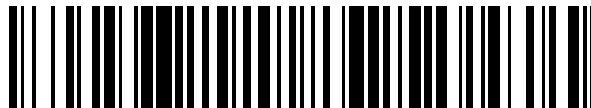


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 426 034**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/11** (2006.01)

**C07K 14/195** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2001 E 01925217 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2013 EP 1276762**

54 Título: **Truncamientos y proteínas recombinantes de Porphyromonas gingivalis**

30 Prioridad:

**28.04.2000 AU PQ718200**

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

**18.10.2013**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BARR, IAN GEORGE;  
CZAJKOWSKI, LARISSA y  
ROSS, BRUCE CARTER**

74 Agente/Representante:

**PÉREZ BARQUÍN, Eliana**

**ES 2 426 034 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

Truncamientos y proteínas recombinantes de *Porphyromonas gingivalis*

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a secuencias de nucleótidos de *P. gingivalis* y a polipéptidos de *P. gingivalis*. Los polipéptidos y nucleótidos de *P. gingivalis* se pueden utilizar en compuestos para su uso en generar una respuesta inmune en un sujeto contra *P. gingivalis* y para tratamiento, prevención o reducción de la gravedad de la afección conocida como periodontitis o de otras afecciones relacionadas con la infección con *P. gingivalis*.

**Antecedentes de la invención**

Las enfermedades periodontales son enfermedades inflamatorias asociadas a infección bacteriana de los tejidos de soporte de los dientes, y abarcan desde la forma relativamente suave de la gingivitis, la inflamación reversible inespecífica de tejido gingival, hasta las formas más agresivas de la periodontitis que se caracterizan por la destrucción de las estructuras de soporte del diente. La periodontitis se asocia con una infección subgingival de un consorcio de bacterias específicas gramnegativas que lleva a la destrucción del periodonto y que supone un problema principal de salud pública. Una bacteria que ha atraído un considerable interés es *P. gingivalis*, ya que la recuperación de este microorganismo en lesiones de periodontitis del adulto puede ser de hasta el 50% de la flora subgingival anaeróbicamente cultivable, mientras que *P. gingivalis* rara vez es recuperable, luego en bajo número, de sitios sanos. Un aumento proporcional en el nivel de *P. gingivalis* en la placa subgingival se ha asociado con un aumento de la gravedad de la periodontitis, y la erradicación del microorganismo de la población microbiana subgingival cultivable se acompaña de la solución 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 seres humanos sugieren un papel principal de *P. gingivalis* en el desarrollo de la periodontitis en el adulto.

Más recientemente, ha habido un aumento de la vinculación de la enfermedad periodontal con la enfermedad cardiovascular y, por lo tanto, del vínculo entre la infección por *P. gingivalis* y la enfermedad cardiovascular. Se puede encontrar más información con relación a esta vinculación en Beck JD *et al.* Ann Periodontol 3: 127-141, 1998 y en Beck J *et al.* J. Periodontol. 67; 1123-37, 1996.

*P. gingivalis* es un bacilo anaeróbico asacrolítico proteolítico gramnegativo pigmentado de negro que obtiene energía a partir del metabolismo de aminoácidos específicos. El microorganismo tiene un requisito absoluto de hierro para el crecimiento, preferentemente en forma de hemo o de su producto de oxidación de Fe (III) hemina, y cuando crece bajo condiciones de exceso de hemina es altamente virulenta en animales experimentales. Varios factores de virulencia han sido implicados en la patogenicidad de *P. gingivalis* incluyendo la cápsula, las adhesinas, las citotoxinas y las enzimas hidrolíticas extracelulares.

Con el fin de desarrollar una vacuna eficaz y segura para prevenir, eliminar o reducir la colonización de *P. gingivalis*, es necesario identificar y producir antígenos que están implicados en la virulencia y que tienen utilidad como inmunógenos posiblemente a través de la generación de anticuerpos específicos. Si bien es posible intentar aislar antígenos directamente a partir de cultivos de *P. gingivalis*, esto es, a menudo, difícil. Por ejemplo, como se mencionó anteriormente, *P. gingivalis* es un anaerobio estricto y puede ser difícil de aislar y de hacerlo crecer. Es también conocido que, para varios organismos, cuando se cultivan *in vitro*, muchos genes de virulencia están regulados y las proteínas codificadas ya no se expresan. Si se aplicaron técnicas de química convencionales para purificar candidatos potencialmente importantes de vacunas, las moléculas (protectoras) no se pueden identificar. Con la secuenciación de ADN, ya que el gen está presente (pero no transcrito) incluso cuando el organismo se hace crecer *in vitro*, puede ser identificado, clonado y producido como una proteína de ADN recombinante. Del mismo modo, un antígeno protector o un objetivo terapéutico se puede expresar transitoriamente por el organismo *in vitro* o producirse en bajos niveles, haciendo la identificación de estas moléculas extremadamente difícil por métodos convencionales.

Con la identificación serológica de objetivos terapéuticos, uno se limita a esas respuestas que son detectables usando métodos estándares tales como Western blot o ELISA. La limitación aquí es tanto el nivel de respuesta que se genera por el animal o por el ser humano como determinar si esta respuesta es protectora, perjudicial o irrelevante. Una limitación tal no está presente con un enfoque de secuenciación para la identificación de los posibles objetivos terapéuticos o profilácticos.

También es bien conocido que *P. gingivalis* produce una gama de proteasas ampliamente activas (solicitud internacional de patente n° WO 97/16542, y patentes de EE.UU. n° 5.475.097 y n° 5.523.390), que hacen difícil la identificación de proteínas intactas debido a su degradación por estas proteasas. El documento WO 01/47961 es parte de la técnica anterior de acuerdo con el artículo 54(3) CPE y describe una proteína de fusión de los residuos 192 a 290 de la adhesina r-Rgp44 de *P. gingivalis* enlazada a los residuos 286 a 380 de la SEC ID n° 4 .

**Sumario de la invención**

Los presentes inventores han identificado ahora fragmentos de las proteínas PG32 y PG33 de *P. gingivalis* que exhiben una solubilidad mejorada en comparación con las proteínas en toda su longitud. Usando un modelo murino de lesión de infección, los presentes inventores han encontrado que estos fragmentos solubles son capaces de proteger contra la exposición a *P. gingivalis*.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido soluble de *P. gingivalis* que consiste en un polipéptido que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consta de los residuos 86 a 223 de la SEC ID nº 3, los residuos 191-322 de la SEC ID nº 3, los residuos 224-391 de la SEC ID nº 3, los residuos 213-380 de la SEC ID nº 4, los residuos 224-306 de la SEC ID nº 3 y los residuos 281-384 de la SEC ID nº 3, o una variante de dicha secuencia que es capaz de generar una respuesta inmune contra *P. gingivalis*, en el que la variante no es una proteína de fusión de los residuos 192 a 290 de la adhesina r-Rgp44 de *P. gingivalis* enlazada a los residuos 286-380 de la SEC ID nº 4.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una construcción quimérica o de fusión que comprende un polipéptido soluble del primer aspecto.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ADN aislada, comprendiendo la molécula de ADN una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido soluble del primer aspecto.

En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un vector recombinante de expresión que comprende la molécula de ADN del tercer aspecto de la presente invención enlazada operativamente a un elemento regulador de la transcripción.

En un quinto aspecto, la presente invención proporciona una célula que comprende un vector recombinante de expresión del cuarto aspecto.

En un sexto aspecto, la presente invención proporciona un método para producir un polipéptido de *P. gingivalis* que comprende cultivar una célula del quinto aspecto bajo condiciones que permiten la expresión del polipéptido.

En un séptimo aspecto, la presente invención proporciona una composición para su uso en generar una respuesta inmune provocada, bajo *P. gingivalis*, en un sujeto, comprendiendo la composición una cantidad eficaz de al menos un polipéptido del primer aspecto, y/o al menos una molécula de ADN del tercer aspecto de la presente invención, y un portador farmacéuticamente aceptable.

En una realización preferida del séptimo aspecto, el portador farmacéuticamente aceptable es un adyuvante.

En un octavo aspecto, la presente invención proporciona una composición del séptimo aspecto para su uso en la reducción o la prevención de la incidencia o de la gravedad de la infección por *P. gingivalis* en un sujeto.

Dado el aumento de vinculación de la enfermedad periodontal con la enfermedad cardiovascular (ECV), y la posible relación, por lo tanto, de la infección por *P. gingivalis* con las ECV, la composición del séptimo aspecto de la presente invención puede usarse también en la terapia profiláctica para reducir la incidencia o la gravedad de las ECV o como un complemento en el tratamiento de las ECV.

En un noveno aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo generado y dirigido contra un polipéptido soluble, consistiendo el polipéptido en una secuencia seleccionada del grupo que consta de los residuos 191-322 de la SEC ID nº 3, los residuos 224-391 de la SEC ID nº 3, los residuos 213-380 de la SEC ID nº 4, los residuos 224-306 de la SEC ID nº 3, y los residuos 281-384 de la SEC ID nº 3.

El anticuerpo del noveno aspecto puede ser policlonal o monoclonal.

En un décimo aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende un anticuerpo del noveno aspecto y un portador farmacéuticamente aceptable.

En una realización preferida del décimo aspecto, la composición se selecciona del grupo que consiste en una composición de pasta de dientes, enjuague bucal, polvo de dientes, dentífrico líquido, colutorio, trocisco, goma de mascar, pasta dental, crema de masaje gingival, tableta para hacer gárgaras, producto lácteo y otros productos alimenticios.

En un undécimo aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo del noveno aspecto para su uso en el tratamiento o prevención de la infección por *P. gingivalis* en un sujeto, en el que el anticuerpo se genera y dirige contra un polipéptido soluble que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consta de los residuos 224-391 de la SEC ID nº 3 y los residuos 213-380 de la SEC ID nº 4.

En un duodécimo aspecto, la presente invención proporciona un método de diagnóstico para detectar la presencia o ausencia de un polipéptido *P. gingivalis* en una muestra, comprendiendo el método poner a la muestra en contacto con un anticuerpo del noveno aspecto bajo condiciones suficientes para que el anticuerpo forme un complejo inmune con un polipéptido de *P. gingivalis* de la muestra, y para detectar la presencia o ausencia de un complejo inmune.

5 En un aspecto decimotercero, la presente invención proporciona un método de diagnóstico para detectar la presencia o ausencia de un anticuerpo de *P. gingivalis* en una muestra, comprendiendo el método poner a la muestra en contacto con un polipéptido soluble del primer aspecto, o con una construcción quimérica o de fusión del segundo aspecto en condiciones suficientes para que el fragmento soluble de un polipéptido forme un complejo inmune con un anticuerpo de la muestra, y para detectar la presencia o ausencia de un complejo inmune.

10 En un decimocuarto aspecto, la presente invención proporciona un conjunto de útiles que comprende un polipéptido soluble del primer aspecto o una construcción quimérica de fusión del segundo aspecto y/o un anticuerpo del noveno aspecto.

15 En un decimoquinto aspecto, la presente invención proporciona el uso de un polipéptido del primer aspecto para generar un anticuerpo.

### 20 Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra los resultados de tres experimentos separados en los que toda la longitud de r-PG32 (construcción 1; aa21-391 en 0,5 M de urea) (figura 1a) y toda la longitud de r-PG33 (construcción 2; aa22-380 en urea 2 M) (figura 1b) se utilizaron para inmunizar ratones y se compararon con fragmentos de r-PG32 (construcción 21; aa224-391 en PBS) y de r-PG33 (construcción 22; aa213-380 en PBS) (figura 1c). A los ratones de control se les dieron células enteras (FK 33277) muertas con formalina de la cepa 33277 de *P. gingivalis* o un lisado completo de *E. coli* (*E. coli*).

La figura 2 muestra resultados de Western blot de un 12% de gel SDS-PAGE (Novex) que se han hecho reaccionar con un anti-GST monoclonal de ratón (B14; Santa Cruz Biotechnology) (figura 2a) y un resultado que se ha hecho reaccionar con sueros de ratones inmunizados con PG32 (aa224-391) en FIA (figura 2b). Los límites del anticuerpo se rastrearon utilizando sueros de Ig-HRP de oveja anti-ratón a 1:2000 (Silenus) y se detectaron con un substrato (KPL) de peroxidasa de membrana TMB.

### 35 Descripción detallada de la invención

La bacteria intra-oral *Porphyromonas gingivalis* contiene en su superficie las principales proteínas PG32 y PG33 de la membrana externa. En un modelo de absceso de ratón, los fragmentos solubles truncados de estas proteínas proporcionan una protección mejorada contra la exposición a *P. gingivalis* cuando se comparan con las proteínas en toda su longitud. De manera acorde, en un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un fragmento soluble del polipéptido de PG32 o de PG33, como se define en la reivindicación 1.

Según se usa en este documento, "soluble" significa soluble al menos en un 5% y, preferiblemente, más soluble que un 10%, según se determina por el método siguiente.

45 Los niveles y la solubilidad de las proteínas recombinantes o de sus truncamientos pueden ser evaluados tomando una pequeña cantidad (5 a 20 ml) del cultivo recombinante de células de *E. coli*, granulando las células por centrifugación y resuspendiendo las células en 1,5 ml de tampón TE a pH 8,0. Después las células se someten a ultrasonidos de 2 x 10 ráfagas por segundo usando un sonicador equipado con una microsonda (por ejemplo, un disruptor celular ultrasónico Virosonic Digital 475 ajustado al nivel 5, modelo perteneciente a The Virtis Company, Nueva York). Después de centrifugarse durante 15 minutos (a 13.000 rpm), se recoge el sobrenadante, y esta fracción representa la fracción soluble. El gránulo se lava y después se resuspende en tampón TE pH 8,0, y esto representa la fracción insoluble. Se puede llevar a cabo el análisis de las diversas fracciones para determinar el nivel de proteína recombinante presente en cada fracción usando análisis de SDS-PAGE y de Western blot y, si la proteína recombinante se purifica, los ensayos de proteínas estándar pueden ser también utilizados. El nivel de solubilidad se evalúa determinando las cantidades relativas de la proteína recombinante de la fracción "soluble" en comparación con la cantidad de la fracción "insoluble", habiéndose recuperado el total que representa el 100% del total de la proteína recombinante. En algunos casos, ciertos detergentes no iónicos, tales como NOG y CHAPS, a niveles de 0,1-1% w/v o 0,1-1% de Tween-20 v/v, se pueden añadir al proceso de sonicación para ayudar en la solubilización de la proteína recombinante. Para la expresión a mayor escala y con fines de purificación, se pueden granular 500 ml de cultivos de *E. coli* por centrifugación y resuspender en 40 ml de un tampón adecuado (por ejemplo, 5 mM de imidazol, 500 nM de NaCl, 20 mM de Tris-HCl, a pH 7,9). Después las células se someten a ultrasonidos a 6 X 10 ráfagas por segundo usando una microsonda (0,5 ") ajustada a 8 [disruptor celular ultrasónico Virosonic Digital 475, The Virtis Company, Nueva York]. Después de centrifugar durante 15 minutos (a 13.000 rpm), el sobrenadante que contiene la proteína recombinante soluble se recoge para su posterior análisis o para su purificación. Si se encontrara que toda la proteína recombinante está en la fracción soluble, entonces esto representaría una proteína 100% soluble, y, a la inversa, si se encontrara que toda la proteína recombinante está en

la fracción insoluble, entonces esto representaría una proteína 0% soluble.

El nivel de solubilidad de las proteínas recombinantes o de truncamientos expresado en la levadura se puede determinar usando el siguiente procedimiento. Una muestra de un cultivo de levadura que expresa una proteína recombinante puede ser extraída por centrifugación (3000 g durante 5 minutos) y resuspendida en tampón de ruptura de 500 ul (50 mM de dihidrógeno ortofosfato de sodio, EDTA 1 mM, 5% de glicerol, a pH 7,4, que contiene 1 mM de PMSF, 10 mM de E-64, Sigma). Se llenan tres cuartas partes de un frasco de tapón de rosca de 2,0 ml (Biospec) con perlas de vidrio de 0,5 mm (Biospec) y el volumen restante del frasco se llena con células resuspendidas. La mezcla se homogeneiza, a continuación, en un disruptor celular de minibatidora de cuenta (por ejemplo, Biospec para 8 x 30 segundos fijado a 5.000 rpm) con una incubación de 30 segundos en hielo entre las batidas. Las perlas se dejan sedimentar y a las células rotas de levadura se les permite recuperarse. Después de una centrifugación durante 5 minutos (3.000 g) se recoge el sobrenadante, y esto representa la fracción soluble. El gránulo restante resuspendido en el tampón de ruptura representa la fracción insoluble. En algunos casos, se pueden añadir detergentes no iónicos, tales como NOG y CHAPS, a niveles de 0,1-1% w/v o 0,1-1% de Tween-20 v/v, para ayudar en la solubilización de las proteínas recombinantes. Las fracciones se analizan usando análisis SDS-PAGE y de Western blot, de una manera similar al material derivado de la *E. coli* con el fin de evaluar las cantidades relativas de proteína recombinante presentes en las fracciones soluble e insoluble.

En el primer aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido soluble de *P. gingivalis* que consiste en un polipéptido que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consta de los residuos 86 a 223 de la SEC ID nº 3, los residuos 191-322 de la SEC ID nº 3, los residuos 224-391 de la SEC ID nº 3, los residuos 213-380 de la SEC ID nº 4, los residuos 224 a 306 de la SEC ID nº 3, y los residuos 281 a 384 de la SEC ID nº 3, o una variante de dicha secuencia que es capaz de generar una respuesta inmune contra *P. gingivalis*, en el que la variante no es una proteína de fusión de los residuos 192 a 290 de la adhesina r-Rgp44 de *P. gingivalis* enlazada a los residuos 286 a 380 de la SEC ID nº 4.

En una realización preferida, el polipéptido del primer aspecto está en forma de proteína quimérica o de fusión.

La presente invención también abarca variantes solubles y derivados de los polipéptidos del primer aspecto. Los términos "variante" o "derivado", en relación con las secuencias de aminoácidos de la presente invención, incluye cualquier sustitución, variación, modificación, reemplazo, delección o adición de uno (o más) aminoácidos de o a la secuencia, proporcionando que la secuencia de aminoácidos resultante sea capaz de generar una respuesta inmune contra *P. gingivalis*, teniendo, preferiblemente, al menos del 25 al 50% de la actividad que los polipéptidos presentan en las listas de secuencias; más preferiblemente, al menos, sustancialmente, la misma actividad.

Se pueden preparar mutantes de la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos de la presente invención introduciendo cambios apropiados de nucleótidos en una secuencia de ácido nucleico, o mediante síntesis *in vitro* del polipéptido deseado. Tales mutantes incluyen, por ejemplo, delecciones, inserciones o sustituciones de residuos dentro de la secuencia de aminoácidos. Se puede hacer una combinación de delección, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que el producto de proteína final posea las características deseadas.

En el diseño de mutantes de la secuencia de aminoácidos, el emplazamiento del sitio de mutación y la naturaleza de la mutación dependerán de la(s) característica(s) que se van a modificar. Los sitios para la mutación se pueden modificar individualmente o en serie, por ejemplo (1) sustituyendo primero con elecciones conservadoras de aminoácidos y, después, con selecciones más radicales, dependiendo de los resultados conseguidos, (2) eliminando el residuo de diana, o (3) insertando otros residuos adyacentes al sitio del emplazamiento.

Las delecciones de la secuencia de aminoácidos oscilan generalmente desde aproximadamente 1 a 30 residuos, más preferiblemente desde aproximadamente 1 a 10 residuos, y típicamente desde aproximadamente 1 a 5 residuos contiguos.

Los mutantes de sustitución tienen al menos un residuo de aminoácido retirado de la molécula de polipéptido, y un residuo diferente insertado en su lugar. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis sustitutiva incluyen los sitios identificados como la región o las regiones antigénica(s) determinante(s), y el sitio o los sitios activo(s). Otros sitios de interés son aquéllos en los que ciertos residuos particulares, obtenidos de diversas especies, son idénticos. Estas posiciones pueden ser importantes para la actividad biológica. Estos sitios, especialmente aquéllos que caen dentro de una secuencia de al menos otros tres sitios conservados de manera idéntica, se sustituyen preferiblemente de una manera relativamente conservadora. Dichas sustituciones conservadoras se muestran en la tabla 1 bajo el título de "sustituciones ejemplares".

Tabla 1. Sustituciones ejemplares

Residuo original	Sustituciones ejemplares
Ala (A)	val; leu; ile; gly
Arg (R)	lys; gln; asn

Asn (N)	gln; his; lys; arg
Asp (D)	glu
Cys (C)	ser
Gln(Q)	asn; his
Glu (E)	asp
Gly (G)	pro; ala
His (H)	asn; gln; lys; arg
Ile (I)	leu; val; ala; met; phe
Leu (L)	ile; val; met; ala; phe
Lys (K)	arg; gln; asn
Met (M)	leu; phe; ile
Phe (F)	leu; val; ala; ile; tyr; trp
Pro (P)	gly
Ser (S)	thr
Thr (T)	ser
Trp (W)	tyr; phe
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala

- Además, si se desea, se pueden introducir aminoácidos no naturales o análogos químicos de aminoácidos, como una sustitución o adición, en el polipéptido de la presente invención. Tales aminoácidos incluyen, pero no se limitan a, los isómeros D de los aminoácidos comunes, ácido 2,4-diaminobutírico, el ácido  $\alpha$ -amino isobutírico, ácido 4-aminobutírico, ácido 2-aminobutírico, ácido 6-amino hexanoico, ácido 2-amino isobutírico, ácido 3-amino propiónico, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, sarcosina, citrulina, homocitrulina, ácido cisteico, t-butilglicina, t-butilalanina, fenilglicina, ciclohexilalanina,  $\beta$ -alanina, fluoro-aminoácidos, aminoácidos de diseño tales como aminoácidos  $\beta$ -metilo, aminoácidos C $\alpha$ -metilo, aminoácidos N $\alpha$ -metilo, y análogos de aminoácidos en general.
- 5 También se incluyen, dentro del alcance de la invención, los polipéptidos de la presente invención que se modifican diferencialmente durante o después de la síntesis, por ejemplo por biotilación, bencilación, glicosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos conocidos de protección/bloqueo, escisión proteolítica, enlace a una molécula de anticuerpo o a otro ligando celular, etc. Estas modificaciones pueden servir para aumentar la estabilidad y/o bioactividad del polipéptido de la invención.
- 10 También se incluyen, dentro del alcance de la invención, fragmentos biológicamente activos de los polipéptidos de la presente invención. Por "fragmento biológicamente activo" nos referimos a un fragmento soluble, de una secuencia de los aspectos segundo o tercero, que conserva al menos una de las actividades del polipéptido nativo. Lo más preferiblemente, un "fragmento biológicamente activo" de la presente invención es capaz de generar una respuesta inmune contra *P. gingivalis* cuando el fragmento se administra a un sujeto.
- 15 Se apreciará que las técnicas para identificar un fragmento biológicamente activo o un mutante de un polipéptido de la presente invención, que es capaz de generar una respuesta inmune contra *P. gingivalis* en un sujeto, son bien conocidas en la este campo. Por ejemplo, se pueden hacer sustituciones y/o deleciones al polipéptido de la presente invención, y se puede testar la capacidad del fragmento/mutante resultante para generar una respuesta inmune contra *P. gingivalis* en el sujeto.
- 20 La invención también proporciona proteínas quiméricas o de fusión. Según se usan en este documento, una "proteína quimérica" o una "proteína de fusión" comprenden un primer polipéptido de la presente invención operativamente enlazado a un polipéptido asociado. El término "operativamente enlazado" pretende indicar que el primer polipéptido y el polipéptido asociado están fusionados en bastidor entre sí. El polipéptido asociado puede fusionarse en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal del polipéptido de la presente invención.
- 25 El polipéptido asociado se puede derivar del mismo organismo o de uno diferente, y puede ser el mismo polipéptido que el primero u otro diferente. De manera acorde, la proteína de fusión puede comprender al menos dos polipéptidos de la presente invención.
- 30
- 35

En una realización, la proteína de fusión es un polipéptido de la presente invención que contiene una secuencia heteróloga de señal en su extremo N-terminal. En ciertas células huésped (por ejemplo, células huésped de mamífero), la expresión y/o la secreción de un polipéptido se puede aumentar mediante el uso de una secuencia heteróloga de señal.

5 En otra realización, la proteína de fusión comprende un polipéptido de la presente invención enlazado a una proteína de unión a maltosa (MPB) o a una proteína de glutatión transferasa (GST). Se pueden hacer proteínas MBP de fusión usando el sistema New England Biolabs pMal de expresión. Se ha demostrado que la fusión de MBP o de GST con las proteínas recombinantes facilita, en algunos casos, el plegado del polipéptido asociado recombinante de fusión y, por consiguiente, puede aumentar la solubilidad de la proteína de fusión, en comparación con los polipéptidos recombinantes no fusionados de *P. gingivalis* de la presente invención.

15 Preferiblemente, una proteína quimérica o de fusión de la invención se produce por técnicas estándares recombinantes de ADN. Por ejemplo, los fragmentos de ADN que codifican las diferentes secuencias de polipéptidos se ligan juntos en bastidor de acuerdo con técnicas convencionales, por ejemplo empleando términos con extremos romos o extremos escalonados para la ligación, digestión con enzimas de restricción para proporcionar términos apropiados, rellenado de extremos cohesivos según sea apropiado, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar una unión indeseable, y ligación enzimática. En otra realización, el gen de fusión se puede sintetizar por técnicas convencionales incluyendo sintetizadores de ADN automatizados.

20 Alternativamente, se puede llevar a cabo una amplificación por PCR de fragmentos de genes usando iniciadores de anclaje que dan lugar a salientes complementarios entre dos fragmentos consecutivos de gen que pueden consecuentemente hibridarse y reamplificarse para generar una secuencia quimérica de gen (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel *et al.*, John Wiley & Sons: 1992). Lo que es más, hay muchos vectores de expresión comercialmente disponibles que codifican ya una porción proteínica específica de fusión (por ejemplo, un polipéptido GST). Un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la presente invención se puede clonar en un vector tal de expresión tal que la porción proteínica específica de fusión quede enlazada en bastidor a un polipéptido de la presente invención.

30 La presente invención también proporciona secuencias de nucleótidos que codifican los péptidos solubles de la invención, equivalentes funcionales de dichas secuencias de nucleótidos y sondas de ácido nucleico para dichas secuencias de nucleótidos.

35 La invención también incluye dentro de su alcance diversas aplicaciones y usos de los nucleótidos anteriores y productos recombinantes que incluyen polipéptidos recombinantes quiméricos o de fusión.

De acuerdo con una realización de la presente invención, usando técnicas recombinantes de ADN, se incorpora una secuencia génica que codifica un fragmento soluble de PG32 o de PG33 de la invención en un vector de expresión, y el vector recombinante se introduce en una célula huésped apropiada dirigiendo por ello la expresión de la secuencia a esa célula huésped particular. El sistema de expresión, que comprende el vector recombinante introducido en la célula huésped, se puede usar (a) para producir fragmentos solubles de PG32 o de PG33 que se pueden purificar para su uso como inmunógenos en formulaciones de vacunas; (b) para producir fragmentos solubles de PG32 o de PG33 para su uso como antígenos para inmunoensayos de diagnóstico o para generar antisueros específicos de *P. gingivalis* de valor terapéutico y/o diagnóstico; (c) o si el vector recombinante de expresión es un virus vivo tal como el Vaccinia virus, puede ser utilizado el vector en sí mismo como una preparación de vacuna viva o inactivada para ser introducida en las células del huésped para la expresión de fragmentos solubles de PG32 o de PG33; (d) para su introducción en células bacterianas vivas atenuadas o bacterias comensales intra-orales genéticamente manipuladas, que se utilizan para expresar fragmentos solubles de PG32 o de PG33 para vacunar individuos; (e) o para su introducción directamente en un individuo para inmunizarle contra las proteínas PG32 o PG33 solubles codificadas y expresadas. 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 la enfermedad periodontal en animales. La vacuna bacteriana recombinante que expresa fragmentos solubles de PG32 o de PG33 se puede usar para colonizar la cavidad oral, la placa supragingival o la subgingival. La bacteria intra-oral se puede aislar del paciente con periodontitis y ser manipulada genéticamente para expresar los fragmentos solubles de PG32 o de PG33. Los fragmentos solubles de PG32 o de PG33 estimularán los tejidos linfoides asociados a la mucosa (MALT) para producir anticuerpos específicos para *P. gingivalis*. Los fragmentos solubles de PG32 o de PG33 de la invención se pueden utilizar como inmunógenos en formulaciones de vacunas profilácticas y/o terapéuticas contra cepas patogénicas de *P. gingivalis*, tanto si el inmunógeno se sintetiza químicamente, se purifica a partir de *P. gingivalis*, o se purifica a partir de un sistema de vector recombinante de expresión. Alternativamente, se puede incorporar un segmento de gen, que codifica un fragmento soluble de PG32 o de PG33 de la invención, a una vacuna bacteriana o viral, que comprende bacterias o virus recombinantes que están manipulados para producir uno o más fragmentos solubles de PG32 o de PG33, o en combinación con epítopos inmunogénicos de otros microorganismos patógenos. Además, se puede introducir, directamente en seres humanos, un gen que codifica un fragmento soluble de PG32 o de PG33, enlazado operativamente a uno o más elementos reguladores, para expresar el fragmento soluble y provocar una respuesta inmune protectora. Una vacuna se puede basar también en un componente recombinante de un fragmento soluble de PG32 o de PG33 incorporado a un

vector apropiado y expresado en un huésped adecuado transformado (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 intra-oral bacteriana recombinante, en la que la bacteria recombinante que expresa un fragmento soluble de PG32 o de PG33 es un habitante comensal de la cavidad oral.

5 Una realización preferida de la invención es una vacuna basada en un polipéptido soluble del primer aspecto y adyuvante adecuado que se entrega por aerosol nasal, por vía oral o por inyección para producir una respuesta inmune específica contra las proteínas PG32 o PG33. Una vacuna se puede basar también en un componente recombinante de un fragmento soluble, del primer o del segundo aspecto, que se incorpora en un vector apropiado y se expresa en un huésped adecuado transformado (por ejemplo, *B. coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, células COS, células CHO y células HeLa), que contiene el vector.

La presente invención proporciona también anticuerpos generados y dirigidos contra ciertos polipéptidos solubles de la presente invención.

15 Cuando se usa en este documento, el término "anticuerpo" incluye fragmentos de anticuerpos completos que conservan su actividad de unión para un antígeno diana. Tales fragmentos incluyen los fragmentos Fv, F(ab') y F(ab')<sub>2</sub>, así como anticuerpos de cadena sencilla (scFv). Además, los anticuerpos y fragmentos designados con este término pueden ser anticuerpos humanizados, como se describe, por ejemplo, en el documento EP-A-239400.

20 Los polipéptidos solubles de PG32 y PG33 de la presente invención se pueden usar para generar anticuerpos usando técnicas estándares. Los animales utilizados para la generación de anticuerpos pueden ser conejos, cabras, gallinas, ovejas, caballos, vacas, etc. Cuando se detecta un alto título de anticuerpos contra un fragmento soluble mediante inmunoensayo, se sangran los animales o se recogen los huevos o la leche, y se prepara el suero y/o se purifica el anticuerpo utilizando técnicas estándares o se producen anticuerpos monoclonales fusionando células de bazo con células de mieloma utilizando técnicas estándar. El anticuerpo (fracción de inmunoglobulina) se puede separar del cultivo o fluido de ascitis, suero, leche o huevos por precipitación salina, filtración de gel, intercambio iónico y/o cromatografía de afinidad, y similares, siendo preferida la precipitación salina. En el método de precipitación salina, el antisuero o la leche se saturan con sulfato de amonio para producir el precipitado, seguido por una diálisis del precipitado contra la solución salina fisiológica para obtener la fracción de inmunoglobulina purificada con el anti-PG32 o el anti-PG33 específico. El anticuerpo preferido se obtiene a partir del antisuero equino, del antisuero bovino y de la leche. En esta invención, el anticuerpo contenido en el antisuero y la leche obtenido mediante la inmunización del animal con los fragmentos solubles se mezcla en la composición oral. En este caso, se pueden usar el antisuero y la leche, así como el anticuerpo separado y purificado del antisuero y de la leche. Cada uno de estos materiales se puede usar en solitario o en combinación con dos o más. Los anticuerpos contra PG32 y PG33 se pueden utilizar en composiciones orales tales como pasta de dientes y colutorio. Los anticuerpos se pueden usar también para la detección temprana de *P. gingivalis* en muestras de placa subgingival mediante una técnica en consulta de Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) o Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.

40 Para las composiciones orales, se prefiere que la cantidad de los anticuerpos anteriores administrados sea 0,0001-50 g/kg/día y que el contenido de los anticuerpos anteriores sea 0,0002-10% en peso, preferiblemente 0,002-5% del peso de la composición. La composición de esta invención que contiene el anticuerpo antes mencionado del suero o de la leche se puede preparar y usar en diversas formas aplicables para la boca tales como dentífrico, incluyendo pastas de dientes, polvos dentales y dentífricos líquidos, colutorios, trociscos, dispositivos de irrigación de las bolsas periodontales, gomas de mascar, pastas dentales, cremas de masaje gingival, tabletas para hacer gárgaras, productos lácteos y otros productos alimenticios. La composición oral de acuerdo con esta invención puede incluir adicionalmente ingredientes adicionales bien conocidos, dependiendo del tipo y de la forma de la composición oral particular.

50 En ciertas formas altamente preferidas de la invención, la composición puede ser sustancialmente de carácter líquido, tal como un colutorio o enjuague. En una preparación tal, el portador es típicamente una mezcla de agua y alcohol que incluye, de manera deseable, un humectante como se describe posteriormente. Generalmente, la relación en peso de agua y alcohol está en el intervalo de desde aproximadamente 1:1 hasta aproximadamente 20:1. La cantidad total de mezcla de agua y alcohol en este tipo de preparación está típicamente en el intervalo de desde aproximadamente 70% hasta aproximadamente 99,9% del peso de la preparación. El alcohol es típicamente etanol o isopropanol. Se prefiere el etanol.

60 El pH de tal líquido y otras preparaciones de la invención está generalmente en el intervalo de desde aproximadamente 4,5 hasta aproximadamente 9 y típicamente de desde aproximadamente 5,5 hasta 8. El pH está preferiblemente en el intervalo de desde aproximadamente 6 hasta aproximadamente 8,0, preferiblemente 7,4. El pH se puede controlar con un ácido (por ejemplo, ácido cítrico o ácido benzoico), con una base (por ejemplo, hidróxido de sodio) o tamponado (como con citrato de sodio, benzoato, carbonato o bicarbonato, fosfato de hidrógeno disódico, dihidrógeno fosfato de sodio, etc.).

65 En otras formas deseables de esta invención, la composición puede ser de carácter sustancialmente sólido o



pastoso, tal como polvo de dientes, una tableta dental o un dentífrico, esto es, una pasta de dientes (crema dental) o gel dentífrico. El portador de tales preparaciones orales sólidas o pastosas contiene generalmente material dentalmente aceptable de pulido. Ejemplos de materiales de pulido son metafosfato de sodio insoluble en agua, metafosfato de potasio, fosfato tricálcico, fosfato de calcio dihidratado, fosfato dicálcico anhidro, pirofosfato de calcio, 5 ortofosfato de magnesio, fosfato de trimagnesio, carbonato de calcio, alúmina hidratada, alúmina calcinada, silicato de aluminio, silicato de zirconio, sílice, bentonita y mezclas de ellos. Otros materiales adecuados de pulido incluyen resinas termoendurecibles en partículas, tales como formaldehídos de melanina, fenólicos y de urea, y poliésteres y poliepóxidos reticulados. Los materiales de pulido preferidos incluyen sílice cristalina que tiene un tamaño de partícula de hasta aproximadamente 5 micras, un tamaño medio de partícula de hasta aproximadamente 1,1 micras, 10 y un área de superficie de hasta aproximadamente 50.000 cm<sup>2</sup>/gm, gel de sílice o sílice coloidal, y complejo amorfo de aluminosilicato de metal alcalino.

Cuando se emplean geles visualmente claros, los agentes de pulido de sílice coloidal, tales como los vendidos bajo la marca comercial SYLOID, como Syloid 72 y Syloid 74, o bajo la marca comercial SANTOCEL, como Santocel 100, 15 complejos alcalinos metálicos de aluminio-silicato, son particularmente útiles, ya que tienen índices de refracción cercanos a los índices de refracción de los sistemas gelificantes de agente-líquido (incluyendo agua y/o humectante) usados comúnmente en dentífricos.

Muchos de los llamados materiales de pulido "insolubles en agua" son de carácter aniónico e incluyen también 20 pequeñas cantidades de material soluble. De este modo, se puede formar metafosfato de sodio insoluble de cualquier manera adecuada, como se ilustra mediante el Diccionario Thorpe de Química Aplicada, [Thorpe's Dictionary of Applied Chemistry, Volumen 9, 4<sup>a</sup> edición, pp. 510-511]. Las formas de metafosfato de sodio insoluble conocidas como sal de Madrell y sal de Kurrol son ejemplos adicionales de materiales adecuados. Estas sales de metafosfato exhiben sólo una solubilidad de minutos en agua, y por lo tanto son referidas comúnmente como 25 metafosfatos insolubles (IMP). Está presente en ellas una cantidad menor de material de fosfato soluble como impurezas, normalmente un pequeño porcentaje tal como de hasta un 4% en peso. La cantidad de material de fosfato soluble, que se cree incluye un trimetafosfato de sodio soluble en el caso del metafosfato insoluble, se puede reducir o eliminar mediante lavado con agua si se desea. El metafosfato alcalino de metal insoluble se emplea típicamente en forma de polvo, con un tamaño tal de partícula que no más del 1% del material es mayor de 37 30 micras.

El material de pulido está presente generalmente en las composiciones sólidas o pastosas, en concentraciones en peso de desde aproximadamente 10% hasta aproximadamente 99%. Preferiblemente, está presente en cantidades de desde aproximadamente 10% hasta aproximadamente 75% en la pasta de dientes, y de desde aproximadamente 70% hasta aproximadamente 99% en el polvo dental. En las pastas de dientes, cuando el material de pulido es de naturaleza silícea, está generalmente presente en una cantidad de aproximadamente 10-30% en peso. Otros 35 materiales de pulido están típicamente presentes en una cantidad de aproximadamente 30-75% en peso.

En una pasta de dientes, el portador líquido puede comprender agua y humectante típicamente en una cantidad que oscila desde aproximadamente 10% hasta aproximadamente 80% del peso de la preparación. Glicerina, propilenglicol, sorbitol y propilenglicol ejemplifican humectantes/vehículos adecuados. También son ventajosas las 40 mezclas líquidas de agua, glicerina y sorbitol. En geles claros, donde el índice de refracción es una consideración importante, se emplean preferiblemente aproximadamente 2,5-30% de peso húmedo de agua, desde 0% hasta aproximadamente 70% de peso húmedo de glicerina y aproximadamente 20-80% de peso húmedo de sorbitol.

Pastas de dientes, cremas y geles contienen típicamente un agente espesante o gelificante natural o sintético en proporciones de desde aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 10, preferiblemente de desde aproximadamente 0,5% hasta aproximadamente 5% de peso húmedo. Un espesante adecuado es la hectorita 45 sintética, una arcilla compleja de silicato de metal alcalino y magnesio, coloidal y sintética, disponible, por ejemplo, como Laponite (por ejemplo, GP, SP 2002, D) comercializada por Laporte Industries Limited. Laponite D es, aproximadamente, en peso, 58,00% de SiO<sub>2</sub>, 25,40% de MgO, 3,05% de Na<sub>2</sub>O, 0,98% de Li<sub>2</sub>O, y algo de agua y trazas de metales. Su gravedad específica real es 2,53 y tiene una densidad aparente de 1,0 g/ml al 8% de 50 humedad.

Otros espesantes adecuados incluyen musgo irlandés, carragenina iota, goma de tragacanto, almidón, polivinilpirrolidona, hidroxietilpropilcelulosa, hidroxibutil metil celulosa, hidroxipropil metil celulosa, hidroxietil celulosa (por ejemplo, disponible como Natrosol), carboximetilcelulosa de sodio, y sílice coloidal tal como Syloid (por ejemplo, 244) finamente molido. Se pueden también incluir agentes solubilizantes tales como polioles humectantes (tales como propilenglicol, dipropilenglicol y hexilenglicol), cellosolves (tales como metil cellosolve y etil cellosolve), aceites 60 vegetales y ceras que contienen al menos aproximadamente 12 átomos de carbono en una cadena lineal (tales como aceite de oliva, aceite de ricino y vaselina) y ésteres (tales como acetato de amilo, acetato de etilo y benzoato de bencilo).

Se entenderá que, como es convencional, las preparaciones orales han de ser vendidas o, de otro modo, 65 distribuidas en paquetes adecuados etiquetados. De este modo, un frasco de enjuague bucal tendrá una etiqueta describiéndolo, en sustancia, como un enjuague bucal o colutorio y albergando instrucciones para su uso; y una

pasta de dientes, una crema o un gel estarán normalmente en un tubo aplastable, típicamente de aluminio, forrado de plomo o plástico, o en otro dispensador de apretón, de bomba o de presión, para dosificar el contenido, que tenga una etiqueta que lo describa, en sustancia, como pasta de dientes, gel o crema dental.

5 Se usan agentes orgánicos tensioactivos en las composiciones de la presente invención para conseguir un aumento de la acción profiláctica, ayudar a conseguir una dispersión a fondo y completa del agente activo a lo largo de la cavidad oral, y hacer las composiciones instantáneas más aceptables cosméticamente. El material orgánico tensioactivo es preferiblemente de naturaleza aniónica, no iónica o de anfótero, que no desnatura el anticuerpo de la invención, y se prefiere emplear como agente tensioactivo un material detergente que imparte a la composición propiedades detergentes y espumantes al mismo tiempo que no desnatura el anticuerpo. Ejemplos adecuados de surfactantes aniónicos son las sales solubles en agua de monosulfatos de monoglicéridos de ácidos grasos superiores (tales como la sal de sodio del monoglicérido monosulfatado de ácidos grasos hidrogenados de aceite de coco), alquil sulfatos superiores (tales como lauril sulfato de sodio), alquil aril sulfonatos (tales como dodecil benceno de sodio sulfonato), alquilsulfoacetatos superiores, ésteres de ácidos grasos superiores de 1,2-dihidroxi propano sulfonato, y las amidas alifáticas superiores, sustancialmente saturadas, de compuestos de aminoácidos carboxílicos alifáticos inferiores, tales como los que tienen de 12 a 16 carbonos en el ácido graso, radicales alquilo o acilo, y similares. Ejemplos de las últimas amidas mencionadas son N-lauroil-sarcosina, y las sales de sodio, potasio, y etanolamina de sales de N-lauroil, N-miristoil o N-palmitoil sarcosina, que deben estar sustancialmente libres de jabón o material similar de ácido graso superior. El uso de estos compuestos de sarconite en las composiciones de la presente invención es particularmente ventajoso, ya que estos materiales exhiben un marcado efecto prolongado en la inhibición de la formación de ácido en la cavidad oral debido a la ruptura de carbohidratos, además de ejercer alguna reducción en la solubilidad del esmalte dental en soluciones ácidas. Ejemplos de surfactantes no iónicos solubles en agua adecuados para su uso con anticuerpos son productos de condensación de óxido de etileno con diversos compuestos reactivos que contienen hidrógeno reactivos con ellos, que tienen largas cadenas hidrófobas (por ejemplo, cadenas alifáticas de aproximadamente 12 a 20 átomos de carbono), cuyos productos de condensación ("etoxámeros") contienen porciones proteínicas específicas de polioxietileno hidrófilo, tales como productos de condensación de poli (óxido de etileno) con ácidos grasos, alcoholes grasos, amidas grasas, alcoholes polihidroxilados (por ejemplo monoestearato de sorbitán) y óxido de polipropileno (por ejemplo, materiales plurónicos).

30 El agente tensioactivo está típicamente presente en una cantidad de aproximadamente 0,1-5% en peso. Es de destacar que el agente tensioactivo puede ayudar en la disolución del anticuerpo de la invención y, por ello, disminuir la cantidad de humectante solubilizante necesitado.

35 Se pueden incorporar otros materiales diversos en las preparaciones de esta invención, tales como agentes blanqueantes, conservantes, siliconas, compuestos de clorofila y/o material amoniacal tal como urea, fosfato de diamonio, y mezclas de ellos. Estos adyuvantes, cuando están presentes, se incorporan a las preparaciones en cantidades que no afectan sustancialmente de manera adversa a las propiedades y características deseadas.

40 Se puede también emplear cualquier material adecuado saborizante o edulcorante. Ejemplos de constituyentes saborizantes adecuados son aceites saborizantes, por ejemplo aceite de menta verde, menta, gaulteria, sasafrás, clavo, salvia, eucalipto, mejorana, canela, limón, y naranja, y salicilato de metilo. Los agentes edulcorantes adecuados incluyen sacarosa, lactosa, maltosa, sorbitol, xilitol, ciclamato de sodio, perillartina, AMP (aspartil-fenil-alanina, éster metílico), sacarina, y similares. Adecuadamente, los agentes saborizantes y edulcorantes pueden hacer comprender cada uno o conjuntamente desde aproximadamente el 0,1% hasta el 5% más de la preparación.

50 En una práctica preferida de esta invención, una composición de acuerdo con esta invención, tal como colutorio o dentífrico, que contiene la composición de la presente invención, se aplica preferiblemente con regularidad en las encías y en los dientes, tal como cada día o cada dos o tres días o, preferiblemente, de 1 a 3 veces al día, a un pH de desde aproximadamente 4,5 hasta aproximadamente 9, generalmente de desde aproximadamente 5,5 hasta aproximadamente 8, preferiblemente de desde aproximadamente 6 hasta 8, durante al menos 2 semanas y hasta 8 semanas o más, hasta toda la vida.

55 Las composiciones de esta invención se pueden incorporar en pastillas, o en goma de mascar o en otros productos, por ejemplo mediante agitación en una base de goma caliente o recubrimiento de la superficie exterior de una base de goma, ilustrativas de las cuales pueden mencionarse gelutong, látex de caucho, resinas de vinilita, etc, deseablemente con plastificantes o suavizantes convencionales, azúcar u otros edulcorantes tales como glucosa, sorbitol y similares.

60 Las composiciones de esta invención también incluyen portadores dirigidos de entrega tales como dispositivos de irrigación de las bolsas periodontales, colágeno y elastina, o esponjas sintéticas, membranas o fibras colocadas en la bolsa periodontal, usadas como membrana de barrera o aplicadas directamente en la raíz del diente.

65 La presente invención también proporciona un método de diagnóstico para detectar la presencia de *P. gingivalis*, caracterizado por el uso de un anticuerpo o de un antígeno cualquiera o de una combinación de ellos, como se ha definido antes en este documento, comprendiendo la aplicación de técnicas conocidas, incluyendo, por ejemplo, el

ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.

A lo largo de esta memoria descriptiva, la palabra "comprenden", o variaciones tales como "comprende" o "comprendiendo", se entenderá que implican la inclusión de un elemento, número entero o paso indicados, o de un grupo indicado de elementos, de números enteros o de pasos, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, número entero o paso, o grupo de elementos, de números enteros o de pasos.

Cualquier discusión de documentos, actas, materiales, dispositivos, artículos o similares que se han incluido en la presente memoria descriptiva es con el único fin de proporcionar un contexto para la presente invención. No debe ser tomada como una admisión de que cualquiera o la totalidad de estas cuestiones forman parte de la base de la técnica anterior o eran conocimientos comunes generales en el campo relevante para la presente invención, como existían en Australia antes de la fecha de prioridad de cada reivindicación de esta solicitud.

Con el fin de que la naturaleza de la presente invención se pueda comprender más claramente, se describirán ciertas formas preferidas de ella con referencia a los siguientes ejemplos.

### Ejemplo 1: Clonación y análisis de las proteínas recombinantes PG32 y PG33 de *P. gingivalis* y fragmentos o truncamientos de estas proteínas

#### (a) Clonación de proteínas truncadas de *P. gingivalis*

PG32 (número de acceso GenBank AF175 714) y PG33 (número de acceso GenBank AF175715) han sido previamente descritas como proteínas inmunorreactivas de la cepa W50 de *P. gingivalis*. La secuencia completa de ADN y la secuencia de la proteína para PG32 se dan en las SEC ID n° 1 y n° 3, respectivamente, y para PG33 en las SEC ID n° 2 y n° 4, respectivamente.

Ambas proteínas recombinantes PG32 y PG33 junto con varios truncamientos de estas proteínas (tabla 2) fueron clonados y expresados en *E. coli*.

utilizando los iniciadores de oligonucleótidos listados en la tabla 2, las enteras longitudes de PG32 y de PG33 (con su secuencias líder eliminadas) y varios fragmentos de PG32 y PG33 se han amplificado por PCR a partir de la purificación de ADN genómico de *P. gingivalis* W50 usando Pfu ADN polimerasa (Promega) y un PTC-100 termociclador (MJ Research). Las reacciones de PCR usan las siguientes condiciones: 30 ciclos de desnaturalización (95 °C, 1 min), recocido (50 °C, 2 min), y extensión (72 °C, 6 min). Cada producto de PCR fue tratado con proteinasa K (Boehringer Mannheim) y purificado usando el equipo QIAquick de PCR de purificación (Qiagen). El ADN se digirió después en los sitios *EcoRI* y *NotI* de enzimas de restricción introducidos por iniciadores. El fragmento de ADN se purificó seguido de una electroforesis a través de un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1% (Bio-Rad) y se extrajo usando el equipo de extracción de gel QiaexII (Qiagen). El ADN purificado se ligó al vector plásmido purificado QIAEXII de expresión pET24a(+) (Novagen) que había sido previamente digerido con *EcoRI* y *NotI*. Los productos de ligación se transformaron en células competentes de calcio de *E. coli* BL21 DE3 (Stratagene) y los transformantes se seleccionaron en una LB que contenía 50 µg de kanamicina. PG32, PG33 y los truncamientos de estas proteínas se expresaron a partir de pET24a(+), que contenía una etiqueta de hexahistidina fusionado al extremo N-terminal de la proteína recombinante expresada. La expresión de la proteína fue inducida por adición de IPTG y purificada mediante cromatografía de afinidad con níquel (véase posteriormente).

Tabla 2. Iniciadores de oligonucleótidos (F = hacia adelante y R = marcha atrás) utilizados para la amplificación de las secuencias de nucleótidos que codifican PG32 y PG33 o porciones de estos genes. aa se refiere al número de aminoácido como se da en la SEC ID n° 3 para PG32 y en la SEC ID n° 4 para PG33.

SEC ID n°	Proteínas recombinantes	F/R	Iniciadores
5	PG32 (aa21-391)	F	5' CGCAGAATTCAGGAGAATACTGTACCGGCAACG 3'
6		R	5' CTATGCGGCCGCTTGGAGCGAACGATTACAACAC 3'
7	PG33 (aa22-380)	F	5' TGCAGAATTCGAAGAAGCTACTACACAGAACAAA 3'
8		R	5' CTATGCGGCCGCTTCCGCTGCAGTCATTACTACAA 3'
5	PG32 (aa21-223)	F	5' CGCAGAATTCAGGAGAATACTGTACCGGCAACG 3'
.9		R	5' TTTTGCGGCCGCCATCCCCTGGAATCCATT 3'
10	PG33 (aa22-212)	F	5' TGCAGAATTCGAAGAAGCTACTACACAGAACAAA 3'
11		R	5' TTTTGCGGCCGCCATTACAGGGAAGTCTGC 3'
12	PG32 (aa86-223)	F	5' TTTTGAATTCCTTTCTTTGCAACTCGT 3'
9		R	5' TTTTGCGGCCGCCATCCCCTGGAATCCATT 3'

ES 2 426 034 T3

13 11	PG33 (aa84-212)	F R	5' TTTTGAATTCCCTTATTTCCGGTACTCGT 3' 5' TTTTGCGGCCGCCATTACAGGGAAGTCTGC 3'
5 14	PG32 (aa21-152)	F R	5' CGCAGAATTCAGGAGAATACTGTACCGGCAACG 3' 5' AAAAGCGGCCGCTTTGTGTTGGTAGCCAAC 3'
10 15	PG33 (aa22-150)	F R	5' TGCAGAATTCGAAGAAGCTACTACACAGAACAAA 3' 5' AAAAGCGGCCGCGAATTTATAACCAAATCC 3'
16 17	PG32 (aa153-306)	F R	5' TTTTGAATTCTTCATCGGTAGCGAATGG 3' 5' TTTTGCGGCCGCCAATTGATCTTTGTCCAC 3'
18 19	PG33 (aa151-285)	F R	5' TTTTGAATTCCATAGCGAAAACGCCAA 3' 5' TTTTGCGGCCGCGATACGGAAGTAAACCAC 3'
20 21	PG32 (aa191-322)	F R	5' TTTTGAATTCGCTCACTCCAATCTCAAT 3' 5' AAAAGCGGCCGCTCGTTAGTTTCTTTTAC 3'
22 23	PG33 (aa193-310)	F R	5' TTTTGAATTCCTTGCCGAAAGATGAAC 3' 5' AAAAGCGGCCGCTGCGTTGTTGGTCTTCGC 3'
12 17	PG32 (aa86-306)	F R	5' TTTTGAATTCCTTTCTTTGCAACTCGT 3' 5' TTTTGCGGCCGCCAATTGATCTTTGTCCAC 3'
13 19	PG33 (aa84-285)	F R	5' TTTTGAATTCCTTATTTCCGGTACTCGT 3' 5' TTTTGCGGCCGCGATACGGAAGTAAACCAC 3'
12 21	PG32 (aa86-322)	F R	5' TTTTGAATTCCTTTCTTTGCAACTCGT 3' 5' AAAAGCGGCCGCTCGTTAGTTTCTTTTAC 3'
13 23	PG33 (aa84-310)	F R	5' TTTTGAATTCCTTATTTCCGGTACTCGT 3' 5' AAAAGCGGCCGCTGCGTTGTTGGTCTTCGC 3'
16 21	PG32 (aa153-322)	F R	5' TTTTGAATTCTTCATCGGTAGCGAATGG 3' 5' AAAAGCGGCCGCTCGTTAGTTTCTTTTAC 3'
18 23	PG33 (aa151-310)	F R	5' TTTTGAATTCCATAGCGAAAACGCCAA 3' 5' AAAAGCGGCCGCTGCGTTGTTGGTCTTCGC 3'
20 17	PG32 (aa191-306)	F R	5' TTTTGAATTCGCTCACTCCAATCTCAAT 3' 5' TTTTGCGGCCGCCAATTGATCTTTGTCCAC 3'
22 19	PG33 (aa193-285)	F R	5' TTTTGAATTCCTTGCCGAAAGATGAAC 3' 5' TTTTGCGGCCGCGATACGGAAGTAAACCAC 3'
24 6	PG32 (aa224-391)	F R	5' GATCGAATTCGCTACAGCAGGTCTTAATTTCC 3' 5' CTATGCGGCCGCTTGGAGCGAACGATTACAACAC 3'
25 8	PG33 (aa213-380)	F R	5' GATCGAATTCGCTACAGCAGGTCTAACGTTCAA 3' 5' CTATGCGGCCGCTTCCGCTGCAGTCATTACTACAA 3'
26 8	PG33 (aa286-380)	F R	5' GATCCGAATTCGAATAGTGCAAAGATTGAT 3' 5' CTATGCGGCCGCTTCCGCTGCAGTCATTACTACAA 3'
24 17	PG32 (aa224-306)	F R	5' GATCGAATTCGCTACAGCAGGTCTTAATTTCC 3' 5' TTTTGCGGCCGCCAATTGATCTTTGTCCAC 3'
25 19	PG33 (aa213-285)	F R	5' GATCGAATTCGCTACAGCAGGTCTAACGTTCAA 3' 5' TTTTGCGGCCGCGATACGGAAGTAAACCAC 3'
27	PG32 (aa281-384)	F	5' GATCGAATTCACTAAGACAGAAAATATACTGA 3'

28		R	5' TTTTGC GGCCGCACGATTCCAAGCTTTCTT 3'
29	PG33 (aa306-372)	F	5' GATCGAATTCAAGACCAACAACGCACCGATCA 3'
30		R	5' TTTTGC GGCCGCACGATTCCAAGCGTTCTC 3'

(b) La expresión de proteínas recombinantes en E. coli

Una única colonia transformante se utilizó para inocular 20 ml de caldo de Luria-Bertani (LB) que contenía 50 µg/ml de kanamicina, y se agitó a 37 °C durante la noche. Este inóculo se utilizó después para inocular 500 ml de caldo Terrific (que contenía fosfatos de potasio y 50 µg/ml de kanamicina), y se agitó a 37 °C hasta que la densidad óptica (DO600) fue de 2,0. El cultivo se indujo con IPTG 0,1 mM. Después de un período de inducción 1-4 horas a 30 °C o 37 °C, el cultivo se recogió por centrifugación a 4000 rpm durante 10 min a 4 °C, y el gránulo se almacenó a -70 °C para la determinación de la solubilidad de la proteína recombinante.

(c) Determinación de la solubilidad de las proteínas recombinantes

Los niveles de expresión y la solubilidad de las proteínas r-PG32 o r-PG33 o de sus truncamientos fueron evaluados seguidos de la inducción IPTG. Aproximadamente, 14 ml del cultivo recombinante de células de *E. coli* se granularon por centrifugación y se resuspendieron en 1,5 ml de TE a pH 8,0. Las células se sometieron después a sonicación de 2 X 10 ráfagas por segundo, usando una microsonda en un entorno de 5 (mediante un disruptor celular por ultrasonidos Virosonic Digital 475, The Virtis Company, Nueva York). Seguido de una centrifugación durante 15 minutos (13.000 rpm), se recogió el sobrenadante, que representa la fracción soluble. El gránulo se lavó y después se resuspendió en TE a pH 8,0, y esto representó la fracción insoluble. Se llevó a cabo el análisis de las diversas fracciones utilizando análisis de Western blot y SDS-PAGE. Los resultados de estos experimentos se muestran en la tabla 3. En algunos casos se añadieron detergentes no iónicos tales como NOG y CHAPS al 0,1-1% al proceso de sonicación para ayudar en la solubilización de la proteína recombinante. Para la expresión a gran escala y con fines de purificación, se granularon 500 ml de cultivos de *E. coli* por centrifugación y se resuspendieron en 40 ml de 1x tampón de unión (5 mM de imidazol, 500 nM de NaCl, 20 mM de Tris-HCl, a pH 7,9). Después, las células se sometieron a ultrasonidos de 6 X 10 ráfagas por segundo usando una microsonda (0,5") en un entorno de 8 (disruptor celular por ultrasonidos Virosonic Digital 475, The Virtis Company, Nueva York). Seguido de una centrifugación durante 15 minutos (13.000 rpm), el sobrenadante que contenía la proteína recombinante soluble se recogió purificado como se describe posteriormente.

(d) Aislamiento y solubilización de cuerpos de inclusión o proteínas recombinantes insolubles

Cuando se encontró que la r-proteína era insoluble, como en el caso de las enteras longitudes de PG32 (SEC ID nº 3; residuos 21-391) y de PG33 (SEC ID nº 4, los residuos 22 a 380), el gránulo de *E. coli* recombinante se descongeló en hielo y se resuspendió en tampón de unión, después se sometió a ultrasonidos y se centrifugó a 20.000 xg para recoger los cuerpos de inclusión. El gránulo se resuspendió en tampón de unión y se repitió dos veces más el proceso de sonicación y centrifugación para liberar proteína adicionalmente. El gránulo se resuspendió después en un tampón de unión que contenía urea 6 M y se incubó en hielo durante 2-3 h, agitando para disolver completamente las proteínas. Todo el material insoluble que quedaba se retiró centrifugando a 39.000 xg durante 20 min. El sobrenadante se filtró a través de una membrana de 0,45 µm antes de la purificación en columna.

(e) Purificación de ácido níquel-nitrilotriacético (Ni-NTA) y replegamiento de proteínas recombinantes

Se usó una cromatografía de afinidad de metal con Ni-NTA para purificar las proteínas recombinantes mediante la etiqueta H6. En resumen, las proteínas fueron lotes unidos a la resina de Ni-NTA equilibrada (Qiagen), que se vertió en una pequeña columna, y las proteínas no unidas se eluyeron por gravedad. Después, la columna se lavó con 10 ml de tampón de unión seguido de 6 ml de tampón de lavado (60 mM de imidazol, 500 mM de NaCl, 20 mM de Tris-HCl, a pH 7,9). Después, la proteína unida se eluyó en un tampón que contenía 1 M de imidazol, 500 mM de NaCl, 20 mM de Tris-HCl, a pH 7,9). Si se estaban purificando los cuerpos de inclusión solubilizados o la proteína recombinante insoluble, se añadían 6 M de urea a los tampones anteriormente mencionados.

(f) Renaturalización de la proteína recombinante

Para las preparaciones que no contenían urea, las fracciones de proteína eluidas de la resina de Ni-NTA se juntaron antes de la diálisis con 0,5 M de Tris-HCl y 50 mM de NaCl para retirar trazas de imidazol.

Para los preparados que contenían urea, las fracciones de proteína eluidas de la resina de Ni-NTA se juntaron y se replegaron mediante una diálisis escalonada de 6 M a 4 M a 2 M a 0,5 M a 0 M de urea contenida en el siguiente tampón: 50 mM de Tris-HCl, 0,5 M de NaCl y 8% de glicerol. Se llevó a cabo la diálisis durante un mínimo de 2 horas en cada concentración diferente de urea. Se añadieron también diversos detergentes al tampón de diálisis, en algunos casos para mejorar la solubilidad, tales como 0,5-1% de NOG o 0,5% -1% de CHAPS.

(g) Electroforesis en gel de poliacrilamida y realización de Western blot

La electroforesis SDS-PAGE se realizó esencialmente como se recomienda en Novex. Las muestras se mezclaron con un volumen igual de 2 x tampón de muestra de reducción (Novex), se hirvió durante 10 min a 100 °C y se aplicó a geles de Tris-glicina 4-20% (Novex). Los estándares de peso molecular (SeeBlue™) también se adquirieron en Novex. Se prepararon resultados de Western blot mediante proteínas de electrotransferencia sobre nitrocelulosa durante 1 hora a 100 voltios seguido de electroforesis. Las membranas se bloquearon en PBS con 5% de leche desnatada antes de la incubación con anticuerpo anti-conejo diluido a 1/5000 o con anticuerpo anti-rata diluido a 1/1000 en PBS con 5% de leche desnatada. Más tarde, las membranas se lavaron y se incubaron con un anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado con HRP (KPL) o un anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con HRP (KPL), se lavaron y se desarrollaron con sustrato TMB con peroxidasa de membrana (KPL).

**Ejemplo 2: Antisueros**

Se generó un antisuero policlonal para las proteínas recombinantes purificadas mediante dosificación BALB/c de ratones con 2 x 20 µg de la proteína recombinante PG32 (constructo 21) en adyuvante incompleto de Freund (FIA, Sigma) con tres semanas de diferencia. Los ratones se sangraron una semana después de la segunda dosis, y el antisuero generado se utilizó para cribar los resultados de Western blot de células enteras de *P. gingivalis* W50 realizadas bajo condiciones reductoras y de desnaturalización. También se generaron antisueros en conejos mediante inmunización con 3 dosis de células enteras de *P. gingivalis* (cepa W50) o de fracciones insolubles enriquecidas con Sarkosyl (un método que enriquece las proteínas de la membrana externa de los organismos gram negativos) de *P. gingivalis* (cepa W50) en FIA. También se generaron antisueros en ratas seguido de inmunización con células enteras de *P. gingivalis* W50 en adyuvante incompleto de Freund. Las ratas fueron después expuestas por vía oral a células vivas de *P. gingivalis* (cepa ATCC 33277) y se sangraron 6 semanas más tarde. Estas ratas, más tarde, demostraron estar protegidas de la pérdida ósea alveolar alrededor de los dientes molares tras la exposición en comparación con las ratas de control.

Tabla 3. Determinación de la solubilidad, de los niveles de expresión y de la reactividad a Western blot con proteínas recombinantes PG32 y PG33 y sus fragmentos.

Nº	Construcción en pET24a(+)	Nivel de expresión*	Tamaño de proteína (kDa)	% Solubilidad	Reactividad a Western blot **			
					Etiqueta de 6xHis	Ser humano	Rata	Conejo
1	PG32 (aa21-391)	++	43,8	Insoluble	+	-	+	+
2	PG33 (aa22-380)	+	43	Insoluble	+	-	+	+
3	PG32 (aa21-223)	++	22,6	Insoluble	+	-	-	-
4	PG33 (aa22-212)	+++	21,2	Insoluble	+	-	-	-
5	PG32 (aa86-223)	++++	15,4	10%	+	-	-	+/-
6	PG33 (aa84-212)	+	14,3	Insoluble	+	-	-	+
7	PG32 (aa21-152)	+	14,6	Insoluble	+	-	-	+
8	PG33 (aa22-150)	+++++	14,3	Insoluble	+	-	-	-
9	PG32 (aa153-306)	++	17,2	Insoluble	+	-	-	+
10	PG33(aa151-285)	+	15	Insoluble	+	-	-	+
11	PG32 (aa191-322)	+++++	14,6	10%	+	-	-	+/-
12	PG33 (aa193-310)	+++	10,9	<5%	+	-	+/-	+
13	PG32 (aa86-306)	+++++	24,6	Insoluble	+	-	+/-	+
14	PG33 (aa84-285)	+++	22,4	Insoluble	+	-	-	+
15	PG32 (aa86-322)	++++	26,3	Insoluble	+	-	+/-	+
16	PG33 (aa84-310)	++++	25,2	Insoluble	+	-	+/-	+
17	PG32 (aa153-322)	+	18,4	Insoluble	+	-	-	-
18	PG33 (aa151-310)	++++	17,7	Insoluble	+	-	+/-	+
19	PG32 (aa191-306)	++++	13	<5%	+	-	-	+
20	PG33 (aa193-285)	+++++	8,1	Insoluble	+	-	+/-	+
21	PG32 (aa224-391)	+++++	18,5	10-15%	+	-	+	+

22	PG33 (aa213-380)	+++++	18,6	10-15%	+	-	+	+
23	PG33 (aa286-380)	+++	10,5	<5%	+	-	-	+
24	PG32 (aa224-306)	+++	9,3	20%	+	-	-	+/-
25	PG33 (aa213-285)	+++	8,1	<5%	+	-	-	+
26	PG32 (aa281-384)	+++++	11,4	50%	+	-	-	+
27	PG33 (aa306-372)	++	7,3	10%	+	-	-	-

\* Niveles de expresión: + = nivel bajo ++++++ = niveles extremadamente altos de expresión

\*\* Reactividad a Western blot: +/- = nivel bajo de reactividad + = reactividad claramente positiva

### Ejemplo 3: modelo murino de lesión

5 Grupos de 10 ratones BALB/c hembra (6-8 semanas de edad) fueron inmunizados (20 µg/dosis) por vía subcutánea con cada proteína recombinante, PG32 (Construcción 1, en 0,5 M de urea), PG33 (Construcción 2, en 2 M de urea), fragmento de PG32 (Construcción 21) y fragmento de PG33 (Construcción 22). A los ratones de control se les dieron  
 10 células muertas de *P. gingivalis* con formalina (aproximadamente  $2 \times 10^9$ ) o lisado de *E. coli* (20 µg/dosis); todo emulsionado en adyuvante incompleto de Freund (Sigma). Las inmunizaciones se dieron por vía subcutánea en la base de la cola, y se produjeron cuatro semanas y una semana antes de la exposición a *P. gingivalis*. Dos días antes de la exposición, los ratones se sangraron del plexo retrobulbar. Los ratones BALB/c fueron expuestos a  $7,5 \times 10^9$  células viables de *P. gingivalis* 33277, por vía subcutánea, en la región ventral de la abdomen. Tras la  
 15 exposición, los ratones fueron examinados diariamente del número y del tamaño de las lesiones durante un periodo de siete días. Se midieron diariamente las lesiones desarrolladas en el abdomen de los ratones en torno al sitio de la inyección y otras lesiones.

La figura 1 muestra los resultados de 3 experimentos separados en los que la entera longitud r-PG32 (Construcción 1; aa21-391 en 0,5 M de urea), véase la figura 1a, y la entera longitud r-PG33 (Construcción 2; aa22-380 en urea 2  
 20 M), véase la figura 1b, se usaron para inmunizar ratones y se compararon con los fragmentos de r-PG32 (Construcción 21; aa224-391 en PBS) y de r-PG33 (Construcción 22; aa213-380 en PBS), véase la figura 1c. A los ratones de control se les dieron células enteras muertas de la cepa 33277 de *P. gingivalis* con formalina (FK 33277) o lisado completo de *E. coli* (*E. coli*). Se obtuvieron reducciones significativas en el tamaño de la lesión sólo con el uso de la vacunación con células enteras muertas de *P. gingivalis* con formalina (cepa 33277) y los fragmentos de r-  
 25 PG32 (Construcción 21; aa 224-391 en PBS, p <0,01) y de r-PG33 (Construcción 22; aa 213-380 en PBS, p <0,05).

### Ejemplo 4: Expresión de PG32 (aa224-391) en la levadura

30 *Clonación de fragmento PG32 (aa224-391)*. PG32 (Construcción 21) se amplificó por PCR y se extrajo como se describe en el ejemplo 1. El ADN purificado se ligó en GST purificado en QIAEXII al vector de expresión de levadura pYEX4T-1 (Amrad), que había sido previamente digerido con *EcoRI* y *NotI*. El producto de ligación se transformó en *E. coli* BL21 DE3 competente de calcio (Stratagene) y se seleccionó en placas LB que contenían 50 µg de ampicilina. Una única colonia de células de *E. coli* que contenía el plásmido recombinante se inoculó en un cultivo de 100 ml que contenía caldo Terrific conteniendo ampicilina durante la noche, y el plásmido se purificó con un equipo  
 35 QIAGEN Maxi Plasmid antes de ser transformado en levadura.

40 *Transformación de la levadura*. Una muestra de *S. cerevisiae* DY150 almacenada en glicerol se extendió sobre una placa de YPD y se colocó a 30 °C durante 3-4 días. Una única colonia se inoculó en 20 ml de medio YPD y se agitó a 30 °C durante 24 horas. Un volumen de 500µl del cultivo de la noche se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min y el gránulo DY150 se lavó en 1 ml de dH<sub>2</sub>O. El gránulo se resuspendió en 10 mg/ml de ADN de timo de ternera (Sigma), al que se añadió 1 µg de ADN plásmido junto con 500 µl de la solución de la placa, y la mezcla se incubó a 25 °C durante 24 horas. Las células se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 min y la solución de la placa se retiró. La levadura se lavó en 1 ml de dH<sub>2</sub>O, se colocó en una placa YNBS y se incubó a 30 °C durante 4-5 días.

45 *Expresión a pequeña escala en la levadura*. Se utilizó una única colonia transformante para inocular 5 ml de caldo YNBS y se agitó a 30 °C durante 48 horas. Un inóculo de 0,5 ml se añadió a 5 ml de caldo fresco YNBS y se indujo con 0,5 mM de CuSO<sub>4</sub>. Después de un periodo de inducción de 3 horas a 30 °C, el cultivo se recogió por centrifugación y se resuspendió en tampón de ruptura 500 µl (que contenía PMSF 1 mM y E-64 10 mM, Sigma). Un vial de tapón de rosca de 2,0 ml (Biospec) se llenó tres cuartos de su capacidad con perlas de vidrio de 0,5 mm  
 50 (Biospec) y el volumen vial restante se llenó con células. La mezcla se homogeneizó en un disruptor celular de minibatidora de cuenta (Biospec) para 8 x 30 s (a 5.000 rpm) con una incubación de 30 segundos en hielo entre las batidas. Las perlas se dejaron reposar y se recuperaron las células rotas de levadura. Seguido de la centrifugación durante 5 minutos (3000 g), se recogió el sobrenadante y se tomó nota de la fracción soluble. El gránulo se resuspendió en tampón de ruptura para producir la fracción insoluble. Las fracciones se analizaron usando análisis  
 55 SDS-PAGE y Western blot.

Los resultados de la expresión en la levadura del fragmento PG32 (aa224-391) se muestran en las figuras 2a y 2b. La línea 1 en ambas figuras contiene marcadores de peso molecular pre-teñidos (Novex, SeeBlue), mientras que la línea 2 contiene sobrenadante de levadura recombinante alterada que expresa sólo GST. Las líneas 3-7 representan clones individuales expandidos de células alteradas de levadura que contienen GST fusionado con el gen PG32 (aa224-391), sin (línea 3) y con el gen PG32 optimizado para el uso de codones de levadura (líneas 4-7, véase el ejemplo 5). Obsérvese que la reactividad se ve sólo en la posición del GST solo (véase la flecha de línea 2, figura 2<sup>a</sup>, en aproximadamente 27.5kDa) cuando la membrana se sondeó con anti-GST, en comparación con la banda dominante de mayor peso molecular vista cuando el GST se fusionó con PG32 (aa224-391), líneas 3-7 (véase la flecha en aproximadamente 48 kDa de la figura 2a). Cuando el resultado de Western blot se hizo reaccionar con el antisuero anti-PG32 (véase la figura 2b) no se vio reactividad alguna en la levadura que expresa el GST solo (línea 2) pero se vio una fuerte reactividad en aproximadamente 46-48kDa (véase la flecha) con algo de reactividad con otras bandas. El peso molecular previsto para la proteína de fusión era aproximadamente 46kDa, y esto corresponde a la banda de fuerte tinción en las líneas 3-7 (indicada con la flecha en la figura 2b).

**15 Ejemplo 5: Construcción y clonación de PG32 (aa224-391) sintética para la expresión óptima de la proteína en la levadura**

Se construyó un gen sintético de PG32 truncada (correspondiente a PG32 aa224-391) utilizando el uso de un codon previsto de *S. cerevisiae* para mejorar la expresión de la proteína *P. gingivalis* en *S. cerevisiae*. Los oligonucleótidos que cubrirían toda la secuencia de ADN de doble cadena, como se listan en la tabla 4, fueron diseñados con codones de alta predisposición de expresión para expresión en levaduras (Sharp, P.M., y Cole, E. (1991) Yeast. 7, 657-678). Los iniciadores A y B de oligonucleótidos se convirtieron a un fragmento de ADN de doble cadena por PCR con de ADN polimerasa de precisión TaqPlus (Stratagene) usando las siguientes condiciones: 20 ciclos de desnaturalización (96 °C, 1 min), recocido (53 °C, 1 min) y extensión (72 °C, 2 min), con la duración del paso de extensión aumentado en 5 segundos en cada ciclo (Di Donato, A., de Nigris, M., Russo, N., Di Biase, S., y D'Alessio, G. (1993) Analytical Biochemistry. 212, 291-293). Una parte alícuota 1/20 de la mezcla del núcleo se usó en una segunda realización PCR con iniciadores C y D de oligonucleótidos, funcionando para alargar la plantilla de núcleo. El procedimiento se repitió con cada par de iniciadores hasta que se generó un producto de 500 bp. Este producto de PCR se trató con proteinasa K (Boehringer Mannheim), se purificó usando el equipo de purificación QIAquick de PCR (Qiagen) y se digirió en los sitios *EcoRI* y *NotI* de enzimas de restricción introducidos por el iniciador. El fragmento de ADN se purificó mediante electroforesis a través de un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1% (Bio-Rad) y se extrajo usando el equipo de extracción en gel QiaexII (Qiagen). El ADN purificado se ligó en GST purificado en QIAEXII al vector de expresión de levadura pYEX4T-1 (Amrad), que había sido previamente digerido con *EcoRI* y *NotI*. Los productos de ligación se transformaron *E. coli* BL21 DE3 competente de calcio (Stratagene) y se seleccionaron en placas LB que contenían 50 µg de ampicilina. La integridad del codon inserto reemplazado se confirmó mediante análisis de secuencia de ADN. La transformación de la levadura y la expresión de PG32 se realizaron como se describió anteriormente. La figura 2 muestra la expresión y la inmunoreactividad de la PG32 (aa224-391) sintética expresada en la levadura fusionada con GST. En las figuras 2a y 2b, la línea 3 contiene los codones no modificados de *P. gingivalis* expresados en la levadura, y las líneas 4, 5, 6 y 7 contienen los clones que han tenido sus codones optimizados para la expresión en la levadura como se describió anteriormente. Parece haber cierta expresión e inmunoreactividad mejoradas cuando se emprendió la optimización de codón, como se evidencia por el aumento de la reactividad en las bandas a aproximadamente 48kD (véanse las flechas), especialmente cuando se usó el antisuero para PG32 (figura 2b).

45 Tabla 4. Múltiples iniciadores de oligonucleótidos superpuestos usados para la generación de ADN de PG32C reemplazado con codon de alta predisposición de expresión.

Oligonucleótidos para PG32-C sintética

Oligonucleótido	Secuencia de ADN (5'→3')	SEC ID nº
	Superposición AC	
A (62-mer)	<u>GGCTGTTTTGTT</u> CAGATTTCGATTCTCACGTTGTT	31
	GATAA <u>GGATCAATTGATTA</u> ACTTGTACG	32
	Superposición AB	
	Superposición BD	
B (57-mer)	<u>GGTTCGTTAGTTT</u> CCTTAACGAATTGAGCAACA	33
	TCGTACAAGTTAATCAATTGATCC	34
	Superposición BA	



ES 2 426 034 T3

	Superposición CE	
C (62-mer)	<u>CCAGAAGTTACTCCAGTTACTAAGACTGAAAA</u>	35
	<u>CATTTTGGACTGAAAAGGCTGTTTTGTTTCAG</u>	36
	Superposición CA	
	Superposición DF	
D (61-mer)	<u>GTATTGAGTGTTACCAGTTGGATCAGCGTAACC</u>	37
	<u>AACAACAGTAATTGGTTCGTTAGTTTCC</u>	38
	Superposición DB	
	Superposición EG	
E (60-mer)	<u>GAAGTTGAAGAATTGTCTAAGAGACCAGTTTCT</u>	39
	<u>TGTCCAGAATGTCCAGAAGTTACTCCA</u>	40
	Superposición EC	
	Superposición FH	
F (62-mer)	<u>AACATCAACAACAGCCTTAGCTCTTCTTTCAGA</u>	41
	<u>CAACTTTTCGTTGTATTGAGTGTTACCAG</u>	42
	Superposición FD	
	Superposición GI	
G (64-mer)	<u>CGCTTTGATTAACGATTTGAACGGTCAAATTA</u>	43
	<u>CAGATTGAGATCTGAAGTTGAAGAATTGTCT</u>	44
	Superposición GE	
	Superposición HJ	
H (64-mer)	<u>CCATTCAACAGAAATCAATTCAGATGGAACAC</u>	45
	<u>CGTACTTACCAGTCAAAACATCAACAACAGCC</u>	46
	Superposición HF	
	Superposición IK	
I (54-mer)	<u>GTGCTGTTGGTTTCAACGCTATTGAACCAATGG</u>	47
	<u>ATTACGCTTTGATTAACGATT</u>	48
	Superposición IG	
	Superposición JL	
J (55-mer)	<u>CAAGCCTTCTTAGAGAATGGTTGAGTAGAATCA</u>	49
	<u>CCCTTCCATTCAACAGAAATCA</u>	50
	Superposición JH	

	<i>EcoRI</i>	
K (54-mer)	GATCGAATTCGCTACTGCTGGTTTGAACCTCAG	51
	ATTGGGTGCTGTTGGTTTCAA	52
	Superposición KI	
	<i>NotI</i>	
L (55-mer)	CTATGCGGCCGCTTAGATCTAACAAATAACAAC	53
	TCTGTTCCAAGCCTTCTTAGAGA	54
	Superposición LJ	

**Lista de secuencias**

- <110> CSL Limitado
- 5 <120> Proteínas recombinantes y truncamientos de *Porphyromonas gingivalis*
- <130> P34581EP-K/NJL
- <140> EP01925217.0
- <141> 2001-04-27
- <150> AU PQ 7182
- 10 <151> 2000-04-28
- <160> 54
- <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1
- <211> 1173
- 15 <212> ADN
- <213> *Porphyromonas gingivalis*
- <400> 1
- atgaaggtaa agtacttaat gctcacattg gttggagcaa ttgactgaa cgcaagtgca 60
- caggagaata ctgtaccggc aacgggtcag ttaccgcgta agaatgttg ttttgctcgc 120
- aataaagcag gcagcaattg gtttgtaaca ctgcaaggcg gtggtgcagc gcagttcctc 180
- aatgacaaca acaacaaaga cctcatggac cgcttaggag ccatagggtc tctttctgct 240
- ggaaagtatc acagcccttt ctttgcaact cgtttgcaaa ttaacggagg tcaagcccac 300
- actttcctcg gaaaaaatgg cgaacaagaa atcaacacca attttggtgc agctcacttc 360
- gactttatgt ttgatgtggt taactacttt gcaccatatt gcgaaaaatcg tttcttccat 420
- ttaattccat gggtagggtg tggctaccaa cacaaattca tccgtagcga atggagcaaa 480
- gacaatgtgg aatcactgac ggccaatgta ggagttatga tggctttcag attaggaaag 540
- cgagtagact ttgtgatcga agcacaagca gctcactcca atctcaatct aagtcgcgca 600
- tacaatgcca agaaaactcc cgtattcgaa gatcccgcag gacgttatta caatggattc 660
- caggggatgg ctacagcagg tcttaatttc cgctggggag ccgtaggctt caatgccatt 720
- gaaccaatgg actacgcact tatcaatgat ctgaatggtc agattaaccg tttgcgagc 780
- gaggtcgaag aactcctaaa acgtcctgta tcatgccccg aatgtcctga agtaactcct 840
- gttactaaga cagaaaatat actgacggaa aaagctgtac tgttccggtt cgacagccac 900
- gttggtggaca aagatcaatt gatcaacctg tatgacgtag ctcagtttgt aaaagaaact 960
- aacgagccga ttaccgttgt tggttatgct gatcctacgg gtaatactca atacaacgag 1020
- aaattgtctg agcgtcgggc taaagccgtt gttgatgttc tgacaggtaa atatggtgtg 1080
- ccttcggaat taatctctgt agaatggaag ggcgactcta cgcaaccgtt cagcaagaaa 1140
- gcttggaatc gtgttgaat cgttcgctcc aag 1173
- <210> 2
- 20 <211> 1140
- <212> ADN
- <213> *Porphyromonas gingivalis*
- <400> 2

ES 2 426 034 T3

atgaaagcta	aatctttatt	attagcactt	gcgggtctcg	catgcacatt	cagtgaaca	60
gcccagaag	ctactacaca	gaacaaagca	gggatgcaca	ccgcattcca	acgtgataag	120
gcctccgatc	attggttcat	tgacattgca	gggtggagcag	gtatggctct	ctcgggatgg	180
aataatgatg	tagactttgt	agatcgtcta	agtatcgttc	ctactttcgg	tatcggtaaa	240
tggcatgagc	cttatttcgg	tactcgtctc	caattcacag	gattcgacat	ctatggattc	300
ccgcaagggg	gcaaggagcg	taaccacaat	tactttggaa	acgccacact	tgacttcatg	360
ttcgatctga	cgaactatit	cggtgtatac	cgtcccaatc	gtgtcttcca	tatcatccca	420
tgggcaggta	taggatttgg	ttataaatc	catagcgaag	acgccaatgg	tgaaaaagta	480
ggaagttaaag	atgatatgac	cggaacagtt	aatgtcggtt	tgatgctgaa	attccgccta	540
tcaagagtcg	tagacttcaa	tattgaagga	caagcttttg	ccggaagat	gaactttatc	600
gggacaaga	gaggaaaagc	agacttccct	gtaatggcta	cagcaggct	aacgttcaac	660
cttggcaaga	cagagtggac	agaaattggt	cctatggact	atgctttggt	caatgacctg	720
aacaaccaa	tcaactcact	tcgcggtcaa	gtggaagagt	tgagccgctg	tcctgtttca	780
tgccctgaat	gccctgagcc	tacacagcct	acagttactc	gtgtagctgt	tgacaatgtg	840
gtttacttcc	gtatcaatag	tgcaaagatt	gatcgtaatc	aagaaatcaa	tgtttacaat	900
acagctgaat	atgcgaagac	caacaacgca	ccgatcaagg	tagtaggta	cgctgacgaa	960
aaaaccggta	ctgcggccta	taacatgaag	ctttcagagc	gtcgtgcaaa	agcggtagcc	1020
aagatgcttg	aaaagtatgg	tgtttctgcg	gatcgatta	caattgaatg	gaagggctca	1080
tcagagcaaa	tctatgaaga	gaacgcttgg	aatcgattg	tagtaatgac	tcagcggaa	1140

<210> 3

5 <211> 391

<212> PRT

<213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 3

ES 2 426 034 T3

Met Lys Val Lys Tyr Leu Met Leu Thr Leu Val Gly Ala Ile Ala Leu  
 1 5 10 15  
 Asn Ala Ser Ala Gln Glu Asn Thr Val Pro Ala Thr Gly Gln Leu Pro  
 20 25 30  
 Ala Lys Asn Val Ala Phe Ala Arg Asn Lys Ala Gly Ser Asn Trp Phe  
 35 40 45  
 Val Thr Leu Gln Gly Gly Val Ala Ala Gln Phe Leu Asn Asp Asn Asn  
 50 55 60  
 Asn Lys Asp Leu Met Asp Arg Leu Gly Ala Ile Gly Ser Leu Ser Val  
 65 70 75 80  
 Gly Lys Tyr His Ser Pro Phe Phe Ala Thr Arg Leu Gln Ile Asn Gly  
 85 90 95  
 Gly Gln Ala His Thr Phe Leu Gly Lys Asn Gly Glu Gln Glu Ile Asn  
 100 105 110  
 Thr Asn Phe Gly Ala Ala His Phe Asp Phe Met Phe Asp Val Val Asn  
 115 120 125  
 Tyr Phe Ala Pro Tyr Arg Glu Asn Arg Phe Phe His Leu Ile Pro Trp  
 130 135 140  
 Val Gly Val Gly Tyr Gln His Lys Phe Ile Gly Ser Glu Trp Ser Lys  
 145 150 155 160  
 Asp Asn Val Glu Ser Leu Thr Ala Asn Val Gly Val Met Met Ala Phe  
 165 170 175  
 Arg Leu Gly Lys Arg Val Asp Phe Val Ile Glu Ala Gln Ala Ala His  
 180 185 190  
 Ser Asn Leu Asn Leu Ser Arg Ala Tyr Asn Ala Lys Lys Thr Pro Val  
 195 200 205  
 Phe Glu Asp Pro Ala Gly Arg Tyr Tyr Asn Gly Phe Gln Gly Met Ala  
 210 215 220  
 Thr Ala Gly Leu Asn Phe Arg Leu Gly Ala Val Gly Phe Asn Ala Ile  
 225 230 235 240  
 Glu Pro Met Asp Tyr Ala Leu Ile Asn Asp Leu Asn Gly Gln Ile Asn  
 245 250 255  
 Arg Leu Arg Ser Glu Val Glu Glu Leu Ser Lys Arg Pro Val Ser Cys  
 260 265 270  
 Pro Glu Cys Pro Glu Val Thr Pro Val Thr Lys Thr Glu Asn Ile Leu  
 275 280 285  
 Thr Glu Lys Ala Val Leu Phe Arg Phe Asp Ser His Val Val Asp Lys  
 290 295 300  
 Asp Gln Leu Ile Asn Leu Tyr Asp Val Ala Gln Phe Val Lys Glu Thr  
 305 310 315 320  
 Asn Glu Pro Ile Thr Val Val Gly Tyr Ala Asp Pro Thr Gly Asn Thr  
 325 330 335  
 Gln Tyr Asn Glu Lys Leu Ser Glu Arg Arg Ala Lys Ala Val Val Asp  
 340 345 350  
 Val Leu Thr Gly Lys Tyr Gly Val Pro Ser Glu Leu Ile Ser Val Glu  
 355 360 365  
 Trp Lys Gly Asp Ser Thr Gln Pro Phe Ser Lys Lys Ala Trp Asn Arg  
 370 375 380  
 Val Val Ile Val Arg Ser Lys  
 385 390

5 <210> 4  
 <211> 380  
 <212> PRT  
 <213> *Porphyromonas gingivalis*

ES 2 426 034 T3

<400> 4  
Met<sub>1</sub> Lys Ala Lys Ser<sub>5</sub> Leu Leu Leu Ala Leu<sub>10</sub> Ala Gly Leu Ala Cys<sub>15</sub> Thr  
Phe Ser Ala Thr<sub>20</sub> Ala Gln Glu Ala Thr<sub>25</sub> Thr Gln Asn Lys Ala<sub>30</sub> Gly Met  
His Thr Ala<sub>35</sub> Phe Gln Arg Asp Lys<sub>40</sub> Ala Ser Asp His Trp<sub>45</sub> Phe Ile Asp  
Ile Ala<sub>50</sub> Gly Gly Ala Gly Met<sub>55</sub> Ala Leu Ser Gly Trp<sub>60</sub> Asn Asn Asp Val  
Asp Phe Val Asp Arg Leu<sub>70</sub> Ser Ile Val Pro Thr<sub>75</sub> Phe Gly Ile Gly Lys<sub>80</sub>  
Trp His Glu Pro Tyr<sub>85</sub> Phe Gly Thr Arg Leu<sub>90</sub> Gln Phe Thr Gly Phe<sub>95</sub> Asp  
Ile Tyr Gly Phe<sub>100</sub> Pro Gln Gly Ser Lys<sub>105</sub> Glu Arg Asn His Asn<sub>110</sub> Tyr Phe  
Gly Asn Ala<sub>115</sub> His Leu Asp Phe Met<sub>120</sub> Phe Asp Leu Thr Asn<sub>125</sub> Tyr Phe Gly  
Val Tyr Arg Pro Asn Arg Val<sub>135</sub> Phe His Ile Ile Pro<sub>140</sub> Trp Ala Gly Ile  
Gly Phe Gly Tyr Lys Phe<sub>150</sub> His Ser Glu Asn Ala<sub>155</sub> Asn Gly Glu Lys Val<sub>160</sub>  
Gly Ser Lys Asp Asp<sub>165</sub> Met Thr Gly Thr Val<sub>170</sub> Asn Val Gly Leu Met<sub>175</sub> Leu  
Lys Phe Arg Leu<sub>180</sub> Ser Arg Val Val Asp<sub>185</sub> Phe Asn Ile Glu Gly<sub>190</sub> Gln Ala  
Phe Ala Gly<sub>195</sub> Lys Met Asn Phe Ile<sub>200</sub> Gly Thr Lys Arg Gly<sub>205</sub> Lys Ala Asp  
Phe Pro Val Met Ala Thr Ala<sub>215</sub> Gly Leu Thr Phe Asn<sub>220</sub> Leu Gly Lys Thr  
Glu Trp Thr Glu Ile Val<sub>230</sub> Pro Met Asp Tyr Ala<sub>235</sub> Leu Val Asn Asp Leu<sub>240</sub>  
Asn Asn Gln Ile Asn<sub>245</sub> Ser Leu Arg Gly Gln<sub>250</sub> Val Glu Glu Leu Ser Arg<sub>255</sub>  
Arg Pro Val Ser<sub>260</sub> Cys Pro Glu Cys Pro<sub>265</sub> Glu Pro Thr Gln Pro<sub>270</sub> Thr Val  
Thr Arg Val<sub>275</sub> Val Val Asp Asn Val<sub>280</sub> Val Tyr Phe Arg Ile<sub>285</sub> Asn Ser Ala  
Lys Ile Asp Arg Asn Gln Glu<sub>295</sub> Ile Asn Val Tyr Asn<sub>300</sub> Thr Ala Glu Tyr  
Ala Lys Thr Asn Asn Ala<sub>310</sub> Pro Ile Lys Val Val<sub>315</sub> Gly Tyr Ala Asp Glu<sub>320</sub>  
Lys Thr Gly Thr Ala<sub>325</sub> Ala Tyr Asn Met Lys<sub>330</sub> Leu Ser Glu Arg Arg Ala<sub>335</sub>  
Lys Ala Val Ala<sub>340</sub> Lys Met Leu Glu Lys<sub>345</sub> Tyr Gly Val Ser Ala<sub>350</sub> Asp Arg  
Ile Thr Ile Glu Trp Lys Gly Ser<sub>360</sub> Ser Glu Gln Ile Tyr<sub>365</sub> Glu Glu Asn  
Ala Trp Asn Arg Ile Val Val<sub>375</sub> Met Thr Ala Ala Glu<sub>380</sub>

5 <210> 5  
<211> 34  
<212> ADN  
<213> *Porphyromonas gingivalis*  
<400> 5

10 cgcagaattc caggagaata ctgtaccggc aacg 34

<210> 6  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> *Porphyromonas gingivalis*  
 5 <400> 6  
 ctatgcggcc gccttgagc gaacgattac aacac 35  
 <210> 7  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 10 <213> *Porphyromonas gingivalis*  
 <400> 7  
 tgcagaattc caagaagcta ctacacagaa caaa 34  
 <210> 8  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 15 <213> *Porphyromonas gingivalis*  
 <400> 8  
 ctatgcggcc gctccgctg cagtcattac ttacaa 36  
 <210> 9  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 20 <213> *Porphyromonas gingivalis*  
 <400> 9  
 ttttgcggcc gccatcccct ggaatccatt 30  
 25 <210> 10  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> *Porphyromonas gingivalis*  
 <400> 10  
 30 tgcagaattc caagaagcta ctacacagaa caaa 34  
 <210> 11  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> *Porphyromonas gingivalis*  
 35 <400> 11  
 ttttgcggcc gccattacag ggaagtctgc 30  
 <210> 12  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 40 <213> *Porphyromonas gingivalis*  
 <400> 12  
 ttttgaattc cctttcttg caactcgt 28  
 <210> 13  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 45 <213> *Porphyromonas gingivalis*  
 <400> 13  
 ttttgaattc ccttattcg gtactcgt 28  
 <210> 14  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 50 <213> *Porphyromonas gingivalis*  
 <400> 14  
 aaaagcggcc gctttgtgtt gtagccaac 30  
 55 <210> 15  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> *Porphyromonas gingivalis*  
 <400> 15  
 60 aaaagcggcc gcgaatttat aaccaaattc 30  
 <210> 16  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> *Porphyromonas gingivalis*  
 65 <400> 16  
 ttttgaattc tcatcggtg gcgaatgg 28

<210> 17  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> *Porphyromonas gingivalis*  
 5 <400> 17  
 ttttgccggcc gcccaattgat ctttgtcca 29  
 <210> 18  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 10 <213> *Porphyromonas gingivalis*  
 <400> 18  
 ttttgaattc catagcgaaa acgccaa 27  
 <210> 19  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 15 <213> *Porphyromonas gingivalis*  
 <400> 19  
 ttttgccggcc gcgatacggga agtaaaccac 30  
 <210> 20  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 20 <213> *Porphyromonas gingivalis*  
 <400> 20  
 ttttgaattc gctcactcca atctcaat 28  
 25 <210> 21  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> *Porphyromonas gingivalis*  
 <400> 21  
 30 aaaagcggcc gcctcgtag tttctttac 30  
 <210> 22  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> *Porphyromonas gingivalis*  
 35 <400> 22  
 ttttgaattc ttgcccggaa agatgaac 28  
 <210> 23  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 40 <213> *Porphyromonas gingivalis*  
 <400> 23  
 aaaagcggcc gctgcgtgt tggcttcgc 30  
 <210> 24  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 45 <213> *Porphyromonas gingivalis*  
 <400> 24  
 gatcgaattc gctacagcag gtcttaatt cc 32  
 <210> 25  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> *Porphyromonas gingivalis*  
 50 <400> 25  
 gatcgaattc gctacagcag gtctaactt caa 33  
 <210> 26  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> *Porphyromonas gingivalis*  
 <400> 26  
 60 gatccgaatt cgaatagtc aaagattgat 30  
 <210> 27  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> *Porphyromonas gingivalis*  
 65 <400> 27  
 gatcgaattc actaagacag aaaatatact ga 32

<210> 28  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> *Porphyromonas gingivalis*  
 5 <400> 28  
 ttttgcggcc gcacgattcc aagctttctt 30  
 <210> 29  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 10 <213> *Porphyromonas gingivalis*  
 <400> 29  
 gatcgaattc aagaccaaca acgcaccgat ca 32  
 <210> 30  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 15 <213> *Porphyromonas gingivalis*  
 <400> 30  
 ttttgcggcc gcacgattcc aagcgtctc 30  
 <210> 31  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos  
 25 <400> 31  
 ggctgtttg ttcagattcg atttcacgt tgtt 34  
 <210> 32  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos  
 <400> 32  
 gataaggatc aattgattaa cttgtacg 28  
 35 <210> 33  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos  
 40 <400> 33  
 ggttcgttag tttcctaac gaattgagca aca 33  
 <210> 34  
 <211> 24  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos  
 <400> 34  
 50 tcgtacaagt taatcaattg atcc 24  
 <210> 35  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 55 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos  
 <400> 35  
 ccagaagta ctccaggtag taagactgaa aa 32  
 <210> 36  
 60 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos  
 65 <400> 36  
 cattttgact gaaaaggctg tttgttcag 30



<210> 37  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos  
 <400> 37  
 gtattgagtg ttaccagttg gatcagcgta acc 33  
 <210> 38  
 10 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos  
 15 <400> 38  
 aacaacagta attggtcgt tagtttcc 28  
 <210> 39  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos  
 <400> 39  
 gaagttgaag aattgtctaa gagaccagtt tct 33  
 25 <210> 40  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 30 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos  
 <400> 40  
 tgtccagaat gtccagaagt tactcca 27  
 <210> 41  
 <211> 33  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos  
 <400> 41  
 40 aacatcaaca acagccttag ctcttcttc aga 33  
 <210> 42  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 45 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos  
 <400> 42  
 caacttttcg ttgtattgag tgttaccag 29  
 <210> 43  
 50 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos  
 55 <400> 43  
 cgcttgatt aacgattga acggtcaaat taa 33  
 <210> 44  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 60 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos  
 <400> 44  
 cagattgaga tctgaagttg aagaattgc t 31  
 65 <210> 45  
 <211> 32

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos  
 5 <400> 45  
 ccattcaaca gaaatcaatt cagatggaac ac 32  
 <210> 46  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos  
 <400> 46  
 cgtacttacc agtcaaaaca tcaacaacag cc 32  
 15 <210> 47  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 20 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos  
 <400> 47  
 gtgctgttg tttcaacgct attgaaccaa tgg 33  
 <210> 48  
 <211> 21  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos  
 <400> 48  
 30 attacgcttt gattaacgat t 21  
 <210> 49  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 35 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos  
 <400> 49  
 caagccttct tagagaatgg ttgagtagaa tca 33  
 <210> 50  
 40 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos  
 45 <400> 50  
 ccctccatt caacagaaat ca 22  
 <210> 51  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 50 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos  
 <400> 51  
 gatcgaattc gctactgctg gttgaact cag 33  
 55 <210> 52  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 60 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos  
 <400> 52  
 attgggtgct gttggttca a 21  
 <210> 53  
 <211> 32  
 65 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

## ES 2 426 034 T3

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos  
<400> 53  
ctatgCGGCC gcttagatct aacaataaca ac 32  
5 <210> 54  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
10 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótidos  
<400> 54  
tctgttcaa gccttcttag aga 23

## REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido soluble de *P. gingivalis* que consiste en un polipéptido que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consta de los residuos 86 a 223 de la SEC ID nº 3, los residuos 191-322 de la SEC ID nº 3, los residuos 224-391 de la SEC ID nº 3, los residuos 213-380 de la SEC ID nº 4, los residuos 224-306 de la SEC ID nº 3, y los residuos 281 a 384 de la SEC ID nº 3, o una variante de dicha secuencia que es capaz de generar una respuesta inmune contra *P. gingivalis*, en el que el polipéptido soluble no es una proteína de fusión de los residuos 192 a 290 de la adhesina r-Rgp44 de *P. gingivalis* vinculada a los residuos 286-380 de la SEC ID nº 4.
2. Una construcción quimérica o de fusión que comprende un polipéptido soluble de la reivindicación 1.
3. Una molécula aislada de ADN, comprendiendo la molécula de ADN una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido soluble de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2.
4. Un vector recombinante de expresión que comprende la molécula de ADN de la reivindicación 2, vinculado operativamente a un elemento regulador de la transcripción.
5. Una célula que comprende el vector recombinante de expresión de la reivindicación 4.
6. Un método para producir un polipéptido de *P. gingivalis*, que comprende cultivar la célula de la reivindicación 5 bajo condiciones que permitan la expresión del polipéptido.
7. Una composición para su uso en generar una respuesta inmune dirigida contra *P. gingivalis* en un sujeto, comprendiendo la composición una cantidad eficaz de al menos un polipéptido soluble de la reivindicación 1 y/o al menos una molécula de ADN de la reivindicación 3, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
8. Una composición según la reivindicación 7, en la que el vehículo farmacéuticamente aceptable es un adyuvante.
9. Una composición según la reivindicación 7 o la reivindicación 8, para su uso en la reducción o en la prevención de la incidencia o de la gravedad de la infección por *P. gingivalis* en un sujeto.
10. Un anticuerpo generado y dirigido contra un polipéptido soluble, consistiendo el polipéptido en una secuencia seleccionada del grupo que consta de los residuos 191-322 de la SEC ID nº 3, los residuos 224-391 de la SEC ID nº 3, los residuos 213-380 de la SEC ID nº 4, los residuos 224-306 de la SEC ID nº 3, y los residuos 281-384 de la SEC ID nº 3.
11. Un anticuerpo según la reivindicación 10, que es un anticuerpo monoclonal.
12. Un anticuerpo según la reivindicación 10, que es un anticuerpo policlonal.
13. Una composición que comprende el anticuerpo de las reivindicaciones 10, 11 o 12 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
14. Un anticuerpo según las reivindicaciones 10, 11 o 12, para su uso en el tratamiento o en la prevención de la infección por *P. gingivalis* en un sujeto, en el que el anticuerpo se genera y se dirige contra un polipéptido soluble que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consta de los residuos 224 a 391 de la SEC ID nº 3 y los residuos 213-380 de la SEC ID nº 4.
15. Un método de diagnóstico para detectar la presencia o ausencia de un polipéptido de *P. gingivalis* en una muestra, comprendiendo el método poner en contacto la muestra con el anticuerpo de la reivindicación 10, 11 o 12 bajo condiciones suficientes para que el anticuerpo forme un complejo inmune con un polipéptido de *P. gingivalis* de la muestra, y detectar la presencia o ausencia de un complejo inmune.
16. Un método de diagnóstico para detectar la presencia o ausencia de un anticuerpo de *P. gingivalis* en una muestra, comprendiendo el método poner en contacto la muestra con el polipéptido soluble de la reivindicación 1 o con la construcción quimérica o de fusión de la reivindicación 2, bajo condiciones suficientes para que el fragmento soluble del polipéptido forme un complejo inmune con un anticuerpo de la muestra, y detectar la presencia o ausencia de un complejo inmune.
17. Un equipo que comprende el polipéptido soluble de la reivindicación 1, o la construcción quimérica o de fusión de la reivindicación 2, y/o el anticuerpo de las reivindicaciones 10, 11 o 12.
18. El uso del polipéptido de la reivindicación 1 para generar un anticuerpo.

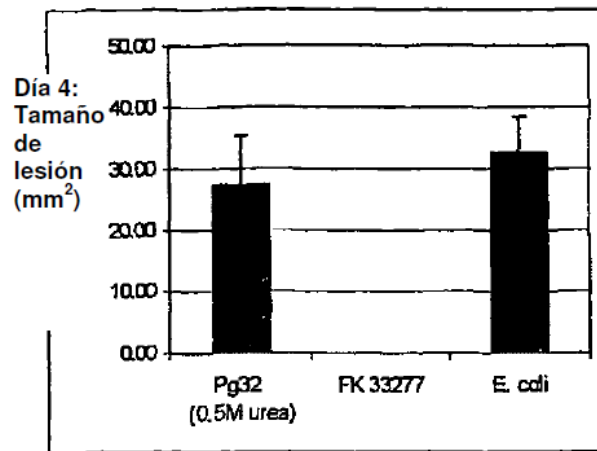


Figura 1a

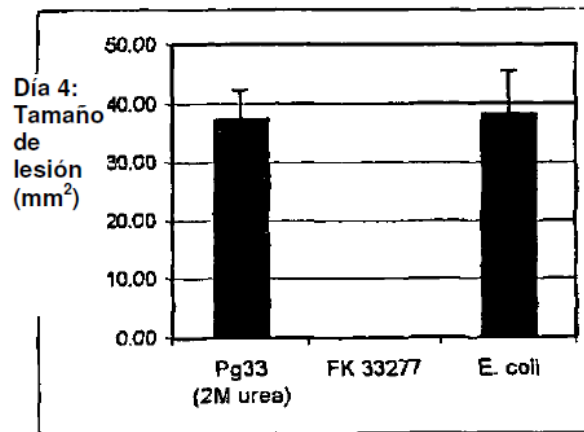


Figura 1b

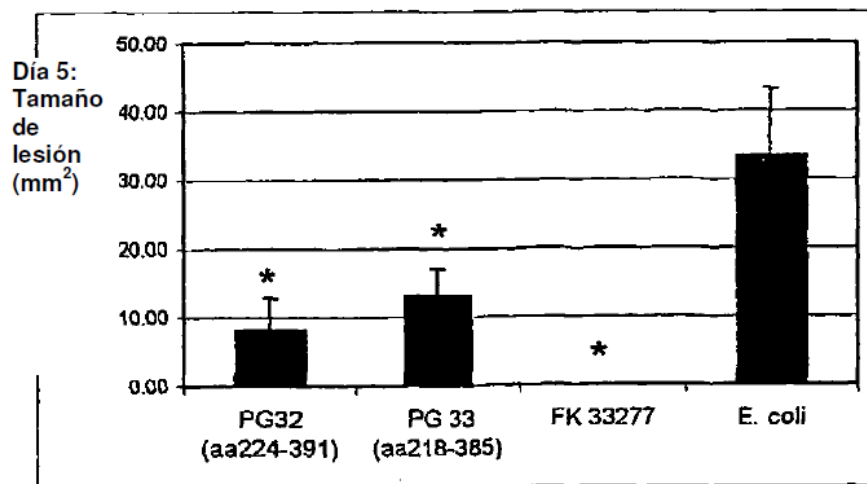


Figura 1c

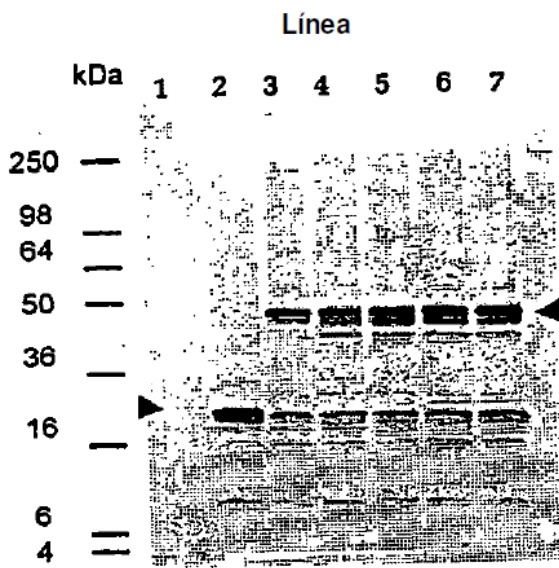


Figura 2a

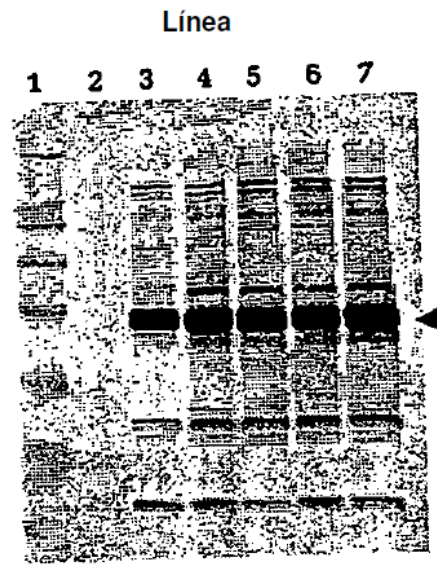


Figura 2b