

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 432 690**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4184 (2006.01)

A61K 31/00 (2006.01)

A61P 33/10 (2006.01)

A61P 1/02 (2006.01)

A61P 33/00 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

A61K 31/505 (2006.01)

A61K 31/381 (2006.01)

A61K 31/427 (2006.01)

A61K 31/506 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.07.2008 E 08772643 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2013 EP 2175851**

54 Título: **Tratamiento de biopelícula**

30 Prioridad:

12.07.2007 AU 2007903788 P

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

04.12.2013

73 Titular/es:

**ORAL HEALTH AUSTRALIA PTY LTD (100.0%)
Faculty of Medicine, Dentistry and Health
Sciences Melbourne Dental School Level 6, 720
Swanston Street
Carlton, VIC 3053, AU**

72 Inventor/es:

**DASHPER, STUART GEOFFREY;
REYNOLDS, ERIC CHARLES;
VEITH, PAUL DAVID y
ANG, CHING SENG**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 432 690 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

Tratamiento de biopelícula.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a composiciones para prevenir o alterar la formación y/o desarrollo de biopelícula bacteriana tal como aquellas que contienen *Porphyromonas gingivalis*. En particular, la presente invención se refiere a la reivindicación 1.

10

Antecedentes de la invención

Muchos tratamientos bacterianos están dirigidos a bacterias en un estado planctónico. Sin embargo, las patologías bacterianas incluyen bacterias en un estado de biopelícula. Por ejemplo, *Porphyromonas gingivalis* se considera que es el principal agente causante de enfermedad periodontal crónica. La lesión de tejido asociada a la enfermedad se produce por una respuesta inmunitaria del huésped desregulada a *P. gingivalis* que crece como parte de una biopelícula bacteriana polimicrobiana sobre la superficie de los dientes. Las biopelículas bacterianas son ubicuas en la naturaleza y se definen como poblaciones bacterianas encerradas en matriz adherentes entre sí y/o a superficies o interfases (1). Estas células bacterianas sésiles que se adhieren a y crecen sobre una superficie como una biopelícula madura pueden sobrevivir en entornos hostiles que pueden incluir la presencia de agentes antimicrobianos, fuerzas de cizallamiento y privación de nutrientes.

Los Centros para el control y la prevención de enfermedades estiman que el 65% de las infecciones bacterianas humanas implican biopelículas. Las biopelículas frecuentemente complican el tratamiento de infecciones crónicas protegiendo bacterias del sistema inmunitario, disminuyendo la eficacia de antibióticos y dispersando células planctónicas a sitios distantes que pueden ayudar en la reinfección (2, 3). La placa dental es un ejemplo clásico de una biopelícula bacteriana en la que una alta diversidad de especies forman una biopelícula polimicrobiana heterogénea que crece sobre la superficie de los dientes. La superficie de los dientes es un hábitat microbiano único ya que es la única superficie que no se muda permanente dura en el cuerpo humano. Esto permite la acreción de una biopelícula bacteriana sustancial durante un periodo de tiempo prolongado a diferencia de superficies mucosas en las que la eliminación de células epiteliales limita el desarrollo de la biopelícula. Por tanto, los cambios al proteoma de *P. gingivalis* que se producen entre los estados planctónicos y de biopelícula son importantes para el entendimiento de los presentes inventores de la progresión de enfermedad periodontal crónica.

P. gingivalis se ha clasificado en dos amplios grupos de cepas incluyendo las cepas W50 y W83 que se han descrito como invasivas en modelos de lesión animal mientras que las cepas que incluyen 381 y ATCC 33277 se describen como menos invasivas (4,5). Griffen y col. (6) encontraron que cepas similares a W831W50 estuvieron más asociadas a enfermedad periodontal humana que otras cepas de *P. gingivalis*, que incluyen cepas similares a 381, mientras que Cutler y col. (7) demostraron que cepas invasivas de *P. gingivalis* fueron más resistentes a fagocitosis que las cepas no invasivas. La comparación de la cepa W83 de *P. gingivalis* secuenciada con la cepa ATCC 33277 tipo indicó que el 7% de los genes estuvieron ausentes o altamente divergentes en la cepa 33277, que indica que hay diferencias considerables entre las cepas (8). De forma interesante, la cepa W50 de *P. gingivalis* forma biopelículas solo escasamente bajo la mayoría de las circunstancias en comparación con la cepa 33277, que fácilmente forma biopelículas (9). Como consecuencia de esto se han realizado relativamente pocos estudios sobre la formación de biopelícula por W50 de *P. gingivalis*.

El documento GB 2381449 desvela composiciones que comprenden cinco compuestos de nitroimidazol para tratar enfermedad periodontal producida por *P. gingivalis*.

Se han empleado estudios proteómicos cuantitativos para determinar cambios del proteoma de patógenos bacterianos humanos tales como *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Streptococcus mutans* del estado planctónico a de biopelícula usando enfoques de electroforesis en gel 2D en los que se calculan relaciones de proteínas basándose en la intensidad de la tinción del gel (10-12). Una alternativa es usar técnicas de marcado con isótopos estables tales como ICAT, iTRAQ o agua pesada ($H_2^{18}O$) con cuantificación por EM (13). La base para el marcado con $H_2^{18}O$ es que durante la hidrólisis de proteínas se ha demostrado que endopeptidasas tales como tripsina demostraron incorporar dos átomos de ^{18}O en los extremos C de los péptidos resultantes (14, 15). Además de usarse en la determinación de las abundancias de proteínas relativas (16-19), el marcado con ^{18}O en proteómica también se ha usado para la identificación del extremo C de la proteína, identificación de glucosilación ligada a N después de la eliminación enzimática del glucano, simplificación de la interpretación de datos de EM/EM y más recientemente para la validación de sitios de fosforilación (20-23). El procedimiento de marcado proteolítico con $^{16}O/^{18}O$ para medir la abundancia de proteínas relativa implica digerir una muestra en $H_2^{16}O$ y la otra muestra en $H_2^{18}O$. Los digestos se combinan entonces antes del análisis por EM-CL/EM. Los péptidos que eluyen de la columna de CL pueden cuantificarse midiendo la intensidad de señal relativa de los pares iónicos del péptido en el modo de EM. La incorporación de dos átomos de ^{18}O en el extremo C de péptidos digeridos por tripsina produce un desplazamiento de la masa de +4 m/z que permite la identificación de los pares de isótopos.

65

Debido a la complejidad del proteoma, etapas de prefraccionamiento son ventajosas para aumentar el número de identificaciones de péptidos y proteínas. La mayoría de las etapas de prefraccionamiento implican un enfoque de CL 2D al nivel de péptidos después de la digestión en disolución (24, 25). Sin embargo, debido a la posible pérdida de muestras durante las etapas de deshidratación iniciales de la disolución de proteína, el prefraccionamiento por SDS-PAGE al nivel de proteína seguido del marcado con $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ durante la digestión en gel también se ha llevado a cabo satisfactoriamente (26-29). El marcado proteolítico con $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ es una metodología altamente específica y versátil, pero se han realizado pocos estudios de validación a gran escala (30). Se llevó a cabo un excelente estudio de validación por Qian y col. (18) que marcaron dos alícuotas similares de proteínas del suero en una relación 1:1 y obtuvieron una relación promedio de $1,02 \pm 0,23$ de 891 péptidos. Un estudio más reciente por Lane y col. (26) demostró adicionalmente la factibilidad del procedimiento de $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ usando una estrategia de marcado inverso para determinar la abundancia relativa de las 17 proteínas de citocromo P450 entre ratones de control y tratados con inductores de citocromo P450 que se inyectaron con tumores humanos.

Resumen de la invención

La presente invención usó un sistema por el cual W50 de *P. gingivalis* se cultiva en cultivo continuo y se desarrolla una biopelícula madura sobre las superficies verticales en el recipiente del quimiostato durante un periodo de tiempo prolongado. La biopelícula final es similar a la que se habría observado en condiciones de progresión de la enfermedad, permitiendo así una comparación directa entre células de biopelícula y planctónicas. El marcado proteolítico con $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ usando una estrategia de marcado inverso se llevó a cabo después del prefraccionamiento por SDS-PAGE de la fracción de la envuelta de células de *P. gingivalis* seguido de acoplamiento a EM CL MALDI TOF/EM fuera de línea para la identificación y cuantificación. De las 116 proteínas identificadas, 81 se encontraron coherentemente en dos estudios en cultivo continuo independientes. Se encontró que 47 proteínas con una variedad de funciones aumentaron o disminuyeron coherentemente en abundancia en las células de biopelícula proporcionando posibles dianas para las estrategias de control de biopelículas. De estas 47 proteínas, los presentes inventores han seleccionado 24 proteínas que creen que son particularmente útiles como dianas en el tratamiento y/o prevención de infección por *P. gingivalis*. Éstas se enumeran en la Tabla 4 más adelante.

Por consiguiente, los presentes inventores describen un polipéptido bacteriano aislado, purificado o recombinante que modula la formación de biopelícula por bacterias. Preferentemente, las bacterias son anaerobias. En una realización, las bacterias son dependientes de fumarato reductasa (Frd), tal como aquellas del género *Porphyromonas*. Una bacteria preferida es *P. gingivalis*.

Los polipéptidos descritos en el presente documento para *P. gingivalis* tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias enumeradas en la Tabla 4. La invención se extiende a secuencias al menos el 80% idénticas a las mismas, preferentemente el 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o el 99%.

La invención se refiere a la biopelícula de *gingivalis* de la reivindicación 1, los presentes inventores también describen un procedimiento para prevenir o tratar un sujeto para enfermedad periodontal que comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende un agente inhibidor de un polipéptido que modula la formación de biopelícula, particularmente enfermedad periodontal resultante de o asociada a la formación de biopelícula bacteriana. Normalmente, el polipéptido es importante o necesario para el desarrollo de biopelícula en el sentido de que la inhibición de la actividad del polipéptido reduce o inhibe la formación y/o desarrollo de biopelícula.

Los presentes inventores también describen el uso de un agente inhibidor de un polipéptido que modula la formación de biopelícula en la fabricación de un medicamento para prevenir o tratar enfermedad periodontal.

Los presentes inventores también describen una composición útil en la prevención o tratamiento de enfermedad periodontal, composición que comprende un agente inhibidor tal como un antagonista, o combinación de antagonistas del polipéptido descrito en el presente documento.

Normalmente, la composición también incluirá un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición se administra de manera que el (los) antagonista(s) inhiba(n) la infección.

Opcionalmente, la composición puede incluir adicionalmente uno o más antibióticos que son tóxicos para o inhiben el crecimiento de bacterias anaerobias Gram-negativas. Posiblemente cualquier antibiótico bacteriostático o bactericida pueda usarse en una composición de la invención. Preferentemente, antibióticos adecuados incluyen amoxicilina, doxiciclina o metronidazol.

Los presentes inventores también describen una composición útil en la prevención, inhibición o tratamiento de enfermedad periodontal o infección por *P. gingivalis* para su uso en la cavidad bucal.

Los presentes inventores también describen una composición útil en la prevención, inhibición o tratamiento de enfermedad periodontal o infección por *P. gingivalis* cuando se usa en la cavidad bucal.

Una composición oral puede depositarse sobre los dientes o sobre las encías o ambos.

El polipéptido puede ser una enzima. Preferentemente, la enzima participa en el metabolismo de los ácidos orgánicos, más preferentemente catabolismo de glutamato/aspartato. En una realización, el polipéptido es fumarato reductasa.

5 Los presentes inventores también describen una molécula de ARN interferente, comprendiendo la molécula una región bicatenaria de al menos 19 pares de bases en cada cadena en la que una de las cadenas de la región bicatenaria es sustancialmente complementaria a una región de un polinucleótido que codifica un polipéptido como se ha descrito anteriormente. En una realización, una de las cadenas es complementaria a una región de polinucleótido que codifica un polipéptido de una secuencia enumerada en la Tabla 4.

10 Los presentes inventores describen adicionalmente un agente inhibidor que es un antagonista del polipéptido. Para *P. gingivalis*, el polipéptido puede ser fumarato reductasa y el antagonista está seleccionado de uno o más de agentes inhibidores de fumarato reductasa. Agentes inhibidores adecuados adicionales incluyen productos naturales que incluyen, pero no se limitan a, decursina, verticipirona, paecilaminol, 5-alquenil-3,3(2H)-furanonas de *Streptomyces spp.*, nafuredina, rotenona de ácido mesacónico y análogos naturales, semisintéticos y sintéticos de los mismos. Los presentes inventores describen adicionalmente agentes inhibidores que son compuestos sintéticos que incluyen, pero no se limitan a, 4,6-dinitrofenoles 2-sustituídos; N-óxido de mercaptopiridina; L-092,201 (Merck Sharpe y Dohme); nitroimidazoles tales como fexinidazol, megazol, benzimidazol, MK-436, L-634,549, misonidazol; o bencimidazoles tales como albendazol, cambendazol, mebendazol, oxfendazol, parebendazol y tiabendazol; u oxantel o morantel. Según la invención, agentes inhibidores son oxantel, morantel o tiabendazol. Un agente inhibidor particularmente preferido es oxantel.

Se reconocerá por el destinatario experto que la selección del agente inhibidor será dependiente del número de factores clínicos que determinen si el agente inhibidor es o no apropiado para su uso en un entorno clínico.

25

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Cuantificación de $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ de relaciones de BSA específicas. La cuantificación de cantidades conocidas de BSA se llevó a cabo del mismo modo que para las muestras de biopelícula y planctónicas informadas en los procedimientos experimentales para validar la metodología. Cantidades brevemente predeterminadas de BSA se cargaron en carriles adyacentes de un gel NuPAGE seguido de escisión de bandas de igual tamaño, marcado proteolítico normal o inverso, nanoHPLC y EM MALDI TOF/EM. (A) Espectros de EM del péptido triptico de BSA, RHPEYAVSVLLR, a relaciones de marcado de $^{16}\text{O}:^{18}\text{O}$ conocidas de 1:1 (i), 2:1 (ii), 1:5 (iii) y 10:1 (iv) que muestran la envuelta isotópica doblete característica para el péptido marcado con ^{16}O y ^{18}O (S0, S2 y S4 son la intensidades medidas de los picos isotópicos) (B) Gel de SDS-PAGE de relaciones de BSA conocidas usadas para el procedimiento de cuantificación.

Figura 2: Espectros de EM y EM/EM directa e inversa típicos de muestra de *P. gingivalis*. (i, ii) Porción ampliada de espectros de masas que muestran el ión precursor parental $[M+H]^+$ del péptido marcado normal e inverso GNLQALVGR que pertenece a PG2082 y que muestra la diferencia de masa de 4 Da típica en una relación 1:1 (iii, iv) Espectro de masas que muestra el ión precursor parental $[M+H]^+$ del péptido marcado normal e inverso YNANNVDLNR que pertenece a PG0232 y que muestra la diferencia de masa de 4 Da típica en una relación 2:1 (v, vi) Espectro de EM/EM del péptido YNANNVDLNR (+2 180) marcado pesado y YNANNVDLNR sin marcar caracterizado por el desplazamiento de 4 Da de todos los iones Y.

Figura 3: Correlación de duplicados técnicos marcados normales/inversos. Comparación de los diagramas de dispersión transformados por \log_{10} de la relación de abundancia de péptidos del marcado normal (Bio18, Plank16) e inverso (Plank18, Bio16) para ambos duplicados. Las relaciones de abundancia de los péptidos marcados inversos se han invertido para una comparación directa. (A) Duplicado biológico 1 (B) Duplicado biológico 2

Figura 4: Distribución y correlación de abundancias de proteínas de duplicados biológicos. (A) Cambios de veces promedio normalizados para las 81 proteínas cuantificables identificadas en ambos duplicados biológicos expresaron una distribución similar a gaussiana. La relación de abundancias de cada proteína se normalizó adicionalmente a cero ($R - 1$) y relaciones inferiores a 1 se invirtieron y calcularon como $(1 - (1/R))$ (18). Las 81 proteínas cuantificables de cada duplicado biológico se clasificaron aumentando las relaciones (Biofilm/Planktonic) y se dividieron igualmente en seis grupos con igual número de proteínas (A-F). Los grupos C y D representan proteínas no significativamente reguladas (< 3 DE de 1,0). (B) Distribución de proteínas basándose en clasificaciones. Inserto: tabla de clasificación para la determinación de la similitud entre ambos duplicados biológicos. Las proteínas se clasificaron en orden descendente siendo 1 la mayor similitud cuando ambos duplicados biológicos se encontraron dentro del mismo grupo y siendo 6 la menor similitud.

Figura 5: Rotura de las 116 proteínas identificadas en este estudio basándose en la identificación en uno o ambos duplicados biológicos y número de péptidos únicos identificados. Las proteínas identificadas de ambos duplicados biológicos (81) se presentan en la Tabla 2. La leyenda muestra el número de péptidos únicos identificados por proteína.

65

Figura 6: Las rutas catabólicas para la fermentación de glutamato y aspartato en *P. gingivalis*. Enzimas identificadas que catalizan cada etapa se representan por su número de acceso de TIGR como se observa en la Tabla 3. El número de acceso subrayado indica enzimas que se detectaron en el otro análisis proteómico, pero no en los estudios de ICAT.

Figura 7: Efecto de oxantel sobre el crecimiento de células de W50 (A) y ATCC 33277 (B) de *P. gingivalis* durante 50 h. Las concentraciones usadas fueron de 15,625 a 1000 μM . El control negativo usado fue 4 μl de DMSO. CIM y TGM de *P. gingivalis* fue como se observó en la Tabla 7 y 8. El resultado muestra la media de dos duplicados biológicos llevados a cabo en diferentes días (n=10). (- DMSO, - 15,625 μM , - - 31,25 μM , - - - - 62,5 μM , - - - - 125 μM , - - - - - 250 μM , - - - - - 500 μM , - - - - - 1000 μM)

Figura 8: Efecto de morantel sobre el crecimiento de células de *P. gingivalis* durante 50 h. Las concentraciones usadas fueron de 15,625 a 1000 μM . El control negativo usado fue 4 μl de DMSO. CIM y TGM de *P. gingivalis* fueron como se observa en la Tabla 7. (-DMSO, 19,53 μM , - -39,06 μM , - - - - 78,13 μM , - - - - 156,25 μM , - - - - - 312,5 μM , - - - - 625 μM . - - - - 1250 μM , - - - 2500 μM , - - - - - 5000 μM)

Figura 9: Efecto de tiabendazol sobre el crecimiento de células de *P. gingivalis* durante 50 h. Las concentraciones usadas fueron de 31,25 a 4000 μM . El control negativo usado fue 4 μl de DMSO. CIM y TGM de *P. gingivalis* fueron como se observa en la Tabla 7. (-DMSO, -31,25 μM , - - 62,5 - - - - 125 μM , - - - - 250 μM , - - - - - 500 μM , - - -1000 μM , - - - - - 2000 μM , - - - 4000 μM)

Figura 10: Efectos de oxantel sobre la formación de biopelícula por la cepa 33277 de *P. gingivalis* (A) biopelícula de 24 h (B) biopelícula de 48 h. Se llevaron a cabo duplicados biológicos del ensayo y barras de error que representan las desviaciones estándar de ambos duplicados biológicos (n=12).

Figura 11: Imagen de CLSM de ATCC 33277 de control tratado con solo agua y teñido con Backlight. Las imágenes son proyecciones máximas del apilado en z entero obtenido a intervalos de 2 μm . Barra de escala (blanca) = 10 μm .

Figura 12: Imagen de CLSM de ATCC 33277 tratado con oxantel 125 μM y teñido con Backlight. Las imágenes son proyecciones máximas del apilado en z entero obtenido a intervalos de 2 μm . Barra de escala (blanca) = 10 μm

Figura 13: Imagen de CLSM de ATCC 33277 tratado con oxantel 12,5 μM y teñido con Backlight. Las imágenes son proyecciones máximas del apilado en z entero obtenido a intervalos de 2 μm . Barra de escala (blanca) = 10 μm

Figura 14: Unidades formadoras de colonia de *P. gingivalis* después del tratamiento con oxantel basado en un ensayo estático de 24 pocillos.

Descripción detallada de las realizaciones

Usando una estrategia proteómica los presentes inventores identificaron y cuantificaron satisfactoriamente los cambios en la abundancia de 116 proteínas de la envuelta de células de *P. gingivalis* entre los estados de biopelícula y planctónicos, identificándose la mayoría de las proteínas por éxitos de múltiples péptidos. Los presentes inventores demostraron expresión potenciada de un grupo grande de proteínas de la familia del dominio del extremo C localizadas en la superficie celular que incluyen RgpA, HagA, CPG70 y PG99. Otras proteínas que presentaron cambios significativos en la abundancia incluyeron proteínas relacionadas con el transporte (HmuY e IhtB), enzimas metabólicas (FrdA y FrdB), proteínas inmunogénicas y numerosas proteínas con funciones desconocidas hasta ahora.

Por consiguiente, los presentes inventores describen un polipéptido de *P. gingivalis* aislado, polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias correspondientes a los números de acceso enumerados en la Tabla 4 y secuencias al menos el 95% idénticas a las mismas.

Preferentemente, el polipéptido aislado es al menos el 96%, 97%, 98%, 99% o el 100% idéntico a la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las secuencias correspondientes a los números de acceso enumerados en la Tabla 4.

Los términos "péptidos, proteínas y polipéptidos" se usan indistintamente en el presente documento. Los polipéptidos pueden incluir polipéptidos recombinantes tales como polipéptidos de fusión. Procedimientos para la producción de un polipéptido de fusión son muy conocidos para aquellos expertos en la materia.

Como se entenderá bien por aquellos expertos en la materia, pueden hacerse alteraciones a las secuencias de aminoácidos correspondientes a los números de acceso enumerados en la Tabla 4. Estas alteraciones pueden ser deleciones, inserciones o sustituciones de residuos de aminoácidos. Los polipéptidos alterados pueden ser tanto que

se producen naturalmente (es decir, purificados o aislados de una fuente natural) como sintéticos (por ejemplo, por mutagénesis dirigida a sitio sobre el ADN codificante). Se pretende que tales polipéptidos alterados tengan al menos el 85%, preferentemente al menos el 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o el 99% de identidad con las secuencias correspondientes a los números de acceso enumerados en la Tabla 4. Anticuerpos producidos contra estos polipéptidos alterados también se unirán a los polipéptidos que tienen una de las secuencias correspondientes a los números de acceso enumerados en la Tabla 4.

Mientras que el concepto de sustitución conservativa es muy entendido por el experto en la materia, por claridad, sustituciones conservativas son aquellas explicadas a continuación.

Gly, Ala, Val, Ile, Leu, Met;
 Asp, Glu, Ser;
 Asn, Gln;
 Ser, Thr;
 Lys, Arg, His;
 Phe, Tyr, Trp, His; y
 Pro, N α -alquilaminoácidos.

La práctica de la invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de química, biología molecular, microbiología, ADN recombinante e inmunología muy conocidas para aquellos expertos en la materia. Tales técnicas se describen y explican en toda la bibliografía en fuentes tales como, J. Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning*, John Wiley and Sons (1984), J. Sambrook et *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989), T. A. Brown (editor), *Essential Molecular Biology: A Practical Approach*, volúmenes 1 y 2, IRL Press (1991), D. M. Glover y B. D. Hames (editores), *DNA Cloning: A Practical Approach*, volúmenes 1-4, IRL Press (1995 y 1996) y F. M. Ausubel y col. (editores), *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, que incluyen todas las actualizaciones hasta el presente). La divulgación de estos textos se incorporan en el presente documento por referencia.

Un "polipéptido aislado" como se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido que ha sido separado de otras proteínas, lípidos y ácidos nucleicos con los que naturalmente se produce o el polipéptido o péptido puede sintetizarse sintéticamente. Preferentemente, el polipéptido también se separa de sustancias, por ejemplo, anticuerpos o matriz de gel, por ejemplo, poliacrilamida, que se usan para purificarlo. Preferentemente, el polipéptido constituye al menos el 10%, 20%, 50%, 70% y el 80% de peso seco de la preparación purificada. Preferentemente, la preparación contiene una cantidad suficiente de polipéptido para permitir la secuenciación de proteínas (es decir, al menos 1, 10 ó 100 mg).

Los polipéptidos aislados descritos en el presente documento pueden purificarse por técnicas convencionales, tales como cromatografía en columna (usando diversas matrices que interaccionan con los productos de proteína tales como matrices de intercambio iónico, matrices hidrófobas y similares), cromatografía de afinidad utilizando anticuerpos específicos para la proteína u otros ligandos que se unen a la proteína.

Una "secuencia de aminoácidos contigua" como se usa en el presente documento se refiere a un estiramiento continuo de aminoácidos.

Un "polipéptido recombinante" es un polipéptido producido mediante un procedimiento que implica el uso de tecnología de ADN recombinante.

En la determinación de si dos secuencias de aminoácidos se encuentran o no dentro de un límite de porcentaje especificado, aquellos expertos en la materia serán conscientes de que es necesario realizar una comparación lado a lado o múltiples alineamientos de secuencias. En tales comparaciones o alineamientos se producirán diferencias en el posicionamiento de residuos no idénticos, que dependen del algoritmo usado para realizar el alineamiento. En el presente contexto debe hacerse referencia a un porcentaje de identidad o similitud entre dos o más secuencias de aminoácidos para referirse al número de residuos idénticos y similares respectivamente, entre dichas secuencias como se ha determinado usando cualquier algoritmo estándar conocido para aquellos expertos en la materia. Por ejemplo, pueden calcularse identidades o similitudes de secuencias de aminoácidos usando el programa GAP y/o alinearse usando el programa PILEUP del Computer Genetics Group, Inc., University Research Park, Madison, Wisconsin, Estados Unidos de América (Devereaux y col. y col., 1984). El programa GAP utiliza el algoritmo de Needleman y Wunsch (1970) para maximizar el número de residuos idénticos/similares y para minimizar el número y longitud de huecos de secuencia en el alineamiento. Alternativamente o además, si se comparan más de dos secuencias de aminoácidos, se usa el programa Clustal W de Thompson y col., (1994).

Los presentes inventores también describen un procedimiento para prevenir o tratar un sujeto para enfermedad periodontal que comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica como se describe en el presente documento.

En un procedimiento se trata un sujeto que incluye tratamiento profiláctico para enfermedad periodontal. Las

- enfermedades periodontales oscilan de una simple inflamación de encía a enfermedad grave que produce lesión importante al tejido blando y hueso que soportan los dientes. La enfermedad periodontal incluye gingivitis y periodontitis. Bacterias tales como *P. gingivalis* producen inflamación de las encías que se llama "gingivitis". En la gingivitis, las encías se ponen rojas, se hinchan y pueden sangrar fácilmente. Si no se trata la gingivitis, puede progresar a "periodontitis" (que significa "inflamación alrededor de los dientes"). En las periodontitis, las encías se alejan de los dientes y forman "bolsas" que se infectan. El sistema inmunitario del cuerpo combate las bacterias a medida que la placa se propaga y crece debajo de la línea de la encía. Si no se trata, los huesos, encías y tejido conjuntivo que soportan los dientes se destruyen. Los dientes pueden aflojarse eventualmente y tienen que sacarse.
- 5
- 10 Los presentes inventores también describen una composición útil en la prevención o tratamiento de enfermedad periodontal, composición que comprende un antagonista de un polipéptido de *P. gingivalis* del primer aspecto de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en la que el antagonista inhibe infección por *P. gingivalis*.
- 15 Puede prepararse una composición oral de la presente invención que contiene la composición farmacéutica anteriormente mencionada y usarse en diversas formas aplicables a la boca tales como dentífrico que incluye pastas de dientes, polvos dentales y dentífricos líquidos, enjuagues bucales, trociscos, chiches, pastas dentales, cremas de masaje gingival, comprimidos para gárgaras, productos lácteos y otros alimentos. Una composición oral según la presente invención pueden además incluir adicionalmente componentes muy conocidos dependiendo del tipo y
- 20 forma de una composición oral particular.
- En ciertas formas preferidas de la invención, la composición oral puede ser de carácter sustancialmente líquido, tal como un enjuague o colutorio bucal. En una preparación tal, el vehículo es normalmente una mezcla de agua-alcohol que deseablemente incluye un humectante como se describe más adelante. Generalmente, la relación de peso de
- 25 agua con respecto a alcohol está en el intervalo de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 20:1. La cantidad total de mezcla de agua-alcohol en este tipo de preparación está normalmente en el intervalo de aproximadamente el 70 a aproximadamente el 99,9% en peso de la preparación. El alcohol es normalmente etanol o isopropanol. Se prefiere etanol.
- 30 El pH de tales preparaciones líquidas y otras preparaciones de la invención está generalmente en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 9 y normalmente de aproximadamente 5,0 a 7,0. El pH puede controlarse con ácido (por ejemplo, ácido cítrico o ácido benzoico) o base (por ejemplo, hidróxido sódico) o tamponarse (como con citrato, benzoato, carbonato o bicarbonato de sodio, hidrogenofosfato de disodio, dihidrogenofosfato de sodio, etc.).
- 35 En otras formas deseables de la presente invención, la composición farmacéutica puede ser de carácter sustancialmente sólido o pastoso, tal como polvo dental, un comprimido dental o una pasta de dientes (crema dental) o dentífrico en gel. El vehículo de tales preparaciones oral sólidas o pastosas generalmente contiene material de pulido dentalmente aceptable.
- 40 En una pasta de dientes, el vehículo líquido puede comprender agua y humectante normalmente en una cantidad que oscila de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 80% en peso de la preparación. Glicerina, propilenglicol, sorbitol y polipropilenglicol ejemplifican humectantes/vehículos adecuados. También son ventajosas mezclas líquidas de agua, glicerina y sorbitol. En geles claros en los que el índice de refracción es una consideración importante se emplean preferentemente aproximadamente 2,5 - 30% peso/peso de agua, 0 a aproximadamente 70%
- 45 peso/peso de glicerina y aproximadamente 20 - 80% peso/peso de sorbitol.
- Pasta de dientes, cremas y geles normalmente contienen un espesante o agente gelificante natural o sintético en proporciones de aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 10, preferentemente aproximadamente el 0,5 a
- 50 aproximadamente el 5% peso/peso. Un espesante adecuado es hectorita sintética, una arcilla coloidal sintética compleja de magnesio-silicato de metal alcalino disponible, por ejemplo, como Laponite (por ejemplo CP, SP 2002, D) comercializada por Laporte Industries Limited. Laponite D tiene aproximadamente en peso 58,00% de SiO₂, 25,40% de MgO, 3,05% de Na₂O, 0,98% de Li₂O, y algo de agua y metales traza. Su gravedad específica real es 2,53 y tiene una densidad a granel aparente de 1,0 g/ml al 8% de humedad.
- 55 Otros espesantes adecuados incluyen musgo de Irlanda, carragenina iota, goma tragacanto, almidón, polivinilpirrolidona, hidroxietilpropilcelulosa, hidroxibutilmetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxietilcelulosa (por ejemplo, disponible como Natrosol), carboximetilcelulosa de sodio y sílice coloidal tal como Syloid finamente molido (por ejemplo, 244). También pueden incluirse agentes solubilizantes tales como polioles humectantes tales
- 60 como propilenglicol, dipropilenglicol y hexilenglicol, Cellosolves tales como metil Cellosolve y etil Cellosolve, aceites vegetales y ceras que contienen al menos aproximadamente 12 carbonos en una cadena lineal tal como aceite de oliva, aceite de ricino y petrolato, y ésteres tales como acetato de amilo, acetato de etilo y benzoato de bencilo.
- Se entenderá que, como es convencional, las preparaciones orales se venderán normalmente o se distribuirán de
- 65 otro modo en envases etiquetados adecuados. Así, un frasco de colutorio bucal tendrá una etiqueta que lo describe, en sustancia, como un colutorio bucal o enjuague bucal y que tiene indicaciones para su uso; y una pasta, crema o

gel dental normalmente estará en un tubo colapsible, normalmente aluminio, plomo revestido o plástico, u otro dispensador exprimible, bombeable o presurizado para dosificar el contenido, que tiene una etiqueta que lo describe, en sustancia, como una pasta de dientes, gel o crema dental.

5 Pueden usarse agentes tensioactivos orgánicos en las composiciones de la presente invención para lograr elevada acción profiláctica, ayudar a alcanzar la dispersión a fondo y completa del agente activo en toda la cavidad bucal, y hacer las presentes composiciones más cosméticamente aceptables. El material tensioactivo orgánico es preferentemente de naturaleza aniónica, no iónica o anfófica y preferentemente no interacciona con el agente activo. Se prefiere emplear como agente tensioactivo un material deteritivo que confiere a la composición propiedades deteritivas y espumantes. Ejemplos adecuados de tensioactivos aniónicos son sales solubles en agua de monosulfatos de monoglicéridos de ácidos grasos superiores tales como la sal de sodio del monoglicérido monosulfatado de ácidos grasos de aceite de coco hidrogenado, alquilsulfatos superiores tales como laurilsulfato de sodio, alquilarilsulfonatos tales como dodecylbencenosulfonato de sodio, alquilsulfoacetatos superiores, ésteres de ácidos grasos superiores de 1,2-dihidroxiopropanosulfonato, y las acilamidas alifáticas superiores sustancialmente saturadas de compuestos de ácido aminocarboxílico alifático inferior, tales como aquellos que tienen 12 a 16 carbonos en los radicales ácido graso, alquilo o acilo, y similares. Ejemplos de las últimas amidas mencionadas son N-lauroilsarcosina, y las sales de sodio, potasio y etanolamina de N-lauroil-, N-miristoil- o N-palmitoil-sarcosina que deben estar sustancialmente libres de jabón o material de ácido graso superior similar. El uso de estos compuestos de sarcosinato en las composiciones orales de la presente invención es particularmente ventajoso, ya que estos materiales presentan un efecto marcado prolongado en la inhibición de la formación de ácido en la cavidad bucal debido a la degradación de hidratos de carbono, además de ejercer alguna reducción en la solubilidad del esmalte dental en disoluciones ácidas. Ejemplos de tensioactivos no iónicos solubles en agua adecuados para su uso son productos de condensación de óxido de etileno con diversos compuestos que contienen hidrógeno reactivo con ellos que tienen cadenas hidrófobas largas (por ejemplo, cadenas alifáticas de aproximadamente 12 a 20 átomos de carbono), cuyos productos de condensación ("etoxámeros") contienen restos de polioxietileno hidrófilos, tales como productos de condensación de poli(óxido de etileno) con ácidos grasos, alcoholes grasos, amidas grasas, alcoholes polihidroxilados (por ejemplo, monoestearato de sorbitano) y poli(óxido de propileno) (por ejemplo, materiales Pluronic).

30 El agente tensioactivo está normalmente presente en una cantidad de aproximadamente el 0,1-5% en peso. Es digno de mención que el agente tensioactivo pueda ayudar en la disolución del agente activo de la invención y así disminuir la cantidad de humectante solubilizante necesario.

35 Diversos otros materiales pueden incorporarse en las preparaciones orales de la presente invención tales como agentes blanqueantes, conservantes, siliconas, compuestos de clorofila y/o material amoniacal tal como urea, fosfato de diamonio y mezclas de los mismos. Estos adyuvantes, si están presentes, se incorporan en las preparaciones en cantidades que no afectan sustancialmente adversamente las propiedades y características deseadas.

40 También puede emplearse cualquier material aromatizante o edulcorante adecuado. Ejemplos de constituyentes aromatizantes adecuados son aceites aromatizantes, por ejemplo, aceite de menta verde, menta piperita, gaulteria, sazafrán, clavo, salvia, eucalipto, mejorana, canela, limón y naranja, y salicilato de metilo. Edulcorantes adecuados incluyen sacarosa, lactosa, maltosa, sorbitol, xilitol, ciclamato de sodio, perilartina, AMP (aspartilfenilalanina, éster metílico), sacarina y similares. Adecuadamente, aromas y edulcorantes pueden comprender cada uno o juntos de aproximadamente el 0,1% al 5% más de la preparación.

45 Las composiciones de la presente invención también pueden incorporarse en pastillas para chupar, o en chicle u otros productos, por ejemplo, por agitación en una base de goma caliente o recubriendo la superficie externa de una base de goma, ilustrativos de los cuales son jelutong, látex de caucho, resinas de vinilita, etc., deseablemente con plastificantes o ablandadores convencionales, azúcar u otros edulcorantes o tales como glucosa, sorbitol y similares.

50 Los presentes inventores también describen partes que incluyen (a) una composición de agente inhibidor de polipéptidos y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable. Deseablemente, el kit incluye adicionalmente instrucciones para su uso para inhibir la formación de biopelícula en un paciente en necesidad de tal tratamiento.

55 Composiciones previstas para uso oral pueden prepararse según cualquier procedimiento conocido en la técnica para la fabricación de composiciones farmacéuticas y tales composiciones pueden contener uno o más agentes seleccionados del grupo que consiste en edulcorantes, aromatizantes, colorantes y conservantes con el fin de proporcionar preparaciones farmacéuticamente elegantes y agradables al paladar. Los comprimidos contienen el principio activo en mezcla con excipientes farmacéuticamente aceptables no tóxicos que son adecuados para la fabricación de comprimidos. Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes inertes tales como carbonato cálcico, carbonato sódico, lactosa, fosfato de calcio o fosfato de sodio; agentes granulantes y de disgregación, por ejemplo, almidón de maíz, o ácido algínico: aglutinantes, por ejemplo almidón, gelatina o goma arábiga, y lubricantes, por ejemplo, estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Los comprimidos pueden estar sin recubrir o pueden recubrirse por técnicas conocidas para retrasar la disgregación y absorción en el tubo gastrointestinal y así proporcionar una acción sostenida durante un periodo más largo. Por ejemplo, puede emplearse un material de retraso temporal tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo.

Formulaciones para uso oral también pueden presentarse como cápsulas de gelatina dura en las que el principio activo se mezcla con un diluyente sólido inerte, por ejemplo, carbonato cálcico, fosfato de calcio o caolín, o como cápsulas de gelatina blanda en las que el principio activo se mezcla con agua o un medio de aceite, por ejemplo, aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva.

5 Las suspensiones acuosas contienen los materiales activos en mezcla con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Tales excipientes son agentes de suspensión, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidropropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma tragacanto y goma arábiga; los dispersantes o humectantes pueden ser una fosfatida que se produce naturalmente, por ejemplo, lecitina, o productos de condensación de un óxido de alquileno con ácidos grasos, por ejemplo, estearato de polioxietileno, o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo, heptadecaetilenoxietanol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol tal como monooleato de polioxietilensorbitol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo, monooleato de polietilensorbitano.

Las suspensiones acuosas también pueden contener uno o más conservantes, por ejemplo, benzoatos tales como etilo, o p-hidroxibenzoato de n-propilo, uno o más colorantes, uno o más aromatizantes, y uno o más edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina.

20 Pueden formularse suspensiones aceitosas suspendiendo los principios activos en un aceite vegetal, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco, o en un aceite mineral tal como parafina líquida. Las suspensiones aceitosas pueden contener un espesante, por ejemplo, cera de abeja, parafina dura o alcohol cetílico. Edulcorantes tales como aquellos expuestos anteriormente y aromatizantes pueden añadirse para proporcionar preparaciones orales agradables al paladar. Estas composiciones pueden preservarse mediante la adición de un antioxidante tal como ácido ascórbico.

30 Las comparaciones de abundancias de proteína de *P. gingivalis* entre crecimiento como un estado de biopelícula y planctónico revelaron muchos cambios al proteoma de esta bacteria patógena, en particular la menor abundancia de las enzimas fumarato reductasa esenciales para el catabolismo de glutamato/aspartato. En un estudio separado que implica comparar los cambios del proteoma de *P. gingivalis* de hemo limitado y en exceso, hubo un desplazamiento observable en los patrones de fermentación durante la limitación a hemo que condujo a elevada producción de acetato y estuvo de acuerdo con los cambios coordinados en abundancia de enzimas en la principal ruta catabólica de *P. gingivalis*. De particular interés fue la coherente menor abundancia de las enzimas fumarato reductasa durante la limitación de hemo y el crecimiento de biopelícula. Los presentes inventores demostraron posteriormente la utilidad de tres agentes inhibidores de Frd (oxantel, morantel y tiabendazol) contra la supervivencia de *P. gingivalis* y concentraciones inhibitorias submínimas (C_{subM}) para alterar el desarrollo normal de la biopelícula.

40 Como se usa en el presente documento, el término "antagonista" se refiere a un ácido nucleico, péptido, anticuerpo, ligandos u otra entidad química que inhibe la actividad biológica del polipéptido de interés. Un experto en la materia estaría familiarizado con técnicas de prueba y selección de antagonistas adecuados de una proteína específica, tales técnicas incluirían ensayos de unión.

45 Los anticuerpos y antagonistas descritos en el presente documento tienen varias aplicaciones, por ejemplo, pueden usarse como conservantes antimicrobianos, en productos de cuidado oral (pastas de dientes y colutorios bucales) para el control de placa dental y supresión de patógenos asociados a caries dental y enfermedades periodontales. Los anticuerpos y antagonistas descritos en el presente documento también pueden usarse en preparaciones farmacéuticas (por ejemplo, medicinas antiinfecciosas tópicas y sistémicas).

50 Los presentes inventores también describen moléculas de ARN interferente que son dirigidas contra las moléculas de ARNm que codifican los polipéptidos descritos en el presente documento.

55 Por consiguiente, los presentes inventores también describen una molécula de ARN interferente, molécula que comprende una región bicatenaria de al menos 19 pares de bases en cada hebra en la que una de las hebras de la región bicatenaria es complementaria a o puede hibridarse bajo condiciones intracelulares normales con una región de una molécula de ARNm que codifica un polipéptido descrito en el presente documento.

60 El llamado ARN interferente o ARNi es conocido e información adicional referente al ARNi se proporciona en Hannon (2002) Nature 418: 244-259, y McManus & Sharp (2002) Nature Reviews: Genetics 3(10): 737-747.

65 Los presentes inventores también describen modificación (modificaciones) química(s) de ARNip que potencia(n) la estabilidad de ARNip y soportan su uso *in vivo* (véase, por ejemplo, Shen y col. (2006) Gene Therapy 13: 225-234). Estas modificaciones podrían incluir restos abásicos invertidos en el extremo 5' y 3' del oligonucleótido de hebra codificante, y un enlace fosforotioato sencillo entre los dos últimos nucleótidos en el extremo 3' de la hebra no codificante.

Se prefiere que la región bicatenaria del ARN interferente comprenda al menos 20, preferentemente al menos 25, y lo más preferentemente al menos 30 pares de bases en cada hebra de la región bicatenaria. Los presentes inventores también describen un procedimiento de tratamiento de un sujeto para enfermedad periodontal que comprende administrar al sujeto al menos una de las moléculas de ARN interferente descritas en el presente documento.

En toda esta memoria descriptiva, la palabra “comprenden”, o variaciones tales como “comprende” o “que comprende”, se entenderán que implican la inclusión de un elemento, número entero o etapa establecido, o grupo de elementos, números enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas.

Cualquier discusión de documentos, actos, materiales, dispositivos, artículos o similares que se ha incluido en la presente memoria descriptiva es únicamente con el fin de proporcionar un contexto para la presente invención. No debe considerarse una admisión de que cualquiera o todas de estas cuestiones formen parte de la base de la técnica anterior o sean conocimiento general común en el campo relevante a la presente invención como existió en Australia o en cualquier parte antes de la fecha de prioridad de cada reivindicación de la presente solicitud.

Se apreciará por expertos en la materia que numerosas variaciones y/o modificaciones pueden hacerse a la invención como se muestra en las realizaciones específicas sin apartarse del espíritu o alcance de la invención como se ha descrito ampliamente. Las presentes realizaciones van a considerarse, por tanto, en todos los aspectos como ilustrativas y no restrictivas. La invención incluye específicamente todas las combinaciones de características descritas en esta memoria descriptiva.

Con el fin de que la naturaleza de la presente invención pueda entenderse más claramente, aspectos preferidos de la invención se describirán ahora en más detalle con referencia a las siguientes tablas y ejemplos de composiciones.

Crecimiento y recogida de P. gingivalis para estudios de biopelícula frente a planctónicos

Se cultivó W50 de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 53978) en cultivo continuo usando un quimostato BioFlo modelo C-30 (New Brunswick Scientific) con un volumen de trabajo de 400 ml. Tanto el recipiente de cultivo como el depósito de medio se gasificó continuamente con 10% de CO₂ y 90% de N₂. La temperatura de crecimiento fue 37 °C y el medio de crecimiento de infusión de cerebro-corazón (Oxoid) se mantuvo a pH 7,5. Durante todo el crecimiento, el potencial redox se mantuvo a -300 mV. La tasa de dilución fue 0,1 h⁻¹, dando un tiempo de generación medio (TGM) de 6,9 h. Se añadieron HCl de cisteína estéril (0,5 g/l) y hemina (5 mg/l). El cultivo alcanzó el estado estacionario aproximadamente 10 días después de la inoculación y se mantuvo durante otros 30 días hasta que se había desarrollado una densa capa de biopelícula sobre las superficies verticales del recipiente.

Todas las manipulaciones de células bacterianas se llevaron a cabo sobre hielo o a 4 °C. Durante la recogida, las células planctónicas se decantaron en un recipiente limpio y la biopelícula se lavó dos veces suavemente con tampón PGA (NaH₂PO₄ 10,0 mM, KCl 10,0 mM, ácido cítrico 2,0 mM, MgCl₂ 1,25 mM, CaCl₂ 20,0 mM, ZnCl₂ 25,0 mM, MnCl₂ 50,0 mM, CuCl₂ 5,0 mM, CoCl₂ 10,0 mM, H₃BO₃ 5,0 mM, Na₂MoO₄ 0,1 mM, HCl de cisteína 10 mM con el pH ajustado a 7,5 con NaOH 5 M a 37 °C), seguido de recogida de la biopelícula en un tubo de centrifuga de 50 ml.

Células planctónicas y de biopelícula se lavaron entonces 3 veces (7000 g) con tampón PGA y ambas muestras se resuspendieron a un volumen final de 30 ml con tampón de lavado (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ 5 mM, pH 8,0, inhibidor de proteinasa (Sigma)) y se lisaron por 3 pases a través de una celda a presión de prensa francesa (SLM, AMINCO) a 138 MPa. Las células lisadas se centrifugaron a 2000 g durante 30 min para eliminar cualquier célula sin romper. El sobrenadante se centrifugó adicionalmente a 100000 g durante 1 h para separar las células lisadas en sus fracciones solubles e insolubles (envuelta celular). La fracción de la envuelta celular se lavó adicionalmente 3 veces con tampón de lavado a 100000 g, durante 20 min cada vez para eliminar cualquier contaminación soluble. Todas las muestras se congelaron y se guardaron entonces a -80 °C.

Crecimiento y recogida de P. gingivalis para estudios de limitación y exceso de hemo

Se cultivó W50 de *P. gingivalis* en cultivo continuo usando un fermentador/biorreactor Bioflo 110 (New Brunswick Scientific) con un volumen de trabajo de 400 ml. El medio de crecimiento fue 37 g/l de medio de infusión de cerebro-corazón (Oxoid) complementado con 5 mg/ml de clorhidrato de cisteína esterilizado por filtración, 5,0 µg/ml de hemina (exceso de hemo) o 0,1 µg/ml de hemina (de hemo limitada). El crecimiento se inició inoculando el recipiente de cultivo con un cultivo en lotes de 24 h (100 ml) de *P. gingivalis* cultivado en el mismo medio (exceso de hemo). Después de 24 h de crecimiento de cultivo en lotes, la bomba del depósito de medio se encendió y el flujo de medio se ajustó para dar una tasa de dilución de 0,1 h⁻¹ (tiempo de generación medio (TGM) de 6,9 h). La temperatura del recipiente se mantuvo a 37 °C y el pH a 7,4 ± 0,1. El cultivo se gasificó continuamente con 5% de CO₂ en 95% de N₂. Las células se recogieron durante el crecimiento en estado estacionario, se lavaron tres veces con tampón de lavado (Tris-HCl 50 mM a pH 8,0, NaCl 150 mM, MgCl₂ 5 mM) a 5000 g durante 30 min y se rompieron con 3 pases a través de una celda de presión francesa (SLM, AMINCO) a 138 MPa. Las células lisadas se centrifugaron

entonces a 2000 g durante 30 min para eliminar las células sin romper, seguido de ultracentrifugación a 100000 g, produciendo una fracción soluble (sobrenadante) y de membranas. Todas las fracciones se llevaron a cabo sobre hielo.

5 *Preparación y análisis de biopelícula marcada con ^{18}O proteolítica y fracción de la envuelta de células planctónicas*

La fracción de la envuelta de células se resuspendió primero en 1 ml de tampón de lavado helado que contenía 2% de SDS, luego se llevaron a cabo sonicación y agitación con vórtex para ayudar en la resuspensión del sedimento. La etapa final en la resuspensión implicó el uso de una aguja de insulina de calibre 29 para ayudar a romper las partículas. La mezcla se centrifugó entonces a 40000 g para eliminar partículas insolubles y la concentración de proteína del sobrenadante se determinó usando el reactivo BCA (Pierce) según las instrucciones del fabricante.

Las muestras resuspendidas se sometieron a precipitación usando 5 volúmenes de acetona helada durante la noche a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ que ayudaron adicionalmente a inactivar cualquier actividad proteolítica. Después de la precipitación con acetona, ambas muestras se resuspendieron a una concentración final de 3 mg/ml con Tris 25 mM a pH 8,0 y 1% de SDS ayudado por sonicación intermitente, agitación con vórtex y el uso de una aguja de insulina de calibre 29. Entonces se llevó a cabo un segundo ensayo de proteína BCA para normalizar la cantidad de proteína final.

Se llevó a cabo electroforesis en gel sobre un gel NuPAGE según el protocolo del fabricante usando tampón de electroforesis MOPs (NuPAGE, Invitrogen), excepto que las muestras se hirvieron a $99\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 min antes de la carga sobre 10% de gel NuPAGE en 10 pocillos con MOPs como tampón de electroforesis. Las muestras de biopelícula y planctónicas (30 μg cada una) se cargaron en carriles adyacentes sobre el gel. Entonces se llevó a cabo SDS-PAGE a 126 V (constante) a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta que el frente de colorante estuvo a aproximadamente 1 cm de la parte inferior del gel. Para el duplicado biológico, el gel usado fue un gel con gradiente del 4-12% de NUPAGE usando MOPs como tampón de electroforesis para dar un patrón similar, pero no exacto, de separación de manera que se venciera la variación de potencial de una banda de proteína que se separa en dos fracciones. La tinción se llevó a cabo durante la noche en azul brillante de Coomassie G-250 (31) seguido de tinción durante la noche en H_2O ultrapura.

Los dos carriles de gel se dividieron en 10 bandas de gel de tamaños iguales usando una plantilla hecha a medida y cada sección se cortó en cubos de aproximadamente 1 mm^3 . El desteñido se llevó a cabo 3 veces en una disolución de NH_4HCO_3 50 mM/ACN (1:1). Después del desteñido, los cubos de gel se deshidrataron con 100% de ACN, seguido de rehidratación/reducción con una disolución de ditiotreitól 10 mM en tampón ABC (NH_4HCO_3 50 mM) a $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 min. La disolución en exceso se eliminó antes de añadir yodoacetamida 55 mM en tampón ABC durante 60 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Después de la reacción de alquilación, los cubos de gel se lavaron 3 veces en tampón ABC, seguido de deshidratación dos veces en 100% de ACN durante 10 min. Los cubos de gel se secaron adicionalmente bajo centrifugación usando Speedvac durante 90 min. La digestión se llevó a cabo en 60 μl de disolución por sección de gel que contenía 2 μg de tripsina modificada de calidad para secuencia (Promega) y tampón ABC de $\frac{1}{2}$ concentración preparado en tanto H_2^{16}O como H_2^{18}O (H_2^{18}O , >97% de pureza, Marshall Isotopes) durante 20 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Después de la digestión, los péptidos se extrajeron dos veces del gel usando una disolución de 50% de ACN/0,1% de TFA en su agua respectiva ($\text{H}_2^{16}\text{O}/\text{H}_2^{18}\text{O}$) y 0,1% de TFA con la ayuda de sonicación durante 5 min cada vez. El extracto reunido se hirvió a $99\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 min para inactivar la tripsina, seguido de liofilización durante 48 h.

Los péptidos liofilizados se resuspendieron en una disolución de 5% de ACN/0,1% de TFA en su agua respectiva ($\text{H}_2^{16}\text{O}/\text{H}_2^{18}\text{O}$) justo antes del análisis usando análisis de nanoHPLC y EM MALDI TOF/EM. La disolución de péptido (20 μl) se cargó entonces sobre un sistema Ultimate Nano LC (LC Packings) usando un autoinyector FAMOS (LC Packings) en modo de recogida de μl avanzado. Las muestras se cargaron primero sobre una columna trampa (300 μm de diámetro interno x 5 mm) a 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ durante 5 min. La separación se logró usando una columna de fase inversa (LC Packings, C18 PepMap100, 75 μm de d.i. x 15 cm, 3 μm , 100Å) con una velocidad de flujo de 300 nl/min, y se eluyó en 0,1% de ácido fórmico con un gradiente de ACN de 0-5 min (0%), 5-10 min (0-16%), 10-90 min (16-80%), 90-100 min (80-0%).

Los eluyentes se aplicaron en manchas lineales sobre placas AnchorChip (Bruker Daltonics) previamente moteadas usando el robot Proteineer Fc (Bruker Daltonics) a intervalos de 30 s. Antes del moteado, cada posición de mancha se moteó previamente con 0,2 μl de H_2O ultrapura para reducir la concentración del acetonitrilo durante el procedimiento de cristalización con la matriz. La placa se lavó con fosfato de amonio 10 mM y 0,1% de TFA y se secó al aire antes del análisis automatizado usando MALDI-TOF/TOF (Ultraflex con mejora LIFT II, Bruker Daltonics). El análisis por EM del digesto se llevó inicialmente a cabo en modo reflectrón midiendo de 800 a 3500 Da usando un voltaje de aceleración de 25 kV. Todos los espectros de EM se produjeron a partir de 8 conjuntos de 30 disparos de láser, necesitando cada conjunto tener una señal con respecto a ruido, S/R >6, resolución >3000 para incluirse. La calibración del instrumento se realizó externamente con iones $[\text{M}+\text{H}]^+$ de los patrones internos previamente moteados (angiotensina II, angiotensina I, neurotensina, Renina_sustrato y ACTH_Clip) para cada grupo de cuatro muestras. El modo LIFT para MALDI-TOF/TOF se llevó a cabo en un modo completamente automatizado usando el software Flexcontrol y WarpLC (Bruker Daltonics). En la etapa de TOF1, todos los iones se aceleraron a 8 kV y posteriormente se elevó a 19 kV en la celda LIFT y todos los espectros de EM/EM se produjeron

a partir de la acumulación de 550 disparos de láser consecutivos.

La selección de precursores parentales se llevó a cabo usando el software WarpLC (ver 1.0) con el flujo de trabajo de SILE (experimento de marcado de isótopos estables) de CL-MALDI. Solo se seleccionó el pico más abundante de cada par pesado o ligero separado 4 Da, siempre que su S/R fuera >50. Los compuestos separados menos de seis fracciones de CL-MALDI se consideraron iguales y por tanto solo se seleccionaron una vez.

Se generaron listas de picos usando Flexanalysis 2.4 Compilación 11 (Bruker Daltonics) con el algoritmo de búsqueda de picos Apex con S/R > 6. El barrido de EM se suavizó una vez con el algoritmo de Savitzky Golay usando una anchura de 0,2 m/z y la resta de la línea base se logró usando el algoritmo de Median con planicidad de 0,8.

La identificación de proteínas se logró usando el motor de búsqueda MASCOT (MASCOT versión 2.1.02, Matrix Science) sobre datos de EM/EM buscados por comparación con la base de datos de *P. gingivalis* obtenida de la página web de The Institute for Genomic Research (TIGR) (www.tigr.org). Los parámetros de búsqueda de MASCOT fueron: estado de carga 1+, tripsina como proteasa, se permitió la ausencia de una escisión y una tolerancia de 250 ppm para EM y 0,8 m/z para picos de EM/EM. La modificación fija se fijó para carbamidometilo de cisteína y la modificación variable fue residuos de lisina y arginina marcados con ¹⁸O del extremo C. Se empleó una estrategia de base de datos inversa como se ha descrito previamente (32) para determinar la puntuación de MASCOT de péptido mínimo requerida para omitir positivos falsos para la identificación de un único péptido. Brevemente, la base de datos consiste en tanto la secuencia de cada proteína de *P. gingivalis* predicha en su orientación normal como las mismas proteínas con su secuencia invertida (3880 secuencias). El conjunto de datos de EM/EM completo se buscó entonces por comparación con la base de datos combinada para determinar la menor puntuación de Mascot para dar el 0% de positivos falsos. Se definió un positivo falso como coincidencia positiva con la secuencia invertida (rojo en negrita y por encima de la puntuación umbral de péptidos). Se determinó que una tasa de positivos falsos para péptidos diana individuales era del 0,5% con puntuaciones de iones de péptidos Mascot de >umbral y <25. Cuando la puntuación de iones de péptidos Mascot >30, no hubo coincidencia con la base de datos inversa. Con el fin de aumentar la confianza de identificación para el péptido diana individual, los presentes inventores usaron una puntuación de iones de péptido Mascot mínima de >50 que da una probabilidad de dos órdenes de magnitud menor de identificación incorrecta que si se usara una puntuación de 30, según el algoritmo de puntuación de Mascot.

Los péptidos coincidentes se evaluaron usando los siguientes criterios, i) al menos 2 únicos péptidos con una puntuación basada en probabilidad correspondiente a un valor de $p < 0,05$ se consideraron positivamente identificados (coincidencias rojas en negrita requeridas) en los que la puntuación es $-\log X 10\log(P)$ y P es la probabilidad de que la coincidencia observada sea un evento al azar (33), ii) si solo se usó un único péptido en la identificación de una proteína específica (la identificación de tanto péptido marcado pesado como ligero se considera uno), la puntuación de iones de péptidos MASCOT debe ser superior a 50 o ese péptido se identifica en más de uno de los cuatro experimentos independientes (2 duplicados biológicos y 2 duplicados técnicos).

Debido a la incorporación mixta de uno o dos átomos de ¹⁸O en los péptidos, la contribución de la abundancia natural del isótopo de ¹⁸O y la pureza de H₂¹⁸O (a=0,97), las relaciones de los péptidos R se corrigieron matemáticamente usando la ecuación:

$$R = (I_1 + I_2) / I_0 \quad (1)$$

I₀, I₁ y I₂ se calcularon según las siguientes ecuaciones (27)

$$I_1 = \frac{aS_2 - [aJ_2 - 2(1-a)J_4]S_0 - 2(1-a)S_4}{a^2 - (2-a-a^2)J_2 + 2(1-a)^2J_4} \quad (2)$$

$$I_0 = \frac{S_0 - (1-a)I_1}{1} \quad (3)$$

$$I_2 = \frac{(S_4 - J_4I_0 - J_2I_1)}{a^2} \quad (4)$$

En las que S₀, S₂ y S₄ son las intensidades medidas del pico monoisotópico para el péptido sin marca de ¹⁸O, el pico con 2 Da superior al pico monoisotópico y el pico con 4 Da superior al pico monoisotópico respectivamente (Fig 1 A). J₀, J₂ y J₄ son las intensidades relativas teóricas correspondientes de la envuelta isotópica del péptido calculadas a partir de isótopos de EM (<http://prospector.ucsf.edu>). Sin embargo, cuando la intensidad de los segundos picos isotópicos (S₁ y S₅) fue más intensa que los primeros picos isotópicos (S₀ y S₄), la relación se calculó simplemente como S₁ dividido entre S₅. Esto fue cierto especialmente para péptidos grandes superiores a 2000 m/z en los que la

contribución del quinto pico isotópico del péptido marcado con ^{16}O al pico S_4 se vuelve significativa. El cálculo de la incorporación de $^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ mixta se determinó por la diferencia en S_2 experimental y S_2 teórica (J_2) como un porcentaje de S_4 experimental.

- 5 Las relaciones de abundancia de proteínas se determinaron promediando todos los péptidos identificados de la misma proteína, incluso cuando la misma proteína se identificara en más de una sección de gel. Los datos de cada duplicado "normal" se combinaron con las relaciones invertidas de su duplicado "inverso" respectivo proporcionando una relación promedio y error estándar para cada proteína en cada duplicado biológico. La normalización de ambos duplicados biológicos se llevó a cabo entonces similarmente a la previamente informada (34, 35). Brevemente, la relación promediada para cada duplicado biológico se multiplicó por un factor de manera que la media geométrica de las relaciones fuera igual a uno.

Preparación y análisis de células de hemo limitado y en exceso marcadas con ICAT

- 15 El marcado y la separación de proteínas se basaron en el enfoque de EM gelLC/EM (Li y col., 2003) usando el reactivo ICAT escindible (Applied Biosystems). En el documento PCT/AU2007/000890 se ha tomado otro enfoque proteómico que se incorpora en el presente documento por referencia. La proteína se precipitó primero usando TCA (16%) y se solubilizó con urea 6 M, EDTA 5 mM, 0,05% de SDS y Tris-HCl 50 mM a pH 8,3. La concentración de proteína se determinó usando el reactivo de proteína BCA y se ajustó a 1 mg/ml. 100 μg de proteína de cada condición de crecimiento se redujeron individualmente usando 2 μl de clorhidrato de Tris(2-carboxi-etil)fosfina 50 mM durante 1 h a 37 °C. La proteína reducida de la condición de crecimiento de limitación de hemo se alquiló entonces con el reactivo ICAT_{pesado} y la proteína de la condición de crecimiento de hemo en exceso con el reactivo ICAT_{ligero}. Las dos muestras se combinaron luego y se sometieron a SDS-PAGE sobre un gel precolado Novex al 10% de NuPAGE (Invitrogen). El gel se tiñó durante 5 min usando SimplyBlue™ SafeStain (Invitrogen), seguido de desteñido con agua. El carril de gel se escindió entonces en 20 secciones desde la parte superior del gel hasta el frente de colorante.

- Las secciones escindidas se trocearon adicionalmente en cubos de 1 mm³ y se digirieron en gel durante la noche y se extrajeron dos veces según el procedimiento anterior. El sobrenadante reunido se secó a vacío reducido a aproximadamente 50 μl seguido de mezcla con 500 μl de tampón de carga de afinidad antes de cargar sobre la columna de afinidad según instrucción del fabricante (Applied Biosystems). Los péptidos eluidos se secaron y la marca de biotina se escindió con TFA puro a 37 °C durante 2 h, seguido de secado a vacío reducido. Las muestras secas se suspendieron en 35 μl de 5% de acetonitrilo en 0,1% de TFA.

- 35 Se llevó a cabo EM usando un espectrómetro de masas de trampa de iones Esquire HCT (Bruker Daltonics) acoplado a un sistema UltiMate Nano LC (LC Packings - Dionex). La separación se logró usando una columna de fase inversa de LC Packings (C18 PepMap100, 75 μm de d.i. x 15 cm, 3 μm , 100Å), y se eluyó en 0,1% de ácido fórmico con el siguiente gradiente de acetonitrilo: 0-5 min (0%), 5-10 min (0-10%), 10-100 min (10-50%), 100-120 min (50-80%), 120-130 min (80-100%).

- 40 La salida de CL se conectó directamente con la fuente de nanopulverización. Las adquisiciones de EM se realizaron bajo un control de carga iónica de 10000 en el intervalo de m/z de 300-1500 con tiempo de acumulación máximo de 100 ms. Si se usa GPF se usaron tres intervalos de m/z adicionales (300-800, 700-1200 y 1100-1500) para seleccionar iones precursores y cada intervalo de m/z se llevó a cabo por duplicado para aumentar el número de péptidos identificados. La adquisición de EM/EM se obtuvo durante un intervalo de masas de 100-3000 m/z y se realizó en hasta 10 precursores para el análisis de proteomas completo inicial y 3 para análisis de ICAT para los iones múltiplemente cargados más intensos con un tiempo de exclusión activa de 2 min.

- 50 Se generaron listas de picos usando DataAnalysis 3.2 (Bruker Daltonics) usando el algoritmo de búsqueda de picos Apex con un umbral de detección de compuestos de 10000 y umbral de señal con respecto a ruido de 5. Se fijó una limitación de carga global de +2 y +3 para datos exportados. La identificación de proteínas se logró usando el motor de búsqueda MASCOT (MASCOT versión 2.1.02, Matrix Science sobre datos de EM/EM buscados por comparación con la base de datos de *P. gingivalis* obtenida de la página web de The Institute for Genomic Research (TIGR) (www.tigr.org). Los péptidos coincidentes se evaluaron adicionalmente usando los siguientes criterios, i) péptidos con una puntuación de Mowse basada en probabilidad correspondiente a un valor de p de como máximo 0,05 se consideraron positivamente identificados, en los que la puntuación es $-\log X 10(\log(P))$ y P es la probabilidad de que la coincidencia observada sea un evento al azar ii) si solo se usó un único péptido en la identificación de una proteína específica y la puntuación de MASCOT fue inferior a 30, se realizó verificación manual de los espectros. Para aumentar la confianza en la identificación de proteínas marcadas con ICAT, especialmente para aquellas con péptidos diana individuales, se aplicaron filtros adicionales del siguiente modo: i) los péptidos pesados y ligeros de un par de ICAT deben haber presentado picos de elución próximos como se ha determinado a partir de sus cromatogramas de iones extraídos ii) para proteínas con un péptido único individual, este péptido debe haberse identificado más de una vez (por ejemplo, en diferentes fracciones de SDS-PAGE o en tanto las formas de ICAT ligeras como pesadas iii) si un péptido individual no cumplió los criterios de (ii), la puntuación de MASCOT debe haber sido ≥ 25 , el valor de esperanza $\leq 0,01$ y el espectro de EM/EM debe haber presentado una serie contigua de iones tipo 'b' o 'y' considerándose los iones intensos. Las determinaciones de positivos falsos fueron como se ha

descrito anteriormente.

La relación de péptidos isotópicamente marcados con ^{13}C pesado con respecto a ^{12}C ligero se determinó usando un comando de DataAnalysis (Bruker Daltonics) y se verificó manualmente basándose en la medición de la intensidad de picos monoisotópicos (intensidad de señal y área del pico) en un único espectro de EM. El recuento de iones mínimo de iones parentales usados para la cuantificación fue 2000 aunque >96% de tanto iones precursores pesados como ligeros fue >10000. En el caso de espectros escasamente resueltos, la relación se determinó a partir del área de los cromatogramas de iones extraídos reconstruidos (CIE) de los iones parentales. Los promedios se calcularon para múltiples péptidos derivados de un única proteína parental y se eliminaron valores atípicos usando la prueba de Grubb con $\alpha = 0,05$.

La localización celular de proteínas de *P. gingivalis* se predijo usando CELLO (<http://cello.life.nctu.edu.tw> (36)). Las predicciones extracelulares, de la membrana externa, de la membrana interna y periplásmicas se consideraron que eran de la fracción de la envuelta.

Las concentraciones de ácidos grasos de cadena corta (SCFA) en sobrenadantes de cultivo libres de células (sin inocular, hemo en exceso de y hemo limitado) se determinaron por cromatografía de gases capilar basándose en el procedimiento de derivatización de Richardson y col. (37).

El coeficiente de correlación (r) entre ambos duplicados biológicos se evaluó usando la función del coeficiente de correlación de Pearson de Microsoft Excel. El coeficiente de la varianza (CV) se calculó por la desviación estándar de las relaciones de abundancia de péptidos dividido entre la media, expresada como porcentaje.

Extracción de ácidos nucleicos para análisis transcriptómico

Se extrajo ARN de muestras de 5 ml de células de *P. gingivalis* recogidas directamente del quimiostato. A cada muestra se añadieron 0,2 volúmenes de reactivo de estabilización de ARN (5% v/v de fenol en etanol absoluto). Las células se sedimentaron por centrifugación (9000 g, 5 min, 25 °C), inmediatamente se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a -70 °C para el posterior procesamiento. Las células congeladas se suspendieron en 1 ml de reactivo TRIzol (Invitrogen) por 1×10^{10} células y luego se rompieron usando perlas de vidrio Lysing Matrix B (MP Biomedicals) y el homogeneizador Precellys 24 (Bertin Technologies, Francia). Las perlas de vidrio se eliminaron por centrifugación y la fracción de ARN se purificó según el protocolo del fabricante de TRIzol (Invitrogen), excepto que se añadió etanol (a una concentración final del 35%) en vez de isopropanol en la etapa de precipitación de ARN y las muestras se transfirieron entonces a las columnas de centrifugación del kit de aislamiento de ARN Illustra RNeasy Mini (GE Healthcare). El ARN se purificó según las instrucciones del fabricante de la etapa de unión más adelante, que incluye tratamiento de ADNsa en columna para eliminar cualquier ADN residual. La integridad del ARN se determinó usando la estación de electroforesis automatizada Experion (Bio-Rad).

Se extrajo ADN genómico de células de *P. gingivalis* que se cultivaron en cultivo continuo usando el kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen) según las instrucciones del fabricante.

Diseño de micromatrices, hibridación y análisis

Se imprimieron portaobjetos de micromatrices por Australian Genome Research Facility y consistieron en 1977 sondas de oligonucleótidos 60-meros diseñados a medida para las regiones codificantes de proteína predichas del genoma de W83 de *P. gingivalis* que incluyen regiones codificantes de proteína adicionales predichas por el proyecto Oralgen de Los Alamos National Laboratory. Se incluyeron sondas de control del conjunto de muestras de micromatrices (MSP) para ayudar en la normalización dependiente de la intensidad. El complemento completo de sondas se imprimió 3 veces por portaobjetos de micromatriz sobre portaobjetos recubiertos con UltraGAPS de Corning.

Los portaobjetos se hibridaron usando tanto muestras con hemo en exceso como de hemo limitadas marcadas con Cy3, se combinaron con una referencia de ADN genómico universal marcada con Cy5 (GE Lifesciences). Se sintetizó ADNc a partir de 10 μg de ARN total usando el sistema SuperScript plus indirect cDNA labelling (Invitrogen), con 5 μg de hexámeros al azar (Invitrogen) para el cebado de la reacción de síntesis de ADNc. El ADNc se marcó con Cy3 usando el paquete de colorante reactivo después del marcado Amersham CyDye (GE Lifesciences) y se purificó usando el módulo de purificación del sistema de marcado Invitrogen. Se sintetizó ADNc genómico marcado con Cy5-dUTP de un modo similar a partir de 400 ng de ADN, usando el sistema BioPrime Plus Array CGH Indirect Genomic Labelling (Invitrogen). Antes de la hibridación, los portaobjetos de micromatrices se sumergieron durante 1 h en disolución de bloqueo (35% de formamida, 1% de BSA, 0,1% de SDS, 5X SSPE [1 X SSPE es NaCl 150 mM, NaH_2PO_4 10 mM, EDTA 1 mM]) a 42 °C. Después de bloquear los portaobjetos se lavaron brevemente en H_2O , seguido de 99% de etanol y luego se secaron por centrifugación. Los ADNc marcados se resuspendieron en 55 μl de tampón de hibridación (35% de formamida, 5X SSPE, 0,1% de SDS, 0,1 mg ml^{-1} de ADN de esperma de salmón) desnaturalizado a 95 °C durante 5 min, luego se aplicaron a portaobjetos y se cubrieron con LifterSlips (Erie Scientific). La hibridación se realizó a 42 °C durante 16 h. Tras la hibridación, los portaobjetos se lavaron sucesivamente en 0,1% de SDS más 2X SSC [1X SSC es NaCl 150 mM, citrato de sodio 15 mM] (5 min a 42

°C, todos los lavados posteriores se realizaron a temperatura ambiente), 0,1% de SDS más 0,1X SSC (10 min), 0,1X SSC (4 lavados, 1 min cada uno), y luego sumergiendo rápidamente en 0,01X SSC, luego 99% de etanol y usando centrifugación para secar los portaobjetos.

5 Los portaobjetos se barrieron usando un escáner de micromatrices GenePix 4000B y las imágenes se analizaron usando el software GenePix Pro 6.0 (Molecular Devices). Se usaron tres portaobjetos para cada tratamiento (limitación de hemo o exceso de hemo) que representan tres duplicados biológicos.

10 El análisis de imágenes se realizó usando el software GenePix Pro 6.0 (Molecular Devices), y se usaron valores de referencia "morf" como los cálculos estimados de referencia en el posterior análisis. Para identificar genes diferencialmente expresados, el paquete de software LIMMA se usó con un corte de $P < 0,005$. Dentro de la matriz se realizó la normalización ajustando una curva de Loess global a través de los puntos de control de MSP y aplicando la curva a todos los otros puntos. Se usó el método de Benjamini Hochberg para controlar la tasa de descubrimientos falsos para corregir múltiples pruebas.

15 Las predicciones de genes se basaron en la anotación del genoma de W83 de *P. gingivalis* a partir del The Institute for Genomic Research (TIGR, www.tigr.org). La predicción de operones se llevó a cabo a partir de la página web Microbesonline (<http://microbesonline.org>)

20 *Respuesta de P. gingivalis a limitación de hemo como se ha determinado usando análisis de micromatrices de ADN*

Un análisis de micromatrices de ADN del efecto del crecimiento limitado por hemo sobre la expresión génica global de *P. gingivalis* se llevó a cabo bajo condiciones de crecimiento idénticas a las empleadas para el análisis proteómico. El análisis de los datos de tres duplicados biológicos identificaron un total de 160 genes que mostraron regulación diferencial estadísticamente significativa entre exceso de hemo y limitación de hemo, mostrando la mayoría de estos genes elevados niveles de expresión en condiciones de limitación de hemo y siendo solo 8 genes regulados por disminución. Se predijo que muchos de los genes regulados por incremento estaban en operones y la mayoría de estos mostraron cambios similares en niveles de transcritos (Tabla 3 y 5). Hubo un amplio acuerdo entre los datos transcriptómicos proteómicos con una correlación significativa entre los dos conjuntos de datos en los que se observó regulación diferencial tras la limitación de hemo [correlación de Spearman 0,6364, $p < 0,05$]. Sin embargo, para algunas de las proteínas que muestran diferencias en abundancia del análisis proteómico, el análisis transcriptómico de los genes correspondientes no detectó ninguna diferencia estadísticamente significativas en la abundancia del ARNm. Los análisis de micromatrices tendieron a identificar solo aquellos genes que codificaban proteínas que tenían grandes cambios en abundancia como se ha determinado por el análisis proteómico (**Tablas 3 y 5**). Si se encontró que proteína y transcrito del mismo gen estaban significativamente regulados por limitación de hemo, la mayoría mostró la misma dirección de regulación. Las excepciones fueron dos productos génicos, PG0026, una proteína de la familia putativa CTD de la proteinasa de la superficie celular y PG2132, una fimbriina (FimA). Estas proteínas disminuyeron en abundancia en el análisis proteómico bajo limitación de hemo, pero se predijo que se regulaban por incremento por el análisis transcriptómico. Ambas de estas proteínas están localizadas en la superficie celular y es bastante posible que sean tanto liberadas de la superficie celular como modificadas postraduccionalmente lo que podría descartarlas de ser identificadas como reguladas por incremento en el análisis proteómico.

45 *Susceptibilidad de P. gingivalis a agentes inhibidores de Frd*

El efecto de agentes inhibidores de Frd sobre *P. gingivalis* se llevó a cabo en cultivos líquidos. Brevemente, W50 se cultivó en 200 ml de medio BHI hasta DO de 0,6 ($\sim 2,9 \times 10^9$ ufc/ml). Las células se resuspendieron entonces en medio de crecimiento fresco a una concentración final de $2,5 \times 10^7$ ufc/ml. Se disolvieron pamonato de oxantel, citrato de morantel y tiabendazol (Sigma) en DMSO para lograr concentraciones madre de 250 mM. Entonces se mezclaron 4 μ l de la disolución de prueba con 196 μ l de suspensión de células y se transfirieron a placas de fondo plano de 96 pocillos, seguido de incubación a 37 °C en condiciones anaerobias y se monitorizaron cada hora durante un periodo de 50 h midiendo la densidad óptica del cultivo a 620 nm usando un lector de microplacas iEMS (Labsystems OY Research Technologies Division). Los tiempos de generación media de *P. gingivalis* en presencia de diferentes agentes inhibidores se calcularon dividiendo el tiempo de duplicación [$(\log_{10}N_t - \log_{10}N_0) / \log_{10}2$] entre el tiempo ($N_t - N_0$) en la que N_t y N_0 son población de células en el tiempo t y tiempo cero, respectivamente.

Efectos de agentes inhibidores de Frd sobre biopelícula de P. gingivalis

60 La formación de biopelícula de *P. gingivalis* durante 48 h en un modo estático de 96 pocillos se determinó como se ha descrito previamente. Brevemente, células ATCC 33277 de *P. gingivalis* se resuspendieron a una densidad de células final de $2,5 \times 10^7$ antes de mezclar con las sustancias de prueba, seguido de transferencia a placas de fondo plano de 96 pocillos, y se incubaron anaeróticamente a 37 °C. La evaluación de la masa de biopelícula se llevó a cabo a 24 h y 48 h lavando las células dos veces con 250 μ l de agua ultrapura para eliminar células adheridas sueltas, seguido de secado a 37 °C durante 3 h. La biopelícula seca se tiñó entonces en una disolución de 0,1% de cristal violeta durante 15 min y se lavó 2 veces con 250 μ l de agua ultrapura. La tinción con cristal violeta se disolvió entonces de la biopelícula usando una disolución de 80% de etanol y 20% de acetona durante 2 min mediante

pipeteado repetido antes de transferir a una nueva placa de 96 pocillos para la medición de la densidad óptica a 620 nm.

Cultivo de biopelícula en celdas de flujo y análisis por CSLM

5 El cultivo de biopelícula de ATCC 33277 de *P. gingivalis* en celdas de flujo fue similar al previamente descrito con varias modificaciones. Se fijó un sistema de celda de flujo de 3 canales (Stovall Life Science, EE.UU.) en una cámara anaerobia (estación de trabajo anaerobia MK3; Don Whitley Scientific Ltd.) y se modificó con tubos de bomba de silicona (Gilson, Francia) y llaves de paso para la inoculación, prueba y tinción de las biopelículas bacterianas. Todas las partes se ensamblaron y se bombeó 0,5% de hipoclorito de sodio en el sistema y se dejó durante la noche para esterilizar el sistema. Luego se usó agua estéril (200 ml) para lavar el sistema antes de la adición del medio de crecimiento. El sistema se inoculó con 1 ml de *P. gingivalis* exponencialmente creciente diluido a 0,1 de DO₆₀₀. El sistema se incubó durante 1 h antes de flujo constante (0,2 ml/min) de 5x BHI diluido (Oxoid) complementado con 0,1 g/l de cisteína, 1 mg/l de hemina y 1 mg/l de vitamina K. Después de 18 h se inyectó 1 ml de 125 µM o 12,5 µM de Oxantel o agua estéril en cada canal del sistema y se incubó durante 30 min. El flujo de medio continuó durante otros 10 min para eliminar por lavado cualquier célula sin unir debido a la prueba. Luego se usó tinción con BackLight (Molecular Probes) para teñir la biopelícula *in situ* (véase más adelante).

20 Se llevó a cabo microscopía de barrido láser confocal (CLSM) de las biopelículas bacterianas en un microscopio confocal Meta 510 con una platina invertida (Zeiss). Se obtuvieron imágenes de secciones optodigitales horizontales (xy), cada una de 2 µm de espesor sobre el espesor completo de la biopelícula (z), usando 63x objetivo a 512 x 512 píxel (0,28 µm por píxel), con cada marco a 143,86 µm (x) x 143,86 µm (y). Para determinar la reproducibilidad a través de la biopelícula se obtuvieron 5 imágenes en posiciones al azar de cada uno de dos duplicados biológicos a longitudes de onda de 488 nm y 568 nm para cada canal. Todas las imágenes obtenidas se analizaron usando el software COMSTAT. Las microcolonias se definieron como agrupación de células con >500 recuentos de píxeles.

Viabilidad de células dispersadas por tratamiento con oxantel

30 Para probar la viabilidad de células dispersadas por tratamiento con oxantel se realizó un ensayo de biopelícula estático como se ha descrito anteriormente, pero con ligeras modificaciones. Brevemente, *P. gingivalis* (ATCC 33277) se dejó formar biopelícula en microplacas de 24 pocillos después de 18 h de incubación. Las células planctónicas de libre flotación se eliminaron primero y la biopelícula se lavó una vez con PBS. Se añadió 1 ml de 125 µM o 12,5 µM de oxantel o agua estéril (control positivo) a cada pocillo y se incubó durante 30 min. El número de células de *P. gingivalis* dispersas que todavía son viables se determinó por análisis en cultivo sobre placas de agar de sangre de caballo después de dilución seriada en BHI.

Análisis estadístico

40 El coeficiente de correlación (r) entre ambos duplicados biológicos se evaluó usando la función del coeficiente de correlación de Pearson de Microsoft Excel. El coeficiente de la varianza (CV) se calculó por la desviación estándar de las relaciones de abundancia de péptidos divididas entre la media, expresada como un porcentaje.

Cultivo continuo y formación de biopelícula

45 Se cultivó W50 de *P. gingivalis* en cultivo continuo durante un periodo de 40 días durante el cual la densidad celular del cultivo permaneció constante después de los 10 primeros días con una DO₆₅₀ de 2,69 ± 0,21 y 2,80 ± 0,52 para los duplicados biológicos 1 y 2 respectivamente. Esto es equivalente a una densidad celular de ~3 mg de peso seco celular/ml. Durante este periodo de tiempo se desarrolló una biopelícula de células de *P. gingivalis* sobre la pared de vidrio vertical del recipiente del fermentador. Esta biopelícula tuvo ~2 mm de espesor en el momento de la recogida.

Validación del procedimiento de cuantificación de ¹⁶O/¹⁸O usando BSA

55 Para determinar la precisión y reproducibilidad del procedimiento de cuantificación de ¹⁶O/¹⁸O, cantidades conocidas de BSA se cargaron sobre carriles de gel adyacentes para dar relaciones de 1:1, 1:2, 1:5 y 10:1 (Fig 1B). Las bandas se sometieron a digestión trípica en gel en presencia de tanto H₂¹⁶O como H₂¹⁸O, se mezclaron y luego se analizaron por EM CL MALDI-EM/EM. Un conjunto típico de espectros para un único péptido trípico de BSA a través de las cuatro relaciones muestra la incorporación preferencial de dos átomos de ¹⁸O, que se observa más claramente por la predominancia del pico de +4 Da en la relación de BSA 10:1, y por el doblete casi simétrico en el espectro de 1:1, simplificando tanto la cuantificación como la identificación (Fig 1A). La incorporación promedio de un único átomo de ¹⁸O se estimó que fue <7% basándose en el marcado 1:1 (tabla adicional). Las relaciones promedio calculadas para todos los péptidos de BSA identificados fueron 0,98 ± 0,12, 2,22 ± 0,26, 4,90 ± 0,75 y 10,74 ± 2,04 para relaciones de 1:1 (triplicado), 2:1 (y 1:2), 1:5 y 10:1, respectivamente, que indica buen intervalo dinámico, alta precisión de ± 2-11% y un bajo CV que oscila del 11,75% al 18,95% (Tabla 1). La precisión reproducible de la mezcla 1:1 (realizada por triplicado) implica que el sesgo del marcado era muy bajo. Esto se confirmó adicionalmente comparando BSA marcada normal e inversa a una relación 2:1 usando solo péptidos que se identificaron en ambos experimentos. Se determinó que la relación normal era 2,11 ± 0,33, mientras que la inversa

era $2,30 \pm 0,20$ (Tabla 1).

Diseño experimental para el análisis cuantitativo de muestras de biopelícula y planctónicas

5 El diseño de este estudio implicó el uso de dos duplicados biológicos, es decir, dos cultivos continuos independientes, cada uno fraccionado en una muestra de biopelícula obtenida de las paredes del recipiente, y una muestra planctónica obtenida del contenido de fluido del recipiente. Se realizaron dos duplicados técnicos por cada duplicado biológico, y aunque los presentes inventores establecieron que no hubo sesgo de marcado significativo con BSA, los presentes inventores eligieron utilizar la estrategia de marcado inverso ya que había una falta de
10 estudios de validación del marcado con $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ que se habían realizado en muestras biológicas complejas (30). Por tanto, en total hubo cuatro experimentos, consistiendo cada uno en 10 ejecuciones de EM CL-MALDI/EM que se originaron a partir de 2×10 segmentos de gel.

15 La Figura 2 muestra espectros de EM y EM/EM típicos de dos péptidos marcados normales e inversos de las muestras de biopelícula/planctónicas que ilustran el patrón de marcado inverso típico. Al igual que con los datos de BSA, podría observarse que había un alto nivel de incorporación de ^{18}O doble siendo la incorporación mixta promedio calculada $<15\%$ para todos los péptidos, confirmando que el procedimiento de marcado proteolítico de $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ también fue eficaz con muestras complejas (datos no mostrados). La predominancia de péptidos doblemente marcados se confirmó adicionalmente por los relativamente pocos éxitos de Mascot para las especies de $+2$ Da. Los
20 espectros de EM/EM de los péptidos marcados pesados revelaron adicionalmente los desplazamiento de $+4$ Da esperados en los iones Y (Fig 2).

Correlación entre duplicados técnicos

25 Para comparar duplicados técnicos de los datos biológicos, la abundancia transformada por \log_{10} de relaciones de proteína de cada par de experimentos marcados normales e inversos se representaron los unos frente a los otros (Fig 3). La regresión lineal de estas representaciones indicó que cada par estaba altamente correlacionado con valores de R^2 de 0,92 y 0,82 para el duplicado biológico 1 y 2, respectivamente. La pendiente de cada ajuste lineal también fue similar al valor esperado de 1,0 a 0,97 y 0,93 para el duplicado biológico 1 y 2, respectivamente, que
30 indica que no hay sesgo de marcado entre los duplicados técnicos (Fig 3). La abundancia de relaciones de proteína de los duplicados técnicos se promedió dando una única relación para cada duplicado biológico.

Correlación de duplicados biológicos

35 Antes de comparar los datos promedio para los dos duplicados biológicos, las relaciones de abundancia de proteínas de cada duplicado biológico se normalizaron dando una relación media promedio de 1,0. Una representación de las relaciones de abundancia de proteínas normalizadas de ambos duplicados biológicos presenta una distribución similar a gaussiana estrechamente centrada en cero (Fig 4A) similar a la descrita por otros (40, 41). Hubo una significativa correlación positiva entre los dos duplicados biológicos (coeficiente de correlación de Pearson
40 $r = 0,701$, $p < 0,0001$) que indica que el crecimiento de los cultivos de biopelícula/planctónicos y todo el procesamiento aguas abajo de las muestras podría reproducirse a un nivel satisfactorio. Para determinar qué proteínas se regularon coherentemente en los dos duplicados biológicos se construyó un simple diagrama de clasificación en el que las proteínas se dividieron en 6 grupos (A-F) según su relación de abundancia y luego se clasificaron 1-6 según la correlación basada en grupos, teniendo aquellos clasificados con 1 la mayor similitud
45 cuando una proteína de ambos duplicados biológicos se encontraba dentro del mismo grupo (Fig 4B). Usando el diagrama de clasificación, los presentes inventores pudieron determinar que 34 de las 81 (42%) proteínas identificadas de ambos duplicados se clasificaron con el número uno, considerablemente superior al valor esperado para una correlación al azar que sería del 17% (o 1/6). La mayoría de las restantes proteínas se clasificaron con el número dos y, por tanto, en total, 70 proteínas (86,4%) se consideraron que estaban similarmente reguladas entre
50 los dos experimentos (se clasificaron 1 ó 2; Tabla 2).

Basándose en la desviación estándar medida ($\pm 0,26$) del experimento de marcado de BSA a 2:1 (Tabla 1), los cambios en la abundancia de proteínas se consideraron biológicamente significativos cuando se diferenciaron 1,0 por >3 desviaciones estándar (tanto $>1,78$ o $<0,56$) (18, 42). Usando este criterio, la abundancia de 47 de las 81
55 proteínas identificadas en ambos duplicados cambió significativamente (basándose en las relaciones promedio), y de estas, 42 se clasificaron tanto como 1 como 2 (Tabla 2). De las 42 proteínas clasificadas con 1 y 2, 24 tuvieron abundancia significativamente elevada y 18 tuvieron abundancia disminuida.

Enzimas de rutas metabólicas que muestran regulación coordinada

60 Veinte proteínas que participaron en el catabolismo de glutamato/aspartato se identificaron en el estudio de limitación de hemo frente a exceso de hemo usando estrategias de marcado con ICAT (Tabla 3). De aquellas se identificaron enzimas que catalizan seis de las ocho etapas que participaron directamente en el catabolismo de glutamato a butirato y se encontró que había aumentado 1,8 a 4 veces bajo limitación de hemo (Fig. 6, Tabla 3).
65 Aunque las otras dos enzimas catalíticas (PG0690, 4-hidroxibutirato CoA-transferasa y PG1066, butirato-acetoacetato CoA-transferasa) no se detectaron usando ICAT, se encontró que estaban presentes en un estudio

5 cualitativo separado a intensidades de iones altas comparables a aquellas proteínas informadas en la Tabla 3 y pertenecen a operones que se mostró que se regulaban por incremento. Por otra parte, se mezcló el efecto de la limitación de hemo sobre las abundancias de las enzimas de la ruta catabólica del aspartato, siendo invariables las enzimas que catalizan la rotura de aspartato a oxaloacetato en la ruta de degradación oxidativa y mostrando las enzimas que participan en la conversión de piruvato a acetato un aumento de 2 a 4,4 veces.

10 La abundancia de dos enzimas fumarato reductasa que contienen hierro, FrdA (PG1615) y FrdB (PG1614), que juntas catalizan la conversión de fumarato a succinato mediante la ruta reductora de aspartato, se redujo significativamente en células cultivadas en limitación de hemo (**Figura 6, Tabla 3**). Estas dos proteínas, que están codificadas en un operón (Baughn y col., 2003), muestran cambios similares en abundancia en respuesta a limitación de hemo (UE de FrdA = 0,35; L/E de FrdB = 0,25).

Análisis de productos finales de ácidos orgánicos

15 Las cantidades de acetato, butirato y propionato en el medio agotado de cultivo de *P. gingivalis* cultivado bajo limitación de hemo fueron $13,09 \pm 1,82$, $7,77 \pm 0,40$ y $0,71 \pm 0,05$ mmol/g de peso seco celular, respectivamente. Los niveles de acetato, butirato y propionato en el medio agotado de cultivo de *P. gingivalis* cultivado en exceso de hemo fueron $6,00 \pm 0,36$, $6,51 \pm 0,04$ y $0,66 \pm 0,07$ mmol/g de peso seco celular, respectivamente.

Efectos de agentes inhibidores de Frd sobre el crecimiento de P. gingivalis

20 El efecto de diferentes concentraciones de los tres antihelmínticos oxantel, morantel y tiabendazol sobre el crecimiento de W50 de *P. gingivalis* durante 50 h se mostró en las Figuras 7, 8 y 9. El efecto de DMSO sobre el crecimiento fue insignificante como se observa en el TGM de *P. gingivalis* con estudios informados previos y W50 solo (43,44). El efecto más profundo de estos tres agentes inhibidores sobre el crecimiento de *P. gingivalis* es oxantel (**Fig. 7**). De las curvas de crecimiento, es evidente que hay inhibición positiva de oxantel sobre el crecimiento de *P. gingivalis* a concentraciones superiores a 15 μM . Se determinó que las concentraciones inhibitoras mínimas (CIM) de oxantel como se ha descrito previamente (45) fueron 112 μM . También hubo una correlación significativa de concentración creciente de oxantel con mayor TGM como se observa para C_{sub}M de oxantel (**Fig 7A**). El efecto bactericida de morantel fue comparablemente menor que el de oxantel con CIM de - 3 mM, pero todavía muestra efectos inhibitorios significativos a C_{sub}M (**Fig 8**). El tiabendazol parece no tener efectos inhibitorios muy significativos sobre el crecimiento de *P. gingivalis* y aparentemente requiere más de 1 mM para ligeros efectos inhibitorios sobre el crecimiento (**Fig 9**). En conclusión, se estimó que los efectos inhibitorios de los diferentes agentes inhibitorios de Frd estaban en el orden de oxantel » morantel > tiabendazol.

Efectos de concentraciones inhibitoras submínimas de oxantel sobre la formación de biopelícula

35 El oxantel, que tiene los efectos más profundos sobre el crecimiento de *P. gingivalis*, se usó para estudiar sus efectos sobre la formación de biopelícula. En la prueba de biopelícula, la cepa ATCC 33277 de *P. gingivalis* se usó en lugar de W50, ya que la última forma biopelículas solo escasamente bajo la mayoría de las circunstancias. Como el efecto inhibitorio del crecimiento de oxantel sobre la cepa ATCC 33277 es similar a W50 en ensayos planctónicos a 125 μM (**Fig 7B**), representa por tanto un buen modelo para estudiar los efectos de oxantel sobre la formación de biopelícula. Oxantel a concentraciones inhibitoras submínimas (C_{sub}M) de tan solo 0,1 μM redujo significativamente la masa de biopelícula a 24 h (**Fig. 10A**), aunque concentraciones de 3,9 μM o superiores fueron necesarias para tener un efecto inhibitorio sobre la masa de biopelícula a 48 h (**Fig. 10B**).

Efecto de oxantel sobre la dispersión de biopelícula

40 Para estudiar más estrechamente los efectos de C_{sub}M de oxantel, sobre biopelículas de *P. gingivalis* se usó un sistema de cultivo en celda de flujo. Hubo una reducción significativa en la profundidad y tamaño de la biopelícula de microcolonias cuando la biopelícula madura se trató con oxantel ($P < 0,01$), mientras que no hubo diferencia significativa en el número de microcolonias entre las muestras de control y tratadas (**Figs. 11-13, Tabla 6**).

50 Se liberaron células de *P. gingivalis* de la biopelícula que siguió viable especialmente para la biopelícula tratada con oxantel 12,5 μM (**Fig. 14**). Las células de control no tratadas parecieron más resistentes a la dispersión con respecto a células tratadas con oxantel. El número de células recuperadas de la biopelícula también está de acuerdo con el observado bajo el CLSM (**Figs. 11-13**) con significativamente mayor número de células en la muestra de control.

60 Los resultados anteriores ilustran los cambios en la abundancia de proteínas que se producen cuando células de *P. gingivalis* planctónicas se adhieren a una superficie sólida y se cultivan como parte de una biopelícula de mono especie madura. Es el primer estudio comparativo de biopelícula bacteriana frente a crecimiento planctónico en utilizar tanto el enfoque de EM de geLC del grupo de Gygi (46) como el procedimiento de marcado proteolítico con $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ para determinar cambios en abundancias de proteínas ya que todos los estudios publicados hasta la fecha han utilizado procedimientos basados en electroforesis en gel 2D (10-12). Un enfoque de marcado inverso con $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ de dos duplicados técnicos y dos duplicados biológicos se empleó satisfactoriamente para cuantificar y validar los cambios en abundancia de proteína.

Cultivo continuo de P. gingivalis

En este estudio, W50 de *P. gingivalis* se cultivó en cultivo continuo a diferencia de la metodología más tradicional de cultivo en lotes. El cultivo en lotes introduce un gran intervalo y grado de variación en análisis bacterianos debido a variables entre los lotes tales como: tamaño y viabilidad del inóculo, etapa de crecimiento exacto de la bacteria cuando se recoge, niveles de nutrientes disponibles en el medio y potencial redox del medio, entre otros factores. En cultivo continuo, la bacteria se cultiva durante muchas generaciones bajo condiciones estrictamente controladas que incluyen tasa de crecimiento, densidad celular, concentraciones de nutrientes, temperatura, pH y potencial redox (44, 47, 48). Un estudio previo ha demostrado un alto nivel de reproducibilidad de análisis transcriptómicos de *Saccharomyces cerevisiae* continuamente cultivados en quimiostatos en diferentes laboratorios (49). Además, en el estudio de los presentes inventores, el crecimiento de tanto células de biopelícula como planctónicas se llevó a cabo en un único recipiente de fermentación, reduciendo la variabilidad con respecto a cultivos separados. Los coherentes cambios en las abundancias de proteína de la envuelta de células *P. gingivalis* entre duplicados biológicos del 86,4% de las proteínas identificadas (clasificadas 1 y 2) observadas en este estudio ilustran la aplicabilidad del sistema de cultivo continuo y la estrategia de marcado proteolítico con $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ para el análisis del efecto del crecimiento de biopelícula sobre el proteoma de *P. gingivalis*.

Eficiencia del marcado con ^{18}O

El procedimiento proteómico básico empleado en este estudio fue el procedimiento de EM de geLC (46, 50) debido a la alta resolución y solubilidad de proteínas de membrana que proporciona el procedimiento de SDS-PAGE. Este procedimiento se combinó con una única reacción de marcado con ^{18}O durante el procedimiento de digestión en gel similar al descrito por otros (26-29). Un marcado eficiente debe producir la incorporación de dos átomos de ^{18}O en el extremo C de cada péptido y debe ser resistente al retro-intercambio con ^{16}O . Se encontró que éste era el caso en el estudio de los presentes inventores con BSA cuando el nivel de incorporación de un único átomo de ^{18}O se estimó que era de <7% y se encontró que las relaciones medias obtenidas para diversos experimentos con BSA no favorecían significativamente ^{16}O (Tabla 1), sugiriendo que el retro-intercambio con agua normal no era una problema. También se obtuvieron resultados similares para las muestras biológicas. Una etapa crucial para el eficaz marcado con ^{18}O fue la necesidad de la eliminación completa del H_2^{16}O natural, seguido de la resolubilización de la proteína en H_2^{18}O antes de la digestión triptica empleando un procedimiento de "una sola digestión". Aunque varios estudios han usado una procedimiento "de digestión doble" (51, 52), el procedimiento de una sola digestión tiene la ventaja de dar una mayor eficiencia de marcado con ^{18}O , ya que en el procedimiento de digestión doble algunos péptidos tripticos fueron incapaces de intercambiar cualquiera de sus átomos de ^{16}O del extremo C con un átomo de ^{18}O después de la digestión inicial (53). Los presentes inventores utilizaron adicionalmente un procedimiento de digestión en gel en el que la proteína es retenida en la matriz de gel durante la etapa de deshidratación inicial usando disolventes orgánicos como en cualquier protocolo de digestión en gel convencional. La eliminación completa de cualquier traza de H_2^{16}O natural se logró mediante la liofilización por centrifugación a vacío mientras que la proteína todavía estuvo dentro de la matriz de gel para prevenir las posteriores pérdidas adsorptivas durante la etapa de liofilización inicial. La rehidratación y la digestión en gel se llevaron a cabo en H_2^{18}O que contenía un gran exceso de tripsina, que también se reconstituyó en H_2^{18}O . Durante el procedimiento de digestión, los péptidos tripticos liberados del gel después de la incorporación del primer átomo de ^{18}O pueden experimentar el procedimiento de intercambio del segundo oxígeno del carbonilo mediado por la tripsina en exceso. Esto debe promover la sustitución del segundo oxígeno del carbonilo, ya que los péptidos liberados tendrían mayor solubilidad que las proteínas, produciendo así un mayor nivel de péptidos tripticos doblemente marcados con ^{18}O (Figs 1 y 2; (54)). Con el fin de prevenir el retro-intercambio con agua normal, la tripsina se desactivó hirviendo, que se había mostrado previamente que era eficaz (51,54). Además, la mezcla desactivada secada solo se resuspendió y mezcló inmediatamente antes de la inyección sobre una NanoLC para minimizar el intercambio espontáneo, aunque este intercambio espontáneo se ha mostrado que es muy bajo (15,40).

Marcado inverso

En el caso del marcado y cuantificación de isótopos estables usando EM, los errores se introducen probablemente durante el procedimiento de marcado e ionización. Estos errores incluyen la potencial afinidad diferente de la marca y el posible efecto de supresión de los péptidos marcados pesados o ligeros durante el procedimiento de MALDI (13, 55). Duplicados técnicos tradicionales que implican repetir el mismo marcado podrían producir un sesgo hacia una marca particular o error al azar elevado de péptidos específicos debido a picos contaminantes. Los duplicados técnicos marcados normales e inversos de los presentes inventores demostraron un alto grado de correlación con gradientes de representaciones de dispersión de 0,97 ($R^2 = 0,92$) y 0,93 ($R^2 = 0,82$) para los duplicados biológicos 1 y 2, respectivamente (Fig 3), que es próximo a la relación esperada de 1,0 para sesgo no marcado. Estos gradientes también indican que el procedimiento fue reproducible con respecto a la estimación de proteínas, carga de gel, escisión del gel y digestión en gel. La falta de sesgo sugiere que podrían ser innecesarias rutinas de normalización como intercambio de colorante o normalización de datos de LOWESS usados rutinariamente en experimentos de micromatriz (35). Sin embargo, las muestras que son considerablemente más complejas que las envueltas de la célula bacteriana usadas en este estudio pueden todavía requerir validación del marcado inverso como cuando se considera la influencia de péptidos contaminantes menores en el cálculo de las relaciones $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ y la necesidad de verificar péptidos con cambios extremos. El diseño de marcas inversas, además de proporcionar un cálculo estimado

y medios para corregir errores sistémicos, tuvo el beneficio adicional de permitir que se identificaran fácilmente tanto los péptidos marcados pesados como ligeros, ya que el procedimiento de adquisición de EM/EM solo seleccionó el péptido más intenso en cada par pesado/ligero con respecto al fragmento. De esta forma se reduce la posibilidad de asignación incorrecta. A nuestro conocimiento, este es el primer informe de marcado con $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ inverso en una muestra biológica compleja distinta de la reciente cuantificación de las diecisiete proteínas de citocromo P450 (26,30).

Cultivo de biopelículas frente a planctónico

Los presentes inventores han demostrado una fuerte correlación positiva entre los duplicados biológicos ($r = 0,701$, $p < 0,0001$) que indican que hubo reproducibilidad en la formación y desarrollo de biopelículas. Esto también se observó por el hallazgo de que se observó que 70 de las 81 proteínas cuantificables presentaban relaciones similares en ambos duplicados biológicos (Tabla 2, clasificados 1 ó 2). Más de tres cuartos de las proteínas de *P. gingivalis* identificadas en este estudio se identificaron por >2 péptidos únicos, aumentando adicionalmente la confianza de la identificación y cuantificación de este procedimiento de marcado. De las 81 proteínas coherentemente identificadas de ambos duplicados biológicos, 47 cambiaron significativamente en abundancia del estado planctónico al de biopelícula. El cambio en la abundancia de un porcentaje del proteoma detectado, especialmente en la envuelta de la célula, está de acuerdo con otros estudios de bacterias formadoras de biopelículas tales como *Pseudomonas aeruginosa*, en las que más del 50% del proteoma detectado se mostró que presentaba cambios significativos en la abundancia entre fases de crecimiento planctónicas y de biopelícula madura. (12). Los presentes inventores observaron adicionalmente un amplio intervalo de respuestas en el proteoma de la envuelta de la célula de *P. gingivalis* al crecimiento como una biopelícula. Varias proteínas que demostraron previamente que se alteraban en abundancia en respuesta a cultivo de biopelícula también se encontró que habían cambiado en abundancia en el estudio de los presentes inventores. Sorprendentemente se observaron algunas proteínas que habían cambiado en abundancia hasta cinco veces (Tabla 2), sugiriendo algunos desplazamientos importantes en el proteoma en respuesta al cultivo de biopelículas.

Metabolismo

La principal fuente de energía para *P. gingivalis* se deriva de la fermentación de aminoácidos que se obtienen en forma de péptido por la hidrólisis proteolítica de proteínas huésped (47, 80, 81). Las principales rutas catabólicas de *P. gingivalis* son la fermentación de glutamato y aspartato en la que el glutamato se metaboliza a butirato, propionato y amoniaco, y el aspartato se metaboliza a butirato, propionato, acetato y amoniaco (**Fig. 6**). Informes previos han mostrado que *P. gingivalis* utiliza preferencialmente aspartato/asparagina, glutamato/glutamina, treonina, serina, leucina y valina del medio de cultivo (47, 81, 82).

Dos proteínas de *P. gingivalis* que participan en el catabolismo de glutamato, PG1076 (UE = 1,8) y PG1078 (UE = 2,0), aumentaron significativamente en abundancia durante la limitación de hemo. Estas proteínas están codificadas por genes dispuestos en un gran operón predicho de 15 genes. En la dirección 5' de estos genes están dos genes que codifican una proteína hipotética y una proteína hipotética conservada cuya abundancia también aumentó durante la limitación de hemo (PG1067, UE = 2,4 y PG1068, UE = 1,7, respectivamente). El análisis de este gran operón reveló adicionalmente la presencia de una región de unión consenso Fur putativa característica de muchos genes regulados por hierro (83), que sugiere que la expresión podría controlarse por la disponibilidad de hierro. Aunque los presentes inventores esperaron que el cambio en veces de todas las proteínas codificadas en un operón fuera el mismo, esto no es necesariamente el caso en todos los casos, ya que el nivel de transcrito algunas veces no se correlaciona con los niveles de proteína (84). Esto podría ser debido a modificaciones postraduccionales o estabilidad del transcrito, permitiendo que se produzca una regulación sustancial de eventos celulares al nivel de proteína sin cambio aparente de la abundancia de ARNm.

La conversión de fumarato a succinato mediante la ruta de aspartato está catalizada por un complejo heterotrímico de succinato-quinona oxidoreductasa (SQOR) que consiste en dos enzimas citoplásmicas FrdA (1615) y FrdB (1614) y una FrdC transmembrana (1616). La abundancia de las dos enzimas fumarato reductasa citoplásmicas, FrdA (PG1615) y FrdB (PG1614), se redujo significativamente en células cultivadas en limitación de hemo (3 y 4 veces, respectivamente) y crecimiento de biopelícula (17 y 5,9 veces, respectivamente). Estas dos proteínas, que están codificadas en un operón (85), muestran cambios similares en abundancia en respuesta a limitación de hemo (UE de FrdA = 0,35; UE de FrdB = 0,25) y crecimiento de biopelícula (B/P de FrdA = 0,06; B/P de FrdB = 0,17). Estudios previos en *Bacteroides fragilis* han sugerido que se requiere hemo para la síntesis del complejo de Frd dependiente de citocromo-b (86). Por tanto, no es sorprendente ver niveles más bajos de Frd durante las condiciones de crecimiento de limitación de hemo en *P. gingivalis* considerando que es incapaz de sintetizar PPIX *de novo*. Estudios de crecimiento de tanto *B. fragilis* como *P. gingivalis* han mostrado que requieren hemo para el crecimiento y que este requisito puede sustituirse parcialmente con succinato exógeno (87, 88). Esta observación se confirmó usando mutantes deficientes en Frd de *B. fragilis* cuyo crecimiento no se estimuló por hemo, pero se estimuló mediante la adición de succinato (85). Estudios de rendimiento del crecimiento molar mostraron adicionalmente que los mutantes deficientes en Frd de *B. fragilis* tienen un rendimiento de ATP similar al de una cepa natural restringida a hemo. Durante el crecimiento óptimo, el succinato se convierte en succinil-CoA tanto para la entrada en rutas productoras de energía como para la biosíntesis de aminoácidos esenciales (lisina y metionina).

Estos estudios demuestran la importancia de la conversión de aspartato a succinato para el crecimiento equilibrado. Bajo condiciones de exceso de hemo, una parte del aspartato catabolizado por *P. gingivalis* se reduce inicialmente mediante las enzimas fumarato reductasa (FrdA y FrdB) a succinato y luego se cataboliza mediante la ruta de glutamato para producir butirato (**Fig. 6**). La disminución de 3-4 veces en la abundancia de estas enzimas fumarato reductasa durante la limitación de hemo indica que menos del aspartato entraría en la ruta catabólica del glutamato y como consecuencia de esto la mayoría del aspartato catabolizado se convertiría mediante la ruta oxidativa en acetato (**Fig. 6**). Para probar esta hipótesis, los presentes inventores llevaron a cabo análisis de ácidos orgánicos sobre los medios de cultivo agotados de *P. gingivalis* cultivado en cultivo continuo. Esto mostró que había un nivel dos veces mayor de acetato producido bajo limitación de hemo ($13,09 \pm 1,82$ mmol/g de peso seco celular) en comparación con el nivel producido bajo exceso de hemo ($6,00 \pm 0,36$ mmol/g de peso seco celular), mientras los niveles de los otros productos finales principales, butirato y propionato, fueron similares bajo ambas condiciones de crecimiento. Esto está de acuerdo con la hipótesis de los presentes inventores de un desplazamiento en la ruta usada para la fermentación de aspartato. El aumento en la abundancia de las enzimas que catalizan la conversión de piruvato a acetato (acetato cinasa PG1081, fosfotransacetilasa PG1082 y piruvato ferredoxina PG0548) también está de acuerdo con el aumento de las cantidades de acetato encontradas en el medio de cultivo agotado (**Tabla 2; Fig. 6**).

Estos resultados motivaron así a los presentes inventores a investigar de dos formas para controlar la bacteria mediante la inhibición de esta delicada ruta reguladora metabólica.

Efectos de agentes inhibidores de fumarato reductasa sobre el crecimiento

Los presentes inventores han mostrado una reducción de 17,0 y 5,9 veces en la abundancia del complejo de Frd (FrdA y FrdB, respectivamente) durante el crecimiento de biopelícula de *P. gingivalis* que es incluso mayor que las reducciones de 3 y 4 veces en FrdA y FrdB durante el crecimiento con limitación de hemo. La coherente menor abundancia del complejo de Frd se correlaciona con la disminución del crecimiento de la bacteria asociada a la limitación de hemo durante tanto condiciones de crecimiento de biopelícula como de hemo limitado. Smith y col. (89) han demostrado previamente que las actividades de Frd de *Campylobacter spp* son mayores en cultivos que crecen exponencialmente, pero disminuyeron a medida que entraron en la fase estacionaria. Por tanto, sugiere que la actividad de Frd limita la tasa de crecimiento que destaca que sea una nueva diana terapéutica atractiva. La respiración de fumarato es el tipo más generalizado de respiración anaerobia y es el único producto intermedio metabólico conocido por servir de aceptor de electrones dando $\sim 0,5$ ATP/electrón para formar succinato como producto final (90). Shah y William (91) informaron que *P. gingivalis* produjo succinato a partir de aspartato y Takahashi y col. (81) propusieron que el succinato producido se convirtió en succinil-CoA que luego se convirtió en butirato o propionato.

Se demostró que los antihelmínticos normalmente usados para curar infección helmíntica en animales y seres humanos tenían efectos inhibidores y bactericidas contra *Helicobacter pylori* y *Campylobacter jejuni* (89, 94). Se ha mostrado que uno de estos fármacos, oxantel, es un inhibidor de la enzima fumarato reductasa en *H. pylori* y *C. jejuni* supuestamente sobre las subunidades hidrófilas del complejo Frd mediante mecanismos desconocidos (94-96).

De forma interesante no todas las bacterias anaerobias poseen Frd y algunas bacterias que poseen Frd tienen rutas bioquímicas alternativas para la supervivencia cuando Frd se inhibe (97, 98). Por tanto, el descubrimiento de que la viabilidad de *P. gingivalis* está gravemente afectada en presencia de agentes inhibidores de Frd (**Fig. 7-10**) sugiere que la enzima es absolutamente esencial para el crecimiento y la contribución del ATP de la ruta aspartato podría desempeñar una función crucial en la supervivencia de *P. gingivalis*. Como el complejo de Frd está ausente en seres humanos y otros animales (92, 93), el agente que inhibe Frd proporciona una diana contra enfermedades producidas por patógenos, especialmente aquellos que tienen un requisito esencial para Frd.

Efectos de agentes inhibidores de fumarato reductasa sobre la formación de biopelícula

Lo siguiente ilustra el efecto de agentes inhibidores de Frd sobre la capacidad de *P. gingivalis* para formar biopelículas. La reducción de la masa de biopelícula a concentraciones de oxantel C₁subM es muy interesante, ya que sugiere que hay una cantidad mínima de Frd o energía requerida para la óptima formación de biopelícula.

La inhibición parcial de Frd por concentraciones C₁subM de agentes inhibidores de Frd podría traducirse como señales similares tal como en un entorno pobre en nutrientes. Por ejemplo, la formación de biopelícula regulada por carbono está bien documentada en varias bacterias que incluyen *Pseudomonas aeruginosa* y *E. coli* y, por tanto, mediada por reguladores transcripcionales tales como RpoS, Crc y CsrA en durante la limitación de nutrientes (99-101). En *E. coli*, el gen *csrA* codifica una proteína reguladora global, CsrA (regulador del almacenamiento de carbono) que reprime ciertas rutas metabólicas tales como síntesis de glucógeno y gluconeogénesis (101,102). La rotura de *csrA* en *E. coli* produjo formación potenciada de biopelícula (101, 103) y, de forma interesante, la activación del homólogo de CsrA en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium produjo la elevada invasión de células epiteliales debido a los efectos de CsrA sobre otras dianas (104, 105). Es, por tanto, muy tentador especular que es menos probable que *P. gingivalis* de hemo limitado forme biopelículas debido a los menores niveles de ATP como resultado

de la actividad de Frd reducida, ya que tales proteínas de invasión de células huésped que incluyen internalinas están reguladas por incremento para promover la fuga a células epiteliales hasta el final de la privación de nutrientes.

5 Hay una mayor abundancia de la enzima glucolítica gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) durante el estado de biopelícula en comparación con el planctónico que está de acuerdo con resultados previos obtenidos para *Listeria monocytogenes* y *Pseudomonas aeruginosa* (12, 106). Aunque GAPDH se clasifica como una enzima de unión a NAD tetrámera que participa en la glucólisis y gluconeogénesis, ha habido numerosos informes de esta proteína que es multifuncional y cuando se expresa en la superficie celular de bacterias Gram-positivas, pareció
10 participar en la unión de plasmina, plasminógeno y transferrina (107,108). De forma interesante, se ha mostrado que la coagregación entre *Streptococcus oralis* y 33277 de *P. gingivalis* está mediada por la interacción de fimbrias de *P. gingivalis* y GAPDH de *S. oralis* (109). Sin embargo, queda por responder la función exacta, si la tiene, de GAPDH en sustrato que se une en *P. gingivalis*.

15 *Formación de biopelícula*

Hubo una abundancia significativamente mayor de la proteína del estrés universal (UspA) en las células planctónicas con respecto a las células de biopelícula. Se encontró que la producción de Usp en diversas bacterias se estimulaba por una gran variedad de condiciones, tales como entrada en la fase estacionaria, inanición de ciertos nutrientes, oxidantes y otros estimulantes (110, 111). La elevada abundancia en células de la fase planctónica está de acuerdo con el hecho de que *P. gingivalis* ha evolucionado para crecer como parte de una biopelícula y que es más probable
20 que las fases planctónicas sean más estresantes. Se cree que la expresión de UspA en *P. gingivalis* está relacionada con la formación de biopelícula, ya que la inactivación de *uspA* produjo la atenuación de la formación de biopelícula temprana por células planctónicas (112). En este estudio, la biopelícula se ha establecido y alcanzado la maduración, por tanto parece tener menos necesidad de UspA con respecto a células planctónicas flotantes libres.

Se observó que un homólogo de la proteína de la familia internalina InIJ (PG0350) era mayor en abundancia durante el estado de biopelícula. Se ha mostrado que PG0350 es importante para la formación de biopelícula en *P. gingivalis* 33277 y que la inactivación génica produjo formación de biopelícula reducida (39). Mayores niveles de PG0350 en la biopelícula podrían sugerir que esta proteína podría ser requerida no solo para la formación de biopelícula inicial,
30 sino que actúa de adhesina que une *P. gingivalis* entre sí o sustratos extracelulares dentro de la biopelícula.

Proteínas con funciones desconocidas

35 El mayor grupo de proteínas identificadas en este estudio fue 41 proteínas con funciones desconocidas que incluyen cuatro proteínas que se identificaron por primera vez en este estudio (Tabla 2). De las 41 proteínas identificadas, se predijo que 37 eran de la envuelta de la célula y dentro de este grupo 17 proteínas mostraron cambios significativos entre las células de biopelícula y planctónicas. La mayoría de estas proteínas tienen homología con proteínas de GenBank con nombres definidos, pero funciones no bien definidas. Son de particular interés varias proteínas que se
40 encontró que aumentaban coherentemente sustancialmente en abundancia en el estado de biopelícula, concretamente PG0181, PG0613, PG1304, PG2167 y PG2168.

Los resultados anteriores representan una validación a gran escala del procedimiento de marcado proteolítico con $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ como se aplica a una mezcla compleja, y son los primeros en usar este enfoque para la comparación de
45 estados de crecimiento de biopelícula bacteriana y planctónica. Se encontró que un número sustancial de proteínas con una variedad de funciones aumentaron o disminuyeron coherentemente en abundancia en las células de biopelícula, que indica cómo las células se adaptan a las condiciones de la biopelícula y también proporcionan posibles dianas para las estrategias de control de las biopelículas.

50 **EJEMPLOS**

Para ayudar a ilustrar composiciones que encarnan un aspecto de la invención dirigido al tratamiento, se proporcionan las siguiente formulaciones de muestra.

55 Lo siguiente es un ejemplo de una formulación de pasta de dientes.

60

65

ES 2 432 690 T3

	Componente	% peso/peso
	Fosfato de dicalcio dihidratado	50,0
	Glicerol	20,0
5	Carboximetilcelulosa de sodio	1,0
	Laurilsulfato de sodio	1,5
	Lauroilsarcosinato de sodio	0,5
	Aroma	1,0
	Sacarina sódica	0,1
10	Gluconato de clorhexidina	0,01
	Dextranasa	0,01
	Inhibidor de biopelícula (pamoato de oxantel)	0,2
	Agua	resto

Lo siguiente es un ejemplo de una formulación de pasta de dientes.

	Componente	% peso/peso
	Fosfato de dicalcio dihidratado	50,0
	Sorbitol	10,0
	Glicerol	10,0
20	Carboximetilcelulosa de sodio	1,0
	Laurilsulfato de sodio	1,5
	Lauroilsarcosinato de sodio	0,5
	Aroma	1,0
	Sacarina sódica	0,1
25	Monofluorofosfato de sodio	0,3
	Gluconato de clorhexidina	0,01
	Dextranasa	0,01
	Inhibidor de biopelícula (pamoato de oxantel)	0,2
	Agua	resto

Lo siguiente es un ejemplo de una formulación de pasta de dientes.

	Componente	% peso/peso
	Fosfato de dicalcio dihidratado	50,0
35	Sorbitol	10,0
	Glicerol	10,0
	Carboximetilcelulosa de sodio	1,0
	Lauroildietanolamida	1,0
	Monolaurato de sacarosa	2,0
40	Aroma	1,0
	Sacarina sódica	0,1
	Monofluorofosfato de sodio	0,3
	Gluconato de clorhexidina	0,01
	Dextranasa	0,01
45	Inhibidor de biopelícula (pamoato de oxantel)	0,1
	Agua	resto

Lo siguiente es un ejemplo de una formulación de pasta de dientes.

	Componente	% peso/peso
50	Sorbitol	22,0
	Musgo de Irlanda	1,0
	Hidróxido sódico (50%)	1,0
	Gantrez	19,0
55	Agua (desionizada)	2,69
	Monofluorofosfato de sodio	0,76
	Sacarina sódica	0,3
	Pirofosfato	2,0
60	Alúmina hidratada	48,0
	Aceite aromatizante	0,95
	Inhibidor de biopelícula (pamoato de oxantel)	0,3
	Laurilsulfato de sodio	2,00

65

ES 2 432 690 T3

Lo siguiente es un ejemplo de una formulación de pasta de dientes líquida.

	Componente	% peso/peso
5	Poliacrilato de sodio	50,0
	Sorbitol	10,0
	Glicerol	20,0
	Aroma	1,0
	Sacarina sódica	0,1
10	Monofluorofosfato de sodio	0,3
	Gluconato de clorhexidina	0,01
	Etanol	3,0
	Inhibidor de biopelícula (pamoato de oxantel)	0,2
	Ácido linólico	0,05
15	Agua	resto

Lo siguiente es un ejemplo de una formulación de enjuague bucal.

	Componente	% peso/peso
20	Etanol	20,0
	Aroma	1,0
	Sacarina sódica	0,1
	Monofluorofosfato de sodio	0,3
	Gluconato de clorhexidina	0,01
25	Lauroildietanolamida	0,3
	Inhibidor de biopelícula (pamoato de oxantel)	0,2
	Agua	resto

Lo siguiente es un ejemplo de una formulación de enjuague bucal.

	Componente	% peso/peso
30	Gantrez® S-97	2,5
	Glicerina	10,0
	Aceite aromatizante	0,4
35	Monofluorofosfato de sodio	0,05
	Gluconato de clorhexidina	0,01
	Lauroildietanolamida	0,2
	Inhibidor de biopelícula (pamoato de oxantel)	0,3
	Agua	resto

Lo siguiente es un ejemplo de una formulación de pastilla para chupar.

	Componente	% peso/peso
45	Azúcar	75-80
	Jarabe de maíz	1-20
	Aceite aromatizante	1-2
	NaF	0,01-0,05
	Inhibidor de biopelícula (pamoato de oxantel)	0,3
	Estearato de Mg	1-5
50	Agua	resto

Lo siguiente es un ejemplo de una formulación en crema de masaje gingival.

	Componente	% peso/peso
55	Vaselina filante	8,0
	Propilenglicol	4,0
	Alcohol estearílico	8,0
	Polietilenglicol 4000	25,0
	Polietilenglicol 400	37,0
60	Monoestearato de sacarosa	0,5
	Gluconato de clorhexidina	0,1
	Inhibidor de biopelícula (pamoato de oxantel)	0,3
	Agua	resto

65

Lo siguiente es un ejemplo de una formulación en gel periodontal.

Componente	% peso/peso
Pluronic F127 (de BASF)	20,0
Alcohol estearílico	8,0
Pamoato de oxantel	3,0
Dióxido de silicio coloidal (tal como Aerosil® 200™)	1,0
Gluconato de clorhexidina	0,1
Agua	resto

Lo siguiente es un ejemplo de una formulación de chicle.

Componente	% peso/peso
Base de goma	30,0
Carbonato cálcico	2,0
Sorbitol cristalino	53,0
Glicerina	0,5
Aceite aromatizante	0,1
Inhibidor de biopelícula (pamoato de oxantel)	0,3
Agua	resto

Tabla 7. Efecto de oxantel, morantel o tiabendazol sobre el crecimiento de W50 de *P. gingivalis* durante 50 h

	CIM	TGM h ⁻¹ (DMSO)	TGM h ⁻¹ (31,25 µM)	TGM h ⁻¹ (62,5 µM)
Oxantel	112 µM	6,62	19,28	23,77
Morantel	2800 µM	6,85	10,97	11,28
Tiabendazol	> 3 mM*	6,25	6,80	6,22

* La CIM a mayores concentraciones no pudo determinarse debido a la insolubilidad de tiabendazol a > 3 mM.

Tabla 8. Efecto de Oxantel sobre el crecimiento de ATCC 33277 de *P. gingivalis* durante 50 h

	CIM	TGM h ⁻¹ (DMSO)	TGM h ⁻¹ (31,25 µM)	TGM h ⁻¹ (62,5 µM)
Oxantel	125 µM	6,62	10,0	24,0

Referencias

- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R. y Lappin-Scott, H. M. (1995) Annu. Rev. Microbiol. 49, 711-745
- Cvitkovitch, D. G., Li, Y. H. y Ellen, R. P. (2003) J. Clin. Invest. 112(11), 1626-1632
- Cochrane, D. M., Brown, M. R., Anwar, H., Weller, P. H., Lam, K. y Costerton, J. W. (1988) J. Med. Microbiol. 27(4), 255-261
- van Steenberg, T. J., Kastelein, P., Touw, J. J. y de Graaff, J. (1982) J. Periodontal Res. 17(1), 41-49
- Neiders, M. E., Chen, P. B., Suido, H., Reynolds, H. S., Zambon, J. J., Shlossman, M. y Genco, R. J. (1989) J. Periodontal Res. 24(3), 192-198
- Griffen, A. L., Becker, M. R., Lyons, S. R., Moeschberger, M. L. y Leys, E. J. (1998) J. Clin. Microbiol. 36(11), 3239-3242
- Cutler, C. W., Arnold, R. R. y Schenkein, H. A. (1993) J. Immunol. 151(12), 7016-7029
- Chen, T., Hosogi, Y., Nishikawa, K., Abbey, K., Fleischmann, R. D., Walling, J. y Duncan, M. J. (2004) J. Bacteriol. 186(16), 5473-5479
- Davey, M. E. (2006) Periodontol. 2000 42, 27-35
- Orme, R., Douglas, C. W., Rimmer, S. y Webb, M. (2006) Proteomics 6(15), 4269-4277
- Rathsam, C., Eaton, R. E., Simpson, C. L., Browne, G. V., Valova, V. A., Harty, D. W. y Jacques, N. A. (2005) J. Proteome Res 4(6), 2161-2173
- Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W. y Davies, D. G. (2002) J. Bacteriol. 184(4), 1140-1154
- Ong, S. E., and Mann, M. (2005) Nat. Chem. Biol. 1(5), 252-262
- Bender, M. L. y Kemp, K. C. (1957) J. Am. Chem. Soc 79, 116
- Schnolzer, M., Jedrzejewski, P. y Lehmann, W. D. (1996) Electrophoresis 17(5), 945-953
- Yao, X., Freas, A., Ramirez, J., Demirev, P. A. y Fenselau, C. (2001) Anal Chem 73(13), 2836-2842
- Blonder, J., Hale, M. L., Chan, K. C., Yu, L. R., Lucas, D. A., Conrads, T. P., Zhou, M., Popoff, M. R., Issaq, H. J., Stiles, B. G. y Veenstra, T. D. (2005) J. Proteome Res 4(2), 523-531
- Qian, W. J., Monroe, M. E., Liu, T., Jacobs, J. M., Anderson, G. A., Shen, Y., Moore, R. J., Anderson, D. J., Zhang, R., Calvano, S. E., Lowry, S. F., Xiao, W., Moldawer, L. L., Davis, R. W., Tompkins, R. G., Camp, D. G., 2^a y Smith, R. D. (2005) Mol. Cell Proteomics 4(5), 700-709
- Zang, L., Palmer Toy, D., Hancock, W. S., Sgroi, D. C. y Karger, B. L. (2004) J. Proteome Res. 3(3), 604-

612

20. Kuster, B. y Mann, M. (1999) *Anal. Chem.* 71(7), 1431-1440
21. Takao, T., Hori, H., Okamoto, K., Harada, A., Kamachi, M. y Shimonishi, Y. (1991) *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 5(7), 312-315
- 5 22. Shevchenko, A., Chemushevich, I., Ens, W., Standing, K. G., Thomson, B., Wilm, M. y Mann, M. (1997) *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 11(9), 1015-1024
23. Gevaert, K., Staes, A., Van Damme, J., De Groot, S., Hugelier, K., Demol, H., Martens, L., Goethals, M. y Vandekerckhove, J. (2005) *Proteomics* 5(14), 3589-3599
24. Chen, X., Cushman, S. W., Pannell, L. K. y Hess, S. (2005) *J. Proteome Res.* 4(2), 570-577
- 10 25. Stockwin, L. H., Blonder, J., Bumke, M. A., Lucas, D. A., Chan, K. C., Conrads, T. P., Issaq, H. J., Veenstra, T. D., Newton, D. L. y Rybak, S. M. (2006) *J. Proteome Res.* 5(11), 2996-3007
26. Lane, C. S., Wang, Y., Betts, R., Griffiths, W. J. y Patterson, L. H. (2007) *Mol. Cell Proteomics*
27. Korbel, S., Schumann, M., Bittorf, T. y Krause, E. (2005) *Rapid Comm. Mass Spectrom.* 19(16), 2259-2271
28. Bantscheff, M., Dimpfelfeld, B. y Kuster, B. (2004) *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* 18(8), 869-876
- 15 29. Jia, J. Y., Lamer, S., Schumann, M., Schmidt, M. R., Krause, E. y Haucke, V. (2006) *Mol. Cell Proteomics* 5(11), 2060-2071
30. Miyagi, M. y Rao, K. C. (2007) *Mass Spectrom. Rev* 26(1), 121-136
31. Veith, P. D., Talbo, G. H., Slakeski, N., Dashper, S. G., Moore, C., Paolini, R. A. y Reynolds, E. C. (2002) *Biochem. J.* 363(Pt 1), 105-115
- 20 32. Qian, W. J., Liu, T., Monroe, M. E., Strittmatter, E. F., Jacobs, J. M., Kangas, L. J., Petritis, K., Camp, D. G., 2^a, y Smith, R. D. (2005) *J. Proteome Res* 4(1), 53-62
33. Perkins, D. N., Pappin, D. J., Creasy, D. M. y Cottrell, J. S. (1999) *Electrophoresis* 20(18), 3551-3567
34. Xia, Q., Hendrickson, E. L., Zhang, Y., Wang, T., Taub, F., Moore, B. C., Porat, I., Whitman, W. B., Hackett, M. y Leigh, J. A. (2006) *Mol. Cell Proteomics* 5(5), 868-881
- 25 35. Quackenbush, J. (2001) *Nat. Rev. Genet.* 2(6), 418-427
36. Yu, C. S., Chen, Y. C., Lu, C. H. y Hwang, J. K. (2006) *Proteins* 64(3), 643-651
37. Richardson, A. J., Calder, A. G. y Stewart, C. S. (1989) *Letters in Applied Microbiology* 9, 5-8
38. O'Toole, G. A. y Kolter, R. (1998) *Mol Microbiol* 28(3), 449-461
39. Capestany, C. A., Kuboniwa, M., Jung, I. Y., Park, Y., Tribble, G. D. y Lamont, R. J. (2006) *Infect. Immun.* 74(5), 3002-3005
- 30 40. Lopez-Ferrer, D., Ramos-Fernandez, A., Martinez-Bartolome, S., Garcia-Ruiz, P. y Vazquez, J. (2006) *Proteomics* 6 Suppl 1, S4-S11
41. Staes, A., Demol, H., Van Damme, J., Martens, L., Vandekerckhove, J. y Gevaert, K. (2004) *J Proteome Res* 3(4), 786-791
- 35 42. Patwardhan, A. J., Strittmatter, E. F., Camp, D. G., 2nd, Smith, R. D. y Pallavicini, M. G. (2006) *Proteomics* 6(9), 2903-2915
43. Smalley, J. W., Birss, A. J., McKee, A. S. y Marsh, P. D. (1993) *J Gen Microbiol* 139(9), 2145-2150
44. McKee, A. S., McDermid, A. S., Baskerville, A., Dowsett, A. B., Ellwood, D. C. y Marsh, P. D. (1986) *Infect. Immun.* 52(2), 349-355
- 40 45. Dashper, S. G., Butler, C. A., Lissel, J. P., Paolini, R. A., Hoffmann, B., Veith, P. D., O'Brien-Simpson, N. M., Snelgrove, S. L., Tsiros, J. T. y Reynolds, E. C. (2005) *J. Biol. Chem.* 280(30), 28095-28102
46. Li, J., Steen, H. y Gygi, S. P. (2003) *Mol. Cell Proteomics* 2(11), 1198-1204
47. Dashper, S. G., Brownfield, L., Slakeski, N., Zilm, P. S., Rogers, A. H. y Reynolds, E. C. (2001) *J. Bacteriol.* 183(14), 4142-4148
- 45 48. Hoskisson, P. A. y Hobbs, G. (2005) *Microbiology* 151 (Pt 10), 3153-3159
49. Piper, M. D., Daran-Lapujade, P., Bro, C., Regenber, B., Knudsen, S., Nielsen, J. y Pronk, J. T. (2002) *J. Biol. Chem.* 277(40), 37001-37008
- 50 50. Siroy, A., Cosette, P., Seyer, D., Lemaitre-Guillier, C., Vallenet, D., Van Dorsselaer, A., Boyer-Mariotte, S., Jouenne, T. y De, E. (2006) *J. Proteome Res.* 5(12), 3385-3398
51. Hood, B. L., Lucas, D. A., Kim, G., Chan, K. C., Blonder, J., Issaq, H. J., Veenstra, T. D., Conrads, T. P., Pollet, I. y Karsan, A. (2005) *J Am Soc Mass Spectrom* 16(8), 1221-1230
52. Yao, X., Afonso, C. y Fenselau, C. (2003) *J Proteome Res* 2(2), 147-152
53. Eckel-Passow, J. E., Oberg, A. L., Themeau, T. M., Mason, C. J., Mahoney, D. W., Johnson, K. L., Olson, J. E. y Bergen, H. R., 3rd. (2006) *Bioinformatics* 22(22), 2739-2745
- 55 54. Storms, H. F., van der Heijden, R., Tjaden, U. R. y van der Greef, J. (2006) *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20(23), 3491-3497
55. Zenobi, R. y Knochenmuss, R. (1998) *Mass Spectrom. Rev.* 17(5), 337-366
56. Seers, C. A., Slakeski, N., Veith, P. D., Nikolof, T., Chen, Y. Y., Dashper, S. G. y Reynolds, E. C. (2006) *J. Bacteriol.* 188(17), 6376-6386
- 60 57. Curtis, M. A., Kuramitsu, H. K., Lantz, M., Macrina, F. L., Nakayama, K., Potempa, J., Reynolds, E. C. y Aduse-Opoku, J. (1999) *J. Periodontal Res.* 34(8), 464-472
58. O'Brien-Simpson, N. M., Paolini, R. A., Hoffmann, B., Slakeski, N., Dashper, S. G. y Reynolds, E. C. (2001) *Infect. Immun.* 69(12), 7527-7534
59. O'Brien-Simpson, N. M., Veith, P. D., Dashper, S. G. y Reynolds, E. C. (2003) *Curr. Protein Pept. Sci.* 4(6), 409-426
- 65 60. Abe, N., Kadowaki, T., Okamoto, K., Nakayama, K., Ohishi, M. y Yamamoto, K. (1998) *J. Biochem. (Tokyo)*

- 123(2), 305-312
61. Potempa, J., Pike, R. y Travis, J. (1995) *Infect. Immun.* 63(4), 1176-1182
62. Pathirana, R. D., O'Brien-Simpson, N. M., Brammar, G. C., Slakeski, N. y Reynolds, E. C. (2007) *Infect. Immun.* 75(3), 1436-1442
- 5 63. Chen, Y. Y., Cross, K. J., Paolini, R. A., Fielding, J. E., Slakeski, N. y Reynolds, E. C. (2002) *J. Biol. Chem.* 277(26), 23433-23440
64. Zhang, Y., Wang, T., Chen, W., Yilmaz, O., Park, Y., Jung, I. Y., Hackett, M. y Lamont, R. J. (2005) *Proteomics* 5(1), 198-211
- 10 65. Sato, K., Sakai, E., Veith, P. D., Shoji, M., Kikuchi, Y., Yukitake, H., Ohara, N., Naito, M., Okamoto, K., Reynolds, E. C. y Nakayama, K. (2005) *J. Biol. Chem.* 280(10), 8668-8677
66. Nguyen, K. A., Travis, J. y Potempa, J. (2007) *J. Bacteriol.* 189(3), 833-843
67. Dashper, S. G., Cross, K. J., Slakeski, N., Lissel, P., Aulakh, P., Moore, C. y Reynolds, E. C. (2004) *Oral Microbiol. Immunol.* 19(1), 50-56
- 15 68. Lewis, J. P., Dawson, J. A., Hannis, J. C., Muddiman, D. y Macrina, F. L. (1999) *J. Bacteriol.* 181(16), 4905-4913
69. Shi, Y., Ratnayake, D. B., Okamoto, K., Abe, N., Yamamoto, K. y Nakayama, K. (1999) *J. Biol. Chem.* 274(25), 17955-17960
70. Sroka, A., Sztukowska, M., Potempa, J., Travis, J. y Genco, C. A. (2001) *J. Bacteriol.* 183(19), 5609-5616
- 20 71. Simpson, W., Olczak, T. y Genco, C. A. (2000) *J. Bacteriol.* 182(20), 5737-5748
72. Lewis, J. P., Plata, K., Yu, F., Rosato, A. y Anaya, C. (2006) *Microbiology* 152(Pt 11), 3367-3382
73. Olczak, T., Siudeja, K. y Olczak, M. (2006) *Protein Expr. Purif.* 49(2), 299-306
74. Olczak, T., Simpson, W., Liu, X. y Genco, C. A. (2005) *FEMS Microbiol. Rev.* 29(1), 119-144
75. Veith, P. D., Chen, Y. Y. y Reynolds, E. C. (2004) *Infect. Immun.* 72(6), 3655-3657
- 25 76. Shibata, Y., Hiratsuka, K., Hayakawa, M., Shiroza, T., Takiguchi, H., Nagatsuka, Y. y Abiko, Y. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300(2), 351-356
77. Tatusov, R. L., Fedorova, N. D., Jackson, J. D., Jacobs, A. R., Kiryutin, B., Koonin, E. V., Krylov, D. M., Mazumder, R., Mekhedov, S. L., Nikolskaya, A. N., Rao, B. S., Smirnov, S., Sverdlov, A. V., Vasudevan, S., Wolf, Y. I., Yin, J. J. y Natale, D. A. (2003) *BMC Bioinformatics* 4, 41
- 30 78. Ratnayake, D. B., Wai, S. N., Shi, Y., Amako, K., Nakayama, H. y Nakayama, K. (2000) *Microbiology* 146 1119-1127
79. Smalley, J. W., Birss, A. J., McKee, A. S. y Marsh, P. D. (1991) *FEMS Microbiol. Lett.* 69(1), 63-67
80. Dashper, S. G., Hendtlass, A., Slakeski, N., Jackson, C., Cross, K. J., Brownfield, L., Hamilton, R., Barr, I. y Reynolds, E. C. (2000) *J. Bacteriol.* 182(22), 6456-6462
- 35 81. Takahashi, N., Sato, T. y Yamada, T. (2000) *J. Bacteriol.* 182(17), 4704-4710
82. Takahashi, N. y Sato, T. (2001) *J. Dent Res* 80(5), 1425-1429
83. Litwin, C. M. y Calderwood, S. B. (1993) *Clin Microbiol Rev* 6(2), 137-149
84. Gygi, S. P., Rochon, Y., Franza, B. R. y Aebersold, R. (1999) *Mol. Cell Biol.* 19(3), 1720-1730
85. Baughn, A. D. y Malamy, M. H. (2003) *Microbiology* 149(Pt 6), 1551-1558
- 40 86. Macy, J., Probst, I. y Gottschalk, G. (1975) *J. Bacteriol.* 123(2), 436-442
87. Baughn, A. D. y Malamy, M. H. (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(7), 4662-4667
88. Mayrand, D. y McBride, B. C. (1980) *Infect Immun* 27(1), 44-50
89. Smith, M. A., Mendz, G. L., Jorgensen, M. A. y Hazell, S. L. (1999) *Int J Biochem Cell Biol* 31(9), 961-975
90. Kroger, A., Geisler, V., Lemma, E., Theis, F. y Lenger, R. (1992) *Archives of Microbiology* 158(5), 311-314
91. Shah, H. y Williams, R. (1987) *Current Microbiology* 15, 241-246
- 45 92. Klein, R. A., Linstead, D. J. y Wheeler, M. V. (1975) *Parasitology* 71(1), 93-107
93. Turrens, J. F. (1989) *Biochem J* 259(2), 363-368
94. Mendz, G. L., Hazell, S. L. y Srinivasan, S. (1995) *Arch Biochem Biophys* 321(1), 153-159
95. Mendz, G. L., Meek, D. J. y Hazell, S. L. (1998) *J. Membr Biol* 165(1), 65-76
- 50 96. Mileni, M., MacMillan, F., Tziatzios, C., Zwicker, K., Haas, A. H., Mantele, W., Simon, J. y Lancaster, C. R. (2006) *Biochem J* 395(1), 191-201
97. Nealson, K. y D, S. (1994) *Annual review of microbiology* 48, 311-343
98. Sellars, M. J., Hall, S. J. y Kelly, D. J. (2002) *J. Bacteriol.* 184(15), 4187-4196
99. O'Toole, G. A., Gibbs, K. A., Hager, P. W., Phibbs, P. V., Jr. y Kolter, R. (2000) *J. Bacteriol.* 182(2), 425-431
100. Whiteley, M., Banger, M. G., Bumgarner, R. E., Parsek, M. R., Teitzel, G. M., Lory, S. y Greenberg, E. P. (2001) *Nature* 413(6858), 860-864
- 55 101. Romeo, T., Gong, M., Liu, M. Y. y Brun-Zinkemagel, A. M. (1993) *J. Bacteriol.* 175(15), 4744-4755
102. Sabnis, N. A., Yang, H. y Romeo, T. (1995) *J. Biol. Chem.* 270(49), 29096-29104
103. Mercante, J., Suzuki, K., Cheng, X., Babitzke, P. y Romeo, T. (2006) *J. Biol. Chem.* 281(42), 31832-31842
104. Altier, C., Suyemoto, M. y Lawhon, S. D. (2000) *Infect. Immun.* 68(12), 6790-6797
- 60 105. Lawhon, S. D., Frye, J. G., Suyemoto, M., Porwollik, S., McClelland, M. y Altier, C. (2003) *Mol. Microbiol.* 48(6), 1633-1645
106. Hefford, M. A., D'Aoust, S., Cyr, T. D., Austin, J. W., Sanders, G., Kheradpir, E. y Kalmokoff, M. L. (2005) *Can. J. Microbiol.* 51(3), 197-208
107. Pancholi, V. y Fischetti, V. A. (1992) *J. Exp. Med.* 176(2), 415-426
- 65 108. Taylor, J. M. y Heinrichs, D. E. (2002) *Mol. Microbiol.* 43(6), 1603-1614
109. Maeda, K., Nagata, H., Yamamoto, Y., Tanaka, M., Tanaka, J., Minamino, N. y Shizukuishi, S. (2004)

Infect. Immun. 72(3), 1341-1348

110. Gustavsson, N., Diez, A. y Nystrom, T. (2002) Mol. Microbiol. 43(1), 107-117

111. Kvint, K., Nachin, L., Diez, A. y Nystrom, T. (2003) Curr. Opin. Microbiol. 6(2), 140-145

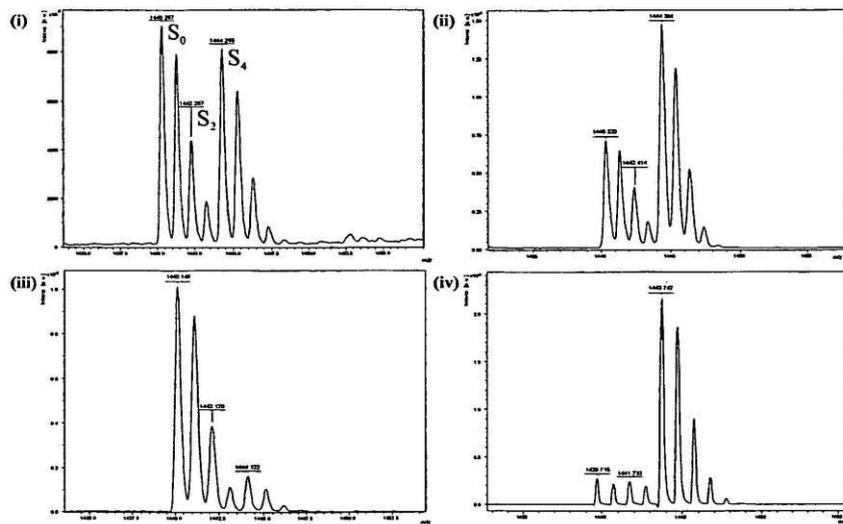
112. Kuramitsu, H. K., Chen, W. y Ikegami, A. (2005) J. Periodontol. 76(11 Suppl), 2047-2051

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica que comprende un agente inhibidor para su uso en prevenir, inhibir o reducir una biopelícula de *P. gingivalis* en un sujeto en la que el agente inhibidor está seleccionado del grupo que consiste en oxantel, morantel o tiabendazol.
2. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que el agente inhibidor es oxantel.
- 10 3. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que el agente inhibidor es morantel.
4. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que el agente inhibidor es tiabendazol.

FIGURA 1

A



5

B

(1 : 1) (2 : 1) (1 : 5) (10 : 1)



FIGURA 3

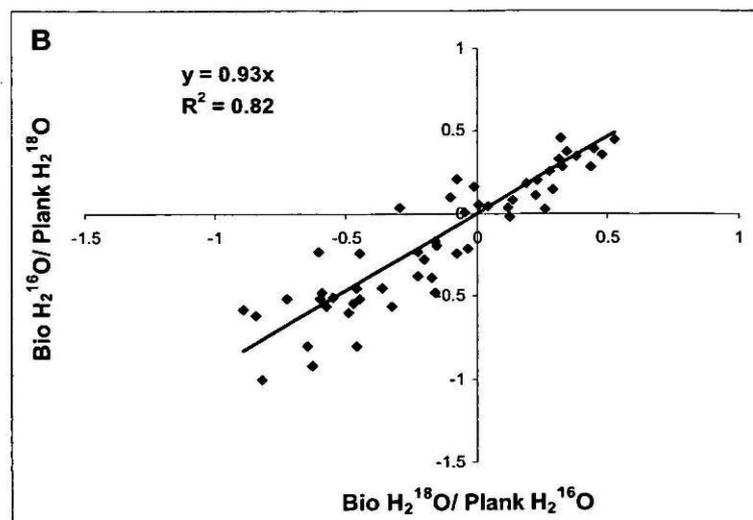
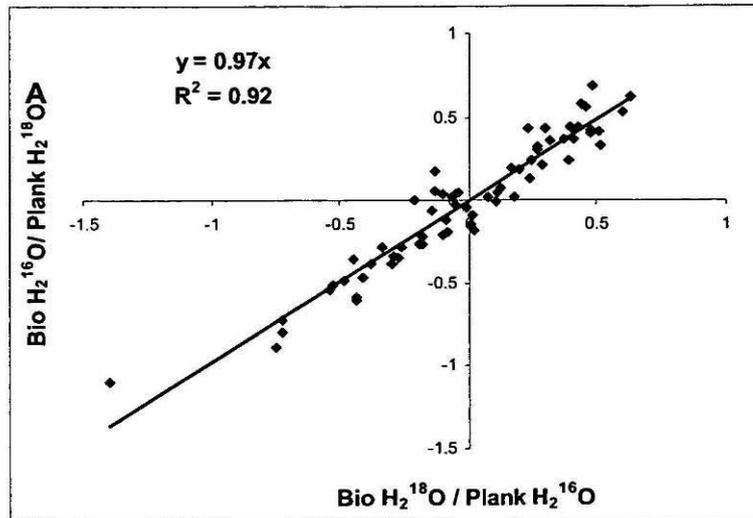


FIGURA 4

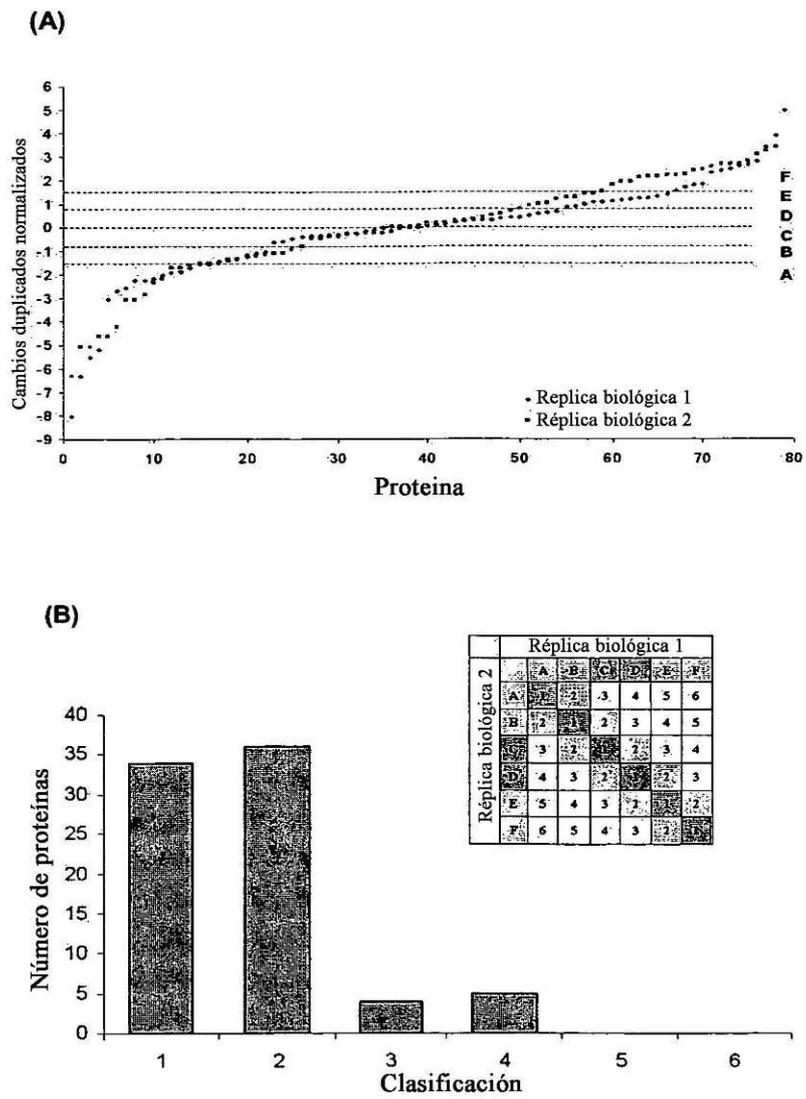


FIGURA 5

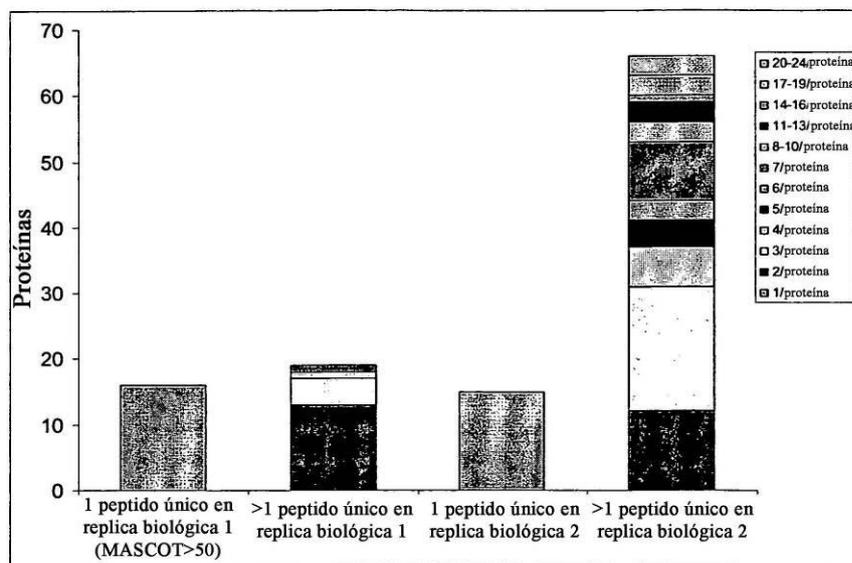


FIGURA 6

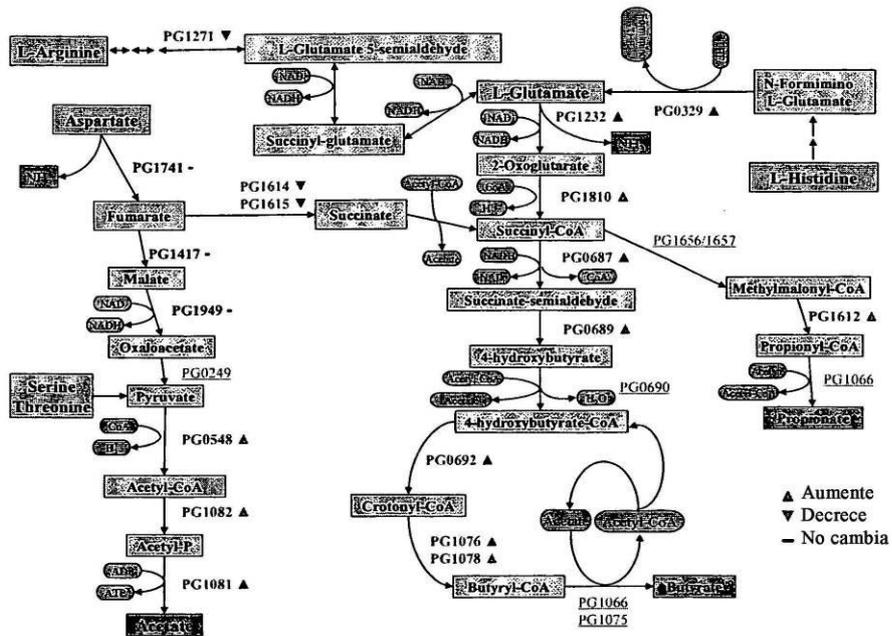


FIGURA 7

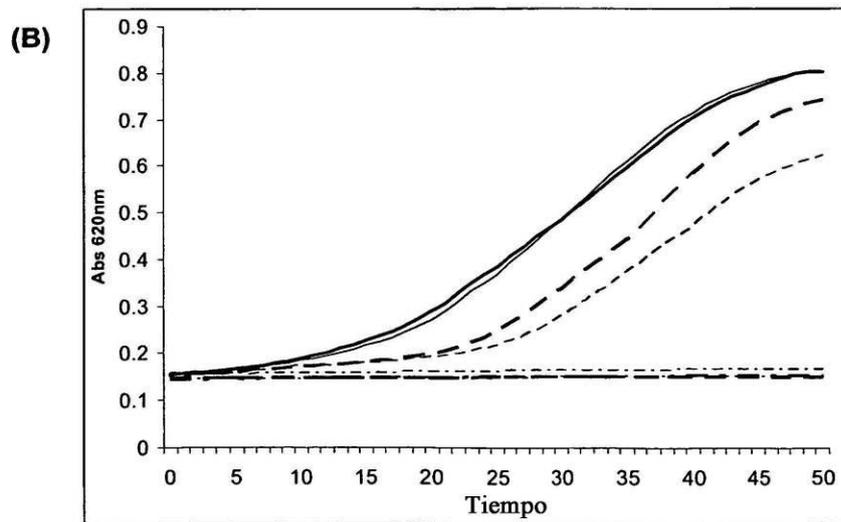
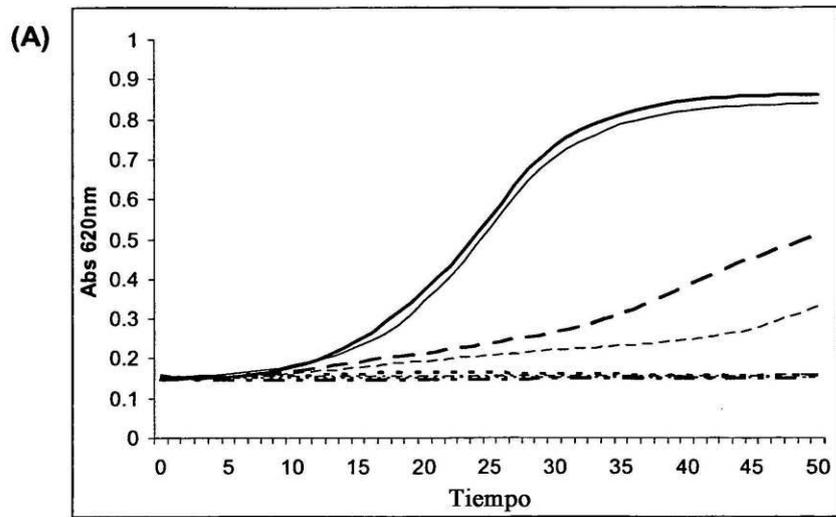


FIGURA 8

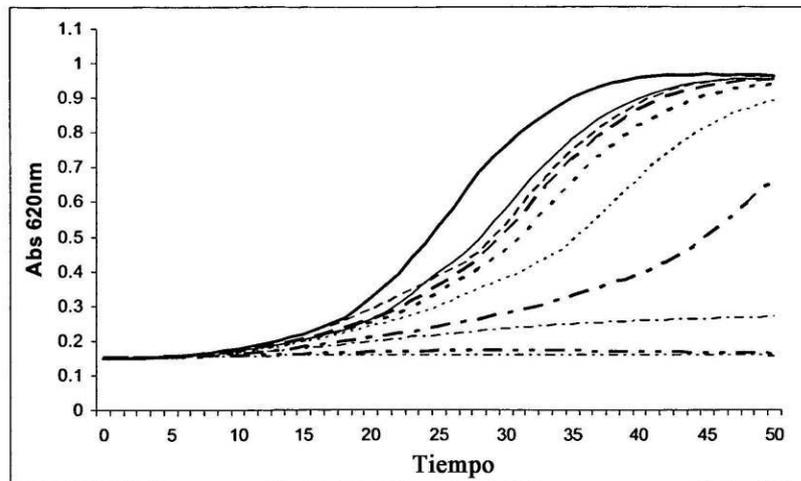


FIGURA 9

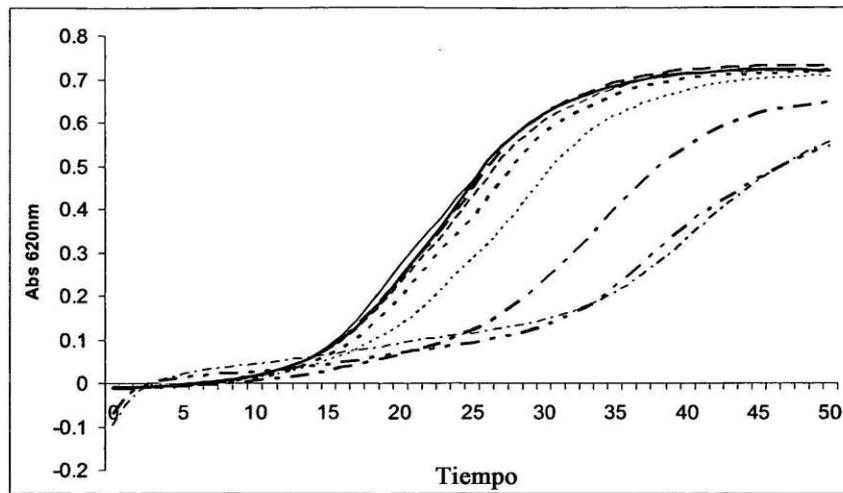


FIGURA 10

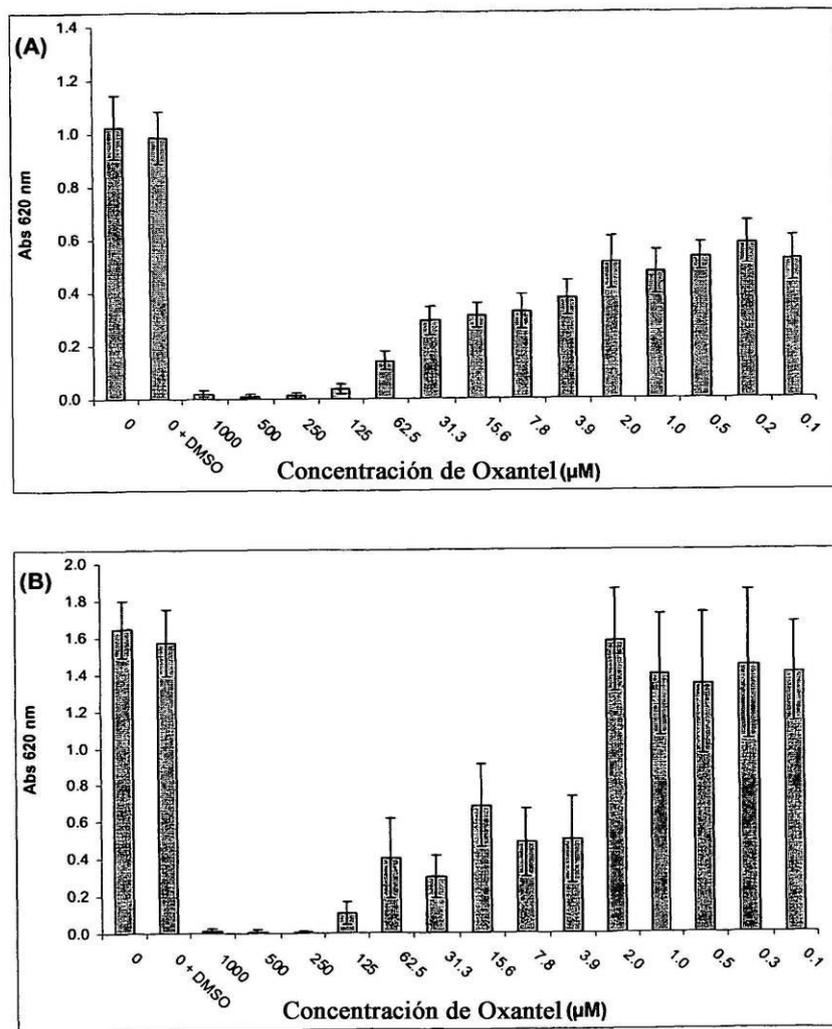


FIGURA 11

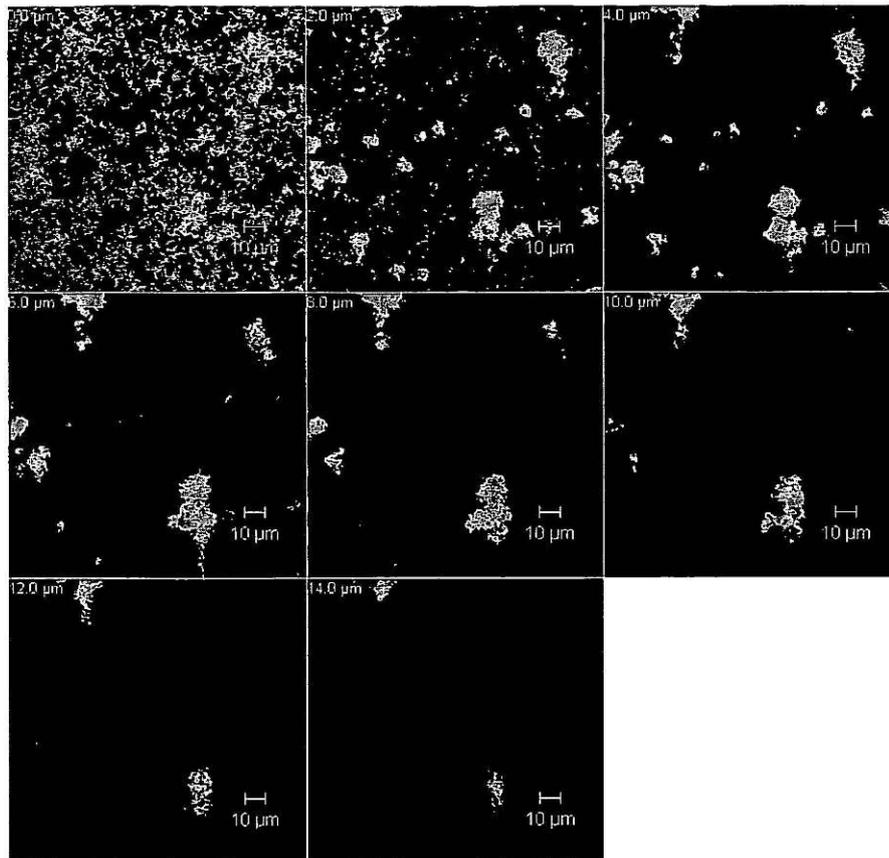


FIGURA 12

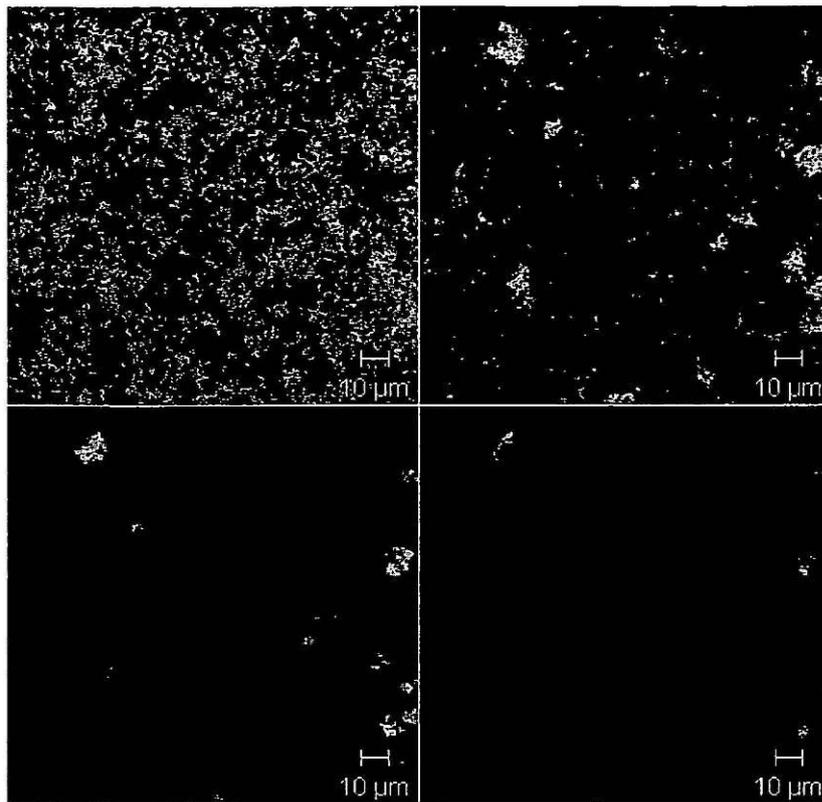


FIGURA 13

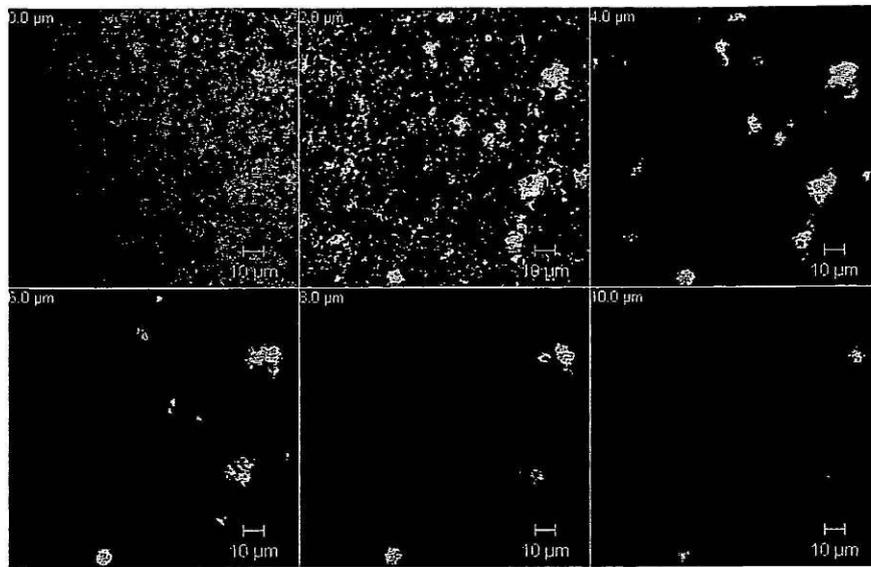


FIGURA 14

