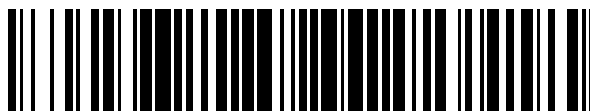


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 895**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/195** (2006.01)  
**C07K 16/12** (2006.01)  
**A61K 39/02** (2006.01)  
**A61K 39/40** (2006.01)  
**A61K 38/16** (2006.01)  
**A61P 31/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08010018 .3**  
96 Fecha de presentación: **21.12.2000**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1985626**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.10.2008**

54 Título: **Composición antigénica de P. gingivalis**

30 Prioridad:  
**24.12.1999 AU PQ485999**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**19.10.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**19.10.2012**

73 Titular/es:  
**CSL LIMITED  
45 POPLAR ROAD  
PARKVILLE VIC 3052, AU y  
THE UNIVERSITY OF MELBOURNE**

72 Inventor/es:  
**Reynolds, Eric Charles;  
Slakeski, Nada;  
Chen, Chao Guang y  
Barr, Ian George**

74 Agente/Representante:  
**Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 388 895 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Composición antigénica de *P. gingivalis*

Campo de la invención

5 Esta invención provee una composición oral y una composición antigénica para utilizar en la supresión de los efectos patogénicos de la bacteria intra-oral *Porphyromonas gingivalis*, asociada con una enfermedad periodontal basada en anticuerpos y proteína recombinantes. También provee pruebas de diagnóstico para la presencia de *P. gingivalis* en muestras de placa subgingival y anticuerpos específicos anti-*P. gingivalis* en suero. Relacionado con esto y se revela un método para preparar r-Kgp39 y los derivados de esta, utilizando técnicas de ADN recombinante. También se revelan las células huésped transformadas con vectores recombinantes capaces de expresar las proteínas recombinantes. Las proteínas recombinantes son útiles como inmunógenos en una formulación de vacuna para inmunización activa y se pueden utilizar para generar antisuero específico de la proteína útil para inmunización pasiva y como reactivos para ensayos de diagnóstico.

Antecedentes de la invención

15 Esta invención se relaciona en general con la proteína recombinante de *Porphyromonas gingivalis*, r-Kgp39. La invención también se relaciona con las composiciones farmacéuticas y los agentes asociados, basados en estas proteínas recombinantes y derivados para la detección, prevención y tratamiento de una enfermedad periodontal asociada con *P. gingivalis*.

20 Las enfermedades periodontales son enfermedades inflamatorias asociadas con bacterias de los tejidos de soporte de los dientes y van desde la forma relativamente suave de la gingivitis, la inflamación reversible, no-específica del tejido gingival a las formas más agresivas de periodontitis que se caracterizan por la destrucción de las estructuras de soporte de los dientes. La periodontitis se asocia con una infección subgingival de un consorcio de bacterias específicas Gram-negativas que conduce a la destrucción del periodoncio y es un importante problema de salud pública. Una bacteria que ha suscitado considerable interés es la *P. gingivalis*, ya que la recuperación de este microorganismo a partir de lesiones de periodontitis en adultos puede ser hasta 50% de la flora subgingival que se cultiva anaeróbicamente, mientras que *P. gingivalis* rara vez se recupera, y luego en pequeñas cantidades, a partir de sitios saludables. Un incremento proporcional en el nivel de *P. gingivalis* en placa subgingival se ha asociado con un incremento en la severidad de la periodontitis y la erradicación del microorganismo a partir de la población microbiana subgingival cultivable, se logra por la resolución de la enfermedad. La progresión de las lesiones de periodontitis en primates no-humanos se ha demostrado con la implantación subgingival de *P. gingivalis*. Estos hallazgos en animales como en humanos sugieren un papel importante de *P. gingivalis* en el desarrollo de periodontitis en adultos.

35 Más recientemente ha habido una creciente vinculación de enfermedad periodontal y enfermedad cardiovascular y por lo tanto un vínculo entre la infección por *P. gingivalis* y enfermedad cardiovascular. Más información respecto a este enlace se puede encontrar en Beck JD et al Ann Periodontol 3 : 127-141, 1998 and Beck J, et al. J. Periodontol. 67; 1123-37, 1996.

40 *P. gingivalis* expresa un rango de proteínas sobre su superficie celular, las cuales son candidatas potenciales para el desarrollo de una vacuna o diagnóstico. Un grupo importante de las proteínas de la superficie celular expresadas por *P. gingivalis* es un grupo de proteinasas y adhesinas asociadas. Una proteinasa designada Arg-gingipain ha sido revelada previamente por Travis et al. (PCT Patent No. WO 95/07286). Estos investigadores también reportaron una forma de alta masa molecular de Arg-gingipain que se codifica por el gen *rgp* también se revela en WO 95/07286. La forma de alta masa molecular de Arg-gingipain consiste de la proteinasa y varias otras proteínas propuestas para ser adhesinas. Los complejos de superficie celular de *P. gingivalis* que consiste de proteinasas específicas Arg- y Lys y las adhesinas también se han revelado por Reynolds et al. (PCT/AU96/00673). Ninguna de estas divulgaciones proporciona la enseñanza respecto a la utilidad de una adhesina particular como un recombinante en la protección de la infección por *P. gingivalis*.

WO98/49192 revela los fragmentos encontrados en Kgp39 o ambos Rgp44 y Kgp39, que generan una respuesta inmune protectora cuando se conjuga con toxoide diftérico.

Resumen de la invención

La invención es como se establece en las reivindicaciones.

50 En un primer aspecto, la presente invención consiste de una composición antigénica, la composición que comprende una proteína recombinante que consiste de SEQ. ID. NO. 5 o SEQ. ID. NO. 6.

En otra modalidad preferida la composición antigénica además comprende un adyuvante.

En incluso otra modalidad preferida, la proteína recombinante es una proteína quimérica o una de fusión. Cuando la proteína recombinante es una proteína quimérica o una de fusión, esta consiste de SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6 unidas a una o más secuencias del polipéptido.

- 5 En un segundo aspecto, la presente invención consiste de una composición, la composición que comprende al menos un anticuerpo policlonal, siendo el anticuerpo construido contra la composición antigénica del primer aspecto de la presente invención.

10 En un tercer aspecto, la presente invención consiste de una célula recombinante procariota o eucariota, la célula recombinante que comprende una secuencia de ADN que consiste de SEQ.ID.NO. 7 o SEQ.ID. NO. 8 ligada operativamente a al menos un elemento regulador.

En otro aspecto de la presente invención, se provee una composición antigénica de la invención para utilizar en la prevención o la reducción de la incidencia o severidad de la infección por *P. gingivalis* en un sujeto.

15 En otro aspecto, la presente invención provee una composición de anticuerpo que comprende al menos un anticuerpo construido contra la composición antigénica de la invención, en donde el anticuerpo se une específicamente a un polipéptido, que consiste de SEQ.ID. NO. 5 o SEQ.ID. NO. 6, para utilizar en la prevención o la reducción de la incidencia o severidad de la infección por *P. gingivalis* en un sujeto.

En incluso otro aspecto, la invención incluye el uso de la composición de anticuerpo de la invención en un método *in vitro* de diagnóstico de *P. gingivalis*.

20 Dada la vinculación creciente de la enfermedad periodontal con una enfermedad cardiovascular (CVD) y por lo tanto el posible vínculo de la infección por *P. gingivalis* y CVD, la composición antigénica del primer aspecto de la presente invención también se puede utilizar en una terapia profiláctica para reducir la incidencia o severidad de CVD o como un complemento en el tratamiento de CVD.

25 Una forma importante de la invención es una vacuna basada en las reivindicadas proteínas r-Kgp39 o los péptidos y el adyuvante apropiado administrado por aerosol nasal, vía oral o por inyección, para producir una respuesta inmune específica contra la proteína r-Kgp39. Una vacuna también se puede basar en un componente recombinante del segmento del gen de Kgp39 incorporado en un vector apropiado y expresado en un huésped transformado apropiado (por ejemplo, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, células COS, células CHO y células HeLa), que contiene el vector. La proteína componente, péptidos, y oligopéptidos con epitopes inmunogénicos a partir de la proteína Kgp39, se pueden utilizar como inmunógenos en diversas formulaciones de vacunas en la prevención de enfermedades periodontales. Adicionalmente, de acuerdo con la presente invención, las proteínas Kgp39 y péptidos relacionados o quimeras producidos, se pueden utilizar para generar un antisuero de *P. gingivalis* útil para la inmunización pasiva contra la enfermedad periodontal y las infecciones causadas por *P. gingivalis*.

35 Utilizando técnicas de ADN recombinante el segmento del gen codificante de Kgp39, o fragmentos del gen que codifican uno o más péptidos o quimeras que tienen epitopes inmunogénicos, se incorpora en un vector de expresión, y el vector recombinante se introduce en una célula huésped apropiada, dirigiendo así la expresión de estas secuencias en la célula huésped particular. El sistema de expresión, que comprende el vector recombinante introducido en la célula huésped, se puede utilizar (a) para producir proteínas r-Kgp39, péptidos relacionados, oligopéptidos o quimeras que pueden ser purificados para utilizar como un inmunógeno en las formulaciones de vacunas; (b) para producir proteína Kgp39, péptidos relacionados, oligopéptidos y quimeras para ser utilizados como un antígeno para inmunoensayos de diagnóstico o para generar el antisuero específico de *P. gingivalis* de valor terapéutico y/o de diagnóstico ; (c) o si el vector recombinante de expresión, es un virus vivo tal como virus de vaccinia, el vector por si mismo se puede utilizar como una preparación de vacuna inactiva o viva para ser introducida en las células huésped para la expresión de Kgp39 o péptidos inmunogénicos u oligopéptidos o péptidos quiméricos; o (d) para la introducción en las células bacterianas atenuadas vivas o bacterias intra-orales comensales modificadas genéticamente, que se utilizan para expresar la proteína Kgp39, péptidos relacionados u oligopéptidos o quimeras para vacunar los individuos. En particular la vacuna bacteriana recombinante se puede basar en un habitante comensal de la cavidad oral humana o animal si la vacuna es para prevenir una enfermedad periodontal en animales. La vacuna bacteriana recombinante que expresa *P. gingivalis* de Kgp39, se puede utilizar para colonizar la cavidad oral, la placa supragingival o subgingival. La bacteria intra-oral se puede aislar del paciente con periodontitis y modificar genéticamente para expresar la r-Kgp39, componentes, péptidos o quimeras. La proteína r-Kgp39 estimulará los tejidos linfoides asociados con la mucosa (MALT) para producir el anticuerpo específico para *P. gingivalis*.

Las proteínas Kgp39, péptidos, oligopéptidos, péptidos quiméricos y las construcciones que contienen epitopes, se pueden utilizar como inmunógenos en formulaciones de vacunas profilácticas y/o terapéuticas contra cepas

patogénicas de *P. gingivalis*, si el inmunógeno se sintetiza químicamente, se purifica a partir de *P. gingivalis*, o se purifica a partir de un vector recombinante del sistema de expresión. De manera alternativa, el segmento del gen que codifica Kgp39, o uno o más fragmentos del gen que codifica los péptidos u oligopéptidos o péptidos quiméricos, se pueden incorporar en una vacuna bacteriana o vírica que comprende bacteria o virus recombinantes que se modifican para producir uno o más epitopes inmunogénicos específicos de Kgp39, o en combinación con epitopes inmunogénicos de otros microorganismos patogénicos. Además, el gen codificante de Kgp39 o uno o más fragmentos del gen que codifica los péptidos de Kgp39 o los oligopéptidos o los péptidos quiméricos, ligados operativamente a uno o más elementos reguladores, se pueden introducir directamente en humanos para expresar la proteína, el péptido, los oligopéptidos o péptidos quiméricos relativos a Kgp39 para provocar una respuesta inmune protectora. Una vacuna también se puede basar en un componente recombinante de Kgp39 normal o mutado incorporado en un vector apropiado y expresado en un huésped transformado apropiado (por ejemplo, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, células COS, células CHO y células HeLa) que contiene el vector. La vacuna se puede basar en una vacuna bacteriana recombinante intra-oral, donde la bacteria recombinante que expresa la Kgp39 de *P. gingivalis* es un habitante comensal de la cavidad oral.

En otro aspecto, la invención provee secuencias de nucleótidos que codifican para la proteína recombinante.

La invención también incluye dentro de su alcance diversas aplicaciones y usos de los anteriores nucleótidos y productos recombinantes incluyendo polipéptidos recombinantes quiméricos. En particular, la invención provee anticuerpos contruados contra la composición antigénica de la invención. Los anticuerpos son policlonales. Los anticuerpos se pueden mezclar en composiciones orales tales como pasta de dientes, enjuague bucal, polvos para dientes y dentífricos líquidos, colutorios, comprimidos medicinales, gomas de mascar, pastas dentales, cremas para masaje gingival, comprimidos para gárgaras, productos lácteos y otros productos alimenticios. Los polipéptidos recombinantes, oligopéptidos y péptidos quiméricos también se puede utilizar como inmunógenos en formulaciones de vacunas profilácticas y/o terapéuticas.

Descripción detallada de la invención

Leyendas de la figura

Figura 1, muestra los resultados obtenidos en el Ejemplo 1

Figura 2, muestra los resultados de la proteína recombinante de 44KD de longitud completa, 2 fragmentos de la proteína 44KD (Fragmento 4; residuos 65-290 y fragmento 6; residuos 192-290), una proteína recombinante control R2 y *P. gingivalis* completa muerta con Formalina (FK-33277) en el modelo de absceso de ratón.

Figura 3, El análisis citométrico de flujo de células de *P. gingivalis* reaccionó con (A) PBS/FA, (B) suero de ratón normal, (C) antisuero de célula completa de *P.gingivalis*, (D) antisuero de Pg44 recombinante, (E) antisuero del Fragmento 4 (r-44kDa residuos 65-290) (F) antisuero del Fragmento 6 (r-44kDa residuos 192-290) (G) antisuero de proteína r-44-Pg33 quimérica.

Figura 4: Enlace del anti-suero específico de RgpA-Kgp con las proteínas recombinantes. Las proteínas recombinantes se cubrieron a 5µg/ml y analizaron con anti-suero específico anti-RgpA-Kgp: proteína recombinante Kgp39 (-♦-), fragmento de Kgp39 recombinante (-▲-), complejo RgpA-Kgp (-●-), y control (-X-). El anticuerpo unido se detectó utilizando una dilución 1:4000 de HRP anti-Conejo de Cabra, y las placas de ELISA, se leyeron utilizando un lector de microplacas Labsystems iEMS a 415nm.

Figura 5: Enlace de proteína recombinante Kgp39 con una variedad de proteínas de matriz. Las proteínas de matriz se cubrieron a 5µg/ml y analizaron con proteína recombinante, que luego se analizó con anti-suero específico complejo anti-RgpA-Kgp: Colágeno tipo V (-♦-), Fibrinógeno (-■-), Hemoglobina (-▲-), y control (-X-). El anticuerpo unido se detectó utilizando una dilución 1:4000 de conjugado anti-Conejo de Cabra HRP, y las placas de ELISA se leyeron utilizando un lector Labsystems iEMS a 415nm.

Figura 6: Enlace del fragmento de proteína Kgp39 recombinante con una variedad de proteínas de matriz. Las proteínas de matriz se cubrieron a 5µg/ml y analizaron con proteína recombinante que luego se analizó con complejo anti-suero específico anti-RgpA-Kgp: Colágeno tipo V(-♦-), Fibrinógeno (-■-), Hemoglobina (-▲-), y control (-X-). El anticuerpo unido se detectó utilizando una dilución 1:4000 de conjugado anti-Conejo de Cabra HRP, y las placas de ELISA se leyeron utilizando un lector Labsystems iEMS a 415nm.

Con el fin de que la naturaleza de la presente invención se pueda entender más claramente las formas preferidas de esta, serán descritas con referencia a los siguientes Ejemplos.

La bacteria intra-oral *Porphyromonas gingivalis* contiene en su superficie un complejo proteinasa-adhesina codificado por los genes *rgpA* y *kgp*. La adhesina de 44 kDa recombinante (r-RgpA44) de este complejo proteinasa-

adhesina protege contra el desafío de *P. gingivalis* en un modelo de absceso de ratón, mientras que otras proteínas recombinantes del gen *rgpA* no. El segmento del gen que codifica el dominio de adhesina de 44 kDa RgpA44 o Kgp39 se puede clonar en un sistema de expresión apropiado para producir la proteína recombinante, r-RgpA44 o r-Kgp39. A continuación, la proteína r-RgpA44 o r-Kgp39 purificada puede ser utilizada para generar anticuerpos utilizando técnicas estándar. Los animales utilizados para la generación del anticuerpo pueden ser conejos, cabras, gallinas, ovejas, caballos, vacas etc. Cuando se detecta por inmunoensayo, un alto título de anticuerpos contra la proteína r-RgpA44 o r-Kgp39, los animales se desangran o los huevos o la leche se recolectan y el suero preparado y/o anticuerpo purificado utilizando técnicas estándar o anticuerpos monoclonales producidos fusionando las células del bazo con células de mieloma utilizando técnicas estándar. El anticuerpo (fracción inmunoglobulina) se puede separar del cultivo o fluido de aceites, suero, leche o huevo por salado, filtración en gel, intercambio iónico y/o cromatografía de afinidad, y similares, siendo el salado el preferido. En el método de salado el anti-suero o la leche se saturan con sulfato de amonio para producir un precipitado, seguido por la diálisis el precipitado contra solución salina fisiológica para obtener la fracción de inmunoglobulina purificada con el anti-r-RgpA44 o anti-r-Kgp39 específico. El anticuerpo preferido se obtiene a partir del anti-suero equino y el anti-suero bovino y leche. En esta invención el anticuerpo contenido en el anti-suero y leche obtenido por la inmunización del animal con la proteína r-Kgp39 o péptido se mezcla en la composición oral. En este caso, se pueden utilizar el anti-suero y la leche así como el anticuerpo separado y purificado a partir del anti-suero y la leche. Cada uno de estos materiales se pueden utilizar solos o en combinación de dos o más. Los anticuerpos contra la r-Kgp39, se pueden utilizar en composiciones orales tales como pasta de dientes y enjuagues bucales. Los anticuerpos anti-r-Kgp39, también se pueden utilizar para la detección temprana de *P. gingivalis* en muestras de placa subgingival por un Ensayo Inmunoabsorbente de Enzima Ligada (ELISA) en el consultorio.

Se prefiere que para las composiciones orales, la cantidad de los anteriores anticuerpos administrados sea 0.0001 - 50 g/kg/día y que el contenido de los anteriores anticuerpos sea 0.0002 - 10% en peso, preferiblemente 0.002 - 5% en peso de la composición. La composición oral de esta invención que contiene los anticuerpos de suero o leche mencionados anteriormente, se puede preparar y utilizar en diversas formas aplicables a la boca tal como dentífrico incluyendo pastas de dientes, polvos para dientes y dentífricos líquidos, colutorios, comprimidos medicinales, dispositivos de riego de bolsas periodontales, gomas de mascar, pastas dentales, cremas para masaje gingival, comprimidos para gárgaras, productos lácteos y otros productos alimenticios. Además, la composición oral de acuerdo con esta invención puede incluir otros ingredientes bien conocidos dependiendo del tipo y forma de una composición oral particular.

En ciertas formas altamente preferidas de la invención, la composición oral puede ser sustancialmente líquida en carácter, tales como un colutorio o enjuague. En tal preparación el vehículo por lo general es una mezcla de alcohol-agua deseable incluyendo un humectante como se describe a continuación. Generalmente, la relación de peso de agua con el alcohol está en el rango de aproximadamente 1:1 a cerca de 20:1. La cantidad total de mezcla de alcohol-agua en este tipo de preparación, por lo general es en el rango de aproximadamente 70 a cerca de 99.9% en peso de la preparación. El alcohol por lo general es etanol o isopropanol. Se prefiere el etanol.

El pH de tales preparaciones líquidas y otras de la invención generalmente es en el rango de aproximadamente 4.5 a cerca de 9 y por lo general de aproximadamente 5.5 a 8. El pH preferiblemente está en el rango de aproximadamente 6 a cerca de 8.0, preferiblemente es 7.4. El pH se puede controlar con ácido (por ejemplo, ácido cítrico o ácido benzoico) o base (por ejemplo hidróxido de sodio) o regulador (como con citrato de sodio, benzoato, carbonato, o bicarbonato, fosfato hidrógeno disódico, fosfato dihidrógeno de sodio, etc).

Otras formas deseables de esta invención, la composición oral puede ser sustancialmente sólida o pastosa en carácter, tal como polvo para dientes, un comprimido dental o un dentífrico, es decir una pasta de dientes (crema dental) o dentífrico en gel. El vehículo de tales preparaciones orales sólidas o pastosas generalmente contiene material de pulido aceptable dentalmente. Ejemplos de materiales de pulido son metafosfato de sodio insoluble en agua, metafosfato de potasio, fosfato de tricalcio, fosfato de calcio dihidratado, fosfato anhidro dicálcico, pirofosfato de calcio, ortofosfato de magnesio, fosfato de trimagnesio, carbonato de calcio, alúmina hidratada, alúmina calcinada, silicato de aluminio, silicato de zirconio, sílica, bentonita, y mezclas de estos. Otro material de pulido apropiado incluye las resinas termoestables particuladas tales como melamina-, fenólico, y urea-formaldehídos, y poliésteres y poliepóxidos reticulados. Los materiales de pulido reticulados incluyen sílica cristalina que tiene tamaño de partícula de hasta aproximadamente 5 micrones, un tamaño de partícula medio de hasta aproximadamente 1.1 micrones, y un área superficial de hasta aproximadamente 50,000 cm<sup>2</sup>/gm., sílica gel o sílica coloidal, y complejo metal alcalino aluminosilicato amorfo.

Cuando se emplean geles claros visualmente, un agente de pulido de sílica coloidal, tal como aquellas vendidas bajo la marca comercial SYLOID como Syloid 72 y Syloid 74 o bajo la marca comercial SANTOCEL como Santocel 100, complejos de metal alcalino aluminosilicato son útiles particularmente dado que tienen índices de refracción cerca a los índices de refracción de sistemas líquidos de agente de gelificación (incluyendo agua y/o humectante) utilizados comúnmente en dentífricos.

Muchos de los materiales de pulido así llamados "insolubles en agua" son de carácter aniónico y también incluyen pequeñas cantidades de material soluble. De esta manera, el metafosfato de sodio insoluble se puede formar de cualquier forma apropiada como se ilustra por Thorpe's Dictionary of Applied Chemistry, [Volume 9, 4th Edition, pp. 510-511]. Las formas de metafosfato de sodio insoluble conocidas como sal de Madrell y sal de Kurrol además son ejemplos de materiales apropiados. Estas sales de metafosfato muestran solo una solubilidad de minutos en agua, y por lo tanto se refieren comúnmente como metafosfatos insolubles (IMP). Está presente en este una cantidad menor de material de fosfato soluble como impurezas, usualmente un pequeño porcentaje tal como hasta 4% en peso. La cantidad de material de fosfato soluble, que se considera que incluye un trimetafosfato de sodio soluble en el caso de metafosfato insoluble, se puede reducir o eliminar lavando con agua si desea. El metafosfato de metal alcalino insoluble por lo general se emplea en forma de polvo de un tamaño de partícula de tal manera que no más del 1% del material es mayor de 37 micrones.

El material de pulido generalmente está presente en las composiciones sólidas o pastosas en concentraciones en peso de aproximadamente 10% a cerca de 99%. Preferiblemente, está presente en cantidades de aproximadamente 10% a cerca de 75% en pasta de dientes, y de aproximadamente 70% a cerca de 99% en polvo para dientes. En pastas de dientes, cuando el material de pulido es de naturaleza silícea, generalmente está presente en cantidad de aproximadamente 10-30% en peso. Por lo general, otros materiales de pulido están presentes en cantidades de aproximadamente 30-75% en peso

En una pasta de dientes, el vehículo líquido puede comprender agua y humectante por lo general en una cantidad que oscila de aproximadamente 10% a cerca de 80% en peso de la preparación. Ejemplos de humectantes/portadores apropiados son la glicerina, propileno glicol, sorbitol y polipropileno glicol. También son ventajosas las mezclas líquidas de agua, glicerina y sorbitol. En geles claros dónde el índice de refracción tiene una consideración importante, se emplean preferiblemente aproximadamente 2.5 - 30% peso/peso de agua, 0 a cerca de 70% peso/peso de glicerina y aproximadamente 20-80% peso/peso de sorbitol.

Por lo general, las pasta de dientes, cremas y geles contienen un espesante natural o sintético o agente gelificante en proporciones de aproximadamente 0.1 a cerca de 10, preferiblemente aproximadamente 0.5 a cerca de 5% peso/peso. Un espesante apropiado es la hectorita sintética, una arcilla de complejo de silicato de metal alcalino de magnesio coloidal sintético disponible por ejemplo como Laponite (por ejemplo CP, SP 2002, D) comercializada por Laporte Industries Limited. Laponite D tiene, aproximadamente en peso 58.00% de SiO<sub>2</sub>, 25.40% de MgO, 3.05% de Na<sub>2</sub>O, 0.98% de Li<sub>2</sub>O, y un poco de agua y metales trazas. Su peso específico real es 2.53 y tiene una densidad aparente de 1.0 g/ml a 8% de humedad.

Otros espesantes apropiados incluyen Musgo irlandés, carragenina iota, goma de tragacanto, almidón, polivinilpirrolidona, hidroxietilpropilcelulosa, hidroxibutil metil celulosa, hidroxipropil metil celulosa, hidroxietil celulosa (por ejemplo disponible como Natrosol), sodio carboximetil celulosa, y sílica coloidal tal como Syloid molido finamente (por ejemplo 244). También se pueden incluir agentes solubilizantes, tales como polioles humectantes como propileno glicol, dipropileno glicol y hexileno glicol, celosolves tales como metil celosolve y etil celosolve, aceites vegetales y ceras que contienen al menos aproximadamente 12 carbonos en una cadena lineal tal como aceite de oliva, aceite de castor y vaselina y ésteres tales como amil acetato, etil acetato y bencil benzoato.

Se comprenderá que, como es convencional, las preparaciones orales son para ser vendidas o de otra manera distribuidas en envases etiquetados apropiados. Así, un frasco de enjuague bucal tendrá una etiqueta que lo describa, en sustancia, como un enjuague bucal o enjuagues bucales y que tienen instrucciones para su uso; y una pasta de dientes, crema o gel usualmente será en un tubo colapsible, por lo general de aluminio, plomo revestido o plástico, u otro dispensador comprimible, bomba o presurizado para dosificar los contenidos, que tienen una etiqueta que lo describe, en sustancia, como una pasta de dientes, gel o crema dental.

Los agentes tensoactivos orgánicos se utilizan en las composiciones de la presente invención para lograr incrementar la acción profiláctica, ayudar a conseguir una dispersión a fondo y completa del agente activo por toda la cavidad oral, y hacer las composiciones instantáneas más aceptables cosméticamente. Los materiales tensoactivos orgánicos preferiblemente son de naturaleza aniónica, no-iónica o anfófica que no desnaturalizan el anticuerpo de la invención, y se prefiere emplear como el agente tensoactivo un material detergente que imparta a la composición propiedades detergentes y espumantes mientras que no desnaturaliza el anticuerpo. Los ejemplos apropiados de agentes tensoactivos aniónicos son sales solubles en agua de monosulfatos monoglicérido de ácido graso superior, tales como la sal de sodio del monoglicérido monosulfatado de ácidos grasos de aceite de coco hidrogenado, alquil sulfatos superiores tales como sodio lauril sulfato, alquil aril sulfonatos tales como dodecil benceno sulfonato de sodio, sulfo-acetatos de alquilo superior, ésteres de ácido graso superior de 1,2-dihidroxi propano sulfonato, y las acil amidas alifáticas superiores sustancialmente saturadas de compuestos de ácido carboxílico amino alifático inferior, tal como aquellos que tienen de 12 a 16 carbonos en los radicales de ácido graso, alquilo o acil, y similares. Ejemplos de las amidas mencionadas anteriormente son N-lauroil sarcosina, y las sales de sodio, potasio, y etanolamina de N-lauroil, N-miristoil, o N-palmitoil sarcosina que debería ser sustancialmente libre de jabón o material similar del ácido graso superior. El uso de estos compuestos de sarconita en las composiciones orales de la presente invención particularmente es ventajosa dado que estos materiales muestran un marcado efecto

5 prolongado en la inhibición de la formación de ácido en la cavidad oral, debido a la descomposición de carbohidratos además de ejercer alguna reducción en la solubilidad del esmalte de los dientes en soluciones ácidas. Ejemplos de agentes tensoactivos no-iónicos solubles en agua, apropiados para utilizar con anticuerpos son los productos de condensación de óxido de etileno con diversos compuestos que contienen hidrógeno reactivo, reactivos entre ellos que tienen cadenas hidrofóbicas largas (por ejemplo cadenas alifáticas de aproximadamente 12 a 20 átomos de carbono), cuyos productos de condensación ("etoxámeros") contienen fracciones de polioxietileno hidrofílicos, tales como productos de condensación de poli (óxido de etileno) con ácidos grasos, alcoholes grasos, amidas grasas, alcoholes polihídricos (por ejemplo sorbitan monoestearato) y óxido de polipropileno (por ejemplo materiales Plurónicos).

10 El agente tensoactivo por lo general está presente en una cantidad de aproximadamente 0.1-5% en peso. Es de notar, que el agente tensoactivo puede ayudar en la disolución del anticuerpo de la invención y por consiguiente disminuye la cantidad de humectante solubilizante necesario.

15 Otros diferentes materiales se pueden incorporar en las preparaciones orales de esta invención tales como agentes blanqueantes, conservantes, siliconas, compuestos de clorofila y/o material amoniacal tal como urea, fosfato de diamonio, y mezclas de estos. Estos adyuvantes, cuando están presentes, se incorporan en las preparaciones en cantidades que sustancialmente no afectan de forma adversa las propiedades y características deseadas.

20 También se puede emplear cualquier saborizante o material edulcorante apropiado. Ejemplos de constituyentes saborizantes apropiados son aceites saborizantes, por ejemplo aceite de menta verde, yerbabuena, menta fresca, sassafrás, clavo, salvia, eucalipto, mejorana, canela, limón, y naranja, y salicilato de metilo. Los agentes edulcorantes apropiados incluyen sacarosa, lactosa, maltosa, sorbitol, xilitol, ciclamato de sodio, perillartina, AMP (aspartil fenil alanina, metil éster), sacarina, y similares. Convenientemente, los agentes aromatizantes y los edulcorantes pueden cada uno o juntos comprender de aproximadamente 0.1% a 5% más de la preparación.

25 En la práctica preferida de esta invención una composición oral de acuerdo con esta invención tal como enjuague bucal o dentífrico que contiene la composición de la presente invención, preferiblemente se aplica regularmente a las encías y dientes, por ejemplo cada día o cada segundo o tercer día o preferiblemente de 1 a 3 veces diarias, a un pH de aproximadamente 4.5 a cerca de 9, por lo general aproximadamente 5.5 a cerca de 8, se prefiere aproximadamente 6 a 8, durante al menos 2 semanas hasta 8 semanas o más hasta una vida útil.

30 Las composiciones de esta invención se pueden incorporar en pastillas, o en goma de mascar u otros productos, por ejemplo por agitación en una base de goma caliente o revestimiento de la superficie exterior de una base de goma, ilustrativos de los que se pueden mencionar jelutong, latex de caucho, resinas de vinilita, etc., deseablemente con plastificantes o suavizantes convencionales, azúcar u otros edulcorantes o por ejemplo glucosa, sorbitol y similares.

La composición de esta invención también incluye vehículos de administración dirigida tales como dispositivos de irrigación de la bolsa periodontal, colágeno, elastina, o esponjas sintéticas, membranas o fibras colocadas en la bolsa periodontal o utilizada como una membrana de barrera o aplicadas directamente en la raíz del diente

35 Los siguientes ejemplos, además son ilustrativos de la naturaleza de la presente invención, pero se entiende que la invención no se limita a estos. Todas las cantidades y proporciones mencionadas en este documento y en las reivindicaciones anexas, están en peso a menos que se indique de otra manera.

**EJEMPLO 1**

40 Clonación y expresión de los dominios de proteinasa y adhesina de *P. gingivalis* RgpA45, RgpA44, RgpA27 y RgpA15 en *E. coli* y prueba de las proteínas recombinantes como una vacuna en el modelo de absceso de murino.

Tabla 1. Cebadores de oligonucleótidos utilizados para la amplificación de las secuencias de nucleótidos que codifican RgpA45, RgpA44, RgpA27 y RgpA15.

Proteína Recombinante		Cebadores
RgpA45	Hacia adelante	5'-GCGCAGATCTTACACACCGGTAGAGG-3'
	Reverso	5'-GCGCGTCGACTTAGCGAAGAAGTTCGGGG-3'
RgpA44	Hacia adelante	5'-GCGCCATATGAGCGGTCAGGCCGAGATTGCTTG-3'
	Reverso	5'-GCGCCTCGAGGCGCTTGCCATTGCCTTGATCTC-3'

RgpA27	Hacia adelante	5'-GCGCGCTAGCGTATACATGGCCAACGAAGCCAAGG-3'
	Reverso	5'-GCGCAGATCTCTTGATAGCGAGTTTGTGTC-3'
RgpA15	Hacia adelante	5'- GCGCGCTAGCGTATACATGGCAGACTTCACGGAAACGTTTC- 3'
	Reverso	5'-GCGCAGATCTTTTGGCGCCATCGGCTTCCG-3'

Cada uno de los dominios de la proteinasa y adhesina del gen *rgpA*, fueron amplificados utilizando los cebadores enumerados en la Tabla 1, ADN genómico de *P. gingivalis* W50 con Elongase® (Gibco BRL) polimerasa de ADN y un termociclador PC-960 (Corbett Research Technologies). Se llevó a cabo un PCR, utilizando los cebadores oligonucleótidos, esencialmente como se describe en el protocolo de instrucción de Elongase, utilizando las siguientes condiciones: 25 ciclos de desnaturalización (94°C, 30 seg.), hibridación (50°C, 45 seg.), y extensión (70°C, 1.5 min). El producto de PCR se purificó utilizando PCR SpinClean® (Progen) y se ligó en plásmido vector pGEMT-easy (Promega) y se transformó en *E. coli* JM109 competente (Promega) siguiendo los protocolos de los fabricantes. Todos los procedimientos fueron similares para la preparación de los cuatro recombinantes por el proceso detallado para la RgpA44 solo será descrito. El ADN del plásmido recombinante pGEMT-easy-RgpA44 fue digerido con NdeI y XhoI para liberar el ADN inserto. El ADN inserto fue aislado mediante electroforesis en gel de agarosa (0.8%) y se purificó utilizando el kit de extracción de gel Qiafilter (Qiagen). El ADN inserto purificado se ligó en Qiafilter vector de expresión de plásmido purificado pET28a (Novagen) que ha sido previamente digerido con NdeI y XhoI, y los productos de unión fueron transformados en el huésped sin-expresión, *E. coli* JM109. El plásmido pET28-RgpA44 recombinante, a continuación se transformó en el huésped de expresión de *E. coli*, HMS174(DE3) y se seleccionó sobre LB que contiene 50 µg de kanamicina. La r-RgpA44 expresada de pET28a contiene una etiqueta hexahistidina fusionada al N-terminal de la proteína recombinante expresada. La expresión de r-RgpA44 fue inducida mediante la adición de IPTG y se purificó mediante cromatografía de afinidad de níquel. La integridad del inserto de pET28-RgpA44 se confirmó, mediante el análisis de secuencia de ADN.

#### 20 Expresión de *E. coli* recombinante

Una sola colonia transformante se utilizó para inocular 10 mls de caldo de Luria-Bertani que contiene 50 µg/ml de kanamicina a 37°C, hasta que la densidad óptica (OD<sub>600</sub>) fue 1.0. Este inóculo, luego se utilizó para inocular 500 ml de caldo Terrific (que contiene fosfatos de potasio y 50 µg/ml de kanamicina). La OD<sub>600</sub> de este cultivo se dejó llegar a 2.0 antes de la inducción con IPTG 0.1 mM. Después de un período de inducción de 4.5 horas a 37°C, el cultivo se cosechó por centrifugación a 4000 rpm, durante 20 min a 4°C y el pellet fue almacenado a -70°C para la extracción de cuerpos de inclusión.

#### Aislamiento y solubilización de cuerpos de inclusión

El pellet bacteriano se descongeló sobre hielo y se volvió a suspender en solución reguladora de enlace (imidazol 5 mM, NaCl 500 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 7.9), luego se somete a ultrasonido y se centrifuga a 20,000 x g para recolectar los cuerpos de inclusión. El pellet se volvió a suspender en solución reguladora de enlace y el proceso de sonicación y centrifugación se repitió dos veces más para liberar más proteína. El pellet luego se volvió a suspender en solución reguladora de enlace que contiene urea 6 M y se incubó sobre hielo durante 2-3 hrs agitando para disolver completamente las proteínas. Cualquier material insoluble remanente se retiró por centrifugación a 39,000 x g durante 20 min. El sobrenadante se filtró a través de una membrana de 0.45 µm antes de la purificación en columna.

#### Purificación de níquel-ácido nitrilotriacético (Ni-NTA) y plegamiento de las proteínas de las inclusiones solubilizadas

Se utilizó cromatografía de afinidad de metal Ni-NTA, para purificar las proteínas recombinantes vía la etiqueta H6. En resumen, las proteínas se unieron en lote a la resina Ni-NTA equilibrada (Qiagen) la cual fue vertida en una columna pequeña y las proteínas sin unir se eluyeron bajo gravedad. La columna luego se lavó con 10 volúmenes de solución reguladora de enlace seguido por 5 volúmenes de la columna de solución reguladora de lavado (imidazol 60 mM, NaCl 500 mM, Tris-HCl 20 mM, urea 6 M, pH 7.9). A continuación, la proteína unida fue eluida en solución reguladora que contiene imidazol 1M, NaCl 500 mM, Tris-HCl 20 mM, urea 6M, pH 7.9).

#### Renaturalización de la proteína recombinante

Las fracciones que eluyeron completamente de la resina NI-NTA se mezclaron y se plegaron mediante la diálisis paso a paso de 6 M a 3 M a 1.5 M a 0 M de Urea contenido en la siguiente solución reguladora Tris-HCl 0.5 M, NaCl 50 mM y 8% de Glicerol.



## Electroforesis en Gel de Poliacrilamida y Transferencia de Western

- 5 SDS-PAGE se llevó a cabo como se describe por Laemmli. Las muestras se mezclaron con un volumen igual de 2 x solución reguladora de reducción de la muestra, se hirvieron durante 10 min a 95°C y se pasaron sobre geles al 12% de Tris-glicina (Novex). Los estándares de peso molecular (See-Blue™) también se adquirieron de Novex. Se prepararon Western blots mediante electrotransferencia de las proteínas sobre nitrocelulosa durante 1 hr a 100 voltios. Las membranas fueron bloqueadas con solución de caseína al 1% antes de la incubación con anticuerpo primario diluido a 1/1000, se lavaron e incubaron con un conjugado HRP-cabra-anti-conejo (KPL) se lavaron y desarrollaron con sustrato de peroxidasa membrana TMB (KPL).

## Antisuero

- 10 El anti-suero policlonal fue construido para las proteínas recombinantes purificadas dosificando ratones BALB/c con 2 X 20 µg de proteína recombinante en adyuvante incompleto de Freund (Sigma) con tres semanas de diferencia. Los ratones se desangraron una semana después de la segunda dosis y el anti-suero generado se utilizó para seleccionar los Western blots de la célula completa *P. gingivalis* W50 realizados bajo condiciones de reducción, desnaturizantes.
- 15 La pureza de las proteínas recombinantes se confirmó utilizando espectrometría de masas MALDI-TOF y análisis de la secuencia N-terminal.

## Modelo de lesión murino

- 20 Grupos de 10 ratones BALB/c hembras (6-8 semanas de edad) fueron inmunizados (20 µg) por vía subcutánea con cada proteína recombinante, r-RgpA45, r-RgpA44, r-RgpA27 y r-RgpA15 así como células *P. gingivalis* muertas con formalina y *E. coli*; todas emulsificadas en Adyuvante de Freund Incompleto. Las inmunizaciones se dieron en la base de la cola y ocurrieron cuatro semanas y una semana antes del desafío con *P. gingivalis*. Dos días antes del desafío los ratones se desangraron desde el plexo retroocular. Los ratones BALB/c se desafiaron con  $7.5 \times 10^9$  de células viables de *P. gingivalis* 33277 por vía subcutánea en el abdomen. Después del desafío, los ratones fueron examinados diariamente para el número y tamaño de lesiones durante un periodo de siete días. Las lesiones desarrolladas en el abdomen de los ratones y el tamaño de lesión máxima en mm<sup>2</sup> se presentan en la Fig. 1. Las significantes reducciones en el tamaño de la lesión fueron obtenidas solo con la vacunación que utiliza células completas de *P. gingivalis* muertas con formalina y el r-RgpA44 adhesina recombinante. Las otras proteínas recombinantes del gen *rgpA* no redujeron significativamente el tamaño de la lesión.
- 25

- 30 Este ejemplo demuestra la superioridad de r-RgpA44 sobre las otras proteínas recombinantes a partir del gen *rgpA* en protección contra el desafío con *P. gingivalis*.

**EJEMPLO 2**

- 35 En el ejemplo previo se demostró que la adhesina recombinante de 44kDa protegió contra el desafío con *P. gingivalis* en el modelo de lesión de ratón. Sin embargo la adhesina de 44 kDa de longitud completa cuando se expresa en *E. coli* se encontró como cuerpos de inclusión que fueron solamente solubles en solventes de desnaturización. Una serie de fragmentos a partir de la adhesina de 44kDa fue generada con el fin de mejorar la solubilidad de la proteína y potenciar el correcto plegamiento de la proteína recombinante. Los cebadores oligonucleótidos utilizados para la construcción de fragmentos de la proteína adhesina de 44kDa recombinante, se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Cebadores de oligonucleótido utilizados para construcción de los vectores de r-proteína

Proteína recombinante	Dirección	Cebadores
Fragmento 1	Hacia adelante	5' GGGAATTCCATGGGTCAGGCCGAGATTGTT 3'
Fragmento 1	Reverso	5' TCCCTCGAGCTTAACTTCCACGCAATACTC 3'
Fragmento 2	Hacia adelante	5' GGGAATTCCATGGGTCAGGCCGAGATTGTT 3'
Fragmento 2	Reverso	5' GGTCAATTGGACTCGAGATATACACAACCATTGCT 3'
Fragmento 3	Hacia adelante	5' GAGGAATTCAGATCCTTCTTGCCCCTAC 3'

Fragmento 3	Reverso	5' TCCCTCGAGCTTAACTTCCACGCAATACTC 3'
Fragmento 4	Hacia adelante	5' GAGGAATTCAGATCCTTCTTGTTCCCCTAC 3'
Fragmento 4	Reverso	5' GGTC AATTGGACTCGAGATATACACAACCKTTGCT 3'
Fragmento 5	Hacia adelante	5' GAGGAATTCAGATCCTTCTTGTTCCCCTAC 3'
Fragmento 5	Reverso	5' AGGAATTCTCGAGCTTGCCGTTGGCCTTGAT 3'
Fragmento 6	Hacia adelante	5' GGGAATTCCATGGCGAAGGTATGTAAAGACGTT 3'
Fragmento 6	Reverso	5' GGTC AATTGGACTCGAGATATACACAACCATTGCT 3'
Fragmento 7	Hacia adelante	5' GGGAATTCCATGGCGAAGGTATGTAAAGACGTT 3'
Fragmento 7	Reverso	5' AGGAATTCTCGAGCTTGCCGTTGGCCTTGAT 3'

- Utilizando métodos similares al descrito en el Ejemplo 1, los fragmentos de la adhesina de 44kDa se clonaron en plásmidos pET24b (Novagen) y se expresan en la cepa de *E. coli* BL21(DE3) (Novagen). Los niveles de expresión y la cantidad de proteína r-44kDa soluble, producidos fueron evaluados para los diferentes fragmentos. Esto se hizo después de la inducción de IPTG, donde mediante un cultivo celular de 1.5ml del cultivo de células *E. coli* recombinantes fue peletizado por centrifugación y se volvió a suspender en 150ul de solución reguladora de enlace. Luego las células fueron sonicadas durante 10 seg., utilizando una microsonda con un ajuste de 5 (Virosonic Digital 475 ultrasonic cell disruptor, The Virtis Company, NY). Después de la centrifugación durante 3 minutos (10,000 rpm) el sobrenadante se recolectó, lo que representa la fracción soluble. El pellet luego se lavó y se volvió a suspender en solución reguladora de enlace, lo que representa la fracción insoluble. El análisis de las diversas fracciones se llevó a cabo utilizando un análisis Western blot y SDS-PAGE. Los resultados de estos experimentos se muestran en la Tabla 3. Además la estabilidad de la proteína r-44kDa o los fragmentos de esta, también se pueden potenciar mediante la mutagénesis de sitio dirigido de todos o los residuos de cisteína seleccionados a residuos de serina o alanina.
- 15 La adhesina de 44kDa contiene seis residuos Cys que forman disulfuros cuando se oxidan, lo que puede resultar en plegamiento incorrecto y posiblemente conduce a la formación de proteína insoluble. Además, la estabilidad de la proteína r-44kDa o los fragmentos de la proteína r-44kDa, por lo tanto se puede potenciar mediante la mutagénesis de sitio dirigido de todos o los residuos de cisteína seleccionados a residuos de serina o alanina.

Tabla 3. Niveles de expresión y solubilidad de proteínas r-44KD

Construcción 44kD	Residuos	Tamaño (aminoácidos)	Niveles de expresión	Solubilidad
Longitud completa	1-419	419	+++++	-
Fragmento 1	2-184	183	+++++	+
Fragmento 2	2-290	289	+++++	++
Fragmento 3	65-184	120	+++++	+++++
Fragmento 4	65-290	226	+++++	+++++
Fragmento 5	65-418	352	+++++	-
Fragmento 6	192-290	99	+++++	+++++
Fragmento 7	192-418	227	+++++	-
La numeración del amino ácido se deriva de SEQ ID NO 3.				

La Figura 2 muestra los resultados de la proteína recombinante de 44kDa de longitud completa, 2 fragmentos de la proteína 44kDa (Fragmento 4; residuos 65-290 y fragmento 6; residuos 192-290) y una proteína recombinante control R2 en el modelo de absceso de ratón que se describe en el Ejemplo 1. A los ratones se les dieron 2 dosis de 20ug de proteína-r, con 3 semanas de diferencia como en el Ejemplo 1. Tanto las formas de longitud completa y del fragmento de la proteína 44kDa mostraron una protección estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) en comparación con la proteína recombinante control (R2). *P. gingivalis* completa muerta con Formalina (FK-33277) dio una protección completa del desafío.

### EJEMPLO 3

Además de utilizar los fragmentos de la adhesina de 44kDa, las proteínas quiméricas se pueden construir utilizando uno o más fragmentos de la adhesina de 44kDa con otras proteínas o fragmentos de proteína a partir de otras proteínas de *P. gingivalis*. Las secuencias ID 2 y 4 dan un ejemplo de una proteína quimérica recombinante derivada de un fragmento de la adhesina de 44kDa (Fragmento 6, residuos 192-290) unido a otro fragmento de la proteína *P. gingivalis* derivada de PG33 (número de acceso Genbank AF175715) un fragmento del terminal C del residuo 95 (residuos 286-380). En total esta proteína quimérica tiene un total de 194 residuos.

Esta proteína de fusión recombinante quimérica de fragmentos de las proteínas de 44kDa y PG33 fue producida, mediante la amplificación del fragmento C-terminal PG33 por PCR como se describe en el Ejemplo 1, utilizando los siguientes cebadores:

Hacia adelante: 5'GGCCCATGGTCGACAATAGTGCAAAGATTGAT 3'

Reverso: 5'CTATCCGGCCGCTTCCGCTGCAGTCATTACTACAA 3'

Este producto de PCR fue subclonado en los sitios Sall y NotI de pET24b para generar pET24b::PG33C. El producto de PCR del fragmento de 644kDa (ver ejemplo 2 para cebadores), luego se subclonó en el EcoRI y Sall del plásmido pET24b:: PG33C para generar una construcción de fusión de 44kDa/PG33, i.e pET24b::PG44f6-PG33C. Cuando este plásmido se transformó en la cepa *E. coli* BL21(DE3) y los estudios de expresión realizados como se describe en los Ejemplos 1 y 2, niveles altos de la proteína recombinante quimérica de 44kDa/PG33 fueron obtenidos que fue soluble cuando se analizó como en el Ejemplo 2.

### EJEMPLO 4

Antisueros de ratón contruidos para la 44kDa recombinante o los fragmentos recombinantes de la proteína de 44kDa, reaccionan con células completas de *P. gingivalis* fijadas con paraformaldehído indicando que los epitopes inmuno-reactivos se conservan en las proteínas recombinantes.

Antisueros de ratón fueron obtenidos por inmunización de ratones BALB/c con la proteína de 44kDa recombinante de longitud completa o con un fragmento recombinante de la proteína de 44kDa como se describe en los Ejemplos 1 y 2. *P. gingivalis* (cepa W50) se cultivó anaeróticamente en fase log, en caldo de infusión corazón cerebro (Oxoid) suplementado con 5ug/ml de hemina y 1ug/ml de vitamina K y 0.5mg/ml de Cisteína. Las células fueron sedimentadas por centrifugación durante 15min a 10.000rpm a 4°C y se volvió a suspender en solución salina reguladora de fosfato (PBS) que contiene 1% (peso/vol) de paraformaldehído. Las bacterias se colocaron a 4°C durante la noche, luego se lavaron y se volvieron a suspender en PBS a una densidad óptica de 0.25 a OD<sub>600</sub> (1 x 10<sup>9</sup> células/ml). Las bacterias muertas luego se mezclaron en alícuotas de 10μl con sueros policlonales de ratón mezclados a una dilución de 1:100 en 0.22μm PBS +10% de FBS+0.01% de Azida (PBS/FA) filtrado, durante 15 min a temperatura ambiente. Las células se lavaron con PBS/FA y posteriormente se incubaron 15min con 1μl de Inmunoglobulina anti-ratón FITC-marcada (Silenus) a una dilución de 1:100 en PBS/FA. Las células luego se lavaron y se volvieron a suspender en 1ml de PBS/FA.

La intensidad de fluorescencia de las células *P. gingivalis* teñidas, se cuantificó utilizando un clasificador celular de fluorescencia FACS Calibur-activado (Becton Dickinson) utilizando la banda de longitud de onda 488nm generada de un láser de ión de argón de 155mW. PBS/FA filtrado se utilizó como el fluido envolvente. Las señales de emisión de FTTC se recolectaron para cada análisis que consistió de 20,000 eventos cerrados que se recolectaron en la base del tamaño y granularidad utilizando el software CELLQuest (Becton Dickinson).

Los resultados se muestran en la Figura 3. El % marcado en cada panel indica el porcentaje de células de *P. gingivalis* que tiñen positivamente i.e., con una intensidad de fluorescencia por encima de los niveles de fondo vistos sin antisuero o con suero de ratones normales. Todas las proteínas recombinantes produjeron antisuero que reacciona con la mayoría de células de *P. gingivalis*, aunque el antisuero para el Fragmento 4 mostró una reactividad reducida en comparación con el otro antisuero de r-44kDa.

## EJEMPLO 5

Clonación y expresión de los dominios de adhesina de *P. gingivalis* Kgp39 (Kgp39) y fragmento de Kgp39 (Kgp39frag) en *E. coli* y la prueba de las proteínas recombinantes por ELISA

Tabla 4. Cebadores de oligonucleótido utilizados para la amplificación de las secuencias de nucleótidos codificantes de Kgp39

Proteína Recombinante		Cebadores
Kgp39	Hacia adelante	5'-GCAGCAGTCGACGCCAACGAAGCCAAGGTTG-3'
	Reverso	5'-GCAGCACTCGAGGCGCTTGCCATTGGCC-3'
Kgp39frag	Hacia adelante	5'-GCAGCAGTCGACTTGATTGCCGATGAC-3'
	Reverso	5'-GCAGGACTCGAGGAATGATTCGCGAAAGTGTTG-3'

Los dominios de adhesina Kgp 39 y fragmento de Kgp39, fueron amplificados utilizando los cebadores enumerados en la Tabla 4. Los cebadores consisten de una solución reguladora de 6 nucleótidos seguida por un sitio de enzima de restricción (Sall o XhoI) y secuencia específica para Kgp39. PCR se llevó a cabo utilizando Polimerasa de ADN Taq (Promega) bajo las siguientes condiciones: 25 ciclos de desnaturalización (94°C, 45 seg.), hibridación (52°C, 30 seg.), y extensión (72°C, 60 seg.). El producto de PCR se ligó en el plásmido vector pGEMT-easy (Promega) y se transformó en JM109 *E. coli* competente (Promega) como se describe previamente. Todos los procedimientos fueron idénticos para la preparación de ambos Kgp39 y fragmento de Kgp39 recombinantes y esencialmente son como se describen anteriormente para fragmentos de Rgp44 recombinantes. El ADN del plásmido pGEMT-easy-Kgp39 recombinante fue digerido con Sall y XhoI y el ADN inserto purificado se ligó en el vector de expresión de plásmido purificado pET28b (Novagen) que ha sido previamente digerido con Sall y XhoI. Los productos de unión fueron transformados en la *E. coli* JM109, huésped sin-expresión y luego se transformaron en la *E. coli* huésped de expresión, HMS174(DE3) como se describe previamente. La expresión de rKgp39 fue inducida mediante la adición de IPTG y se purificó por cromatografía de afinidad de níquel. La integridad del inserto de pET28b-Kgp39 se confirmó, mediante un análisis de secuencia de ADN.

Expresión de *E. coli* recombinante

La proteína Kgp39 y el fragmento de Kgp39 recombinante fueron expresados por la inducción con IPTG utilizando una metodología similar a la descrita para los fragmentos rRgp44. En resumen, los transformantes de colonia simples se utilizaron para inocular 5 ml de LB que contiene 50µg/ml de kanamicina a 37°C, en un agitador orbital durante la noche. Este cultivo luego se utilizó para inocular 100ml de medio fresco y se cultivó en fase de crecimiento semilogarítmica ( $OD_{600}=0.6-1.0$ ) antes de la inducción con IPTG 0.5mM, durante 6 horas. A continuación las células fueron cosechadas por centrifugación a 6500 x g y se almacenaron a -20°C durante la noche para la extracción de cuerpos de inclusión.

## Aislamiento y solubilización de cuerpos de inclusión

El pellet bacteriano se descongeló en hielo y se volvió a suspender en 10 mls de solución reguladora B ( $Na_2HPO_4$  20mM, NaCl 0.5M, urea 8M). El pellet celular re-disuelto se sonicó en hielo durante 3 x 30 impulsos por segundo a intervalos de 30 segundos, utilizando un Branson Sonifier® 250 Cell disruptor (Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, CT) con la micropunta en ajuste 3. Los restos celulares insolubles se retiraron por centrifugación a 39000 x g, durante 30 minutos a 4°C y el sobrenadante se recolectó. La fracción celular insoluble se volvió a suspender en 10mls de Solución reguladora B. Se adicionó azida de sodio (0.001% v/v) a todas las muestras antes de almacenar a 4°C. Las muestras luego se analizaron por SDS-PAGE

## Purificación con níquel-ácido nitrilotriacético (Ni-NTA) y plegamiento de las proteínas de las inclusiones solubilizadas

Las proteínas se purificaron utilizando columnas de afinidad Pharmacia Biotech HiTrap (1ml) (Amersham Pharmacia Biotech) conectadas a un equipo de Cromatografía Líquida Rápida para Proteínas (FPLC) Pharmacia. La columna se cubrió con 5 volúmenes de la columna de  $NiSO_4$  0.1M, luego se equilibró con 10 volúmenes de la columna de Solución reguladora Inicial ( $Na_2HPO_4$  20mM, NaCl 0.5M, imidazol 20mM, urea 8M) a una velocidad de flujo de 1 ml/min. Las muestras se cargaron en la columna a una velocidad de flujo de 0.5 ml/min, luego se lavaron con 10 volúmenes de Solución reguladora Inicial a una velocidad de 1ml/min. La proteína se eluyó con un gradiente lineal

de 10 volúmenes de Solución reguladora de Elución ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  20mM, NaCl 0.5M, imidazol 200mM, urea 8M) a una velocidad de flujo de 1ml/min. Las fracciones de elución se recolectaron y las muestras de cada fracción se analizaron sobre geles SDS-PAGE como se describe previamente.

#### Renaturalización de proteína recombinante

- 5 La eliminación de urea 8M de las muestras de proteína recombinante se logró utilizando Spectrum-Por®Float-A-Lyzer (Alltech, Australia). La molaridad de urea en las muestras se tomó de 8M inicialmente a 0M durante un periodo de 4 días. Las proteínas rKgp39 se plegaron por diálisis paso a paso de un contenido de Urea 8 M a 7 M a 6 M a 5 M a 4 M a 3 M a 2 M a 1 M a 0.5 M a 0 M en la siguiente solución reguladora:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  20mM, NaCl 0.5M.

#### Ensayo inmunoabsorbente con enzimas ligadas (ELISA)

- 10 Los ELISAs se realizaron para investigar el enlace de antisuero RgpA-Kgp específico con rICgp39 y fragmento de rKgp39 y el enlace de rKgp39 y fragmento de rKgp38 para matrices periodontales y proteínas huésped.

Los pozos de placas de microtitulación de polivinilo de fondo plano (Microtitre, Dynatech Laboratories, VA, USA) se cubrieron con  $5\mu\text{g/ml}$  de ya sea rKgp39 o fragmento de rKgp39 en PBS 0.1M [ $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.01M, NaCl 0.15M,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5mM, KCl 3.0mM, pH 7.4] durante la noche a temperatura ambiente (RT). La solución de revestimiento se retiró y los pozos fueron bloqueados con 1% (peso/v) de BSA en PBST 0.1M (PBS que contiene 0.1% (v/v) de Tween 20), por 1hr a RT y las placas se lavan 4 x con PBST 0.1M. Las diluciones en serie de antisuero de conejo dirigido contra el complejo proteinasa-adhesina de RgpA-Kgp de W50 *P. gingivalis* (Bhogal et al., 1997) se adicionó a cada pozo y se incubó durante la noche a RT y luego se lavaron con 6 x PBST. El anticuerpo unido se detectó por incubación con conjugado de inmunoglobulina de cabra peroxidasa de rábano de picante dirigido contra inmunoglobulina de ratón (dilución 1:4000) (Sigma, NSW, Australia) en 0.5%(peso/v) de BSA en PBS 0.1M durante 1.5 hr a RT. Las placas luego se lavaron (6x PBST) y el sustrato [ABTS 0.9mM (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenz-tiazolina-6-) sulfónico), y se adicionó 0.005% (v/v) de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , en solución reguladora ABTS ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.1M, ácido cítrico monohidrato 0.08 M) ( $100\mu\text{l/pozo}$ ). La densidad óptica a 415nm (O.D415) se determinó utilizando un lector de microplaca Bio-Rad (model 450, Bio-Rad, NSW, Australia).

- 25 Los resultados se muestran en la Figura 4.

#### Enlace de rKgp39 y fragmento de rKgp39 con matrices periodontales y proteínas huésped.

Los ELISAs también se realizaron para investigar las características de enlace de proteínas rKgp39 y fragmento de rKgp39 con las proteínas huésped de matriz fibrinógeno y colágeno tipo V y con hemoglobina. Las placas de microtitulación se cubrieron con  $10\mu\text{g/ml}$  de ya sea fibrinógeno, colágeno tipo V o hemoglobina en PBS 0.1M durante la noche a RT. La solución de revestimiento se retiró y el plástico sin cubrir remanente se bloqueó con 2% (peso/v) de leche Skim en PBST 0.1M durante 1hr a RT. La solución de bloqueo se retiró y  $5\mu\text{g/ml}$  de ya sea proteína rKgp39 o fragmento de rKgp39 en PBS 0.1M se adicionó a los pozos y se incubó durante 2hr a RT. Los pozos se lavaron 4 x con PBST 0.1M, luego las diluciones en serie de anti-suero de complejo conejo anti-RgpA-Kgp en 1% (peso/v) de leche Skim en PBST 0.1M se adicionó a cada pozo y se incubó durante la noche a RT. El anticuerpo unido se detectó, después del lavado 6 x PBST, por incubación con conjugado de inmunoglobulina de cabra peroxidasa de rábano de picante dirigido contra inmunoglobulina de conejo (dilución 1:4000) (Sigma, NSW, Australia) en 1%(peso/v) de leche Skim en PBST 0.1M, durante 1hr a RT. Las placas se desarrollaron como se describen anteriormente.

Los resultados se muestran en las Figuras 5 y 6.

#### 40 EJEMPLO 6

Este ejemplo ilustra que las secuencias de nucleótidos que codifican RgpA44 o Kgp39 o porciones de estas, se pueden insertar en, y expresar mediante diversos vectores incluyendo vectores fago y plásmidos. El éxito de expresión de la proteína y los péptidos requiere que ya sea el inserto que comprende el gen o el fragmento del gen, o el vector por sí mismo, contengan los elementos necesarios para la transcripción y traducción que sean compatibles con, y reconocidos por el sistema huésped particular utilizado para la expresión. El ADN que codifica RgpA44 o Kgp39 o los fragmentos de estas (por ejemplo, Ejemplo 2), o péptidos relacionados u oligopéptidos o péptidos quiméricos pueden ser sintetizados o aislados y secuenciados utilizando los métodos y secuencias como se ilustra en este documento. Una variedad de sistemas huésped, se puede utilizar para expresar la RgpA44 o Kgp39 o fragmentos de estas, péptidos relacionados u oligopéptidos o quimeras, que incluyen, pero no se limitan a bacterias transformadas con un vector bacteriófago, vector plásmido, o ADN del cósmido; levadura que contiene vectores de levadura; hongos que contienen vectores fúngicos; líneas celulares de insectos infectadas con virus (por ejemplo baculovirus); y líneas celulares de mamíferos transfectadas con vectores de expresión plásmido o viral, o

infectadas con virus recombinante (por ejemplo virus de vaccinia, adenovirus, virus adeno-asociados, retrovirus, etc.).

Utilizando los métodos conocidos en la técnica de biología molecular, incluyendo los métodos descritos anteriormente, diversos promotores y potenciadores se pueden incorporar en el vector o la secuencia de ADN que codifica secuencias de aminoácidos de RgpA44 o Kgp39, i.e., péptidos relacionados u oligopéptidos o quimeras, para incrementar la expresión de las secuencias de aminoácidos de RgpA44 o Kgp39, a condición de que la expresión aumentada de las secuencias de aminoácidos sea compatible con (por ejemplo, no-tóxica a) el sistema particular de célula huésped utilizado. Por lo tanto y de manera importante, la secuencia de ADN puede consistir del segmento de genes que codifica la RgpA44 o Kgp39 o los fragmentos de estas, o cualquier otro segmento o segmentos combinados del dominio que codifica epitopes funcionales y específicos de la proteína. Además, el ADN se puede fusionar al ADN que codifica otros antígenos, tales como otras proteínas de membrana exterior de la bacteria, u otros antígenos bacterianos, fúngicos, parásitos, o virales para crear un antígeno multivalente genéticamente fusionado (que comparte un esqueleto de péptido común) para utilizar como una composición de vacuna mejorada.

La selección del promotor dependerá del sistema de expresión utilizado. Los promotores variarán en fuerza, i.e. capacidad de facilitar la transcripción. Generalmente, para el propósito de expresión de un gen clonado, es deseable utilizar un promotor fuerte con el fin de obtener un nivel alto de transcripción del gen y expresión en el producto génico. Por ejemplo, promotores bacterianos, fago, o plásmido conocidos en la técnica a partir del cual un nivel alto de transcripción ha sido observado en un sistema de célula huésped que comprende *E. coli* incluye el promotor lac, promotor trp, promotor recA, promotor de ARN ribosomal, los promotores PR y PL, lacUV5, ompF, bla, lpp, y similares, se pueden utilizar para proporcionar la transcripción de la secuencia de ADN insertada que codifica las secuencias de aminoácidos.

Adicionalmente, si la proteína, péptidos relacionados u oligopéptidos o quimeras pueden ser letales o perjudiciales para las células huésped, la línea/cepa de célula huésped y vectores de expresión se pueden seleccionar de tal manera que la acción del promotor se inhibe hasta que se induce específicamente. Por ejemplo, en ciertos operones la adición de inductores específicos si es necesario para la transcripción eficiente del ADN insertado (por ejemplo, el operón lac se induce mediante la adición de lactosa o isopropil-tio-beta-Dgalactosida). Una variedad de operones tal como el operón trp, están bajo diferentes mecanismos de control. El operón trp se induce cuando el triptófano está ausente en el medio de cultivo. El promotor pL se puede inducir, mediante un incremento en temperatura de las células huésped que contienen el represor lambda sensible a la temperatura. De esta manera, más del 95% de la transcripción dirigida por el promotor se puede inhibir en las células no inducidas. Así, la expresión de la proteína RgpA44 recombinante, los péptidos relacionados, u oligopéptidos o quimeras se puede controlar mediante el cultivo de células transformadas o transfectadas bajo condiciones de tal manera que el promotor que controla la expresión del ADN insertado que codifica las secuencias de aminoácidos de RgpA44 no se induce, y cuando las células alcanzan una densidad apropiada en el medio de cultivo, el promotor se puede inducir para la expresión del ADN insertado.

Otros elementos control para la eficiente transcripción del gen o traducción del mensaje incluyen potenciadores, y señales reguladoras. Las secuencias potenciadoras son elementos de ADN que parecen incrementar la eficiencia transcripcional de una manera relativamente independiente de su posición y orientación con respecto un gen cercano. Así, dependiendo del vector de sistema de expresión de célula huésped utilizado, un potenciador se puede colocar ya sea en dirección 5' o en dirección 3', a partir de las secuencias de ADN insertado codificantes de las secuencias de aminoácidos de RgpA44 o Kgp39, para incrementar la eficiencia transcripcional. Como se ilustra previamente en este ejemplo, se han identificado otras secuencias reguladoras específicas que pueden realizar la expresión a partir del segmento del gen codificante de RgpA44 o Kgp39 y quimeras o péptidos relacionados. Estos u otros sitios reguladores, tales como señales de iniciación de la transcripción o traducción, se pueden utilizar para regular la expresión del gen codificante de RgpA44 o Kgp39, o fragmentos del gen de estos. Tales elementos reguladores se pueden insertar en las secuencias de ADN codificante de las secuencias de aminoácidos RgpA44 o Kgp39 o secuencias de ADN del vector cercano, utilizando métodos de ADN recombinante descritos en este documento para la inserción de secuencias de ADN.

Por consiguiente, las secuencias de nucleótidos de *P. gingivalis* que contienen regiones codificantes para RgpA44 o Kgp39, péptidos relacionados, u oligopéptidos o quimeras se pueden ligar en un vector de expresión en un sitio específico en relación con el promotor del vector, control, y los elementos reguladores de tal manera que cuando el vector recombinante se introduce en la célula huésped las secuencias de ADN específico de *P. gingivalis* se pueden expresar en la célula huésped. Por ejemplo, la secuencia de ADN específico de RgpA44 o Kgp39 que contiene sus propios elementos reguladores se puede ligar en un vector de expresión en una relación u orientación al vector promotor y los elementos control que permitirán la expresión de las RgpA44 o Kgp39 o los derivados. El vector recombinante luego se introduce en las células huésped apropiadas, y las células huésped se seleccionan, y detectan para aquellas células que contienen el vector recombinante. La selección y detección se puede lograr por métodos conocidos en la técnica incluyendo la detección de la expresión de un gen marcador (por ejemplo, marcador de resistencia del fármaco) presente en el plásmido, inmunodetección para la producción de epitopes

específicos de RgpA44 o Kgp39 utilizando antisuero generado para los epitopes específicos de RgpA44 o Kgp39, y sondeo del ADN de las células del huésped para la secuencia de nucleótido específico de RgpA44 o Kgp39 utilizando una o más secuencias de oligonucleótidos y los métodos descritos en este documento.

5 Las técnicas de ingeniería genética también se pueden utilizar para caracterizar, modificar y/o adaptar la RgpA44 codificada o Kgp39 recombinante o la proteína. Por ejemplo, mutagenesis dirigida al sitio de RgpA44 o Kgp39 o fragmentos de estas para modificar uno o todos los residuos Cys a Ser o residuos Ala pueden ser deseables para incrementar la estabilidad y solubilidad de la proteína recombinante para permitir una purificación y plegado más fácil. Además, las técnicas de ingeniería genética se pueden utilizar para generar las secuencias de ADN que codifican una porción de la secuencia de aminoácido de RgpA44 o Kgp39 en particular, secuencias hidrofílicas, 10 solubles que corresponden a epitopes protectores. La selección de enzima de restricción se puede hacer de tal manera que no destruya la inmunopotencia del péptido u oligopéptido o quimera resultante. Los sitios antigénicos de una proteína pueden variar en tamaño pero pueden consistir de aproximadamente 7 a cerca de 14 aminoácidos. Así, RgpA44 o Kgp39 contendrá muchos sitios antigénicos discretos; por lo tanto, muchas secuencias parciales del gen podrían codificar epitopes antigénicos de RgpA44 o Kgp39. Estas secuencias se pueden construir y utilizar en un sistema de expresión para generar péptidos quiméricos u oligopéptidos o proteínas altamente antigénicos. Las combinaciones de dos o más péptidos puede resultar en una inmunogenicidad aumentada. Cuando se utilizan combinaciones de antígenos, estos antígenos se pueden relacionar (i.e. a partir de la misma secuencia del gen o a partir de un gen estrechamente relacionado del mismo organismo). Los antígenos se pueden generar de un organismo relacionado (i.e. otra bacteria oral presente en placa subgingival), o a partir de un organismo relacionado 20 más lejanamente. En particular el organismo huésped para el vector que contiene los genes relacionados de RgpA44 o Kgp39 y las construcciones, puede ser un habitante comensal de la cavidad oral; por ejemplo un habitante de placa subgingival, placa supragingival o una bacteria asociada con la mucosa oral. Ejemplos de intrabacteria oral comensal serían la *Streptococcus species* y *Actinomyces species*, por ejemplo, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguis*, *Actinomyces naeslundii*. Estos organismos se pueden aislar del paciente con periodontitis y luego se modifican genéticamente para expresar la RgpA44 o Kgp39 o componentes, péptidos o quimeras. El ADN que codifica la RgpA44 o Kgp39, péptidos o quimeras se podría unir con el ADN que codifica las secuencias líder de proteínas extracelulares de estas bacterias intra-orales comensales. El ADN que codifica la RgpA44 o Kgp39 o los derivados también se podría unir con, o insertar en, el ADN que codifica las proteínas extracelulares para producir las proteínas de fusión secretadas. Ejemplos de proteínas extracelulares que podrían ser utilizadas para producir las proteínas de fusión con la RgpA44 o Kgp39, componentes, péptidos o quimeras podrían ser las glucosiltransferasas (GTF) o fructosiltransferasas (FTF). El organismo recombinante entonces se volvería a introducir en la cavidad oral de los pacientes y una vez colonizada la mucosa oral o los dientes, expresaría la RgpA44 o Kgp39, componente, péptido, quimera o fusión para estimular el tejido linfóide asociado con la mucosa para producir los anticuerpos neutralizantes.

35 El fragmento de ADN que codifica un antígeno se puede fusionar a las otras secuencias de ADN para permitir los procedimientos de purificación y/o expresión mejorada (i.e. las secuencias de ADN clonadas en el vector pTrxFus, se expresan como fusiones con la proteína tioredoxina de *E. coli*). Este enlace imparte las características de la tioredoxina a la proteína de fusión que ofrece la expresión soluble de las proteínas normalmente insoluble o difícil de expresar. Después de la purificación, la proteína nativa se libera mediante la eliminación de la tioredoxina total por 40 digestión con enteroquinasa. Además, el antígeno se puede utilizar como un hapteno mediante la fusión con otras secuencias que pueden incrementar la inmunogenicidad, si la proteína o el péptido expresado no es inmunogénico.

Otro sistema de expresión de plásmido implica el vector de expresión pTrcHis derivado de pUC de Invitrogen. Este vector permite un nivel alto de expresión de las secuencias de ADN, por la presencia del promotor *Trc* (que contiene la región -35 del promotor *Trp* junto con la región -10 del promotor lac) y un elemento anti-terminador *rrnB*. Los 45 vectores pTrcHis también contienen una copia del gen *lacI<sup>q</sup>* que codifica la proteína represora lac. Por consiguiente, la expresión de la proteína recombinante/péptido se induce mediante la adición de IPTG 1mM (de-represión) a *E. coli* cultivada en fase semilogarítmica. El fragmento de ADN se inserta en el sitio de clonación múltiple que se posiciona en dirección 3' y en marco con una secuencia que codifica un péptido de fusión N-terminal. El péptido de fusión N-terminal codifica (de 5' a 3'); un codón de iniciación de traducción de ATG, una serie de 6 residuos de histidina que funcionan como un dominio de enlace de metal en la proteína traducida, una transcripción que estabiliza la secuencia del gen 10 del fago T7, y una secuencia de reconocimiento de escisión de la enteroquinasa. Los lisados del cultivo celular de células que albergan el plásmido recombinante se purifican por enlace de afinidad alta con la resina Probond™ (Invitrogen). Probond™ es una resina sefarosa cargada con níquel que se utiliza para purificar las proteínas recombinantes que contienen un dominio de enlace poli-histidina. Las proteínas unidas se 55 eluyen a partir de la resina Probond™ con ya sea una solución reguladora de pH bajo o por competición con imidazol o histidina. Posteriormente, el péptido líder poli-histidina se puede retirar por digestión de la proteína expresada recombinante con Enteropeptidasa. La enteropeptidasa reconoce la secuencia de reconocimiento de endopeptidasa que está diseñada entre la etiqueta de afinidad poli-his y el sitio de clonación múltiple en el vector para permitir la escisión de la cola poli-His lejos de la proteína de interés. Luego, la proteína recombinante, purificada se puede utilizar en la generación de anticuerpos, vacunas y la formulación de ensayos de diagnóstico como se discute.

## EJEMPLO 7

Métodos para utilizar las secuencias de nucleótidos específicas de RgpA44 o Kgp39 en pruebas de diagnóstico molecular para la detección de *P. gingivalis*. Las secuencias de ácido nucleico de la presente invención se pueden utilizar en ensayos de diagnóstico molecular para detectar material genético de *P. gingivalis*. En particular, los oligonucleótidos específicos de la secuencia de RgpA44 o Kgp39 se pueden sintetizar para utilizar como cebadores y/o sondas en amplificación, y amplificación de la detección, ácidos nucleicos de *P. gingivalis*. Los recientes avances en biología molecular han proporcionado varios medios para amplificar enzimáticamente las secuencias de ácido nucleico. Actualmente, el método más comúnmente utilizado, PCR™ (reacción en cadena de la polimerasa, Cetus Corporation) implica el uso de Taq Polimerasa, secuencias conocidas como cebadores, y ciclos de calentamiento que separan la hebras del ácido desoxiribonucleico (ADN) replicante y amplificar experimentalmente un gen de interés. Otros métodos de amplificación actualmente en desarrollo incluyen LCR™ (reacción en cadena de ligasa, BioTechnica International) que utiliza ligasa de ADN, y una sonda que consiste de dos mitades de un segmento de ADN que es complementario a la secuencia del ADN para ser amplificado; enzima QB replicasa (Gene-Trak Systems) y una plantilla de la secuencia ácido ribonucleico (ARN) unida a una sonda complementaria al ADN para ser copiada que se utiliza para hacer una plantilla de ADN para la producción exponencial de ARN complementario; y NASBA™ (amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico, Cangene Corporation) que puede ser realizado sobre ARN o ADN como la secuencia de ácido nucleico para ser amplificada.

Sondas de ácido nucleico que son capaces de hibridizar con secuencias del gen específico han sido utilizadas con éxito para detectar patógenos específicos en muestras biológicas a niveles de sensibilidad que se acercan a  $10^3$  -  $10^4$  organismos por muestra [1990, Gene Probes for Bacteria, eds. Macario and deMacario, Academic Press]. Junto con un método que permite la amplificación de secuencias de ADN diana específicas, las sondas de ácido nucleico específicas para especies pueden aumentar considerablemente el nivel de sensibilidad en la detección de organismos en una muestra clínica. El uso de estas sondas puede permitir la detección directa sin depender del cultivo previo y/o las técnicas bioquímicas de identificación convencionales. Esta modalidad de la presente invención se dirige a cebadores que amplifican secuencias específicas de la especie del gen que codifica RgpA44 o Kgp39 de *P. gingivalis*, y a sondas que hibridizan específicamente con estos fragmentos de ADN amplificados. Utilizando las secuencias de ácido nucleico de la presente invención y de acuerdo con los métodos de la presente invención, tan solo un organismo de *P. gingivalis* se puede detectar en la presencia de 10 ug/ml de ADN foráneo.

Esta modalidad se dirige a oligonucleótidos específicos de la especie que se pueden utilizar para amplificar secuencias de ADN de *P. gingivalis*, se está presente, a partir del ADN extraído de muestras clínicas incluyendo placa subgingival, esputo, sangre, abscesos y otros fluidos, para determinar posteriormente si ha ocurrido la amplificación. En una modalidad de la presente invención, un par de oligonucleótidos cebadores de ADN específicos de *P. gingivalis*, se utilizan para hibridizar al ADN genómico de *P. gingivalis* que puede estar presente en ADN extraído de una muestra clínica, y para amplificar el segmento específico de ADN genómico entre los dos cebadores flanqueantes utilizando síntesis enzimáticas y ciclos de temperatura. Cada par de cebadores se designan para hibridizar solo con las secuencias de nucleótidos de *P. gingivalis* de la presente invención para la cual se han sintetizado para complementarse; uno con cada cadena del ADN bicatenario. Así, la reacción es específica incluso en la presencia de cantidades de microgramos de ADN heterólogo. Para los fines de esta descripción, el cebador derivado de la secuencia de la cadena (gen) positiva del ADN será denominado como el "cebador positivo" y el cebador derivado de la secuencia de la cadena negativa (complementaria) será denominado como el "cebador negativo".

La amplificación del ADN se puede lograr por cualquiera de los métodos disponibles comercialmente. Por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa se puede utilizar para amplificar el ADN. Una vez que los cebadores han hibridizado con las cadenas opuestas del ADN diana, la temperatura se eleva para permitir la replicación del segmento específico de ADN frente a la región entre los dos cebadores mediante una polimerasa de ADN termoestable. Entonces la reacción se termocicla de tal manera que en cada ciclo, se duplica la cantidad de ADN que representa las secuencias entre los dos cebadores, y se produce la amplificación específica de las secuencias de ADN de *P. gingivalis*, si está presente. Otra identificación del fragmento de ADN amplificado, como derivado de ADN de *P. gingivalis*, se puede lograr mediante hibridación líquida. Esta prueba utiliza uno o más oligonucleótidos marcados como sondas para hibridizar específicamente al segmento amplificado de ADN de *P. gingivalis*. La detección de la presencia de ADN amplificado específico de la secuencia, se puede lograr utilizando cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica, tal como un ensayo de retardo en gel con autoradiografía. Así, las secuencias de nucleótidos de la presente invención proveen la base de la síntesis de oligonucleótidos que tienen aplicaciones comerciales en kits de diagnóstico para la detección de *P. gingivalis*. En una modalidad relacionada, los oligonucleótidos utilizados como cebadores se pueden marcar directamente, o sintetizar para incorporar la etiqueta. Dependiendo de la etiqueta utilizada, los productos de amplificación entonces se pueden detectar, después del enlace sobre una matriz de afinidad, utilizando detección isotópica o colorimétrica.

El ADN se puede extraer de las muestras clínicas que pueden contener *P. gingivalis*, utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células contenidas en la muestra se pueden lavar en solución reguladora TE y peletizar por centrifugación. A continuación, las células se pueden volver a suspender en 100 ul de solución



reguladora de reacción de amplificación que contiene detergentes y proteinasa K. Utilizando la reacción en cadena de la polimerasa, la muestra resultante se puede componer de las células en Tris 10mM pH 8.3, KCl 50mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5mM, 0.01% de gelatina, 0.45% de NP40™, 0.045% de Tween 20™, y 60 ug/ml de proteinasa K. La muestra se incuba en un baño de agua a 55°C, durante 1 hora. Después de la incubación, la muestra se incuba a 95°C, durante 10 minutos para inactivar con calor la proteinasa K. A continuación, la muestra se puede amplificar de acuerdo con el protocolo de la reacción en cadena de la polimerasa como se establece a continuación.

El ADN de *P. gingivalis*, se puede amplificar utilizando cualquiera de varios protocolos para amplificar los ácidos nucleicos, mediante la reacción en cadena de la polimerasa. En un modo de esta modalidad, el gen que codifica la RgpA44 o Kgp39 se puede amplificar de aislados clínicos de *P. gingivalis* utilizando las siguientes condiciones. El ADN que será amplificado (1 mg de ADN genómico) se distribuye en tubos de microcentrifuga de 0.5 ml y el volumen se ajusta a 50 ul, adicionando una mezcla de reacción que comprende dNTPs 0.2 mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0.25 ug de cada cebador oligonucleótido positivo y negativo, 1 unidad de TaqI polimerasa, TaqI 10x solución reguladora (5ul), MgCl<sub>2</sub> 1mM (concentración final), y agua destilada estéril para lograr el volumen total. La TaqI polimerasa se adiciona a la mezcla de reacción justo antes de su uso y se mezcla suavemente, sin agitar. Una capa de aceite mineral, aproximadamente 2 gotas, se adiciona a cada tubo y luego los tubos se colocaron en el termociclador. De treinta a treinta y cinco ciclos en general son suficientes para la amplificación de ADN bacteriano. Un ciclo consiste de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 37°C, y 1 minuto a 72°C. El primer ciclo incluye 1 ½ minuto de incubación a 95°C, para asegurar la desnaturalización completa.

Los oligonucleótidos útiles como cebadores o sondas que hibridizan específicamente al gen que codifica la RgpA444 o Kgp39 de *P. gingivalis* y se utilizan en la amplificación y/o detección de ADN se puede sintetizar bioquímicamente, utilizando métodos conocidos en la técnica, a partir de las secuencias de nucleótidos en las listas de ID de secuencias en este documento. Para fines de detección, los oligonucleótidos de la presente invención se pueden marcar en el extremo con un radioisótopo. Las secuencias de la sonda, internas para los dos cebadores utilizados para la amplificación de la secuencia del gen, se pueden marcar en el extremo utilizando quinasa de polinucleótido T4 y ATP gamma <sup>32</sup>P. Veinte pMols de ADN de la sonda en solución reguladora de quinasa (Tris 50mM, pH 7.6 MgCl<sub>2</sub> 10mM, ditiotreitól 5mM, espermidina-HCl 0.1mM, EDTA 0.1mM, pH 8.0) se mezcla con 120 uCi de <sup>32</sup>P ATP gamma y se incubó a 37°C, durante 1 hora. La sonda marcada se separa de la etiqueta sin incorporar sobre un gel al 8% de acrilamida tratado durante 1 hora a 200 voltios en solución reguladora EDTA Tris Borato (TBE) a temperatura ambiente. La sonda marcada primero se localiza por la exposición del gel de acrilamida a una película de rayos-X, durante tres minutos. El autoradiograma resultante luego se posiciona bajo el gel, y la banda que contiene la sonda marcada se retiró del gel. La porción del gel se pulveriza en un mililitro de agua destilada estéril, y la sonda se eluye mediante incubación con agitación durante la noche a 37°C. La sonda eluida se separa de los fragmentos de gel por centrifugación utilizando una columna de cromatografía preparativa. La radioactividad de la sonda se determina, por recuento de un microlitro de la sonda marcada sobre un filtro de fibra de vidrio, mediante centelleo líquido. Tales secuencias de la sonda se pueden seleccionar a partir de cualquiera de las secuencias reveladas en este documento, a condición que la secuencia de la sonda sea interna a los dos cebadores utilizados para amplificación de las secuencias de nucleótido deseadas reveladas en la presente invención.

Se pueden utilizar métodos alternativos conocidos en la técnica para mejorar la detección de secuencias diana amplificadas de acuerdo con las composiciones y métodos de la presente invención. La sensibilidad de detección de las secuencias de ADN amplificadas, se puede mejorar sometiendo las secuencias a hibridación líquida. Los métodos alternativos de detección conocidos en la técnica, además de la electroforesis en gel y la electroforesis en gel con hibridación de Southern y autoradiografía, que se pueden utilizar con las composiciones y los métodos de la presente invención, incluyen: digestión con enzimas de restricción con electroforesis en gel; hibridación slot-blot con una sonda de oligonucleótidos marcada; amplificación con una sonda de oligonucleótido radiomarcada; amplificación con un cebador radiomarcado con electroforesis en gel, hibridación de Southern y autoradiografía; amplificación con un cebador radiomarcado con dot blot y autoradiografía; amplificación con oligonucleótidos que contienen etiquetas de afinidad (ej. biotina, o un cebador que incorpora la biotina y el otro cebador con una secuencia específica para una proteína de enlace del ADN) seguido por la detección en un ensayo basado en la afinidad (ej. ELISA); y amplificación con oligonucleótidos que contienen fluoróforos seguido por detección con fluorescencia.

Una modalidad de detección no-isotópica, implica la incorporación de la biotina en los cebadores oligonucleótidos de la presente invención. El grupo 5'-amino de los cebadores puede ser biotinilado con sulfo-NHS-biotina, o la biotina se puede incorporar directamente en el cebador mediante la síntesis del cebador en la presencia de dNTPs marcados con biotina. Los cebadores no-isotópicos marcados, luego se utilizan en la amplificación de ADN de una muestra clínica. La detección para la presencia o ausencia de secuencias diana amplificadas, se puede lograr por la captura de las secuencias diana amplificadas utilizando una matriz de afinidad que tiene avidina unida a esta, seguido por la incubación con un conjugado de una avidina que contiene una enzima, que se puede utilizar para visualizar el complejo con el posterior desarrollo del sustrato. De manera alternativa, las secuencias diana amplificadas, se pueden inmovilizar por hibridación con las sondas correspondientes de la secuencia diana en donde las sondas se han fijado sobre una matriz. La detección se puede lograr utilizando un conjugado de avidina que contiene una enzima que se puede utilizar para visualizar el complejo con el posterior desarrollo del sustrato

**EJEMPLO 8**

Métodos para utilizar RgpA44 o Kgp39, péptidos o péptidos quiméricos en inmunoensayos de diagnóstico.

5 La proteína RgpA44 o Kgp39, péptidos relacionados, oligopéptidos o quimeras se pueden purificar para utilizar como inmunógenos en formulaciones de vacunas; y como antígenos para ensayos de diagnóstico o para generar antisuero específico de *P. gingivalis* de valor terapéutico y/o de diagnóstico. La RgpA44 o Kgp39 de *P. gingivalis* o los oligopéptidos o péptidos o quimeras de estas, o la proteína recombinante, los péptidos recombinantes, o los oligopéptidos recombinantes producidos a partir de un sistema de vector de expresión, se puede purificar con métodos conocidos en la técnica incluyendo extracción de detergentes, cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, inmuoafinidad, o ultrafiltración y columnas de exclusión molecular), centrifugación diferencial, solubilidad diferencial, u otras técnicas estándar para la purificación de proteínas.

10 Como se utiliza en toda la especificación, los oligopéptidos de RgpA44 o Kgp39 se definen en este documento como una serie de péptidos correspondientes a una porción de la secuencia de aminoácido de la RgpA44 o Kgp39 respectivamente como se revela en las secuencias encerradas que se sintetizan como una o ligadas químicamente. Tales péptidos u oligopéptidos se pueden sintetizar utilizando uno de los diferentes métodos de síntesis de péptidos conocidos en la técnica incluyendo síntesis de péptidos de fase sólida estándar utilizando aminoácidos terbutiloxicarbonil [Mitchell et al., 1978, J Org Chem 43:2845-2852], utilizando aminoácidos 9-fluorenilmetiloxicarbonil sobre un soporte de poliamida [Dryland et al., 1986, J Chem So Perkin Trans I, 125-137]; por síntesis de pepscan [Geysen et al., 1987, J Immunol Métodos 03:259; 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998]; por síntesis de péptidos de fase líquida estándar; o por sistemas de vector de expresión recombinante. Modificación de los péptidos u oligopéptidos, tales como por delección y sustitución de aminoácidos (e incluyendo extensiones y adiciones a aminoácidos) y de otras formas, se puede hacer de tal manera que no disminuya sustancialmente de las propiedades inmunológicas del péptido o del oligopéptido. En particular, las secuencias de aminoácidos de la RgpA44 o Kgp39, o péptido u oligopéptido o quimera de estas, se puede alterar reemplazando uno o más aminoácidos con aminoácidos equivalentes funcionalmente, dando lugar a una alteración que es silenciosa en términos de una diferencia observada en el comportamiento fisicoquímico de la proteína, péptido, u oligopéptido o quimera. Los aminoácidos equivalentes funcionalmente se conocen en la técnica como aminoácidos que se relacionan y/o tienen carga o polaridad similar. Así, una secuencia de aminoácido que es sustancialmente la de las secuencias de aminoácidos representadas en el Listado de Secuencias en este documento, se refiere a una secuencia de aminoácido que contiene sustituciones con aminoácidos equivalentes funcionalmente sin cambiar la función biológica primaria de la proteína, el péptido, u oligopéptido o quimera.

15 La proteína RgpA44 o Kgp39, los péptidos, oligopéptidos y quimeras purificados, se pueden utilizar como antígenos en inmunoensayos para la detección de antisuero específico de *P. gingivalis*, presente en el fluido corporal de un individuo sospechoso de tener una infección ocasionada por *P. gingivalis*. La detección de RgpA44 o péptidos relacionados como un antígeno en inmunoensayos, incluye cualquier inmunoensayo conocido en la técnica, incluyendo pero no limitando a, radioinmunoensayo, ensayo inmunoabsorbente de enzima ligado (ELISA), ensayo de "fase doble", reacción de la precipitina, ensayo de aglutinación, inmunoensayo fluorescente, e inmunoensayo basado en la quimioluminiscencia.

**EJEMPLO 9**

20 Métodos y compuestos para formulaciones de vacunas relacionadas con RgpA44 o Kgp39 y péptidos relacionados y quimeras.

Esta modalidad de la presente invención, provee proteína RgpA44 o Kgp39 recombinante y/o péptidos u oligopéptidos o quimeras de estos, para ser utilizados como inmunógenos en una vacuna profiláctica y/o terapéutica para inmunización activa para proteger contra o tratar infecciones causadas por *P. gingivalis*. Para los fines de vacuna, un antígeno de *P. gingivalis* que comprende una proteína bacteriana debería ser inmunogénica, e induce los anticuerpos funcionales dirigidos a uno o más epitopes expuestos a la superficie sobre la bacteria intacta, en donde el o los epitopes se conservan entre cepas de *P. gingivalis*.

25 Para el desarrollo de la vacuna, las secuencias de aminoácidos específicos de RgpA44 o Kgp39 se pueden purificar de un huésped que contiene un vector recombinante que expresa RgpA44 o Kgp39 o quimeras o péptidos relacionados. Tales huéspedes incluyen, pero no se limitan a, transformantes bacterianos, transformantes de levadura, transformantes fúngicos filamentosos, y células cultivadas que han sido o bien infectadas o transfectadas con un vector que codifica las secuencias de aminoácidos de RgpA44 o Kgp39. La proteína recombinante, péptido, u oligopéptido o quimera inmunógeno se incluye como el material inmunogénico relevante en la formulación de la vacuna, y en cantidades terapéuticamente efectivas, para inducir una respuesta inmune. Muchos métodos se conocen para la introducción de una formulación de vacuna en el humano o animal que será vacunado. Estos incluyen, pero no se limitan a, administración intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, ocular, intranasal, y oral. La vacuna además puede comprender un portador fisiológico tal como una solución, un polímero o liposomas; y un adyuvante, o una combinación de estos.

Se utilizan varios adyuvantes junto con las formulaciones de vacunas. Los adyuvantes ayudan modulando la respuesta inmune y obteniendo un nivel superior y más duradero de inmunidad utilizando cantidades más pequeñas de antígeno de la vacuna o dosis más pequeñas que si el antígeno de la vacuna fuera administrado solo. Ejemplos de adyuvantes incluyen adyuvante de Freund incompleto (IFA), Adyuvante 65 (que contienen aceite de cacahuete, monooleato de manida y monoestearato de aluminio), emulsiones de aceite, adyuvante Ribi, los polioles plurónicos, poliaminas, Avidina, Quil A, saponina, MPL, QS-21, y geles minerales tales como sales de aluminio. Otros ejemplos incluyen aceite en emulsiones de agua tal como SAF-1, SAF-0, MF59, Seppic ISA720, y otros adyuvantes particulados tales como ISCOMs™ y ISCOM matrix™. Una extensa pero no exhaustiva lista de otros ejemplos de adyuvantes se enumeran en Cox and Coulter 1992 [En : Wong WK (ed.) *Animals parasite control utilising technonolgy*. Bocca Raton; CRC press, 1992; 49-112]. Además del adyuvante, la vacuna puede incluir portadores convencionales farmacéuticamente aceptables, excipientes, rellenos, soluciones reguladoras o diluentes según sea apropiado. Una o más dosis de la vacuna que contiene adyuvante se puede administrar profilácticamente para prevenir la periodontitis o terapéuticamente para tratar la periodontitis ya presente.

En otra preferida composición la preparación se combina con un adyuvante de mucosa y se administra por vía oral. Ejemplos de adyuvante de mucosas son toxina del cólera y toxina lábil al calor de *E.coli*, las subunidades B no-tóxicas de estas toxinas, mutantes genéticos de estas toxinas que tienen una toxicidad reducida. Otros métodos que se puedan utilizar para administrar RgpA44 vía oral incluyen la incorporación de la proteína en partículas de polímeros biodegradables (tales como acrilatos o poliésteres) por microencapsulación para ayudar a la absorción de las microesferas del tracto gastrointestinal y para proteger la degradación de las proteínas. Los liposomas, ISCOMs™, hidrogeles son ejemplos de otros métodos potenciales que además pueden ser potenciadas por la incorporación de moléculas diana tales como LTB, CTB o lectinas para la administración de la proteína RgpA44 o péptido al sistema inmune de la mucosa. Además de la vacuna y el adyuvante de la mucosa o sistema de entrega la vacuna puede incluir portadores convencionales farmacéuticamente aceptables, excipientes, rellenos, cubiertas, medios de dispersión, agentes antibacterianos y antifúngicos, soluciones reguladoras o diluentes según sea apropiado.

Otra modalidad de este modo de la invención implica la producción de secuencias de aminoácidos específicos recombinantes de RgpA44 o Kgp39 como un hapteno, i.e. una molécula que no puede por sí misma producir una respuesta inmune. En dicho caso, el hapteno puede ser unido covalentemente a un portador u otra molécula inmunogénica que conferirá inmunogenicidad al hapteno acoplado cuando se expone al sistema inmune. Así, como un hapteno específico de RgpA44 o Kgp39, unido a una molécula portadora, puede ser el inmunógeno en una formulación de vacuna.

Otro modo de esta modalidad, provee ya sea una vacuna viral recombinante viva, una vacuna bacteriana recombinante, vacuna bacteriana atenuada recombinante, o una vacuna viral recombinante inactivada que se utiliza para proteger contra infecciones causadas por *P. gingivalis*. El virus de vaccinia es el mejor ejemplo conocido, en la técnica, de un virus infeccioso que está diseñado para expresar antígenos de la vacuna derivados de otros organismos. El virus de vaccinia vivo recombinante, que está atenuado o tratado de otra manera, de tal forma que no ocasione enfermedad por sí mismo, se utiliza para inmunizar el huésped. La posterior replicación del virus recombinante dentro del huésped provee una estimulación continua del sistema inmune con los antígenos de las vacunas tales como proteína RgpA44 o Kgp39 recombinante, quimeras o péptidos relacionados, proporcionando así, inmunidad duradera.

Otros vectores de vacuna viva incluyen: adenovirus, citomegalovirus, y preferiblemente los poxvirus tales como vaccinia [Paoletti and Panicali, U.S. Patent No. 4,603,112] y cepas de *Salmonella* atenuadas [Stocker et al., U.S. Patent Nos. 5,210,035; 4,837,151; and 4,735,801; y Curtiss et al., 1988, Vaccine 6:155-160]. Las vacunas vivas son particularmente ventajosas, dado que estimulan continuamente el sistema inmune que puede conferir sustancialmente inmunidad duradera. Cuando la respuesta inmune protege contra una posterior infección por *P. gingivalis*, la vacuna viva por sí misma, se puede utilizar en una vacuna preventiva contra *P. gingivalis*. En particular, la vacuna viva se puede basar en una bacteria que es un habitante comensal de la cavidad oral. Esta bacteria se puede transformar con un vector que porta una RgpA44 o Kgp39, péptidos, oligopéptidos o péptidos quiméricos recombinantes y luego se utiliza para colonizar la cavidad oral, en particular la mucosa oral. Una vez colonizada la mucosa oral, la expresión de la proteína recombinante, péptido o quimera estimulará el tejido linfoide asociado con la mucosa para producir la neutralización de anticuerpos. Además para ilustrar este modo de la modalidad, utilizando técnicas de biología molecular tales como aquellas ilustradas en el Ejemplo 8, los genes que codifican la RgpA444 o Kgp39 o fragmentos del gen que codifican uno o más péptidos o quimeras se pueden insertar en el ADN genómico del virus de vaccinia en un sitio que permite la expresión de epitopes pero no afectan negativamente el crecimiento o replicación del vector del virus de vaccinia. El virus recombinante resultante se puede utilizar como el inmunógeno en una formulación de vacuna. Los mismos métodos se pueden utilizar para construir una formulación de vacuna viral recombinante inactivada, excepto en que el virus recombinante es inactivado, tal como mediante medios químicos conocidos en la técnica, antes de utilizarse como un inmunógeno y sin afectar sustancialmente la inmunogenicidad del inmunógeno expresado. Una mezcla de los virus inactivados que expresan diferentes epitopes, se puede utilizar en la formulación de una vacuna inactivada multivalente. En cualquier caso, la vacuna

recombinante inactivada o mezcla de virus inactivados, se pueden formular con un adyuvante apropiado con el fin de potenciar la respuesta inmunológica para los antígenos de la vacuna.

En otra variación de esta modalidad, el material genético se utiliza directamente como la formulación de vacuna. El ácido nucleico (ADN o ARN) que contiene secuencias que codifican la proteína RgpA44 o Kgp39, péptidos relacionados u oligopéptidos o quimeras, ligadas operativamente a uno o más elementos reguladores se pueden introducir directamente para vacunar al individuo ("transferencia directa del gen") contra cepas patogénicas de *P. gingivalis*. La transferencia directa del gen en un individuo vacunado, resultando en la expresión del material genético por las células del individuo vacunado, tal como células endoteliales vasculares, así como el tejido de los órganos principales, se ha demostrado mediante las técnicas en el oficio tales como mediante inyección intravenosa de un complejo plásmido de expresión: liposoma catiónico [Zhu et al., 1993, Science 261:209-211]. Otros métodos efectivos para administrar el ADN del vector en una célula diana se conocen en la técnica. En un ejemplo, el ADN recombinante del plásmido purificado que contiene genes virales se ha utilizado para inocular vacunas (ya sea por vía parental, mucosa, o vía inmunización con gen-gun) para inducir una respuesta inmune protectora [Fynan et al. 1993, Proc Natl Acad Sci USA 90:11478-11482]. En otro ejemplo, las células retiradas de un individuo se pueden transfectar o someter a electroporación, mediante procedimientos estándar conocidos en la técnica, resultando en la introducción del ADN del vector recombinante en la célula diana. Las células que contienen el ADN del vector recombinante, luego se pueden seleccionar para utilizar métodos conocidos en la técnica, tales como vía una selección del marcador expresado en el vector, y las células seleccionadas a continuación se pueden volver a introducir en el individuo para expresar la proteína RgpA44 o Kgp39, péptidos relacionados u oligopéptidos o quimeras.

Un método preferido de vacunación con material genético comprende la etapa de administrar al individuo la molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína RgpA44 o Kgp39, péptidos relacionados, u oligopéptidos o quimeras, en donde la molécula de ácido nucleico se liga operativamente a una o más secuencias reguladoras necesarias para la expresión. La molécula de ácido nucleico se puede administrar directamente, o introducir primero en un vector viral y administrarse vía el vector. La molécula de ácido nucleico se puede administrar en un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable y puede contener compuestos que pueden potenciar la efectividad de la vacuna. Estos compuestos adicionales incluyen, pero no se limitan a, adyuvantes que potencian la respuesta inmune, y los compuestos que son dirigidos para modular la respuesta inmune, por ejemplo citoquinas, denominadas colectivamente como "moduladores inmunes"; u otros compuestos que incrementan la absorción del ácido nucleico mediante las células, denominados como "potenciadores de absorción del ácido nucleico". La inmunización con la molécula de ácido nucleico puede ser a través de cualquier ruta parenteral (intravenosa, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea, o intramuscular), o vía contacto con superficies mucosas de nasofaringe, tráquea, o tracto gastrointestinal

Como una alternativa para activar la inmunización, la inmunización puede ser pasiva, i.e. inmunización que comprende la administración de inmunoglobulina purificada que contiene anticuerpo contra epitopes de RgpA44 o Kgp39.

#### EJEMPLO 10

El siguiente es un ejemplo de una formulación propuesta de pasta de dientes que contiene anticuerpos anti-RgpA44 o anti-Kgp39.

Ingrediente	% peso/peso
Fosfato dicalcio dihidrato	50.0
Glicerol	20.0
Sodio carboximetilcelulosa	1.0
Sodio lauril sulfato	1.5
Sodio lauroil sarconisato	0.5
Sabor	1.0
Sacarina sódica	0.1
Clorhexidina gluconato	0.01

## ES 2 388 895 T3

Dextranasa	0.01
Suero de cabra que contiene anti- RgpA44 o anti-Kgp39	0.2
Agua	balance

### EJEMPLO 11

El siguiente es otro ejemplo de una formulación propuesta de pasta de dientes.

Ingrediente	% peso/peso
Fosfato dicalcio dihidrato	50.0
Sorbitol	10.0
Glicerol	10.0
Sodio carboximetilcelulosa	1.0
Sodio lauril sulfato	1.5
Sodio lauroil sarconisato	0.5
Sabor	1.0
Sacarina sódica	0.1
Sodio monofluorofosfato	0.3
Clorhexidina gluconato	0.01
Dextranasa	0.01
Suero bovino que contiene anti- RgpA(788-1004)	0.2
Agua	balance

### EJEMPLO 12

El siguiente es otro ejemplo de una formulación propuesta de pasta de dientes.

Ingrediente	% peso/peso
Fosfato dicalcio dihidrato	50.0
Sorbitol	10.0
Glicerol	10.0
Sodio carboximetilcelulosa	1.0
Lauroil dietanolamida	1.0
Sacarosa monolaurato	2.0
Sabor	1.0
Sacarina sódica	0.1

## ES 2 388 895 T3

Sodio monofluorofosfato	0.3
Clorhexidina gluconato	0.01
Dextranasa	0.01
Ig de leche de bovino que contiene anti- RgpA44	0.1
Agua	balance

### EJEMPLO 13

El siguiente es otro ejemplo de una formulación propuesta de pasta de dientes.

Ingrediente	% peso/peso
Sorbitol	22.0
Musgo irlandés	1.0
Hidróxido de sodio (50%)	1.0
Gantrez	19.0
Agua (desionizada)	2.69
Monofluorofosfato de Sodio	0.76
Sacarina sódica	0.3
Pirofosfato	2.0
Alúmina hidratada	48.0
Aceite sabor	0.95
anti- RgpA44 monoclonal	0.3
sodio lauril sulfato	2.00
Agua	balance

### EJEMPLO 14

El siguiente es un ejemplo de una formulación propuesta líquida de pasta de dientes.

Ingrediente	% peso/peso
Sodio poliacrilato	50.0
Sorbitol	10.0
Glicerol	20.0
Sabor	1.0
Sacarina sódica	0.1
Sodio monofluorofosfato	0.3

## ES 2 388 895 T3

Clorhexidina gluconato	0.01
Etanol	3.0
Ig equino que contiene anti-RgpA(788-1004)	0.2
Ácido linólico	0.05
Agua	balance

### EJEMPLO 15

El siguiente es un ejemplo de una formulación propuesta de un enjuague bucal.

Ingrediente	% peso/peso
Etanol	20.0
Sabor	1.0
Sacarina sódica	0.1
Sodio monofluorofosfato	0.3
Clorhexidina gluconato	0.01
Lauroil dietanolamida	0.3
Ig de Conejo que contiene anti-RgpA44	0.2
Agua	balance

### EJEMPLO 16

El siguiente es un ejemplo de una formulación propuesta de un enjuague bucal.

Ingrediente	% peso/peso
Gantrez S-97	2.5
Glicerina	10.0
Aceite sabor	0.4
Sodio monofluorofosfato	0.05
Clorhexidina gluconato	0.01
Lauroil dietanolamida	0.2
anti- RgpA44 de ratón monoclonal	0.3
Agua	balance

**EJEMPLO 17**

El siguiente es un ejemplo de una formulación propuesta de pastilla.

Ingrediente	% peso/peso
Azúcar	75-80
Jarabe de maíz	1-20
Aceite sabor	1-2
NaF	0.01-0.05
anti- RgpA44 de ratón monoclonal	0.3
Estearato de Mg	1-5
Agua	balance

**EJEMPLO 18**

El siguiente es un ejemplo de una formulación propuesta de crema de masaje gingival.

Ingrediente	% peso/peso
Vaselina blanca	8.0
Propilenoglicol	4.0
Alcohol estearílico	8.0
Polietileno Glicol 4000	25.0
Polietileno Glicol 400	37.0
Sacarosa monoestearato	0.5
Gluconato de clorohexidina	0.1
anti- RgpA44 de ratón monoclonal	0.3
Agua	balance

**EJEMPLO 19**

5 El siguiente es un ejemplo de una formulación propuesta de goma masticable.

Ingrediente	% peso/peso
Vaselina blanca	8.0
Propilenoglicol	4.0
Alcohol estearílico	8.0
Polietileno Glicol 4000	25.0
Polietileno Glicol 400	37.0



## ES 2 388 895 T3

Sacarosa monoestearato	0.5
Gluconato de clorohexidina	0.1
anti- RgpA44 de ratón monoclonal	0.3
Base de goma	30.0
Carbonato de calcio	2.0
Sorbitol cristalino	53.0
Glicerina	0.5
Aceite sabor	0.1
anti- RgpA de conejo monoclonal (788-1004)	0.3
Agua	balance

A lo largo de esta especificación la palabra "comprender", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", se debe entender que implica la inclusión de un elemento indicado, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas, pero no la exclusión de ningún otro elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> CSL Limited

The University of Melbourne

<120> *composición antigénica de P. gingivalis*

5 <160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1257

<212> ADN

10 <213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 1

```

agcggtcagg ccgagattgt tcttgaagct cacgatgttt ggaatgatgg atccggttat 60
cagattcttt tggatgcaga ccatgatcaa tatggacagg ttatacccag tgatacccat 120
actctttggc cgaactgtag tgtcccggcc aatctgttcg ctccgttcga atatacggtt 180
ccggaaaatg cagatccttc ttgttcccct accaatatga taatggatgg tactgcatcc 240
gtaaatatac cggccggaac ttatgacttt geaattgetg ctctcaage aaatgcaaag 300
at ttggattg ccggacaagg accgacgaaa gaagatgatt atgtatttga agccggtaaa 360
aaataccatt tccttatgaa gaagatgggt agcggtgatg gaactgaatt gactataagc 420
gaagtggtg gaagcgatta cacctatact gtctatcgtg acggcacgaa gatcaaggaa 480
ggtctgacgg ctacgacatt cgaagaagac ggtgtagctg caggcaatca tgagtattgc 540
gtggaagtta agtacacagc cggcgtatct ccgaaggatg gtaaagacgt tacggtagaa 600
agctccaatg aatttgctcc tgtacagaac ctgaccggta gtgcagtcgg ccagaaagta 660
acgcttaagt gggatgcacc taatggtagc ccgaatccaa atccaaatcc gaatccaaat 720
ccgaatcccg gaacaactac actttccgaa tcattcgaaa atggtattcc tgccatcatg 780
aagacgatcg atgcagacgg tgacgggcat ggctggaagc ctggaaatgc tcccggaatc 840
gctggctaca atagcaatgg ttgtgtatat tcagagtcac tcggctcttg tggtagtagg 900
gttcttacc ctgacaacta tctgataaca ccggcattgg atttgcctaa cggaggtaag 960
ttgactttct gggtatgccc acaggatgct aattatgcat ccgagcacta tgccggtgat 1020
gcatcttcga ccggtaacga tgcatacaac ttcacgaatg ctttggtgga agagacgatt 1080
acggcaaaag gtgttcgctc gccggaagct attcgtggtc gtatacaggg tacttggcgc 1140
cagaagacgg tagaccttcc cgcaggtacg aaatatgttg ctttccgtca cttccaaagc 1200
acggatatgt tctacatcga ccttgatgag gttgagatca aggccaatgg caagcgc 1257

```

<210> 2

<211> 588

15 <212> ADN

<213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 2

ES 2 388 895 T3

aaggtatgta aagacgttac ggtagaagga tccaatgaat ttgctcctgt acagaacctg 60  
accggtagt cagtcggcca gaaagtaacg ctttaagtggg atgcacctaa tggtaacccg 120  
aatccaaatc caaatccgaa tccaaatccg aatcccggaa caactacact ttccgaatca 180  
ttcgaaaatg gtattcctgc ctcatggaag .acgatcgatg cagacgggtga cgggcatggc 240  
tggaagcctg gaaatgctcc cggaatcgct ggctacaata gcaatggttg tgtatatctc 300  
gacaatagtg caaagattga tcgtaatcaa gaaatcaatg tttacaatac agctgaatat 360  
gcgaagacca acaacgcacc gatcaaggta gtaggttacg ctgacgaaaa aaccggtact 420  
gcggcctata acatgaagct ttcagagcgt cgtgcaaaag cggtagccaa gatgcttgaa 480  
aagtatggtg tttctgcgga tcgcattaca attgaatgga agggctcatc agagcaaatc 540

tatgaagaga acgcttgtaa tcgtattgta gtaatgactg cagcggaa 588

<210> 3

<211> 419

5 <212> PRT

<213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 3

Ser Gly Gln Ala Glu Ile Val Leu Glu Ala His Asp Val Trp Asn Asp  
 1 5 10 15  
 Gly Ser Gly Tyr Gln Ile Leu Leu Asp Ala Asp His Asp Gln Tyr Gly  
 20 25 30  
 Gln Val Ile Pro Ser Asp Thr His Thr Leu Trp Pro Asn Cys Ser Val  
 35 40 45  
 Pro Ala Asn Leu Phe Ala Pro Phe Glu Tyr Thr Val Pro Glu Asn Ala  
 50 55 60  
 Asp Pro Ser Cys Ser Pro Thr Asn Met Ile Met Asp Gly Thr Ala Ser  
 65 70 75 80  
 Val Asn Ile Pro Ala Gly Thr Tyr Asp Phe Ala Ile Ala Ala Pro Gln  
 85 90 95  
 Ala Asn Ala Lys Ile Trp Ile Ala Gly Gln Gly Pro Thr Lys Glu Asp  
 100 105 110  
 Asp Tyr Val Phe Glu Ala Gly Lys Lys Tyr His Phe Leu Met Lys Lys  
 115 120 125  
 Met Gly Ser Gly Asp Gly Thr Glu Leu Thr Ile Ser Glu Gly Gly Gly  
 130 135 140  
 Ser Asp Tyr Thr Tyr Thr Val Tyr Arg Asp Gly Thr Lys Ile Lys Glu  
 145 150 155 160  
 Gly Leu Thr Ala Thr Thr Phe Glu Glu Asp Gly Val Ala Ala Gly Asn  
 165 170 175  
 His Glu Tyr Cys Val Glu Val Lys Tyr Thr Ala Gly Val Ser Pro Lys  
 180 185 190  
 Val Cys Lys Asp Val Thr Val Glu Gly Ser Asn Glu Phe Ala Pro Val  
 195 200 205  
 Gln Asn Leu Thr Gly Ser Ala Val Gly Gln Lys Val Thr Leu Lys Trp  
 210 215 220  
 Asp Ala Pro Asn Gly Thr Pro Asn Pro Asn Pro Asn Pro Asn Pro Asn  
 225 230 235 240  
 Pro Asn Pro Gly Thr Thr Thr Leu Ser Glu Ser Phe Glu Asn Gly Ile  
 245 250 255

Pro Ala Ser Trp Lys Thr Ile Asp Ala Asp Gly Asp Gly His Gly Trp  
 260 265 270  
 Lys Pro Gly Asn Ala Pro Gly Ile Ala Gly Tyr Asn Ser Asn Gly Cys  
 275 280 285  
 Val Tyr Ser Glu Ser Phe Gly Leu Gly Gly Ile Gly Val Leu Thr Pro  
 290 295 300  
 Asp Asn Tyr Leu Ile Thr Pro Ala Leu Asp Leu Pro Asn Gly Gly Lys  
 305 310 315 320  
 Leu Thr Phe Trp Val Cys Ala Gln Asp Ala Asn Tyr Ala Ser Glu His  
 325 330 335  
 Tyr Ala Val Tyr Ala Ser Ser Thr Gly Asn Asp Ala Ser Asn Phe Thr  
 340 345 350  
 Asn Ala Leu Leu Glu Glu Thr Ile Thr Ala Lys Gly Val Arg Ser Pro  
 355 360 365  
 Glu Ala Ile Arg Gly Arg Ile Gln Gly Thr Trp Arg Gln Lys Thr Val  
 370 375 380  
 Asp Leu Pro Ala Gly Thr Lys Tyr Val Ala Phe Arg His Phe Gln Ser  
 385 390 395 400  
 Thr Asp Met Phe Tyr Ile Asp Leu Asp Glu Val Glu Ile Lys Ala Asn  
 405 410 415  
 Gly Lys Arg

<210> 4

<211> 196

<212> PRT

5 <213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 4

Lys Val Cys Lys Asp Val Thr Val Glu Gly Ser Asn Glu Phe Ala Pro  
 1 5 10 15  
 Val Gln Asn Leu Thr Gly Ser Ala Val Gly Gln Lys Val Thr Leu Lys  
 20 25 30  
 Trp Asp Ala Pro Asn Gly Thr Pro Asn Pro Asn Pro Asn Pro Asn Pro  
 35 40 45  
 Asn Pro Asn Pro Gly Thr Thr Thr Leu Ser Glu Ser Phe Glu Asn Gly  
 50 55 60  
 Ile Pro Ala Ser Trp Lys Thr Ile Asp Ala Asp Gly Asp Gly His Gly  
 65 70 75 80  
 Trp Lys Pro Gly Asn Ala Pro Gly Ile Ala Gly Tyr Asn Ser Asn Gly  
 85 90 95  
 Cys Val Tyr Leu Asp Asn Ser Ala Lys Ile Asp Arg Asn Gln Glu Ile  
 100 105 110  
 Asn Val Tyr Asn Thr Ala Glu Tyr Ala Lys Thr Asn Asn Ala Pro Ile  
 115 120 125  
 Lys Val Val Gly Tyr Ala Asp Glu Lys Thr Gly Thr Ala Ala Tyr Asn  
 130 135 140  
 Met Lys Leu Ser Glu Arg Arg Ala Lys Ala Val Ala Lys Met Leu Glu  
 145 150 155 160  
 Lys Tyr Gly Val Ser Ala Asp Arg Ile Thr Ile Glu Trp Lys Gly Ser  
 165 170 175  
 Ser Glu Gln Ile Tyr Glu Glu Asn Ala Trp Asn Arg Ile Val Val Met  
 180 185 190  
 Thr Ala Ala Glu  
 195

<210> 5

<211> 419

5 <212> PRT

<213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 5

Ala	Asn	Glu	Ala	Lys	Val	Val	Leu	Ala	Ala	Asp	Asn	Val	Trp	Gly	Asp
1				5				10						15	
Asn	Thr	Gly	Tyr	Gln	Phe	Leu	Leu	Asp	Ala	Asp	His	Asn	Thr	Phe	Gly
			20					25					30		
Ser	Val	Ile	Pro	Ala	Thr	Gly	Pro	Leu	Phe	Thr	Gly	Thr	Ala	Ser	Ser
		35					40					45			
Asn	Leu	Tyr	Ser	Ala	Asn	Phe	Glu	Tyr	Leu	Ile	Pro	Ala	Asn	Ala	Asp
	50					55					60				
Pro	Val	Val	Thr	Thr	Gln	Asn	Ile	Ile	Val	Thr	Gly	Gln	Gly	Glu	Val
65					70					75					80
Val	Ile	Pro	Gly	Gly	Val	Tyr	Asp	Tyr	Cys	Ile	Thr	Asn	Pro	Glu	Pro
				85					90					95	
Ala	Ser	Gly	Lys	Met	Trp	Ile	Ala	Gly	Asp	Gly	Gly	Asn	Gln	Pro	Ala
			100					105					110		
Arg	Tyr	Asp	Asp	Phe	Thr	Phe	Glu	Ala	Gly	Lys	Lys	Tyr	Thr	Phe	Thr
		115					120					125			
Met	Arg	Arg	Ala	Gly	Met	Gly	Asp	Gly	Thr	Asp	Met	Glu	Val	Glu	Asp
	130					135					140				

Asp Ser Pro Ala Ser Tyr Thr Tyr Thr Val Tyr Arg Asp Gly Thr Lys  
 145 150 155 160  
 Ile Lys Glu Gly Leu Thr Ala Thr Thr Phe Glu Glu Asp Gly Val Ala  
 165 170 175  
 Ala Gly Asn His Glu Tyr Cys Val Glu Val Lys Tyr Thr Ala Gly Val  
 180 185 190  
 Ser Pro Lys Val Cys Lys Asp Val Thr Val Glu Gly Ser Asn Glu Phe  
 195 200 205  
 Ala Pro Val Gln Asn Leu Thr Gly Ser Ser Val Gly Gln Lys Val Thr  
 210 215 220  
 Leu Lys Trp Asp Ala Pro Asn Gly Thr Pro Asn Pro Asn Pro Asn Pro  
 225 230 235 240  
 Asn Pro Asn Pro Gly Thr Thr Leu Ser Glu Ser Phe Glu Asn Gly Ile  
 245 250 255  
 Pro Ala Ser Trp Lys Thr Ile Asp Ala Asp Gly Asp Gly His Gly Trp  
 260 265 270  
 Lys Pro Gly Asn Ala Pro Gly Ile Ala Gly Tyr Asn Ser Asn Gly Cys  
 275 280 285  
 Val Tyr Ser Glu Ser Phe Gly Leu Gly Gly Ile Gly Val Leu Thr Pro  
 290 295 300  
 Asp Asn Tyr Leu Ile Thr Pro Ala Leu Asp Leu Pro Asn Gly Gly Lys  
 305 310 315 320  
 Leu Thr Phe Trp Val Cys Ala Gln Asp Ala Asn Tyr Ala Ser Glu His  
 325 330 335  
 Tyr Ala Val Tyr Ala Ser Ser Thr Gly Asn Asp Ala Ser Asn Phe Thr  
 340 345 350  
 Asn Ala Leu Leu Glu Glu Thr Ile Thr Ala Lys Gly Val Arg Ser Pro  
 355 360 365  
 Lys Ala Ile Arg Gly Arg Ile Gln Gly Thr Trp Arg Gln Lys Thr Val  
 370 375 380  
 Asp Leu Pro Ala Gly Thr Lys Tyr Val Ala Phe Arg His Phe Gln Ser  
 385 390 395 400  
 Thr Asp Met Phe Tyr Ile Asp Leu Asp Glu Val Glu Ile Lys Ala Asn  
 405 410 415  
 Gly Lys Arg



<210> 6

<211> 231

<212> PRT

<213> *Porphyromonas gingivalis*

5 <400> 6

Phe	Leu	Leu	Asp	Ala	Asp	His	Asn	Thr	Phe	Gly	Ser	Val	Ile	Pro	Ala
1				5					10					15	
Thr	Gly	Pro	Leu	Phe	Thr	Gly	Thr	Ala	Ser	Ser	Asn	Leu	Tyr	Ser	Ala
			20					25					30		
Asn	Phe	Glu	Tyr	Leu	Ile	Pro	Ala	Asn	Ala	Asp	Pro	Val	Val	Thr	Thr
		35					40					45			
Gln	Asn	Ile	Ile	Val	Thr	Gly	Gln	Gly	Glu	Val	Val	Ile	Pro	Gly	Gly
	50					55					60				
Val	Tyr	Asp	Tyr	Cys	Ile	Thr	Asn	Pro	Glu	Pro	Ala	Ser	Gly	Lys	Met
65					70					75					80
Trp	Ile	Ala	Gly	Asp	Gly	Gly	Asn	Gln	Pro	Ala	Arg	Tyr	Asp	Asp	Phe
				85					90					95	
Thr	Phe	Glu	Ala	Gly	Lys	Lys	Tyr	Thr	Phe	Thr	Met	Arg	Arg	Ala	Gly
			100					105					110		
Met	Gly	Asp	Gly	Thr	Asp	Met	Glu	Val	Glu	Asp	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser
		115					120					125			
Tyr	Thr	Tyr	Thr	Val	Tyr	Arg	Asp	Gly	Thr	Lys	Ile	Lys	Glu	Gly	Leu
	130					135					140				
Thr	Ala	Thr	Thr	Phe	Glu	Glu	Asp	Gly	Val	Ala	Ala	Gly	Asn	His	Glu
145					150					155					160
Tyr	Cys	Val	Glu	Val	Lys	Tyr	Thr	Ala	Gly	Val	Ser	Pro	Lys	Val	Cys
				165					170					175	
Lys	Asp	Val	Thr	Val	Glu	Gly	Ser	Asn	Glu	Phe	Ala	Pro	Val	Gln	Asn
			180					185					190		
Leu	Thr	Gly	Ser	Ser	Val	Gly	Gln	Lys	Val	Thr	Leu	Lys	Trp	Asp	Ala
		195					200					205			
Pro	Asn	Gly	Thr	Pro	Asn	Pro	Asn	Pro	Asn	Pro	Asn	Pro	Asn	Pro	Gly
	210					215					220				
Thr	Thr	Leu	Ser	Glu	Ser	Phe									
225					230										

<210> 7

<211> 1257

<212> ADN

<213> *Porphyromonas gingivalis*

5 <400> 7

```

gccaacgaag ccaaggttgt gcttgcgga gacaacgtat ggggagacaa tacgggttac 60
cagttcttgt tggatgccga tcacaataca ttcggaagtg tcattccggc aaccggtcct 120
ctctttaccg gaacagcttc ttccaatcct tacagtgcga acttcgagta tttgatcccg 180
gccaatgccg atcctgttgt tactacacag aatattatcg ttacaggaca ggggtgaagt 240
gtaatccccg gtggtgttta cgactattgc attacgaacc cggaacctgc atccggaaag 300
atgtggatcg caggagatgg aggcaaccag cctgcacgtt atgacgattt cacattcgaa 360
gcaggcaaga agtacacctt cacgatgcgt cgcgccgaa tgggagatgg aactgatatg 420
gaagtcgaag acgattcacc tgcaagctat acctacacgg tgtatcgtga cggcacgaag 480
atcaaggaag gtctgacagc tacgacattc gaagaagacg gtgtagctgc aggcaatcat 540
gagtattgcy tggaagttaa gtacacagcc ggcgtatctc cgaaggtatg taaagacgtt 600
acggtagaag gatccaatga atttgctcct gtacagaacc tgaccggtag ttcagttagt 660
cagaaagtaa cgcttaagtg ggatgcacct aatggtacct cgaatccgaa tccaaatccg 720
aatccgaatc cgggaacaac actttccgaa tcattcgaaa atggtattcc ggcattcttg 780
aagacgatcg atgcagacgg tgacgggcat ggctggaaac ctggaaatgc tcccggaatc 840
gctggctaca atagcaatgg ttgtgtatat tcagagtcac tcggtcttgg tggtatagga 900
gttcttacc ctagacaacta tctgataaca ccggcattgg atttgcctaa cggaggtaag 960
ttgactttct gggtatgcy acaggatgct aattatgcat ccgagcacta tgcgggtgat 1020
gcatcttcga ccggtaacga tgcatccaac ttcacgaatg ctttgttggg agagacgatt 1080
acggcaaaag gtgttcgctc gccgaaagct attcgtggtc gtatacaggg tacttggcgc 1140
cagaagacgg tagaccttc cgcaggtacg aaatatgttg ctttccgtca cttccaaagc 1200
acggatatgt tctacatcga ccttgatgag gttgagatca agccaatgg caagcgc 1257
    
```

<210> 8

<211> 693

<212> ADN

10 <213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 8

```

ttcttggttg atgccgatca caatacattc ggaagtgtca ttccggcaac cggtcctctc 60
tttaccggaa cagcttcttc caatctttac agtgcgaaact tcgagtattt gatcccggcc 120
aatgccgatc ctgttggttac tacacagaat attatcgta caggacaggg tgaagttgta 180
atccccggtg gtgtttacga ctattgcatt acgaaccggg aacctgcac cggaaagatg 240
tggatcgag gagatggagg caaccagcct gcacgttatg acgatttcac attcgaagca 300
ggcaagaagt acaccttcac gatgcgtcgc gccggaatgg gagatggaac tgatatggaa 360
gtcgaagacg attcacctgc aagctatacc tacacggtgt atcgtgacgg cacgaagatc 420
aaggaaggtc tgacagctac gacattcgaa gaagacgggtg tagctgcagg caatcatgag 480
tattgcytgg aagttaagta cacagccggc gtatctccga aggtatgtaa agacgttacg 540
gtagaaggat ccaatgaatt tgctcctgta cagaacctga ccggtagttc agtaggtcag 600
aaagtaacgc ttaagtggga tgcaacctaat ggtacccccg atccgaatcc aaatccgaat 660
ccgaatccgg gaacaacact ttccgaatca ttc 693
    
```

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición antigénica que comprende una proteína recombinante que consiste de SEQ. ID. NO. 5 o SEQ ID NO:6.
- 5 2. Una composición antigénica que comprende una proteína recombinante de fusión o quimérica, en donde la proteína recombinante de fusión o quimérica consiste de SEQ. ID. NO. 5 o SEQ. ID. NO. 6 unidas a una o más secuencias del polipéptido.
3. Una composición antigénica como se reivindica en la reivindicación 1 o reivindicación 2, que además comprende un adyuvante.
- 10 4. Una composición de anticuerpo, la composición que comprende al menos un anticuerpo policlonal construido contra la composición antigénica como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Una célula eucariota o procariota recombinante que comprende una secuencia de ADN, en donde la secuencia de ADN consiste de SEQ. ID NO. 7 o SEQ. ID. NO. 8 ligadas operativamente a al menos un elemento regulador.
6. Una composición antigénica como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para utilizar en la prevención o reducción de la incidencia o severidad de infección por *P. gingivalis* en un sujeto.
- 15 7. Una composición de anticuerpo que comprende al menos un anticuerpo construido contra la composición antigénica como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el anticuerpo se une específicamente a un polipéptido que consiste de SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6 para utilizar en la prevención o reducción de la incidencia o severidad de infección por *P. gingivalis* en un sujeto.
- 20 8. Uso de una composición de anticuerpo en un método *in vitro* de diagnóstico de *P. gingivalis*, en donde la composición de anticuerpo comprende al menos un anticuerpo construido contra la composición antigénica como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el anticuerpo se une específicamente a un polipéptido que consiste de SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6.

FIGURA 1

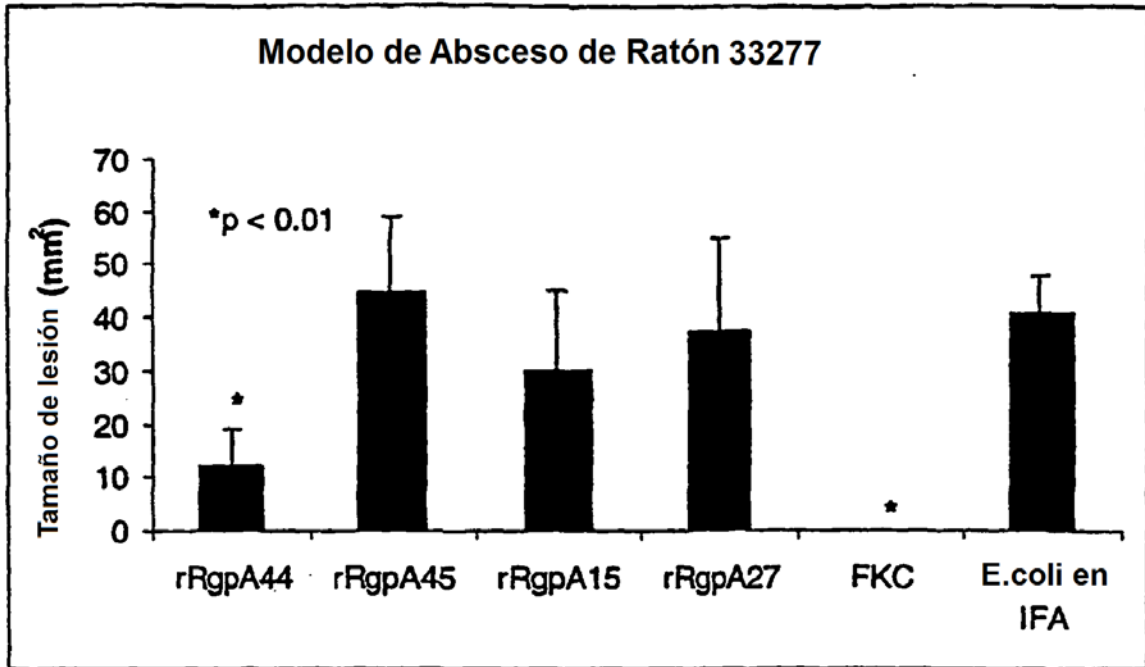


FIGURA 2

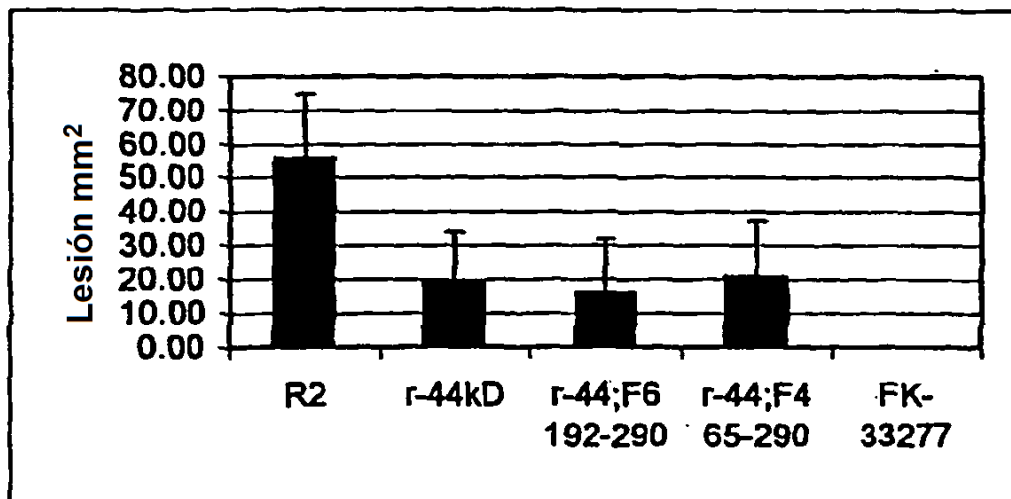


FIGURA 3

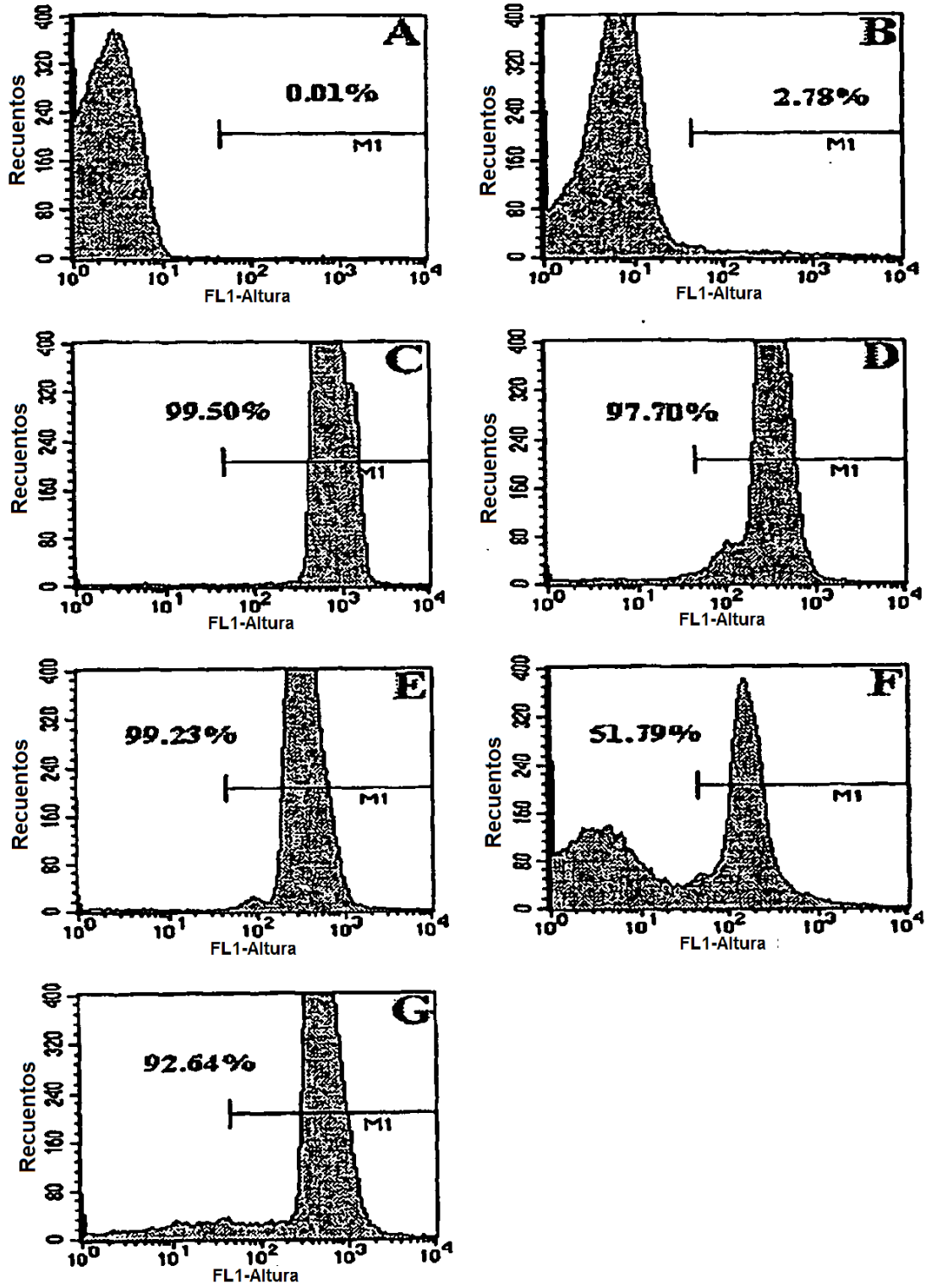


FIGURA 4

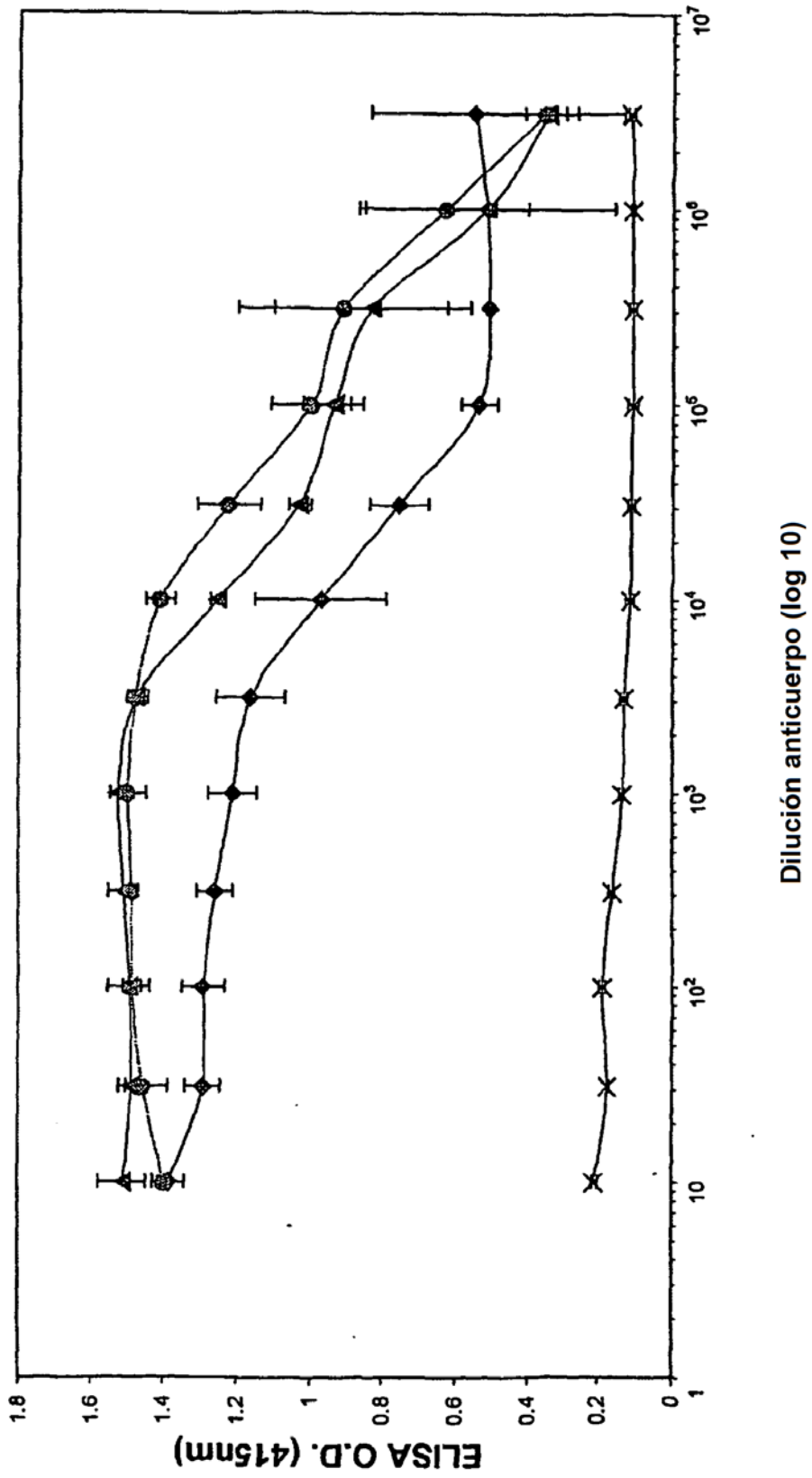


FIGURA 5

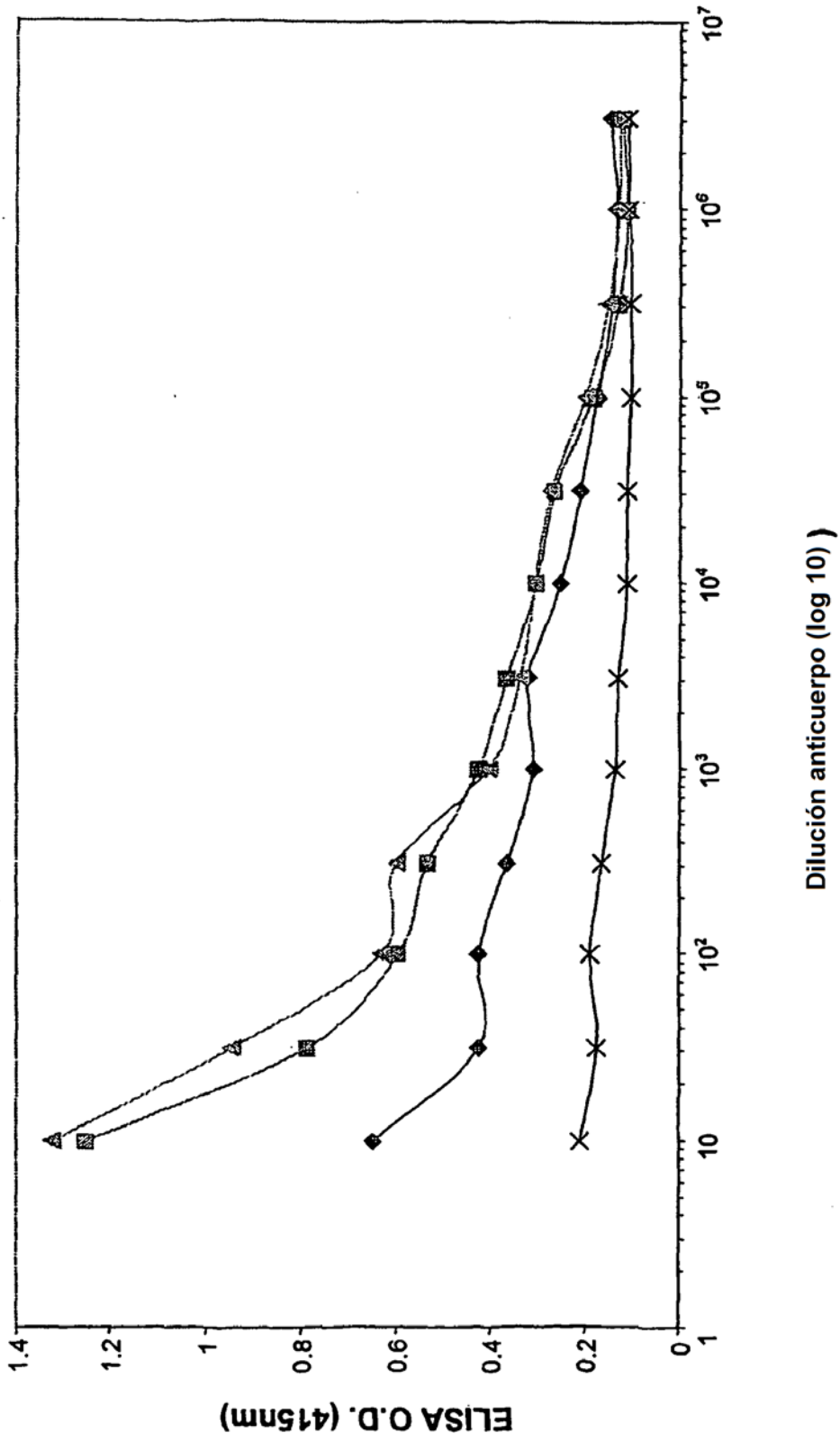


FIGURA 6

