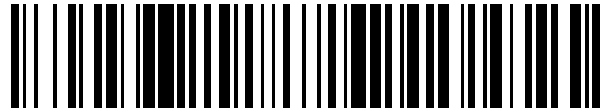


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 403 053**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01)
A61K 8/99 (2006.01)
A61P 1/02 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61Q 1/00 (2006.01)
A61Q 11/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.08.2004 E 04780692 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.01.2013 EP 1659885**

54 Título: **Composiciones para el mantenimiento de la salud bucal**

30 Prioridad:

11.08.2003 US 494169 P

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

13.05.2013

73 Titular/es:

**ORAGENICS, INC. (100.0%)
13700 Progress Boulevard
ALACHUA, FL 32615, US**

72 Inventor/es:

HILLMAN, JEFFREY, D.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 403 053 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

Composiciones para el mantenimiento de la salud bucal

5 Antecedentes de la invención

La caries dental se caracteriza por la disolución de la porción mineral del diente, que puede tener como consecuencia dolor y pérdida de viabilidad del diente, la necesidad de una reparación costosa o la extracción del diente. La caries dental afecta al 50 % de niños de 5-9 años de edad, al 67 % de adolescentes de 12-17 años de edad y al 94 % de los adultos \geq 18 años de edad en los Estados Unidos (Morbidity and Mortality Weekly Reports 51: 144-147, 2002). Los dientes limpios no tienen caries; no obstante, incluso con una limpieza vigorosa es difícil mantener los dientes lo suficientemente limpios. Se han desarrollado diversos procedimientos para prevenir o aliviar la caries dental que incluyen, por ejemplo, la adición de fluoruro de sodio, silicofluoruro de sodio o ácido hidrofluosilícico a agua de bebida y fluoruro de sodio o fluoruro de estaño a preparaciones de uso tópico, que incluyen dentífricos y enjuagues bucales. Se ha usado la prevención de caries mediante recubrimiento del diente con materiales poliméricos o sellantes; estas técnicas, sin embargo, son costosas, requieren el grabado de los dientes con ácido fosfórico y puede ser eficaz solo en niños pequeños que todavía no hayan desarrollado caries. También se han propuesto agentes antibacterianos, incluidos antibióticos, como tratamiento para la caries dental. Los antibióticos destruyen los microorganismos que son responsables de la producción de ácido en la boca tales como *Streptococcus mutans*, pero los antibióticos no son selectivos a la hora de destruir la flora bacteriana y también destruyen bacterias beneficiosas presentes en la cavidad bucal. Esto puede provocar un desequilibrio microbiano en la boca, que puede tener consecuencias graves. Por lo tanto, se necesitan en la técnica procedimientos más eficaces para el tratamiento y la prevención de la caries dental.

25 El *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Aa) es el agente etiológico principal de la periodontitis de aparición temprana incluidas la periodontitis prepuberal localizada y generalizada, la periodontitis juvenil localizada y generalizada y la periodontitis adulta rápidamente progresiva o refractaria. La pérdida del diente es el efecto perjudicial último de la enfermedad periodontal destructiva. Una encuesta nacional en los Estados Unidos reveló una prevalencia de periodontitis juvenil localizada del 0,53 % y de periodontitis juvenil generalizada del 0,13 %. Loe y Brown, J. Periodontol. 62:608-616 (1991). Los hallazgos de varios estudios corroboran la conclusión de que la enfermedad de aparición temprana es similar en otros países industrializados y es más frecuente en países desarrollados. Loe y Brown, J. Periodontol. 62:608-616 (1991).

35 Además, determinados tipos de periodontitis adulta, que en general son afecciones muy comunes que afectan a más de la mitad de la población adulta, está provocados, probablemente, por un grupo selecto de microorganismos indígenas de la cavidad bucal. Estos incluyen Aa, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus*, *Treponema denticola*, *Campylobacter rectus* y *Eikenella corrodens*.

40 Existen terapias mecánicas, quirúrgicas y con antibióticos para el tratamiento de diversos tipos de periodontitis, pero no existen medios para su prevención. Se ha usado ampliamente la tetraciclina en el tratamiento de periodontitis de aparición temprana. Persiste la preocupación, no obstante, de cepas que desarrollan resistencia a la tetraciclina, así como la posibilidad de proliferación excesiva de otros microorganismos patógenos. Dado el caso de enfermedades periodontales, se necesitan en la técnica estrategias de prevención y de tratamiento seguras. El control de la enfermedad periodontal también es muy importante a la luz de la atención reciente al papel posible de infecciones periodontales como factores de riesgo para enfermedades sistémicas (por ejemplo, enfermedades coronarias). Por lo tanto, se necesitan en la técnica procedimientos de tratamiento y prevención de periodontitis de aparición temprana, periodontitis juvenil localizada y generalizada y periodontitis adulta rápidamente progresiva o refractaria.

50 Breve resumen de la invención

La presente invención proporciona combinaciones y composiciones para el mantenimiento de la salud bucal, tales como el tratamiento y/o la prevención de periodontitis, caries dental, proliferación excesiva de *Candida* o fúngica en la cavidad bucal, halitosis, caries dental inducida por xerostomía, infecciones o enfermedades bacterianas bucales y heridas bucales. En una realización la invención proporciona probióticos para el mantenimiento de salud bucal.

55 Los probióticos son microorganismos de cultivo único o mixto viables que cuando se administran a animales o humanos, afectan beneficiosamente a su huésped mejorando las propiedades de la microflora indígena. Tradicionalmente, el uso de probióticos se ha enfocado en la categoría general de salud gastrointestinal, pero el enfoque de usar organismos beneficiosos se ha sugerido para prevenir o tratar otras afecciones, incluida la administración para mantener la salud vaginal y del aparato urinario. En la presente invención se usan probióticos para mantener la salud bucal.

65 Una realización de la invención proporciona una composición que comprende una o más cepas de *Streptococcus oralis* aisladas y una o más cepas de *S. uberis* aisladas combinadas con una o más cepas de *Streptococcus mutans* aisladas deficientes en lactato deshidrogenasa. Las cepas de *Streptococcus mutans* pueden ser una o más cepas deficientes en LDH de *S. rattus*, *S. cricetus*, *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. downei*, *S. macacae* y *S. ferus*. La

composición puede comprender también un vehículo. La cepa de *Streptococcus mutans* puede ser una cepa de origen natural o una cepa modificada genéticamente deficiente en lactato deshidrogenasa. Una cepa de *Streptococcus mutans* puede ser, por ejemplo, una cepa JH145 de *S. rattus*. Una cepa de *S. oralis* puede ser, por ejemplo, la cepa KJ3 o KJ3sm de *S. oralis*. Una cepa de *S. uberis* puede ser, por ejemplo, KJ2 o KJ2 sm.

5 También se describe en el presente documento una composición alimentaria que comprende una o más cepas de *S. oralis* aisladas y una o más cepas de *S. uberis* aisladas y una o más cepas de *Streptococcus mutans* aisladas, en la que las cepas de *Streptococcus mutans* son deficientes en lactato deshidrogenasa.

10 Otra realización más de la invención proporciona un dentífrico, goma de mascar, pastilla para chupar, enjuague bucal o composición de agente de uso tópico que comprende una o más cepas de *S. oralis* aisladas y una o más cepas de *S. uberis* aisladas y una o más cepas de *Streptococcus mutans* aisladas, en los que las cepas de *Streptococcus mutans* son deficientes en lactato deshidrogenasa.

15 Otra realización más de la invención proporciona la composición de la invención para su uso en el mantenimiento de la salud bucal de un sujeto. La composición puede administrarse al sujeto aproximadamente una vez al día, aproximadamente una vez a la semana o aproximadamente una vez al mes. El sujeto puede ser un mamífero, tal como un ser humano. El mantenimiento de la salud bucal puede comprender el tratamiento, la prevención o el tratamiento y la prevención de periodontitis, caries dental, proliferación de *Candida* o fúngica, halitosis, caries dental o periodontitis inducida por xerostomía, infecciones o enfermedades bacterianas bucales, heridas bucales o una combinación de las mismas.

20 Otra realización más de la invención proporciona una combinación que comprende una o más cepas aisladas de *S. oralis* y/o una o más cepas aisladas de *S. uberis* y una o más cepas de *Streptococcus mutans* aisladas, en la que las cepas de *Streptococcus mutans* son deficientes en lactato deshidrogenasa para su uso en colonizar de forma no persistente una cavidad bucal de un sujeto con bacterias terapéuticamente eficaces. El sujeto puede ser un mamífero, tal como un ser humano.

30 Por lo tanto, la invención proporciona combinaciones y composiciones para el mantenimiento de la salud bucal, que incluye, por ejemplo, la prevención y/o el tratamiento de caries dental, periodontitis, proliferación de *Candida* o fúngica, halitosis, caries dental o enfermedad periodontal inducida por xerostomía, infecciones o enfermedades bacterianas bucales, heridas bucales o una combinación de las mismas.

Breve descripción de los dibujos

35 La figura 1 muestra los resultados de la administración del tratamiento diario con JH145.

Las figuras 2A-2C muestran la comparación de un gen JH145 *ldh* de *S. mutans* con un gen BHT-2 *ldh* de *S. mutans* y las secuencias de proteínas correspondientes.

40 Descripción detallada de la invención

45 Los probióticos pueden definirse como la administración de microorganismos vivos en cantidades adecuadas para conferir un beneficio a la salud del huésped. Aunque se desarrollaron originalmente para "salud intestinal", los probióticos se están investigando ahora en modulación del sistema inmunitario, salud vaginal y del aparato urinario, alergias, trastornos inflamatorios e hipertensión. Las bacterias son habitantes normales del organismo de seres humanos y la cavidad bucal proporciona un nicho ecológico para más de 300 especies de bacterias. Las interacciones microbianas son, lógicamente, de gran importancia en el control de la ecología de la placa dental y, por lo tanto, de su consecuencia: salud o enfermedad bucal. Un enfoque preventivo es promover la colonización y la proliferación de especies protectoras del establecimiento de una flora microbiana que se incline a favor de la salud. Los efectos beneficiosos pueden implicar la producción de una(s) enzima(s) o metabolito(s) específicos, o el organismo probiótico puede provocar también que el cuerpo produzca la acción beneficiosa. También puede lograrse un efecto beneficioso mediante la inhibición de colonización o multiplicación de un microorganismo patógeno por medio de la competición por nutrientes o sitios de unión.

55 La invención proporciona combinaciones y sistemas terapéuticos para el mantenimiento de la salud bucal que incluyen, por ejemplo, el tratamiento y/o la prevención de caries dental, periodontitis, infecciones y enfermedades bacterianas bucales, heridas bucales, proliferación de *Candida* o fúngica, halitosis, caries dental o enfermedad periodontal inducida por xerostomía, la promoción de cicatrización de heridas o una combinación de las mismas en un sujeto. Una composición de la invención comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más cepas aisladas de *Streptococcus mutans* deficiente en LDH en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más cepas aisladas de *S. oralis* y/o una o más cepas aisladas de *S. uberis*.

Streptococcus oralis y *Streptococcus uberis*

65 El *Streptococcus oralis* (conocido anteriormente como *S. sanguis* de tipo II) y *S. uberis* son componentes

importantes para mantener el equilibrio saludable normal de microorganismos que componen la flora periodontal. Véase, Socransky y col., Oral Microbiol. Immunol. 3:1-7 (1988); Hillman y Shivers, Arch. Oral. Biol., 33:395-401 (1988); Hillman y col., Arch. Oral. Biol., 30:791-795 (1985). El *S. oralis* produce peróxido de hidrógeno, que puede inhibir los patógenos periodontales tales como *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Aa), *Bacteroides forsythus* y *P. intermedia*. Por lo tanto, el *S. oralis* y el *S. uberis* pueden ser útiles en el mantenimiento de la salud bucal. Las composiciones de la invención comprenden una o más cepas aisladas de *S. oralis*, por ejemplo, ATCC 35037, ATCC 55229, ATCC 700233, ATCC 700234 y ATCC 9811. Otra cepa de *S. oralis* incluye KJ3 y KJ3sm. KJ3sm es una variante genética de origen natural de KJ3 que es resistente a la estreptomina. La resistencia a la estreptomina es ventajosa debido a que proporciona un marcador para un aislamiento sencillo de las bacterias. Adicionalmente, las cepas resistentes a la estreptomina se atenúan ligeramente y no sobreviven tanto en la cavidad bucal como las cepas de tipo silvestre. Esta propiedad es útil cuando el objetivo sea colonizar de forma no persistente la cavidad bucal de un animal con las bacterias.

Se ha observado que *S. uberis* en la placa se correlaciona con la salud periodontal, en particular interfiriendo con la colonización por patógenos periodontales tales como *Porphyromonas gingivalis*, *Campylobacter recta* y *Eikenella corrodens*. Las composiciones de la invención pueden comprender una o más cepas aisladas de *S. uberis*, por ejemplo, ATCC 13386, ATCC 13387, ATCC 19435, ATCC 27958, ATCC 35648, ATCC 700407, ATCC 9927, cepa KJ2 o cepa KJ2sm. KJ2sm es una variante genética de origen natural de KJ2. Es resistente a la estreptomina y proporciona las mismas ventajas que las cepas resistentes a la estreptomina de *S. oralis*. Una o más cepas aisladas de *S. oralis* o una o más cepas aisladas de *S. uberis*, o ambas, pueden usarse en composiciones de la invención.

Streptococcus mutans

Las composiciones de la invención comprenden una o más especies bacterianas *Streptococcus mutans* aisladas deficientes en la producción de ácido láctico. Estas cepas incluyen, por ejemplo, *S. rattus*, *S. cricetus*, *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. downeii*, *S. macacae* y *S. ferus*. Una cepa de *Streptococcus mutans* de la invención no produce sustancialmente L(+) lactato deshidrogenasa (LDH). Dicha cepa se denomina cepa deficiente en LDH. Una cepa deficiente en LDH de *Streptococcus mutans* produce el 75 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % menos ácido láctico que las cepas de tipo silvestre de *Streptococcus mutans*. Una cepa de *Streptococcus mutans* deficiente en LDH puede ser una cepa de origen natural de *Streptococcus mutans* o una cepa modificada genéticamente de *Streptococcus mutans*. El *Streptococcus mutans* deficiente en LDH puede competir con y/o desplazar bacterias patógenas tales como *S. mutans*, un agente etiológico principal de caries dental, en la cavidad bucal. Las cepas de *Streptococcus mutans* deficientes en LDH competirán con *S. mutans* por los mismos nutrientes, sitios de colonización, etc. en la cavidad bucal cuando se administran como probióticos. Por lo tanto, las cepas de *Streptococcus mutans* deficientes en LDH pueden usarse para, por ejemplo, prevenir y/o tratar caries dental. Las cepas de *Streptococcus mutans* deficientes en LDH son no patógenas, modifican el microambiente de la cavidad bucal para prevenir la colonización o proliferación de organismos patógenos, y/o desplazan organismos patógenos de la cavidad bucal en la que el patógeno es parte de la flora indígena del huésped.

Los ejemplos de cepas de *Streptococcus mutans* deficientes en LDH incluyen, por ejemplo, JH145 de *S. rattus* (ATCC 31377) (un mutante deficiente en LDH de origen natural espontáneo) (Véanse las figuras 2A-2C para una secuencia de nucleótidos y polipéptidos de LDH del mutante JH14) y JH140 (ATCC 31341) (un mutante modificado químicamente deficiente en LDH). Véase, por ejemplo, Stanshenko y Hillman, Microflora of plaque in rats following infection with an LDH-deficient mutant of *Streptococcus rattus*, Caries Res. 23:375-377 (1989); Hillman, Lactate dehydrogenase mutants of *Streptococcus mutans*: Isolation and preliminary characterization. Infect. Immun. 21:206-212 (1978); véase también Abhyankar y col., Serotype c *Streptococcus mutans* mutable to lactate dehydrogenase deficiency. J Dent Res 1985 Nov;64(11):1267-71.

Una cepa de *Streptococcus mutans* deficiente en LDH puede derivarse de una cepa de *Streptococcus mutans* usando, por ejemplo, técnicas de mutagénesis químicas o físicas. Las cepas que se someten a mutagénesis usando estas técnicas se consideran cepas modificadas genéticamente. Por ejemplo, una cepa de *Streptococcus mutans* puede someterse a mutágenos tales como ácido nitroso, ácido fórmico, bisulfato de sodio, luz UV, mutágenos análogos a bases, que incluyen, por ejemplo, 5-bromo-deoxiuridina (5BU), alquilantes tales como sulfonato de etilmeano (EMS), sulfonato de metilmetano (MMS), sulfato de dietilo (DES) y nitrosoguanidina (NTG, NG, MNNG). Véase, por ejemplo, In Vitro Mutagenesis Protocols, Braman, Ed., Humana Press, 2002.

Las cepas de *Streptococcus mutans* deficientes en LDH espontáneas de origen natural pueden prepararse usando procedimientos divulgados, por ejemplo, en Hillman, Lactate dehydrogenase mutants of *Streptococcus mutans*: isolation and preliminary characterization. Infect. Immun. 21:206-212 (1978). Los mutantes deficientes en LDH espontáneos se producen con una tasa de frecuencia de aproximadamente 10^{-5} . Véase Johnson y col., Cariogenic potential in vitro in man and in vivo in the rat of lactate dehydrogenase mutants of *Streptococcus mutans*. Arch. Oral Biol. 25:707-713 (1980).

Las cepas deficientes en LDH espontáneas de origen natural de *Streptococcus mutans* pueden diferenciarse de las cepas de *Streptococcus mutans* que producen LDH plaqueando las bacterias en medio de glucosa tetrazolio. Las

colonias de *Streptococcus mutans* deficientes en LDH serán rojas brillantes y relativamente más grandes en tamaño que las colonias de la cepa origen, que son blancas y relativamente menores en tamaño en el medio de glucosa tetrazolio. Pueden usarse cepas de *Streptococcus mutans* deficientes en LDH espontáneas de origen natural en una composición de la invención.

Se ha aislado una cepa de *S. rattus* deficiente en LDH. Brevemente, se cultiva un cultivo de BHT-2 de *S. rattus* durante la noche hasta saturación en caldo de Todd Hewitt y las muestras diluidas se extienden en medio de glucosa tetrazolio dando aproximadamente 300 colonias por placa. Las colonias productoras de ácido de tipo silvestre son blancas en este medio. Los mutantes deficientes en LDH son de un color rojo brillante. El JH145 de *S. rattus* fue una colonia roja entre aproximadamente 100.000 colonias blancas que se cribaron. El JH145 de *S. rattus* es, por lo tanto, un mutante deficiente en LDH de origen natural.

Las cepas deficientes en LDH de *Streptococcus mutans*, tales como mutantes deficientes en LDH de BHT-2 de *S. rattus* producen menos ácido valorable total cuando se incuban en presencia de glucosa u otros azúcares o polioles, fabrican sustancialmente menos ácido láctico cuando se incuban en presencia de glucosa en el caso de cultivos en reposo o en fase de proliferación, se adhieren mejor a hidroxiapatita y acumulan más placa cuando se cultivan en presencia de glucosa. La actividad puede analizarse tal como se describe por Brown y Wittenberger (J. Bacteriol. 110:604,1972).

El pH terminal puede determinarse subcultivando cepas (1:100) en caldo de Todd-Hewitt que contiene glucosa al 1 %. Después de 48 horas de incubación en tarros para velas a 37 °C, puede determinarse la absorbancia a 580 nm y el pH de los cultivos. La concentración de ácido láctico en cultivos puede determinarse mediante cromatografía gas-líquido. Véase Salanitro y Muirhead, Quantitative method for the gas chromatographic analysis of short-chain monocarboxylic and dicarboxylic acids in fermentation media. Appl. Microbiol. 29:374-381 (1975); Hillman y col., Acetoin production by wild-type strains and a lactate dehydrogenase-deficient mutant of *Streptococcus mutans*. Infect. Immun. 55:1399-1402 (1987).

Adicionalmente, puede usarse cualquier técnica de modificación genética conocida por los expertos en la técnica para crear una cepa de *Streptococcus mutans* deficiente en LDH a partir de una cepa origen de *Streptococcus mutans* que produzca LDH. Por ejemplo, un gen de LDH o una porción de un gen de LDH puede suprimirse o mutagenizarse, incluyendo, por ejemplo, técnicas de mutagénesis insercional. Otras técnicas de mutagénesis incluyen, por ejemplo, recombinación de homólogos, recombinación de secuencias recursiva, mutagénesis dirigida a oligonucleótidos, mutagénesis dirigida al sitio, PCR propensa a error, mutagénesis de ADN modificado con fosfotioato, mutagénesis de plantillas que contienen uracilo, mutagénesis doble con huecos, mutagénesis de reparación de desapareamiento en el punto, mutagénesis de cepa huésped deficiente en reparación, mutagénesis radiogénica, mutagénesis de delección, mutagénesis de selección por restricción, mutagénesis de purificación por restricción, mutagénesis de saturación en el sitio, mutagénesis de ensamblaje, mutagénesis de ensamblaje recursiva y creación de ácidos nucleicos quiméricos. Por lo tanto, puede usarse cualquier técnica de modificación genética que inactive un gen de LDH para producir una cepa de *Streptococcus mutans* deficiente en LDH.

En una realización de la invención, las cepas deficientes en LDH, bien mutantes de origen natural o bien modificados genéticamente, tienen una frecuencia de inversión inferior a 10^{-7} y producen menos del 10 % del nivel de la cepa origen de actividad de lactato deshidrogenasa.

Composiciones de la invención

Las composiciones de la invención comprenden una o más cepas aisladas de *Streptococcus mutans* en combinación con una o más cepas aisladas de *S. oralis*, o una o más cepas aisladas de *S. uberis*, o ambas, o una o más cepas aisladas de *S. oralis* y una o más cepas aisladas de *S. uberis*, en las que la cepa de *Streptococcus mutans* es deficiente en lactato deshidrogenasa (LDH). La combinación de *Streptococcus mutans* deficientes en LDH con *S. oralis* y/o *S. uberis* proporciona una ventaja práctica significativa en que la combinación puede usarse para prevenir y tratar, por ejemplo, tanto caries dental como periodontitis. El tratamiento de caries dental y/o periodontitis significa que uno o más síntomas de caries dental y/o periodontitis se alivian, reducen, previenen o mejoran bien permanente o bien temporalmente. Las composiciones de la invención también pueden usarse para tratar o prevenir la proliferación de *Candida* o fúngica en la cavidad bucal, debida a, por ejemplo, tratamiento con antibióticos, para tratar o prevenir halitosis (mal aliento) y para tratar o prevenir caries dental y/o periodontitis asociadas con xerostomía (boca seca), para tratar o prevenir infecciones o enfermedades bacterianas, para tratar o prevenir heridas bucales y combinaciones de los mismos.

Las cepas de *Streptococcus mutans*, *S. oralis* y/o *S. uberis* de la invención pueden estar presentes en cualquier proporción terapéuticamente eficaz. Terapéuticamente eficaz significa eficaz para aliviar, reducir, prevenir y/o mejorar uno o más síntomas de caries dental, periodontitis, infecciones o enfermedades bacterianas, heridas bucales, proliferación de *Candida* o fúngica, halitosis o caries dental o enfermedad periodontal inducida por xerostomía o una combinación de los mismos bien permanente o bien temporalmente. Terapéuticamente eficaz también significa eficaz para promover la cicatrización de heridas en la cavidad bucal.

Las cepas bacterianas de la invención también pueden comprender un vehículo farmacéuticamente aceptable o nutricionalmente aceptable. El vehículo es fisiológicamente compatible con la cavidad bucal del sujeto al que se le va a administrar. Los vehículos pueden estar compuestos por materiales secos de base sólida para la formulación en forma de comprimidos, cápsulas, pastillas para chupar o en polvo. Un vehículo también puede estar compuesto por materiales líquidos o basados en gel para formulaciones en forma de líquido, gel y de goma de mascar.

Los vehículos líquidos o basados en gel adecuados incluyen, pero no están limitados a: agua, soluciones salinas fisiológicas, urea, alcoholes y derivados y glicoles (por ejemplo, etilenglicol o propilenglicol). Las composiciones de la invención también pueden incluir aromatizantes naturales o sintéticos y agentes colorantes de calidad alimenticia, todos ellos compatibles con el mantenimiento de la viabilidad de las cepas bacterianas de la invención. También pueden añadirse a las composiciones de la invención agentes espesantes tales como almidón de maíz, goma guar, carbopol y goma xantana.

También pueden incluirse aromatizantes y/o colorantes en el vehículo. Las composiciones de la invención también pueden incluir un plastificante tal como glicerina o polietilenglicol. La composición del vehículo puede variar siempre que no interfiera significativamente con la actividad terapéutica de las cepas bacterianas de la invención.

Una composición puede formularse para que sea adecuada para la administración por vía oral en una diversidad de maneras, por ejemplo en un líquido, una masa seca, un dentífrico, un lavado bucal, un enjuague bucal, una suspensión líquida, un agente de uso tópico, un suplemento alimentario en polvo, una pasta, un gel, un alimento sólido, un alimento envasado, una oblea, una pastilla para chupar, goma de mascar y similares. Otras formulaciones serán fácilmente evidentes para un experto en la técnica. Una composición de la invención puede incluir un componente suplementario nutricional y puede incluir cualquiera de una diversidad de agentes nutricionales, que son bien conocidos, incluidos vitaminas, minerales, aminoácidos esenciales y no esenciales, carbohidratos, lípidos, alimentos, suplementos dietéticos y similares.

Las bacterias de la invención pueden prepararse en, por ejemplo, un fermentador. Las bacterias pueden recogerse del fermentador y pueden, por ejemplo, concentrarse. Las bacterias de la invención pueden prepararse para su uso mediante, por ejemplo, deshidratación o secado por pulverización. El secado por pulverización comprende pulverizar una suspensión de bacterias en un recipiente y bajo un vapor de aire caliente. Las bacterias también pueden prepararse para su uso mediante microencapsulación (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 6.251.478), liofilización o mediante recubrimiento con una sustancia protectora tal como, por ejemplo, material lipídico tal como triacilglicérols, ceras, ésteres orgánicos, aceite de soja, aceite de semillas de algodón, aceite de palmiste y ésteres de ácidos grasos y alcoholes de cadena larga.

Composiciones para mantener la salud bucal

Las bacterias patógenas, tales como *S. mutans* y *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, que pueden colonizar una cavidad bucal de un animal, pueden inhibirse y/o controlarse mediante la administración de una composición que comprende una o más cepas de *Streptococcus mutans* deficientes en LDH y una o más cepas aisladas de *S. oralis* o una o más cepas aisladas de *S. uberis* o tanto una o más cepas de *S. oralis* aisladas como una o más cepas de *S. uberis* aisladas a la cavidad bucal. Las composiciones pueden administrarse a la cavidad bucal de un sujeto tal como un animal, incluido un mamífero, por ejemplo un ser humano, un primate no humano, un perro, un gato, una rata, un ratón, un caballo, una cabra o un conejo. Las cepas bacterianas de la invención pueden formar al menos una parte de la flora transitoria o indígena de la cavidad bucal y mostrar efectos profilácticos y/o terapéuticos beneficiosos en la cavidad.

La invención proporciona composiciones inventivas para su uso en el tratamiento, prevención o tanto tratamiento como prevención de caries dental, periodontitis, proliferación de *Candida* o fúngica, halitosis, o caries dental o enfermedad periodontal inducida por xerostomía, infecciones o enfermedades bacterianas bucales, heridas bucales o una combinación de los mismos que comprende administrar una composición de la invención a la cavidad bucal de un sujeto. La periodontitis incluye, por ejemplo, periodontitis de aparición temprana, periodontitis juvenil localizada y generalizada y periodontitis adulta rápidamente progresiva o refractaria. La composición se administra al sujeto aproximadamente una vez al día, aproximadamente una vez a la semana o aproximadamente una vez al mes.

Las composiciones de la invención pueden administrarse por vía oral en, por ejemplo, alimento, agua, un dentífrico, un gel, una pasta, una emulsión, pulverización en aerosol, goma de mascar, pastilla para chupar, comprimido, cápsula o una suspensión líquida. Las bacterias pueden estar ya formuladas en alimento, agua, gel u otro vehículo o pueden ser una composición que se añade al vehículo por parte del usuario antes de su administración.

Una realización de la invención proporciona una combinación que comprende una o más cepas aisladas de *S. oralis* y/o *S. uberis* y una o más cepas aisladas de organismos *Streptococcus mutans*, en la que las cepas de organismos *Streptococcus mutans* son deficientes en lactato deshidrogenasa, para su uso en la colonización de forma no persistente de la cavidad bucal de un sujeto con bacterias terapéuticamente eficaces. En una realización de la invención, las cepas bacterianas administradas no colonizan permanentemente la cavidad bucal, sino que más bien las cepas están presentes en la cavidad bucal durante aproximadamente 1 día, aproximadamente 1 semana,

aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses o aproximadamente 3 meses después de la administración de las bacterias. Opcionalmente, las bacterias pueden colonizar permanente y persistentemente la cavidad bucal de un sujeto.

5 Las composiciones de la invención pueden administrarse a una dosis de aproximadamente 1×10^3 , 1×10^5 , 1×10^7 , 1×10^9 o 1×10^{11} UFC o bacterias viables. Pueden administrarse una, dos o más dosis por día durante aproximadamente 1 semana, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente un año o más. Alternativamente, puede administrarse una dosis
10 aproximadamente cada dos días, aproximadamente una vez a la semana, aproximadamente una vez al mes o aproximadamente anualmente.

Ejemplo 1

S. mutans para el mantenimiento de la salud bucal

15 El tratamiento diario con JH145 tuvo como consecuencia unos niveles reducidos de *Streptococcus mutans* indígena debido a la competencia por nutrientes, sitios de unión y otros factores. Los niveles reducidos de *S. mutans* indígena promueven la salud dental, ya que este microorganismo está estrechamente asociado con la caries dental.

20 Se infectaron setenta y dos ratas Sprague-Dawley destetadas (24 días de edad) con la cepa NG8 de *S. mutans* pipeteando 100 microlitros de una suspensión que contenía aproximadamente 10^{10} células por ml en la boca usando un micropipeteador. El régimen de infección se repitió dos veces en días consecutivos. Los animales se mantuvieron a dieta TD 80406 (Harlan Teklad) y agua a voluntad en jaulas separadas. Se dejó a la NG8 que se estableciera durante 4 semanas. Los animales se dividieron aleatoriamente en 6 grupos de 12 y se trataron
25 diariamente durante 16 semanas tal como sigue:

- a. Los animales del grupo 1 recibieron 100 microlitros de una suspensión de JH145 que contenía 10^{10} células por ml usando un micropipeteador.
- 30 b. Los animales del grupo 2 recibieron 100 microlitros de una suspensión de JH145 que contenía 10^9 células por ml usando un micropipeteador.
- c. Los animales del grupo 3 recibieron 100 microlitros de una suspensión de JH145 que contenía 10^8 células por ml usando un micropipeteador.
- 35 d. Los animales del grupo 4 recibieron 100 microlitros de una suspensión de JH145 que contenía 10^7 células por ml usando un micropipeteador.
- e. Los animales del grupo 5 recibieron 100 microlitros de una suspensión de JH145 que contenía 10^6 células por ml usando un micropipeteador.
- 40 f. Los animales del grupo 6 recibieron un tratamiento simulado.

45 A intervalos semanales, se tomaron muestras de placa y saliva usando hisopos con punta de algodón y las muestras se plaquearon en medio de cribado/selección de *S. mutans* para cultivar selectivamente NG8 (colonias blancas) y JH145 (colonias rojas). Se realizó una gráfica con los niveles de NG8 en función del tiempo. Véase la Figura 1.

Usando un análisis de varianza univariado (ANOVA) para examinar las diferencias entre los seis grupos (es decir, 5 de tratamiento y 1 de control) durante la semana 9, los resultados indicaron un efecto de grupo significativo, $F(5, 63) = 5,53$, $p < 0,001$. El tamaño del efecto ($ES = 0,31$) y la potencia observada ($\Phi = 0,99$) para este análisis indicaron que había una cantidad suficiente de potencia para detectar este pequeño efecto entre los grupos. A continuación de los ensayos *t* con la corrección de Bonferroni ($p = 0,01$) se realizaron usando comparaciones planeadas *a priori* que analizaron cada grupo de tratamiento frente al control. Estos análisis indicaron que los grupos de tratamiento 1-4 mostraron una expresión de NG8 de *S. mutans* significativamente menor con respecto a los grupos control, $t(1,21) \geq 2,7$, $p \leq .0,1$.
55

Por lo tanto, el tratamiento diario de ratas con $> 10^6$ células de JH145 tiene como consecuencia niveles reducidos de *S. mutans* indígenas. Debería obtenerse un riesgo reducido de caries dental y una salud dental aumentada. El efecto del tratamiento puede ser probablemente significativamente mejor en sujetos humanos que mantengan el probiótico en la boca y se enjuaguen con el mismo durante 30 a 60 segundos por tratamiento. Con respecto a la rata, que tragan rápidamente la preparación prebiótica, la exposición más prolongada de dientes humanos al JH145 aumentaría la oportunidad del mismo de competir con *S. mutans* indígena, dando como resultado una eficacia mejorada. Pueden realizarse estudios en seres humanos para verificar que la exposición diaria con una suspensión de *mutans streptococci*, por ejemplo, JH145 de *S. rattus* (*ldh, str*) tiene como consecuencia cantidades reducidas de una cepa de *S. mutans* indígena y el cese de la exposición tiene como consecuencia una eliminación eventual de JH145 de *S. rattus* y la vuelta del *S. mutans* indígena a niveles originales. Pueden determinarse niveles de línea
60
65

5 base de *S. mutans* indígena. Puede administrarse las dosis diarias de JH145 de *S. rattus* a la cavidad bucal de los sujetos. Pueden tomarse muestras de la flora oral de los sujetos semanalmente y realizarse un seguimiento de los niveles de *S. mutans* de tipo silvestre y JH145 de *S. rattus* hasta observar una en los niveles de *S. mutans* de tipo silvestre. Las dosis de JH145 de *S. rattus* son discontinuos y se toman muestras de la flora oral semanalmente para seguir la caída en niveles de JH145 de *S. rattus* y el aumento en niveles de *S. mutans* de tipo silvestre.

Streptococcus oralis y *Streptococcus uberis* para el mantenimiento de la salud periodontal

10 Pueden realizarse estudios en seres humanos para verificar que la exposición diaria con una suspensión de *S. oralis* (*str*) y/o *S. uberis* tiene como consecuencia unos niveles aumentados de especies periodontopáticas y especies cariogénicas indígenas y el cese del tratamiento tiene como consecuencia la eliminación eventual de la cepa prebiótica de *S. oralis* y/o *S. uberis* y la vuelta de las especies periodontopáticas y especies cariogénicas a niveles originales.

15 Por ejemplo, pueden determinarse para sujetos humanos los niveles de línea base de 4 bacterias periodontopáticas en saliva. Puede administrarse las dosis diarias de *S. oralis* y/o *S. uberis* a la cavidad bucal de sujetos humanos. Pueden tomarse muestras de la flora oral de los sujetos humanos semanalmente para realizar un seguimiento de patógeno y de niveles de *S. oralis* y/o *S. uberis* hasta observar una disminución de niveles de uno o más patógenos. Las dosis de *S. oralis* y/o *S. uberis* se cesan y se toman muestras de la flora oral de los sujetos humanos
20 semanalmente para realizar un seguimiento de la caída de los niveles de *S. oralis* y/o *S. uberis* y el incremento correspondiente en niveles de patógeno.

25 Finalmente, se han realizado estudios humanos y estudios animales para verificar que la exposición diaria con una suspensión de una o más cepas aisladas de *S. oralis* (*str*) y/o *S. uberis* en combinación con una o más cepas aisladas de *Streptococcus mutans* deficientes en LDH da como resultado concentraciones de especies periodontopáticas indígenas reducidas y el cese del tratamiento da como resultado la eliminación eventual de cepas prebióticas y la vuelta de las especies periodontopáticas a niveles originales.

30 La invención descrita ilustrativamente en el presente documento se puede llevar a la práctica adecuadamente en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones que no estén descritos específicamente en el presente documento. De este modo, por ejemplo, en cada caso, en el presente documento, cualquiera de las expresiones “que comprende”, “constituido esencialmente por” y “constituido por” pueden reemplazarse con cualquiera de las otras expresiones. Los términos y expresiones que se han empleado se usan como términos de descripción y no de limitación.
35

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende:
- 5 (a) (i) una o más cepas de *Streptococcus oralis* aisladas; (ii) o una o más cepas aisladas de *Streptococcus uberis*; (iii) o una o más cepas de *Streptococcus oralis* aisladas y una o más cepas aisladas de *Streptococcus uberis*; y
- (b) una o más cepas de *Streptococcus mutans* aisladas, en las que las cepas de *Streptococcus mutans* son deficientes en lactato deshidrogenasa.
- 10 2. La composición de la reivindicación 1, en la que la composición es una composición alimentaria, una composición dentífrica, una composición de enjuague bucal, una composición de goma de mascar, una composición de pastilla para chupar o una composición de agente de uso tópico.
- 15 3. La composición de la reivindicación 1 o 2 que además comprende un vehículo.
4. La composición de la reivindicación 1 a 3, en la que las cepas de *Streptococcus mutans* se seleccionan del grupo constituido por *S. rattus*, *S. cricetus*, *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. downei*, *S. macacae* y *S. ferus*.
- 20 5. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la cepa de *Streptococcus mutans* es la cepa JH145 de *S. rattus*.
6. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la cepa de *Streptococcus mutans* es un mutante de origen natural que es deficiente en lactato deshidrogenasa.
- 25 7. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la cepa de *S. oralis* es la cepa KJ3sm o KJ3 de *S. oralis*.
8. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la cepa de *S. uberis* es la cepa KJ2sm o la cepa KJ3 de *S. uberis*.
- 30 9. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la cepa de *Streptococcus mutans* es un cepa modificada genéticamente que es deficiente en lactato deshidrogenasa.
- 35 10. Una composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso en el mantenimiento de la salud bucal de un sujeto.
11. La composición para su uso según la reivindicación 10, en la que el sujeto es un mamífero.
- 40 12. La composición para su uso según la reivindicación 10 u 11, en la que la composición se administra al sujeto aproximadamente una vez al día, aproximadamente una vez a la semana o aproximadamente una vez al mes.
13. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en la que el mantenimiento de la salud bucal comprende el tratamiento, la prevención o el tratamiento y la prevención de periodontitis, caries dental, proliferación excesiva de *Candida* o fúngica, halitosis, caries dental o enfermedad periodontal inducida por xerostomía, infecciones bacterianas bucales, enfermedad bacteriana bucal, heridas bucales o sus combinaciones.
- 45 14. Una combinación que comprende:
- 50 (a) (i) una o más cepas de *Streptococcus oralis* aisladas; (ii) o una o más cepas aisladas de *Streptococcus uberis*; (iii) o una o más cepas de *Streptococcus oralis* aisladas y una o más cepas aisladas de *Streptococcus uberis*; y
- (b) una o más cepas de *Streptococcus mutans* aisladas, en las que las cepas de *Streptococcus mutans* son deficientes en lactato deshidrogenasa;
- 55 para uso en la colonización de forma no persistente de una cavidad bucal de un sujeto con bacterias terapéuticamente eficaces.
15. La combinación para su uso según la reivindicación 14, en la que la combinación se administra al sujeto aproximadamente una vez al día, aproximadamente una vez a la semana o aproximadamente una vez al mes.
- 60 16. La combinación para su uso según la reivindicación 14 o 15, en la que el sujeto es un mamífero.

Estudio probiótico de caries

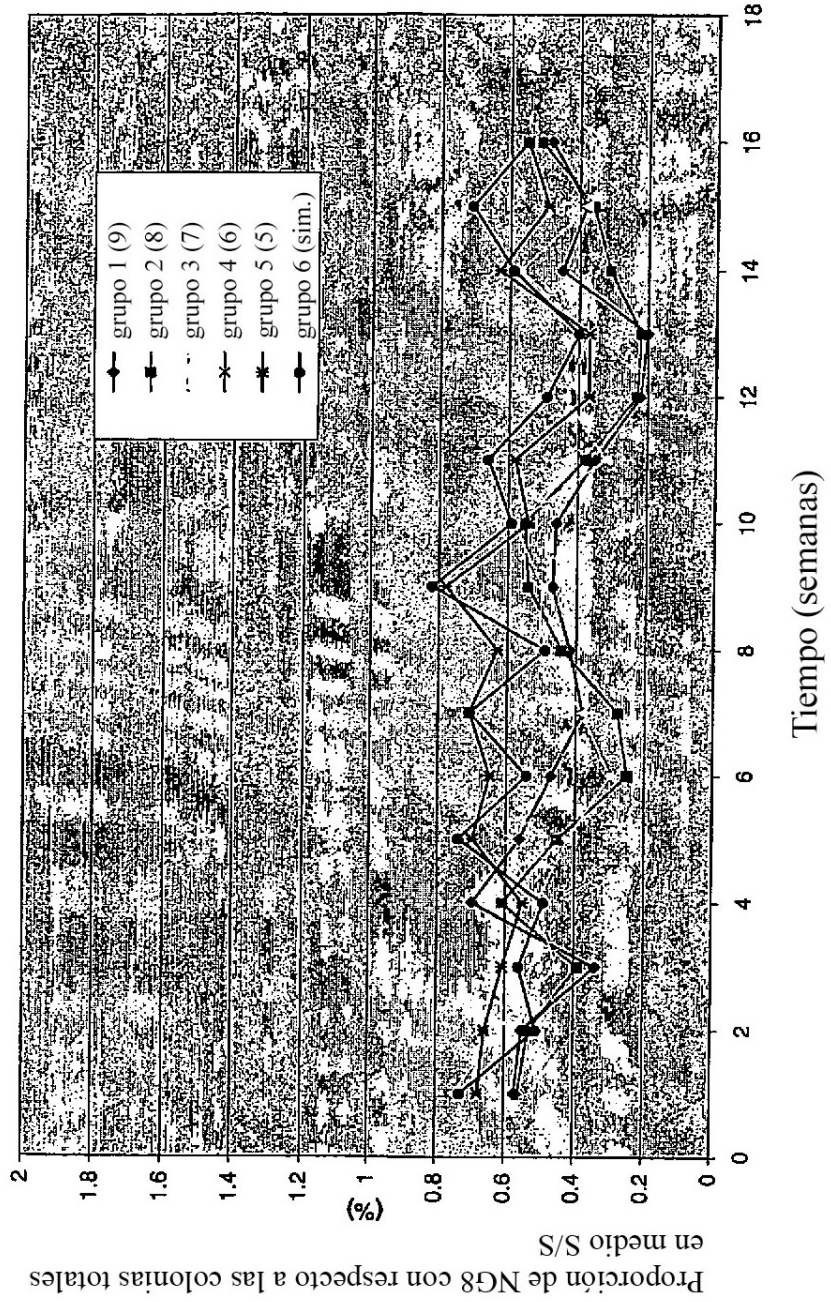


FIGURA 2A

Comparación del gen JH145 LDH de *S. mutans* con el gen BHT-2 LDH de *S. mutans*

Inicio Idh: base 486 (negrita)

Mutación JH145: delección de 1 pb en la base 718 de BHT-2

Detención Idh: base 1474/BHT-2 y 1473/JH145 (subrayado)

```

JH145: 191  tcacgaacatctggcagggcacgagaaacaataaacactcatagcatagtccaataaaaactc 250
                |||
BHT-2: 191  tcacgaacatctggcagggcacgagaaacaataaacactcatagcatagtccaataaaaactc 250

JH145: 251  gttttcatttcactcogttaaattaacatctactaaatttctatcttgcattaaaaaatgc 310
                |||
BHT-2: 251  gttttcatttcactcogttaaattaacatctactaaatttctatcttgcattaaaaaatgc 310

JH145: 311  tccatftctagctctaaaactcctttatattatataccaaaaaatgctccttttcagctat 370
                |||
BHT-2: 311  tccatftctagctctaaaactcctttatattatataccaaaaaatgctccttttcagctat 370

JH145: 371  tctactatagttttcctttaacagaggaaaataactagtgactttttaacaaaaagtggt 430
                |||
BHT-2: 371  tctactatagttttcctttaacagaggaaaataactagtgactttttaacaaaaagtggt 430

JH145: 431  agaataaattcgtataaaaatatacacttaataaattataaggagatggttagaacatgac 490
                |||
BHT-2: 431  agaataaattcgtataaaaatatacacttaataaattataaggagatggttagaacatgac 490

JH145: 491  tgcaactaaacaacataaaaaagtcaccttgcggtgatggtgctgtaggatcatctta 550
                |||
BHT-2: 491  tgcaactaaacaacataaaaaagtcaccttgcggtgatggtgctgtaggatcatctta 550

JH145: 551  cgccctcgcccttgtaaccaaggaatcgctcaagaactcggaattattgaaattcctca 610
                |||
BHT-2: 551  cgccctcgcccttgtaaccaaggaatcgctcaagaactcggaattattgaaattcctca 610

JH145: 611  gctgtttgaaaaggctggtggagacgctcttgaccttagccatgcacttgccttcacttc 670
                |||
BHT-2: 611  gctgtttgaaaaggctggtggagacgctcttgaccttagccatgcacttgccttcacttc 670

JH145: 671  accaaagaaaatttacgctgctaaatatgaagactgtgaggatgctg-ccttggtgtcat 729
                |||
BHT-2: 671  accaaagaaaatttacgctgctaaatatgaagactgtgaggatgctgacccttggtgtcat 730

JH145: 730  tactgcaggtgcacctcaaaaaccaggtgaaactcgtcttgaccttgcggtaaaaacct 789
                |||
BHT-2: 731  tactgcaggtgcacctcaaaaaccaggtgaaactcgtcttgaccttgcggtaaaaacct 790
    
```

FIGURA 2B

JH145: 790 tgcaatcaacaaatctatcgttacacaagtggttgaatcaggctttaaggaatcttctt 849
 |||
 BHT-2: 791 tgcaatcaacaaatctatcgttacacaagtggttgaatcaggctttaaggaatcttctt 850

JH145: 850 ggttgctgccaaaccagttgacatcttgacttattcaacatggaaattctcaggtttccc 909
 |||
 BHT-2: 851 ggttgctgccaaaccagttgacatcttgacttattcaacatggaaattctcaggtttccc 910

JH145: 910 taagaacgcgctcattggttctgggtacatctcttgatactgctcgtttccgtaagctct 969
 |||
 BHT-2: 911 taagaacgcgctcattggttctgggtacatctcttgatactgctcgtttccgtaagctct 970

JH145: 970 tgctgaaaaaatcgggggtgatgctcggtcagtcacgcctatatcatgggtgaacacgg 1029
 |||
 BHT-2: 971 tgctgaaaaaatcgggggtgatgctcggtcagtcacgcctatatcatgggtgaacacgg 1030

JH145: 1030 tgattcagaatttgccggttggtctcatgccaatgtagctgggtgtaaattagaacaatg 1089
 |||
 BHT-2: 1031 tgattcagaatttgccggttggtctcatgccaatgtagctgggtgtaaattagaacaatg 1090

JH145: 1090 gctgcaagacaaccgtagtggtgatgctgaaggctctcgtaaaactggttgatctgttcg 1149
 |||
 BHT-2: 1091 gctgcaagacaaccgtagtggtgatgctgaaggctctcgtaaaactggttgatctgttcg 1150

JH145: 1150 tgatgctgcttattcaatcatcaacaaaaagggtgctactttctatggatatcgctgtcgc 1209
 |||
 BHT-2: 1151 tgatgctgcttattcaatcatcaacaaaaagggtgctactttctatggatatcgctgtcgc 1210

JH145: 1210 ccttgcccgtatcactaaagcaatcttggatgacgaaaaacgcggttcttcgcttccagt 1269
 |||
 BHT-2: 1211 ccttgcccgtatcactaaagcaatcttggatgacgaaaaacgcggttcttcgcttccagt 1270

JH145: 1270 tttccaatcaggccaatacgaagggtgtgaagatgtcttcacggacagccggccatcgt 1329
 |||
 BHT-2: 1271 tttccaatcaggccaatacgaagggtgtgaagatgtcttcacggacagccggccatcgt 1330

JH145: 1330 tggtgacacaggtatcgttcgtccagtaaatattccggttaaatgatgctgaactgcaaaa 1389
 |||
 BHT-2: 1331 tggtgacacaggtatcgttcgtccagtaaatattccggttaaatgatgctgaactgcaaaa 1390

JH145: 1390 aatgcaggcttctgctaaacagctgaaagcaatcattgacgaagcttctcaaatgaaga 1449
 |||
 BHT-2: 1391 aatgcaggcttctgctaaacagctgaaagcaatcattgacgaagcttctcaaatgaaga 1450

JH145: 1450 atttgctgctgctgcagctcgtaa 1473 SEC ID N°: 1
 |||
 BHT-2: 1451 atttgctgctgctgcagctcgtaa 1474 SEC ID N°: 9

FIGURA 2C

Secuencia de proteína BHT-2 en la que (-) indica un codón de detención (SEC ID N°: 10)

```

1  MTATKQHKKVILVGDGAVGSSYAFALVNQGIAQELGIIIEIPQLFEKAVGD 50
51  ALDLSHALFTSPKKIYAAYEDCADADLVVITAGAPQKPGETRLDLVGK 100
101 NLAINKSIVTQVVESGFKGIFLVAANPVDILTYSTWKFSGFPKERVIGSG 150
151 TSLDTARFRQALAEKIGVDARSVHAYIMGEHGDSEFAVWSHANVAGVBLE 200
201 QWLQDNRDVDAEGLVKLFVSVRDAAYSIINKKGATFYGIAVALARITKAI 250
251 LDDENAVLPLSVFQSGQYEGVEDVFTGQPAIVGAHGIVRPVNIPLNDAEL 300
301 QKMQASAKQLKAIIDEAFSNEEFAAAAAR- 329
    
```

Secuencia de proteína JH en la que (-) indica un codón de detención (SEC ID N°: 2-8)

```

1  MTATKQHKKVILVGDGAVGSSYAFALVNQGIAQELGIIIEIPQLFEKAVGD 50
51  ALDLSHALFTSPKKIYAAYEDCADAALLSLQVHLKNQVKLVLTLSVK 100
101 TLQSTNLSLHKWLNQALRESSWLLPTQLTS-LIQHGNSQVSLKNASLVLV 150
151 HLLILLVSVKLLKSGMLGQSTPISWVNTVIQNLPFGLMPM-LVLN-N 200
201 NGCKTTVMLMLKVS-NCLYLFVMLLIQSSTKKVLLSMVLSPLPVSLKQS 250
251 WMTKTPFFFRFQFSNQANTKVLKMSSDSRPSLVHTVVSFVQ-IFR-MMLNC 300
301 KKRLLLLNS-KQSLTKLSQMKNLNLLLQLV 329
    
```