3-5 mm de la colonia CECT 9174, se inocularon 5 µL de *S. mutans* 479 a una concentración de 1 McFarland y las placas se incubaron de nuevo a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% durante 32 horas. Tras este tiempo, *S. mutans* sólo pudo crecer en una pequeña porción lejos de CECT 9174. Este hecho se ve incrementado en las condiciones de restricción nutricional en las placas BHI ½. La Figura 12 muestra los resultados del ensayo de competición de placas en BHI de las especies estudiadas. Por lo tanto, puede concluirse que CECT 9174 segrega a los medios extracelulares una o más sustancias capaces de inhibir el crecimiento de *S. mutans*.

Ensayo de inhibición del sobrenadante

Se tomaron 2 a 3 colonias de un cultivo puro de *S. mutans* CECT 479 y CECT 9174 a partir de una placa de agar sangre (Biomérieux) y se inocularon en 10 ml de caldo THY (Todd-Hewit + extracto de levadura al 5% + suero bovino fetal al 5%) en tubos de 50 ml (BD Falcon). Los tubos se incubaron bajo agitación a 35°C y 100 rpm durante 18 horas. Después de la incubación, ambos cultivos se filtraron a través de un filtro de 0,22 µm para eliminar todos los restos celulares. Posteriormente, en ambos caldos filtrados, se inocularon de 2 a 3 *S. mutans* CECT 974 y se incubaron de nuevo bajo agitación a 35°C y 100 rpm durante 18 horas. Para confirmar la presencia o ausencia de crecimiento celular, se tomó 1 ml de cada caldo y se inoculó por inundación en placa de agar sangre a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% durante 24 horas. La Figura 13 muestra el diseño del ensayo. *S. mutans* CECT 974 crece en el caldo filtrado de *S. mutans* CECT 974. Sin embargo, el caldo filtrado CECT 9174 es capaz de inhibir el crecimiento de *S. mutans* CECT 974 cuando esta cepa se inocula en el mismo. Por lo tanto, puede concluirse que CECT 9174 segrega al medio una o más sustancias capaces de inhibir el crecimiento de *S. mutans*.

Ejemplo 5. La actividad inhibidora de *S. CECT 9174* no se ve afectada por la actividad de la proteinasa K.

CECT 9174 produce una bacteriocina de la familia 7B de lactobina/cereina clase IIb que es termostable, no se ve afectada por el efecto de la proteinasa k, y ejerce una actividad evidente contra los patógenos cariogénicos y periodontales. Para demostrar que *S. CECT 9174* no se ve afectada por la actividad de la proteinasa K, se llevó a cabo el siguiente ensayo: después de 24 horas de incubación en medio sólido de las cepas que se van a testar, 10-15 µl de proteinasa K (70 µg/ml) y 10-15 µl de PBS se añadieron en cada lado de las colonias. Posteriormente, se inocularon 5 µl de las cepas sensibles del lado derecho e izquierdo, tal como se describe en Kreth J. et al. 2005 y Zhu L. et al. 2012.

Después de la incubación a 37°C durante 24 horas, se visualizaron las placas. La ausencia de halos indica que la inhibición es causada por las moléculas del péptido natural. La Figura 14 muestra los resultados: (A) la actividad inhibidora sobre *S. mutans* de CECT 9174 no se ve afectada por la proteinasa K ya que en ambos lados (derecho: PBS e izquierdo: proteinasa K) se inhibe *S. mutans* por CECT 9174. En cambio, en el caso de *S. dentisani*, el efecto inhibidor sobre *S. mutans* se ve afectado de manera negativa por la proteinasa k, tal como se describe en [López-López A, Camelo-Castillo A, Ferrer MD, Simon-Soro Á and Look at (2017) Health-Associated Niche Inhabitants as Oral Probiotics: The Case of Streptococcus dentisani. Front. Microbiol. 8: 379. doi: 10.3389 / fmicb.2017.00379]. Este resultado se puede observar cuando se comparan (B) y (C) de la Figura 14. En (B), PBS no impide la actividad inhibidora de *S. dentisani* sobre *S. mutans*, mientras que en (C), la proteinasa K impide la actividad inhibidora de *S. dentisani* sobre *S. mutans*.

Ejemplo 6. Estudio de inhibición/antagonismo:

5 ul de la cepa CECT 9174 se inocularon a una concentración de 1 McFarland en solución salina al 0,9% en placas de BHI y se incubaron en una atmósfera de CO₂ al 5% durante 16 horas; después de este tiempo, la misma cantidad del microorganismo en estudio se inoculó cerca de la colonia y se incubó de nuevo a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% durante 32 horas. Como control de crecimiento, 5 ul de cada uno de los microorganismos testados se incubaron en aislamiento. El resultado del experimento puede observarse en la Figura 15, en la que A) muestra el ensayo de inhibición y B) muestra el control de crecimiento. Tal como muestra en la Figura 15, CECT 9174 inhibe: *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *S. galactiae*, *S. aureus*, *S. warnerii*, *S. mutans*. Esta actividad no se ha descrito en *S. dentisani*.

Ejemplo 7. Inhibición de CECT 9174 sobre *Fusobacterium nucleatum*:

Para evaluar la inhibición de *S. CECT 9174* en placa dental contra *Fusobacterium nucleatum* DMSZ 20482, una suspensión de 0,3 McFarland de *F. nucleatum* se elaboró en placas de BHI (Conda) para obtener un crecimiento "de tipo alfombra". Al mismo tiempo, 10 µl de *S. CECT 9174* se depositaron como un "botón", y la zona de inhibición se evaluó después de la incubación durante 72 horas en una atmósfera anaerobia (H₂ al 10%, CO₂ al 10% y el resto N₂) a 37°C. *S.* Tal como se muestra en la figura 16, CECT 9174 era adecuada para inhibir *F. nucleatum*.

REIVINDICACIONES

- 5
1. Una cepa bacteriana depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo por el *Servicio Galego de Saúde* (SERGAS), el 20 de Julio 2016, con número de acceso CECT 9174.
2. La cepa bacteriana según la reivindicación 1, para su uso como medicamento.
3. La cepa bacteriana según la reivindicación 1, para su uso como medicamento antimicrobiano.
- 10
4. La cepa bacteriana según la reivindicación 1, para su uso en la prevención o el tratamiento terapéutico de las enfermedades infecciosas de la cavidad oral.
- 15
5. La cepa bacteriana según la reivindicación 1, para el uso según la reivindicación 4, en donde la enfermedad infecciosa de la cavidad oral es causada por bacterias Gram-positivas y/o Gram-negativas.
6. La cepa bacteriana según la reivindicación 1, para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 4-5, en donde la enfermedad infecciosa de la cavidad oral es caries y/o enfermedad periodontal.
- 20
7. Un probiótico o una composición alimenticia para uso médico o alimento funcional que comprende la cepa bacteriana según la reivindicación 1.
8. Una composición farmacéutica que comprende la cepa bacteriana según la reivindicación 1.
- 25
9. Una composición de salud oral que comprende la cepa bacteriana según la reivindicación 1.
10. Las composiciones o alimentos funcionales según la reivindicación 7, composición farmacéutica según la reivindicación 8, o la composición de salud oral según la reivindicación 9, para uso en la prevención y/o el tratamiento terapéutico de enfermedades infecciosas de la cavidad oral.
- 30
11. Las composiciones o alimentos funcionales según la reivindicación 7, composición farmacéutica según la reivindicación 8, y/o la composición de salud oral según la reivindicación 9, para su uso según la reivindicación 10, en donde la enfermedad infecciosa de la cavidad oral es caries o enfermedad periodontal.
- 35
12. El método para preparar un sobrenadante que comprende:
- a) cultivar la cepa bacteriana según la reivindicación 1,
- b) centrifugar el cultivo de la etapa a), y
- 40
- c) recuperar el sobrenadante obtenido a partir de la etapa b).

Figura 1



Figura 2

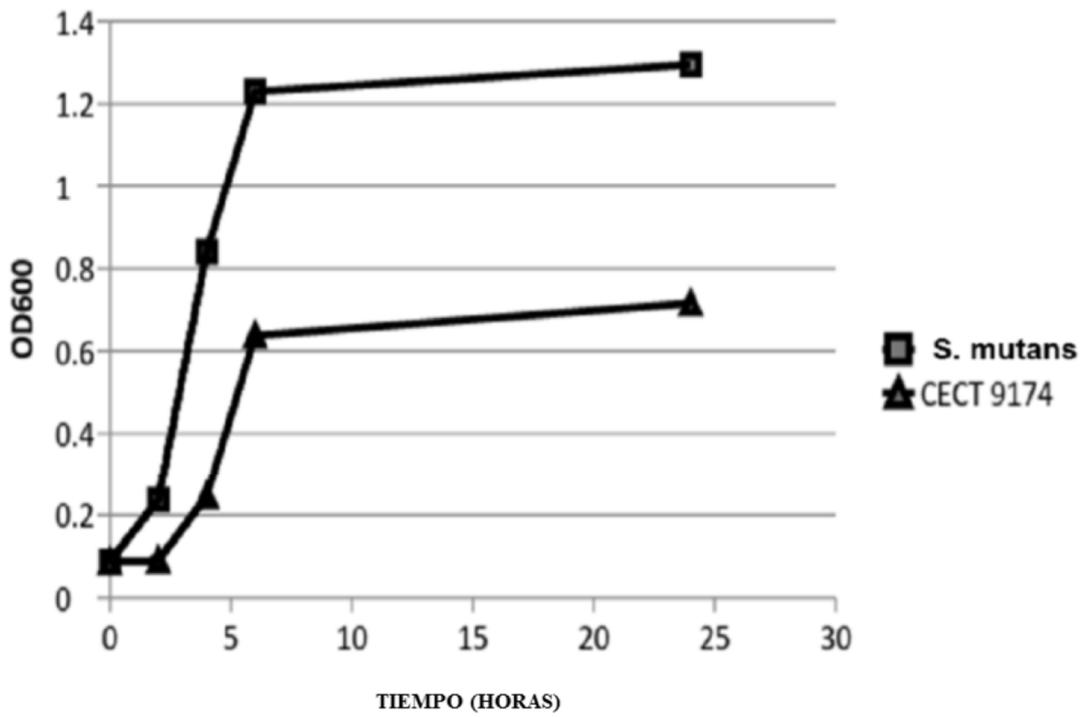


Figura 3

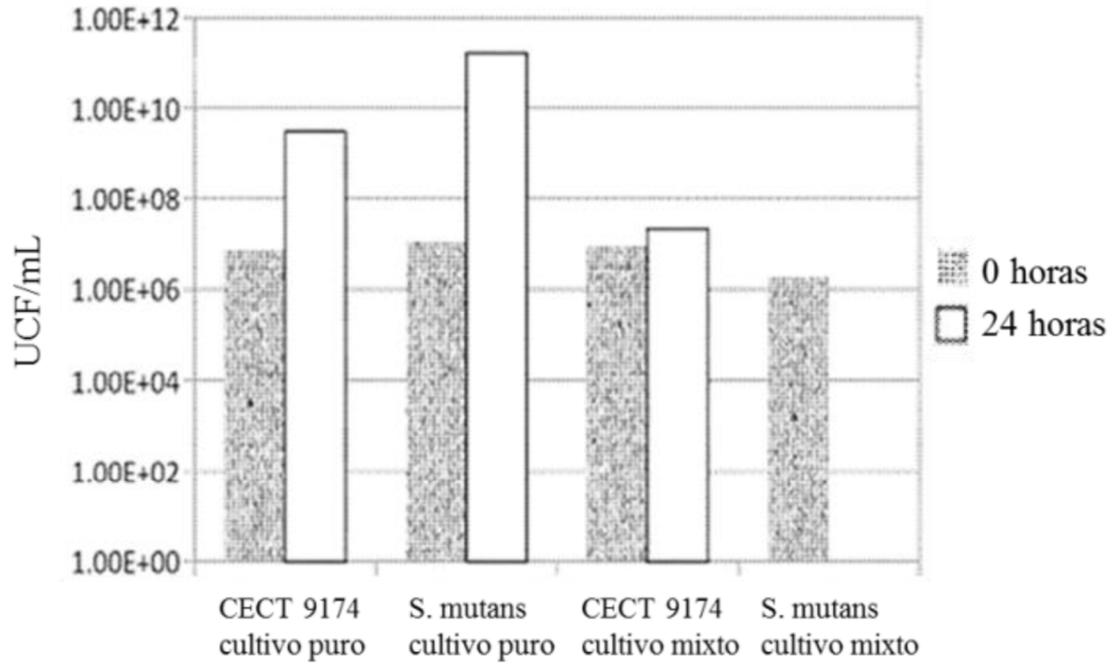


Figura 4

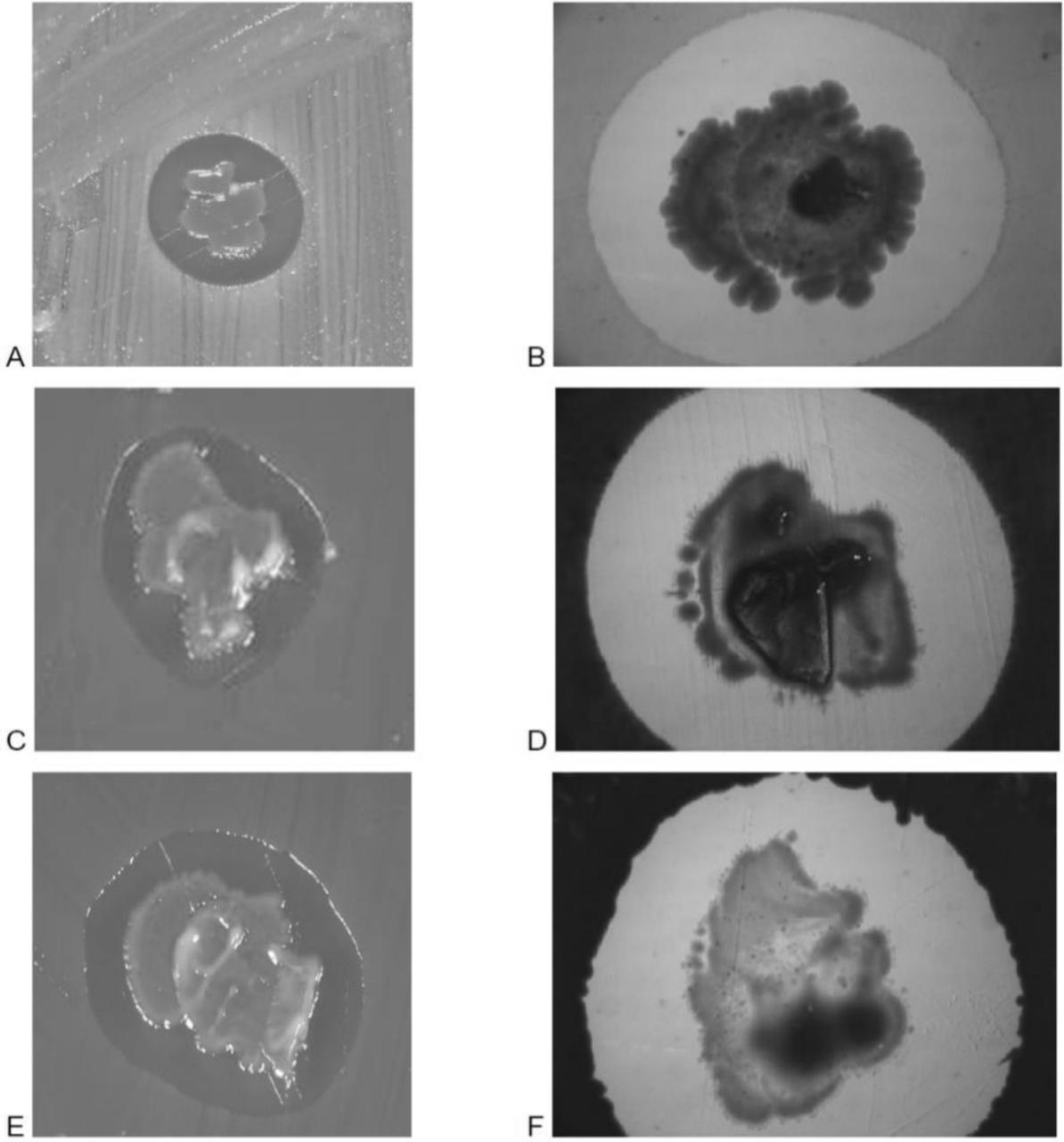


Figura 5

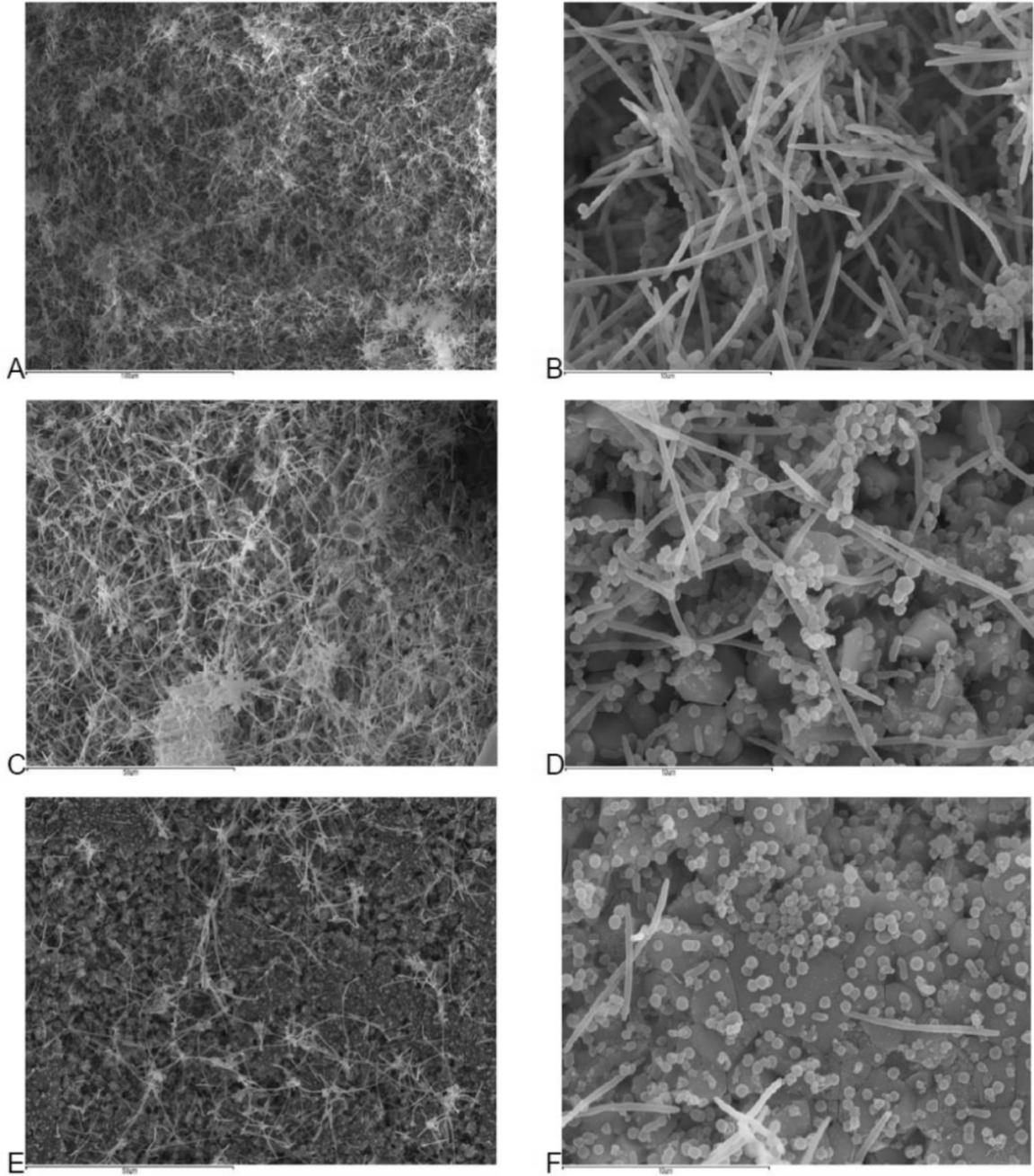


Figura 6

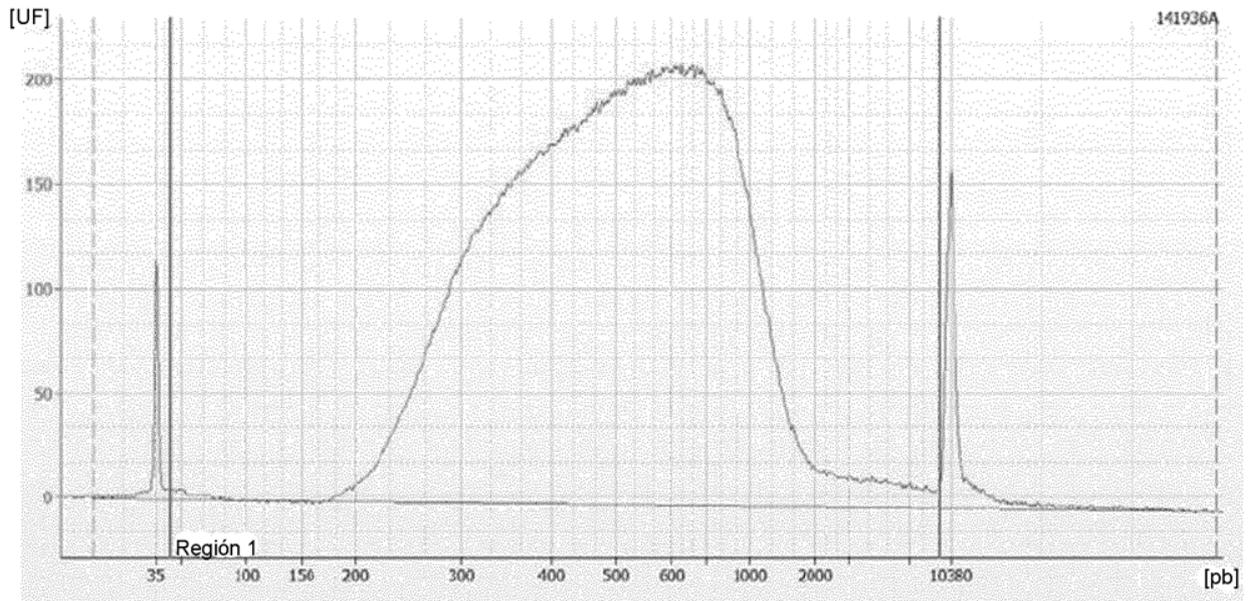


Figura 7. A

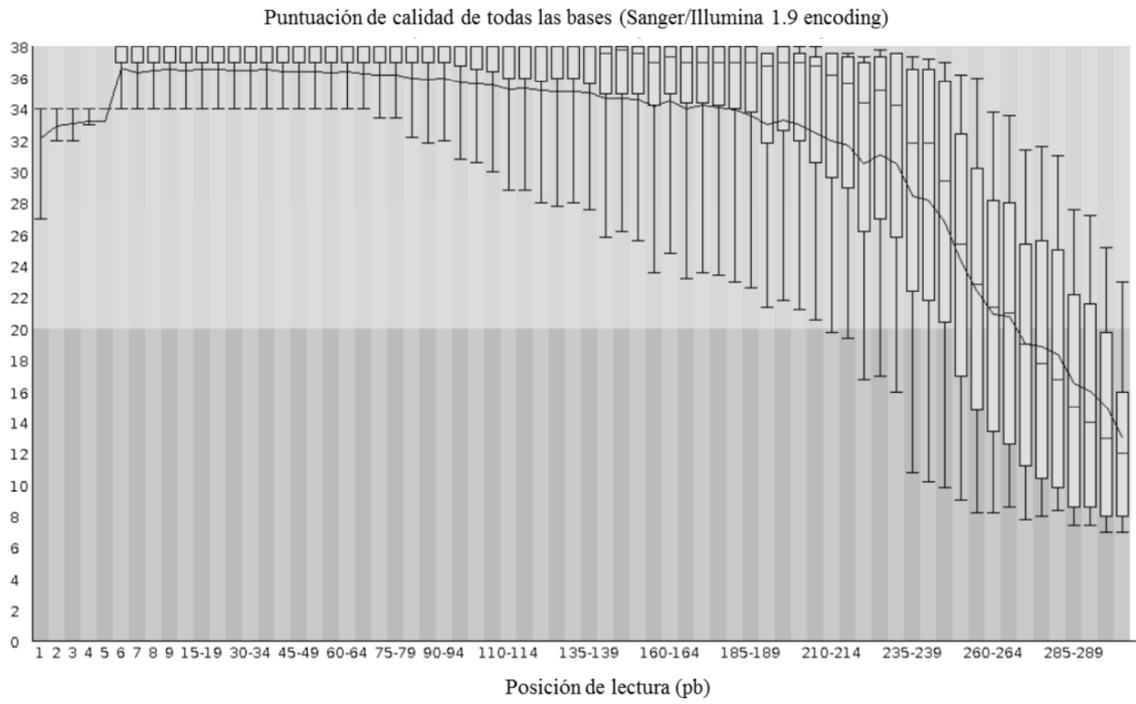
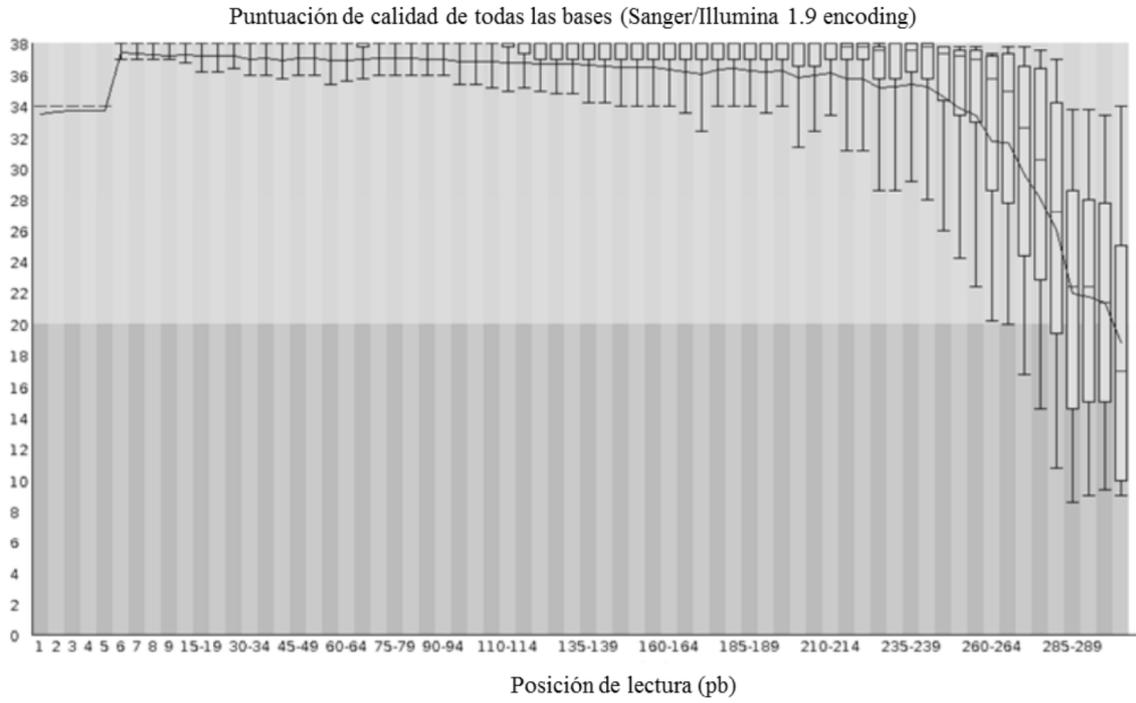


Figura 7. B

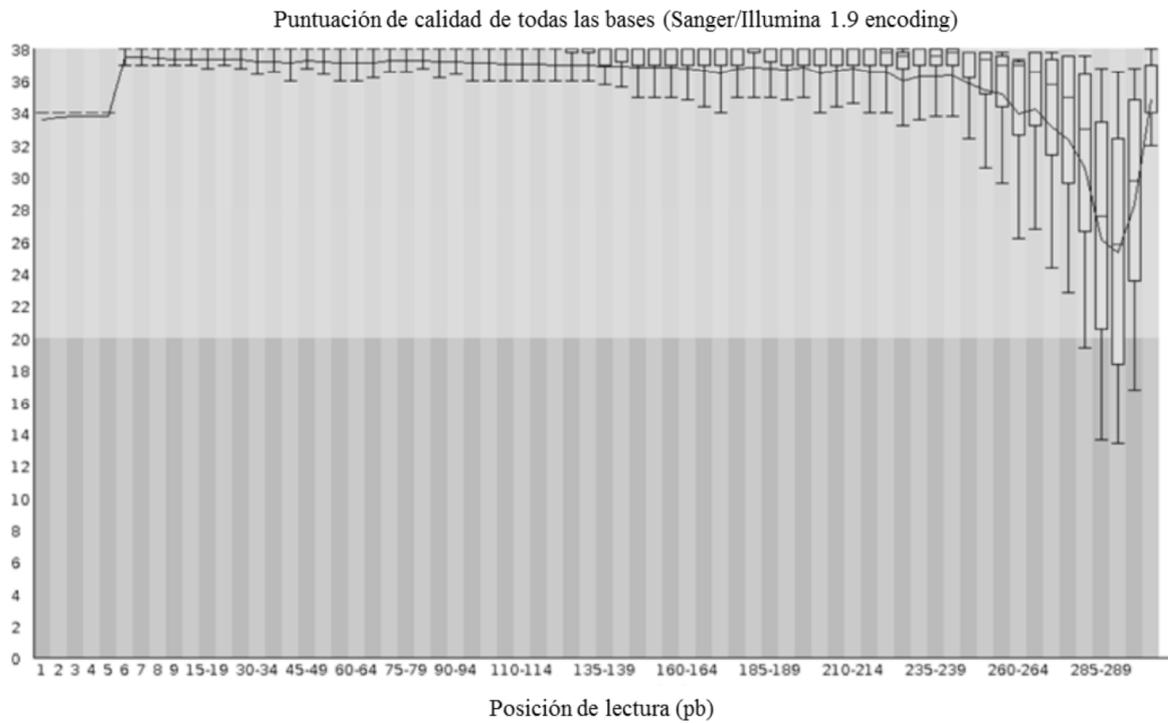
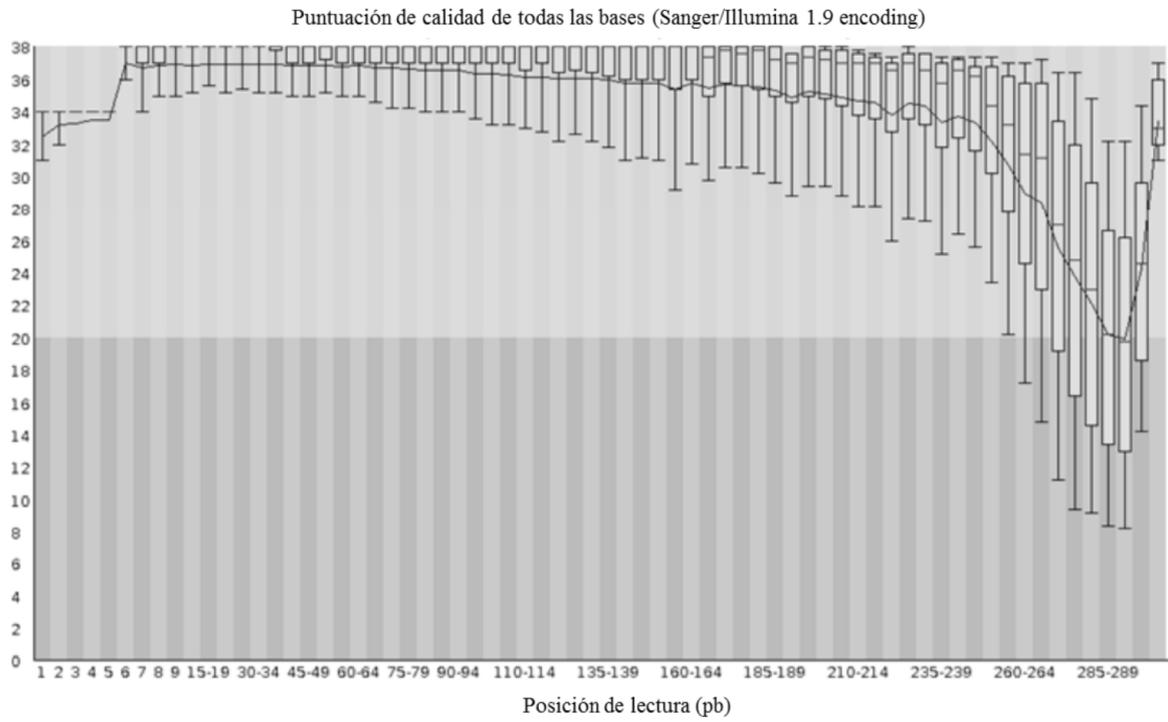


Figura 8. A

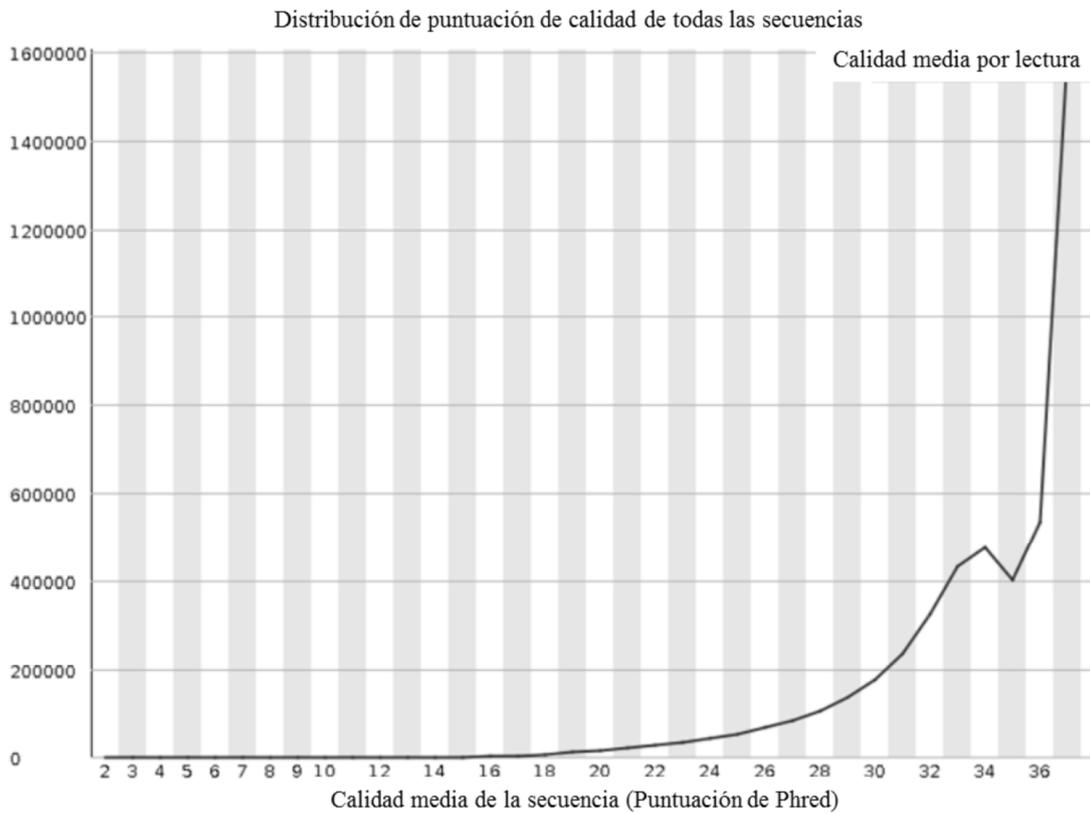
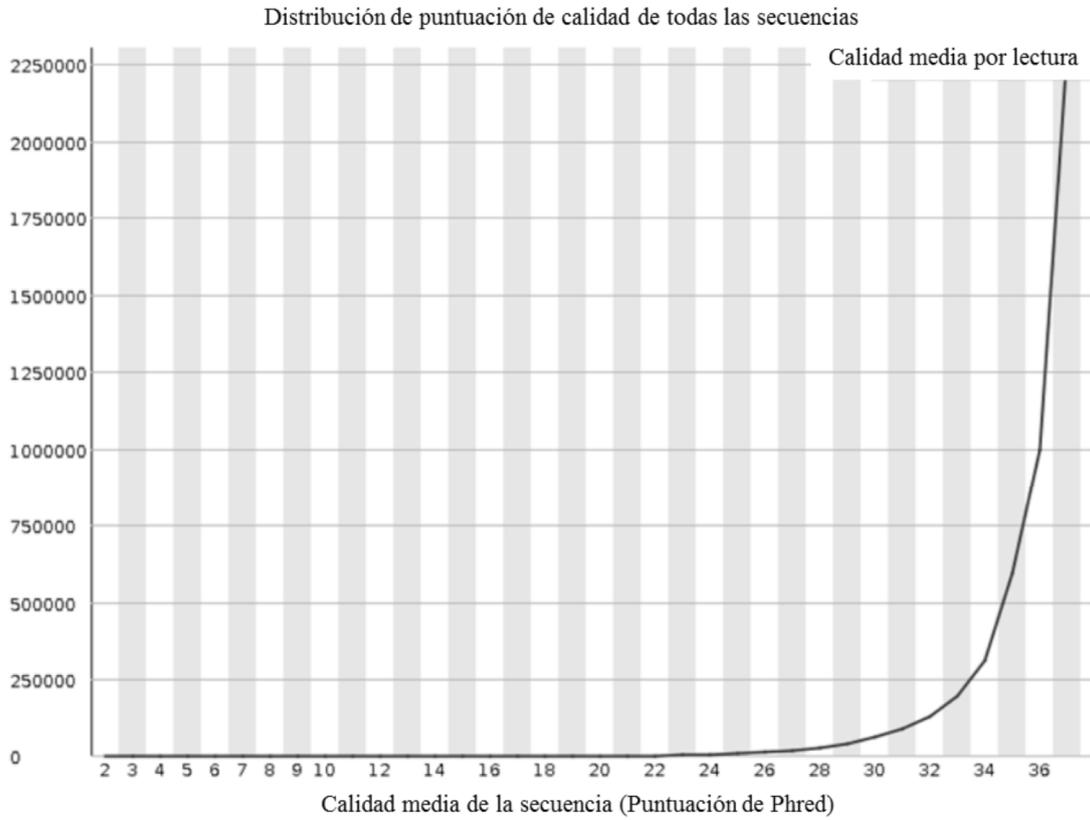


Figura 8. B

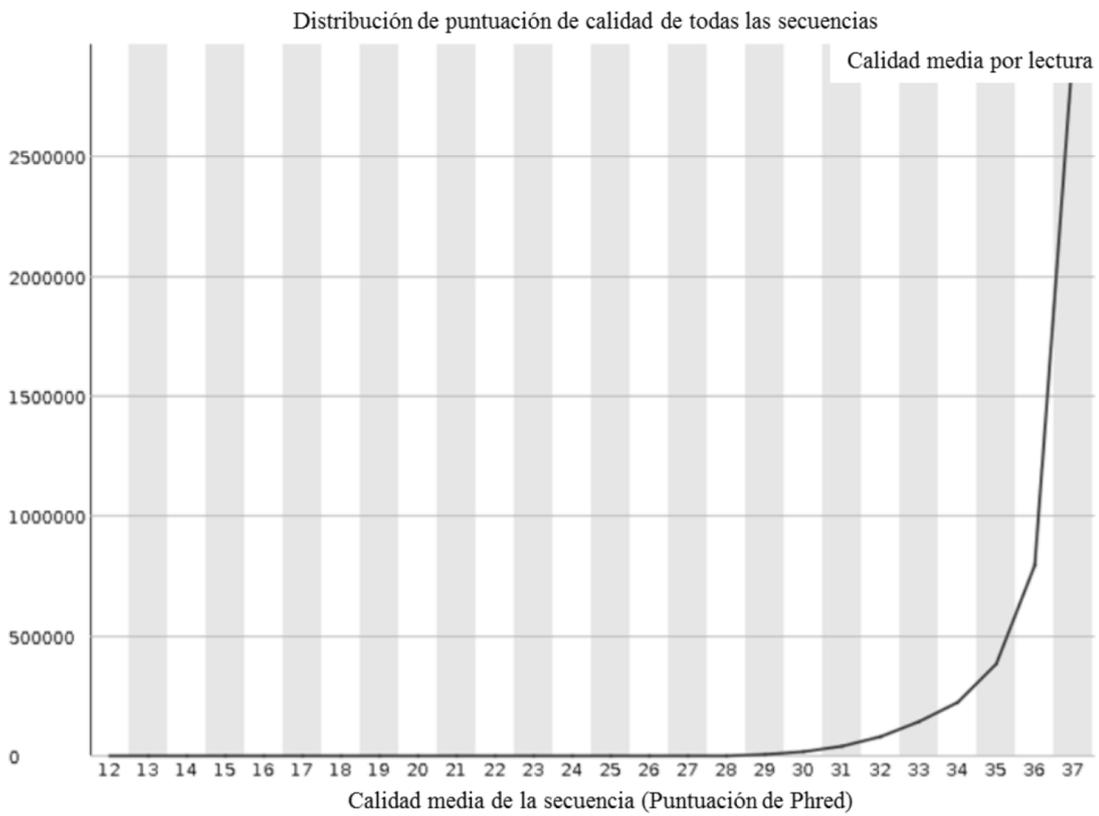
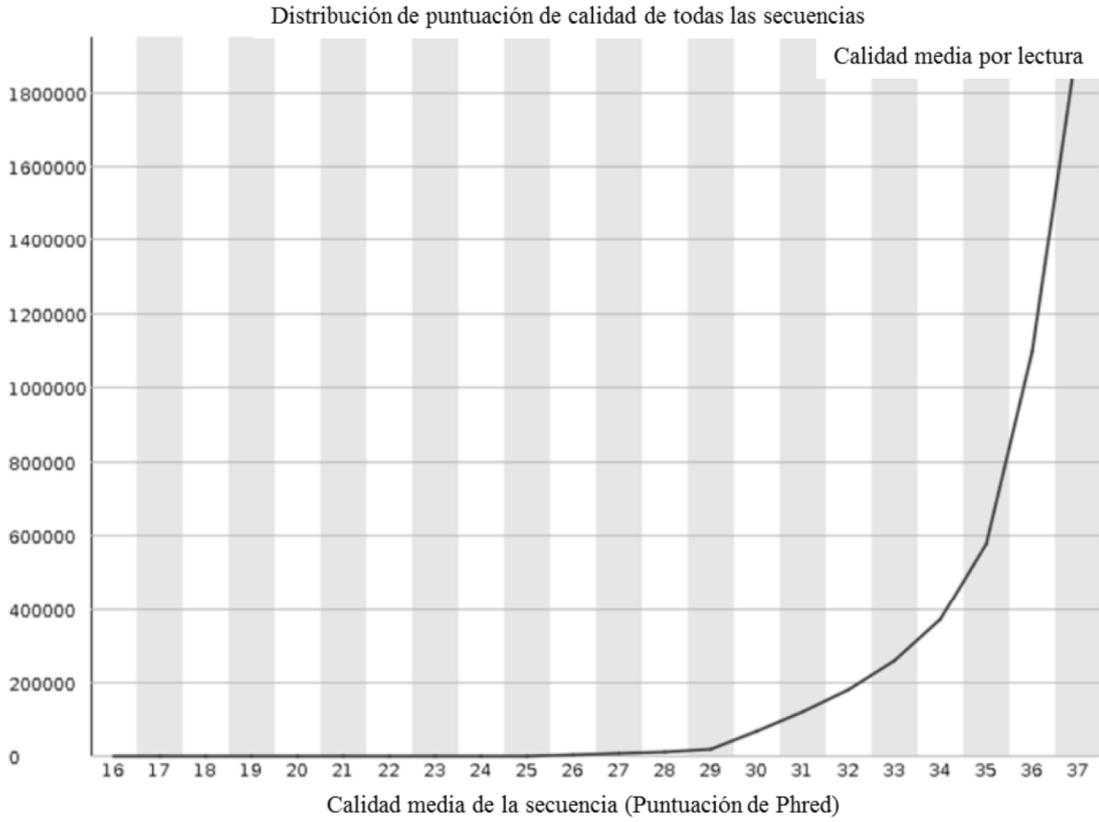


Figura 9. A

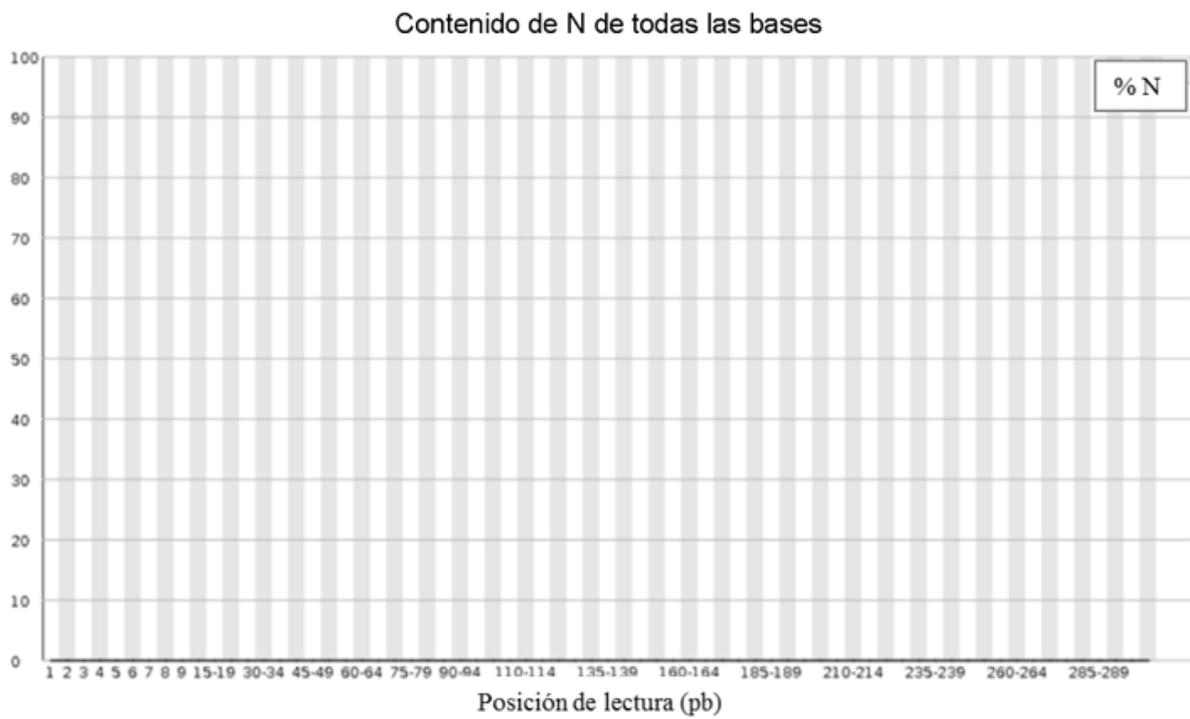
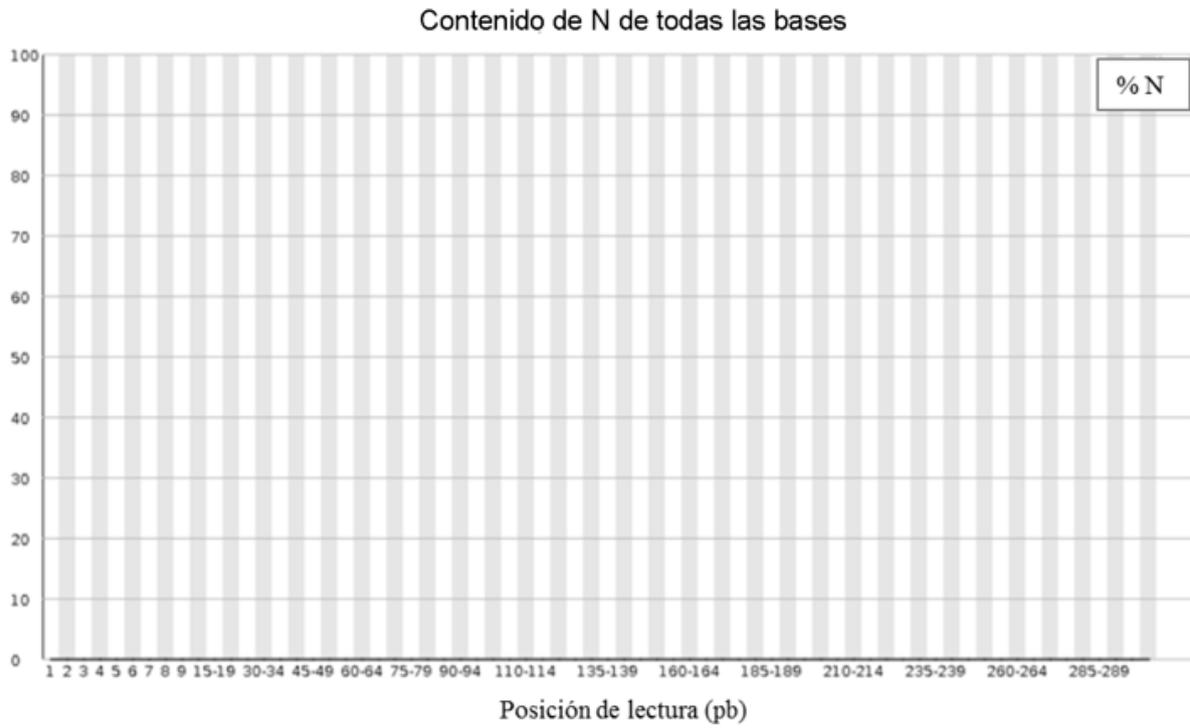


Figura 9. B

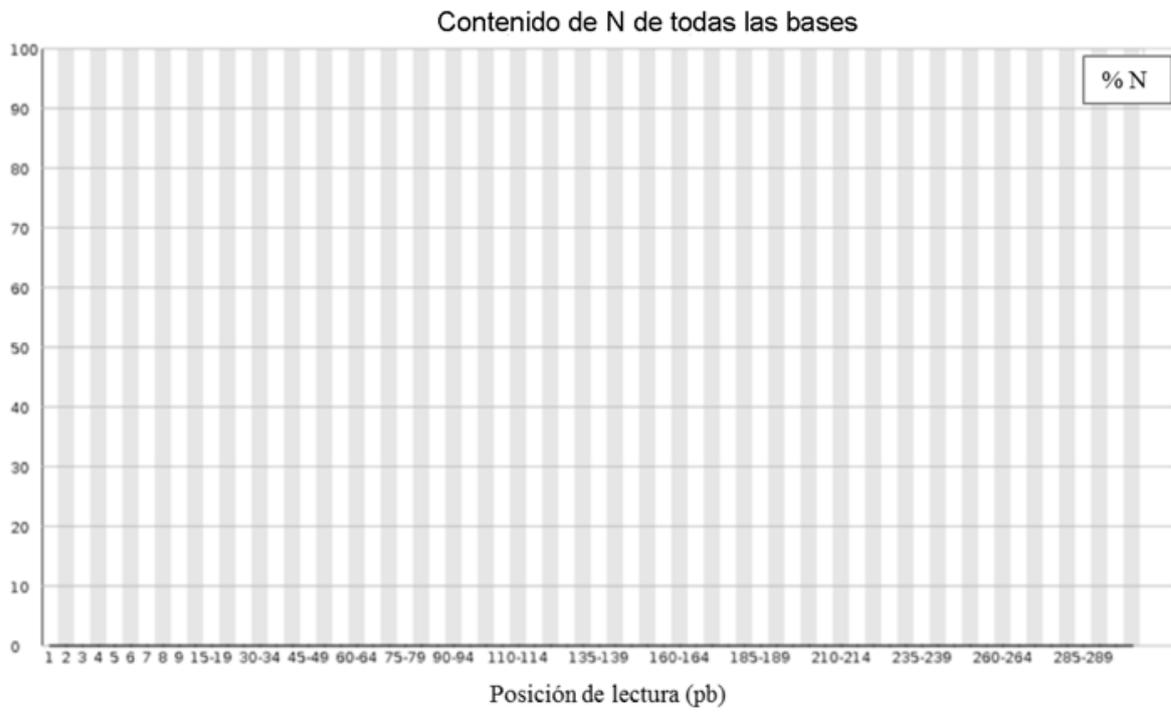
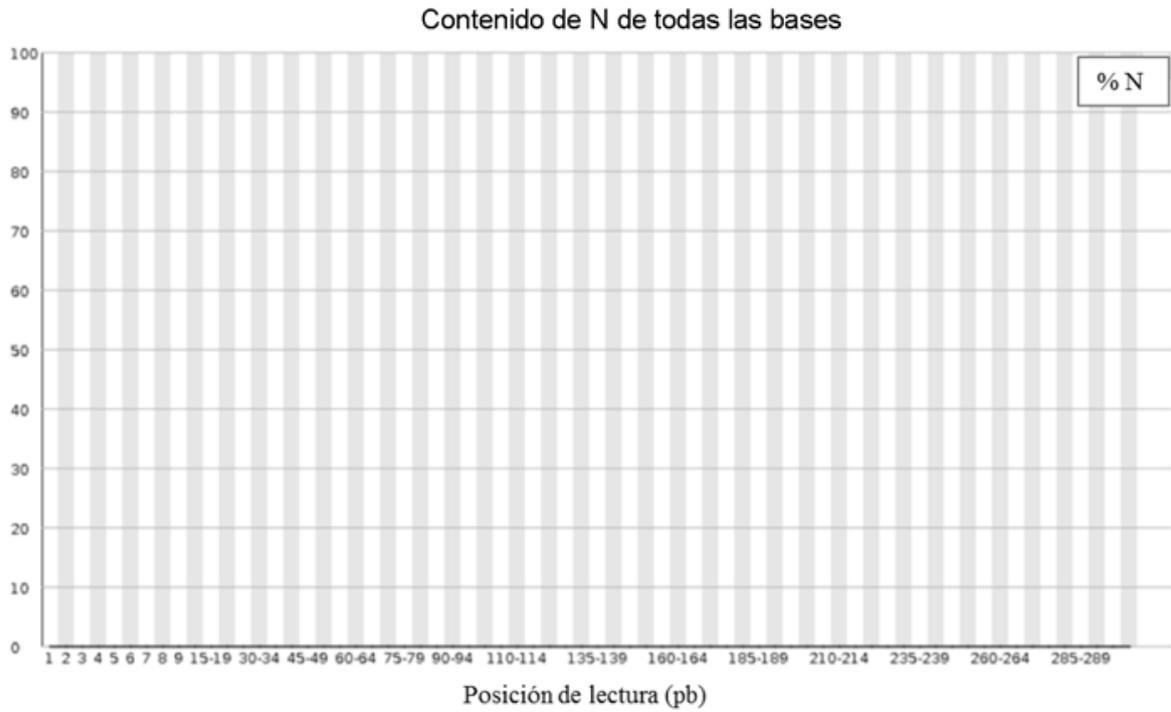


Figura 10. A

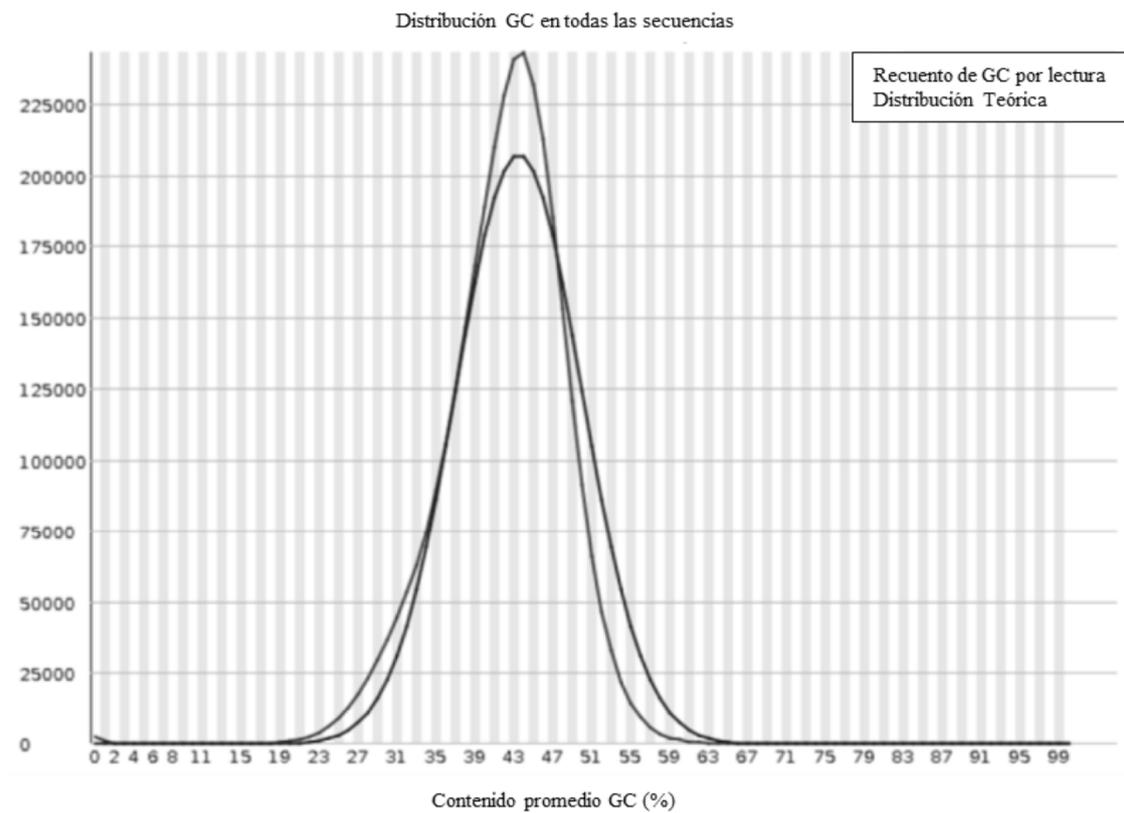
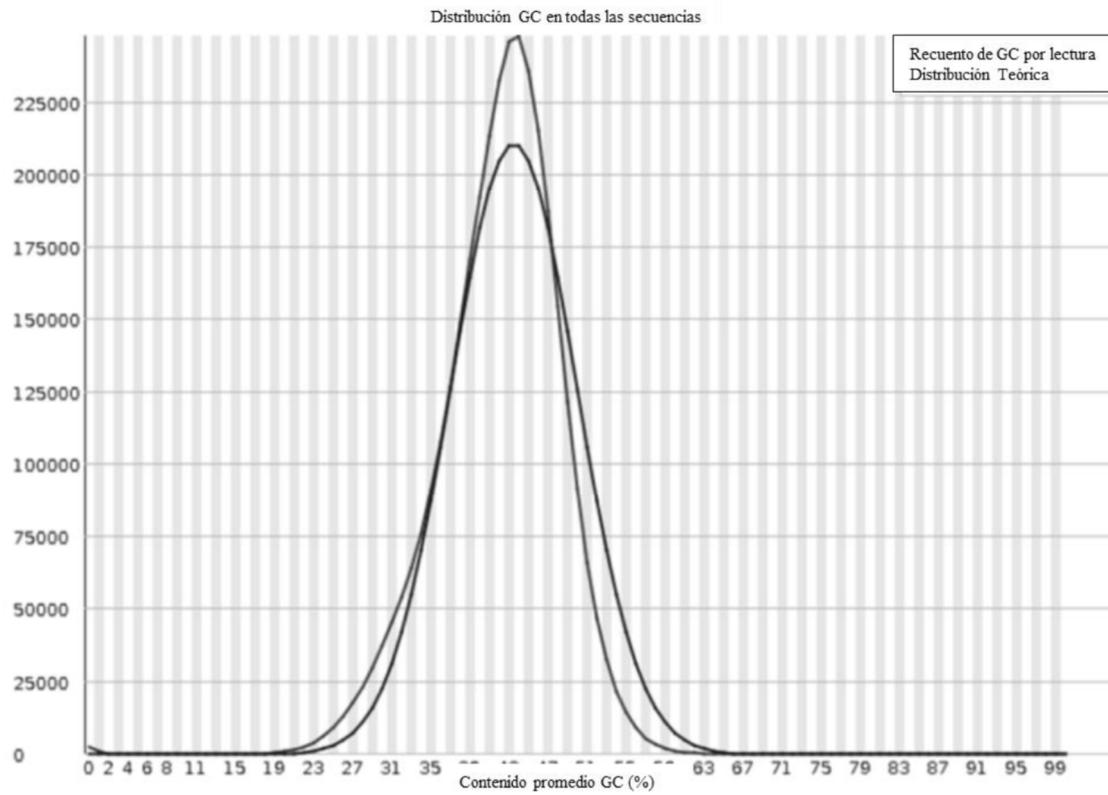


Figura 10. B

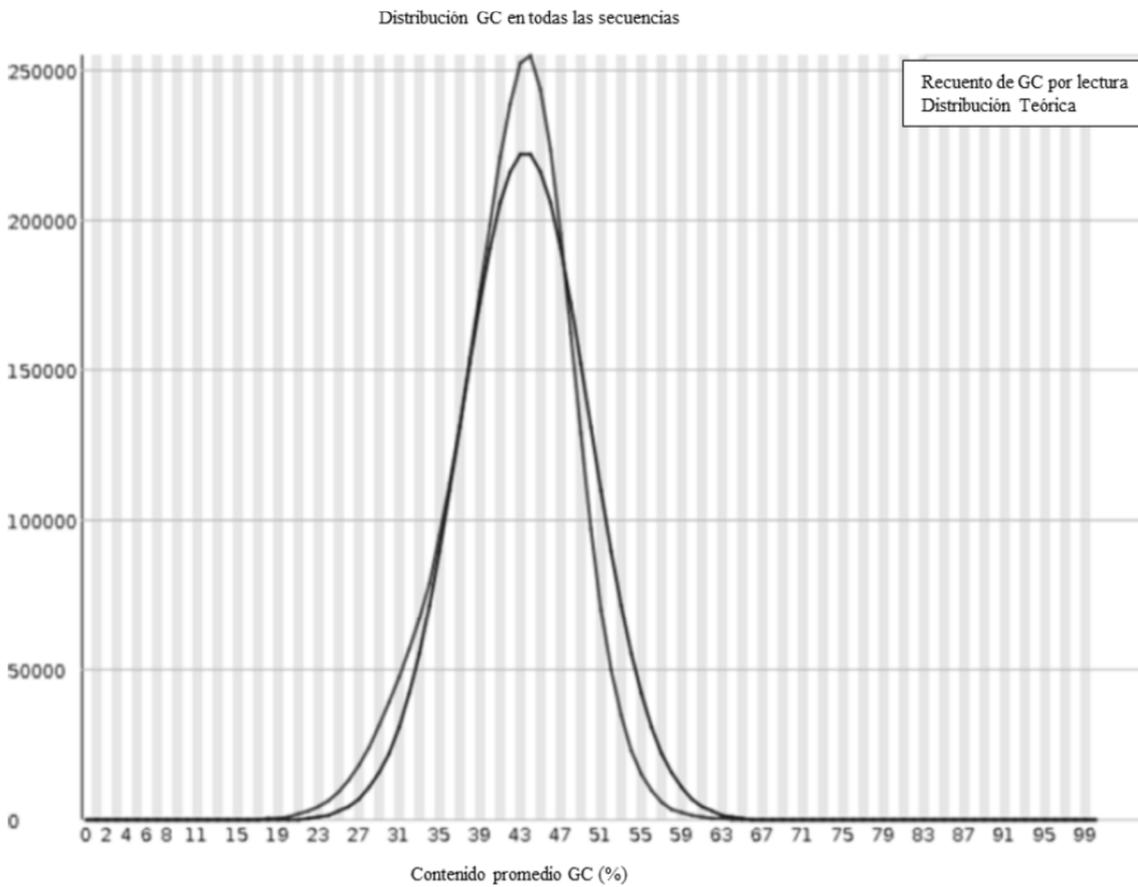
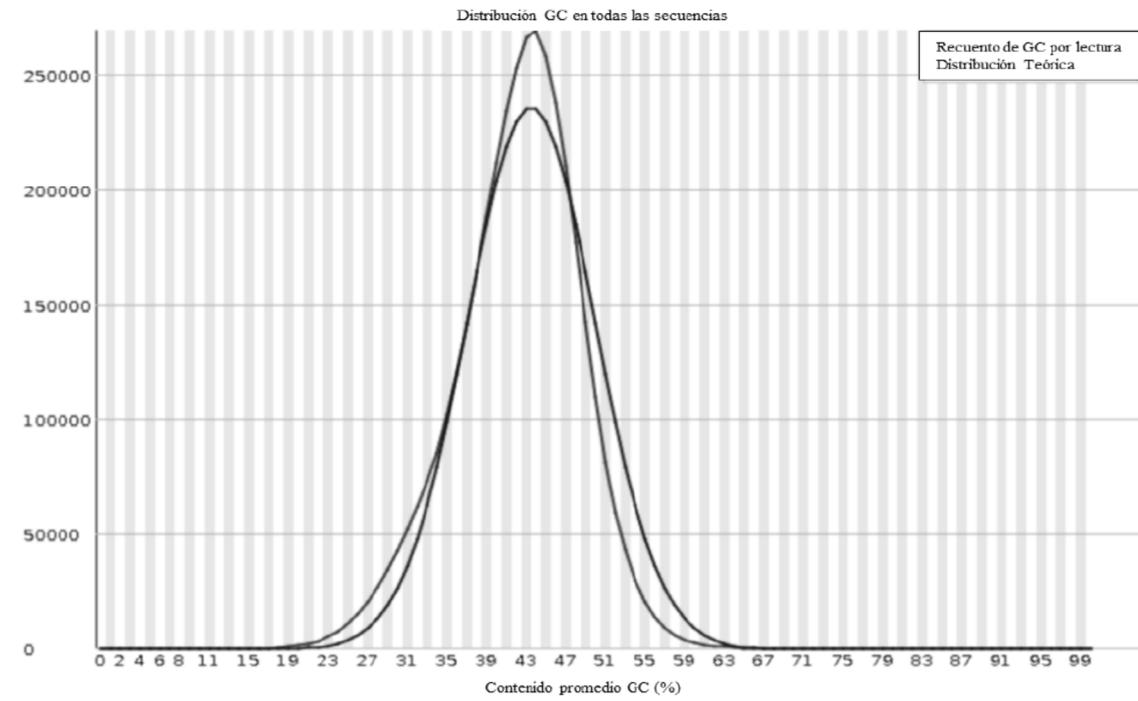


Figura 11

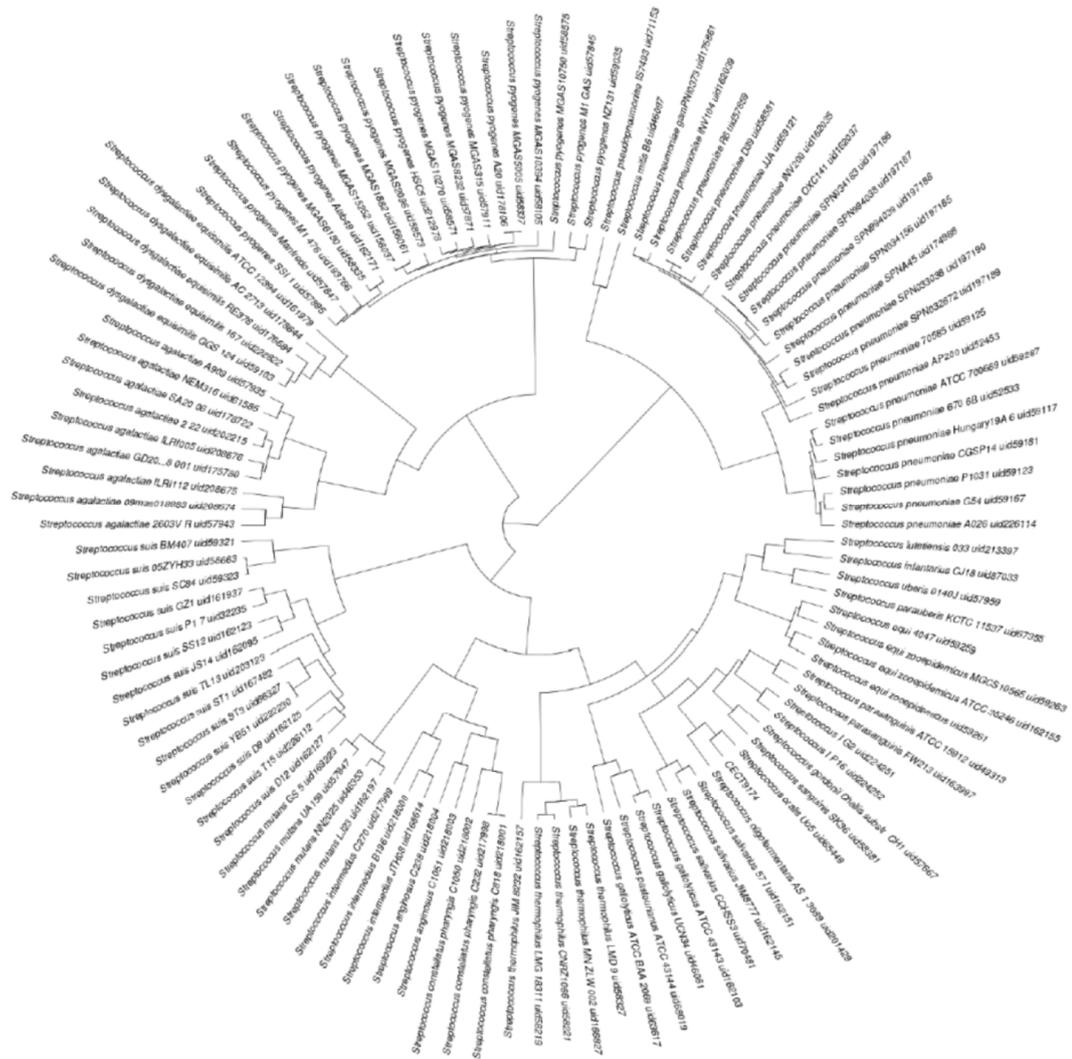


Figura 12

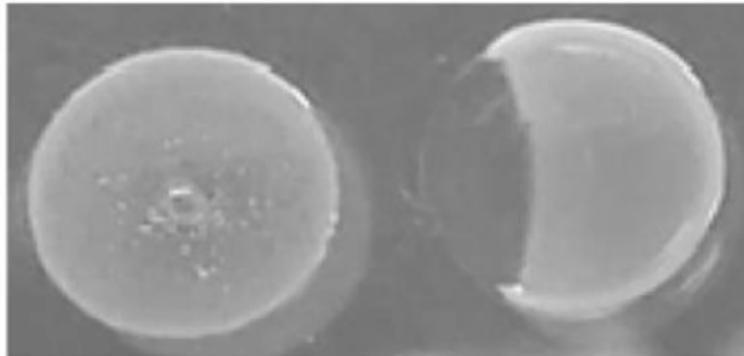


Figura 13

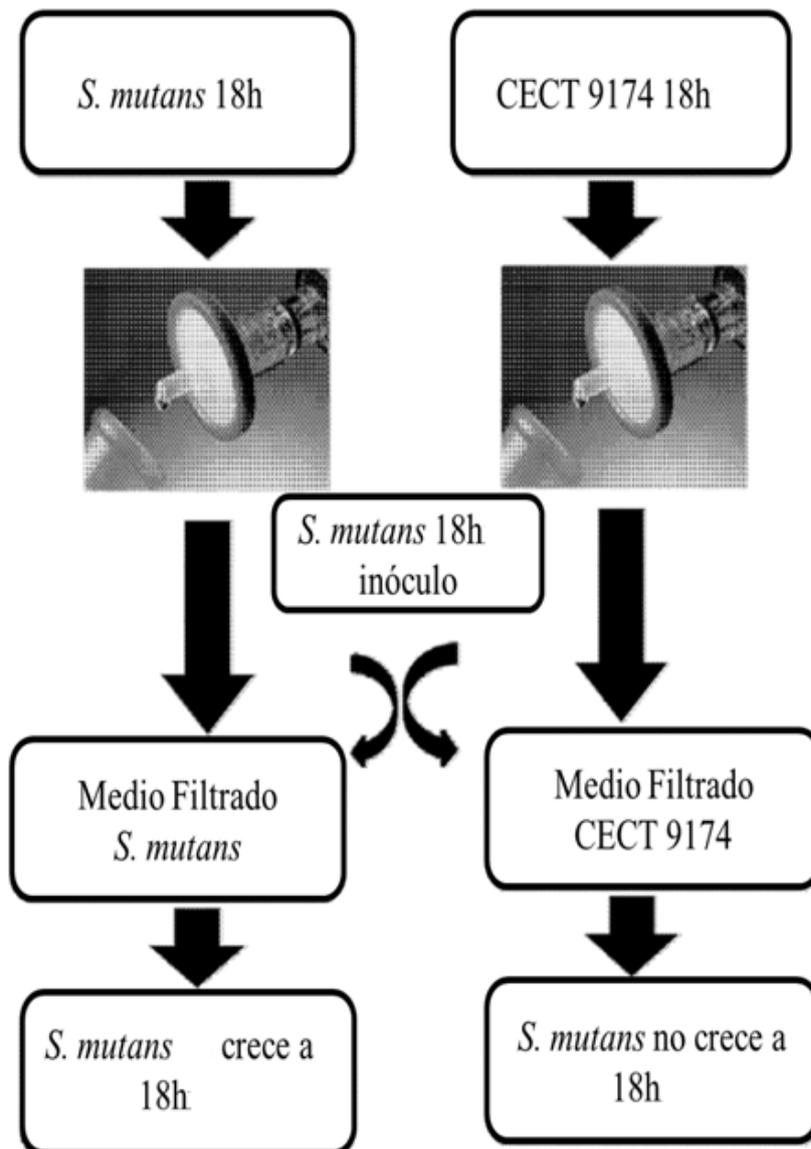


Figura 14

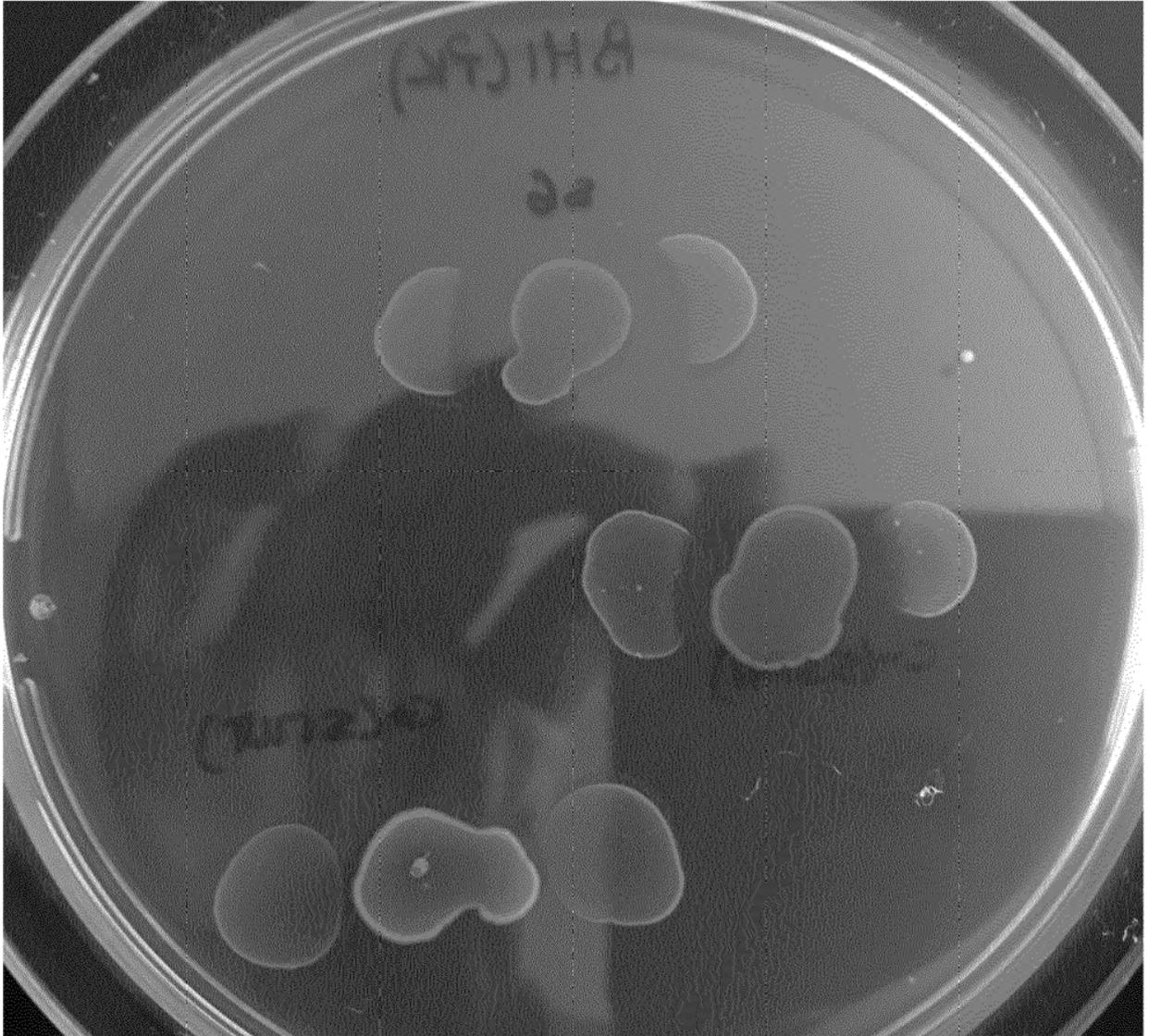


Figura 15

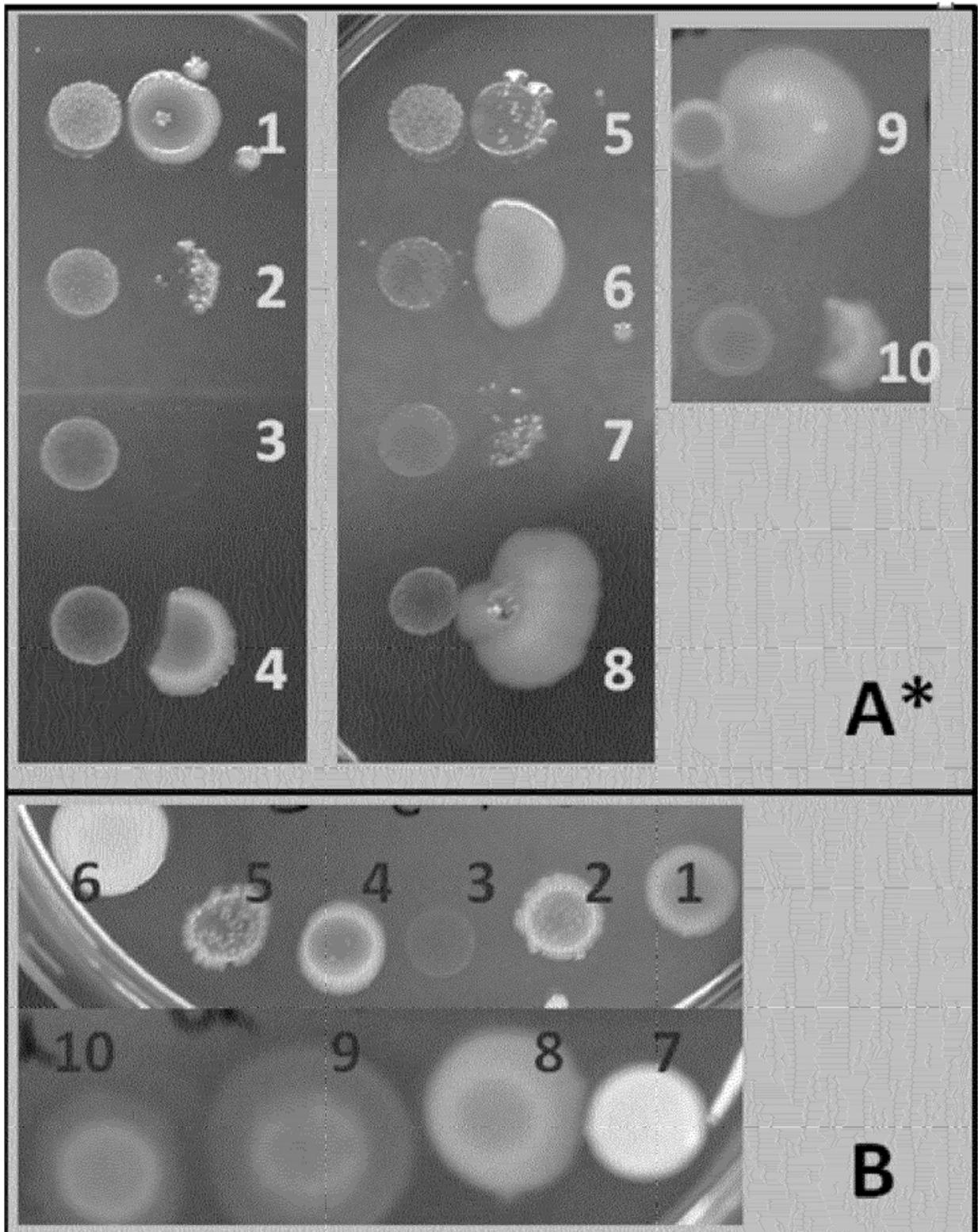


Figura 16

