

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 043**

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 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2000 E 10172677 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2012 EP 2243789**

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

30 Prioridad:

24.12.1999 AU PQ485999

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

16.04.2013

73 Titular/es:

CSL LIMITED (50.0%)
45 Poplar Road
Parkville, Victoria 3052, AU y
THE UNIVERSITY OF MELBOURNE (50.0%)

72 Inventor/es:

REYNOLDS, ERIC CHARLES;
SLAKESKI, NADA;
CHEN, CHAO GUANG y
BARR, IAN GEORGE

74 Agente/Representante:

PÉREZ BARQUÍN, Eliana

ES 2 401 043 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*

5 **Campo de la invención**

Esta invención proporciona una composición oral y una composición antigénica para utilizar en la supresión de los efectos patógenos de la bacteria intraoral *Porphyromonas gingivalis*, asociada con una enfermedad periodontal basada en anticuerpos y proteína recombinantes. También proporciona pruebas de diagnóstico para la presencia de *P. gingivalis* en muestras de placa subgingival y anticuerpos específicos anti-*P. gingivalis* en suero. Se relaciona con esto y se divulga un procedimiento para preparar Rgp44r-Rgp44 y los derivados de esta, utilizando técnicas de ADN recombinante. También se divulgan 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

Esta invención se refiere en general a una proteína recombinante de *Porphyromonas gingivalis*, r-Rgp44Rgp44. La invención también se refiere a 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*.

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 el 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 gravedad 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 tanto en animales como en humanos sugieren un papel importante de *P. gingivalis* en el desarrollo de periodontitis en adultos.

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 y Beck J, et al. J. Periodontol. 67; 1123-37, 1996.

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-gingipaína ha sido divulgada previamente por Travis et al. (patente PCT N.º WO 95/07286). Estos investigadores también informaron de una forma de alta masa molecular de Arg-gingipaína que se codifica por el gen rgp también se divulga en el documento WO 95/07286. La forma de alta masa molecular de Arg-gingipaína consiste en la proteinasa y varias otras proteínas propuestas para ser adhesinas. Los complejos de superficie celular de *P. gingivalis* que consiste en proteinasas específicas Arg y Lys y las adhesinas también se han divulgado 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*.

El documento WO98/49192 divulga los fragmentos encontrados en Rgp44 o ambos Rgp44 y Rgp44, que generan una respuesta inmunitaria protectora cuando se conjuga con toxoide diftérico.

Resumen de la invención

La invención es como se establece en las reivindicaciones.

En un primer aspecto, la presente invención consiste en una composición antigénica, la composición que comprende una proteína recombinante que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en los residuos 1-290 de SEQ. ID. NO. 3, los residuos 65-290 de SEQ. ID. NO. 3 y los residuos 192-290 de SEQ. ID. NO. 3.

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

En otra realización preferida más, 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 en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en los residuos 1-290 de SEQ ID NO: 3, los residuos 65-290 de SEQ ID NO: 3 y los residuos 1-290 de SEQ ID NO: 3 unidas a una o más secuencias del polipéptido. Se establece un ejemplo de una proteína quimérica o de fusión de este tipo en SEQ. ID. NO. 4.

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

En un tercer aspecto, la presente invención consiste en una célula recombinante procarionota o eucariota, la célula recombinante que comprende una secuencia de ADN que consiste en los nucleótidos 1-870 de SEQ. ID. N.º 1, los nucleótidos 193-870 de SEQ.ID. NO. 1 y los nucleótidos 574-870 de SEQ. ID. NO. 1 ligada operativamente a al menos un elemento regulador.

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

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición de anticuerpo que comprende al menos un anticuerpo obtenido contra la composición antigénica de la invención, en donde el anticuerpo se une específicamente a un polipéptido, que consiste en residuos 1-290 de SEQ.ID. NO. 3, los residuos 65-290 de SEQ.ID. NO. 3 o los residuos 1-290 de SEQ ID NO: 3, para utilizar en la prevención o la reducción de la incidencia o gravedad de la infección por *P. gingivalis* en un sujeto.

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

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 un tratamiento profiláctico para reducir la incidencia o gravedad de CVD o como un complemento en el tratamiento de CVD.

Una forma importante de la invención es una vacuna basada en las reivindicadas proteínas Rgp44r-Rgp44 o los péptidos y el adyuvante apropiado administrado por pulverización nasal, vía oral o por inyección, para producir una respuesta inmunitaria específica contra la proteína r-Rgp44Rgp44. Una vacuna también se puede basar en un componente recombinante del segmento del gen de Rgp44 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 epítopos inmunógenos a partir de la proteína Rgp44, 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 Rgp44 y péptidos relacionados o quimeras producidos, se pueden utilizar para generar antisueros de *P. gingivalis* útiles para la inmunización pasiva contra la enfermedad periodontal y las infecciones causadas por *P. gingivalis*.

Utilizando técnicas de ADN recombinante, el segmento del gen codificante de Rgp44, o fragmentos del gen que codifican uno o más péptidos o quimeras que tienen epítopos inmunógenos, 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-Rgp44, péptidos relacionados, oligopéptidos o quimeras que se pueden purificar para utilizar como un inmunógeno en las formulaciones de vacunas; (b) para producir proteína Rgp44, péptidos relacionados, oligopéptidos y quimeras para utilizarse como un antígeno para inmunoensayos de diagnóstico o para generar antisueros específicos 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 introducirse en las células del huésped para la expresión de Rgp44 o péptidos inmunógenos u oligopéptidos o péptidos quiméricos; o (d) para la introducción en las células bacterianas atenuadas vivas o bacterias intraorales comensales modificadas genéticamente, que se utilizan para expresar la proteína Rgp44, péptidos relacionados u oligopéptidos o quimeras para vacunar los individuos; para la introducción directamente en un individuo para inmunizar contra la proteína Rgp44 codificada y expresada, péptidos relacionados u oligopéptidos o quimeras. 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 Rgp44, se puede utilizar para colonizar la cavidad oral, la placa supragingival o subgingival. La bacteria intraoral se puede aislar del paciente con periodontitis y modificar genéticamente para expresar la r-Rgp44, componentes, péptidos o quimeras. La proteína r- Rgp44 estimulará los tejidos linfoides asociados con la mucosa (MALT) para producir el anticuerpo específico para *P. gingivalis*.

Las proteínas Rgp44, péptidos, oligopéptidos, péptidos quiméricos y las construcciones que contienen epítomos, se pueden utilizar como inmunógenos en formulaciones de vacunas profilácticas y/o terapéuticas contra cepas patógenas de *P. gingivalis*, si el inmunógeno se sintetiza químicamente, se purifica a partir de *P. gingivalis*, o se purifica a partir de un sistema de vector de expresión recombinante. De manera alternativa, el segmento del gen que codifica Rgp44, 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 bacterias o virus recombinantes que se modifican para producir uno o más epítomos inmunógenos específicos de Rgp44, o en combinación con epítomos inmunógenos de otros microorganismos patógenos. Además, el gen codificante de Rgp44 o uno o más fragmentos del gen que codifica los péptidos de Rgp44 o los oligopéptidos o los péptidos quiméricos, ligados operativamente a uno o más elementos reguladores, se pueden introducir directamente en seres humanos para expresar la proteína, el péptido, los oligopéptidos o péptidos quiméricos relativos a Rgp44 para provocar una respuesta inmunitaria protectora. Una vacuna también se puede basar en un componente recombinante de Rgp44 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 intraoral, donde la bacteria recombinante que expresa la Rgp44 de *P. gingivalis* es un habitante comensal de la cavidad oral.

En otro aspecto, la invención proporciona 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 proporciona anticuerpos obtenidos contra la composición antigénica de la invención. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales. 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 pueden utilizar como inmunógenos en formulaciones de vacunas profilácticas y/o terapéuticas.

Descripción detallada de la invención

Leyendas de la figura

La figura 1 muestra los resultados obtenidos en el Ejemplo 1

La figura 2 muestra los resultados de la proteína recombinante de 44 kD de longitud completa, 2 fragmentos de la proteína 44 kD (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. Análisis citométrico de flujo de células de *P. gingivalis* que reaccionaron con (A) PBS/FA, (B) suero de ratón normal, (C) antisueros de célula completa de *P. gingivalis*, (D) antisueros de Pg44 recombinante, (E) antisueros del Fragmento 4 (r-44kDa residuos 65-290) (F) antisueros del Fragmento 6 (r-44kDa residuos 192-290) (G) antisueros de proteína r-44-Pg33 quimérica.

Figura 4: Enlace de los anti-sueros específico de RgpA-Kgp con las proteínas recombinantes. Las proteínas recombinantes se cubrieron a 5 µg/ml y analizaron con anti-sueros específicos 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 415 nm.

Figura 5: Enlace de proteína recombinante Rgp44 con una variedad de proteínas de matriz. Las proteínas de matriz se cubrieron a 5 µg/ml y analizaron con proteína recombinante, que luego se analizó con anti-sueros específicos complejos 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 415 nm.

Figura 6: Enlace del fragmento de proteína Rgp44 recombinante con una variedad de proteínas de matriz. Las proteínas de matriz se cubrieron a 5 µg/ml y analizaron con proteína recombinante que luego se analizó con complejo anti-sueros específicos 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 415 nm.

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 intraoral *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 la exposición a *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 se puede utilizar 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 sangran o los huevos o la leche se recogen y el suero se prepara y/o el anticuerpo se purifica utilizando técnicas estándar o los anticuerpos monoclonales se producen fusionando las células del bazo con células de mieloma utilizando técnicas estándar. El anticuerpo (fracción inmunoglobulina) se puede separar del cultivo o líquido ascítico, suero, leche o huevo por desalado, filtración en gel, intercambio iónico y/o cromatografía de afinidad, y similares, siendo el desalado el preferido. En el procedimiento de desalado, el anti-suero o la leche se satura 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-Rgp44 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-Rgp44, se pueden utilizar en composiciones orales tales como pasta de dientes y enjuagues bucales. Los anticuerpos anti-r-Rgp44, también se pueden utilizar para la detección temprana de *P. gingivalis* en muestras de placa subgingival por un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) en el consultorio.

Se prefiere que, para las composiciones orales, la cantidad de los anteriores anticuerpos administrados sea de 0,0001 - 50 g/kg/día y que el contenido de los anteriores anticuerpos sea del 0,0002 - 10% en peso, preferiblemente del 0,002 - 5% en peso de la composición. La composición oral de la presente invención que contiene el anticuerpo de suero o leche mencionado 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 irrigación 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 la presente 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 de carácter sustancialmente líquido, tal 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 aproximadamente 20:1. La cantidad total de mezcla de alcohol-agua en este tipo de preparación, por lo general está en el rango de aproximadamente 70 a aproximadamente el 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 está en el rango de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 9 y por lo general de aproximadamente 5,5 a 8. El pH preferiblemente está en el rango de aproximadamente 6 a aproximadamente 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, hidrógenofosfato disódico, dihidrógenofosfato de sodio, etc).

Otras formas deseables de la presente invención, la composición oral puede ser de carácter sustancialmente sólido o pastoso, 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 dicálcico anhidro, pirofosfato de calcio, ortofosfato de magnesio, fosfato de trimagnesio, carbonato de calcio, alúmina hidratada, alúmina calcinada, silicato de aluminio, silicato de zirconio, sílice, 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 preferidos incluyen sílice cristalina que tiene un tamaño de partícula de hasta aproximadamente 5 micrómetros, un tamaño de partícula medio de hasta aproximadamente 1,1 micrómetros, y un área superficial de hasta aproximadamente 50.000 cm²/g, gel de sílice o sílice coloidal, y aluminosilicato de metal alcalino amorfo complejo.

Cuando se emplean geles transparentes visualmente, un agente de pulido de sílice coloidal, tal como los vendidos 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, [volumen 9, 4ª edición, p. 510-511]. Las formas de metafosfato de sodio insoluble conocidas como sal de Madrell y sal de Kurrol son otros ejemplos de materiales apropiados. Estas sales de metafosfato muestran solo una solubilidad insignificante en agua, y por lo tanto se denominan 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 de hasta el 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 micrómetros.

El material de pulido generalmente está presente en las composiciones sólidas o pastosas en concentraciones en peso de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 99%. Preferiblemente, está presente en cantidades de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 75% en pasta de dientes, y de aproximadamente el 70% a aproximadamente el 99% en polvo para dientes. En pastas de dientes, cuando el material de pulido es de naturaleza silíceo, generalmente está presente en una cantidad de aproximadamente el 10-30% en peso. Por lo general, otros materiales de pulido están presentes en una cantidad de aproximadamente el 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 el 10% a aproximadamente el 80% en peso de la preparación. Ejemplos de humectantes/portadores apropiados son glicerina, propileno glicol, sorbitol y polipropileno glicol. También son ventajosas las mezclas líquidas de agua, glicerina y sorbitol. En geles transparentes dónde el índice de refracción tiene una consideración importante, se emplean preferiblemente aproximadamente el 2,5 - 30% p/p de agua, de 0 a aproximadamente el 70% p/p de glicerina y aproximadamente el 20-80% p/p 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 SiO₂, 25,40% de MgO, 3,05% de Na₂O, 0,98% de Li₂O, 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 una humedad del 8%.

Otros espesantes apropiados incluyen Musgo de Irlanda, carragenina iota, goma de tragacanto, almidón, polivinilpirrolidona, hidroxietilpropilcelulosa, hidroxibutilmetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxietilcelulosa (por ejemplo, disponible como Natrosol), carboximetilcelulosa sódica, y sílice coloidal tal como Syloid molido finamente (por ejemplo, 244). También se pueden incluir agentes solubilizantes, tales como polioles humectantes como propilenglicol, dipropilenglicol y hexilenglicol, 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 ricino y vaselina y ésteres tales como acetato de amilo, acetato de etilo y benzoato de bencilo.

Se comprenderá que, como es convencional, las preparaciones orales son para venderse o de otra manera distribuirse 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 estará en un tubo plegable, 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 tensioactivos 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. El material tensioactivo orgánico preferiblemente es de naturaleza aniónica, no-iónica o anfótera que no desnaturaliza el anticuerpo de la invención, y se prefiere emplear como agente tensioactivo un material detergente que imparta a la composición propiedades detergentes y espumantes mientras que no desnaturaliza el anticuerpo. Los ejemplos apropiados de agentes tensioactivos aniónicos son sales solubles en agua de monosulfatos de monoglicérido de ácido graso superior, tales como la sal de sodio del monoglicérido monosulfatado de ácidos grasos de aceite de coco hidrogenado, alquilsulfatos superiores tales como laurilsulfato de sodio, alquilarilsulfonatos tales como dodecylbencenosulfonato de sodio, alquilsulfoacetatos superiores, ésteres de ácido graso superior de 1,2-dihidroxi propano sulfonato, y las acilamidas 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 acilo, 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 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 tensioactivos 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 hidrófobas largas (por ejemplo cadenas alifáticas de aproximadamente 12 a 20 átomos de carbono), cuyos productos de condensación ("etoxámeros") contienen restos de polioxietileno hidrófilos, tales como productos de condensación de poli (óxido de etileno) con ácidos grasos, alcoholes grasos, amidas grasas, alcoholes polihídricos (por ejemplo monoestearato de sorbitán) y óxido de polipropileno (por ejemplo materiales plurónicos).

El agente tensioactivo por lo general está presente en una cantidad de aproximadamente 0,1-5% en peso. Cabe destacar que el agente tensioactivo puede ayudar en la disolución del anticuerpo de la invención y por consiguiente disminuye la cantidad de humectante solubilizante necesario.

Otros diferentes materiales se pueden incorporar en las preparaciones orales de la presente 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.

También se puede emplear cualquier material saborizante o edulcorante apropiado. Ejemplos de constituyentes saborizantes apropiados son aceites saborizantes, por ejemplo aceite de menta verde, yerbabuena, gaulteria, 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-fenilalanina, éster metílico), 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.

En la práctica preferida de la presente invención, una composición oral de acuerdo con la presente invención tal como enjuague bucal o dentífrico que contiene la composición de la presente invención, preferiblemente se aplica regularmente a las encías y dientes, tal como cada día o cada segundo o tercer día o preferiblemente de 1 a 3 veces diarias, a un pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 9, por lo general aproximadamente 5,5 a aproximadamente 8, preferiblemente de aproximadamente 6 a 8, durante al menos 2 semanas hasta 8 semanas o más hasta una vida útil.

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, látex 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 la presente invención también incluye vehículos de administración dirigida tales como dispositivos de irrigación de bolsas periodontales, 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.

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

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 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	Directo	5'-GCGCAGATCTTACACACCGGTAGAGG3'
	Inverso	5'-GCGCGTCGACTTAGCGAAGAAGTTCGGGG3'
RgpA44	Directo	5'-GCGCCATATGAGCGGTCAGGCCGAGATTGTTCTTG3'
	Inverso	5'-GCGCCTCGAGGCGCTTGCCATTGGCCITGATCTC-3'
RgpA27	Directo	5'-GCGCGCTAGCGTATAGATGGCCAACGAAGCCAAGG-3'
	Inverso	5'-GCGCAGATCTCTTGATAGCGAGTTTCTC-3'

(continuación)

Proteína recombinante		Cebadores
RgpA15	Directo	5'-GCGCGCTAGCGTATACATGGCAGACTTCACGGAAACGTTTC-3'
	Inverso	5'-GCGCAGATCTTTTGGCGCCATCGGCTTCCG-3'

Se amplificó cada uno de los dominios de la proteinasa y adhesina del gen *rgpA* utilizando los cebadores enumerados en la Tabla 1, ADN genómico de *P. gingivalis* W50 con Elongase® (Gibco BRL) ADN polimerasa y un termociclador PC-960 (Corbett Research Technologies). Se llevó a cabo una 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 s), hibridación (50 °C, 45 s), y extensión (70 °C, 1,5 min). El producto de PCR se purificó utilizando PCR SpinClean® (Progen) y se ligó en un vector de plásmido 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 lo que el proceso detallado para la RgpA44 solo será descrito. El ADN del plásmido recombinante pGEMT-easy-RgpA44 se digirió con NdeI y XhoI para liberar el ADN inserto. El ADN inserto se aisló 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 el vector de expresión de plásmido purificado Qiafilter pET28a (Novagen) que ha sido previamente digerido con NdeI y XhoI, y los productos de unión se transformaron 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 extremo N terminal de la proteína recombinante expresada. La expresión de r-RgpA44 se indujo 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.

Expresión de *E. coli* recombinante

Se utilizó una sola colonia transformante para inocular 10 ml de caldo de Luria-Bertani que contiene 50 µg/ml de kanamicina a 37 °C, hasta que la densidad óptica (DO₆₀₀) fue de 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). Se dejó que la DO₆₀₀ de este cultivo alcanzara 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 se almacenó el sedimento a -70 °C para la extracción de cuerpos de inclusión.

Aislamiento y solubilización de cuerpos de inclusión

El sedimento 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 sonicación y se centrifuga a 20.000 x g para recoger los cuerpos de inclusión. El sedimento 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 sedimento luego se volvió a suspender en solución reguladora de enlace que contiene urea 6 M y se incubó sobre hielo durante 2-3 h 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 concentración de inclusiones solubilizadas

Se utilizó cromatografía de afinidad de metal Ni-NTA, para purificar las proteínas recombinantes por medio de la etiqueta H₆. En resumen, las proteínas se unieron en lote a la resina Ni-NTA equilibrada (Qiagen) que se vertió 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 de 5 volúmenes de columna de solución reguladora de lavado (imidazol 60 mM, NaCl 500 mM, Tris-HCl 20 mM, urea 6 M, pH 7,9). A continuación, se eluyó la proteína unida 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 de la resina Ni-NTA se agruparon y se concentraron mediante la diálisis paso a paso de urea 6 M a 3 M a 1,5 M a 0 M contenida en la siguiente solución reguladora Tris-HCl 0,5 M, NaCl 50 mM y glicerol al 8%.

Electroforesis en gel de poliacrilamida y transferencia de Western

Se realizó SDS-PAGE 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 bandas Western mediante electrotransferencia de las proteínas sobre nitrocelulosa durante 1 h a 100 voltios. Se bloquearon las membranas 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-anti-conejo de cabra (KPL) se lavaron y desarrollaron con sustrato de peroxidasa de membrana TMB (KPL).

5

Antisuero

Se obtuvo el anti-suero policlonal para las proteínas recombinantes purificadas dosificando a 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 sangraron una semana después de la segunda dosis y el anti-suero generado se utilizó para seleccionar las bandas Western de la célula completa W50 de *P. gingivalis* realizadas bajo condiciones de reducción, desnaturizantes.

10

La pureza de las proteínas recombinantes se confirmó utilizando espectrometría de masas MALDI-TOF y análisis de la secuencia N-terminal.

15

Modelo de lesión murino

Se inmunizaron grupos de 10 ratones BALB/c hembras (6-8 semanas de edad) (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 de la exposición *P. gingivalis*. Dos días antes de la exposición, los ratones se sangraron desde el plexo retroocular. Los ratones BALB/c se expusieron a $7,5 \times 10^9$ células viables de *P. gingivalis* 33277 por vía subcutánea en el abdomen. Después de la exposición, los ratones se examinaron diariamente para determinar 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 mm² se presentan en la Fig. 1. Se obtuvieron reducciones significativas en el tamaño de la lesión solo con la vacunación que utiliza células completas de *P. gingivalis* muertas con formalina y el r-RgpA44 de adhesina recombinante. Las otras proteínas recombinantes del gen *rgpA* no redujeron significativamente el tamaño de la lesión.

20

25

30

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

EJEMPLO 2

35

En el ejemplo previo se demostró que la adhesina recombinante de 44 kDa protegió contra la exposición a *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 disolventes de desnaturización. Se generaron una serie de fragmentos a partir de la adhesina de 44 kDa 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 44 kDa recombinante, se muestran en la Tabla 2.

40

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

45

Proteína recombinante	Sentido	Cebadores
Fragmento 1	D	5' GGGAATTCATGGGTCAGGCCGAGATTGTT 3'
Fragmento 1	I	5' TCCCTCGAGCTTAAGTCCACGCAATACTC 3'
Fragmento 2	D	5' GGGAATTGCATGGGTCAGGCCGAGATTCTT 3'
Fragmento 2	I	5' GGTCATTGGACTCGAGATATACACAACCATTGCT 3'
Fragmento 3	D	5' GAGGAATTCAGATCCTTCTTGTCCCTAC 3'
Fragmento 3	I	5' TCCCTCGAGCTTAAGTCCACGCAATACTC 3'
Fragmento 4	D	5' GAGGAATTCAGATCCTTCTTGTCCCTAC 3'
Fragmento 4	I	5' GGTCATTGGACTCGAGATATACACAACCATTGCT 3'
Fragmento 5	D	5' GAGGAATTCAGATGCTTGTGTTGCGCTAC 3'
Fragmento 5	I	5' AGGAATTCTCGAGCTTGCCGTTGCCTTGAT 3'

(continuación)

Proteína recombinante	Sentido	Cebadores
Fragmento 6	D	5' GGGAATTCATGGCGAAGGTATGTAAAGACGTT 3'
Fragmento 6	I	5' GGTC AATTGGACTCGAGATATACACAACCATTGCT 3'
Fragmento 7	D	5' GGGAATTCATGGCGAAGGTATGTAAAGACGTT 3'
Fragmento 7	I	5' AGGAATTCTGGAGCITGCCGTTGGCCTIGAT 3'

Utilizando procedimientos 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). Se evaluaron los niveles de expresión y la cantidad de proteína r-44kDa soluble, producidos para los diferentes fragmentos. Esto se hizo después de la inducción de IPTG, donde, mediante un cultivo celular de 1,5 ml del cultivo de células *E. coli* recombinantes, se sedimentó por centrifugación y se volvió a suspender en 150 ul de solución reguladora de enlace. Luego se sometieron a sonicación las células durante 10 s, utilizando una microsonda con un ajuste de 5 (disruptor celular ultrasónico Virosonic Digita 475, The Virtis Company, NY). Después de la centrifugación durante 3 minutos (10.000 rpm), se recogió el sobrenadante, lo que representa la fracción soluble. Luego, se lavó el sedimento 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 de bandas Western 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 potencia mediante la mutagénesis dirigida a sitio de todos o los residuos de cisteína seleccionados a residuos de serina o alanina.

La adhesina de 44 kDa contiene seis residuos Cys que forman disulfuros cuando se oxidan, lo que puede dar como resultado un plegamiento incorrecto y posiblemente conduce a la formación de proteína insoluble. Además, la estabilidad de la proteína r-44 kDa o los fragmentos de la proteína r-44 kDa, por lo tanto se puede potenciar mediante la mutagénesis dirigida a sitio 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 de 44 kD	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 aminoácido se deriva de SEQ ID NO 3.

La Figura 2 muestra los resultados de la proteína recombinante de 44KD de longitud completa, 2 fragmentos de la proteína de 44 kD (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 20 ug de proteína-r, con 3 semanas de diferencia como en el Ejemplo 1. Tanto las formas de longitud completa como del fragmento de la proteína 44 kD 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 de la exposición.

EJEMPLO 3

Además de utilizar los fragmentos de la adhesina de 44 kDa, las proteínas quiméricas se pueden construir utilizando uno o más fragmentos de la adhesina de 44 kDa 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 44 kDa (Fragmento 6, residuos 192-290) unido a otro fragmento de la proteína *P. gingivalis* derivada de PG33 (número de acceso Genbank AF175715) un fragmento C terminal de 95 residuos (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 44 kDa y PG33 se produjo por la amplificación del fragmento C-terminal PG33 por PCR como se describe en el Ejemplo 1, utilizando los siguientes cebadores:

5

Directo:	5 'GGCCCATGGTCGACAATAGTGCAAAGATTGAT 3'
Inverso:	5'CTATCCGGCCGCTTCCGCTGCAGTCATTACTACAA 3'

10

Se subclonó este producto de PCR en los sitios Sall y NotI de pET24b para generar pET24b::PG33C. El producto de PCR del fragmento 6 de 44kDa (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, es decir, pET24b::PG44f6-PG33C. Cuando este plásmido se transformó en la cepa de *E. coli* BL21(DE3) y se realizaron los estudios de expresión como se describe en los Ejemplos 1 y 2, se obtuvieron niveles altos de la proteína recombinante quimérica de 44kDa/PG33, que fue soluble cuando se analizó como en el Ejemplo 2.

EJEMPLO 4

15

Los antisueros de ratón obtenidos para la 44kDa recombinante o los fragmentos recombinantes de la proteína de 44 kDa, reaccionan con células completas de *P. gingivalis* fijadas con paraformaldehído indicando que los epítomos inmunorreactivos se conservan en las proteínas recombinantes.

20

Se obtuvieron antisueros de ratón por inmunización de ratones BALB/c con la proteína de 44 kDa recombinante de longitud completa o con un fragmento recombinante de la proteína de 44 kDa como se describe en los Ejemplos 1 y 2. *P. gingivalis* (cepa W50) se cultivó anaeróticamente en fase log, en caldo de infusión cerebro-corazón (Oxoid) suplementado con 5 ug/ml de hemina y 1 ug/ml de vitamina K y 0,5 mg/ml de cisteína. Se sedimentaron las células por centrifugación durante 15 min a 10.000 rpm a 4 °C y se volvió a suspender en solución salina reguladora de fosfato (PBS) que contiene paraformaldehído al 1% (peso/vol). 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 DO₆₀₀ (1 x 10⁹ células/ml). Las bacterias muertas luego se mezclaron en alícuotas de 10 µl con sueros policlonales de ratón agrupados a una dilución de 1:100 en PBS+ FBA al 10% + azida 0,01% (PBS/FA) 0,22µm filtrado, durante 15 min a temperatura ambiente. Las células se lavaron con PBS/FA y posteriormente se incubaron 15 min con 1 µl de inmunoglobulina anti-ratón marcada con FITC (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.

25

30

35

La intensidad de fluorescencia de las células *P. gingivalis* teñidas, se cuantificó utilizando un clasificador celular de fluorescencia activado con Calibur de FACS (Becton Dickinson) utilizando la banda de longitud de onda de 488 nm generada de un láser de ión de argón de 155 mW. Se utilizó PBS/FA filtrado como el fluido envolvente. Se recogieron las señales de emisión de FTTC para cada análisis que consistió en 20.000 eventos cerrados que se recogieron en base al tamaño y la granularidad utilizando el programa informático CELLQuest (Becton Dickinson).

40

Los resultados se muestran en la Figura 3. El % marcado en cada panel indica el porcentaje de células de *P. gingivalis* que tiñen positivamente es decir, 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 reaccionó con la mayoría de células de *P. gingivalis*, aunque los antisueros para el fragmento 4 mostraron una reactividad reducida en comparación con los otros antisueros de r-44kDa.

45

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

50

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

Proteína recombinante		Cebadores
Kgp39	Directo	5'-GCAGCAGTCGACGCCAACGAAGCCAAGGTTG3'
	Inverso	5'-GCAGCACTCGAGGCGCTTGCCATTGGCC-3'
Kgp39frag	Directo	5'-GCAGCAGTCGACTTCTTGTGGATGCCGATCAC-3'
	Inverso	5'-GCAGGACTCGAGGAATGATTCGGAAAGTGTTG-3'

Se amplificaron los dominios de adhesina Kgp 39 y fragmento de Kgp39 utilizando los cebadores enumerados en la Tabla 4. Los cebadores consisten en una solución reguladora de 6 nucleótidos seguida por un sitio de enzima de

restricción (Sall o XhoI) y secuencia específica para Kgp39. Se realizó la PCR utilizando ADN polimerasa Taq (Promega) bajo las siguientes condiciones: 25 ciclos de desnaturalización (94 °C, 45 s), hibridación (52 °C, 30 s), y extensión (72 °C, 60 s). El producto de PCR se ligó en el vector de plásmido pGEMT-easy (Promega) y se transformó en JM109 de *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 se digirió con Sal I y XhoI y el ADN inserto purificado se ligó en el vector de expresión de plásmido purificado pET28b (Novagen) que se había digerido previamente con Sall y XhoI. Los productos de unión se transformaron en el huésped sin expresión, JM109 de *E. coli* y luego se transformaron en el huésped de expresión de *E. coli*, HMS174(DE3) como se describe previamente. Se indujo la expresión de rKgp39 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 se expresaron por 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 50 µg/ml de kanamicina a 37 °C, en un agitador orbital durante la noche. Este cultivo luego se utilizó para inocular 100 ml de medio fresco y se cultivó en fase de crecimiento semilogarítmica ($DO_{600} = 0,6-1,0$) antes de la inducción con IPTG 0,5 mM, durante 6 horas. A continuación se recogieron las células 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 sedimento bacteriano se descongeló en hielo y se volvió a suspender en 10 ml de solución reguladora B (Na_2HPO_4 20 mM, NaCl 0,5 M, urea 8 M). El sedimento celular redissuelto se sometió a sonicación en hielo durante 3 x 30 impulsos por segundo a intervalos de 30 segundos, utilizando un disruptor celular Branson Sonifier® 250 (Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, CT) con la micropunta en el ajuste 3. Los restos celulares insolubles se retiraron por centrifugación a 39000 x g, durante 30 minutos a 4 °C y se recogió el sobrenadante. La fracción celular insoluble se volvió a suspender en 10ml de solución reguladora B. Se adicionó azida de sodio (0.001% v/v) a todas las muestras antes de su almacenamiento a 4 °C. Después, se analizaron las muestras por SDS-PAGE

Purificación con níquel-ácido nitrilotriacético (Ni-NTA) y concentración de 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) de Pharmacia. La columna se cubrió con 5 volúmenes de columna de $NiSO_4$ 0,1 M, luego se equilibró con 10 volúmenes de la columna de solución reguladora Inicial (Na_2HPO_4 20 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 20 mM, urea 8 M) 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 (Na_2HPO_4 20 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 200 mM, urea 8 M) a una velocidad de flujo de 1ml/min. Las fracciones de elución se recogieron y las muestras de cada fracción se analizaron sobre geles SDS-PAGE como se describe previamente.

Renaturalización de proteína recombinante

La retirada de urea 8 M 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 8 M inicialmente a 0 M durante un periodo de 4 días. Las proteínas rKgp39 se concentraron 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: Na_2HPO_4 20 mM, NaCl 0,5 M.

Ensayo inmunoabsorbente con enzimas ligadas (ELISA)

Se realizaron ELISA para investigar el enlace de antisueros específicos de RgpA-Kgp con rKgp39 y fragmento de rKgp39 y el enlace de rKgp39 y fragmento de rKgp38 para matrices periodontales y proteínas huésped.

Los pocillos de placas de microtitulación de polivinilo de fondo plano (Microtitre, Dynatech Laboratories, VA, EE. UU.) se cubrieron con 5 µg/ml de rKgp39 o bien de fragmento de rKgp39 en PBS 0,1 M [Na_2HPO_4 0,01 M, NaCl 0,15 M, KH_2PO_4 1,5 mM, KCl 3,0 mM, pH 7,4] durante la noche a temperatura ambiente (ta). La solución de recubrimiento se retiró y los pocillos se bloquearon con BSA al 1% (peso/v) en PBST 0,1 M (PBS que contiene Tween 20 al 0,1% (v/v)), durante 1 h a ta y las placas se lavaron 4 x con PBST 0,1 M. Las diluciones en serie de antisueros de conejo dirigidos contra el complejo proteinasa-adhesina de RgpA-Kgp de W50 de *P. gingivalis* (Bhogal et al., 1997) se adicionaron a cada pocillo y se incubó durante la noche a ta y luego se lavaron con 6 x PBST. El anticuerpo unido se detectó por incubación con inmunoglobulina de cabra conjugada con peroxidasa de rábano de picante dirigida contra inmunoglobulina de ratón (dilución 1:4000) (Sigma, NSW, Australia) en BSA al 0,5%(peso/v) en PBS 0,1 M durante

1,5 h a ta. Las placas luego se lavaron (6x PBST) y se añadió sustrato [ABTS 0,9 mM (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenz-tiazolina-6-)sulfónico), yH₂O₂ al 0,005% (v/v) , en solución reguladora ABTS (Na₂HPO₄ 0,1 M, ácido cítrico monohidrato 0,08 M) (100 µl/pocillo). La densidad óptica a 415 nm (D.O.D₄₁₅) se determinó utilizando un lector de microplaca Bio-Rad (modelo 450, Bio-Rad, NSW, Australia).

5

Los resultados se muestran en la Figura 4.

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

10 También se realizaron ELISA 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 µg/ml de fibrinógeno, colágeno tipo V o bien hemoglobina en PBS 0,1 M durante la noche a ta. La solución de recubrimiento se retiró y el plástico sin cubrir restante se bloqueó con leche desnatada al 2% (peso/v) de en PBST 0,1 M durante 1h a ta. La solución de bloqueo se retiró y 5µg/ml de proteína rKgp39 o bien fragmento de rKgp39 en PBS 0,1 M se adicionaron a los pocillos y se incubó durante 2h a ta. Los pocillos se lavaron 4 x con PBST 0,1 M, luego las diluciones en serie de antisueros de complejo anti-RgpA-Kgp de conejo en leche desnatada al 1% (peso/v) en PBST 0,1 M se adicionaron a cada pocillo y se incubó durante la noche a ta. El anticuerpo unido se detectó, después del lavado 6 x PBST, por incubación con inmunoglobulina de cabra conjugada con peroxidasa de rábano de picante dirigida contra inmunoglobulina de conejo (dilución 1:4000) (Sigma, NSW, Australia) en leche desnatada al 1%(peso/v) en PBST 0,1 M, durante 1 h a ta. Las placas se desarrollaron como se describen anteriormente.

15

20

Los resultados se muestran en las Figuras 5 y 6.

25 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 el inserto que comprende el gen o el fragmento del gen, o bien el vector por sí mismo, contengan los elementos necesarios para la transcripción y traducción lo que es compatible con, y reconocido 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 se pueden sintetizar o aislar y secuenciar utilizando los procedimientos y secuencias como se ilustra en este documento. Se puede utilizar una variedad de sistemas huésped 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 víricos, o infectadas con virus recombinante (por ejemplo virus de vaccinia, adenovirus, virus adenoasociados, retrovirus, etc.).

40

Utilizando los procedimientos conocidos en la técnica de biología molecular, incluyendo los procedimientos descritos anteriormente, se pueden incorporar diversos promotores y potenciadores en el vector o la secuencia de ADN que codifica secuencias de aminoácidos de RgpA44 o Kgp39, es decir, 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 para) el sistema particular de célula huésped utilizado. Por lo tanto y de manera importante, la secuencia de ADN puede consistir en el 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 epítomos 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 víricos para crear un antígeno multivalente genéticamente fusionado (que comparte un esqueleto de péptido común) para utilizar como una composición de vacuna mejorada.

50

La selección del promotor dependerá del sistema de expresión utilizado. Los promotores varían en fuerza, es decir, 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, los promotores bacterianos, de fagos o plásmidos conocidos en la técnica a partir de los que se ha observado un nivel alto de transcripción en un sistema de célula huésped que comprende *E. coli* incluyen el promotor lac, promotor trp, promotor recA, promotor de ARN ribosómico, los promotores P_R y P_L, 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.

60

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 los 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 es necesaria para la transcripción eficaz del ADN insertado (por

65

ejemplo, el operón lac se induce mediante la adición de lactosa o isopropilto-beta-D-galactósido). 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 crecimiento. El promotor p_L se puede inducir, mediante un incremento en la temperatura de las células huésped que contienen un 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 tales 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 de control para la transcripción del gen o traducción del mensaje eficaz incluyen potenciadores, y señales reguladoras. Las secuencias potenciadoras son elementos de ADN que parecen incrementar la eficacia transcripcional de una manera relativamente independiente de su posición y orientación con respecto a un gen cercano. Así, dependiendo del vector de sistema de expresión de célula huésped utilizado, un potenciador se puede colocar corriente arriba o bien corriente abajo de las secuencias de ADN insertado codificantes de las secuencias de aminoácidos de RgpA44 o Kgp39, para incrementar la eficacia 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 procedimientos 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 promotor del vector y los elementos de 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 determinar aquellas células que contienen el vector recombinante. La selección y detección se puede lograr por procedimientos 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 epítopos específicos de RgpA44 o Kgp39 utilizando antisueros generados para los epítopos 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 procedimientos descritos en este documento.

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, la mutagénesis dirigida al sitio de RgpA44 o Kgp39 o fragmentos de estas para modificar uno o todos los residuos Cys a residuos Ser o Ala pueden ser deseables para incrementar la estabilidad y solubilidad de la proteína recombinante para permitir una purificación y plegado más fáciles. 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 hidrófilas, solubles que corresponden a epítopos 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 en de aproximadamente 7 a aproximadamente 14 aminoácidos. Así, RgpA44 o Kgp39 contendrá muchos sitios antigénicos discretos; por lo tanto, muchas secuencias parciales del gen podrían codificar epítopos 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 pueden dar como resultado una inmunogenicidad aumentada. Cuando se utilizan combinaciones de antígenos, estos antígenos se pueden relacionar (es decir, a partir de la misma secuencia del gen o a partir de un gen estrechamente relacionado del mismo organismo). Los antígenos se pueden generar a partir de un organismo relacionado (es decir, otra bacteria oral presente en la placa subgingival), o a partir de un organismo relacionado 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 bacterias intraorales comensales serían la especie *Streptococcus* y la especie *Actinomyces*, 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 intraorales 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 se podrían utilizar para producir 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.

El fragmento de ADN que codifica un antígeno se puede fusionar a las otras secuencias de ADN para permitir procedimientos de purificación y/o expresión mejorados (es decir, las secuencias de ADN clonadas en el vector pTrxFus, se expresan como fusiones con la proteína de *E. coli* tioredoxina). Este enlace imparte las características de la tioredoxina a la proteína de fusión que ofrece la expresión soluble de las proteínas normalmente insolubles o difíciles de expresar. Después de la purificación, la proteína nativa se libera mediante la retirada de la tioredoxina total por digestión con enterocinasa. 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 inmunógeno.

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 vectores pTrcHis también contienen una copia del gen *lacI^f* que codifica la proteína represora *lac*. Por consiguiente, la expresión de la proteína recombinante/péptido se induce mediante la adición de IPTG 1 mM (de-represión) a *E. coli* cultivada en fase semilogarítmica. El fragmento de ADN se inserta en el sitio de clonación múltiple que se sitúa corriente abajo 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 enterocinasa. 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 de sefarosa cargada con níquel que se utiliza para purificar las proteínas recombinantes que contienen un dominio de enlace poli-histidina. Las proteínas unidas se eluyen de la resina Probond™ con una solución reguladora de pH bajo o bien por competición con imidazol o histidina. Posteriormente, el péptido líder de poli-histidina se puede retirar por digestión de la proteína expresada recombinante con Enterocinasa. La enterocinasa 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. Después, la proteína recombinante, purificada se puede utilizar en la generación de anticuerpos, vacunas y la formulación de ensayos de diagnóstico como se analiza.

EJEMPLO 7

Procedimientos para utilizar las secuencias de nucleótidos específicas de RgpA44 o Kgp39 en ensayos 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 la amplificación, y en la detección de ácidos nucleicos amplificados de *P. gingivalis*. Los recientes avances en biología molecular han proporcionado varios medios para amplificar enzimáticamente las secuencias de ácido nucleico. Actualmente, el procedimiento 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 exponencialmente un gen de interés. Otros procedimientos de amplificación actualmente en desarrollo incluyen LCR™ (reacción en cadena de ligasa, BioTechnica International) que utiliza ligasa de ADN, y una sonda que consiste en dos mitades de un segmento de ADN que es complementario a la secuencia del ADN que se va a amplificar; enzima QB replicasa (Gene-Trak Systems) y una plantilla de la secuencia ácido ribonucleico (ARN) unida a una sonda complementaria al ADN que se va a copiar 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 se puede realizar sobre ARN o ADN como la secuencia de ácido nucleico que se va a amplificar.

Se han utilizado con éxito sondas de ácido nucleico que se pueden hibridar 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 procedimiento 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 realización de la presente invención se refiere a cebadores que amplifican secuencias específicas de la especie del gen que codifica RgpA44 o Kgp39 de *P. gingivalis*, y a sondas que hibridan específicamente con estos fragmentos de ADN amplificados. Utilizando las secuencias de ácido nucleico de la presente invención y de acuerdo con los procedimientos de la presente invención, tan solo un organismo de *P. gingivalis* se puede detectar en la presencia

de 10 ug/ml de ADN externo.

Esta realización se refiere 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 realización de la presente invención, un par de cebadores oligonucleótidos de ADN específicos de *P. gingivalis*, se utilizan para hibridar el 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 hibridar solo con las secuencias de nucleótidos de *P. gingivalis* de la presente invención para la cual se han sintetizado para complementarse; uno con cada hebra del ADN bicatenario. Así, la reacción es específica incluso en presencia de cantidades de microgramos de ADN heterólogo. Para los fines de esta descripción, el cebador derivado de la secuencia de la hebra (gen) positiva del ADN será denominado el "cebador positivo" y el cebador derivado de la secuencia de la hebra negativa (complementaria) será denominado el "cebador negativo".

La amplificación del ADN se puede lograr por uno cualquiera de los procedimientos disponibles comercialmente. Por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa se puede utilizar para amplificar el ADN. Una vez que los cebadores han hibridado 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 ADN polimerasa 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 hibridar específicamente el 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 procedimientos conocidos en la técnica, tal como un ensayo de retardo en gel con autorradiografía. Así, las secuencias de nucleótidos de la presente invención proporcionan la base de la síntesis de oligonucleótidos que tienen aplicaciones comerciales en kits de diagnóstico para la detección de *P. gingivalis*. En una realización 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 procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células contenidas en la muestra se pueden lavar en solución reguladora TE y sedimentar por centrifugación. A continuación, las células se pueden volver a suspender en 100 ul de solución reguladora 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 10 mM pH 8,3, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, gelatina al 0,01%, NP40™ al 0,45%, Tween 20™ al 0,045%, y 60 ug/ml de proteinasa K. La muestra se incubaba en un baño de agua a 55 °C, durante 1 hora. Después de la incubación, la muestra se incubaba 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 uno cualquiera de varios protocolos para amplificar los ácidos nucleicos, mediante la reacción en cadena de la polimerasa. En un modo de esta realización, 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 dNTP 0,2 mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,25 ug de cada cebador oligonucleótido positivo y negativo, 1 unidad de TaqI polimerasa, TaqI 10 x solución reguladora (5 ul), MgCl₂ 1 mM (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 colocan en el termociclador. En general, son suficientes de treinta a treinta y cinco ciclos para la amplificación de ADN bacteriano. Un ciclo consiste en 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.

Se pueden sintetizar bioquímicamente oligonucleótidos útiles como cebadores o sondas que hibridan específicamente al gen que codifica la RgpA444 o Kgp39 de *P. gingivalis* y que se utilizan en la amplificación y/o detección de ADN, utilizando procedimientos 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 cinasa de polinucleótido T4 y ATP gamma ³²P. Se mezclan veinte pM de ADN de la sonda en solución reguladora de cinasa (Tris 50 mM, pH 7,6, MgCl₂ 10 mM, ditiotreitil 5 mM, espermidina-HCl 0,1mM, EDTA 0,1mM, pH 8,0) con 120 uCi de ATP gamma ³²P y se incubó a 37 °C, durante 1 hora. La sonda marcada se separa de la etiqueta sin incorporar sobre un gel de acrilamida al 8% tratado durante 1 hora a 200 voltios en solución reguladora EDTA Tris Borato (TBE) a temperatura ambiente. La sonda marcada primero se sitúa por exposición del gel de acrilamida a una película de

rayos X, durante tres minutos. El autorradiograma 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 divulgadas 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 divulgadas en la presente invención.

Se pueden utilizar procedimientos alternativos conocidos en la técnica para mejorar la detección de secuencias diana amplificadas de acuerdo con las composiciones y procedimientos de la presente invención. La sensibilidad de detección de las secuencias de ADN amplificadas, se puede mejorar sometiendo las secuencias a hibridación líquida. Los procedimientos alternativos de detección conocidos en la técnica, además de la electroforesis en gel y la electroforesis en gel con hibridación de Southern y autorradiografía, que se pueden utilizar con las composiciones y los procedimientos de la presente invención, incluyen: digestión con enzimas de restricción con electroforesis en gel; hibridación de transferencia en ranura 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 autorradiografía; amplificación con un cebador radiomarcado con transferencia en mancha y autorradiografía; 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 realización 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 se puede biotinilar con sulfo-NHS-biotina, o la biotina se puede incorporar directamente en el cebador mediante la síntesis del cebador en presencia de dNTP marcados con biotina. Los cebadores no isotópicos marcados, luego se utilizan en la amplificación de ADN de una muestra clínica. La detección para determinar 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 de la incubación con un conjugado de 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

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

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 antisueros específicos 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 procedimientos conocidos en la técnica incluyendo extracción de detergentes, cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, inmunoafinidad, o ultrafiltración y columnas de exclusión molecular), centrifugación diferencial, solubilidad diferencial, u otras técnicas estándar para la purificación de proteínas.

Como se utiliza en toda la memoria descriptiva, 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 divulga en las secuencias encerradas que se sintetizan como una o ligadas químicamente. Tales péptidos u oligopéptidos se pueden sintetizar utilizando uno de los diferentes procedimientos de síntesis de péptidos conocidos en la técnica incluyendo síntesis de péptidos de fase sólida estándar utilizando aminoácidos de *tert*-butiloxicarbonilo [Mitchell et al., 1978, J Org Chem 43:2845-2852], utilizando aminoácidos de 9-fluorenilmetiloxicarbonilo 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 Procedimientos 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. Se puede realizar la modificación de los péptidos u oligopéptidos, tales como por deleción y sustitución de aminoácidos (e incluyendo extensiones y adiciones a aminoácidos) y de otras formas, de tal manera que no disminuya sustancialmente 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 pueden alterar reemplazando uno o más aminoácidos con aminoácidos equivalentes funcionalmente, dando como resultado 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.

La proteína RgpA44 o Kgp39, los péptidos, oligopéptidos y quimeras purificados, se pueden utilizar como antígenos en inmunoensayos para la detección de antisueros específicos de *P. gingivalis*, presentes en el fluido corporal de un individuo que se sospecha que tiene 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 se limitan a, radioinmunoensayo, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), ensayo de "sándwich", reacción de la precipitina, ensayo de aglutinación, inmunoensayo fluorescente, e inmunoensayo basado en la quimioluminiscencia.

EJEMPLO 9

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

Esta realización de la presente invención, proporciona proteína RgpA44 o Kgp39 recombinante y/o péptidos u oligopéptidos o quimeras de estos, para utilizarse 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 debe ser inmunógeno, e inducir los anticuerpos funcionales dirigidos a uno o más epítomos expuestos a la superficie sobre la bacteria intacta, en el que el/los epítomo(s) se conserva(n) entre cepas de *P. gingivalis*.

Para el desarrollo de la vacuna, las secuencias de aminoácidos específicos de RgpA44 o Kgp39 se pueden purificar a partir 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 se han infectado o bien transfectado 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 inmunógeno relevante en la formulación de la vacuna, y en cantidades terapéuticamente eficaces, para inducir una respuesta inmunitaria. Se conocen muchos procedimientos para la introducción de una formulación de vacuna en el ser 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 inmunitaria 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 se administrara 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 emulsiones de aceite en agua tales como SAF-1, SAF-0, MF59, Seppic ISA720, y otros adyuvantes particulados tales como ISCOMs™ y ISCOM matrix™. Una lista extensa pero no exhaustiva de otros ejemplos de adyuvantes se enumeran en Cox y 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, excipientes, cargas, soluciones reguladoras o diluyentes convencionales farmacéuticamente aceptables, según sea apropiado. Se pueden administrar una o más dosis de la vacuna que contiene adyuvante profilácticamente para prevenir la periodontitis o terapéuticamente para tratar la periodontitis ya presente.

En otra composición preferida, la preparación se combina con un adyuvante de mucosa y se administra por vía oral. Ejemplos de adyuvantes 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 procedimientos que se pueden utilizar para administrar RgpA44 por 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 procedimientos potenciales que se pueden potenciar adicionalmente por la incorporación de moléculas diana tales como LTB, CTB o lectinas para la administración de la proteína RgpA44 o péptido al sistema inmunitario de la mucosa. Además de la vacuna y el adyuvante de la mucosa o sistema de administración, la vacuna puede incluir portadores, excipientes, cargas, recubrimientos, medios de dispersión, agentes antibacterianos y antifúngicos, soluciones reguladoras o diluyentes convencionales farmacéuticamente aceptables, según sea apropiado.

Otra realización de este modo de la invención implica la producción de secuencias de aminoácidos específicos recombinantes de RgpA44 o Rgp44 como un hapteno, es decir, una molécula que por sí misma no puede producir una respuesta inmunitaria. En dicho caso, el hapteno se puede unir covalentemente a un portador u otra molécula inmunógena que conferirá inmunogenicidad al hapteno acoplado cuando se expone al sistema inmunitario. Así,

dicho hapteno específico de RgpA44 o Kgp39, unido a una molécula portadora, puede ser el inmunógeno en una formulación de vacuna.

Otro modo de esta realización, proporciona una vacuna vírica recombinante viva, vacuna bacteriana recombinante, vacuna bacteriana atenuada recombinante o bien una vacuna vírica 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 al huésped. La posterior replicación del virus recombinante dentro del huésped proporciona una estimulación continua del sistema inmunitario 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 y Panicali, patente de los EE. UU. N.º 4.603.112] y cepas de *Salmonella* atenuadas [Stocker et al., patente de los EE. UU. N.º 5.210.035; 4.837.151; y 4.735.801; y Curtiss et al., 1988, Vaccine 6:155-160]. Las vacunas vivas son particularmente ventajosas, dado que estimulan continuamente el sistema inmunitario que puede conferir sustancialmente inmunidad duradera. Cuando la respuesta inmunitaria 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. Para ilustrar adicionalmente este modo de realización, utilizando técnicas de biología molecular tales como aquellas ilustradas en el Ejemplo 8, los genes que codifican la RgpA44 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 epitopos 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 procedimientos se pueden utilizar para construir una formulación de vacuna vírica 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 epitopos, 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 realización, 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 patógenas de *P. gingivalis*. La transferencia directa del gen en un individuo vacunado, dando como resultado 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 por técnicas en la técnica tales como mediante inyección intravenosa de un complejo plásmido de expresión:liposoma catiónico [Zhu et al., 1993, Science 261:209-211]. Otros procedimientos 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 víricos se ha utilizado para inocular vacunas (ya sea por vía parenteral, mucosal, o por medio de inmunización con pistola génica) para inducir una respuesta inmunitaria 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, dando como resultado 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 procedimientos conocidos en la técnica, tales como por medio de un marcador de selección 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 procedimiento 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 el que 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 vírico y administrarse por medio del 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 sin limitación, adyuvantes que potencian la respuesta inmunitaria, y los compuestos que son dirigidos para modular la respuesta inmunitaria, por ejemplo citocinas, denominadas colectivamente como "moduladores inmunitarios"; 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 por medio del contacto con superficies mucosas de nasofaringe, tráquea o tracto gastrointestinal.

- 5 Como una alternativa a la inmunización activa, la inmunización puede ser pasiva, es decir, inmunización que comprende la administración de inmunoglobulina purificada que contiene anticuerpo contra epítomos de RgpA44 o Kgp39.

EJEMPLO 10

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

<u>Ingrediente</u>	<u>% p/p</u>
Fosfato dicálcico dihidratado	50,0
Glicerol	20,0
Carboximetilcelulosa de sodio	1,0
Laurilsulfato de sodio	1,5
Lauroilsarconisato de sodio	0,5
Saborizante	1,0
Sacarina sódica	0,1
Gluconato de clorhexidina	0,01
Dextranasa	0,01
Suero de cabra que contiene anti-RgpA44 o anti-Kgp39	0,2
Agua	resto

EJEMPLO 11

- 15 El siguiente es otro ejemplo propuesto de una formulación de pasta de dientes.

<u>Ingrediente</u>	<u>% p/p</u>
Fosfato dicálcico dihidratado	50,0
Sorbitol	10,0
Glicerol	10,0
Carboximetilcelulosa de sodio	1,0
Laurilsulfato de sodio	1,5
Lauroilsarconisato de sodio	0,5
Saborizante	1,0
Sacarina sódica	0,1
Monofluorofosfato de sodio	0,3
Gluconato de clorhexidina	0,01
Dextranasa	0,01
Suero bovino que contiene anti- RgpA(788-1004)	0,2
Agua	resto

EJEMPLO 12

- 20 El siguiente es otro ejemplo propuesto de una formulación de pasta de dientes.

<u>Ingrediente</u>	<u>% p/p</u>
Fosfato dicálcico dihidratado	50,0
Sorbitol	10,0
Glicerol	10,0
Carboximetilcelulosa de sodio	1,0
Lauroildietanolamida	1,0
Monolaurato de sacarosa	2,0
Saborizante	1,0
Sacarina sódica	0,1
Monofluorofosfato de sodio	0,3
Gluconato de clorhexidina	0,01
Dextranasa	0,01
Ig de leche de bovino que contiene anti- RgpA44	0,1
Agua	resto

EJEMPLO 13

- 25 El siguiente es otro ejemplo propuesto de una formulación de pasta de dientes.

<u>Ingrediente</u>	<u>% p/p</u>
Sorbitol	22,0
Musgo de Irlanda	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 saborizante	0,95
Anti- RgpA44 monoclonal	0,3
Laurilsulfato de sodio	2,00
Agua	resto

EJEMPLO 14

- 5 El siguiente es un ejemplo propuesto de una formulación de pasta de dientes líquida.

<u>Ingrediente</u>	<u>% p/p</u>
Poliacrilato de sodio	50,0
Sorbitol	10,0
Glicerol	20,0
Saborizante	1,0
Sacarina sódica	0,1
Monofluorofosfato de sodio	0,3
Gluconato de clorhexidina	0,01
Etanol	3,0
Ig equino que contiene anti-RgpA(788-1004)	0,2
Ácido linólico	0,05
Agua	resto

EJEMPLO 15

- 10 El siguiente es un ejemplo propuesto de una formulación de un enjuague bucal.

<u>Ingrediente</u>	<u>% p/p</u>
Etanol	20,0
Saborizante	1,0
Sacarina sódica	0,1
Monofluorofosfato de sodio	0,3
Gluconato de clorhexidina	0,01
Lauroildietanolamida	0,3
Ig de conejo que contiene anti-RgpA44	0,2
Agua	resto

EJEMPLO 16

- 15 El siguiente es un ejemplo propuesto de una formulación de un enjuague bucal.

<u>Ingrediente</u>	<u>% p/p</u>
Gantrez S-97	2,5
Glicerina	10,0
Aceite saborizante	0,4
Monofluorofosfato de sodio	0,05
Gluconato de clorhexidina	0,01
Lauroildietanolamida	0,2
anti- RgpA44 de ratón monoclonal	0,3
Agua	resto

EJEMPLO 17

- 20 El siguiente es un ejemplo propuesto de una formulación de pastilla.

<u>Ingrediente</u>	<u>% p/p</u>
Azúcar	75-80
Jarabe de maíz	1-20
Aceite saborizante	1-2
NaF	0,01-0,05
Anti- RgpA44 de ratón monoclonal	0,3
Estearato de Mg	1-5
Agua	resto

EJEMPLO 18

- 5 El siguiente es un ejemplo propuesto de una formulación de crema de masaje gingival.

<u>Ingrediente</u>	<u>% p/p</u>
Vaselina blanca	8,0
Propilenglicol	4,0
Alcohol estearílico	8,0
Polietilenglicol 4000	25,0
Polietilenglicol 400	37,0
Monoestearato de sacarosa	0,5
Gluconato de clorohexidina	0,1
Anti- RgpA44 de ratón monoclonal	0,3
Agua	resto

EJEMPLO 19

- 10 El siguiente es un ejemplo propuesto de una formulación de goma masticable.

<u>Ingrediente</u>	<u>% p/p</u>
Base de goma	30,0
Carbonato de calcio	2,0
Sorbitol cristalino	53,0
Glicerina	0,5
Aceite saborizante	0,1
Anti- RgpA de conejo monoclonal (788-1004)	0,3
Agua	resto

- 15 A lo largo de esta memoria descriptiva, 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.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> CSL Limited
The University of Melbourne
- <120> Composición antigénica de *P. gingivalis*
- <160> 8
- 10 <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1
- <211> 1257
- <212> ADN
- 15 <213> *Porphyromonas gingivalis*
- <400> 1
- agcggtcagg ccgagattgt tcttgaagct cacgatgttt ggaatgatgg atccggttat 60
- cagattcttt tggatgcaga ccatgatcaa tatggacagg ttatacccag tgatacccat 120
- actcttttggc cgaactgtag tgtcccggcc aatctgttcg ctccgttcga atatacggtt 180
- ccggaaaaatg cagatccttc ttgttcccct accaatatga taatggatgg tactgcatcc 240
- gttaatatac cggccggaac ttatgacttt gcaattgctg ctccctcaagc aaatgcaaaag 300
- atltggattg cgggacaagg accgacgaaa gaagatgatt atgtatttga agccggtaaa 360
- aaataccatt tccttatgaa gaagatgggt agcggtgatg gaactgaatt gactataagc 420
- gaagtggtg gaagcgatta cacctatact gtctatcgtg acggcacgaa gatcaaggaa 480
- ggtctgacgg ctacgcatt cgaagaagac ggtgtagctg caggcaatca tgagtattgc 540
- gtggaagtta agtacacagc cggcgatatc ccgaaggtat gtaaagacgt tacggtagaa 600
- ggatccaatg aatttgctcc tgtacagaac ctgaccggta gtgcagtcgg ccagaaaagta 660
- acgcttaagt gggatgcacc taatggtacc ccgaatccaa atccaaatcc gaatccaaat 720
- ccgaatcccg gaacaactac actttccgaa tcatttcgaaa atggatttcc tgctcatgg 780
- aagacgatcg atgcagacgg tgacgggcat ggttggaagc ctggaaatgc tcccggaaatc 840
- gctggctaca atagcaatg ttgtgtatat tcagagtcac tcgggtcttg tggatatagga 900
- gttcttacc ctgacaacta tctgataaca ccggcattgg atttgcctaa cggaggtaag 960
- ttgactttct gggatgctgc acaggatgct aattatgcat ccgagcacta tgcggtgtat 1020
- gcactcttca cgggtaacga tgcatccaac ttcacgaatg ctttgttggg agagacgatt 1080
- acggcaaaaag gtgttcgctc gccggaagct attcgtggtc gtatacaggg tacttggcgc 1140
- cagaagacgg tagaccttc ccgaggtacg aaatatgttg ctttccgtca cttccaaaagc 1200
- acggatattg tctacatcga cottgatgag gttgagatca aggccaatgg caagcgc 1257
- 20 <210> 2
- <211> 588
- <212> ADN
- <213> *Porphyromonas gingivalis*
- 25 <400> 2
- aaggtatgta aagacgttac ggtagaagga tccaatgaat ttgctcctgt acagaacctg 60
- accggtagtg cagtcggcca gaaagtaacg ctttaagtggg atgcacctaa tggtaacctg 120
- aatccaaatc caaatccgaa tccaaatccg aatcccggaa caactacact ttccgaatca 180
- ttcgaaaaatg gtattcctgc ctcatggaag acgatcgatg cagacgggtg cgggcatggc 240
- tggaaagcctg gaaatgctcc ccggaatcgtc ggctacaata gcaatgggtg tgatatatctc 300
- gacaatagtg caaagattga tcgtaataca gaaatcaatg tttacaatac agctgaatat 360
- gcgaagacca acaacgcacc gatcaaggta gtaggttacg ctgacgaaaa aaccggtaact 420
- gcggcctata acatgaagct ttcagagcgt cgtgcaaaaag cggtagccaa gatgcttgaa 480
- aagtatggtg tttctgcgga tcgcattaca attgaatgga agggctcatc agagcaaatc 540
- tatgaagaga acgcttgaa tcgtattgta gtaatgactg cagcggaa 588
- 30 <210> 3
- <211> 419
- <212> PRT
- <213> *Porphyromonas gingivalis*
- 35 <400> 3

ES 2 401 043 T3

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

ES 2 401 043 T3

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

<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

5

10

ES 2 401 043 T3

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
 <212> PRT
 <213> Porphyromonas gingivalis

5

<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

10

ES 2 401 043 T3

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

5 <212> PRT

<213> Porphyromonas gingivalis

<400> 6

ES 2 401 043 T3

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

5 <212> ADN

<213> Porphyromonas gingivalis

<400> 7

gccaacgaag ccaaggttgt gcttgccgca gacaacgtat ggggagacaa tacgggttac 60
 cagttcttgt tggatgccga tcacaataca ttccggaagtgc tcattccggc aaccggctct 120
 ctctttaccg gaacagcttc ttccaatctt tacagtgcga acttcgagta ttgatcccg 180
 gccaatgccg atcctgttgg tactacacag aatattatcg ttacaggaca ggggtgaagt 240
 gtaatcccg gtggtgttta cgactattgc attacgaacc cggaacctgc atccggaag 300
 atgtggatcg caggagatgg aggcaaccag cctgcacgtt atgacgattt cacattcgaa 360
 gcaggcaaga agtacacctt cactgatgct cgcgcccggaa tgggagatgg aactgatatg 420
 gaagtccgaag acgattcacc tgcaagctat acctacacgg tgtatcgtga cggcacgaag 480
 atcaaggaag gtctgacagc tacgacattc gaagaagacg gtgtagctgc aggcaatcat 540
 gagtattcgc tggaaagttaa gtacacagcc gccgtatctc cgaaggtatg taaagacgtt 600
 acggtagaag gatccaatga atttgctcct gtacagaacc tgaccggtag ttcagttagt 660
 cagaagataa cgccttaagt ggatgcacct aatggatccc cgaatccgaa tccaatccg 720
 aatccgaatc cgggaacaac actttccgaa tcattcgaaa atggtattcc ggcatcttgg 780
 aagacgatcg atgcagacgg tgacgggcat ggctggaaac ctggaaatgc tcccggaatc 840
 gctggctaca atagcaatgg ttgtgtatat tcagatcat tcggttcttg tggatatagga 900
 gttcttacc ctgacaacta tctgataaca ccggcattgg atttgcctaa cggaggtaag 960
 ttgactttct gggatgcgc acaggatgct aattatgcat ccgagcacta tgcgggtgat 1020
 gcatcttcga ccggtaacga tgcattccaac ttacgaatg ctttgttggga agagacgatt 1080
 acggcaaaag gtgttcgctc gccgaaagct attcgtggtc gtatacaggg tacttggcgc 1140
 cagaagacgg tagaccttc cgcaggtacg aatatgttg ctttccgtca cttccaaagc 1200
 acggatatgt tctacatcga ccttgatgag gttgagatca aggccaatgg caagcgc 1257

10

<210> 8

ES 2 401 043 T3

<211> 693

<212> ADN

<213> Porphyromonas gingivalis

5

<400> 8

```
ttcttggtgg atgccgatca caatacattc ggaagtgtca ttccggcaac cggtcctctc 60
tttaccggaa cagcttcttc caatctttac agtgcgaaact tgcgagtattt gatccccggcc 120
aatgccgatc ctggttgttac tacacagaat attatcgta caggacaggg tgaagttgta 180
atccccggtg gtggttacga ctattgcatt acgaaccggg aacctgcac cggaagatg 240
tggatcgcag gagatggagg caaccagcct gcacggtatg acgattcac attcgaagca 300
ggcaagaagt acaccttcac gatgcgtcgc gccggaatgg gagatggaac tgatatggaa 360
gtcgaagacg atcacctgc aagctatacc tacacggtgt atcgtgacgg cacgaagatc 420
aaggaaggtc tgacagctac gacattcgaa gaagacggtg tagctgcagg caatcatgag 480
tattgcgtgg aagttaagta cacagccggc gtatctccga aggtatgtaa agacggtacg 540
gtagaaggat ccaatgaatt tgctcctgta cagaacctga ccggtagtcc agtaggtcag 600
aaagtaacgc ttaagtggga tgcacctaat ggtaccccgga atccgaatcc aaatccgaat 660
ccgaatccgg gaacaacact ttccgaatca ttc 693
```

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición antigénica que comprende una proteína recombinante que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en los residuos 1-290 de SEQ. ID. NO. 3, residuos 65-290 de SEQ ID NO. 3 y 192-290 de SEQ ID NO. 3.
- 10 2. Una composición antigénica que comprende una proteína recombinante de fusión o quimérica que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en los residuos 1-290 de SEQ. ID. NO. 3, residuos 65-290 de SEQ ID NO. 3 y residuos 192-290 de SEQ ID NO. 3, unida a una o más secuencias del polipéptido.
- 15 3. Una composición antigénica como se reivindica en la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que la composición antigénica comprende además un adyuvante.
- 20 4. Una composición antigénica como se reivindica en la reivindicación 2, en la que la proteína quimérica o de fusión tiene la secuencia establecida en SEQ. ID. NO. 4.
- 25 5. Una composición de anticuerpo, composición que comprende al menos un anticuerpo obtenido contra la composición antigénica como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 30 6. Una célula eucariota o procariota, que comprende un polinucleótido recombinante que consiste en los nucleótidos 1-870 de SEQ. ID NO. 1, nucleótidos 193-870 de SEQ. ID. NO. 1 y nucleótidos 574-870 de SEQ. ID. NO. 1 ligado operativamente a al menos un elemento regulador.
- 35 7. Una composición antigénica como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para utilizar en la prevención o reducción de la incidencia o gravedad de infección por *P. gingivalis* en un sujeto.
8. Una composición de anticuerpo, composición que comprende al menos un anticuerpo obtenido contra la composición antigénica como se reivindica en la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que el anticuerpo se une específicamente a un polipéptido que consiste en los residuos 1-290 de SEQ ID NO: 3, residuos 65-290 de SEQ. ID. NO. 3 y residuos 192-290 de SEQ ID NO: 3 para utilizar en la prevención o reducción de la incidencia o gravedad de infección por *P. gingivalis* en un sujeto.
9. Uso de una composición de anticuerpo en un procedimiento *in vitro* de diagnóstico de *P. gingivalis*, en el que la composición de anticuerpo comprende al menos un anticuerpo obtenido contra la composición antigénica como se reivindica en la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el anticuerpo se une específicamente a un polipéptido que consiste en los residuos 1-290 de SEQ. ID. NO. 3, residuos 65-290 de SEQ ID NO. 3 y residuos 192-290 de SEQ ID NO: 3.

FIGURA 1

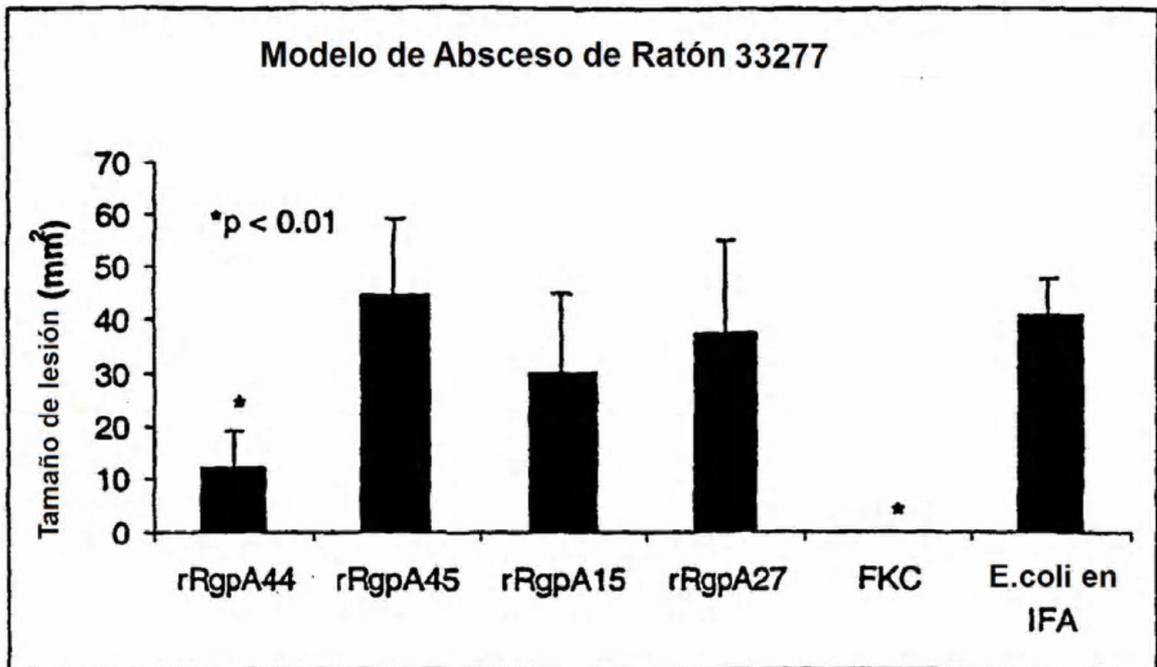


FIGURA 2

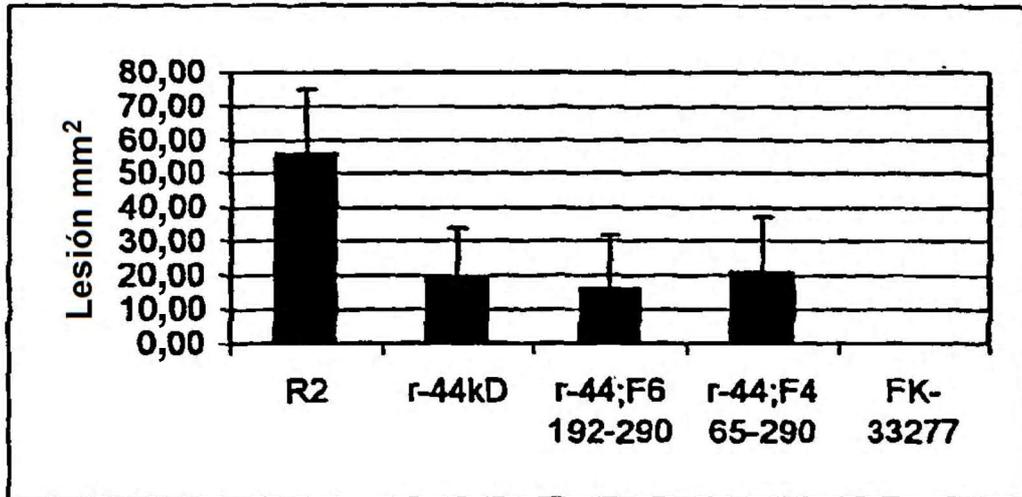


FIGURA 3

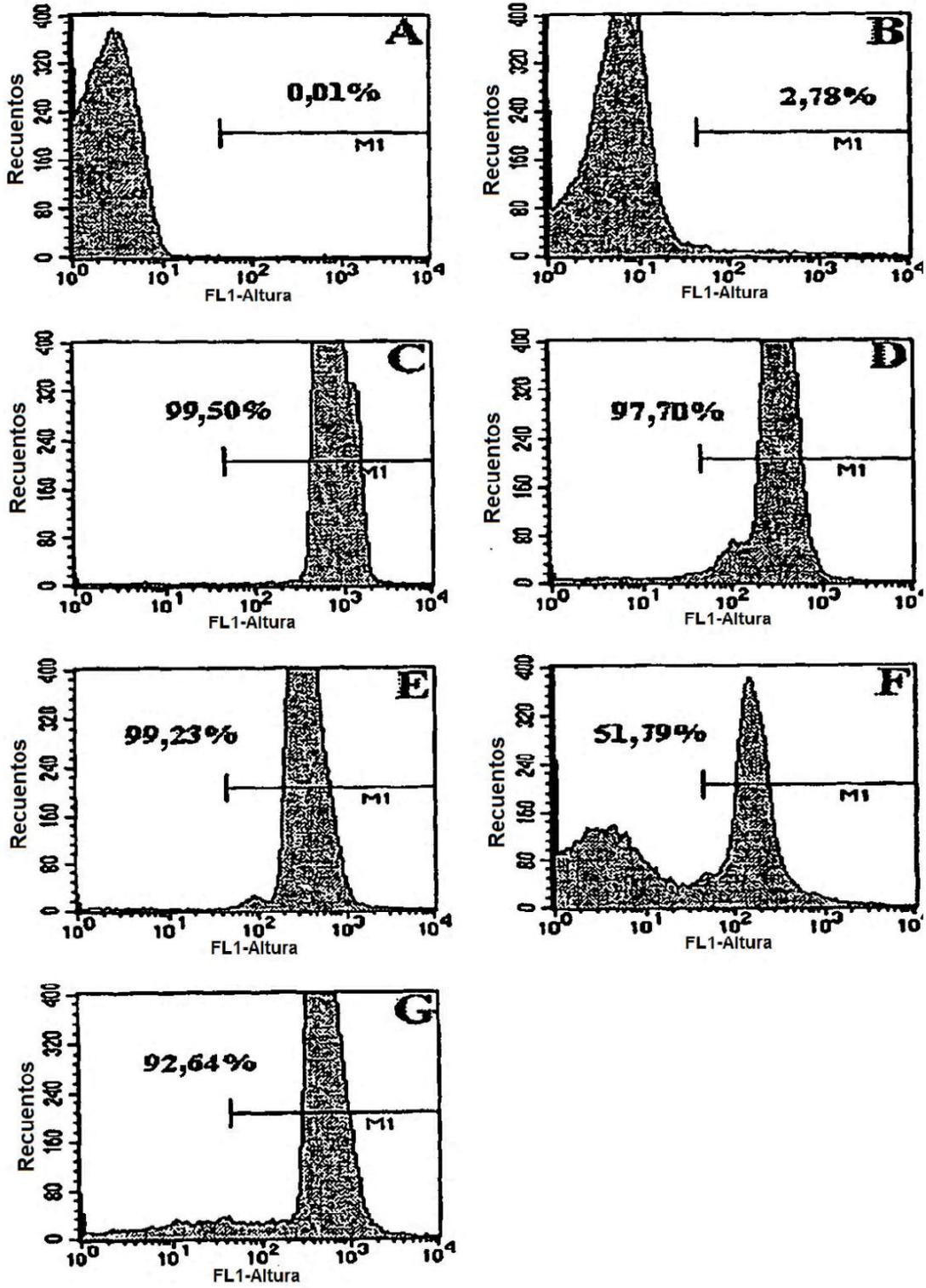


FIGURA 4

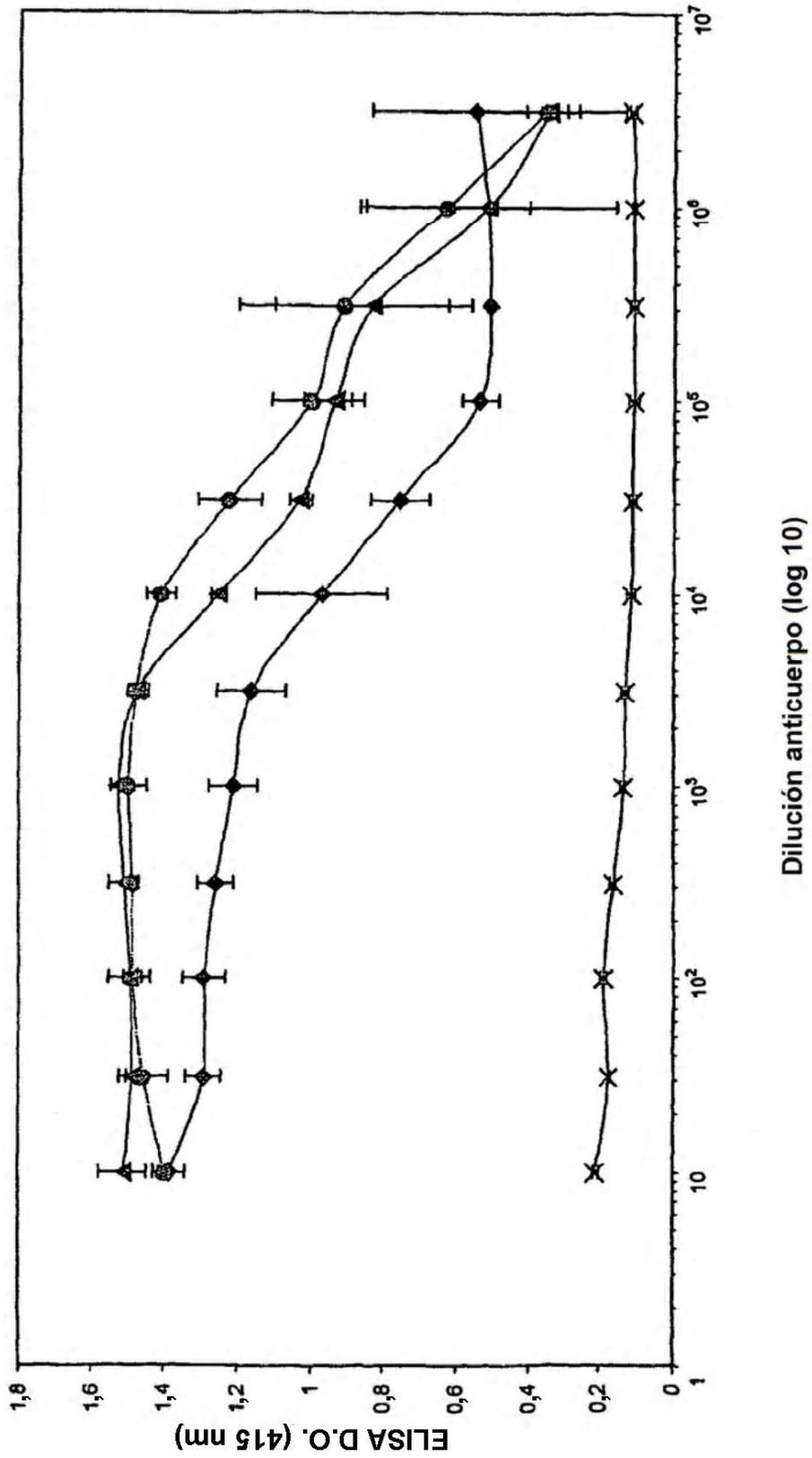


FIGURA 5

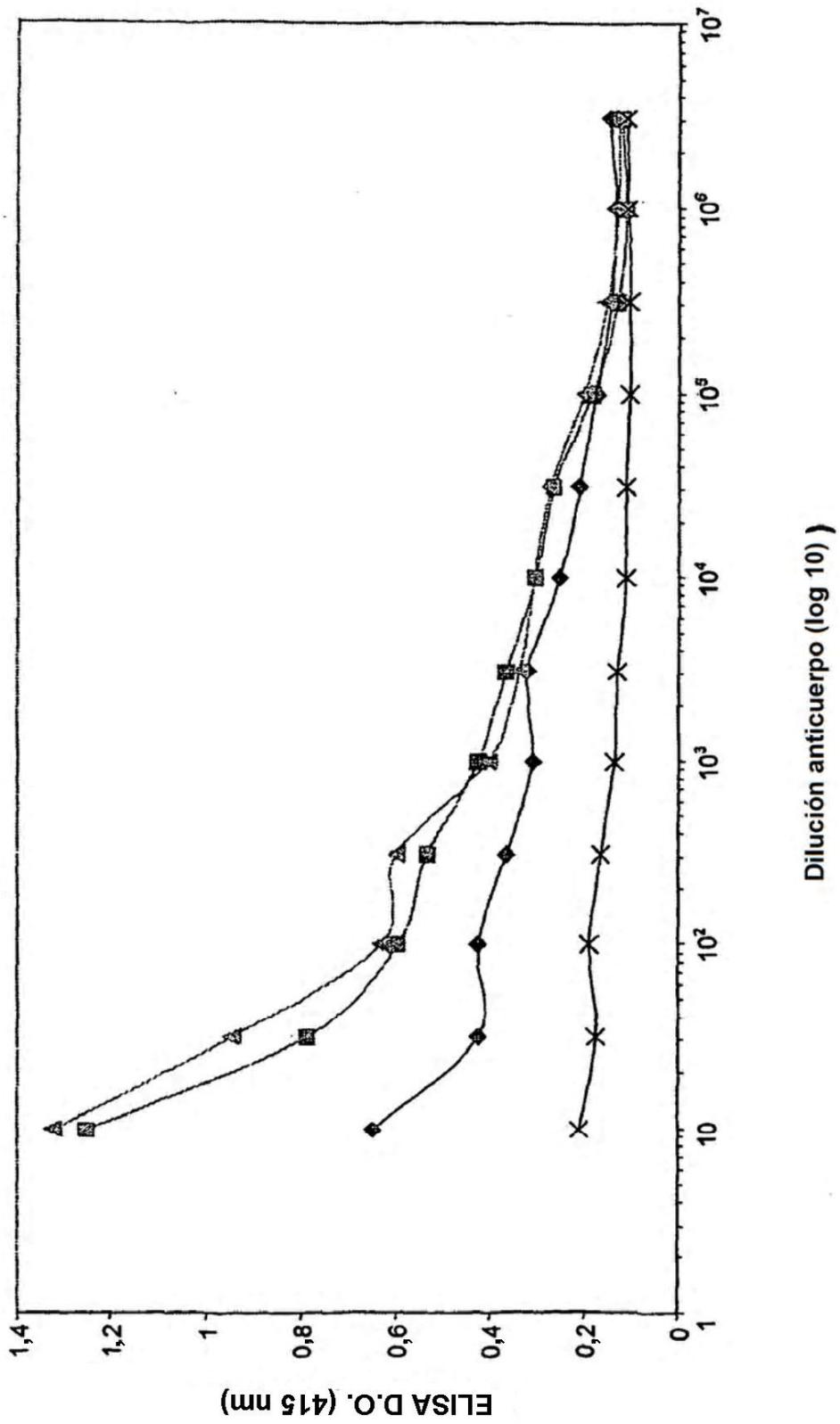


FIGURA 6

