

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 698 421**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09	(2006.01)	C12P 21/02	(2006.01)
A61K 38/00	(2006.01)	C12R 1/225	(2006.01)
A61P 1/02	(2006.01)		
A61P 31/04	(2006.01)		
C07K 14/335	(2006.01)		
C12N 1/15	(2006.01)		
C12N 1/19	(2006.01)		
C12N 1/20	(2006.01)		
C12N 1/21	(2006.01)		
C12N 5/10	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.02.2012 PCT/JP2012/053020**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **16.08.2012 WO12108518**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.02.2012 E 12745195 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.08.2018 EP 2682463**

54 Título: **Bacteriocina derivada de lactobacillus rhamnosus**

30 Prioridad:

10.02.2011 JP 2011027882
26.08.2011 JP 2011184655

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.02.2019

73 Titular/es:

HIROSHIMA UNIVERSITY (100.0%)
3-2, Kagamiyama 1-chome Higashi-Hiroshima-shi
Hiroshima 739-8511, JP

72 Inventor/es:

NIKAWA HIROKI

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 698 421 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

Bacteriocina derivada de *Lactobacillus rhamnosus*

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a una bacteriocina que produce actividad antimicrobiana contra microorganismos causales de enfermedades orales, una composición para profilaxis, mejoría y/o terapia de enfermedades orales que comprenden la bacteriocina como un componente eficaz, un gen que codifica la bacteriocina, un vector de expresión recombinante obtenido por incorporación del gen, una célula hospedadora que comprende el vector de expresión recombinante, un transformante producido por transformación con el vector de expresión recombinante, un procedimiento para producir la bacteriocina y una nueva cepa bacteriana de ácido láctico que produce la bacteriocina, la cepa *Lactobacillus rhamnosus* KO1.

Antecedentes de la técnica

15 En la actualidad, llama la atención la asociación de enfermedades orales tales como la caries dental y las enfermedades periodontales con la salud general. Por lo tanto, como procedimientos terapéuticos para enfermedades orales tales como la caries dental y las enfermedades periodontales, se han desarrollado varios péptidos que ejercen actividad antimicrobiana contra estos microorganismos causales. Por ejemplo, la Referencia de No Patente 1 describe la rhamnosina A, que es una bacteriocina de bajo peso molecular producida por la cepa *Lactobacillus rhamnosus* 68. El documento WO2005095445 desvela un péptido sintético antibacteriano básico con un amplio espectro contra bacterias dentales.

20 Además, la separación e identificación de nuevas bacterias de ácido láctico que ejercen actividad antimicrobiana contra los microorganismos causales de enfermedades orales tales como las bacterias cariogénicas y las bacterias de enfermedades periodontales se han llevado a cabo de manera intensiva en los últimos años. Por ejemplo, el presente inventor propuso previamente nuevas cepas bacterianas de ácido láctico, la cepa *Lactobacillus rhamnosus* KO3 (bacteria L8020), la cepa *Lactobacillus casei* YU3 y la cepa *Lactobacillus paracasei* YU4, que son capaces de producir un producto de fermentación que tiene un amplio espectro antimicrobiano contra microorganismos causales de enfermedades orales y que tiene excelente sabor y palatabilidad (véase Referencia de Patente 1). Además, como procedimientos terapéuticos para enfermedades orales distintas de las técnicas de péptidos antimicrobianos y cepas bacterianas de ácido láctico aisladas, se han propuesto procedimientos terapéuticos que utilizan antibióticos.

Las secuencias de aminoácidos de Kog1 y Kog2 se conocen en la técnica anterior y se desvelan en la Base de datos UNIPROT con los números de registro C2JW85 y C2K1D4, respectivamente.

30 Lista de citas

Referencias de patente

Referencia de patente 1: documento WO 2011/007584

Referencias de No Patente

35 Referencias de No Patente 1: R. Dimitrijevic, M. Stojanovic, I. Petersen, R. M. Jankov, L. Dimitrijevic, M. Gavrovic-Jankulovic, 2009, Journal of Applied Microbiology (107), 2108-2115

Sumario de la invención

Problema técnico

40 Sin embargo, debido a que la mayoría de los diversos péptidos antimicrobianos mencionados anteriormente son péptidos derivados de un mamífero que incluyen péptidos humanos y sintetizados artificialmente, la producción en masa de estos péptidos no es fácil. Además, debido a que la actividad antimicrobiana de tal péptido antimicrobiano es baja a baja concentración, el péptido necesita usarse a alta concentración, es decir, en una gran cantidad.

45 Además, los procedimientos terapéuticos que usan antibióticos a veces no producen el efecto terapéutico debido a la aparición de bacterias resistentes a múltiples fármacos debido al abuso de los antibióticos. Por lo tanto, se exige una nueva bacteriocina que sea fácil de producir en masa, tenga una alta actividad antimicrobiana incluso a baja concentración, y sea menos probable que produzca microorganismos resistentes.

Solución al problema

50 La presente invención se realizó en las circunstancias anteriores, y tiene como objetivo proporcionar una bacteriocina que sea fácil de producir en masa, tenga una alta actividad antimicrobiana incluso a baja concentración y sea menos probable que produzca microorganismos resistentes. Concretamente, la presente invención se refiere a un péptido antimicrobiano básico que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 o en la SEQ ID NO: 2 en el LISTADO DE SECUENCIAS, o con la misma secuencia de aminoácidos que se muestra en la

SEQ ID NO: 1 o en la SEQ ID NO: 2 en el LISTADO DE SECUENCIAS, excepto que se eliminan, sustituyen, insertan y/o agregan de uno a cuatro aminoácidos, en el que el péptido antimicrobiano básico es antimicrobiano para bacterias cariogénicas, bacterias de enfermedades periodontales y *Candida* y tiene un punto isoeléctrico de no menos de 12, para su uso en profilaxis, mejoría y/o terapia de enfermedades orales.

5 Además, se describe una composición para profilaxis, mejoría y/o terapia de enfermedades orales que comprenden la bacteriocina (incluidos los derivados farmacéuticamente aceptables y similares de los mismos) como un componente eficaz, un gen que codifica la bacteriocina, un vector de expresión recombinante obtenido por incorporación del gen, una célula hospedadora que comprende el vector de expresión recombinante, y un transformante producido por transformación con el vector de expresión recombinante. Además, la presente invención
10 también se refiere a un procedimiento para producir la bacteriocina y una nueva cepa bacteriana de ácido láctico que produce la bacteriocina, la cepa *Lactobacillus rhamnosus* KO1.

Como resultado de un estudio intensivo, el presente inventor descubrió que un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 (proteína hipotética HMPREF0539_2969, número de registro ZP_04442437.1, en lo sucesivo denominada Kog1) y un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en
15 la SEQ ID NO: 2 (proteína hipotética HMPREF0539_1169, número de registro ZP_04440638.1, en lo sucesivo denominada Kog2) producidos en la cepa *Lactobacillus rhamnosus* KO3 (bacteria L8020) (se presentó una solicitud de depósito de la cepa ante el Patent Microorganisms Depository, National Institute of Technology and Evaluation (2-5-8 Kazusakamatarí, Kisarazu-shi, Chiba 292-0818 Japan) el 10 de junio de 2009, a la que siguió una solicitud de conversión a depósito en virtud del Tratado de Budapest y a continuación aceptación bajo el número de registro
20 NITE BP-771) propuesto en la Referencia de patente 1, funcionan como bacteriocinas que tienen amplios espectros antimicrobianos y alta actividad antimicrobiana a baja concentración, que tienen menos probabilidades de producir microorganismos resistentes y tienen puntos isoeléctricos de no menos de 12.

Además, como resultado de un estudio intensivo, el presente inventor también logró la separación/identificación de la cepa *Lactobacillus rhamnosus* KO1 (se presentó una solicitud de depósito de la cepa ante el Patent Microorganisms
25 Depository, National Institute of Technology and Evaluation el 24 de enero de 2011, y se aceptó bajo el número de registro NITE P-1065), que es una nueva cepa bacteriana de ácido láctico que produce de manera similar Kog1 y Kog2. Es decir, el presente inventor descubrió que el uso de la cepa *Lactobacillus rhamnosus* KO3 o la cepa *Lactobacillus rhamnosus* KO1 permite la producción en masa de manera fácil de las bacteriocinas Kog1 y Kog2, que tienen amplios espectros antimicrobianos y alta actividad antimicrobiana a baja concentración y es menos probable
30 que produzcan microorganismos resistentes.

Además, como resultado de un estudio intensivo, el presente inventor explicó la razón por la cual las bacteriocinas Kog1 y Kog2 tienen amplios espectros antimicrobianos y una alta actividad antimicrobiana a baja concentración y tienen menos probabilidades de producir microorganismos resistentes. Como se describe en detalle en el Ejemplo 7 a continuación, la razón fue que las bacteriocinas Kog1 y Kog2 tienen una acción para inactivar la endotoxina (LPS,
35 lipopolisacárido) de bacterias gram negativas, como las bacterias de enfermedades periodontales.

La bacteriocina de la primera modalidad de la presente invención tiene: una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 o en la SEQ ID NO: 2 en el LISTADO DE SECUENCIAS; o la misma secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 1 o en la SEQ ID NO: 2 en el LISTADO DE SECUENCIAS, excepto que se eliminan, sustituyen, insertan y/o agregan de uno a cuatro aminoácidos, secuencia de aminoácidos que proporciona
40 actividad antimicrobiana; bacteriocina que tiene un punto isoeléctrico de no menos de 12.

La bacteriocina tiene actividad antimicrobiana contra todas las bacterias cariogénicas, las bacterias de enfermedades periodontales y *Candida*.

Se describe una composición para profilaxis, mejoría y/o terapia de enfermedades orales de la segunda modalidad de la presente invención que comprende la bacteriocina de la primera modalidad, o un derivado farmacéuticamente aceptable o una sal farmacéuticamente aceptable de la bacteriocina como un componente eficaz.
45

Se describe una composición para profilaxis, mejoría y/o terapia de enfermedades orales que es preferentemente un inhibidor del crecimiento de bacterias cariogénicas, bacterias de enfermedades periodontales y/o *Candida*.

Se describe un gen que codifica la bacteriocina de la presente invención.

Se describe un vector de expresión obtenido por incorporación del gen.

50 Se describe una célula hospedadora que comprende el vector de expresión recombinante.

Se describe un transformante producido por transformación con el vector de expresión recombinante.

El transformante es preferentemente una bacteria.

El procedimiento para producir una bacteriocina de la presente invención comprende:

una etapa de cultivo para cultivar *Lactobacillus rhamnosus*; y

una etapa de extracción para extraer el péptido antimicrobiano básico que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 o en la SEQ ID NO: 2 en el LISTADO DE SECUENCIAS, o con la misma secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 1 o en la SEQ ID NO: 2 en el LISTADO DE SECUENCIAS, excepto que se eliminan, sustituyen, insertan y/o agregan de uno a cuatro aminoácidos, en el que el péptido antimicrobiano básico es antimicrobiano para bacterias cariogénicas, bacterias de enfermedades periodontales y *Candida* y tiene un punto isoeléctrico de no menos de 12 a partir de un cultivo de células bacterianas obtenido por la etapa de cultivo.

El *Lactobacillus rhamnosus* es preferentemente una cepa *Lactobacillus rhamnosus* KO1 (se presentó una solicitud de depósito de la cepa ante el Patent Microorganisms Depository, National Institute of Technology and Evaluation el 24 de enero de 2011, y se aceptó bajo el número de registro NITE P-1065), y/o una cepa *Lactobacillus rhamnosus* KO3 (se presentó una solicitud de depósito de la cepa ante el Patent Microorganisms Depository, National Institute of Technology and Evaluation (Incorporated Administrative Agency) el 10 de junio de 2009, y se aceptó con el número de registro NITE BP-771).

Más preferentemente, en la etapa de cultivo, se añaden células inactivadas de *Candida*.

La presente invención se refiere además a la cepa *Lactobacillus rhamnosus* KO1 que se depositó ante el Patent Microorganisms Depository, National Institute of Technology and Evaluation (Incorporated Administrative Agency) bajo el número de registro NITE P-1065 mediante solicitud el 24 de enero de 2011.

Efectos ventajosos de la invención

Mediante la presente invención, es posible proporcionar una bacteriocina que sea fácil de producir en masa, bacteriocina que tiene un amplio espectro antimicrobiano y es menos probable que produzca microorganismos resistentes; una composición para profilaxis, mejoría y/o terapia de enfermedades orales que comprenden la bacteriocina (incluidos los derivados farmacéuticamente aceptables y similares de los mismos) como un componente eficaz, un gen que codifica la bacteriocina, un vector de expresión recombinante obtenido por incorporación del gen, una célula hospedadora que comprende el vector de expresión recombinante, un transformante producido por transformación con el vector de expresión recombinante, un procedimiento para producir la bacteriocina y una nueva cepa bacteriana de ácido láctico que produce la bacteriocina, la cepa *Lactobacillus rhamnosus* KO1. Además, la bacteriocina de la presente invención tiene una alta resistencia al calor, y el rendimiento antimicrobiano de la bacteriocina se mantiene incluso en, por ejemplo, condiciones de ebullición.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es un diagrama que muestra la actividad antimicrobiana de Kog1 a concentraciones de 0,39 a 25 μM contra la cepa *Candida albicans* GDH18 observada en el Ejemplo 2;
 la FIG. 2 es un diagrama que muestra la actividad antimicrobiana de Kog2 a concentraciones de 0,39 a 12 μM contra la cepa *Candida albicans* GDH18 observada en el Ejemplo 2;
 la FIG. 3 es un diagrama que muestra las actividades antimicrobianas de Kog1, Kog2 y otros péptidos antimicrobianos contra la cepa *Streptococcus sobrinus* B-13 observadas en el Ejemplo 3;
 la FIG. 4 es un diagrama que muestra las actividades antimicrobianas de Kog1, Kog2 y otros péptidos antimicrobianos contra la cepa *Streptococcus mutans* NCTC10449 observadas en el Ejemplo 4;
 la FIG. 5 es un diagrama que muestra las actividades antimicrobianas de Kog1, Kog2 y otros péptidos antimicrobianos contra la cepa *Streptococcus mutans* Ingbritt observadas en el Ejemplo 4;
 la FIG. 6 es un diagrama que muestra las actividades antimicrobianas de Kog1, Kog2 y otros péptidos antimicrobianos contra la cepa *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Hudoe001 observadas en el Ejemplo 5;
 la FIG. 7 es un diagrama que muestra el nivel de expresión de Kog1 en la cepa *Lactobacillus rhamnosus* KO1 después de la adición de células inactivadas de *Candida* según lo observado por la micromatriz de ADN en el Ejemplo 6;
 la FIG. 8 es un diagrama que muestra el nivel de expresión de Kog2 en la cepa *Lactobacillus rhamnosus* KO1 después de la adición de células inactivadas de *Candida* según lo observado por la micromatriz de ADN en el Ejemplo 6;
 la FIG. 9 es un diagrama que muestra la relación entre las cantidades de LPS y Kog1 y la cantidad de secreción de ccl2 observada en el Ejemplo 7;
 la FIG. 10 es un diagrama que muestra la relación entre las cantidades de LPS y Kog1 y la cantidad de secreción de TNF- α observada en el Ejemplo 7;
 la FIG. 11 es un diagrama que muestra la relación entre las cantidades de LPS y Kog2 y la cantidad de secreción de ccl2 observada en el Ejemplo 8;
 la FIG. 12 es un diagrama que muestra la relación entre las cantidades de LPS y Kog2 y la cantidad de secreción de TNF- α observada en el Ejemplo 8;
 la FIG. 13 es un diagrama que muestra la asociación de LPS con diversas enfermedades causadas por el mismo;
 la FIG. 14 es un diagrama que muestra el valor del colágeno de tipo I/ β -actina observado por RT-PCR cuantitativa en tiempo real en el Ejemplo 8; y
 la FIG. 15 es un diagrama que muestra datos sobre el resultado de la resistencia al calor probada por un

experimento de ebullición en el Ejemplo 9.

Descripción detallada

En la presente memoria descriptiva, expresiones tales como "que tiene", "que comprende" y "que contiene" también incluyen los significados "que consisten en" y "estar constituido por".

5 (Bacteriocina)

La bacteriocina se refiere a un péptido antimicrobiano básico que tiene una secuencia de aminoácidos específica que produce un efecto específico y tiene características específicas. Los ejemplos específicos de la "bacteriocina" en la presente descripción incluyen el péptido antimicrobiano básico que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 (Kog1) y el péptido antimicrobiano básico que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO: 2 (Kog2). Además, la "bacteriocina" en la presente descripción también incluye péptidos antimicrobianos básicos que tienen la misma secuencia de aminoácidos que el péptido antimicrobiano básico que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO: 1 o 2, excepto que se eliminan, sustituyen, insertan y/o agregan de uno a varios aminoácidos, péptidos antimicrobianos básicos que proporcionan actividad antimicrobiana y tienen puntos isoelectrónicos de no menos de 12. El término "varios" significa de 2 a 8, preferentemente de 2 a 6, más preferentemente de 2 a 5, aún más preferentemente de 2 a 4.

En los casos de una bacteriocina que tiene la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos de Kog1 o Kog2, excepto que uno o varios aminoácidos se eliminan, sustituyen, insertan y/o agregan, bacteriocina que proporciona actividad antimicrobiana, la bacteriocina tiene preferentemente actividad antimicrobiana y basicidad (punto isoelectrónico) que son similares a la actividad antimicrobiana y basicidad de Kog1 o Kog2. La bacteriocina más preferentemente tiene actividad antimicrobiana contra todas las bacterias cariogénicas, las bacterias de enfermedades periodontales y *Candida*.

La bacteriocina se produce opcionalmente mediante un procedimiento que utiliza la cepa *Lactobacillus rhamnosus* KO1, la cepa KO3 o similares, como se describe en detalle en la realización 4 a continuación. Como alternativa, la bacteriocina se produce mediante un procedimiento artificial utilizado convencionalmente en la técnica, tales como el procedimiento de síntesis de péptidos, el procedimiento de ingeniería genética o similares. El procedimiento de ingeniería genética se describe en detalle en la realización 3 a continuación.

Los ejemplos del procedimiento de síntesis de péptidos incluyen el procedimiento en fase líquida y el procedimiento en fase sólida. El procedimiento en fase líquida es un procedimiento en el que la reacción se lleva a cabo en el estado de solución y el producto se aísla/purifica de la mezcla de reacción, utilizando a continuación el producto como un intermediario para la posterior reacción de elongación del péptido. Por otro lado, el procedimiento en fase sólida es un procedimiento en el que los aminoácidos se unen a un vehículo sólido que es insoluble al disolvente de reacción, y la reacción de condensación con estos aminoácidos se lleva a cabo secuencialmente para alargar la cadena peptídica.

De manera más específica, en la síntesis de péptidos, un aminoácido que tiene un grupo carboxilo protegido se une a un aminoácido que tiene un grupo amino protegido por condensación de deshidratación, para formar un enlace peptídico. Posteriormente, el grupo protector de amino se elimina, y el siguiente aminoácido que tiene un grupo amino protegido se une al grupo amino libre. La etapa se repite de manera tal que el péptido se alarga secuencialmente desde el extremo C hasta el extremo N. En la reacción de condensación de deshidratación, el grupo carboxilo se activa y se deja reaccionar con el grupo amino que se une. Los ejemplos del procedimiento para la activación incluyen el procedimiento de diciclohexilcarbodiimida (DCC), el procedimiento de éster activo, el procedimiento de anhídrido de ácido y el procedimiento de azida. El procedimiento se selecciona apropiadamente teniendo en cuenta la reactividad, la racemización y otras reacciones secundarias. Para prevenir reacciones secundarias durante la reacción de condensación, se introducen grupos protectores en el grupo amino, grupo carboxilo y/o grupos funcionales en la cadena lateral del aminoácido. Preferentemente, estos grupos protectores son estables en las condiciones de la reacción de condensación y pueden eliminarse rápidamente cuando sea necesario. Además, preferentemente, el grupo protector para el grupo amino y el grupo protector para el grupo carboxilo pueden eliminarse selectivamente entre ellos.

Los ejemplos del grupo protector para el grupo amino incluyen benciloxicarbonilo (Bz), t-butiloxicarbonilo (Boc), p-bifenilisopropiloxicarbonilo y 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc). Los ejemplos del grupo protector para el grupo carboxilo incluyen grupos capaces de formar un éster alquílico, éster bencílico o similares.

Sin embargo, en el procedimiento en fase sólida, el grupo carboxilo en el extremo C se une a un vehículo tal como una resina de clorotritilo, resina de clorometilo, resina de oximetilo o resina de p-alcoyibencilalaochol, de modo que la reacción de condensación se lleva a cabo preferentemente en presencia de agente de condensación, como la carbodiimida, o usando un éster activado de aminoácido N-prottegido o un éster activado de péptido. Después de completarse la reacción de condensación, se elimina el grupo protector. En el procedimiento en fase sólida, también se escinde el enlace entre el extremo C del péptido y la resina. Posteriormente, el péptido sintetizado químicamente se somete opcionalmente a, por ejemplo, purificación/análisis por cromatografía de intercambio iónico, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), cromatografía de fase inversa, cromatografía de afinidad, procedimiento de

degradación de Edman, cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC- MS) y/o similares.

Es posible usar la bacteriocina producida por tal procedimiento de síntesis de péptidos o por el procedimiento descrito más adelante utilizando el procedimiento de ingeniería genética y la cepa *Lactobacillus rhamnosus* KO1 o la cepa KO3, o un derivado farmacéuticamente aceptable de la bacteriocina, como un componente eficaz de la composición para profilaxis, mejoría y/o terapia de las enfermedades orales descritas a continuación.

(Composición para profilaxis, mejoría y/o terapia de enfermedades orales)

Se describe una composición para profilaxis, mejoría y/o terapia de enfermedades orales, composición que comprende la bacteriocina descrita anteriormente o un derivado farmacéuticamente aceptable o similar de la bacteriocina como componente eficaz. Debido a que la composición para profilaxis, mejoría y/o terapia de enfermedades orales comprende la bacteriocina o un derivado farmacéuticamente aceptable o similar de la bacteriocina como componente eficaz, la composición tiene características similares.

En resumen, las secuencias de aminoácidos de las bacteriocinas Kog1 y Kog2 y las características de las secuencias de aminoácidos son las siguientes. Las secuencias de aminoácidos tienen característicamente aminoácidos básicos y aminoácidos hidrófobos en altas proporciones. Debido a que dichas características son similares a las características de los péptidos antimicrobianos derivados de mamíferos, es menos probable que se produzcan microorganismos resistentes. Además, debido a que el punto isoelectrico no es inferior a 12 y el péptido antimicrobiano tiene una basicidad alta, la citotoxicidad del péptido es baja. Además, como se describe en los Ejemplos a continuación, el péptido tiene una excelente actividad antimicrobiana. Para detalles de tales efectos de Kog1 o Kog2, véanse los Ejemplos a continuación.

En la presente memoria descriptiva, la expresión "enfermedades orales" significa enfermedades en la cavidad oral causadas por bacterias cariogénicas, bacterias de enfermedades periodontales, *Candida* y/o similares. Los ejemplos específicos de las enfermedades orales incluyen la caries dental (diente malo), gingivitis, periodontitis, glositis, afta y queilitis angular.

Los ejemplos de bacterias cariogénicas incluyen *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*. Los ejemplos de bacterias de las enfermedades periodontales incluyen *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Hudo001, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythensis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y *Fusobacterium nucleatum*. Los ejemplos de *Candida* incluyen *Candida albicans*, *Candida glabrata* y *Candida tropicalis*.

En la presente memoria descriptiva, la expresión "composición para profilaxis, mejoría y/o terapia de enfermedades orales" significa preferentemente una composición que actúa como un inhibidor del crecimiento de bacterias cariogénicas, bacterias de enfermedades periodontales y/o *Candida*. Los ejemplos específicos de la composición descrita incluyen alimentos, productos farmacéuticos y composiciones orales que son capaces de suprimir el crecimiento de bacterias cariogénicas, bacterias de enfermedades periodontales y/o *Candida*.

De manera más específica, los ejemplos de los alimentos incluyen alimentos saludables, suplementos, alimentos saludables específicos, bebidas lácteas, yogures y quesos destinados a profilaxis/mejoría de la caries dental, periodontitis, infecciones orales y similares. Los ejemplos de los productos farmacéuticos incluyen líquidos, píldoras, gránulos, gránulos sutiles, polvos, comprimidos, cápsulas, sprays orales y trociscos. El modo de administración es preferentemente la administración oral. Los ejemplos de composiciones orales incluyen agentes de enjuague bucal, enjuagues bucales, pastas dentales, polvos dentales, líquidos dentales, ungüentos orales, geles, píldoras, gránulos, gránulos sutiles, gominolas, trociscos, comprimidos, cápsulas, caramelos y chicles.

La composición descrita para profilaxis, mejoría y/o terapia de enfermedades orales se combina opcionalmente con otras composiciones farmacéuticamente aceptables para preparar diversos alimentos, productos farmacéuticos, composiciones orales y similares. Además, la bacteriocina y la composición se usan opcionalmente en forma de un derivado o sal.

Los ejemplos del derivado incluyen derivados peptídicos tales como productos de sustitución parcial y compuestos de adición de bacteriocina. Los ejemplos específicos del derivado incluyen derivados producidos por amidación o acilación de un grupo carboxilo. Los ejemplos de la forma de la sal incluyen sales de ácidos inorgánicos tales como sal de ácido clorhídrico, sal de ácido nítrico y sal de ácido bromhídrico; y sales de ácidos orgánicos tales como sal de ácido p-toluensulfónico, sal de ácido metanosulfónico, sal de ácido fumárico, sal de ácido succínico y ácido láctico.

Además, en los alimentos, productos farmacéuticos y composiciones orales, es posible ajustar adecuadamente el contenido y la dosis diaria de la bacteriocina como un componente eficaz en función del tipo de composición.

(Gen)

También se describe un gen que codifica la bacteriocina. Los ejemplos específicos del gen incluyen genes y polinucleótidos que tienen la secuencia de bases mostrada en la SEQ ID NO: 3 (Kog1) o en la SEQ ID NO: 4 (Kog2) (y/o la cadena complementaria de la misma).

El experto en la materia puede separar, purificar y extraer el ADN de un gen de este tipo que tiene la secuencia de bases que se muestra en la SEQ ID NO: 3 (Kog1) o en la SEQ ID NO: 4 (Kog2) de la cepa *Lactobacillus rhamnosus* KO1 o KO3 utilizando un procedimiento convencional. Otro posible ejemplo del procedimiento es la síntesis artificial del ADN utilizando un kit de síntesis de ADN o similar.

5 (Vector de Expresión Recombinante)

Es posible usar la secuencia génica que se separó y purificó, o se produjo mediante síntesis de ADN usando un kit o similar, para que un vector de expresión recombinante se use para producir la bacteriocina por el procedimiento de ingeniería genética. Además, se describe un vector de expresión recombinante obtenido por incorporación del gen mencionado anteriormente. Los ejemplos del procedimiento de recombinación incluyen un procedimiento arbitrario utilizado por el experto. En el procedimiento de construcción del vector de expresión recombinante, primero se realiza la síntesis de un gen que tiene la secuencia de bases que se muestra en la SEQ ID NO:3 (Kog1) o la SEQ ID NO:4 (Kog2). Posteriormente, se construye un vector de expresión recombinante que comprende una construcción génica para la expresión, cuya construcción comprende el gen sintetizado y varios elementos reguladores para la expresión del gen en la célula hospedadora (un promotor, un sitio de unión al ribosoma, un terminador, un potenciador y/o varios elementos cis para regular el nivel de expresión), en función de la célula hospedadora.

(Célula Hospedadora, Transformante)

El vector de expresión recombinante así construido se introduce en una célula hospedadora predeterminada, de modo que es posible la expresión del gen. Los ejemplos del procedimiento de introducción incluyen un procedimiento arbitrario utilizado por el experto. Se describe adicionalmente una célula hospedadora que comprende el vector de expresión recombinante. La célula hospedadora es preferentemente una bacteria. Los ejemplos de la célula hospedadora incluyen bacterias del ácido láctico, *E. Coli* y levaduras. Además, se describe un transformante, que se produce por transformación con el vector de expresión recombinante. Es decir, los ejemplos del transformante incluyen una célula transformada producida por la transformación de la célula hospedadora que tiene el vector de expresión recombinante. El transformante es preferentemente una bacteria. Los ejemplos del transformante incluyen bacterias del ácido láctico, *E. Coli* y levaduras. Las bacterias se cultivan en condiciones predeterminadas. El procedimiento anterior permite la expresión y producción de la bacteriocina en la célula hospedadora (bacteria), y la extracción y purificación simple y a gran escala de la bacteriocina. Para detalles del procedimiento de producción, véase la realización 2 descrita más adelante, en la que la bacteria de ácido láctico *Lactobacillus rhamnosus* se cultiva mediante casi el mismo procedimiento.

30 (procedimiento de Producción de Bacteriocina)

La presente invención se refiere a un procedimiento para producir la bacteriocina usando *Lactobacillus rhamnosus*.

De manera más específica, el procedimiento de producción comprende la etapa de cultivar *Lactobacillus rhamnosus* y la etapa de extraer la bacteriocina de un cultivo de células bacterianas obtenido por la etapa de cultivo. El *Lactobacillus rhamnosus* es preferentemente la cepa *Lactobacillus rhamnosus* KO3 y/o la nueva cepa bacteriana de ácido láctico, la cepa *Lactobacillus rhamnosus* KO1.

Por ejemplo, la cepa KO1 y la cepa *Lactobacillus rhamnosus* KO3 se inoculan en medio MRS esterilizado a 121 °C durante 20 minutos o similar, y se precultivan a 37 °C durante 48 horas en aire, seguido de lavado con agua destilada, agua ultrapura, tampón o similares y a continuación la centrifugación para la recolección de las células, para obtener células bacterianas.

40 Debido a que la cepa *Lactobacillus rhamnosus* KO1 y la cepa KO3 producen Kog1 y Kog2, se sugiere que se producen Kog1 y Kog2 siempre que la cepa bacteriana pertenece a la especie *Lactobacillus rhamnosus*. Por lo tanto, el cultivo a gran escala de una cepa bacteriana que pertenece a la especie *Lactobacillus rhamnosus* y el uso de un procedimiento convencional para la extracción de proteínas en la técnica (por ejemplo, homogeneización celular) permite la producción simple y en masa de los péptidos Kog1 y Kog2.

45 En la etapa de cultivo, es posible utilizar diversos medios, como medios de zumos de frutas, medios de zumos vegetales, medios de leche, medios de leche en polvo sin grasa, medios que contienen un componente de leche y medios semisintéticos que no contienen componentes de leche. Los ejemplos específicos de los medios incluyen medios de leche desnatada reconstituidos preparados por reconstitución y esterilización por calor de una leche desnatada; medios de leche seca sin grasa suplementados con un extracto de levadura; medios MRS; y medios GAM.

55 El procedimiento de cultivo no está limitado siempre que el cultivo sea, por ejemplo, cultivo estático, cultivo neutralizante a un pH constante, cultivo de rotación o cultivo continuo que se lleve a cabo en condiciones en las que el *Lactobacillus rhamnosus* crece bien. Los detalles de las propiedades bacteriológicas de la cepa *Lactobacillus rhamnosus* KO3 son casi los mismos que los detalles de las propiedades bacteriológicas de la nueva cepa bacteriana de ácido láctico, la cepa *Lactobacillus rhamnosus* KO1, que se describe a continuación.

La adición de células inactivadas de *Candida* en la etapa de cultivo aumenta las cantidades de Kog1 y Kog2

obtenidas, lo que se prefiere (véase Ejemplo 6).

(Cepa *Lactobacillus rhamnosus* KO1)

5 La cepa *Lactobacillus rhamnosus* KO1 (depositada ante el Patent Microorganisms Depositary, National Institute of Technology and Evaluation bajo el número de registro NITE P-1065 por solicitud el 24 de enero de 2011) es una cepa bacteriana de ácido láctico recién separada de la cavidad oral de un ser humano e identificada por el presente inventor. De manera similar a la cepa *Lactobacillus rhamnosus* KO3, la cepa *Lactobacillus rhamnosus* KO1 se clasifica dentro de las especies de *Lactobacillus rhamnosus* que produce Kog1 y Kog2, pero la cepa *Lactobacillus rhamnosus* KO1 es una nueva cepa bacteriana de ácido láctico en la que los niveles de expresión de diversas proteínas y la información genómica son diferentes.

10 La cepa *Lactobacillus rhamnosus* KO1 se identificó como la especie *Lactobacillus rhamnosus* ya que la secuencia de bases del ARNr 16S en la cepa KO1 mostró una homología del 100% entre 1443/1443 con la secuencia de bases en la cepa *Lactobacillus rhamnosus* IDCC3201, y la cepa KO1 mostró apariencia de un bacilo Gram positivo al microscopio después de la tinción de Gram. La cepa *Lactobacillus rhamnosus* KO1 tiene las propiedades bacteriológicas de: ser un bacilo de ácido láctico Gram positivo; ser capaz de fermentar el ácido homoláctico; ser catalasa negativo; no tener capacidad de formación de esporas; ser capaz de crecer en condiciones aeróbicas; y formar polisacáridos extracelulares.

Como se describió anteriormente, el cultivo de la nueva cepa bacteriana de ácido láctico de la realización 3, la cepa *Lactobacillus rhamnosus* KO1, permite la extracción simple y en masa de los péptidos antimicrobianos básicos, es decir, Kog1 y Kog2, de un cultivo bacteriano obtenido por el cultivo, en el que la cepa es eficaz.

20 **Ejemplos**

La presente invención se describe a continuación con más detalle a modo de ejemplos. Sin embargo, la presente invención no queda limitada por los Ejemplos.

(Ejemplo de Preparación)

25 En el presente ejemplo de preparación, se describen procedimientos para la preparación y cultivo de cepas de ensayo.

Se utilizaron como la *Candida*, bacterias cariogénicas y bacterias de enfermedades periodontales, la cepa *Candida albicans* GDH18, la cepa *Streptococcus sobrinus* B-13, la cepa *Streptococcus mutans* NCTC10449, la cepa *Streptococcus mutans* Ingbritt, la cepa *Porphyromonas gingivalis* Hudoio001 y la cepa *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Hudoe001. Las pruebas fueron proporcionadas por la Facultad de Odontología, Universidad de Hiroshima, Japón y el Hospital Dental de la Universidad de Hiroshima.

30 La cepa *Candida albicans* GDH18 se cultivó previamente utilizando medio SD (Difco) a 37 °C durante 24 horas en condiciones aeróbicas. La cepa *Streptococcus sobrinus* B-13, la cepa *Streptococcus mutans* NCTC 10449 y la cepa *Streptococcus mutans* Ingbritt se cultivaron previamente utilizando medio TSB (Difco) suplementado con extracto de levadura al 5% (Difco) a 37 °C durante 24 horas en condiciones aeróbicas. La cepa *Porphyromonas gingivalis* Hudoio001 y la cepa *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Hudoe001 se cultivaron previamente utilizando medio BHI (Difco) suplementado con hemina (5 mg l) y vitamina K3 (1 mg l) a 37 °C durante 96 horas en condiciones anaeróbicas con el sistema Anaero Pack. (Mitsubishi Gas Chemical Company, Inc.).

40 Después del cultivo, las células de *Candida*, las bacterias cariogénicas y las bacterias de enfermedades periodontales se recolectaron mediante centrifugación a 1000 xg y se lavaron dos veces con tampón fosfato 1 mM (pH 6,8). Las células se suspendieron de manera tal que la concentración final fue de 1×10^8 ufc/ml o 1×10^7 células/ml. Para la suspensión de las cepas de *Streptococcus*, también se llevó a cabo un tratamiento ultrasónico.

(Ejemplo 1)

El Ejemplo 1 se refiere a la síntesis de Kog1 y Kog2.

45 En primer lugar, para confirmar la función como bacteriocina, Kog1 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 y Kog2 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 se sintetizaron mediante el procedimiento de la bolsa de té (procedimiento de Helmerhorst y otros (1999).)) utilizando 9-fluorenilmetiloxycarbonilo como grupo protector y alcohol p-benciloxibencílico como resina. Después de completar un péptido antimicrobiano básico, la escisión de la resina y la desprotección de la cadena lateral se llevaron a cabo utilizando la mezcla de 5% de tianisol, 5% de fenol, 5% de agua purificada y 85% de ácido trifluoroacético.

50 Basándose en la medición del punto isoeléctrico (pI) y el peso molecular (PM) de cada uno de los Kog1 y Kog2 sintetizados, Kog1 tuvo un pI de 12,90 y un PM de 5485,5, y Kog2 tuvo un pI de 12,38 y un PM de 4686,6. Entre los péptidos antimicrobianos, la hBD2 (β -defensina-2 humana (véase Eur J., 2002, Oral Sci. (109), 121-124)) es bien conocido como un péptido antimicrobiano básico, y tiene un punto isoeléctrico de aproximadamente 10. Sin embargo, los puntos isoeléctricos de Kog1 y Kog2 de la realización 2 fueron más altos que el punto isoeléctrico de

hBD2, y más similares a los puntos isoeléctricos de péptidos antimicrobianos derivados de mamíferos. Por lo tanto, se confirmó que Kog1 y Kog2 tienen menos citotoxicidad.

La purificación y el análisis de la pureza de cada péptido sintetizado se llevaron a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución y cromatografía de fase inversa. El peso molecular se investigó con un espectrómetro de masas (MALDI-TOF).

(Ejemplo 2)

El ejemplo 2 se refiere al análisis de las actividades antimicrobianas de Kog1 y Kog2 contra la cepa *Candida albicans* GDH18.

La evaluación de la actividad antimicrobiana se llevó a cabo mediante el procedimiento de Edgerton y otros (1998) con algunas modificaciones. Se mezclaron 20 µl de la suspensión de la cepa *Candida albicans* GDH18 cultivada y preparada mediante el procedimiento descrito en el Ejemplo de preparación anterior con 20 ml de tampón fosfato 1 mM que contenía Kog1 o Kog2 de 0 a 25 µM sintetizados en el Ejemplo 1 y la mezcla resultante se incubó a 37 °C durante 90 minutos con agitación.

Como control, se utilizaron 20 ml de tampón fosfato 1 mM solo. La reacción se detuvo mediante la adición de 360 ml de medio YNB (Difco), y el número de colonias formadas (unidades formadoras de colonias; UFC) se contó junto con el número de colonias en el control, para determinar el porcentaje de células bacterianas vivas. Es decir, se utilizó la ecuación de: $(\text{UFC de la suspensión que contenía Kog1 o Kog2} / \text{UFC ml}^{-1} \text{ de la suspensión de control}) \times 100$ para calcular el porcentaje.

La FIG. 1 es un diagrama que muestra la actividad antimicrobiana de Kog1 a concentraciones de 0,39 a 25 µM contra la cepa *Candida albicans* GDH18 observada en el Ejemplo 2. La FIG. 2 es un diagrama que muestra la actividad antimicrobiana de Kog2 a concentraciones de 0,39 a 12 µM contra la cepa *Candida albicans* GDH18 observada en el Ejemplo 2. Como se muestra en la FIG. 1 y la FIG. 2, el 100% de la cepa *Candida albicans* GDH18 se destruyó a una concentración de péptido de 0,39 µM tanto en Kog1 como en Kog2.

Por el mismo procedimiento y en las mismas condiciones, la anfotericina B, que es un agente antifúngico; la lactoferrina B, que es un péptido antimicrobiano derivado de la leche (que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 5); histatina 5, que es un péptido antimicrobiano derivado de la saliva humana (que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 6); y JH8194, que es un péptido antimicrobiano de JP 3472821 B (que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID N.O: 7); se sometieron a medición de la actividad antimicrobiana. Como resultado, los agentes/péptidos anteriores destruyeron el 100% de la cepa en concentraciones de 5 µM, 5 µM, 100 µM y 2,5 µM, respectivamente. La síntesis de los péptidos se llevó a cabo mediante el procedimiento de la bolsa de té como en el Ejemplo 1.

A partir de los resultados anteriores, se demostró que los péptidos antimicrobianos Kog1 y Kog2 son capaces de destruir *Candida* incluso en los casos en que los péptidos se usan a una concentración más baja, es decir, en una cantidad menor, en comparación con cualquiera de los agentes antifúngicos y péptidos antimicrobianos anteriores.

(Ejemplo 3)

El ejemplo 3 se refiere al análisis de las actividades antimicrobianas de Kog1 y Kog2 contra la cepa *Streptococcus sobrinus* B-13. De manera más específica, el ejemplo 3 es un ejemplo en el que las actividades antimicrobianas de Kog1 y Kog2 se compararon con las actividades antimicrobianas de hBD2 y de la proteína de lisozima (lisozima).

La cepa *Streptococcus sobrinus* B-13 se cultivó y preparó preliminarmente mediante el procedimiento descrito en el Ejemplo de preparación. La evaluación de la actividad antimicrobiana se llevó a cabo por el mismo procedimiento que en el Ejemplo 2 anterior. La evaluación se llevó a cabo en los casos en que la concentración de cada péptido antimicrobiano fue de 0 a 100 µM.

La FIG. 3 es un diagrama que muestra las actividades antimicrobianas de Kog1, Kog2 y los otros péptidos antimicrobianos contra la cepa *Streptococcus sobrinus* B-13 observadas en el Ejemplo 3. Las concentraciones de péptidos se representan en una escala logarítmica en la abscisa ("Concentración de péptido") en la FIG. 3. Como se muestra en la FIG. 3, hBD2 destruyó el 100% de la cepa *Streptococcus sobrinus* B-13 a una concentración de péptido de 3,125 µM. La proteína lisozima no pudo destruir por completo la cepa *Streptococcus sobrinus* B-13. Por otro lado, Kog1 y Kog2 destruyeron el 100% de la cepa *Streptococcus sobrinus* B-13 a concentraciones de 1,56 µM y 0,39 µM, respectivamente. Por lo tanto, se demostró que Kog1 y Kog2 también son capaces de destruir la cepa *Streptococcus sobrinus* B-13 incluso en los casos en que los péptidos se usan a baja concentración.

(Ejemplo 4)

El ejemplo 4 se refiere al análisis de las actividades antimicrobianas de Kog1 y Kog2 contra la bacteria *Streptococcus mutans*. De manera más específica, de manera similar al Ejemplo 3 anterior, el ejemplo 4 es un ejemplo en el que las actividades antimicrobianas de Kog1 y Kog2 se compararon con las actividades

antimicrobianas de hBD2 y de la proteína de lisozima (lisozima).

La cepa *Streptococcus mutans* NCTC10449 y la cepa *Streptococcus mutans* Ingbritt se cultivaron y prepararon preliminarmente mediante el procedimiento descrito en el Ejemplo de preparación. La evaluación y comparación de la actividad antimicrobiana se llevó a cabo por el mismo procedimiento que en el Ejemplo 3 anterior. La evaluación y comparación se llevaron a cabo en los casos en que la concentración de péptido antimicrobiano fue de 0 a 100 μM para ambas cepas de *Streptococcus mutans*.

la FIG. 4 es un diagrama que muestra las actividades antimicrobianas de Kog1, Kog2 y los otros péptidos antimicrobianos contra la cepa *Streptococcus mutans* NCTC 10449 observadas en el Ejemplo 4. la FIG. 5 es un diagrama que muestra las actividades antimicrobianas de Kog1, Kog2 y los otros péptidos antimicrobianos contra la cepa *Streptococcus mutans* Ingbritt observadas en el Ejemplo 4. Las concentraciones de péptidos se representan en una escala logarítmica en la abscisa ("Concentración de péptido") en la FIG. 4 y la FIG. 5. Como se muestra en la FIG. 4 y FIG. 5, Kog1 y Kog2 se evaluaron como capaces de destruir una mayor cantidad de *Streptococcus mutans* incluso a una concentración de péptidos relativamente baja en comparación con los otros péptidos antimicrobianos.

Además, aunque no se muestra en las figuras, Kog1 y Kog2 también se evaluaron como capaces de ejercer actividad antimicrobiana contra la cepa *Porphyromonas gingivalis* Hudo01. Tal resultado también se sugiere, por el hecho evaluado y descrito en los Ejemplos en la Referencia de patente 1, que la cepa *Lactobacillus rhamnosus* KO3, que fue descubierta por el presente inventor, también ejerce actividad antimicrobiana contra la cepa *Porphyromonas gingivalis* Hudo01. Es decir, se supone que, en los Ejemplos descritos en la Referencia de patente 1, la cepa *Lactobacillus rhamnosus* KO3 expresó Kog1 y Kog2 y la Kog1 y Kog2 expresadas ejercieron actividad antimicrobiana contra la cepa *Porphyromonas gingivalis* Hudo01. En vista de los hechos anteriores, se supone que Kog1 y Kog2 ejercen una actividad antimicrobiana similar también contra otras cepas de *Porphyromonas gingivalis* (bacterias de enfermedades periodontales y similares).

(Ejemplo 5)

Además, el presente inventor también analizó la actividad antimicrobiana contra otra bacteria de enfermedades periodontales. El Ejemplo 5 se refiere al análisis de las actividades antimicrobianas de las bacteriocinas Kog1 y Kog2 contra la cepa de la bacteria de enfermedades periodontales *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Hudo01. De manera más específica, El ejemplo 5 muestra un ejemplo en el que las actividades antimicrobianas de Kog1 y Kog2 se compararon nuevamente con las actividades antimicrobianas de hBD2 e histatina 5, y adicionalmente con las actividades antimicrobianas de la lactoferrina B y la lactoferrina H (lactoferrina derivada humana).

La cepa *Streptococcus sobrinus* Hudo01 se cultivó y preparó preliminarmente mediante el procedimiento descrito en el Ejemplo de preparación. La evaluación y comparación de la actividad antimicrobiana se llevó a cabo por el mismo procedimiento que en el Ejemplo 3 anterior. La evaluación y la comparación se llevaron a cabo en los casos en que la concentración de cada péptido antimicrobiano fue de 0 a 50 μM .

la FIG. 6 es un diagrama que muestra las actividades antimicrobianas de Kog1, Kog2 y los otros péptidos antimicrobianos contra la cepa *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Hudo01 observadas en el Ejemplo 5. Las concentraciones de péptidos se representan en una escala logarítmica en la abscisa ("Concentración de péptido") en la FIG. 6. Como se muestra en la FIG. 6, Kog1 y Kog2 destruyeron el 100% de la cepa *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Hudo01 a concentraciones de péptidos de 3,13 μM y 1,56 μM , respectivamente. Las actividades antimicrobianas observadas son equivalentes o superiores a las actividades antimicrobianas de la lactoferrina B y la hBD2.

(Ejemplo 6)

El Ejemplo 6 se refiere al cultivo de la cepa *Lactobacillus rhamnosus* KO1 que se llevó a cabo mientras se añadían células inactivadas de *Candida*. De manera más específica, la cepa *Lactobacillus rhamnosus* KO1 se cultivó en ausencia y en presencia de células inactivadas de la cepa *Candida albicans* GDH18, y se midieron los niveles de expresión de Kog1 y Kog2 mediante el sistema de micromatrices de ADN.

En primer lugar, se inocularon 20 μl de una suspensión de la cepa *Lactobacillus rhamnosus* KO1 en 5 ml de medio MRS que contenía 0, 2, 4 o 6 μg de células inactivadas de la cepa *Candida albicans* GDH18, y el líquido de cultivo resultante se incubó a 37 °C durante 48 horas. Inmediatamente después, las células bacterianas se suspendieron en 100 ml de reactivo RNAprotect (Qiagen) y 900 ml de rifampicina (25 mg/ml, en metanol) (Sigma-Aldrich). Posteriormente, la suspensión resultante se agitó en vórtex durante 15 minutos y a continuación se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después de los tratamientos, las células bacterianas se recogieron mediante centrifugación y el sobrenadante se descartó, seguido de almacenamiento del sedimento obtenido a -20 °C. A partir del sedimento almacenado, se realizó la purificación utilizando un kit de extracción de ARN. Después de tal tratamiento, se llevó a cabo El análisis estadístico de los datos de micromatrices utilizando el software NimbleGen para el análisis de micromatrices.

La FIG. 7 es un diagrama que muestra el nivel de expresión de Kog1 en la cepa *Lactobacillus rhamnosus* KO1 después de la adición de células inactivadas de *Candida* según lo observado por la micromatriz de ADN en el

Ejemplo 6. La FIG. 8 es un diagrama que muestra el nivel de expresión de Kog2 en la cepa *Lactobacillus rhamnosus* KO1 después de la adición de células inactivadas de *Candida* según lo observado por la micromatriz de ADN en el Ejemplo 6. Como se muestra en la FIG. 7 y FIG. 8, en contraste con el caso mostrado en el extremo izquierdo en el que el cultivo se llevó a cabo solo con la cepa KO1, el cultivo de la cepa en la coexistencia de células inactivadas de *Candida* (CaGDH18) dio como resultado aumentos en los niveles de expresión tanto de Kog1 como de Kog2 dependiendo de la cantidad de células inactivadas (2, 4 y 6 µg desde la izquierda).

A partir de los resultados anteriores de los Ejemplos, se demostró que el cultivo de la cepa *Lactobacillus rhamnosus* KO1, que es una nueva cepa bacteriana de ácido láctico, o la cepa *Lactobacillus rhamnosus* KO3, que produce de manera similar Kog1 y Kog2, permite la producción simple y en masa de bacteriocinas Kog1 y Kog2, que tienen amplios espectros antimicrobianos (bacterias cariogénicas, bacterias de enfermedades periodontales y *Candida*) y tienen menos probabilidades de producir microorganismos resistentes, mientras que tienen puntos isoeléctricos de no menos de 12. Además, se sugiere que la producción simple y en masa de las bacteriocinas Kog1 y Kog2 también es posible en otras cepas de *Lactobacillus rhamnosus*. Además, a partir de los resultados anteriores, es evidente para el experto en la materia que el cultivo de una bacteria tal como una bacteria de ácido láctico o *E. coli* producida por transformación con un vector de expresión recombinante obtenido mediante la incorporación de un gen que codifica la bacteriocina Kog1 o Kog2, también permite la producción simple y en masa de la bacteriocina Kog1 o Kog2, que tiene una excelente actividad antimicrobiana.

(Ejemplo 7)

En el Ejemplo 7, se estudiaron los amplios espectros antimicrobianos de las bacteriocinas Kog1 y Kog2 y la improbabilidad de producción de microorganismos resistentes debido a los puntos isoeléctricos básicos de las bacteriocinas Kog1 y Kog2, que se demostraron en los Ejemplos 1 a 6. El presente inventor predijo que las bacteriocinas Kog1 y Kog2 inactivan el LPS de las bacterias gram negativas, tales como las bacterias de enfermedades periodontales y analizó la relación entre el LPS y las bacteriocinas Kog1 y Kog2.

Como medio, se usó medio RPMI 1640 suplementado con FBS al 10% (suero bovino fetal)(Biological industries, Haemek, Israel), antibiótico al 1% y L-glutamina al 1%. En cada pocillo de una placa de 24 pocillos, se colocaron 400 µl del medio y se inocularon 100.000 células/pocillo de células de tipo macrófago RAW264.7 derivadas de ratón.

La bacteriocina Kog1 o Kog2, que fue la misma que en el Ejemplo 1, se incubó en un tubo Eppendorf en cada una de las siguientes 4 condiciones junto con LPS de *Porphyromonas gingivalis* (fabricado por InvivoGen) (en lo sucesivo denominado P. g-LPS) y en el mismo medio como se describe anteriormente, a 37 °C en una fase gaseosa de CO₂ al 5% durante 2 horas: (1) control positivo de 100 ng/ml de P.g-LPS; (2) 100 ng/ml de P.g-LPS + 5 µM Kog1 o Kog2; (3) 100 ng/ml de P.g-LPS + 10 µM Kog1 o Kog2; (4) 100 ng/ml de P.g-LPS + 20 µM Kog1 o Kog2.

El medio descrito anteriormente colocado en cada pocillo de la placa de 24 pocillos se eliminó utilizando un pipetero, y el medio en el tubo Eppendorf para cada una de las 4 condiciones descritas anteriormente se colocó en la placa, seguido del cultivo de las células en la placa de pocillos a 37 °C en una fase gaseosa CO₂ al 5% durante 12 horas. Posteriormente, se recogió el sobrenadante del cultivo y se cuantificó la cantidad de una quimioquina ccl2 o la cantidad de una citoquina TNF-α secretada en el medio mediante el procedimiento ELISA mediante la medición de la absorbancia a 450 nm utilizando un lector de microplacas. Debido a que tanto ccl2 como TNF-α participan en la formación de la inflamación, es posible el análisis de la relación entre la endotoxina LPS y las bacteriocinas Kog1 y Kog2.

La FIG. 9 es un diagrama que muestra la relación entre las cantidades de LPS y Kog1 y la cantidad de secreción de ccl2 observada en el Ejemplo 7. Es decir, la FIG. 9 muestra la cantidad de quimioquina ccl2 secretada en los casos en que la incubación se llevó a cabo utilizando LPS y Kog1 durante 2 horas (la cantidad observada con Kog1 0 µM se considera como 100%) ("LPS + kog1 → ccl2 celular"). En la FIG. 9, * (nivel de significancia) = p < 0,05, ** (nivel de significancia) = p < 0,01 y n=3. Como se muestra en la FIG. 9, a medida que aumentaba la cantidad de Kog1 añadida, disminuía la cantidad de quimioquina ccl2 secretada. Es decir, se reveló que la bacteriocina Kog1 tiene una acción para inactivar el LPS.

La FIG. 10 es un diagrama que muestra la relación entre las cantidades de LPS y Kog1 y la cantidad de secreción de TNF-α observada en el Ejemplo 7. Es decir, la FIG. 10 muestra la cantidad de citoquina TNF-α secretada en los casos en que la incubación se llevó a cabo utilizando LPS y Kog1 durante 2 horas (la cantidad observada con Kog1 0 µM se considera como 100%) ("LPS + kog1 → TNF-α celular"). En la FIG. 10, ** (nivel de significancia) = p < 0,01 y n=3. Como se muestra en la FIG. 10, a medida que aumentaba la cantidad de Kog1 añadida, disminuía la cantidad de citoquina TNF-α secretada. Es decir, de manera similar a los resultados mostrados en la FIG. 9, se reveló que la bacteriocina Kog1 tiene una acción para inactivar el LPS.

La FIG. 11 es un diagrama que muestra la relación entre las cantidades de LPS y Kog2 y la cantidad de secreción de ccl2 observada en el Ejemplo 7. Es decir, la FIG. 11 muestra la cantidad de quimioquina ccl2 secretada en los casos en que la incubación se llevó a cabo utilizando LPS y Kog2 durante 2 horas (la cantidad observada con Kog2 0 µM se considera como 100%) ("LPS + kog2 → ccl2 celular"). En la FIG. 11, * (nivel de significancia) = p < 0,05, ** (nivel de significancia) = p < 0,01 y n=3. Se sugiere, como se muestra en la FIG. 11, que la cantidad de quimioquina ccl2

secretada aumenta cuando la cantidad de Kog2 añadida es pequeña (5 μM), pero, cuando la cantidad de Kog2 añadida excede un cierto nivel, la cantidad de ccl2 disminuye a medida que aumenta la cantidad de Kog2 añadida. Es decir, se reveló que Kog2, cuando se añade en una gran cantidad, también tiene una acción para inactivar el LPS.

5 La FIG. 12 es un diagrama que muestra la relación entre las cantidades de LPS y Kog2 y la cantidad de secreción de TNF- α observada en el Ejemplo 7. Es decir, la FIG. 12 muestra la cantidad de la citoquina TNF- α secretada en los casos en que la incubación se llevó a cabo utilizando LPS y Kog2 durante 2 horas (la cantidad observada con Kog2 0 μM se considera como 100%) ("LPS + kog2 \rightarrow TNF- α celular"). En la FIG. 12, ** (nivel de significancia) = $p < 0,01$ y $n = 3$. Se sugiere, como se muestra en la FIG. 12, que la cantidad de la citoquina TNF- α secretada aumenta cuando la cantidad de Kog2 añadida es pequeña (5 μM), pero, cuando la cantidad de Kog2 añadida excede un cierto nivel, la cantidad de TNF- α disminuye a medida que aumenta la cantidad de Kog2 añadida. Es decir, de manera similar a los resultados mostrados en la FIG. 11, se reveló que Kog2, cuando se añade en una gran cantidad, tiene una acción para inactivar el LPS.

15 Por lo tanto, De los resultados de la FIG. 9 a la FIG. 12, quedó claro que la excelente actividad antimicrobiana y similares de las bacteriocinas Kog1 y Kog2 están asociadas, al menos, con la acción de las bacteriocinas Kog1 y Kog2 para inactivar el LPS. Además, el hecho de que las bacteriocinas Kog1 y Kog2 tengan la acción de inactivar el LPS sugiere una posible utilización de las bacteriocinas Kog1 y Kog2 en procedimientos profilácticos o terapéuticos para otras enfermedades en las que se conoce actualmente la implicación de la endotoxina LPS. Los ejemplos de tales enfermedades incluyen, además de las enfermedades bucales, resorción ósea, promoción de la inflamación crónica, hepatopatía, diabetes mellitus y arteriosclerosis. La FIG. 13 es un diagrama que muestra la asociación de LPS con diversas enfermedades causadas por el mismo. Como se muestra en la FIG.13, la endotoxina LPS está involucrada en muchas enfermedades y mecanismos terapéuticos a través de diversas sustancias.

(Ejemplo 8)

25 Por lo tanto, el presente inventor investigó si Kog2 influye o no, aparte de en las enfermedades orales, en la diferenciación en osteoblastos, mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real (transcriptasa inversa).

Se usaron células MC3T3-E1, que son células de tipo osteoblasto derivadas de ratón. Las células MC3T3-E1 se cultivaron en medio de Eagle modificado con α (a-MEM) suplementado con FBS al 10% (Biological industries, Haemek, Israel), L-glutamina, mezcla de antibióticos (Invitrogen), 50 $\mu\text{g/ml}$ de ácido ascórbico (Sigma) y Kog2 0 nM, 250 nM, 500 nM o 1000 nM, a 37 °C en CO_2 al 5% sobre plástico o titanio. De las células MC3T3-E1 cultivadas de este modo, se extrajo el ARN total utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen), y a continuación se preparó el ADNc utilizando la transcriptasa inversa ReverTra Ace (Toyobo Co., Ltd.). Posteriormente, el ADNc preparado se utilizó para analizar la expresión del colágeno de tipo I, que es un marcador de diferenciación para los osteoblastos, y de la β -actina, que es un control endógeno, mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real.

35 En la RT-PCR cuantitativa en tiempo real, el colágeno de tipo I se analizó utilizando el cebador directo que se muestra en la SEQ ID NO: 8, el cebador inverso que se muestra en la SEQ ID NO: 9 y la sonda que se muestra en la SEQ ID NO: 10. La β -actina se analizó utilizando el cebador directo que se muestra en la SEQ ID NO: 11, el cebador inverso que se muestra en la SEQ ID NO: 12 y la sonda que se muestra en la SEQ ID NO: 13.

40 La FIG. 14 es un diagrama que muestra el valor del colágeno de tipo I/ β -actina observado por la RT-PCR cuantitativa en tiempo real en el Ejemplo 8. Como se muestra en la FIG. 14, el valor del colágeno Tipo I β -actina fue 3 veces mayor en el caso en que se agregó Kog2 a 250 nM que en el caso en que no se agregó Kog2 (ctrl (0 μM)). Se encontró en el presente experimento que la adición de Kog2 a aproximadamente 250 nM promueve la diferenciación en osteoblastos. Es decir, se sugiere suficientemente que la bacteriocina Kog2 también es aplicable a diversas enfermedades óseas.

(Ejemplo 9)

45 Además, el presente inventor llevó a cabo un experimento de ebullición para investigar si las bacteriocinas Kog1 y Kog2 tienen o no actividad antimicrobiana después del calentamiento.

En el Ejemplo 9, se investigó la actividad antimicrobiana contra la cepa *Candida albicans* MYA274. La cepa *Candida albicans* MYA274 se precultivó en caldo de dextrosa Sabouraud (Difco) a 37 °C durante 24 horas y luego se lavó dos veces con agua MQ, seguido de una preparación tal que OD600 es 0,3 ($1,0 \times 10^7$ células/ml).

50 En el Ejemplo 9, la bacteriocina Kog1 o Kog2, o la cepa *Lactobacillus rhamnosus* KO1 o la cepa KO3, no se usaron directamente. En cambio, en el experimento se utilizó un medio de bacteria de ácido láctico que contiene la cepa *Lactobacillus rhamnosus* KO3, yogur 8020 (tipo líquido). De manera más específica, el yogur 8020 (tipo líquido) se preparó agregando la cepa *Lactobacillus rhamnosus* KO3 a una concentración del 1% e iniciador YF-L811 a una concentración del 1% al 15% de leche desnatada + medio de glucosa al 3%, y luego se realizó el cultivo 35 °C durante 2 días. Aún más específicamente, el yogur 8020 contenía un jarabe de maíz con alto contenido de fructosa, productos lácteos, azúcar, estabilizante (pectina), agente acidulante y saborizante como otros materiales, y se preparó de tal manera que el yogur 8020 tenía un brix del 17,4%, acidez de ácido láctico del 0,57%, pH de 3,96 y

sólidos lácteos no grasos del 3,0%.

Dicho yogur 8020 (tipo líquido) se centrifugó para obtener un sobrenadante del que se eliminó la bacteria del ácido láctico (en lo sucesivo denominado sobrenadante B). En el experimento, se utilizaron el sobrenadante B y una muestra preparada al hervir el sobrenadante B a 100 °C durante 20 minutos (en lo sucesivo denominado sobrenadante hervido). Se debe tener en cuenta que, basándose en los resultados de los Ejemplos anteriores, se considera que el sobrenadante B contiene las bacteriocinas Kog1 y Kog2 extraídas de la cepa *Lactobacillus rhamnosus* KO3.

Para estudiar los cambios en la actividad antimicrobiana por ebullición, los siguientes 3 tipos de muestras se colocaron en una placa de 24 pocillos y se midió el valor de ATP (pmol/) después de 24 horas de incubación a 37 °C. Los 3 tipos de muestras fueron: 1) una mezcla que contiene 1 ml de caldo Sabouraud, 1 ml de sobrenadante B y 50 µl del líquido preparado de la cepa *Candida albicans* MYA274; 2) una mezcla que contiene 1 ml de caldo Sabouraud, 1 ml de Sobrenadante Hervido y 50 µl del líquido preparado de la cepa *Candida albicans* MYA274; y 3) una mezcla de control que contiene 1 ml de caldo Sabouraud, 1 ml de leche desnatada al 15% + medio de glucosa al 3% y 50 µl del líquido preparado de la cepa MYA274 de *Candida albicans*.

La FIG. 15 es un diagrama que muestra los datos de resistencia al calor obtenidos por el experimento de ebullición en el Ejemplo 9. Los datos de resistencia al calor se basan en la media ± SD calculada para 4 repeticiones de cada muestra. Como se muestra en la FIG. 15, el nivel de ATP medido para Sobrenadante Hervido, preparado por 20 minutos de ebullición a 100 °C, fue similar al nivel de ATP medido para el sobrenadante B, por lo que se confirmó que incluso el Sobrenadante Hervido, preparado por ebullición, tiene una alta actividad antimicrobiana similar a Sobrenadante B. Es decir, se confirmó que las bacteriocinas Kog1 y Kog2 aún mantienen actividad antimicrobiana después del calentamiento.

La presente invención no está limitada por las explicaciones en las realizaciones y ejemplos descritos anteriormente. Varios modos modificados también se incluyen en la presente invención dentro del rango en el que los modos no se aparten de la descripción de las reivindicaciones y sean fácilmente inferidos por el experto.

El contenido de los documentos, las Publicaciones de Patentes Abiertas al Público y similares especificados en la presente descripción se citan aquí en su totalidad.

La presente solicitud se basa en la solicitud de patente japonesa número 2011-27882, presentada el 10 de febrero de 2011, y la solicitud de patente japonesa número 2011-184655, presentada el 26 de agosto de 2011. La memoria descriptiva, las reivindicaciones y los dibujos en la Solicitud de Patente Japonesa No. 2011-27882 y la Solicitud de Patente Japonesa No. 2011-184655 se han incorporado por referencia en el presente documento en su totalidad.

Aplicabilidad industrial

Los presentes inventores descubrieron que Kog1, que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 y Kog2, que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2, funcionan como bacteriocinas en la cepa *Lactobacillus rhamnosus* KO3 (La solicitud para el depósito de la cepa se presentó al Patent Microorganisms Depository, National Institute of Technology and Evaluation el 10 de junio de 2009 y se aceptó con el número de registro NITE BP-771), cuyas bacteriocinas tienen un amplio espectro antimicrobiano y una alta actividad antimicrobiana a baja concentración, y son menos propensos a producir microorganismos resistentes. Además, los presentes inventores lograron la separación e identificación de una nueva cepa bacteriana de ácido láctico que produce de manera similar Kog1 y Kog2, la cepa *Lactobacillus rhamnosus* KO1 (se presentó una solicitud de deposición de la cepa al Patent Microorganisms Depository, National Institute of Technology and Evaluation el 24 de enero de 2011, y se aceptó bajo el número de registro NITE P-1065).

Por lo tanto, el presente inventor es capaz de proporcionar una bacteriocina que sea fácil de producir en masa, bacteriocina que tiene un amplio espectro antimicrobiano y es menos probable que produzca microorganismos resistentes. Además, se describe una composición para profilaxis, mejoría y/o terapia de enfermedades orales que comprenden la bacteriocina (incluidos los derivados farmacéuticamente aceptables y similares de los mismos) como un componente eficaz, un gen que codifica la bacteriocina, un vector de expresión recombinante obtenido por incorporación del gen, una célula hospedadora que comprende el vector de expresión recombinante y un transformante producido por transformación con el vector de expresión recombinante. Además, la presente descripción proporciona un procedimiento para producir la bacteriocina. Además, La presente invención permite proporcionar una nueva cepa bacteriana de ácido láctico que produce la bacteriocina, la cepa *Lactobacillus rhamnosus* KO1. Además, debido a que la bacteriocina de la presente invención tiene una alta resistencia al calor, el procesamiento industrial de la bacteriocina es fácil. En particular, debido a dicha resistencia al calor, el procesamiento de la bacteriocina de la presente invención en gominolas, trociscos, comprimidos, caramelos y chicles, que requieren calentamiento, es posible sin disminuir el efecto antimicrobiano. Además, debido a que la adición de la bacteriocina a, por ejemplo, alimentos para cocinar tales como arroz y sopa, no disminuye el efecto de la bacteriocina, se espera la aplicación de la bacteriocina para varios usos.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Hiroshima University
 < 120> Bacteriocina derivada de *Lactobacillus rhamnosus*
 <130> P2013,0710 EP N
 5 <140> EP12745195.3-1406
 <141> 09/02/2012
 <150> JP 2011-027882
 <151> 10/02/2011
 10 <150> JP 2011-184655
 <151> 26/08/2011
 <160> 13
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 48
 15 <212> PRT
 <213> *Lactobacillus rhamnosus*
 <400> 1
 Met Ala Lys Ala Arg Pro Ser Arg Pro Arg Pro Leu Thr Leu Arg Ser
 1 5 10 15
 Leu Thr Ala Pro Ala His Ala His Lys Lys Trp Ala Ser Arg Trp Ile
 20 25 30
 Leu Ser Met Arg Leu Ala Arg Val Phe Gly Ile Glu Lys Pro His Gly
 35 40 45
 20 <210> 2
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> *Lactobacillus rhamnosus*
 <400> 2
 Met Thr Lys Val Arg Ser Ser Arg Leu Arg Pro Leu Thr Leu Arg Leu
 1 5 10 15
 Leu Ser Ala Pro Ala Arg Ala Gln Phe Leu Thr Ile Ala Cys Arg Ala
 20 25 30
 Ile Leu Arg Tyr Asp Leu Ile Asn Ser
 35 40
 25 <210> 3
 <211> 147
 <212> ADN
 <213> *Lactobacillus rhamnosus*
 <400> 3

ES 2 698 421 T3

atggccaaag cccggccatc acgtccaagg ccgcttacac tccgacccctt aaccgcgcca
60

gctcacgctc acaaaaaatg ggccagccgt tggattttat ccatgacgact ggcccagatt
120

ttcggtatcg aaaagccgca tggatga
147

<210> 4
<211> 126
<212> ADN
5 <213> Lactobacillus rhamnosus
<400> 4

atgaccaaag tacggatcatc acgctgagg ccacttacac tccgacttct aagcgcgccc
60

gctcgcgctc agttcctgac gatcgcgtgc cgagccattc tgcgttatga ttaattaat
120

agttaa
126

<210> 5
10 <211> 25
<212> PRT
<213> Bos taurus
<400> 5

Phe Lys Cys Arg Arg Trp Gln Trp Arg Met Lys Lys Leu Gly Ala Pro
1 5 10 15

Ser Ile Thr Cys Val Arg Arg Ala Phe
20 25

<210> 6
15 <211> 24
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 6

Asp Ser His Glu Lys Arg His His Gly Tyr Lys Arg Lys Phe His Glu
1 5 10 15

Lys His His Ser His Arg Gly Tyr
20

<210> 7
20 <211> 14
<212> PRT
<213> Bos taurus
<400> 7

ES 2 698 421 T3

Lys Arg Leu Phe Arg Arg Trp Gln Trp Arg Met Lys Lys Tyr
1 5 10

5 <210> 8
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador directo para colágeno de Tipo-I
<400> 8

aaccogaggt atgcttgatc t
21

10 <210> 9
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> cebador inverso para colágeno de Tipo-I
<400> 9

ccagttcttc attgcattgc
20

20 <210> 10
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sonda para colágeno de Tipo-I
<400> 10

cacggctgtg tgcgatgacg
20

25 <210> 11
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> cebador directo para beta-actina
<400> 11

ccacactgtg cccatctacg
20

35 <210> 12
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador inverso para beta-actina

ES 2 698 421 T3

<400> 12

gtggtggtgg agctgtagcc
20

5

<210> 13
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sonda para beta actina

<400> 13

cctgcgtctg gacctggctg gc
22

10

REIVINDICACIONES

1. Un péptido antimicrobiano básico que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 o en la SEQ ID NO: 2 en el LISTADO DE SECUENCIAS o con la misma secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 1 o en la SEQ ID NO: 2 en el LISTADO DE SECUENCIAS, excepto que se eliminan, sustituyen, insertan y/o agregan de uno a cuatro aminoácidos, en el que el péptido antimicrobiano básico es antimicrobiano para bacterias cariogénicas, bacterias de enfermedades periodontales y *Candida* y tiene un punto isoeléctrico de no menos de 12, para su uso en profilaxis, mejoría y/o terapia de enfermedades orales.
2. Un procedimiento para producir un péptido antimicrobiano básico, comprendiendo el procedimiento:

 - una etapa de cultivo para cultivar *Lactobacillus rhamnosus*; y
 - una etapa de extracción para extraer el péptido antimicrobiano básico que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 o en la SEQ ID NO: 2 en el LISTADO DE SECUENCIAS, o con la misma secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 1 o en la SEQ ID NO: 2 en el LISTADO DE SECUENCIAS, excepto que se eliminan, sustituyen, insertan y/o agregan de uno a cuatro aminoácidos, en el que el péptido antimicrobiano básico es antimicrobiano para bacterias cariogénicas, bacterias de enfermedades periodontales y *Candida* y tiene un punto isoeléctrico de no menos de 12 a partir de un cultivo de células bacterianas obtenido por la etapa de cultivo.
3. Un procedimiento para producir un péptido antimicrobiano básico de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el *Lactobacillus rhamnosus* es una cepa *Lactobacillus rhamnosus* KO1, que se presentó para su depósito ante el Patent Microorganisms Depository, National Institute of Technology and Evaluation (Incorporated Administrative Agency) el 24 de enero de 2011 y se aceptó con el número de registro NITE P-1065 y/o una cepa *Lactobacillus rhamnosus* KO3, que se presentó para su depósito ante el Patent Microorganisms Depository, National Institute of Technology and Evaluation (Incorporated Administrative Agency) el 10 de junio de 2009, y se aceptó con el número de registro NITE BP-771).
4. Un procedimiento para producir un péptido antimicrobiano básico de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, en el que, en la etapa de cultivo, se añaden células inactivadas de *Candida*.
5. La cepa *Lactobacillus rhamnosus* KO1 útil en el procedimiento de la reivindicación 2 y que se presentó para su depósito ante el Patent Microorganisms Depository, National Institute of Technology and Evaluation (Incorporated Administrative Agency) el 24 de enero de 2011, y se aceptó con el número de registro NITE P-1065).

FIG. 1

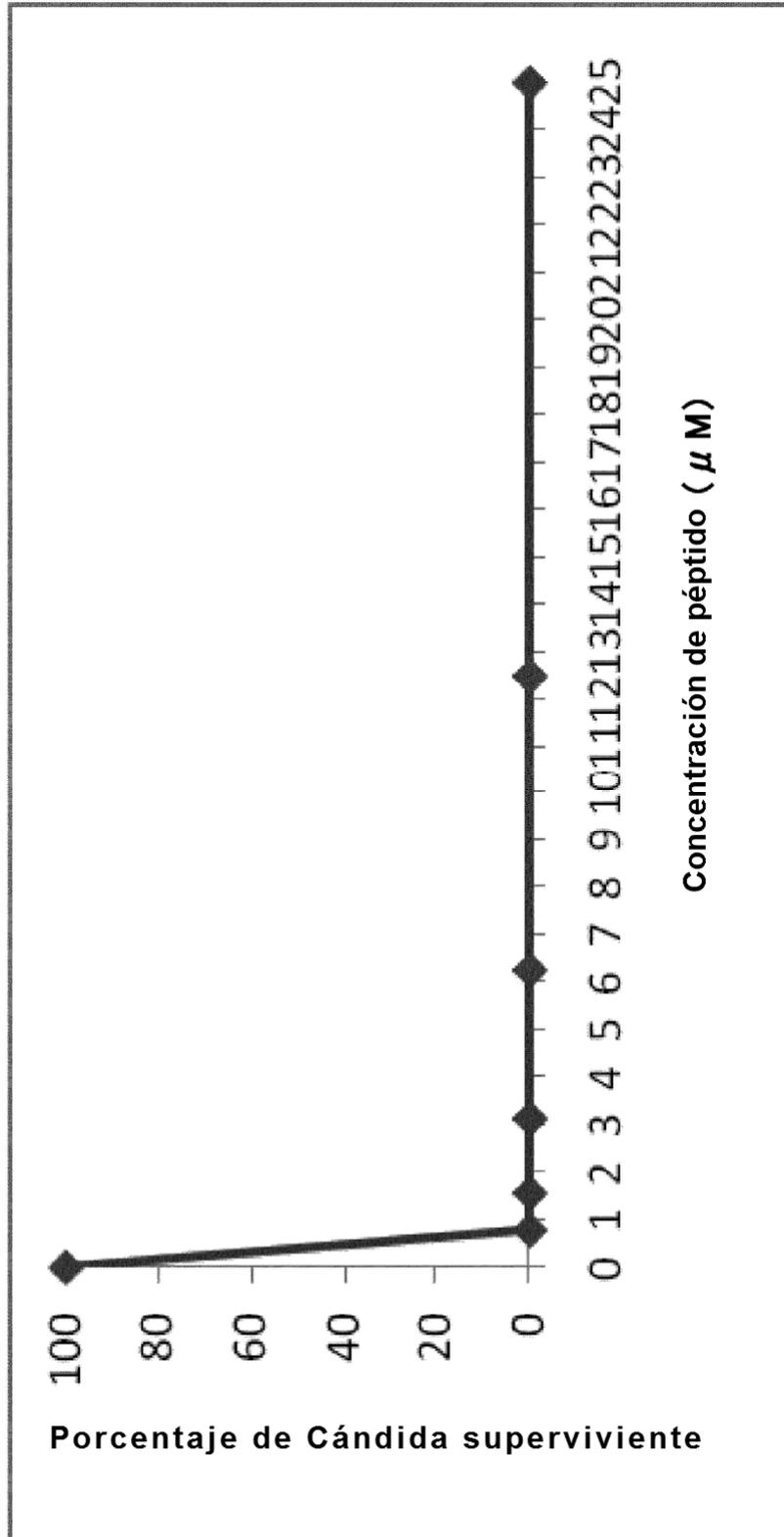


FIG. 2

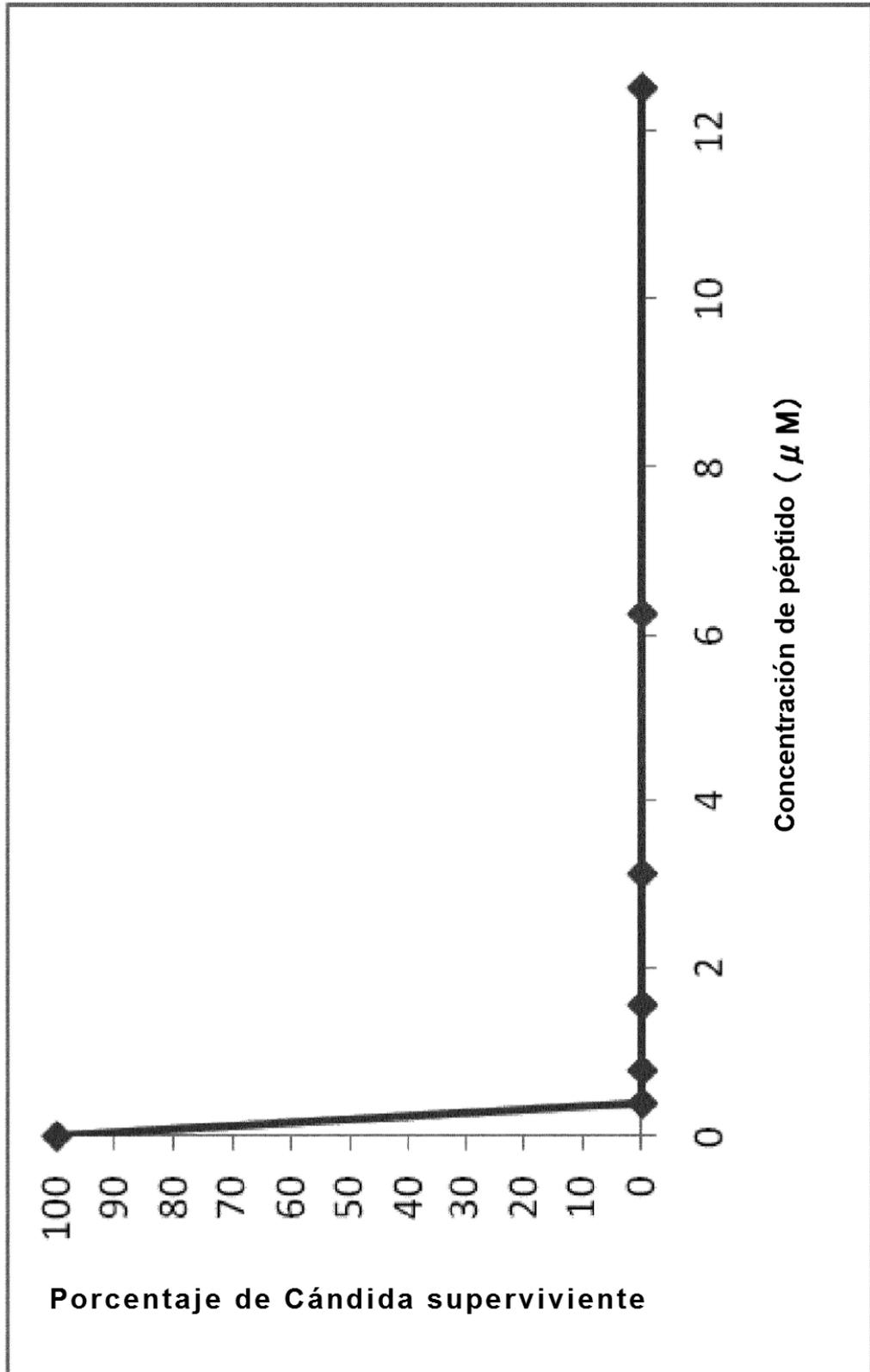


FIG. 3

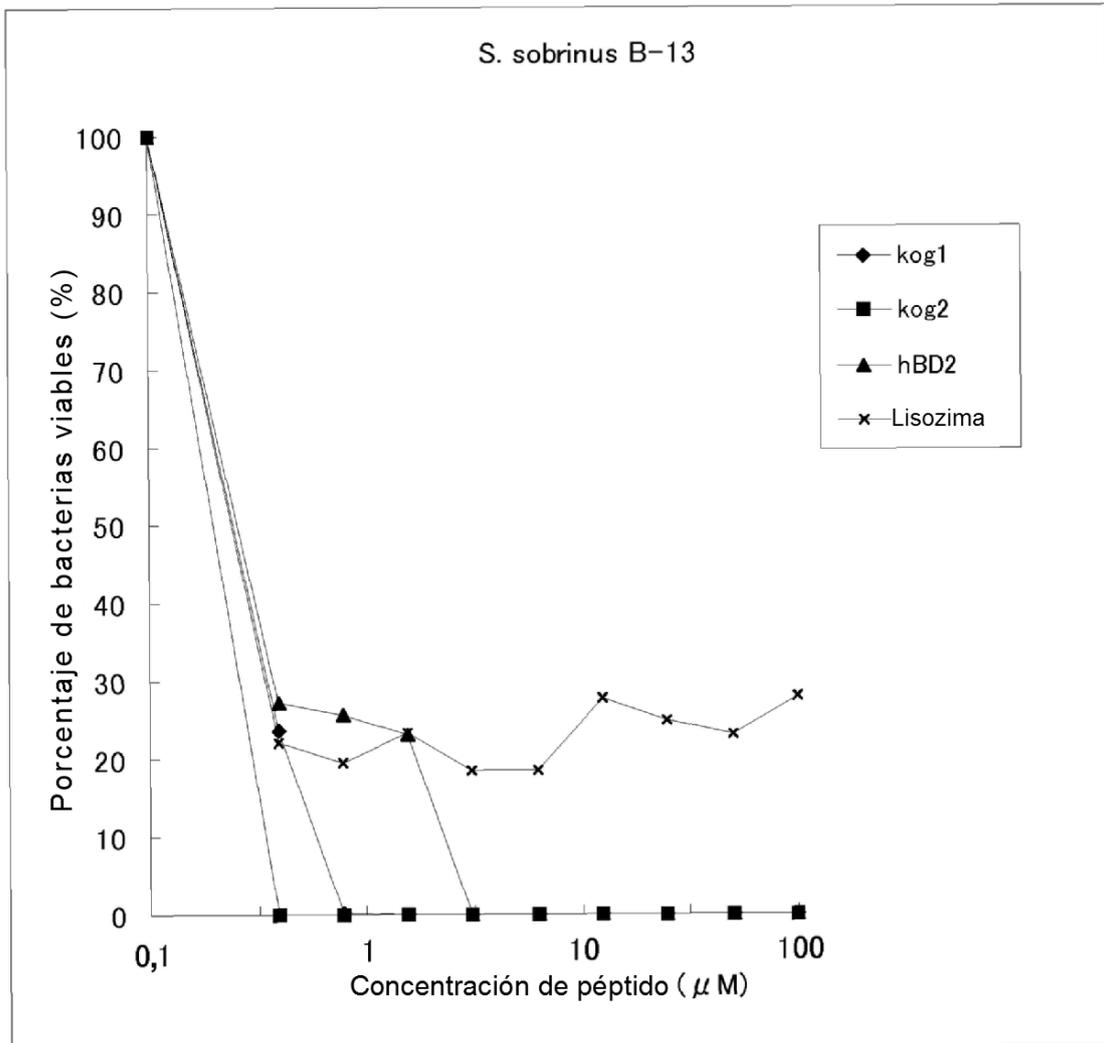


FIG. 4

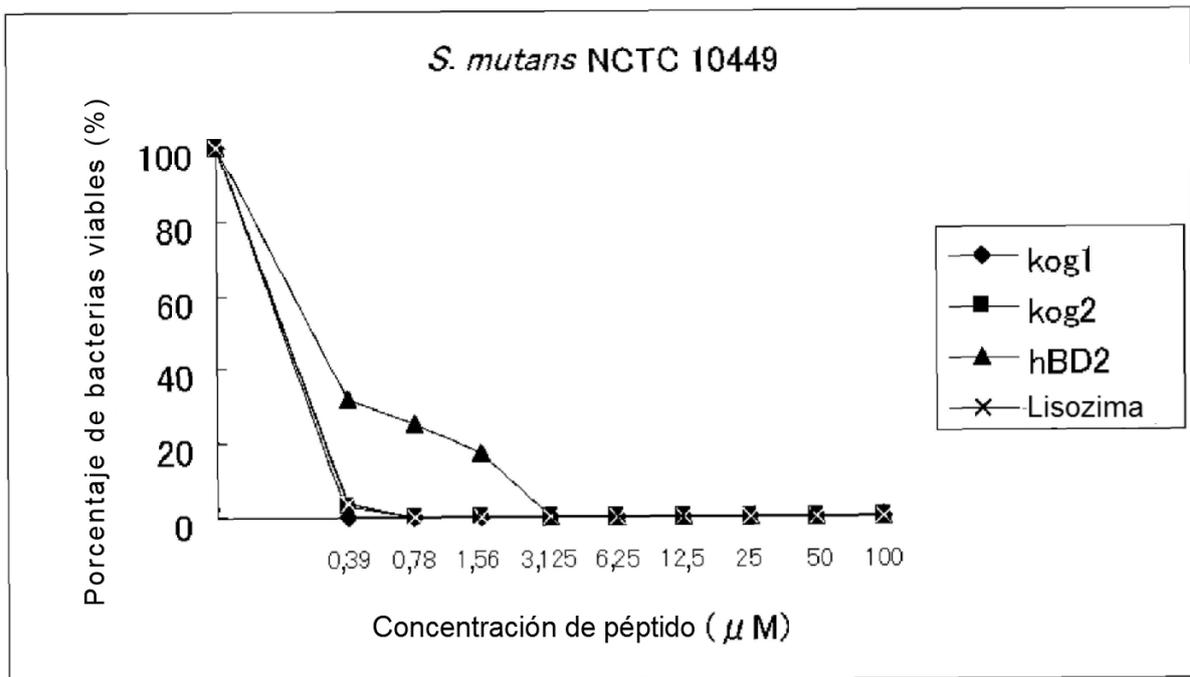


FIG. 5

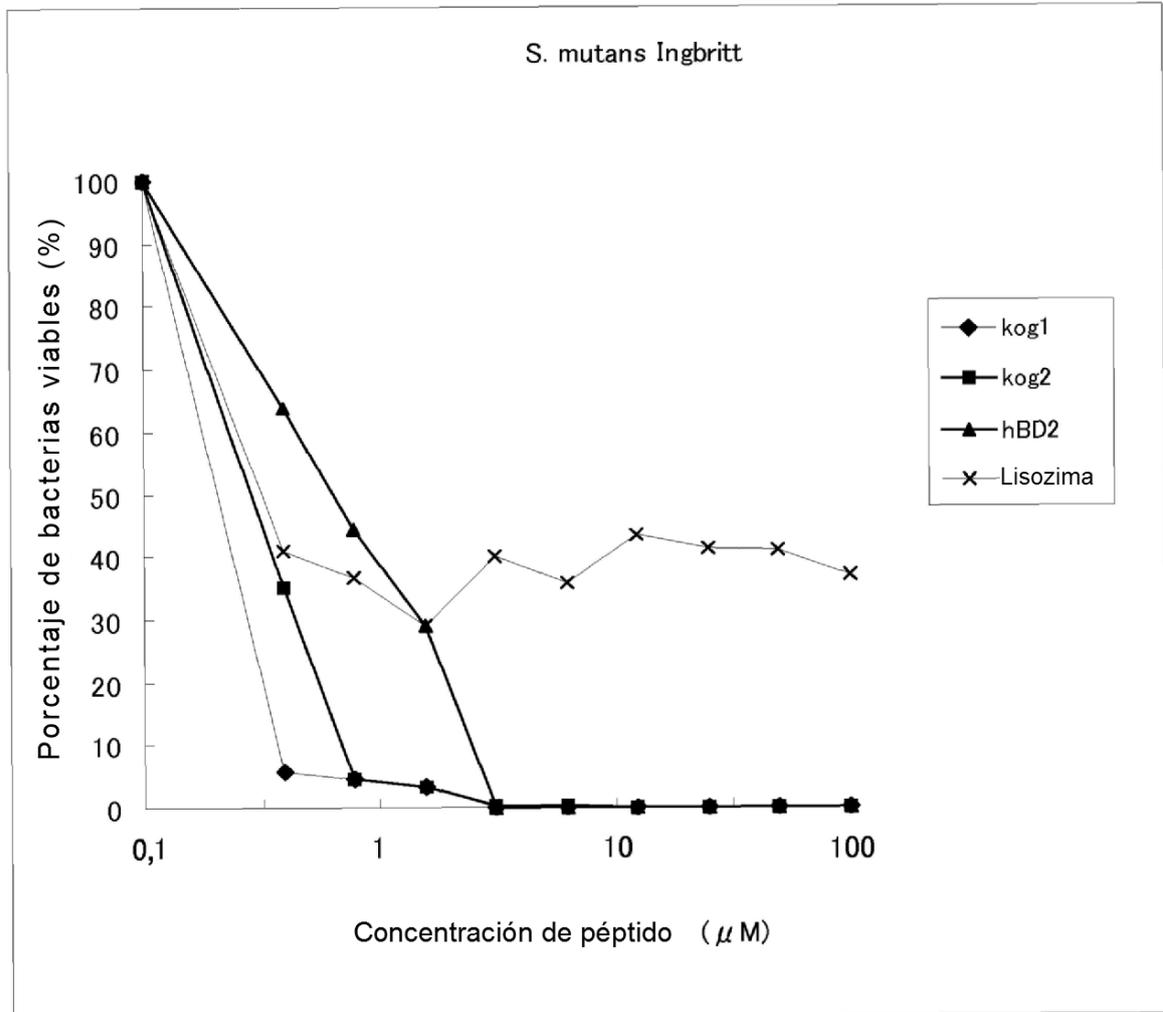


FIG. 6

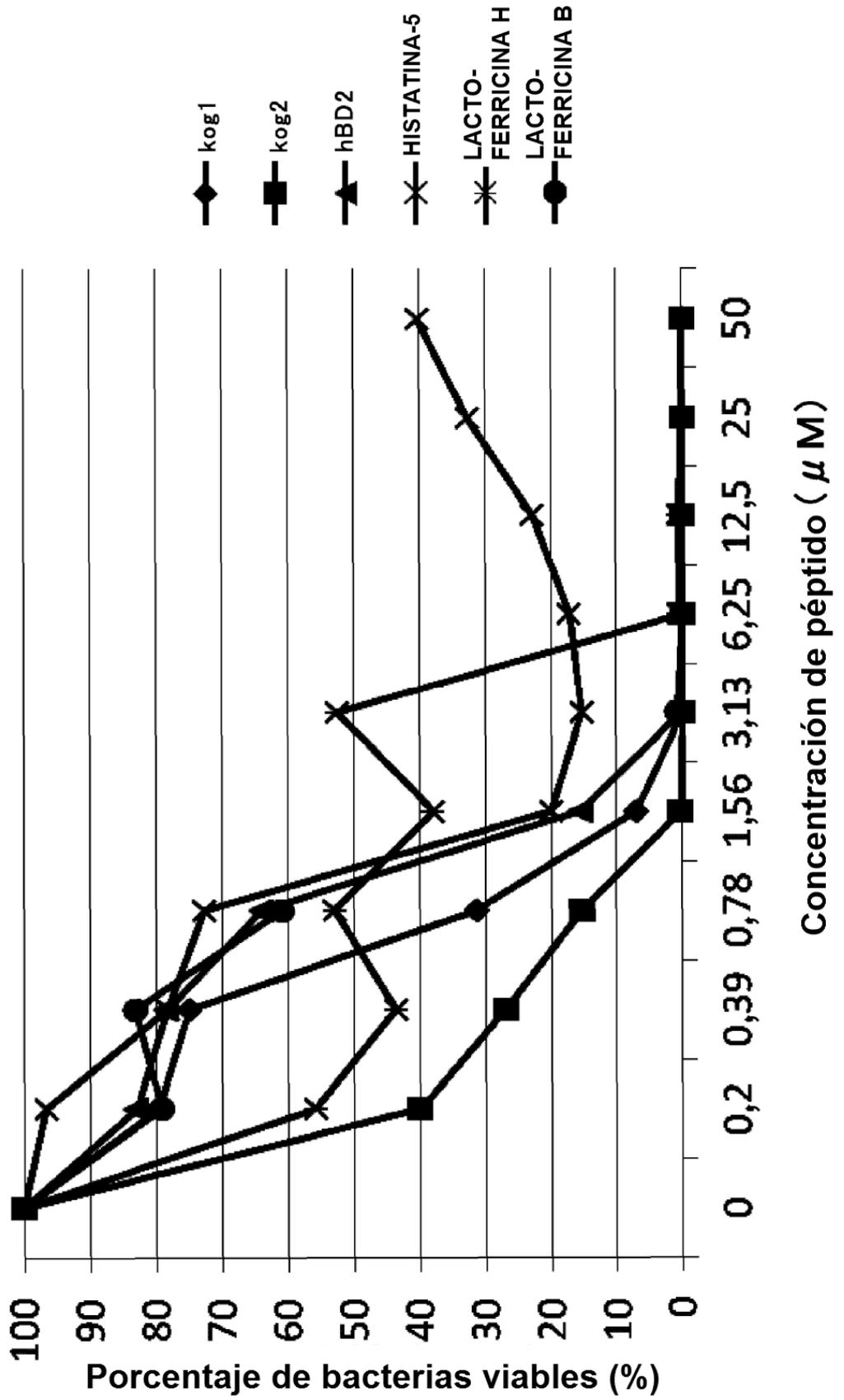
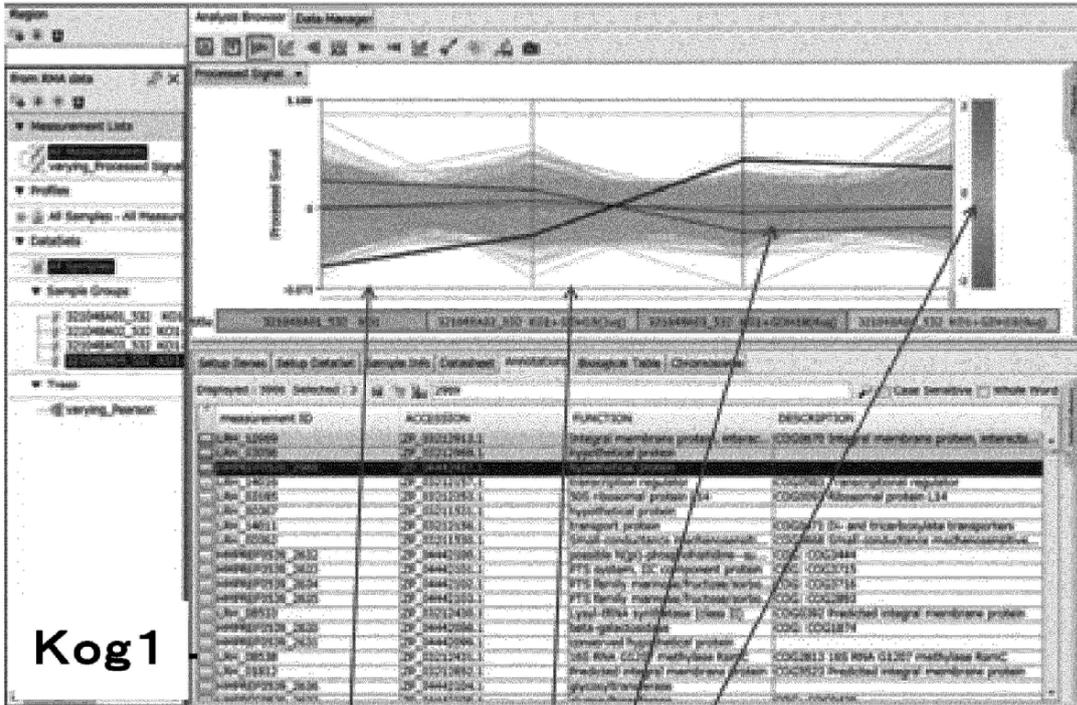


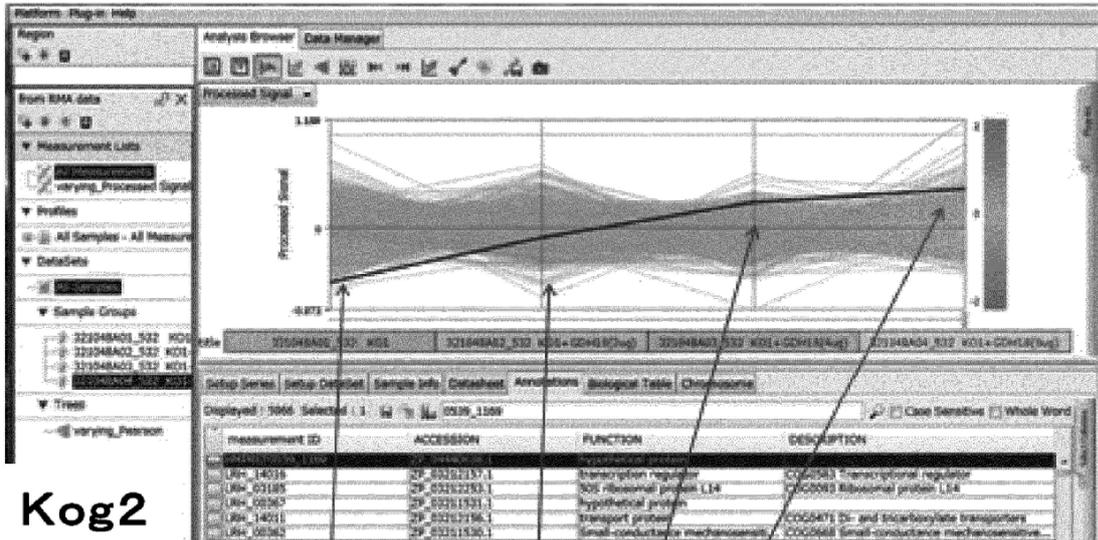
FIG. 7



KO1 SOLA

KO1 +
CÉLULAS INACTIVADAS DE GaGDH18

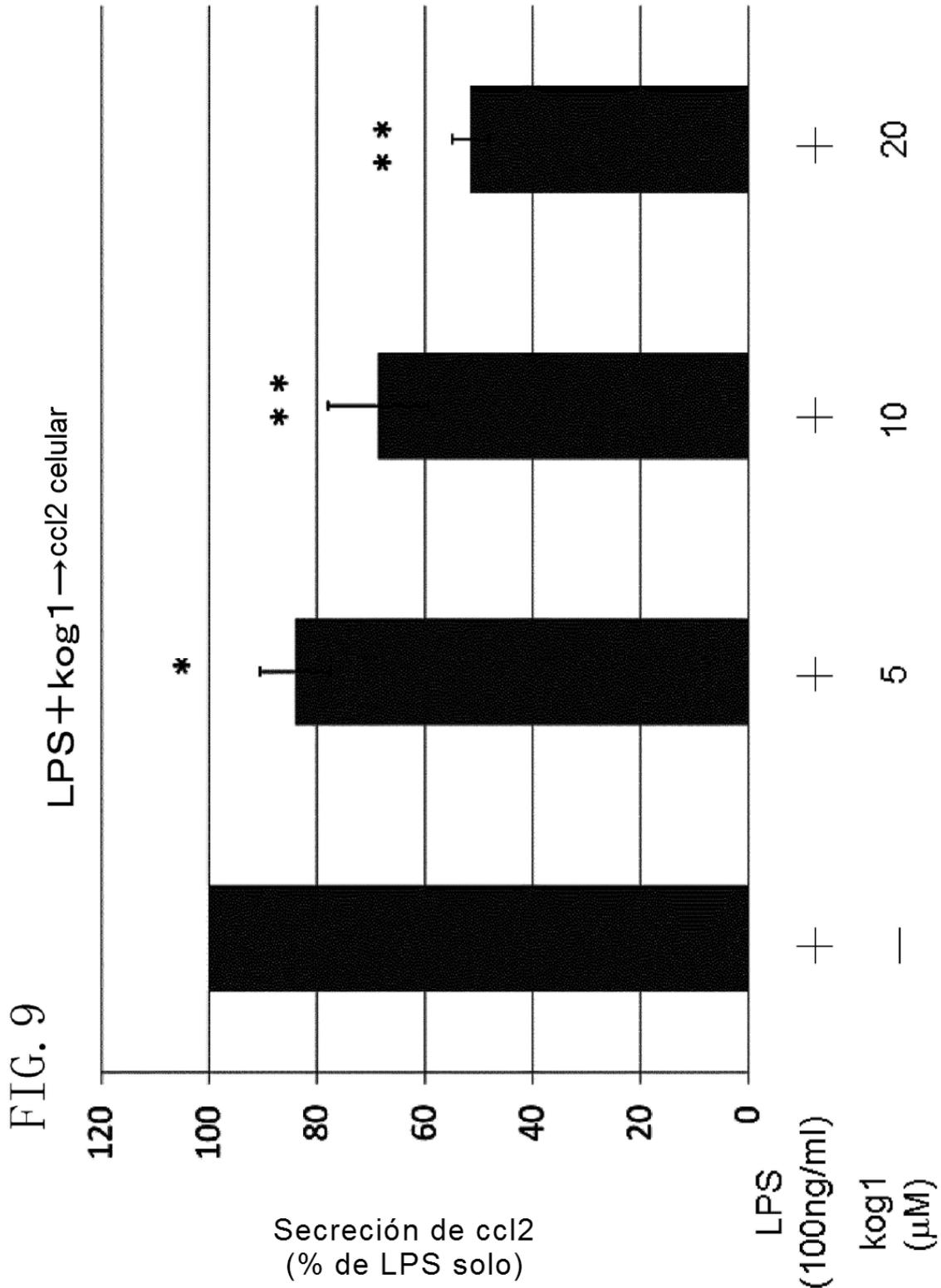
FIG. 8

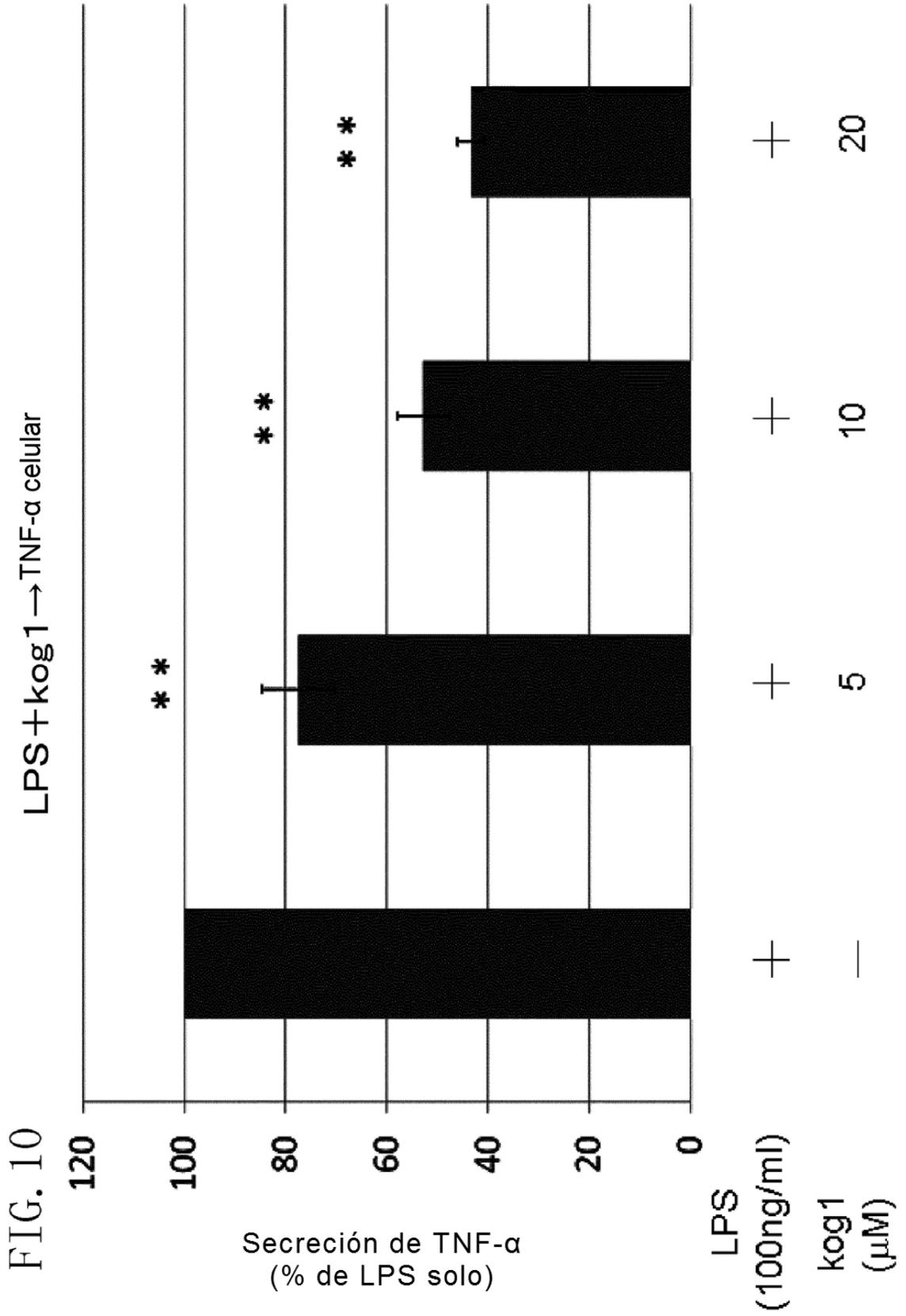


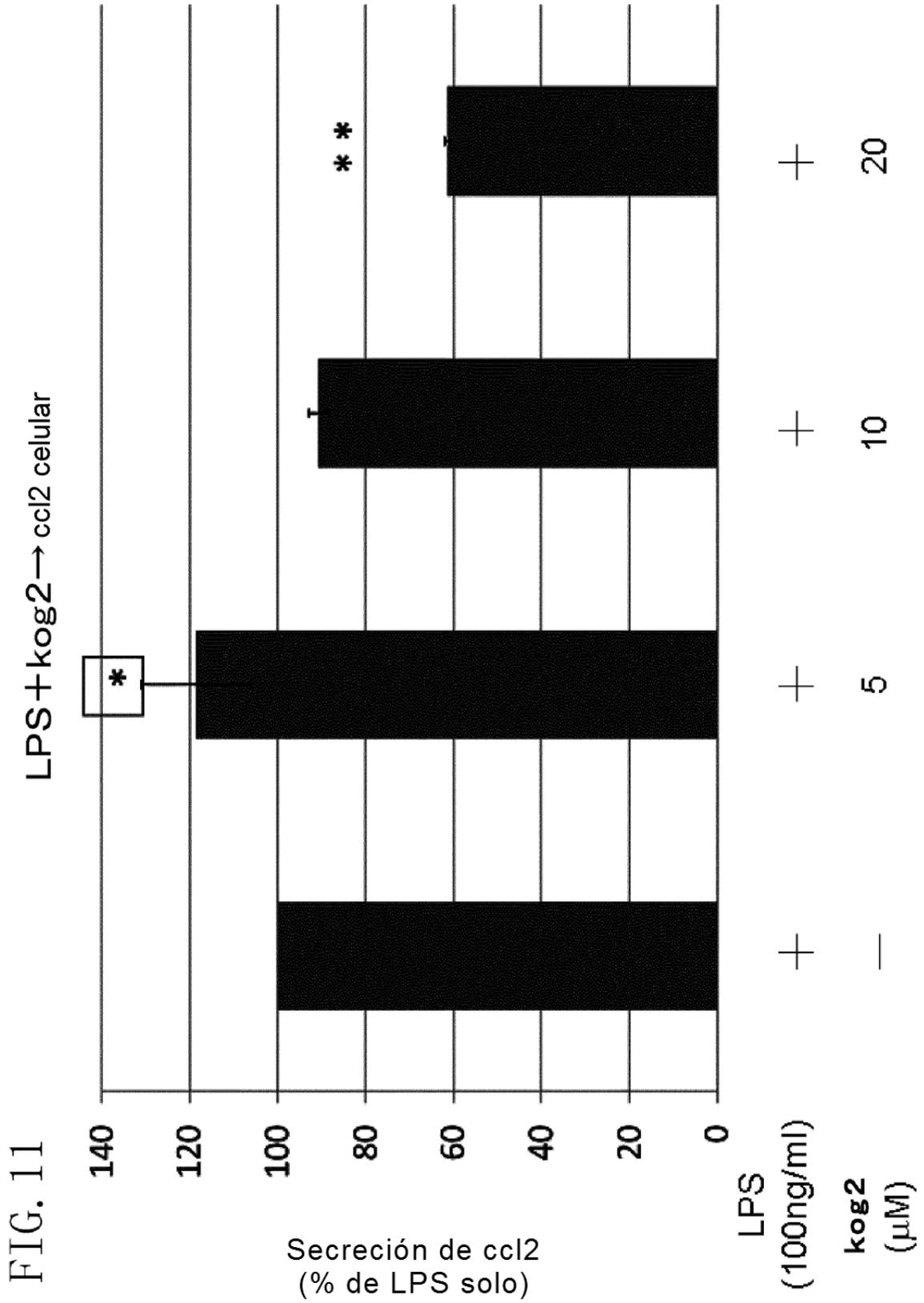
Kog2

KO1 SOLA

KO1 +
CÉLULAS INACTIVADAS DE GaGDH18







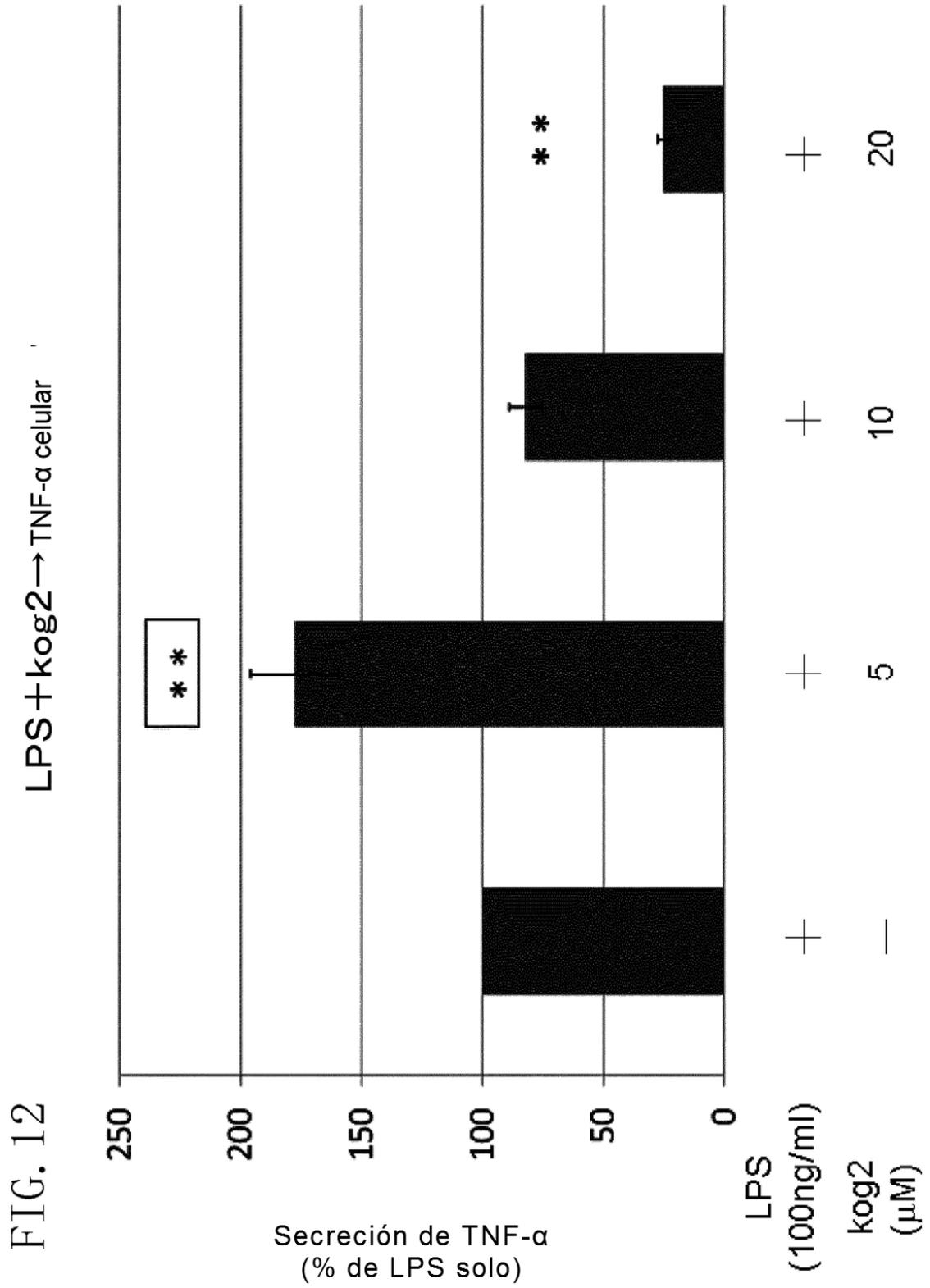


FIG. 13

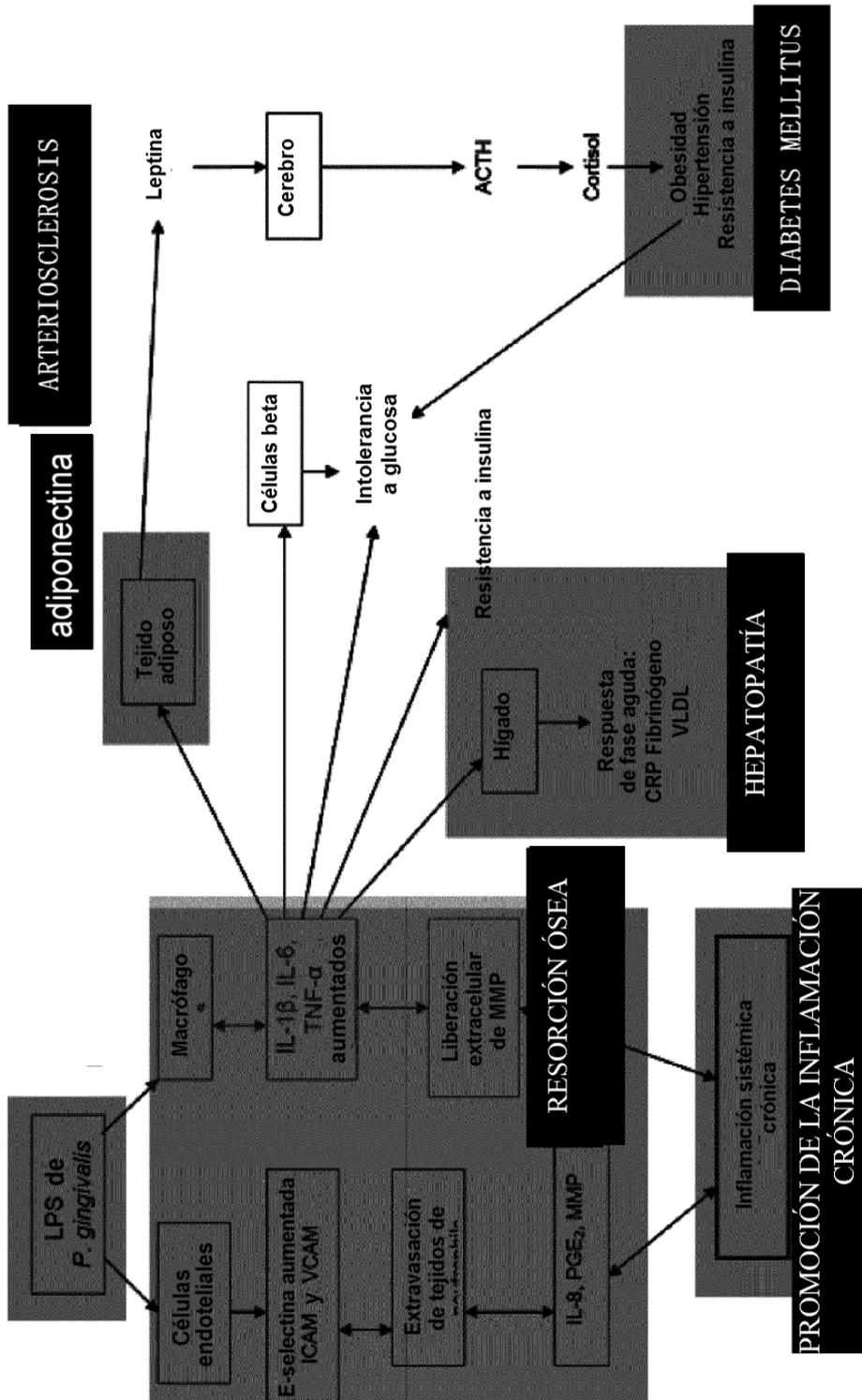


FIG. 14 COLÁGENO DE TIPO I / β -ACTINA

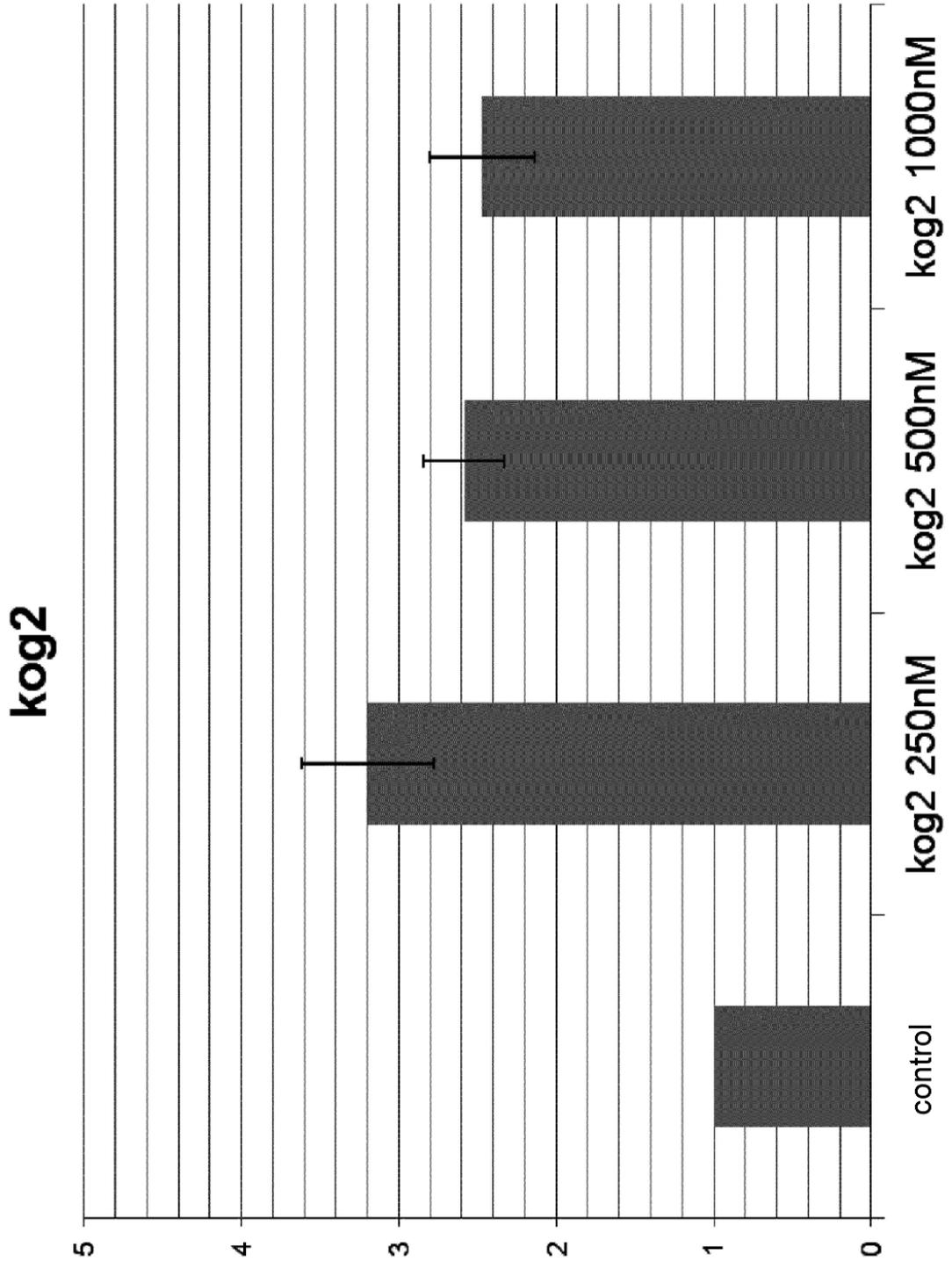


FIG. 15

