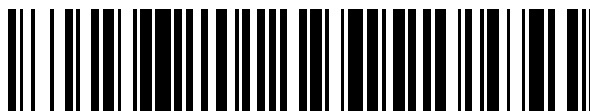


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 530 510**

51 Int. Cl.:

C07K 7/08 (2006.01)

C07K 14/195 (2006.01)

C07K 16/12 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

A61K 39/40 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.1998 E 08010103 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.11.2014 EP 1985625**

54 Título: **Constructos peptídicos sintéticos para el diagnóstico y tratamiento de periodontitis asociada con Porphyromonas gingivalis**

30 Prioridad:

30.04.1997 AU PO652897

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

03.03.2015

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF MELBOURNE (100.0%)
ROYAL PARADE, PARKVILLE
MELBOURNE, VIC 3052, AU**

72 Inventor/es:

**REYNOLDS, ERIC CHARLES;
O'BRIEN-SIMPSON, NEIL MARTIN y
SLAKESKI, NADA**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 530 510 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

Constructos peptídicos sintéticos para el diagnóstico y tratamiento de periodontitis asociada con *Porphyromonas gingivalis*

CAMPO DE LA INVENCIÓN

- 5 Esta invención se refiere a una composición oral y a una composición inmunógena para la supresión de los efectos patógenos de la bacteria intraoral *Porphyromonas gingivalis* asociada con enfermedad periodontal. También se refiere a pruebas de diagnóstico para determinar la presencia de *Porphyromonas gingivalis* en muestras de placa subgingival y anticuerpos específicos anti-*P. gingivalis* en suero. Las composiciones comprenden constructos peptídicos sintéticos que corresponden a áreas estructural y funcionalmente significativas del complejo de
- 10 proteinasa-adhesina PrtR-PrtK de *Porphyromonas gingivalis*. También se describen métodos para preparar los constructos peptídicos sintéticos. Los constructos peptídicos sintéticos son útiles como inmunógenos para provocar una respuesta inmunitaria frente a *P. gingivalis*, y se pueden usar para generar antisuero específico de la proteína y específico del péptido, útil para inmunización pasiva y como reactivos para ensayos de diagnóstico.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

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

- 30 *P. gingivalis* es un bacilo gramnegativo proteolítico, anaerobio, con pigmentos negros, que obtiene energía del metabolismo de aminoácidos específicos. El microorganismo tiene una absoluta necesidad de hierro para su crecimiento, preferentemente en la forma hemo, o su producto de oxidación de Fe (III) hemina, y, cuando se hace crecer en condiciones de hemina en exceso es altamente virulento en los animales de experimentación. Varios factores de virulencia se han implicado en la patogenicidad de *P. gingivalis*, incluyendo la cápsula, adhesinas, citotoxinas y enzimas hidrolíticas extracelulares. A fin de desarrollar una vacuna eficaz y segura para prevenir la
- 35 colonización por *P. gingivalis*, es necesario identificar antígenos eficaces que estén implicados en la virulencia, que tengan utilidad como inmunógenos para generar anticuerpos neutralizantes.

- Se ha purificado y caracterizado un complejo multiproteico de 300 kDa de cisteína proteinasas y adhesinas, que es un factor de virulencia importante para *P. gingivalis*. Este complejo se caracterizó bioquímicamente y se describió en la Solicitud de Patente Internacional WO 97/16542. El complejo consiste en una proteinasa específica de Arg de 160
- 40 kDa con dominios de adhesinas C-terminales (denominada PrtR) asociada con una proteasa específica de Lys de 163 kDa también con dominios de adhesinas C-terminales (denominada PrtK). Los dominios de adhesinas C-terminales de la PrtR y PrtK tienen homología con una hemaglutinina de *P. gingivalis* denominada HagA. El gen que codifica HagA se ha descrito en la solicitud internacional WO 96/17936.

- 45 El documento WO95/07286 describe fragmentos de gingipaina, una proteína que es parte del complejo PrtK-PrtR, y su uso en composiciones para preparaciones inmunógenas, incluyendo vacunas.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

Se ha identificado un número de secuencias estructural y funcionalmente significativas del complejo multiproteico de 300 kDa de cisteína proteinasas y adhesinas que es un factor de virulencia importante para *P. gingivalis*. Estas secuencias se exponen en la Tabla 1.

50

Tabla 1. Secuencias de aminoácidos del complejo de proteinasa-adhesina PrtR-PrtK de significancia funcional.

Motivo de unión de adhesina	Secuencia (código de una sola letra)	Designación
PrtR44 (946-971)	PNGTPNPNPNPNPDIPNPGTTTLESF	ABM3 (R44)
PrtR39 (967-989)	PHGTPNPNPMPMPMPGTTLESF	ABM3 (K39)
HagA (1860-1881)	PNGTPNPNPNPNPGTTTLESF	ABM3 (HagA1)
HagA (1404-1425)	PNGTPNPNPNPNPGTTTLESF	ABM3 (HagA2)
HagA (948-969)	PNGTPNPNPNPNPGTTTLESF	ABM3 (HagA3)
HagA (496-513)	PNGTPNPNPGTTTLESF	ASM3 (HagA4)

5 En consecuencia, en un primer aspecto, la presente invención consiste en una composición para uso para provocar una respuesta inmunitaria frente a *Porphyromonas gingivalis*, incluyendo la composición un adyuvante adecuado y/o vehículo o excipiente aceptable y al menos un péptido seleccionado del grupo que consiste en:

PNGTPNPNPNPNPNPNPGTTTLESF;

PNGTPNPNPNPNPNPGTTLESF;

PNGTPNPNPNPNPGTTTLESF;

PNGTPNPNPGTTTLESF;

10 Cuando la composición incluye más de un péptido, los péptidos pueden estar presentes en la composición como péptidos individuales o en formas multímeras. Cuando se usan formas multímeras, el multímero puede comprender múltiples copias del mismo péptido; sin embargo, se prefiere que el multímero incluya péptidos diferentes.

Los péptidos (PAS1 y PAS2) de la Tabla 1 representan secuencias de las cisteína proteinasas específicas de Arg (PrtR45) y específicas de Lys (PrtK48) que forman el sitio activo que contiene la díada catalítica Cys-His.

15 En un segundo aspecto, la presente invención consiste en un péptido, seleccionándose el péptido de un grupo que consiste en:

PNGTPNPNPNPNPNPNPGTTTLESF;

PNGTPNPNPNPNPNPGTTLESF;

PNGTPNPNPNPNPGTTTLESF;

20 PNGTPNPNPGTTTLESF;

Como será fácilmente manifiesto para las personas expertas en esta área, estos péptidos se pueden usar como antígenos en pruebas de diagnóstico, o como inmunógenos en formulaciones.

25 En un tercer aspecto, la presente invención consiste en una preparación de anticuerpos que comprende anticuerpos dirigidos específicamente contra la composición del primer aspecto de la invención o los péptidos del segundo aspecto de la invención. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos policlonales o monoclonales.

En un cuarto aspecto, la presente invención consiste en el uso de una preparación de anticuerpos del tercer aspecto en la preparación de un medicamento para el tratamiento de *Porphyromonas gingivalis*.

En una realización preferida, el uso de dicha preparación de anticuerpos en la preparación de un medicamento se caracteriza por el hecho de que el medicamento es un colutorio o un dentífrico.

30 En un quinto aspecto, la presente invención consiste en el uso de la composición del primer aspecto o el uso del péptido del segundo aspecto en la preparación de un medicamento para el tratamiento de *Porphyromonas gingivalis*.

En una realización preferida, el uso de dicha composición o de dicho péptido en la preparación de un medicamento se caracteriza por el hecho de que el medicamento es un colutorio o un dentífrico.

35 En un sexto aspecto, la presente invención consiste en el uso de una composición del primer aspecto en la preparación de un medicamento para uso en la reducción de la posibilidad de infección por *Porphyromonas gingivalis* en un individuo y/o la gravedad de dicha enfermedad.

A lo largo de esta memoria descriptiva, excepto que el contexto lo requiera de otro modo, la palabra “comprender”, o variaciones tales como “comprende” o “que comprende”, se entenderá que implica la inclusión de un elemento o entero o grupo de elementos o enteros señalados, pero no la exclusión de ningún otro elemento o entero o grupo de elementos o enteros.

- 5 Los péptidos se pueden sintetizar usando uno de los varios métodos de síntesis peptídica conocidos en la técnica, incluyendo la síntesis peptídica en fase sólida estándar usando t-butiloxicarbonil aminoácidos (Mitchell et al., 1978, *J. Org. Chem.* 43:2845-2852), usando 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc) aminoácidos en un soporte de poliamida (Druland et al., 1986, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1 125-137), mediante síntesis pepsan (Geisen et al., 1987, *J. Immunol Methods* 03:259; 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:3998) o mediante síntesis en fase líquida estándar.
- 10 Para sintetizar los antígenos peptídicos, se puede usar una variedad de métodos para la síntesis de moléculas peptídicas de peso molecular elevado multivalentes/multi-peptídicas. Esto se logrará usando estrategias conocidas en la técnica y nuevas estrategias de ligación.

Preparación de péptidos sintéticos

- 15 Los péptidos de la Tabla 1 se pueden sintetizar de manera que contengan dos ligandos, que pueden ser iguales o diferentes, que pueden ser o no el ligando complementario. Estos péptidos bimodales pueden incorporar cualquier ligando; de este modo se pueden utilizar para la síntesis de constructos multi-peptídicos enlaces tales como tioéter, tioéster, hidrazona, oxima, tiazolidina Shao y Tam., 1995, *J. Am. Chem. Soc.* 117, 3893-3899, Rose, et al 1996, *Bioconjugate Chem.* 7(5):552-556. Rose, K., 1994, *J. Am. Chem. Soc.* 116:30-33, Canne., et al 1995, *J. Am. Chem. Soc.* 117:2998-3007, Lu., et al, 1991, *Mol. Immunol* 28(6):623-630, Liu y Tam., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91.:6584-6588. Una nueva estrategia ligante es usar la reacción conocida entre tioanisol y péptidos acrilólicos (O'Brien-Simpson et al., 1997, *J. Am. Chem. Soc.* 119 (6)), que da como resultado la sustitución en para de tioanisol mediante el doble enlace en condiciones ácidas. Sintetizando y mezclando acrilóil-péptidos y feniltio acetil péptidos y exponiéndolos a condiciones ácidas, la ligación puede transcurrir mediante alquilación de Friedel-Crafts. La ligación se puede lograr entre péptidos y sobre uso un soporte de oligolisina derivatizado con uno de los ligandos. Las
- 20
- 25 condiciones para la ligación pueden consistir en condiciones de reacción de Friedel-Crafts, que son conocidas en la técnica, y condiciones de escisión peptídica conocida.

- La introducción de grupos de ligandos para formar péptidos bimodales se puede lograr acoplando un ligando sobre grupos amino libres, lo que es conocido en la técnica, en el término N o C de un péptido, o en la secuencia peptídica. Esto se puede lograr acoplando, por ejemplo, ácido Fmoc(Fmoc) 2,3 diamino propiónico o Fmoc Lys (Fmoc)-OH o restos de lisina protegidos ortogonalmente, tales como Fmoc Lys (Mtt)-OH, usando protocolos de acoplamiento peptídico estándar sobre el término N, o introducidos en el término C o en la secuencia peptídica. Después de la desprotección, los grupos de ligandos se pueden acoplar en los grupos amino y mediante desprotección selectiva de, por ejemplo, Fmoc Lys (Mtt), se pueden acoplar diferentes ligandos a un péptido individual. En cualquier punto en la síntesis se pueden introducir restos espaciadores entre el péptido y los ligandos, y/o entre los ligandos, lo que se puede usar para reducir el impedimento estérico en la reacción de ligación. La
- 30
- 35 Figura 1 muestra el protocolo de síntesis.

- La ligación peptídica se puede lograr en disolución o en fase sólida. La incorporación de diferentes ligandos y la protección selectiva de un ligando puede permitir la síntesis de constructos multivalentes, multi-peptídicos, con lo que los péptidos se ligan secuencialmente. Esta estrategia tiene la ventaja de que la orientación y el orden de los péptidos ligados son conocidos y se pueden controlar. Los grupos protectores para ligandos pueden ser, por ejemplo, Fmoc, aliloxicarbonilo (Aloc) o nitrocinamiloxicarbonilo (Noc), que son estables a condiciones de escisión estándar pero se eliminan fácilmente en condiciones básicas o transferencia catalítica de alilo. La Figura 2 muestra el esquema de ligación para la síntesis de constructos peptídicos multivalentes usando péptidos bimodales. El protocolo se puede adaptar para una variedad de químicas de ligación alterando simplemente los ligandos que se
- 40
- 45 acoplan al péptido para formar el péptido bimodal.

- La adición por etapas de cada péptido se puede lograr en fase sólida. Esto se puede lograr sintetizando un péptido sobre el soporte sólido vía un asa lábil a bases, por ejemplo ácido 4-hidroximetilbenzoico. Esto puede permitir la desprotección total de la cadena lateral del péptido, quedando el péptido unido al soporte sólido. Esto permitiría que todavía se llevase a cabo la ligación en disolventes acuosos, similar a los usados para la ligación en fase de disolución, excepto que la separación del producto del ligando desde el péptido bimodal sin reaccionar se puede lograr simplemente lavando el soporte sólido. La reacción se puede monitorizar mediante ensayos de ninhidrina o ácido trinitrobenzenosulfónico, con lo que los restos de lisina en el péptido bimodal necesitarían ser protegidos, por ejemplo, con (4,4-dimetil-2,6-dioxociclohex-1-ilideno)etilo (Dde) que es estable a escisión ácida pero se puede eliminar con hidrazina. La Figura 3 muestra la estrategia de ligación para la fase sólida.
- 50

- 55 Los péptidos bimodales se pueden sintetizar de manera que los ligandos estén en el término N y C. Esto permitiría la preparación de péptidos cíclicos y la formación de constructos bi-peptídicos en los que los péptidos pueden correr paralelos o antiparalelos entre sí acoplando términos N a N y C a C o términos N a C juntos respectivamente (Figura 4).

Otra técnica para la síntesis de constructos peptídicos multivalentes es ligar péptidos sobre un soporte de oligolisina (Rose, et al 1996, Bioconjugate Chem. 7(5):552-556, Canne., et al 1995, J. Am. Chem. Soc. 117:2998-3007 y Lu., et al, 1991, Mol. Immunol 28(6):623-630). Incorporando un número de diferentes ligandos y o ligandos protegidos sobre el soporte de lisina, los péptidos se pueden ligar a una posición particular en el soporte. Las químicas de ligación, tales como oxima o hidrazona con haloacilación y alquilación de Friedel-Crafts, se pueden usar secuencialmente sin la necesidad de la protección de los ligandos. La protección de los ligandos se puede usar para incrementar el número de diferentes péptidos incorporados sobre el soporte de lisina. La Figura 5 demuestra el protocolo de síntesis.

Otro método conocido en la técnica es la síntesis de péptidos acrilófilicos y su polimerización con acrilamida (O'Brien-Simpson et al., 1997, J. Am. Chem. Soc. 119 (6)) o acrilóil aminoácidos. Los péptidos del complejo proteico PrtR-PrtK listados en la Tabla 1 se pueden acrilóilar y polimerizar ya sea de forma individual o en combinación. Aunque este método permite la polimerización de un número de péptidos juntos, el orden en el que se incorporan los péptidos no se puede controlar.

El constructo peptídico final puede contener o no todos, la suma o parte de los péptidos listados en la Tabla 1. También el constructo puede contener o no epítomos de linfocitos T promiscuos conocidos en la técnica (Kaumaya et al 1994, en Solid Phase Synthesis, Ed Epton, R), o una secuencia derivada procedente de motivos estructurales/de unión de péptidos de unión del MHC clase II (O'Sullivan et al., 1991, J. Immunol, 147:2663-2669, Hammer et al., 1993, Cell, 74:197-203 y Alexander et al., 1994, Immunity, 1:751-761). Además, se pueden incluir restos lipídicos, tales como ácido palmítico o colesterol, para potenciar las propiedades inmunógenas del constructo peptídico. También se pueden incorporar con el constructo peptídico secuencias escindibles enzimáticas conocidas en la técnica (Duncan et al., ref), o secuencias derivadas de motivos de escisión (Van Noort y van der Drift., ref).

Los antígenos peptídicos sintéticos identificados en la Tabla 1 son de particular interés para diagnóstico y neutralización mediante inmunidad pasiva a través de composiciones orales que contienen anticuerpos neutralizantes, y mediante el desarrollo de vacunas. La superioridad de estos antígenos peptídicos sintéticos frente a los antígenos de *P. gingivalis* descritos previamente es que estas secuencias son homólogas a áreas estructural y funcionalmente significativas del factor de virulencia principal de *P. gingivalis*, el complejo de proteinasa-adhesina PrtR-PrtK. Los péptidos representan secuencias asociadas con los dominios de unión de las adhesinas, haciéndolos ideales para el desarrollo de productos de diagnóstico e inmunoprolácticos.

Los anticuerpos frente a los antígenos se pueden usar en composiciones orales tales como pasta de dientes y colutorio para neutralizar los antígenos y de este modo prevenir la enfermedad. Los anticuerpos específicos de los antígenos se pueden usar también para la detección temprana de *P. gingivalis* en muestras de placa subgingival mediante un ensayo de diagnóstico. Una vacuna basada en estos antígenos y un adyuvante adecuado suministrado mediante pulverización nasal, oralmente, o mediante inyección, para producir una respuesta inmunitaria específica frente a estos antígenos, reduciendo de ese modo la colonización y virulencia de *P. gingivalis* y evitando de ese modo la enfermedad. Los antígenos peptídicos de la presente invención se pueden usar como inmunógenos en formulaciones de vacuna profilácticas y/o terapéuticas; o como un antígeno en inmunoensayos de diagnóstico dirigidos a la detección de infección por *P. gingivalis* al medir un incremento en el título sérico de anticuerpo específico de *P. gingivalis*. También, los péptidos sintéticos de la presente invención se pueden usar para generar anticuerpo específico de antígeno, que puede ser útil para la inmunización pasiva, y como reactivos para ensayos de diagnóstico dirigidos a detectar la presencia de *P. gingivalis* en muestras clínicas tales como muestras de placa subgingival.

A diferencia de células completas de *P. gingivalis* u otros antígenos preparados previamente, los antígenos peptídicos sintéticos descritos aquí son antígenos seguros y eficaces para la preparación de una vacuna para la prevención de enfermedad periodontal asociada con *P. gingivalis*.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Síntesis de péptidos bimodales. Aunque se muestra aquí un ejemplo específico, se puede introducir cualquier ligando en los grupos amino a o e de lisina. (a) Acilación, por ejemplo aminoácido:HOBt:HBTU:DIPEA 1:1:1:1,5 en dimetilformamida (DMF). (b) Desprotección de Fmoc, por ejemplo piperidina al 20% en DMF. (c) Ácido levulínico:diisopropilcarbodiimida (DIC) 2:1 en diclorometano (DCM). 1 h. (d) Eliminación de Mtt, 3x 1% de TFA en DCM, 3 min. (e) Ácido Fmoc-hidrazinobenzoico:DIC 2:1, en DCM, 1 h. (f) Escisión ácida, por ejemplo TFA:agua 95:5.

Figura 2: Síntesis de constructos peptídicos multivalentes usando péptidos bimodales. (a) Ligación. Urea 8 M y NaH₂PO₄ 0,1 M (intervalo de pH 3-4,7). La ligación se puede monitorizar mediante HPLC analítica de fase inversa y espectrometría de masas. (b) Desprotección, por ejemplo se elimina Aloc mediante transferencia del grupo alilo catalizada por paladio(0) a un receptor básico. El producto de la ligación se puede purificar mediante HPLC preparativa y se puede liofilizar. (c) Ligación. Condiciones similares a como se describe en (a). Se pueden usar diferentes químicas de ligación sintetizando péptidos con diferentes ligandos y sintetizando ligandos no complementarios en el mismo péptido, evitando de ese modo ligandos protegidos. El símbolo de cuadrado indica protección, (L) ligando, (P) péptido.

Figura 3: Síntesis de constructos peptídicos multivalentes usando péptidos bimodales mediante fase sólida. (a) Desprotección y ligación. El grupo protector S-acetilo se elimina mediante hidroxiamina acuosa 0,05 M, pH 7,3. Después de lavar, el primer péptido se puede ligar en el grupo SH, hidrocloreto de guanidina acuoso 6 M y EDTA 0,05 M pH 6,4-6,5 ajustado mediante Tris.HCl 1 M en nitrógeno. El tampón de ligación puede contener disolventes orgánicos tales como acetonitrilo. (b) Desprotección. El grupo protector S-acetilo se puede eliminar mediante hidroxiamina acuosa 0,05 M, pH 7,3. (c) Ligación, como se describe en (a), aunque se pueden usar diferentes químicas de ligación al sintetizar péptidos con diferentes ligandos y al sintetizar ligandos no complementarios en el mismo péptido, evitando de ese modo ligandos protegidos. El símbolo de cuadrado indica protección, (L) ligando, (P) péptido, (B) asa lábil a bases, ácido 4-hidroximetilbenzoico.

Figura 4: Ciclación usando péptidos bimodales. (a) Desprotección y ciclación. La síntesis de péptidos bimodales que tienen ligandos complementarios en sus terminos N y C permite la ciclación de estos péptidos en tampones acuosos. (i) Ligación. (ii) Desprotección y ligación. (iii) Escisión del péptido cíclico desde el asa lábil a bases. Ejemplo: los péptidos mostrados proceden de la Tabla 1 y presentan los péptidos de sitio activo de prtR45. (a) Ligación. TFA acuoso a 95%. La ligación se puede monitorizar mediante HPLC analítica de fase inversa y espectrometría de masas. Las condiciones de ligación se pueden variar para incluir depuradores usados habitualmente en síntesis peptídica y diferentes condiciones ácidas para potenciar la alquilación de Friedel-Crafts. (b) Desprotección y ligación. El grupo protector S-acetilo se puede eliminar mediante hidroxiamina acuosa 0,05 M, pH 7,3. Ligación, hidrocloreto de guanidina acuoso 6 M y EDTA 0,05 M pH 6,4-6,5 ajustado mediante Tris.HCl 1 M en nitrógeno. La estrategia de ligación también se puede lograr en la fase sólida. Seleccionando qué ligando introducir en el término N y C, se pueden sintetizar péptidos cíclicos paralelos y antiparalelos.

Figura 5. Síntesis de péptidos antigénicos múltiples multivalentes (MAPs) usando químicas de ligación alternativas. Usando diferentes estrategias de ligación, se puede ligar una variedad de péptidos en un único péptido antigénico múltiple. El ejemplo mostrado es de péptidos listados en la Tabla 1. (a) Ligación, TFA acuoso a 95%. La ligación se puede monitorizar mediante HPLC analítica de fase inversa y espectrometría de masas. Desprotección, Aloc se puede eliminar mediante transferencia del grupo alilo catalizada por paladio(0) a un receptor básico, y tras la purificación, el segundo péptido se puede ligar al MPA, (c) urea 8 M y NaH₂PO₄ 0,1 M (intervalo de pH 3-4,7).

Figura 6. FPLC con filtración en gel de fracciones reunidas y concentradas que eluyen a partir de FPLC de intercambio aniónico en Q sefarosa. Las fracciones de intercambio aniónico que eluyen entre NaCl 160-246 mM y que representan el borde delantero del pico principal de actividad proteolítica-amidolítica se reunieron, se equilibraron en tampón TC pH 7,4 que contiene NaCl 50 mM, se concentraron y se aplicaron a una columna de filtración en gel Superose 12 HR 10/30 usando el mismo tampón a un caudal de 0,3 ml min⁻¹. Las fracciones (0,5 ml) se evaluaron en busca de la actividad proteolítica/amidolítica usando azocaseína, Bz-L-Arg-pNA y z-L-Lys-pNA. La actividad amidolítica de cada fracción de 0,5 ml con Bz-L-pNA se muestra mediante el histograma.

Figura 7. SDS-PAGE (condiciones hervidas/reducidas) del pico de intercambio iónico (Mono Q) que eluye a NaCl 200 mM y que contiene solamente actividad específica de Arg. Línea 1, patrones de masa molecular baja de Pharmacia; línea 2, proteinasa específica de Arg de 50 kDa purificada, PrtRII50.

Figura 8. Alineamiento de secuencias de aminoácidos deducidas de PrtRII50, proteinasa específica de Arg PrtR45 y proteinasa específica de Lys PrtK48, con similitud optimizada. Los restos aminoacilicos de PrtRII50 están numerados a partir del resto N-terminal de la proteína madura. * Indica un resto idéntico.

Figura 10. Ensayo de unión competitiva que demuestra la unión del complejo de proteinasa-adhesión PrtR-Prk inactivado por TLCK al péptido sintético correspondiente al motivo de unión de adhesina (ABM) putativo. -●-●- péptido sintético ABM. PYQPVSNLATTQGQKVTWKWDAPSTK. -■-■- péptido de control, FNGGISLANYTGHGSETAWGT, que corresponde a los restos 428-448 de PrtR45. -▲-▲- caseína. Véase Materiales y Métodos para detalles.

Figura 11. Tamaño promedio de la lesión de ratones expuestos a Porphyromonas gingivalis en un modelo de absceso de ratón. Ratones BALB/C (6 por grupo) se inocularon (s.c.) con 50 µg de antígeno emulsionado en CFA e IFA para las inoculaciones primarias y secundarias, y se expusieron entonces (s.c.) a 8 X 10⁹ células de la cepa 33277 de P. gingivalis.

ABM1(R45)-DT, (□); ABM2(K39)-KT, (○); ABM3(R44)-DT, (★); ABM4(R17)-DT, (●); ABMS(R15)-DT, (◆); ABM6(K39)-DT, (◇); PAS1(R45)-DT, (▲); PAS1(K48)-DT, (■); péptido control-DT, (-◇-); cepa 33277 de P. gingivalis exterminada con formalina (+); DT, (-- △--); adyuvante, (X). Por claridad, no se muestran las barras de error.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a una composición oral y a una composición inmunógena para la supresión de los efectos

patógenos de la bacteria intraoral *Porphyromonas gingivalis* asociada con enfermedad periodontal. También se refiere a pruebas de diagnóstico para determinar la presencia de *Porphyromonas gingivalis* en muestras de placa subgingival y anticuerpos anti-*P. gingivalis* específicos en suero. Los antígenos peptídicos de la Tabla 1 se pueden sintetizar individualmente o como constructos multiméricos o multipeptídicos.

5 Los antígenos peptídicos sintéticos se usan para generar anticuerpos policlonales o monoclonales usando técnicas estándar. Los animales usados para la generación de anticuerpos pueden ser ratones, conejos, cabras, pollos, ovejitas, caballos, vacas, etc. Cuando se detecta mediante inmunoensayo un título elevado de anticuerpos frente a los antígenos, los animales son sangrados, o se recogen los huevos o la leche, y el suero se prepara y/o el anticuerpo se purifica usando técnicas estándar, o se producen anticuerpos monoclonales fusionando células de bazo con células de mieloma usando técnicas estándar. El anticuerpo (fracción inmunoglobulínica) puede ser

Esta invención se refiere a una composición oral y a una composición inmunógena para la supresión de los efectos patógenos de la bacteria intraoral *Porphyromonas gingivalis* asociada con enfermedad periodontal. También se refiere a pruebas de diagnóstico para determinar la presencia de *Porphyromonas gingivalis* en muestras de placa subgingival y anticuerpos anti-*P. gingivalis* específicos en suero. Los antígenos peptídicos de la Tabla 1 se pueden sintetizar individualmente o como constructos multiméricos o multipeptídicos.

Los antígenos peptídicos sintéticos se usan para generar anticuerpos policlonales o monoclonales usando técnicas estándar. Los animales usados para la generación de anticuerpos pueden ser ratones, conejos, cabras, pollos, ovejitas, caballos, vacas, etc. Cuando se detecta mediante inmunoensayo un título elevado de anticuerpos frente a los antígenos, los animales son sangrados, o se recogen los huevos o la leche, y el suero se prepara y/o el anticuerpo se purifica usando técnicas estándar, o se producen anticuerpos monoclonales fusionando células de bazo con células de mieloma usando técnicas estándar. El anticuerpo (fracción inmunoglobulínica) se puede separar del cultivo o fluido ascítico, suero, leche o huevo mediante extracción con sal, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico y/o de afinidad, y similar, prefiriéndose la extracción con sal. En el método de extracción con sal, el antisuero o la leche se satura con sulfato de amonio para producir un precipitado, seguido de la dialización del precipitado frente a disolución salina fisiológica para obtener la fracción inmunoglobulínica purificada con el anticuerpo específico. El anticuerpo preferido se obtiene del antisuero equino y del antisuero bovino y leche. En esta invención, el anticuerpo contenido en el antisuero y leche, obtenido inmunizando el animal con los antígenos, se mezcla en la composición oral. En este caso, se puede usar el antisuero y la leche, así como el anticuerpo separado y purificado del antisuero y la leche. Cada uno de estos materiales se puede usar solo o en combinación de dos o más. Los anticuerpos se pueden usar en composiciones orales tales como pasta de dientes y colutorio para neutralizar *P. gingivalis* y de este modo prevenir la enfermedad. Los anticuerpos también se pueden usar para la detección temprana de *P. gingivalis* en muestras de placa subgingival mediante un ensayo inmunosorbente enlazado a enzima (ELISA) próximo al sillón dental.

Se prefiere que, para composiciones orales, la cantidad de los anticuerpos anteriores administrados sea 0,0001-50 g/kg/día, y que el contenido de los anticuerpos anteriores sea 0,0002-10% en peso, preferiblemente 0,002-5% en peso de la composición. La composición oral de esta invención que contiene el anticuerpo de suero o leche mencionado anteriormente se puede preparar y utilizar en diversas formas aplicables a la boca, tal como dentífrico, incluyendo pastas de dientes, polvos para dientes y dentífricos líquidos, colutorios, trociscos, gomas de mascar, pastas dentales, cremas para masaje gingival, comprimidos para gárgaras, productos lácteos y otros productos alimentarios. Además, la composición oral de acuerdo con esta invención puede incluir otros ingredientes adicionales bien conocidos, dependiendo del tipo y forma de una composición oral particular.

En ciertas formas altamente preferidas de la invención, la composición oral puede ser de carácter sustancialmente líquido, tal como un colutorio o enjuague. En tal preparación, el vehículo típicamente es una mezcla de agua-alcohol que incluye, de forma deseable, un humectante como se describe a continuación. Generalmente, la relación en peso de agua a alcohol está en el rango de alrededor de 1:1 a alrededor de 20:1. La cantidad total de mezcla de agua-alcohol en este tipo de preparación está típicamente en el intervalo de alrededor de 70 a alrededor de 99,9% en peso de la preparación. El alcohol es típicamente etanol o isopropanol. Se prefiere etanol.

El pH de tales preparaciones líquidas y otras preparaciones de la invención está generalmente en el intervalo de alrededor de 4, 5 a alrededor de 9 y típicamente de alrededor de 5,5 a 8. El pH está preferiblemente en el intervalo de alrededor de 6 a alrededor de 8,0, preferiblemente 7,4. El pH se puede controlar con ácido (por ejemplo, ácido cítrico o ácido benzoico) o base (por ejemplo, hidróxido de sodio) o tampón (como con citrato, benzoato, carbonato, o bicarbonato de sodio, hidrogenofosfato disódico, dihidrogenofosfato de sodio, etc).

Otras formas deseables de esta invención, la composición oral puede ser de carácter sustancialmente sólido o pastoso, tal como polvo para dientes, un comprimido dental o un dentífrico, es decir, una pasta de dientes (crema dental) o dentífrico en gel. El vehículo de tales preparaciones orales sólidas o pastosas generalmente contiene material de pulido aceptable dentalmente. Ejemplos de materiales de pulido son metafosfato de sodio insoluble en agua, metafosfato de potasio, fosfato de tricalcio, fosfato de calcio dihidratado, fosfato dicálcico anhidro, pirofosfato de calcio, ortofosfato de magnesio, fosfato de trimagnesio, carbonato de calcio, alúmina hidratada, alúmina calcinada, silicato de aluminio, silicato de zirconio, sílice, bentonita, y mezclas de estos. Otro material de pulido apropiado incluye las resinas termoendurecibles en partículas, tales como melamina-, fenol-, y urea-formaldehídos, y

poliepóxidos y poliésteres reticulados. Los materiales de pulido preferidos incluyen sílice cristalina que tiene un tamaño de partículas de hasta alrededor de 5 micrómetros, un tamaño medio de partículas de hasta alrededor de 1,1 micrómetros, y un área superficial de hasta alrededor de 50.000 cm²/g, gel de sílice o sílice coloidal, y aluminosilicato de metal alcalino amorfo complejo.

- 5 Cuando se emplean geles visualmente transparentes, un agente de pulido de sílice coloidal, tal como los vendidos bajo la marca comercial SYLOID como Syloid 72 y Syloid 74 o bajo la marca comercial SANTOCEL como Santocel 100, complejos de aluminosilicato de metal alcalino son particularmente útiles, dado que tienen índices de refracción próximos a los índices de refracción de sistemas líquidos de agentes de gelificación (incluyendo agua y/o humectante) utilizados comúnmente en dentífricos.
- 10 Muchos de los materiales de pulido denominados "insolubles en agua" son de carácter aniónico, y también incluyen pequeñas cantidades de material soluble. De esta manera, el metafosfato de sodio insoluble se puede formar de cualquier forma apropiada, como se ilustra por Thorpe's Dictionary of Applied Chemistry, Volume 9, 4ª Edición, p. 510-511. Las formas de metafosfato de sodio insoluble conocidas como sal de Madrell y sal de Kurrol son además ejemplos de materiales apropiados. Estas sales de metafosfato muestran sólo una solubilidad ínfima en agua, y por lo tanto se refieren comúnmente como metafosfatos insolubles (IMP). Hay presente en aquellas una cantidad minoritaria de material de fosfato soluble como impurezas, usualmente un pequeño porcentaje tal como hasta 4% en peso. La cantidad de material de fosfato soluble, que se considera que incluye trimetafosfato de sodio soluble en el caso de metafosfato insoluble, se puede reducir o eliminar lavando con agua si desea. El metafosfato de metal alcalino insoluble se emplea típicamente en forma de polvo de un tamaño de partículas de tal manera que no más de 1% del material es mayor de 37 micrómetros.

El material de pulido está presente generalmente en las composiciones sólidas o pastosas en concentraciones en peso de alrededor de 10% a alrededor de 99%. Preferiblemente, está presente en cantidades de alrededor de 10% a alrededor de 75% en pasta de dientes, y de alrededor de 70% a alrededor de 99% en polvo para dientes. En pastas de dientes, cuando el material de pulido es de naturaleza silíceo, generalmente está presente en cantidad de 25 alrededor de 10-30% en peso. Otros materiales de pulido están presentes típicamente en cantidad de alrededor de 30-75% en peso.

En una pasta de dientes, el vehículo líquido puede comprender agua y humectante, típicamente en una cantidad que oscila de alrededor de 10% a alrededor de 80% en peso de la preparación. Ejemplos de humectantes/vehículos apropiados son glicerina, propilenglicol, sorbitol y polipropilenglicol. También son ventajosas las mezclas líquidas de agua, glicerina y sorbitol. En geles transparentes en los que el índice de refracción tiene una consideración importante, se emplean preferiblemente alrededor de 2,5-30% peso/peso de agua, 0 a alrededor de 70% peso/peso de glicerina y alrededor de 20-80% peso/peso de sorbitol.

Las pasta de dientes, cremas y geles contienen típicamente un espesante natural o sintético o agente gelificante en proporciones de alrededor de 0,1 a alrededor de 10, preferiblemente alrededor de 0,5 a alrededor de 5% peso/peso. 35 Un espesante apropiado es hectorita sintética, una arcilla compleja de silicato de metal alcalino y magnesio coloidal sintético, disponible por ejemplo como Laponite (por ejemplo CP, SP 2002, D) comercializada por Laporte Industries Limited. Laponite D tiene, aproximadamente en peso, 58,00% de SiO₂, 25,40% de MgO, 3,05% de Na₂O, 0,98% de Li₂O, y algo de agua y metales en trazas. Su peso específico real es 2,53, y tiene una densidad aparente de 1,0 g/ml a 8% de humedad.

40 Otros espesantes apropiados incluyen musgo irlandés, carragenina iota, goma de tragacanto, almidón, polivinilpirrolidona, hidroxietilpropilcelulosa, hidroxibutilmetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxietilcelulosa (por ejemplo disponible como Natrosol), carboximetilcelulosa sódica, y sílice coloidal, tal como Syloid molido finamente (por ejemplo 244). También se pueden incluir agentes solubilizantes, tales como polioles humectantes como propilenglicol, dipropilenglicol y hexilenglicol, celosolubles tales como metil celosolve y etil celosolve, aceites vegetales y ceras que contienen al menos alrededor de 12 carbonos en una cadena lineal, tal como aceite de oliva, aceite de ricino y vaselina, y ésteres tales como acetato de amilo, acetato de etilo y benzoato de bencilo.

Se comprenderá que, como es convencional, las preparaciones orales son para ser vendidas o de otra manera distribuidas en envases etiquetados apropiados. Así, un frasco de enjuague bucal tendrá una etiqueta que lo describa, en sustancia, como un enjuague bucal o colutorio, y que tiene instrucciones para su uso; y una pasta de 50 dientes, crema o gel estará habitualmente en un tubo comprimible, típicamente de aluminio, plomo forrado o plástico, u otro dispensador comprimible, bomba o presurizado para dosificar los contenidos, que tienen una etiqueta que lo describe, en sustancia, como una pasta de dientes, gel o crema dental.

Los agentes tensoactivos orgánicos se usan en las composiciones de la presente invención para lograr una acción profiláctica incrementada, ayudar a conseguir una dispersión a conciencia y completa del agente activo por toda la cavidad oral, y hacer las presentes composiciones cosméticamente más aceptables. El material tensoactivo orgánico es preferiblemente de naturaleza aniónica, no iónica o anfófica, que no desnaturalizan el anticuerpo de la invención, y se prefiere emplear como el agente tensoactivo un material detergente que imparta a la composición propiedades detergentes y espumantes mientras que no desnaturalice el anticuerpo. Los ejemplos apropiados de agentes tensoactivos aniónicos son sales solubles en agua de monosulfatos de monoglicéridos con 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, sulfo-acetatos de alquilo superior, ésteres de ácidos grasos superiores de 1,2-dihidroxipropanosulfonato, y las acilamidas alifáticas superiores sustancialmente saturadas de compuestos de ácidos carboxílicos aminoalifáticos inferiores, tales como aquellos que tienen de 12 a 16 carbonos en los radicales de ácido graso, alquilo o acilo, y similares. Ejemplos de las últimas amidas mencionadas son N-lauroil sarcosina, y las sales de sodio, potasio, y etanolamina de N-lauroil, N-miristoil, o N-palmitoil sarcosina que debería de estar sustancialmente libre de jabón o material de ácido graso superior similar. El uso de estos compuestos de sarconita en las composiciones orales de la presente invención particularmente es ventajosa, dado que estos materiales muestran un marcado efecto prolongado en la inhibición de la formación de ácido en la cavidad oral, debido a la ruptura de carbohidratos, además de ejercer cierta reducción en la solubilidad del esmalte de los dientes en disoluciones ácidas. Ejemplos de agentes tensoactivos no iónicos solubles en agua, apropiados para uso con anticuerpos, son productos de condensación de óxido de etileno con diversos compuestos que contienen hidrógeno reactivo, reactivos con aquél que tienen cadenas hidrófobas largas (por ejemplo cadenas alifáticas de alrededor de 12 a 20 átomos de carbono), productos de condensación ("etoxámeros") los cuales 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 sorbitán) y óxido de polipropileno (por ejemplo, materiales Pluronic).

El agente tensoactivo está presente típicamente en una cantidad de alrededor de 0,1-5% en peso. Es digno de mención que el agente tensoactivo puede ayudar en la disolución del anticuerpo de la invención, y por consiguiente disminuye la cantidad de humectante solubilizante necesario.

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

También se puede emplear cualquier material saborizante o edulcorante apropiado. Ejemplos de constituyentes saborizantes apropiados son aceites saborizantes, por ejemplo aceite de menta verde, hierbabuena, menta fresca, sazafrán, clavo, salvia, eucalipto, mejorana, canela, limón, y naranja, y salicilato de metilo. Los agentes edulcorantes adecuados incluyen sacarosa, lactosa, maltosa, sorbitol, xilitol, ciclamato de sodio, perillartina, AMP (aspartil fenil alanina, éster metílico), sacarina, y similares. Convenientemente, los agentes aromatizantes y edulcorantes pueden comprender cada uno o juntos de alrededor de 0,1% a 5% más de la preparación.

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

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

Otra forma importante de la invención es una composición inmunógena basada en los antígenos peptídicos sintéticos y adyuvante adecuada suministrada mediante pulverización nasal, oralmente, o mediante inyección, para producir una respuesta inmunitaria específica frente al antígeno, reduciendo de ese modo la colonización de *P. gingivalis* y reduciendo la virulencia, evitando de ese modo la enfermedad. A diferencia de células completas de *P. gingivalis* u otros antígenos preparados previamente, los antígenos peptídicos descritos aquí son antígenos seguros y eficaces para la preparación de una vacuna para la prevención de enfermedad periodontal asociada con *P. gingivalis*. Adicionalmente, según la presente invención, el péptido antigénico producido se puede usar para generar antisuero de *P. gingivalis* útil para la inmunización pasiva frente a enfermedad periodontal e infecciones provocadas por *P. gingivalis*.

Todas las cantidades y proporciones citadas aquí y en las reivindicaciones anejas están en peso excepto que se indique de otro modo.

En tanto que los siguientes ejemplos describen materia objeto fuera del alcance de las reivindicaciones, su contenido debe ser entendido como comparativo.

EJEMPLO 1

La identificación del sitio activo de proteinasa y de los motivos de unión de adhesina se facilitó mediante la clonación y caracterización del segundo gen que codifica una proteinasa específica de Arg de *P. gingivalis* W50.

Materiales

Hexafluorofosfato de O-benzotriazol-*N,N,N,N'*-tetrametiluronio (HBTU), 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), diisopropiletilamina (DIPEA), *N,N*-dimetilformamida (DMF), piperidina, ácido trifluoroacético (TFA) y aminoácidos protegidos con 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) se obtuvieron de Auspep Pty Ltd (Melbourne, Australia). Triisopropilsilano (TIPS) y etanoditiol (EDT) se obtuvieron de Aldrich (New South Wales, Australia). 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU) se obtuvo de Sigma Chemical Company (New South Wales, Australia). Fenol y éter dietílico se obtuvieron de BDH (Poole, UK). Excepto que se señale de otro modo, las sustancias químicas fueron de grado de síntesis peptídica o su equivalente.

Cepa bacteriana y condiciones de crecimiento

Los cultivos liofilizados de *Porphyromonas gingivalis* W50 fueron proporcionados amablemente por el Profesor P. Marsh (PHLS, Centre for Applied Microbiology and Research, Wiltshire, UK). *P. gingivalis* W50 se hizo crecer de forma anaerobia (Bhogal et al., 1997), y las cepas JM109 y LE392 de *Escherichia coli* se hicieron crecer siguiendo los procedimientos descritos previamente (Slakeski et al., 1996).

Purificación de la proteinasa específica de Arg de 50 kDa

Se hizo crecer *P. gingivalis* W50 en cultivo discontinuo (5 l) y se cosechó en fase logarítmica tardía mediante centrifugación (5.000 x g, 20 min., 4°C). Las células se lavaron una vez con 150 ml de tampón TC (Tris-HCl 20 mM pH 7,4 y CaCl₂ 5 mM) que contiene NaCl 50 mM, y se sometieron a ultrasonidos como se describe previamente (Bhogal et al., 1997). El sonicado se centrifugó (100.000 x g, 30 min., 4°C), y el sobrenadante se filtró (0,22 µm) antes de FPLC de intercambio aniónico. El sonicado se aplicó a una columna de intercambio aniónico (HiLoad XK 16/10 Q Sepharose, Pharmacia-LKB) enfriada hasta 4°C, en inyecciones múltiples usando un Superloop (Pharmacia-LKB) de 50 ml. El sonicado se eluyó usando un gradiente lineal de 0-100% de tampón B durante 90 min. a un caudal de 2,0 ml min⁻¹. La absorbancia se monitorizó a 280 nm, y se recogió un eluato a 4°C en fracciones de 6 ml usando un colector de fracciones Frac 100 (Pharmacia-LKB). El tampón A fue tampón TC que contiene NaCl 50 mM, y el tampón B fue tampón TC que contiene NaCl 500 mM. Las fracciones se analizaron en busca de la actividad proteolítica y amidolítica usando azocaseína (A-2765, Sigma Chemical Co. St Louis, MO), benzoil-L-Arg-p-nitroanilida (Bz-L-Arg-pNA, Sigma) y benziloxycarbonil-L-Lys-p-nitroanilida (z-L-Lys-pNA, Calbiochem, Melbourne, Australia), como se describe previamente (Bhogal et al., 1997), excepto que las fracciones se incubaron previamente con cisteína 10 mM durante 10 min. a 25°C antes de la adición de sustrato. Para los ensayos amidolíticos, la absorbancia se monitorizó a 410 nm como se describe previamente (Bhogal et al., 1997), y la actividad amidolítica se expresó como U, en el que U = µmol de sustrato convertido min⁻¹ a 25°C. Las fracciones del intercambio aniónico que eluyen entre 160-246 mM de NaCl que contienen la relación más elevada de actividad específica de Arg a específica de Lys se lavaron y se concentraron en tampón TC que contiene NaCl 150 mM usando concentradores centripep y centricon 10 (Amicon), y se aplicaron a una columna de filtración en gel (Superose 12, HR 10/30, Pharmacia-LKB) usando tampón TC que contiene NaCl 150 mM a un caudal de 0,3 ml min⁻¹. La absorbancia se monitorizó a 280 nm, y las fracciones se recogieron a 4°C usando un colector de fracciones Frac 100. Los valores M_r de los picos de eluato se determinaron usando patrones de masa molecular de filtración en gel (Pharmacia-LKB). El pico que eluye a 50 kDa que contiene sólo actividad amidolítica específica de Arg se lavó en tampón TC que contiene NaCl 50 mM usando un concentrador centricon-10 (Amicon), y se aplicó a una columna de intercambio aniónico Mono Q (HR 5/5) usando un bucle de 5 ml, y se eluyó usando un gradiente lineal de 0-100% de tampón B a un caudal de 1,0 ml min⁻¹. El tampón A fue tampón TC que contiene NaCl 150 mM, y el tampón B fue tampón TC que contiene NaCl 500 mM. La absorbancia se monitorizó a 280 nm, y las fracciones se recogieron a 4°C usando un colector de fracciones Frac 100.

SDS-PAGE, transferencia de proteína y análisis de secuencia N-terminal

Se llevó a cabo SDS-PAGE usando un sistema de electroforesis Mini protean II (Biorad) con geles separadores de 1 mm al 12% (p/v), cubiertos con geles apiladores al 5% (Laemmli, 1970), y las proteínas se transfirieron y se secuenciaron N-terminalmente usando los procedimientos descritos previamente (Bhogal et al., 1997).

Clonación y análisis de la secuencia nucleotídica

Se cribó la genoteca LambdaGEM®-12 de *P. gingivalis* W50, descrita previamente (Slakeski et al., 1996), usando oligonucleótidos sintéticos derivados de la secuencia nucleotídica de *prtR* (Slakeski et al., 1996) que corresponde a la secuencia N-terminal de PrtR45. Las sondas oligonucleotídicas se marcaron en el extremo 5' usando γ ³²P ATP y T4 polinucleótido cinasa. Se cribaron aproximadamente 1,5 x 10⁴ fagos colocándolos sobre filtros de membrana de nailon e hibridando toda la noche con oligonucleótidos radiomarcados en tampón de hibridación 6 x SSC (SSC es citrato de sodio 15 mM, NaCl 150 mM pH 8,0), 0,25% de SDS, 5 x disolución de Denhardt (Sambrook et al., 1989) y 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón a 49°C. Los filtros se lavaron ampliamente en una disolución de 2 x SSC que contiene 0,1% de SDS (p/v) a 49°C. Los fagos de placas que se hibridan positivamente se purificaron usando procedimientos estándar (Sambrook et al., 1989). El ADN fágico se digirió con *Eco*72 I, y los fragmentos resultantes se ligaron en *Sma* I-BAP pUC18 (Pharmacia, Sydney, Australia), que se usó para transformar *E. coli* JM109 usando el procedimiento de choque térmico (Sambrook et al., 1989). El ADN molde bicatenario se secuenció como se describe previamente (Slakeski et al., 1996).

Se usó PCR para amplificar un fragmento de 991 pb que contiene el sitio *Eco* 72I interno codificado por *prtRII* usando dos cebadores oligonucleotídicos 5'-CGGCTTCCGTAAAGTC-3' (cebador directo idéntico a las bases 657-672 de la secuencia de *PrtRII*) y 5'-TGGCTACGATGACGATCATACGAC-3' (cebador inverso con 96% de identidad con las bases 1624-1647 de *PrtRII*). La PCR se llevó a cabo en un volumen final de 100 μ l, y cada mezcla de reacción contenía 100 ng de ADN genómico de *P. gingivalis* W50, dNTPs 0,2 mM, MgCl₂ 1,5 mM, 100 pmoles de cada cebador, Tris-HCl 20 mM, pH 8,4, KCl 50 mM y 2,5 U de Taq DNA Polymerase (Gibco BRL). La mezcla de reacción se calentó a 95°C durante 3 min. y después se sometió a 25 ciclos de desnaturalización del ADN a 95°C durante 30 s, hibridación del cebador a 40°C durante 1 min. y alargamiento a 72°C durante 2 min. Después del ciclo, la mezcla de reacción se calentó finalmente a 72°C durante 5 min. El ADN amplificado se purificó usando PCR SpinClean Kit (Progen), y se secuenció a lo largo del sitio *Eco* 72I en ambas direcciones.

Purificación de complejos de masa molecular elevada de proteínas específicas de Arg y específicas de Lys y adhesinas (complejos PrtR-PrtK)

Los complejos de proteinasa-adhesina asociados a las células, de masa molecular elevada, (complejos PrtR-PrtK) de *P. gingivalis* W50 se purificaron usando una combinación de cromatografía de intercambio aniónico, filtración en gel y afinidad de Arg-sefárosa de un producto celular sonificado como se describe previamente (Bhogal et al., 1997). Los complejos se caracterizaron usando SDS-PAGE, transferencia y análisis de secuencia, y se evaluaron para determinar la actividad enzimática usando los sustratos Bz-L-Arg-pNA y Z-L-Lys-pNA (Bhogal et al., 1997).

Síntesis peptídica en fase sólida

Los péptidos se sintetizaron manualmente usando protocolos de síntesis peptídica en fase sólida de Fmoc estándar. Los péptidos se ensamblaron como la forma carboxamídica usando la resina Fmoc-Pal-Peg-PS (PerSeptive Biosystems Inc., Framingham, MA). El acoplamiento se logró con activación mediante HBTU/HOBt usando 4 equiv. de Fmoc-aminoácido y 6 equiv. de DIPEA. El grupo Fmoc se eliminó mediante DBU al 2% v/v en DMF que contiene 2% v/v de piperidina. La escisión de los péptidos desde el soporte de la resina se llevó a cabo usando un cóctel de escisión de TFA:fenol:TIPS:EDT:agua (92:2:2:2:2) durante 2,5 horas. Tras la escisión, la resina se eliminó mediante filtración, y el filtrado se concentró hasta aproximadamente 1 ml en una corriente de nitrógeno. Después de que los productos peptídicos se precipitaron en éter frío, se centrifugaron y se lavaron tres veces. El precipitado peptídico se disolvió entonces en 10 ml de agua que contiene 0,1% v/v de TFA, y el residuo insoluble se eliminó mediante centrifugación.

La purificación de los péptidos sintéticos se llevó a cabo usando una columna Brownlee C18 Aquapore ODS (250 x 100 mm) instalada en un sistema de HPLC de Waters. Los cromatogramas se desarrollaron a un caudal de 5,0 ml min⁻¹ usando TFA al 0,1% v/v en agua (disolvente A) y TFA al 0,1% v/v en acetonitrilo acuoso al 90% (disolvente B). Los péptidos se eluyeron con un gradiente de 10-30% de disolvente B a lo largo de 40 min. La HPLC analítica se llevó a cabo usando una columna Brownlee C8 Aquapore RP-300 (220 x 4,6 mm) instalada en un sistema de HPLC de Applied Biosystems. Los cromatogramas se desarrollaron usando disolvente A y disolvente B a un caudal de 1,0 ml min⁻¹ y un gradiente lineal de 0-100% de disolvente B a lo largo de 30 min. El material eluido de las columnas se monitorizó mediante absorbancia a 214 nm. Los péptidos se analizaron mediante espectrometría de masas usando un PerSeptive Biosystems Voyager DE MALDI-TOF.

Ensayo de unión competitiva

Pocillos de placas de microtitulación de polivinilo de fondo redondo (Microtitre, Dynatech Laboratories, VA) se revistieron toda la noche a 4°C usando una disolución (5 mg/ml) del péptido del motivo de unión de adhesina (ABM) en disolución salina tamponada con fosfato 0,1 M, pH 7,4, que contiene 0,1% v/v de Tween 20 (PBST) y 0,1% de azida sódica. Tras eliminar la disolución de revestimiento, se añadió 2% p/v de polvo de leche desnatada en PBST, para bloquear el plástico no revestido que queda durante 1 hora a temperatura ambiente, y después se lavó (4 x PBST). Se incubó una disolución (1 mg/ml) del complejo de proteinasa-adhesina PrtR-PrtK (inactivado con TLCK 1 mM) con concentraciones conocidas de péptido ABM, péptido de control y caseína durante 1 hora, y después se transfirió a las placas de microtitulación revestidas con el péptido ABM. Tras la incubación durante 2 horas a 37°C, las placas se lavaron (5 x PBST). Entonces se añadió una dilución 1/10.000 de antisero anti-PrtR-PrtK de conejo en PBST que contiene 1% p/v de polvo de leche desnatada a los pocillos lavados, y se incubó durante 2 horas a 37°C. El anticuerpo unido se detectó mediante incubación con inmunoglobulina (Ig) de cabra conjugada con peroxidasa de rábano picante dirigida contra Ig de conejo (BioRad, Richmond, CA) durante 1,5 horas a 37°C. Después de lavar (5 x PBST), se añadió sustrato (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina 0,4 mM en tampón de acetato de sodio/ácido cítrico 0,1 M que contiene 0,004% v/v de peróxido de hidrógeno) y el desarrollo del color se detuvo mediante adición de H₂SO₄ 2 M. La densidad óptica (O.D.) a 450 nm se midió usando un lector de microplacas de BioRad modelo 450.

RESULTADOS

55 Purificación y caracterización de proteinasa específica de Arg PrtRII50

El sonificado celular de *P. gingivalis* W50 contenía 0,36 mg ml⁻¹ de proteína y una actividad de 2,4 y 1,1 μ mol min⁻¹ mg de proteína⁻¹ con 1,0 mM de Bz-L-Arg-pNA y z-L-Lys-pNA como sustratos respectivamente a 25°C. El sonificado se sometió a FPLC de intercambio aniónico en Q-sefárosa, y la actividad proteolítica/amidolítica que eluye entre

160-246 mM de NaCl se recogió y se concentró usando un concentrador centrípeto y centricon-10 (Amicon, Sydney, Australia). Esta fracción representó el borde delantero del pico principal de la actividad proteolítica/amidolítica, y contenía la relación más elevada de actividad específica de Arg a actividad específica de Lys. Después de concentrar, la fracción se aplicó a una columna de filtración en gel Superose 12 (Fig. 6). La actividad específica de Arg y de Lys se asoció con el material que eluye de masa molecular elevada correspondiente a los picos con valores M_r de 0,6-2,0 x 10⁶ Da y 300 kDa como se da a conocer previamente (Bhogal et al., 1997). Sin embargo, también se observó un pico de masa molecular más baja de 50 kDa, que presentó solamente actividad específica de Arg, y este pico se recogió para purificación posterior. El pico de filtración en gel de 50 kDa se aplicó a una columna de intercambio aniónico Mono Q y, con la aplicación de un gradiente de NaCl, la actividad específica de Arg eluyó en un pico distinto a una concentración de NaCl de 200 mM de NaCl, con una purificación de 28 veces con respecto al soncado bruto original. El pico que contiene actividad específica de Arg se sometió a SDS-PAGE, que confirmó una única banda proteica de 50 kDa (Fig. 7). La banda de 50 kDa se sometió a Trans-blott y se sometió a análisis de secuencia N-terminal, que proporciona la secuencia de aminoácidos YTPVEEKENGRMIVIPKKEYEEDIED. La especificidad de la proteinasa de 50 kDa por los restos de arginilo se confirmó mediante la enzima que escinde Bz-L-Arg-pNA pero no z-L-Lys-pNA. La enzima de 50 kDa específica de Arg se activó mediante tioles (particularmente cisteína), no se inhibió mediante los inhibidores de serina proteinasas, fluoruro de fenilmetilsulfonilo o fluoruro de 4-(2-aminoetil)bencenosulfonilo, pero se inhibió mediante reactivos dirigidos a sulfhidrilo, leupeptina y EDTA a concentraciones similares a aquellas que inhibieron la PrtR45 (Bhogal et al., 1997). La inhibición con EDTA podría invertirse mediante la adición de Ca²⁺ en exceso, y el pH óptimo de la enzima fue 8,0, con actividad mínima por debajo de pH 6,0.

Clonación molecular y análisis de secuencia del gen *prtRII*

El cribado de la genoteca de *P. gingivalis* usando sondas oligonucleotídicas específicas para el término N de PrtR45 identificó varios clones positivos. El ADN de estos clones se extrajo y se sometió a análisis Southern para identificar aquellos que contienen el fragmento *BamH* I de 12 kb previamente propuesto que corresponde al gen que codifica la segunda proteinasa específica de Arg (Slakeski et al., 1996). El clon 18 de lambda, que contiene un fragmento *BamH* I de 12 kb, se escogió para análisis posterior, y se aisló ADN de este clon y se digirió con *Eco72* I, y se clonó aleatoriamente en *Sma* I-BAP pUC 18 plasmídico. Los fragmentos genómicos de *Eco72* I de 3,3 y 1,2 kb adyacentes se secuenciaron en ambas direcciones para generar toda la secuencia nucleotídica de *prtRII* (Número de Acceso Genbank AF007124). Se generó y se secuenció un fragmento de PCR de 991 pb para confirmar la secuencia que engloba el sitio *Eco72* I interno.

El ORF de *prtRII* comprende 2208 pb (736 restos de aminoácidos), y codifica una pre-pro-proteína que consiste en una secuencia líder putativa y un profragmento seguido de la proteinasa específica de Arg madura (507 restos de aminoácidos) que contiene la secuencia de aminoácidos N-terminal exacta obtenida para la enzima de 50 kDa purificada (PrtR45). La secuencia N-terminal de la proteína madura, como PrtR45, está inmediatamente precedida de un resto de Arg en el profragmento.

El gen *prtRII* muestra un grado elevado de similitud con dos quintos de 5' del gen *prtR* que codifica PrtR45 y sus adhesinas asociadas (Figs. 8 y 9). Una comparación de las dos secuencias traducidas muestra una similitud global de 76% y 80% para el profragmento traducido y el dominio de proteinasa, respectivamente. Sin embargo, el *prtRII* no codifica ninguno de los dominios de hemaglutinina/adhesina C-terminales codificados por los genes *prtR* y *prtK*, siendo consistente con el hallazgo de que la proteinasa PrtR45 purificada no estaba asociada con adhesinas. El M_r de la proteinasa madura PrtR45 deducida de la secuencia del gen *prtRII* traducida es 55,6 kDa, que es consistente con el 50 kDa obtenido mediante SDS-PAGE (Fig. 7) y es ligeramente mayor que el M_r deducido de 53,9 kDa para PrtR45 (Bhogal et al., 1997).

El alineamiento de secuencias de la secuencia de aminoácidos deducida de PrtR45 con la proteinasa específica de Arg PrtR45 y la proteinasa específica de Lys PrtK48 (Slakeski et al., 1996; Bhogal et al., 1997) muestra que PrtR45 presenta una similitud de secuencia elevada (97,5% de identidad) con la proteinasa PrtR45 asociada a adhesinas, excepto por los 80 restos de aminoácidos C-terminales (Fig. 8). De hecho, esta secuencia de 80 restos C-terminal de PrtR45 es similar (47% de identidad) a los 80 restos C-terminales del dominio de adhesina de PrtR27, el último dominio de la PrtR (Fig. 9). En contraste con la elevada identidad de secuencia de las proteinasas PrtR45 y PrtR45, hay una menor similitud global (25% de identidad) entre las dos proteinasas PrtR45 y PrtK48 asociadas a adhesinas, excepto alrededor de la región C-terminal, en la que el motivo -GEPNPYQPVSNLTTATTGQKQVLMICWDAPSTK- (subrayado en la Fig. 8) es casi idéntico en ambas proteinasas pero está ausente en PrtR45. También aparecen motivos similares en los dominios de adhesina de PrtR44, PrtR17, PrtK39 y PrtK44 de PrtR y PrtK (Tabla 1 péptidos ABM), lo que ha conducido a proponer que este motivo es un motivo de unión de adhesina implicado en la asociación de las proteinasas PrtR y PrtK y adhesinas en grandes complejos.

Unión del complejo PrtR-PrtK a un péptido sintético que corresponde a un motivo de unión de adhesina putativo

Se sintetizó un péptido (ABM1 [R45]) que corresponde al motivo de unión de adhesina propuesto PYQPVSNLTTATTGQKQVTLKWDAPSTK, y se usó para medir la unión del complejo PrtR-PrtK. La unión específica del complejo PrtR-PrtK inactivado por TLCK al péptido ABM se demostró en un ensayo de unión competitiva, en el que se necesitó un exceso molar de 5-100 veces del péptido ABM en disolución para inhibir la unión del complejo al

péptido ABM adsorbido sobre la placa de microtitulación (Fig. 10). Un péptido de control, FNGGISLANYTGHGSETAWGT, que corresponde a los restos 428-448 de PrtR45, así como la caseína no inhibieron la unión del complejo PrtR-PrtK inactivado por TLCK al péptido ABM adsorbido. El antisuero anti-PrtR-PrtK no se unió al péptido ABM en ausencia del complejo PrtR-PrtK. La inactivación con TLCK aseguró que el complejo no se estaba uniendo al péptido a través de los sitios activos de las proteinasas. Esto también se confirmó por la falta de unión del complejo PrtR-PrtK a caseína y a péptido no específico de tamaño y contenido de lisina similar al péptido ABM pero de secuencia no relacionada. Estos resultados, que demuestran la unión específica del complejo PrtR-PrtK inactivado por TLCK al péptido ABM, son por lo tanto consistentes con el papel propuesto de este motivo conservado en la asociación de las proteinasas PrtR y PrtK y adhesinas en grandes complejos.

10 DISCUSIÓN

Usando un sonicado celular de *P. gingivalis* W50, se ha purificado y caracterizado una segunda cisteína proteinasa estabilizada por calcio, específica de Arg, asociada a la célula, que es casi idéntica a la cisteína proteinasa específica de Arg previamente caracterizada PrtR45 (Bhogal et al., 1997). Sin embargo, a pesar de las características enzimáticas y el perfil inhibidor/activador casi idénticos a PrtR45, la segunda enzima muestra un número de diferencias clave. En primer lugar, la segunda enzima, denominada PrtR1150 es una enzima discreta, no asociada con adhesinas. La cisteína proteinasa específica de Arg, PrtR45, es un componente de 45 kDa de un complejo multiproteico grande de proteinasas específicas de Arg y Lys y adhesinas (Bhogal et al., 1997). En segundo lugar, PrtR1150 es ligeramente más grande que PrtR45 en SDS-PAGE (M_r 50 kDa); y en tercer lugar, hay cuatro sustituciones de aminoácidos en los primeros 25 restos N-terminales de PrtR1150. PrtR1150 tiene un Glu en la posición 8 en lugar de Gln, un Pro en la posición 17 en lugar de Ala, un Glu en la posición 22 en lugar de Gly, y un Glu en la posición 25 en lugar de Lys en PrtR45 (Fig. 8). Estas diferencias en tamaño y la secuencia de aminoácidos N-terminal se confirmaron con la clonación y el análisis de secuencia del gen *prtR11* que codifica la segunda proteinasa específica de Arg.

La secuencia de aminoácidos deducida del gen *prtR11* presenta 98% de identidad con aquella del gen *rgpB* recientemente dado a conocer de *P. gingivalis* ATCC 33277 (Nakavama, 1997), sugiriendo que ambos genes representan el mismo locus en dos cepas diferentes. Sin embargo, la secuencia para la proteinasa madura del gen *rgpB* no contiene tres de las sustituciones de aminoácidos N-terminales encontradas en el producto del gen *prtR11*, y sólo tiene la sustitución Gln→Glu en la posición 8. Las sustituciones en las posiciones 17, 22 y 25, encontradas en PrtR1150, que permitieron que el producto génico se diferenciara inequívocamente mediante análisis de secuencia N-terminal de la proteinasa PrtR45 madura del *prtR* (*rgpA*), no se encontraron en el *rgpB*. En el estudio actual, las diferencias en la secuencia N-terminal y en el tamaño de las proteinasas maduras permitieron la diferenciación de la proteinasa específica de Arg de 50 kDa discreta (PrtR1150) de la proteinasa específica de Arg de 45 kDa (PrtR45) que se encuentra asociada con adhesinas. La asignación de las dos proteinasas (PrtR45 y PrtR1150) a los dos genes (*prtR* y *prtR11* respectivamente) ha permitido la identificación de un motivo conservado en las dos proteinasas asociadas con adhesinas (PrtR45 y PrtK48) no encontrado en la PrtR1150 discreta. Puesto que el motivo conservado también se encontró en varias adhesinas de las *prtR* y *prtK*, se propone que es un motivo de unión de adhesina implicado en la asociación de las proteinasas *prtR* y *prtK* y adhesinas en grandes complejos. Esta proposición está apoyada por la demostración de que un péptido sintético que corresponde al motivo conservado se une específicamente al complejo PrtR-PrtK inactivado por TLCK.

La identificación del motivo conservado PVXNLT....LKWXAP en el motivo 1 de unión de adhesinas condujo a proponer que el motivo complementario sería hidrófobo y estaría cargado negativamente. Los motivos repetidos que fueron por lo tanto hidrófobos y contenían restos negativos se seleccionaron para la síntesis, por ejemplo TATTFEEDGVA (ABM 2, Tabla 1) y WKTIDADGDG (ABM 5, Tabla 1). Otros motivos seleccionados para el estudio fueron otros motivos repetidos de restos polares hidrófobos y/o cargados y/o neutros, por ejemplo VYRDGTKIKE (ABM 2, Tabla 1), WEIRTVDLPAAGTKYV (ABM 4, Tabla 1) y EFAPVQNLGSA (ABM 6, Tabla 1).

Al examinar adicionalmente el alineamiento de la secuencia de aminoácidos deducida de PrtR1150 con los dominios catalíticos de la proteinasa específica de Arg PrtR45 y la proteinasa específica de Lys PrtK48, se revelaron ciertas áreas de similitud interesantes adicionales (Fig. 8). Aunque estas tres cisteína proteinasas de *P. gingivalis* no tienen similitud con ninguna de las otras familias conocidas de cisteína proteinasas, es posible especular sobre la identidad de los restos catalíticos puesto que solamente se conservan en las tres enzimas relacionadas con la secuencia un resto de His y dos restos de Cys. Por lo tanto, es probable que la díada catalítica Cys, His de estas enzimas, consista en H⁴⁴⁰ de PrtR1150, la única His conservada en las tres proteinasas. La Cys catalítica es también probable que sea uno de los dos restos cisteinílicos conservados C⁴⁷³ y C⁴⁸⁴ en las tres proteinasas relacionadas con la secuencia.

55 EJEMPLO 2

Síntesis de sitio activo de proteinasa y péptidos del motivo de unión de adhesinas, y ensayo en un modelo de lesión murino.

Los siguientes péptidos representativos de los sitios activos de proteasas y cada motivo de unión de adhesinas listados en la Tabla 1 se sintetizaron, se conjugaron y se ensayaron en el modelo de lesión murino (Tabla 2).

Tabla 2. Origen y secuencia de aminoácidos de péptidos sintetizados

Origen	Secuencia de aminoácido (código de una sola letra)	Abreviatura
Péptidos del sitio activo de proteinasa		
PrtR45 (426-446)	FNGGISLANYTGHGSETAWGT	PAS1 (R45)
PrtK48 (432-453)	LNTGVSFANYTAHGSETAWADP	PAS1 (K48)
Péptidos del motivo de unión de adhesina		
PrtR45 (664-689)	PYQPVSNLTTATTQGQKVTWKWDAPSTK	ABM1 (R45)
PrtK39 (1580-1608)	SYTYTVYRDGTKIKEGLTATTFEEDGVAA	ABM2 (K39)
PrtR44 (939-971)	VTLKWDAPNGTPNPNPNPNPNPGTTTTLSESF	ABM3 (R44)
PrtK44 (1296-1315)	WIERTVDLPAGTKYVAFRHY	ABM4 (K44)
PrtR15 (1154-1169)	PAEWTTIDADGDGQGW	ABM5 (R15)
PrtR44 (919-938)	EGSNEFAPVQNLTGSAVGQK	ABM6 (R44)
Péptido de control		
PrtR27 (1432-1463)	ANEAKVLAADNVWGDNTGYQFLLDADHNTFG	Péptido de control

Materiales

5 Excepto que se establezca de otro modo, las sustancias químicas fueron de grado de síntesis peptídica o su equivalente. Hexafluorofosfato de O-benzotriazol-*N,N,N,N*-tetrametiluronio (HBTU), 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), diisopropiletamina (DIPEA), *N,N*-dimetilformamida (DMF), piperidina, ácido trifluoroacético (TFA) y aminoácidos protegidos con 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) se obtuvieron de Auspep Pty Ltd (Melbourne, Australia). Triisopropilsilano (TIPS) y etanoditiol (EDT) se obtuvieron de Aldrich (New South Wales, Australia). 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU) se obtuvo de Sigma Chemical Company (New South Wales, Australia). El fenol y el éter dietílico se obtuvieron de BDH (Poole, UK).

10 Síntesis peptídica en fase sólida

Los péptidos se sintetizaron manualmente o usando un sintetizador peptídico 431A ABI. Se usaron a lo largo del experimento protocolos de síntesis peptídica en fase sólida estándar para química de Fmoc. Los péptidos se ensamblaron como la forma carboxamídica usando resina Fmoc-Pal-Peg-PS (PerSeptive Biosystems Inc., Framingham, MA). El acoplamiento se logró con activación mediante HBTU/HOBt usando 4 equiv. de Fmoc-aminoácido y 6 equiv. de DIPEA. El grupo Fmoc se eliminó mediante DBU al 2% v/v en DMF que contiene 2% v/v de piperidina. La escisión de los péptidos desde el soporte de resina se llevó a cabo usando cóctel de escisión TFA:fenol:TIPS:EDT:agua (92:2:2:2:2) durante 2,5 horas o 4 horas, dependiendo del contenido de arginina del péptido. Tras la escisión, la resina se eliminó mediante filtración, y el filtrado se concentró hasta aproximadamente 1 ml bajo una corriente de nitrógeno. Después de que los productos peptídicos se precipitaron en éter frío, se centrifugaron y se lavaron tres veces. El precipitado peptídico se disolvió entonces en 5 a 10 ml de agua que contiene 0,1% v/v de TFA, y el residuo insoluble se eliminó mediante centrifugación.

Síntesis de péptidos con ácido S-acetilmercaptoacético

25 Las resinas que poseen péptidos se sumergieron en DMF, y el grupo Fmoc N-terminal se eliminó mediante DBU al 2% v/v en DMF que contiene 2% v/v de piperidina. El grupo ácido S-acetilmercaptoacético (SAMA) se introdujo en el grupo amino N-terminal usando 5 equiv. de SAMA-OPfp y 5 equiv. de HOBt. La reacción se monitorizó mediante el ensayo de ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBSA). Cuando se devolvió un ensayo de TNBSA negativo, la resina se lavó (5 x DMF, 3 x DCM y 3 x éter dietílico). La resina se secó a vacío, y los SAMA-péptidos se escindieron del soporte de resina como se describe anteriormente.

Purificación de péptidos

30 La purificación de los péptidos sintetizados se llevó a cabo usando una columna Brownlee C18 Aquapore ODS (250 x 100 mm) instalada en un sistema de HPLC de Waters. Los cromatogramas se desarrollaron a un caudal de 5 ml/min. usando TFA al 0,1% v/v en agua (disolvente A) y TFA al 0,1% v/v en acetonitrilo acuoso al 90% (disolvente B) como el tampón límite. Los péptidos se eluyeron con un gradiente de 10-30% de disolvente B formado a lo largo de 40 min. La HPLC analítica se llevó a cabo usando una columna Brownlee C8 Aquapore RP-300 (220 x 4,6 mm) instalada en un sistema de HPLC de Applied Biosystems. Los cromatogramas se desarrollaron usando el disolvente

A y el disolvente B a un caudal de 1 ml/min. y un gradiente lineal de 0-100% de disolvente B formado a lo largo de 30 min. El material eluido de las columnas se detectó determinando la absorbancia a 214 nm. Las fracciones peptídicas se reunieron y se liofilizaron. Los péptidos se analizaron mediante espectrometría de masas usando un PerSeptive Biosystems Voyager DE MALDI-TOF.

5 Conjugación de SAMA-péptidos a toxoide diftérico

El toxoide diftérico (DT) se obtuvo de Dr I. Barr (CSL Pty. Ltd. Melbourne, Australia), que contenía 9 equivalentes de grupos amino por molécula de 62 kDa. A una disolución que contiene 10 mg/ml de DT en disolución salina tamponada con fosfato (fosfato de sodio 0,1 M, NaCl 0,9%; pH 7,4) se añadieron 0,1 ml de una disolución al 1% p/v de éster m-maleimido benzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS) en DMF. Después de 30 min., el MBS sin reaccionar se eliminó, y el DT modificado con MBS se recogió mediante filtración en gel usando una columna PD10 (Farmacia, NSW, Australia) equilibrada en tampón de conjugación (fosfato de sodio 0,1 M, EDTA 5 mM; pH 6,0). Se disolvió SAMA-péptido purificado (1,3 μ moles) en 200 μ l de guanidina HCl 6 M que contiene Tris 0,5 M; EDTA 2 mM, pH 6, y se diluyó con 800 μ l de agua MilliQ, y se desprotegió in situ mediante adición de 25 μ l de NH_2OH 2 M (40 equiv.) disuelto en agua MilliQ. El MBS-DT recogido se hizo reaccionar inmediatamente con SAMA-péptido desprotegido, y se agitó durante una hora a temperatura ambiente. El conjugado de péptido-DT se separó de péptido sin reaccionar mediante filtración en gel usando una columna PD10 equilibrada en PBS pH 7,4, y se liofilizó. La reacción se monitorizó usando el ensayo de Ellmans. Los rendimientos de la conjugación de SAMA-péptidos a MBS-DT osciló de 34% a 45%, indicando que 3 a 4 péptidos se acoplaron por molécula de DT.

Inmunización y protocolos del modelo de lesión murino

20 Ratones BALB/c de 6-8 semanas se inmunizaron subcutáneamente con 50 μ g del conjugado de péptido-DT, 50 μ g de DT, o 2 x 10⁹ células de la cepa 33277 de *Porphyromonas gingivalis* exterminadas con formalina emulsionadas en adyuvante completo de Freund (CFA). Después de 30 días, a los ratones se les inyectó subcutáneamente con antígeno (50 μ g del conjugado de péptido-DT, 50 μ g de DT o 2 x 10⁹ células de la cepa 33277 de *Porphyromonas gingivalis* exterminadas con formalina) emulsionado en adyuvante incompleto de Freund (IFA), y después se sangraron desde el plexo retrobulbar 12 días más tarde. Todos los ratones se expusieron a 8 x 10⁹ células de *P. gingivalis* (200 μ l) mediante inyección subcutánea en el abdomen, y se pesaron y se midió el tamaño de la lesión durante 10 días. Los tamaños de la lesión se expresaron como mm², y se analizaron estadísticamente usando un ANOVA de una vía de Kruskal-Wallis y la prueba de la suma de rangos W de Wilcoxon-de la U de Mann-Whitney.

30 Los conjugados de péptido-DT se usaron para inmunizar ratones BALB/c para evaluar su eficacia a la hora de proteger frente a la exposición a *Porphyromonas gingivalis* en el modelo de lesión murino. La Figura 6 muestra que los ratones que se inmunizaron con la proteína portadora toxoide diftérico sola tuvieron tamaños promedio de lesión similares a los ratones inmunizados con adyuvante solo (controles). Esto indica que DT solo no proporciona protección frente a *P. gingivalis*, y además que cualquier protección proporcionada por los conjugados de péptido-DT fue atribuible a la respuesta inmunitaria inducida por el péptido. El conjugado de péptido-DT de control no proporcionó protección frente a *P. gingivalis* ya que el tamaño promedio de la lesión no fue significativamente diferente al de los ratones inmunizados con DT o adyuvante solo (controles). La inmunización con los péptidos del sitio activo de proteinasas conjugados a DT (PAS1(R45) y PAS1(K48)) redujo significativamente el tamaño de la lesión que resulta de la exposición a *P. gingivalis*, con respecto a los controles de DT (Tabla 3). Todos los péptidos del motivo de unión de adhesinas, cuando se usan como inmunógenos, redujeron el tamaño de la lesión; sin embargo, solamente ABM1(R45), ABM2(K39) y ABM3(R44) lograron significancia ($p < 0,05$) con el número de animales usados (Tabla 3).

45 Los resultados demuestran la eficacia de los péptidos del sitio activo de proteinasas PrtR-PrtK y los péptidos del motivo de unión de adhesinas cuando se usan como inmunógenos en la prevención de la exposición a *P. gingivalis* en el modelo de lesión murino. Estos resultados sugieren por lo tanto que estos péptidos pueden tener utilidad como vacunas en la prevención de enfermedades asociadas a *P. gingivalis* (por ejemplo periodontitis) en seres humanos.

50 El antisuero contra los péptidos PAS1 inhibió la actividad proteolítica tanto específica de Arg como específica de Lys, que por lo tanto puede explicar la excelente protección conferida mediante inmunización con estos péptidos. La inhibición de la actividad proteolítica mediante el antisuero anti-PAS1 sugiere que estos anticuerpos pueden tener utilidad en un colutorio, pasta de dientes u otro vehículo de suministro intraoral para neutralizar las proteasas de *P. gingivalis* y sus efectos dañinos. De forma similar, el antisuero contra los motivos de unión de adhesinas, particularmente ABM1, ABM2 y ABM3, puede tener utilidad en productos y sustancias farmacéuticas para el cuidado oral para bloquear la adherencia y por lo tanto la colonización de *P. gingivalis*.

Tabla 3. Tamaño máximo de lesión y significancia de conjugados de péptido-difteria.

	DT ^d	ABM1 (R4 5) - DT	ABM2 (K3 9) - DT	ABM3 (R4 4) - DT	ABM4 (K4 4) - D	ARM5 (R1 5) - DT	ABM6B (R4 4) - DT	PAS1 (R4 5) - DT	PAS1 (K4 8) - DT	Péptido DT control	FK 33277 ^e
Tamaño máximo de la lesión (mm ²)	33,59 ±18,77 ^a	10,42 ±11,7	12,63 ±10,89	12,27 ±4,68	18,83 ±18,87	14,79 ±10,04	15,22 ±11,55	10,46 ±4,08	9,28 ±10,36	36,61 ±34,92	13,78 ±12,55
Significancia ^b	-	p <0,05	p <0,05	P <0,05	N/S ^c	N/S ^c	N/S ^c	P <0,05	p <0,05	N/S ^c	p <0,05

a = desviación estándar n = 5,6

b = Prueba de la U de Mann-Whitney

c = ninguna diferencia significativa

d = toxoide diftérico

e = cepa 33277 de *Porphyromonas gingivalis* exterminada con formalina

EJEMPLO 3

(1) Síntesis de antígenos peptídicos y múltiples constructos

Los péptidos de la Tabla 1 se sintetizaron usando estrategias de síntesis de Fmoc o tBoc estándar, y se sintetizaron constructos muropeptídicos usando las estrategias esquematizadas en las Figs. 1-5.

5 (2) Preparación de anticuerpos

Los anticuerpos séricos se obtuvieron inmunizando caballos, conejos, ovejas o vacas lecheras.

Las inmunizaciones se llevaron a cabo usando procedimientos estándar. La inmunización inicial fue con una mezcla del antígeno y adyuvante incompleto de Freund. Los anticuerpos se pudieron recuperar del suero o leche de los animales usando procedimientos estándar.

10 **EJEMPLO 4**

Métodos para usar péptidos antigénicos en inmunoensayos de diagnóstico.

Los antígenos peptídicos de *P. gingivalis* descritos aquí se pueden sintetizar para uso como inmunógenos en formulaciones de vacuna, y como antígenos para ensayos de diagnóstico o para generar antisuero específico de *P. gingivalis* de valor terapéutico y/o de diagnóstico.

15 Los péptidos descritos en la Tabla 1 se pueden sintetizar de forma individual o se pueden enlazar químicamente usando uno cualquiera de un número de estrategias bien conocidas en la técnica. Los ejemplos de algunas estrategias que se pueden usar se exponen en las Figs. 1-5. Los péptidos se pueden sintetizar usando uno de los
20 varios métodos de síntesis peptídica conocidos en la técnica, incluyendo síntesis peptídica en fase sólida estándar usando terebutiloxycarbonil aminoácidos (Mitchell et al., 1978, J. Org. Chem. 43:2845-2852), usando 9-fluorenilmetiloxycarbonil aminoácidos sobre un soporte de poliamida (Dryland et al., 1986, J. Chem. So. Perkin Trans. I, 125-137); mediante síntesis de pepscan (Geysen et al., 1987, J. Immunol. Methods 03:259; 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998); o mediante síntesis peptídica en fase líquida estándar. La modificación de los péptidos u oligopéptidos, tal como mediante supresión y sustitución de aminoácidos (e incluyendo alargamientos y adiciones a los aminoácidos) y de otras maneras, se puede realizar para no restar sustancialmente valor a las propiedades
25 inmunológicas del péptido u oligopéptido. En particular, las secuencias de aminoácidos de los antígenos descritos aquí se pueden alterar sustituyendo uno o más aminoácidos con aminoácidos funcionalmente equivalentes, dando como resultado una alteración que es silenciosa en términos de una diferencia observada en el comportamiento fisicoquímico del péptido, u oligopéptido o quimera. Los aminoácidos funcionalmente equivalentes son conocidos en la técnica como aminoácidos que están relacionados y/o tienen polaridad o carga similar. De este modo, una
30 secuencia de aminoácidos, que es sustancialmente aquella de las secuencias de aminoácidos representadas en el Listado de Secuencias aquí, se refiere a una secuencia de aminoácidos que contiene sustituciones con aminoácidos funcionalmente equivalentes sin cambiar la función biológica primaria del péptido, oligopéptido o quimera.

Los péptidos sintéticos purificados se pueden usar como antígenos en inmunoensayos para la detección de anticuerpo específico de *P. gingivalis* presente en el fluido corporal de un individuo que se sospecha que tiene una
35 infección provocada por *P. gingivalis*. La detección de antígenos o péptidos relacionados en inmunoensayos incluye cualquier inmunoensayo conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, radioinmunoensayo, ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA), ensayo de "sándwich", reacción de precipitación, ensayo de aglutinamiento, inmunoensayo fluorescente, e inmunoensayo a base de quimioluminiscencia.

EJEMPLO 5

40 Métodos y compuestos para formulaciones de vacuna relacionadas con antígenos peptídicos sintéticos y constructos muropeptídicos.

Esta realización de la presente invención es para proporcionar antígenos peptídicos de la Tabla 1 a usar como inmunógenos en una vacuna profiláctica y/o terapéutica para la inmunización activa para proteger contra o tratar
45 infecciones causadas por *P. gingivalis*. Para los fines de vacuna, un antígeno de *P. gingivalis* que comprende un constructo peptídico sintético debería ser inmunógeno, e inducir anticuerpos funcionales dirigidos a uno o más epítomos expuestos en la superficie en bacterias intactas, en el que el epítomo o epítomos se conservan entre cepas de *P. gingivalis*.

En una ilustración de la invención, el constructo dipeptídico PAS1-PAS2 (Fig. 4), que tiene las propiedades deseables de un antígeno de vacuna, se puede sintetizar usando el método descrito aquí en el Ejemplo 3.

50 El péptido sintético se incluye como el material inmunógeno relevante en la formulación de vacuna, y en cantidades terapéuticamente eficaces, para inducir una respuesta inmunitaria. Se conocen muchos métodos para la introducción de una formulación de vacuna en el ser humano o animal a vacunar. Éstos incluyen, pero no se limitan a, administración intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, ocular, intranasal, y oral. La vacuna puede comprender además un vehículo fisiológico tal como una disolución, un polímero o liposomas; y un

adyuvante, o una combinación de los mismos.

5 Diversos adyuvantes se usan conjuntamente con las formulaciones de vacuna. Los adyuvantes ayudan a modular la respuesta inmunitaria y a lograr un nivel más duradero y mayor de inmunidad usando cantidades más pequeñas de antígeno de vacuna, o menores dosis que si el antígeno de vacuna se administrase solo. Los ejemplos de adyuvantes incluyen adyuvante incompleto de Freund (ISA), Adyuvante 65 (que contiene aceite de cacahuete, monooleato de manida y monoestearato de aluminio), emulsiones de aceite, adyuvante de Ribí, los polioles plurónicos, poliaminas, Avridina, Quil A, saponina, MPL, QS-21, y geles minerales tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, etc.

10 Otra realización de este modo de la invención implica la producción de secuencias de aminoácidos específicas del antígeno como un hapteno, es decir, una molécula que no puede provocar por sí misma una respuesta inmunitaria. En tal caso, el hapteno se puede unir covalentemente a un vehículo u otra molécula inmunógena que conferirá inmunogenicidad al hapteno acoplado cuando se expone al sistema inmunitario. De este modo, tal hapteno específico del antígeno, enlazado a una molécula portadora, puede ser el inmunógeno en una formulación de vacuna.

15 Como una alternativa a la inmunización activa, la inmunización puede ser pasiva, es decir, inmunización que comprende la administración de inmunoglobulina purificada que contiene anticuerpo contra péptidos sintéticos.

EJEMPLO 6

Lo siguiente es un ejemplo de una formulación de pasta de dientes propuesta que contiene anticuerpos anti-péptidos.

Ingrediente	% p/p
Fosfato dicálcico dihidratado	50,0
Glicerol	20,0
Carboximetilcelulosa sódica	1,0
Laurilsulfato de sodio	1,5
Lauroilsarconisato de sodio	0,5
Sabor	1,0
Sacarina sódica	0,1
Gluconato de clorhexidina	0,01
Dextranasa	0,01
Suero de cabra que contiene Abs anti-péptido	0,2
Agua	resto

20

EJEMPLO 7

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

Ingrediente	% p/p
Fosfato dicálcico dihidratado	50,0
Sorbitol	10,0
Glicerol	10,0
Carboximetilcelulosa sódica	1,0
Laurilsulfato de sodio	1,5
Lauroilsarconisato de sodio	0,5

Ingrediente	% p/p
Sabor	1,0
Sacarina sódica	0,1
Monofluorofosfato de sodio	0,3
Gluconato de clorhexidina	0,01
Dextranasa	0,01
Suero de bovino que contiene Abs anti-péptido	0,2
Agua	resto

EJEMPLO 8

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

Ingrediente	% p/p
Fosfato dicálcico dihidratado	50,0
Sorbitol	10,0
Glicerol	10,0
Carboximetilcelulosa sódica	1,0
Lauroil dietanolamida	1,0
Monolaurato de sodio	2,0
Sabor	1,0
Sacarina sódica	0,1
Monofluorofosfato de sodio	0,3
Gluconato de clorhexidina	0,01
Dextranasa	0,01
Ig de leche bovina que contiene Abs anti-péptido	0,1
Agua	resto

5 **EJEMPLO 9**

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

Ingrediente	% p/p
Sorbitol	22,0
Musgo irlandés	1,0
Hidróxido sódico (50%)	1,0
Gantrez	19,0
Agua (desionizada)	2,69
Monofluorofosfato sódico	0,76

ES 2 530 510 T3

Ingrediente	% p/p
Sacarina sódica	0,3
Pirofosfato	2,0
Alúmina hidratada	48,0
Aceite de sabor	0,95
Anticuerpo monoclonal de ratón anti-péptido	0,3
Laurilsulfato de sodio	2,00

EJEMPLO 10

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

Ingrediente	% p/p
Poliacrilato sódico	50,0
Sorbitol	10,0
Glicerol	20,0
Sabor	1,0
Sacarina sódica	0,1
Monofluorofosfato sódico	0,3
Gluconato de clorhexidina	0,01
Etanol	3,0
Ig equina que contiene Ab anti-péptido	0,2
Ácido linólico	0,05
Agua	resto

5 EJEMPLO 11

Lo siguiente es un ejemplo de una formulación de colutorio propuesta.

Ingrediente	% p/p
Etanol	20,0
Sabor	1,0
Sacarina sódica	0,1
Monofluorofosfato sódico	0,3
Gluconato de clorhexidina	0,01
Lauroil dietanolamida	0,3
Ig de conejo que contiene Ab anti-péptido	0,2
Agua	resto

EJEMPLO 12

ES 2 530 510 T3

Lo siguiente es un ejemplo de una formulación de colutorio propuesta.

Ingrediente	% p/p
Gantrez S-97	2,5
Glicerina	10,0
Aceite de sabor	0,4
Monofluorofosfato sódico	0,05
Gluconato de clorhexidina	0,01
Lauroil dietanolamida	0,2
Anticuerpo monoclonal de ratón anti-péptido	0,3
Agua	resto

EJEMPLO 13

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

Ingrediente	% p/p
Azúcar	75-80
Jarabe de maíz	1-20
Aceite de sabor	1-2
NaF	0,01-0,05
Anticuerpo monoclonal de ratón anti-péptido	0,3
Estearato de Mg	1-5
Agua	resto

5

EJEMPLO 14

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

Ingrediente	% p/p
Vaselina blanca	8,0
Propilenglicol	4,0
Alcohol estearílico	8,0
Polietilenglicol 4000	25,0
Polietilenglicol 400	37,0
Monostearato de sacarosa	0,5
Gluconato de clorhexidina	0,1
Anticuerpo monoclonal de ratón anti-péptido	0,3
Agua	resto

EJEMPLO 15

Lo siguiente es un ejemplo de una formulación de goma de mascar propuesta.

Ingrediente	% p/p
Base de goma	30,0
Carbonato de calcio	2,0
Sorbitol cristalino	53,0
Glicerina	0,5
Aceite de sabor	0,1
Anticuerpo monoclonal de ratón anti-péptido	0,3
Agua	resto

REFERENCIAS

- 5 Alexander, J., Sidney, J., Southwood, S., *et al.* (1994). "Development of high potency universal DR-restricted helper epitopes by modification of high affinity DR-blocking peptides." *Immunity* 1: 751-761.
- Bhogal, P. S., Slakeski, N. y Reynolds, E. C. (1997). Characterization of a cell-associated, protein complex of *Porphyromonas gingivalis* W50 containing Arg- and Lys-specific cysteine proteinases and adhesins. *Microbiology* 143, 2485-2495.
- 10 Canne, L. E., Ferre-D'Amare, A. R., Burley, S.K., y Kent, S.B.H. (1995). "Total chemical synthesis of a unique transcription factor-related protein: cMyc-Max." *J. A. Chem. Soc.* 117: 2998-3001.
- Druland, *et al.* (1986). *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*: 125-137.
- Duncan, R., y Kopeček, J. (1980). "Degradation of side chains of N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymers by lysosomal enzymes." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 94: 284-290.
- 15 Geysen, H. M., Meleon, R.H., y Barteling, S.J. (1984). "Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81: 3998.
- Geysen, H. M., Rodda, S.J., Mason, T.J., *et al.* (1987). "Strategies for epitope mapping using peptide synthesis." *J. Immunol. Methods.* 102: 259.
- Hammer, J., Valsasini, P., Tolba, K., Bolin, D., Higelin, J., Takacs, B., y Sinigaglia, F. (1993). "Promiscuous and allele-specific anchors in HLA-DR-binding peptides." *Cell* 74: 197-203.
- 20 Kaumaya, P. T. P., Kobs-Conrad, S., y DiGeorge, A. M. (1994). *Synthetic peptide vaccines: Misconceptions and problems, strategies and prospects Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis.* R. Epton. Kingswinford, Mayflower: 279-292.
- Liu, C. F. a. T., J.P. (1994). "Peptide ligation strategy without use of protecting groups." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 6584-6588.
- 25 Lu, Y. A., Clavijo, P., Galantino, M., Shen, Z.Y., y Tam, J.P. (1991). "Chemically unambiguous peptide immunogen: Preparation, orientation and antigenicity of purified peptide conjugated to the multiple antigen peptide system." *Mol. Immunol.* 28(6): 623-630.
- Mitchell, e. a. (1978). *J. Org. Chem.* 43: 2845-2852.
- 30 Nakayama, K. (1997). Domain-specific rearrangement between the two Arg-gingipain-encoding genes in *Porphyromonas gingivalis*: possible involvement of nonreciprocal recombination. *Microbiol Immunol* 48, 185-196.
- O'Brien-Simpson, N.M., Ede, N.J., Brown, L.E., Swan, J., y Jackson, D.C. (1997). "Polymerisation of unprotected synthetic peptides: a view towards a synthetic peptide vaccine." *J. Am. Chem. Soc.* 117(6).
- O'Sullivan, D., Arrhenius, T., Sidney, J., *et al.* (1991). "On the interaction of promiscuous antigenic peptides with different DR alleles. Identification of common structural motifs." *J. Immunol* 147(8): 2663-2669.
- 35 Rose, K. (1994). "Facile synthesis of homogeneous artificial proteins." *J. Am. Chem. Soc.* 116: 30-33.

Rose, J., Zeng, W., Regamey, P. O., Chernusheivich, I.V., Standing, K. G., y Gaertner, H.F. (1996). "Natural peptides as building blocks for the synthesis of large protein-like molecules with hydrazone and oxime linkages." *Bioconjugate Chem.* 7(5): 552-556.

Shao, J., y Tam, J.P. (1995). *J. Am. Chem. Soc.* 117: 3893-3899.

5 Slakeski, N., Cleal, S. M. y Reynolds, E. C. (1996). Characterization of a *Porphyromonas gingivalis* gene prtR that encodes an arginine-specific thiol proteinase and multiple adhesins. *Biochem Biophys Res Comm* 224, 605-610.

Spetzler, J. C. a. T., J.P. (1994). A general approach for the synthesis of branched peptides for synthetic vaccines: Synthesis of multiple antigen peptides using unprotected segments. *Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis*. R. Epton. Kingswinford, Mayflower: 293-300.

10 van Noort, J. M., y van der Drift, A.C.M. (1989). "The selectivity of cathepsin D suggests an involvement of the enzyme in the generation of T-cell epitopes." *J. Biol. Chem.* 264(24): 14159-14164.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> The University of Melbourne Victorian Dairy Industry Authority CSL Limited

15 <120> Constructos peptídicos sintéticos para el diagnóstico y tratamiento de periodontitis asociada con *Porphyromonas gingivalis*

<130> PWC/P22115EP

<140> 98916667.3-2110/1017714

<141> 30-04-1998

<150> PCT/AU98/00311

20 <151> 30-04-1998

<150> AU PO 6528

<151> 30-04-1997

<160> 75

<170> PatentIn version 3.0

25 <210> 1

<211> 21

<212> PRT

<213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 1

Phe Asn Gly Gly Ile Ser Leu Ala Asn Tyr Thr Gly His Gly Ser Glu
1 5 10 15

30 Thr Ala Trp Gly Thr
. 20

<210> 2

<211> 22

<212> PRT

<213> *Porphyromonas gingivalis*

35 <400> 2

Leu Asn Thr Gly Val Ser Phe Ala Asn Tyr Thr Ala His Gly Ser Glu
1 5 10 15

Thr Ala Trp Ala Asp Pro
. 20

ES 2 530 510 T3

<210> 3

<211> 24

<212> PRT

<213> *Porphyromonas gingivalis*

5 <400> 3

Phe Asp Val Ala Cys Val Asn Gly Asp Phe Leu Phe Ser Met Pro Cys
1 5 10 15

Phe Ala Glu Ala Leu Met Arg Ala
20

<210> 4

<211> 24

<212> PRT

10 <213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 4

Ile Gly Asn Cys Cys Ile Thr Ala Gln Phe Asp Tyr Val Gln Pro Cys

1 5 10 15

Phe Gly Glu Val Ile Thr Arg Val
20

15 <210> 5

<211> 31

<212> PRT

<213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 5

Gly Glu Pro Asn Pro Tyr Gln Pro Val Ser Asn Leu Thr Ala Thr Thr
1 5 10 15

20 Gln Gly Gln Lys Val Thr Leu Lys Trp Asp Ala Pro Ser Thr Lys
20 25 30

<210> 6

<211> 31

<212> PRT

<213> *Porphyromonas gingivalis*

25 <400> 6

Glu Gly Ser Asn Glu Phe Ala Pro Val Gln Asn Leu Thr Gly Ser Ala
1 5 10 15

Val Gly Gln Lys Val Thr Leu Lys Trp Asp Ala Pro Asn Gly Thr
20 25 30

<210> 7

<211> 31

<212> PRT

ES 2 530 510 T3

<213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 7

Val Asn Ser Thr Gln Phe Asn Pro Val Lys Asn Leu Lys Ala Gln Pro
1 5 10 15

Asp Gly Gly Asp Val Val Leu Lys Trp Glu Ala Pro Ser Ala Lys

5 20 25 30

<210> 8

<211> 31

<212> PRT

<213> *Porphyromonas gingivalis*

10 <400> 8

Gly Glu Pro Ser Pro Tyr Gln Pro Val Ser Asn Leu Thr Ala Thr Thr
1 5 10 15

Gln Gly Gln Lys Val Thr Leu Lys Trp Glu Ala Pro Ser Ala Lys
20 25 30

<210> 9

<211> 31

<212> PRT

15 <213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 9

Glu Gly Ser Asn Glu Phe Ala Pro Val Gln Asn Leu Thr Gly Ser Ser
1 5 10 15

Val Gly Gln Lys Val Thr Leu Lys Trp Asp Ala Pro Asn Gly Thr
20 25 30

<210> 10

<211> 33

20 <212> PRT

<213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 10

Val Asn Ser Thr Gln Phe Asn Pro Val Gln Asn Leu Thr Ala Glu Gln
1 5 10 15

Ala Pro Asn Ser Met Asp Ala Ile Leu Lys Trp Asn Ala Pro Ala Ser
20 25 30

Lys

<210> 11

25 <211> 27

<212> PRT

<213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 11

ES 2 530 510 T3

Gln Phe Asn Pro Val Gln Asn Leu Thr Gly Ser Ala Val Gly Gln Lys
 1 5 10 15

Val Thr Leu Lys Trp Asp Ala Pro Asn Gly Thr
 20 25

<210> 12

<211> 27

<212> PRT

5 <213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 12

Gln Phe Asn Pro Val Gln Asn Leu Thr Gly Ser Ala Val Gly Gln Lys
 1 5 10 15

Val Thr Leu Lys Trp Asp Ala Pro Asn Gly Thr
 20 25

<210> 13

<211> 27

10 <212> PRT

<213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 13

Gln Phe Asn Pro Val Gln Asn Leu Thr Gly Ser Ala Val Gly Gln Lys
 1 5 10 15

Val Thr Leu Lys Trp Asp Ala Pro Asn Gly Thr
 20 25

<210> 14

15 <211> 26

<212> PRT

<213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 14

Phe Ala His Val Gln Asn Leu Thr Gly Ser Ala Val Gly Gln Lys Val
 1 5 10 15

Thr Leu Lys Trp Asp Ala Pro Asn Gly Thr
 20 25

20 <210> 15

<211> 26

<212> PRT

<213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 15

Phe Ala Pro Val Gln Asn Leu Gln Trp Ser Val Ser Gly Gln Thr Val
 1 5 10 15

Thr Leu Thr Trp Gln Ala Pro Ala Ser Asp
 20 25

25 <210> 16

<211> 29

ES 2 530 510 T3

<212> PRT

<213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 16

Gln Phe Asn Pro Val Gln Asn Leu Thr Ala Glu Gln Ala Pro Asn Ser
1 5 10 15
Met Asp Ala Ile Leu Lys Trp Asn Ala Pro Ala Ser Lys
20 25

5

<210> 17

<211> 29

<212> PRT

<213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 17

Asp Tyr Thr Tyr Thr Val Tyr Arg Asp Gly Thr Lys Ile Lys Glu Gly
1 5 10 15
Leu Thr Ala Thr Thr Phe Glu Glu Asp Gly Val Ala Thr
20 25

10

<210> 18

<211> 29

<212> PRT

<213> *Porphyromonas gingivalis*

15

<400> 18

Asp Tyr Thr Tyr Thr Val Tyr Arg Asp Gly Thr Lys Ile Lys Glu Gly
1 5 10 15
Leu Thr Glu Thr Thr Phe Glu Glu Asp Gly Val Ala Thr
20 25

<210> 19

<211> 29

<212> PRT

20

<213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 19

Ser Tyr Thr Tyr Thr Val Tyr Arg Asp Gly Thr Lys Ile Lys Glu Gly
1 5 10 15
Leu Thr Glu Thr Thr Tyr Arg Asp Ala Gly Met Ser Ala
20 25

<210> 20

<211> 29

25

<212> PRT

<213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 20

ES 2 530 510 T3

Ser Tyr Thr Tyr Thr Val Tyr Arg Asp Gly Thr Lys Ile Lys Glu Gly
 1 5 10 15

Leu Thr Ala Thr Thr Phe Glu Glu Asp Gly Val Ala Ala
 20 25

<210> 21

<211> 29

<212> PRT

5 <213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 21

Asp Tyr Thr Tyr Thr Val Tyr Arg Asp Gly Thr Lys Ile Lys Glu Gly
 1 5 10 15

Leu Thr Glu Thr Thr Phe Glu Glu Asp Gly Val Ala Thr
 20 25

<210> 22

<211> 29

10 <212> PRT

<213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 22

Ser Tyr Thr Tyr Thr Ile Tyr Arg Asn Asn Thr Gln Ile Ala Ser Gly
 1 5 10 15

Val Thr Glu Thr Thr Tyr Arg Asp Pro Asp Leu Ala Thr
 20 25

<210> 23

15 <211> 29

<212> PRT

<213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 23

Asp Tyr Thr Tyr Thr Val Tyr Arg Asp Gly Thr Lys Ile Lys Glu Gly
 1 5 10 15

Leu Thr Glu Thr Thr Phe Glu Glu Asp Gly Val Ala Thr
 20 25

20 <210> 24

<211> 29

<212> PRT

<213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 24

Asp Tyr Thr Tyr Thr Val Tyr Arg Asp Gly Thr Lys Ile Lys Glu Gly
 1 5 10 15

Leu Thr Glu Thr Thr Phe Glu Glu Asp Gly Val Ala Thr
 20 25

25

<210> 25

<211> 29

ES 2 530 510 T3

Pro Asn Gly Thr Pro Asn Pro Asn Pro Asn Pro Asn Pro Asn Pro Asn
 1 5 10 15
 Pro Gly Thr Thr Thr Leu Ser Glu Ser Phe
 20 25
 <210> 30
 <211> 23
 5 <212> PRT
 <213> *Porphyromonas gingivalis*
 <400> 30
 Pro Asn Gly Thr Pro Asn Pro Asn Pro Asn Pro Asn Pro Asn Pro Gly
 1 5 10 15
 Thr Thr Leu Ser Glu Ser Phe
 20
 <210> 31
 10 <211> 22
 <212> PRT
 <213> *Porphyromonas gingivalis*
 <400> 31
 Pro Asn Gly Thr Pro Asn Pro Asn Pro Asn Pro Asn Pro Gly Thr Thr
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Glu Ser Phe
 20
 15 <210> 32
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> *Porphyromonas gingivalis*
 <400> 32
 Pro Asn Gly Thr Pro Asn Pro Asn Pro Gly Thr Thr Thr Leu Ser Glu
 1 5 10 15
 Ser Phe
 20 <210> 33
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Porphyromonas gingivalis*
 25 <400> 33
 Trp Ile Glu Arg Thr Val Asp Leu Pro Ala Gly Thr Lys Tyr Val Ala
 1 5 10 15
 Phe Arg His Tyr
 20
 <210> 34
 <211> 20

ES 2 530 510 T3

<212> PRT

<213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 34

Trp Arg Gln Lys Thr Val Asp Leu Pro Ala Gly Thr Lys Tyr Val Ala
1 5 10 15
Phe Arg His Phe
 20

5 <210> 35

<211> 20

<212> PRT

<213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 35

Trp Tyr Gln Lys Thr Val Gln Leu Pro Ala Gly Thr Lys Tyr Val Ala
1 5 10 15
Phe Arg His Phe
 20

10 <210> 36

<211> 20

<212> PRT

<213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 36

Trp Ile Glu Arg Thr Val Asp Leu Pro Ala Gly Thr Lys Tyr Val Ala
1 5 10 15
Phe Arg His Tyr
 20

15 <210> 37

<211> 21

<212> PRT

<213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 37

Glu Arg Thr Ile Asp Leu Ser Ala Tyr Ala Gly Gln Gln Val Tyr Leu
1 5 10 15
Ala Phe Arg His Phe
 20

20 <210> 38

<211> 16

<212> PRT

<213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 38

Pro Ala Glu Trp Thr Thr Ile Asp Ala Asp Gly Asp Gly Gln Gly Trp
1 5 10 15

25 <210> 39

<211> 22

<212> PRT

<213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 39

Pro Ala Glu Trp Thr Thr Ile Asp Ala Asp Gly Asp Gly Gln Gly Trp
1 5 10 15

ES 2 530 510 T3

<210> 39

<211> 16

<212> PRT

<213> *Porphyromonas gingivalis*

5 <400> 39

Pro Ala Ser Trp Lys Thr Ile Asp Ala Asp Gly Asp Gly His Gly Trp
1 5 10 15

<210> 40

<211> 16

<212> PRT

10 <213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 40

Pro Ala Ser Trp Lys Thr Ile Asp Ala Asp Gly Asp Gly Asn Asn Trp
1 5 10 15

<210> 41

<211> 16

15 <212> PRT

<213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 41

Pro Ser Ser Trp Lys Thr Ile Asp Ala Asp Gly Asp Gly Asn Asn Trp
1 5 10 15

<210> 42

20 <211> 16

<212> PRT

<213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 42

Pro Asn Gly Trp Thr Met Ile Asp Ala Asp Gly Asp Gly His Asn Trp
1 5 10 15

25 <210> 43

<211> 20

<212> PRT

<213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 43

Glu Gly Ser Asn Glu Phe Ala Pro Val Gln Asn Leu Thr Gly Ser Ala
1 5 10 15

30

Val Gly Gln Lys
20

<210> 44

<211> 20

<212> PRT

ES 2 530 510 T3

<213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 44

Gly Glu Pro Asn Pro Tyr Gln Pro Val Ser Asn Leu Thr Ala Thr Thr
1 5 10 15

Gln Gly Gln Lys
20

<210> 45

5 <211> 20

<212> PRT

<213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 45

Glu Gly Ser Asn Glu Phe Ala Pro Val Gln Asn Leu Thr Gly Ser Ser
1 5 10 15

Val Gly Gln Lys
20

10 <210> 46

<211> 20

<212> PRT

<213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 46

Gly Glu Pro Ser Pro Tyr Gln Pro Val Ser Asn Leu Thr Ala Thr Thr
1 5 10 15

Gln Gly Gln Lys
20

15 <210> 47

<211> 19

<212> PRT

<213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 47

Asn Ser Thr Gln Phe Asn Pro Val Gln Asn Leu Thr Ala Glu Gln Ala
1 5 10 15

Pro Asn Ser
20

<210> 48

<211> 20

<212> PRT

25 <213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 48

Glu Gly Ser Asn Glu Phe Ala His Val Gln Asn Leu Thr Gly Ser Ala
1 5 10 15

Val Gly Gln Lys
20

ES 2 530 510 T3

<210> 49

<211> 19

<212> PRT

<213> *Porphyromonas gingivalis*

5 <400> 49

Asp Pro Val Gln Phe Asn Pro Val Gln Asn Leu Thr Gly Ser Ala Val

1 5 10 15

Gly Gln Lys

<210> 50

<211> 19

10 <212> PRT

<213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 50

Asp Pro Val Gln Phe Asn Pro Val Gln Asn Leu Thr Gly Ser Ala Val

1 5 10 15

Gly Gln Lys

<210> 51

15 <211> 19

<212> PRT

<213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 51

Asp Pro Val Gln Phe Asn Pro Val Gln Asn Leu Thr Gly Ser Ala Val

1 5 10 15

Gly Gln Lys

20 <210> 52

<211> 20

<212> PRT

<213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 52

Glu Gly Gly Asn Glu Phe Ala Pro Val Gln Asn Leu Gln Trp Ser Val

1 5 10 15

25 Ser Gly Gln Thr

20

<210> 53

<211> 25

<212> PRT

30 <213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 53

ES 2 530 510 T3

Gly Asn His Glu Tyr Cys Val Glu Val Lys Tyr Thr Ala Gly Val Ser
 1 5 10 15

Pro Lys Val Cys Lys Asp Val Thr Val
 20 25

<210> 54

<211> 25

<212> PRT

5 <213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 54

Gly Asn His Glu Tyr Cys Val Glu Val Lys Tyr Thr Ala Gly Val Ser
 1 5 10 15

Pro Lys Lys Cys Val Asn Val Thr Val
 20 25

<210> 55

<211> 21

10 <212> PRT

<213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 55

Ser His Glu Tyr Cys Val Glu Val Lys Tyr Thr Ala Gly Val Ser Pro
 1 5 10 15

Lys Val Cys Val Asp
 20

<210> 56

15 <211> 25

<212> PRT

<213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 56

Gly Asn His Glu Tyr Cys Val Glu Val Lys Tyr Thr Ala Gly Val Ser
 1 5 10 15

Pro Lys Val Cys Val Asn Val Thr Ile
 20 25

20 <210> 57

<211> 25

<212> PRT

<213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 57

Gly Gln Tyr Asn Tyr Cys Val Glu Val Lys Tyr Thr Ala Gly Val Ser
 1 5 10 15

Pro Lys Val Cys Lys Asp Val Thr Val
 20 25

25 <210> 58

<211> 25

ES 2 530 510 T3

<212> PRT

<213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 58

Gly Asn His Glu Tyr Cys Val Glu Val Lys Tyr Thr Ala Gly Val Ser
 1 5 10 15
 Pro Glu Val Cys Val Asn Val Thr Val
 20 25

5 <210> 59

<211> 25

<212> PRT

<213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 59

Gly Asn His Glu Tyr Cys Val Glu Val Lys Tyr Thr Ala Gly Val Ser
 1 5 10 15
 Pro Glu Val Cys Val Asn Val Thr Val
 20 25

10 <210> 60

<211> 27

<212> PRT

<213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 60

Pro Tyr Gln Pro Val Ser Asn Leu Thr Ala Thr Thr Gln Gly Gln Lys
 1 5 10 15
 Val Thr Leu Lys Trp Asp Ala Pro Ser Thr Lys
 20 25

15 <210> 61

<211> 16

<212> ADN

<213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 61

cggtccgt aaagtc 16

<210> 62

<211> 24

<212> ADN

<213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 62

tggctacgat gacgatcata cgac 24

<210> 63

<211> 16

<212> PRT

<213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 62

<210> 63

<211> 16

<212> PRT

ES 2 530 510 T3

<213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 63

Tyr Thr Pro Val Glu Glu Lys Glu Asn Gly Arg Met Ile Val Ile Val
1 5 10 15

<210> 64

5 <211> 10

<212> PRT

<213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 64

Pro Lys Lys Tyr Glu Glu Asp Ile Glu Asp
1 5 10

10 <210> 65

<211> 6

<212> PRT

<213> *Porphyromonas gingivalis*

<220>

15 <221> Variante

<222> (3)..(3)

<223> Xaa - cualquier aminoácido de origen natural

<400> 65

Pro Val Xaa Asn Leu Thr
1 5

20 <210> 66

<211> 6

<212> PRT

<213> *Porphyromonas gingivalis*

<220>

25 <221> VARIANTE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa – cualquier aminoácido de origen natural

<400> 66

Leu Lys Trp Xaa Ala Pro
1 5

30 <210> 67

<211> 11

<212> PRT

<213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 67

ES 2 530 510 T3

Thr Ala Thr Thr Phe Glu Glu Asp Gly Val Ala
1 5 10

<210> 68

<211> 10

<212> PRT

5 <213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 68

Trp Lys Thr Ile Asp Ala Asp Gly Asp Gly
1 5 10

<210> 69

<211> 10

10 <212> PRT

<213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 69

Val Tyr Arg Asp Gly Thr Lys Ile Lys Glu
1 5 10

<210> 70

15 <211> 27

<212> PRT

<213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 70

Trp Glu Ile Arg Thr Val Asp Leu Pro Ala Gly Thr Lys Tyr Val Glu
1 5 10 15

Phe Ala Pro Val Gln Asn Leu Thr Gly Ser Ala
20 25

20 <210> 71

<211> 32

<212> PRT

<213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 71

Ala Asn Glu Ala Lys Val Val Leu Ala Ala Asp Asn Val Trp Gly Asp
1 5 10 15

25 Asn Thr Gly Tyr Gln Phe Leu Leu Asp Ala Asp His Asn Thr Phe Gly
20 25 30

<210> 72

<211> 33

<212> PRT

<213> *Porphyromonas gingivalis*

30 <400> 72

ES 2 530 510 T3

Val Thr Leu Lys Trp Asp Ala Pro Asn Gly Thr Pro Asn Pro Asn Pro
 1 5 10 15

Asn Pro Asn Pro Asn Pro Asn Pro Gly Thr Thr Thr Leu Ser Glu Ser
 20 25 30

Phe

<210> 73

<211> 507

<212> PRT

5 <213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 73

Tyr Thr Pro Val Glu Glu Lys Glu Asn Gly Arg Met Ile Val Ile Val
 1 5 10 15

Pro Lys Lys Tyr Glu Glu Asp Ile Glu Asp Phe Val Asp Trp Lys Asn
 20 25 30

Gln Arg Gly Leu Arg Thr Glu Val Lys Val Ala Glu Asp Ile Ala Ser
 35 40 45

Pro Val Thr Ala Asn Ala Ile Gln Gln Phe Val Lys Gln Glu Tyr Glu
 50 55 60

Lys Glu Gly Asn Asp Leu Thr Tyr Val Leu Leu Val Gly Asp His Lys
 65 70 75 80

Asp Ile Pro Ala Lys Ile Thr Pro Gly Ile Lys Ser Asp Gln Val Tyr
 85 90 95

Gly Gln Ile Val Gly Asn Asp His Tyr Asn Glu Val Phe Ile Gly Arg
 100 105 110

Phe Ser Cys Glu Ser Lys Glu Asp Leu Lys Thr Gln Ile Asp Arg Thr
 115 120 125

Ile His Tyr Glu Arg Asn Ile Thr Thr Glu Asp Lys Trp Leu Gly Gln
 130 135 140

Ala Leu Cys Ile Ala Ser Ala Glu Gly Gly Pro Ser Ala Asp Asn Gly
 145 150 155 160

Glu Ser Asp Ile Gln His Glu Asn Ile Ile Ala Asn Leu Leu Thr Gln

ES 2 530 510 T3

165 170 175

Tyr Gly Tyr Thr Lys Ile Ile Lys Cys Tyr Asp Pro Gly Val Thr Pro
180 185 190

Lys Asn Ile Ile Asp Ala Phe Asn Gly Gly Ile Ser Leu Ala Asn Tyr
195 200 205

Thr Gly His Gly Ser Glu Thr Ala Trp Gly Thr Ser His Phe Gly Thr
210 215 220

Thr His Val Lys Gln Leu Thr Asn Ser Asn Gln Leu Pro Phe Ile Phe
225 230 235 240

Asp Val Ala Cys Val Asn Gly Asp Phe Leu Tyr Asn Val Pro Cys Phe
245 250 255

Ala Glu Ala Leu Met Arg Ala Gln Lys Asp Gly Lys Pro Thr Gly Thr
260 265 270

Val Ala Ile Ile Ala Ser Thr Ile Asn Gln Ser Trp Ala Ser Pro Met
275 280 285

Arg Gly Gln Asp Glu Met Asn Glu Ile Leu Cys Glu Lys His Pro Asn
290 295 300

Asn Ile Lys Arg Thr Phe Gly Gly Val Thr Met Asn Gly Met Phe Ala
305 310 315 320

Met Val Glu Lys Tyr Lys Lys Asp Gly Glu Lys Met Leu Asp Thr Trp
325 330 335

Thr Val Phe Gly Asp Pro Ser Leu Leu Val Arg Thr Leu Val Pro Thr
340 345 350

Lys Met Gln Val Thr Ala Pro Ala Asn Ile Ser Ala Ser Ala Gln Thr
355 360 365

Phe Glu Val Ala Cys Asp Tyr Asn Gly Ala Ile Ala Thr Leu Ser Asp
370 375 380

Asp Gly Asp Met Val Gly Thr Ala Ile Val Lys Asp Gly Lys Ala Ile
385 390 395 400

Ile Lys Leu Asn Glu Ser Ile Ala Asp Glu Thr Asn Leu Thr Leu Thr
405 410 415

Val Val Gly Tyr Asn Lys Val Thr Val Ile Lys Asp Val Lys Val Glu
420 425 430

Gly Thr Ser Ile Ala Asp Val Ala Asn Asp Lys Pro Tyr Thr Val Ala
435 440 445

Val Ser Gly Lys Thr Ile Thr Val Glu Ser Pro Ala Ala Gly Leu Thr
450 455 460

Ile Phe Asp Met Asn Gly Arg Arg Val Ala Thr Ala Lys Asn Arg Met
465 470 475 480

Val Phe Glu Ala Gln Asn Gly Val Tyr Ala Val Arg Ile Ala Thr Glu
485 490 495

Gly Lys Thr Tyr Thr Glu Lys Val Ile Val Lys
500 505

<210> 74

<211> 491

5 <212> PRT

<213> *Porphyromonas gingivalis*

ES 2 530 510 T3

<400> 74

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

ES 2 530 510 T3

	195		200		205														
Thr	Gly	His	Gly	Ser	Glu	Thr	Ala	Trp	Gly	Thr	Ser	His	Phe	Gly	Thr				
	210						215					220							
Thr	His	Val	Lys	Gln	Leu	Thr	Asn	Ser	Asn	Gln	Leu	Pro	Phe	Ile	Phe				
	225				230					235									240
Asp	Val	Ala	Cys	Val	Asn	Gly	Asp	Phe	Leu	Phe	Ser	Met	Pro	Cys	Phe				
				245					250					255					
Ala	Glu	Ala	Leu	Met	Arg	Ala	Gln	Lys	Asp	Gly	Lys	Pro	Thr	Gly	Val				
			260					265					270						
Ala	Ile	Ile	Ala	Ser	Thr	Ile	Asn	Gln	Ser	Trp	Ala	Ser	Pro	Met	Arg				
		275					280					285							
Gly	Gln	Asp	Glu	Met	Asn	Glu	Ile	Leu	Cys	Glu	Lys	His	Pro	Asn	Asn				
	290					295					300								
Ile	Lys	Arg	Thr	Phe	Gly	Gly	Val	Thr	Met	Asn	Gly	Met	Phe	Ala	Met				
	305				310					315					320				
Val	Glu	Lys	Tyr	Lys	Lys	Asp	Gly	Glu	Lys	Met	Leu	Asp	Thr	Trp	Thr				
				325					330					335					
Val	Phe	Gly	Asp	Pro	Ser	Leu	Leu	Val	Arg	Thr	Leu	Val	Pro	Thr	Lys				
			340					345					350						
Met	Gln	Val	Thr	Ala	Pro	Ala	Gln	Ile	Asn	Leu	Thr	Asp	Ala	Ser	Val				
		355				360						365							
Asn	Val	Ser	Cys	Asp	Tyr	Asn	Gly	Ala	Ile	Ala	Thr	Ile	Ser	Ala	Asn				
	370					375					380								
Gly	Lys	Met	Phe	Gly	Ser	Ala	Val	Val	Glu	Asn	Gly	Thr	Ala	Thr	Ile				
	385				390				395						400				
Asn	Leu	Thr	Gly	Leu	Thr	Asn	Glu	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Val	Val				
				405					410					415					
Gly	Tyr	Asn	Lys	Glu	Thr	Val	Ile	Lys	Thr	Ile	Asn	Thr	Asn	Gly	Glu				
			420					425					430						
Pro	Asn	Pro	Tyr	Gln	Pro	Val	Ser	Asn	Leu	Thr	Ala	Thr	Thr	Gln	Gly				
		435					440					445							
Gln	Lys	Val	Thr	Leu	Lys	Trp	Asp	Ala	Pro	Ser	Thr	Lys	Thr	Asn	Ala				
	450					455					460								
Thr	Thr	Asn	Thr	Ala	Arg	Ser	Val	Asp	Gly	Ile	Arg	Glu	Leu	Val	Leu				
	465				470					475					480				
Leu	Ser	Val	Ser	Asp	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Arg									
				485					490										

<210> 75

<211> 509

<212> PRT

5 <213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 75

ES 2 530 510 T3

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

ES 2 530 510 T3

			245						250						255
Val	Gln	Pro	Cys	Phe	Gly	Glu	Val	Ile	Thr	Arg	Val	Lys	Glu	Lys	Gly
			260					265					270		
Ala	Tyr	Ala	Tyr	Ile	Gly	Ser	Ser	Pro	Asn	Ser	Tyr	Trp	Gly	Glu	Asp
		275					280					285			
Tyr	Tyr	Trp	Ser	Val	Gly	Ala	Asn	Ala	Val	Phe	Gly	Val	Gln	Pro	Thr
	290					295					300				
Phe	Glu	Gly	Thr	Ser	Met	Gly	Ser	Tyr	Asp	Ala	Thr	Phe	Leu	Glu	Asp
305					310					315					320
Ser	Tyr	Asn	Thr	Val	Asn	Ser	Ile	Met	Trp	Ala	Gly	Asn	Leu	Ala	Ala
				325					330						335
Thr	His	Ala	Gly	Asn	Ile	Gly	Asn	Ile	Thr	His	Ile	Gly	Ala	His	Tyr
			340					345					350		
Tyr	Trp	Glu	Ala	Tyr	His	Val	Leu	Gly	Asp	Gly	Ser	Val	Met	Pro	Tyr
		355					360					365			
Arg	Ala	Met	Pro	Lys	Thr	Asn	Thr	Tyr	Thr	Leu	Pro	Ala	Ser	Leu	Pro
	370					375					380				
Gln	Asn	Gln	Ala	Ser	Tyr	Ser	Ile	Gln	Ala	Ser	Ala	Gly	Ser	Tyr	Val
385					390					395					400
Ala	Ile	Ser	Lys	Asp	Gly	Val	Leu	Tyr	Gly	Thr	Gly	Val	Ala	Asn	Ala
				405					410						415
Ser	Gly	Val	Ala	Thr	Val	Ser	Met	Thr	Lys	Gln	Ile	Thr	Glu	Asn	Gly
			420					425					430		
Asn	Tyr	Asp	Val	Val	Ile	Thr	Arg	Ser	Asn	Tyr	Leu	Pro	Val	Ile	Lys
		435					440					445			
Gln	Ile	Gln	Val	Gly	Glu	Pro	Ser	Pro	Tyr	Gln	Pro	Val	Ser	Asn	Leu
	450					455					460				
Thr	Ala	Thr	Thr	Gln	Gly	Gln	Lys	Val	Thr	Leu	Lys	Trp	Glu	Ala	Pro
465					470					475					480
Ser	Ala	Lys	Lys	Ala	Glu	Gly	Ser	Arg	Glu	Val	Lys	Arg	Ile	Gly	Asp
				485					490						495
Gly	Leu	Phe	Val	Thr	Ile	Glu	Pro	Ala	Asn	Asp	Val	Arg			
			500					505							

REIVINDICACIONES

1. Una composición para uso para provocar una respuesta inmunitaria frente a *Porphyromonas gingivalis*, incluyendo la composición un adyuvante adecuado y/o vehículo o excipiente aceptable y al menos un péptido seleccionado del grupo que consiste en:

- 5 PNGTPNPNPNPNPNPNPGTTTLESSEF
- PNGTPNPNPNPNPNPNPGTTTLESSEF
- PNGTPNPNPNPNPNPGTTTLESSEF
- PNGTPNPNPNPNPNPGTTTLESSEF

2. Una composición según la reivindicación 1, en la que la composición incluye más de un péptido.

10 3. Una composición según la reivindicación 2, en la que la composición incluye uno o más multímeros de diferentes péptidos.

4. Un péptido seleccionado del grupo que consiste en:

- 15 PNGTPNPNPNPNPNPNPGTTTLESSEF
- PNGTPNPNPNPNPNPNPGTTTLESSEF
- PNGTPNPNPNPNPNPNPGTTTLESSEF
- PNGTPNPNPNPNPNPNPGTTTLESSEF

5. Una preparación de anticuerpos que comprende anticuerpos dirigidos específicamente contra un péptido según la reivindicación 4.

6. Una preparación de anticuerpos según la reivindicación 5, en la que los anticuerpos son anticuerpos policlonales.

20 7. Una preparación de anticuerpos según la reivindicación 5, en la que los anticuerpos son anticuerpos monoclonales.

8. El uso de una composición como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o un péptido como se define en la reivindicación 4, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de *Porphyromonas gingivalis*.

25 9. El uso de una preparación de anticuerpos como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de *Porphyromonas gingivalis*.

10. El uso según la reivindicación 8 o reivindicación 9, en el que el medicamento se administra como un colutorio o como un dentífrico.

30 11. El uso de una composición como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la preparación de un medicamento para uso en la reducción de la posibilidad de infección por *Porphyromonas gingivalis* en un individuo, y/o la gravedad de dicha enfermedad.

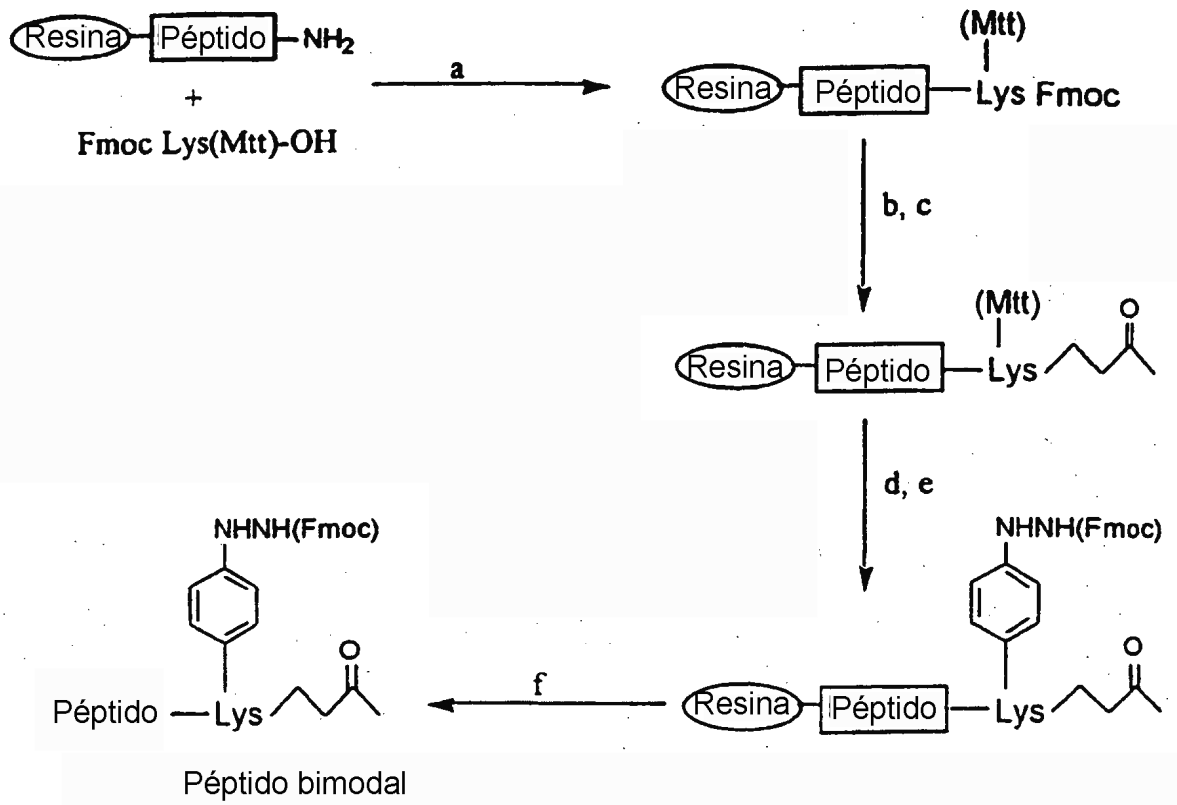
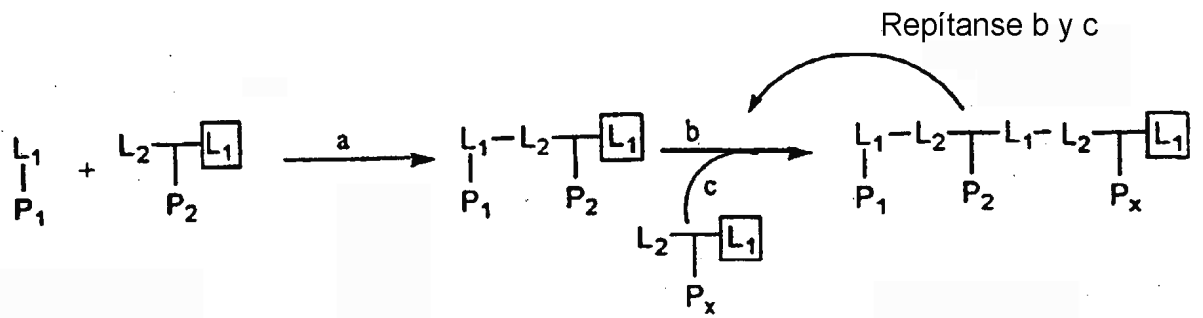


Figura 1



Ejemplo

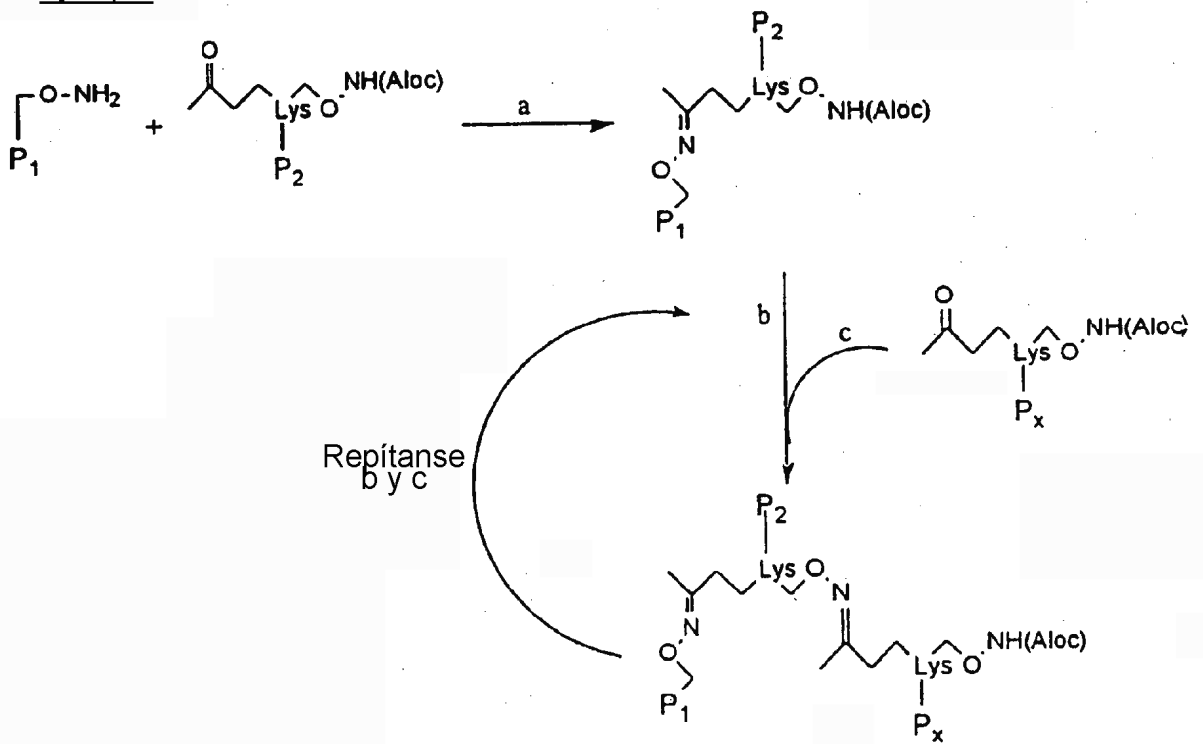
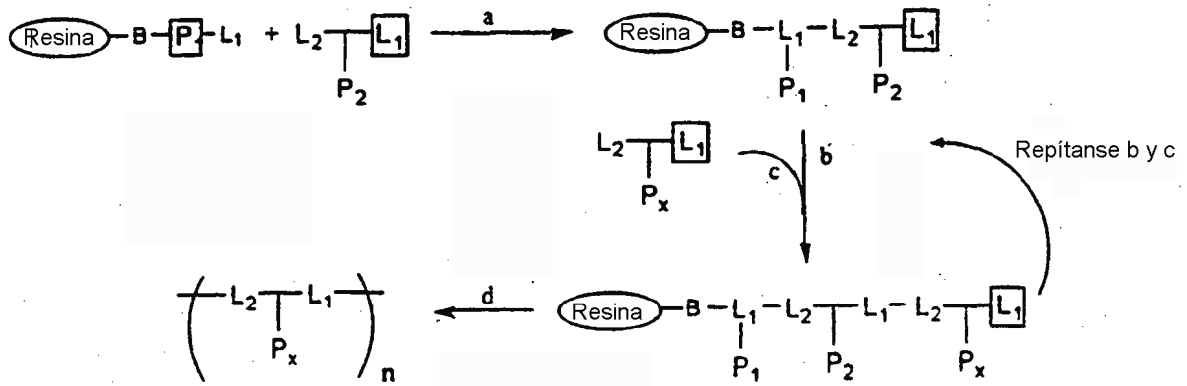


Figura 2



Ejemplo

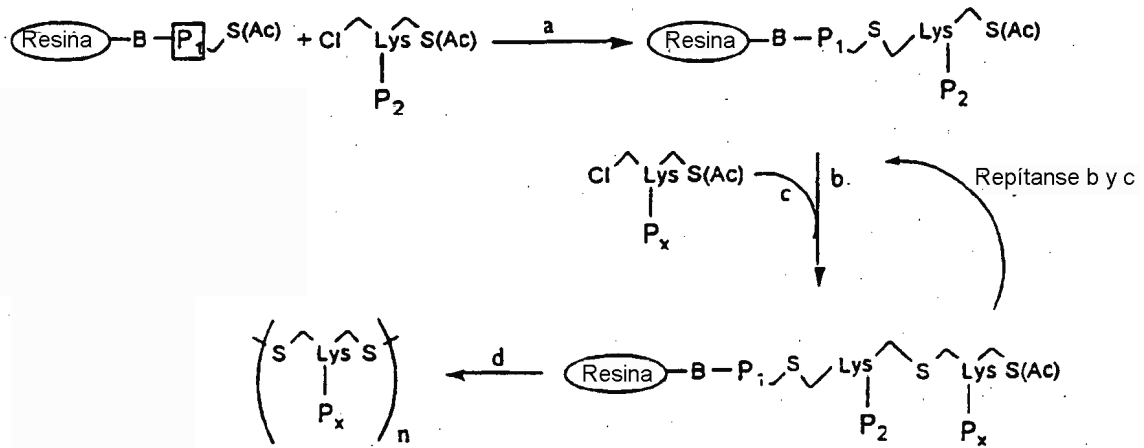
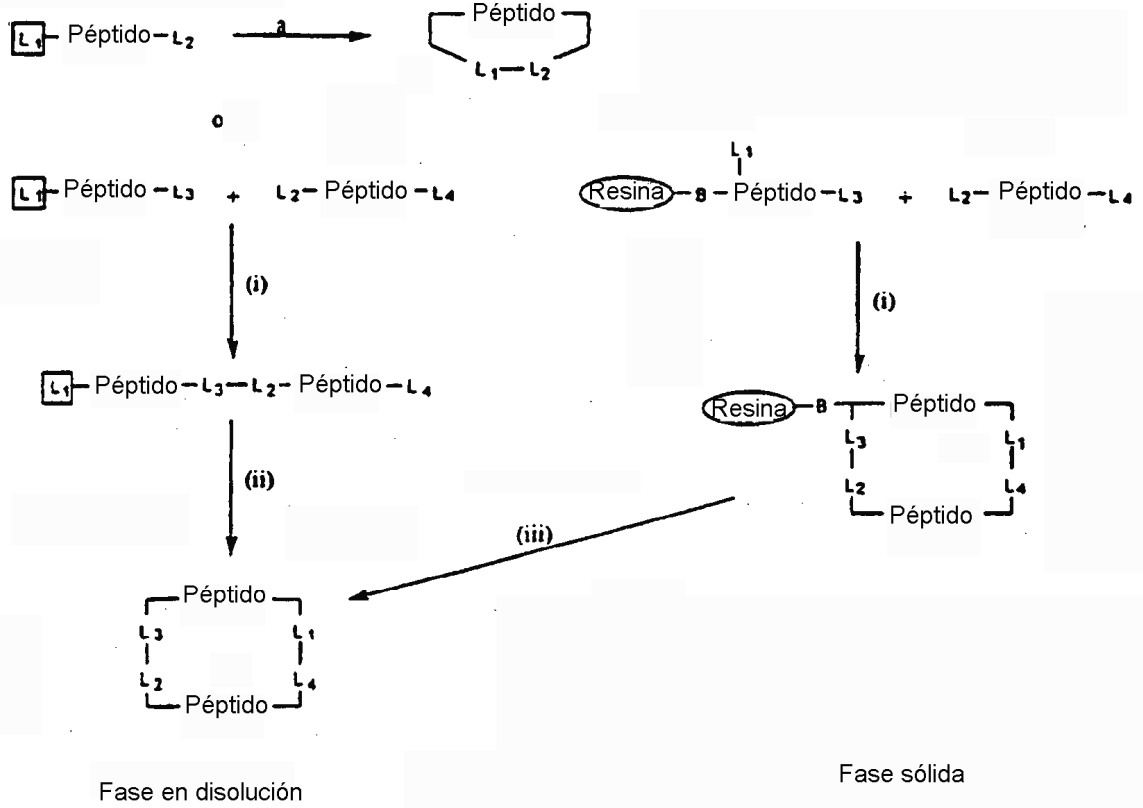


Figura 3



Ejemplo

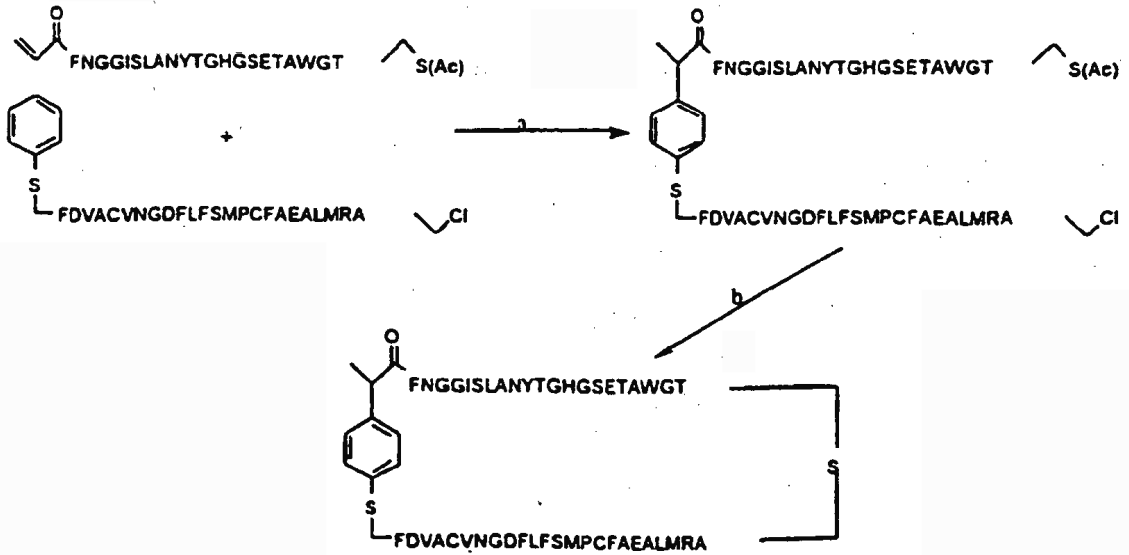
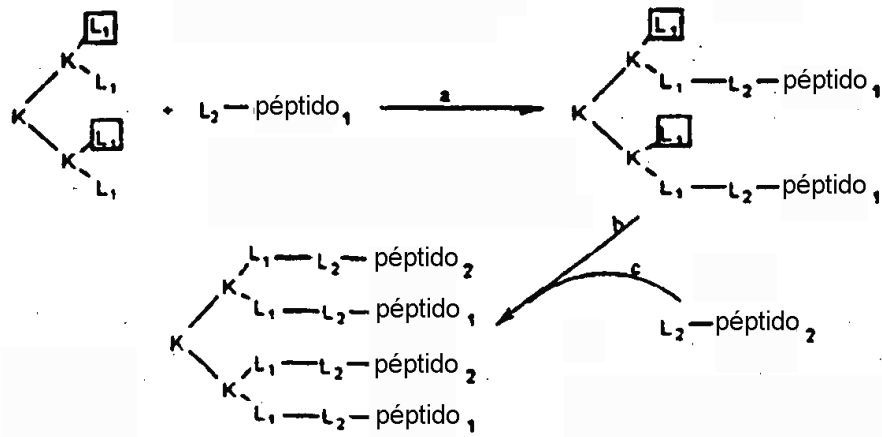


Figura 4



Ejemplo

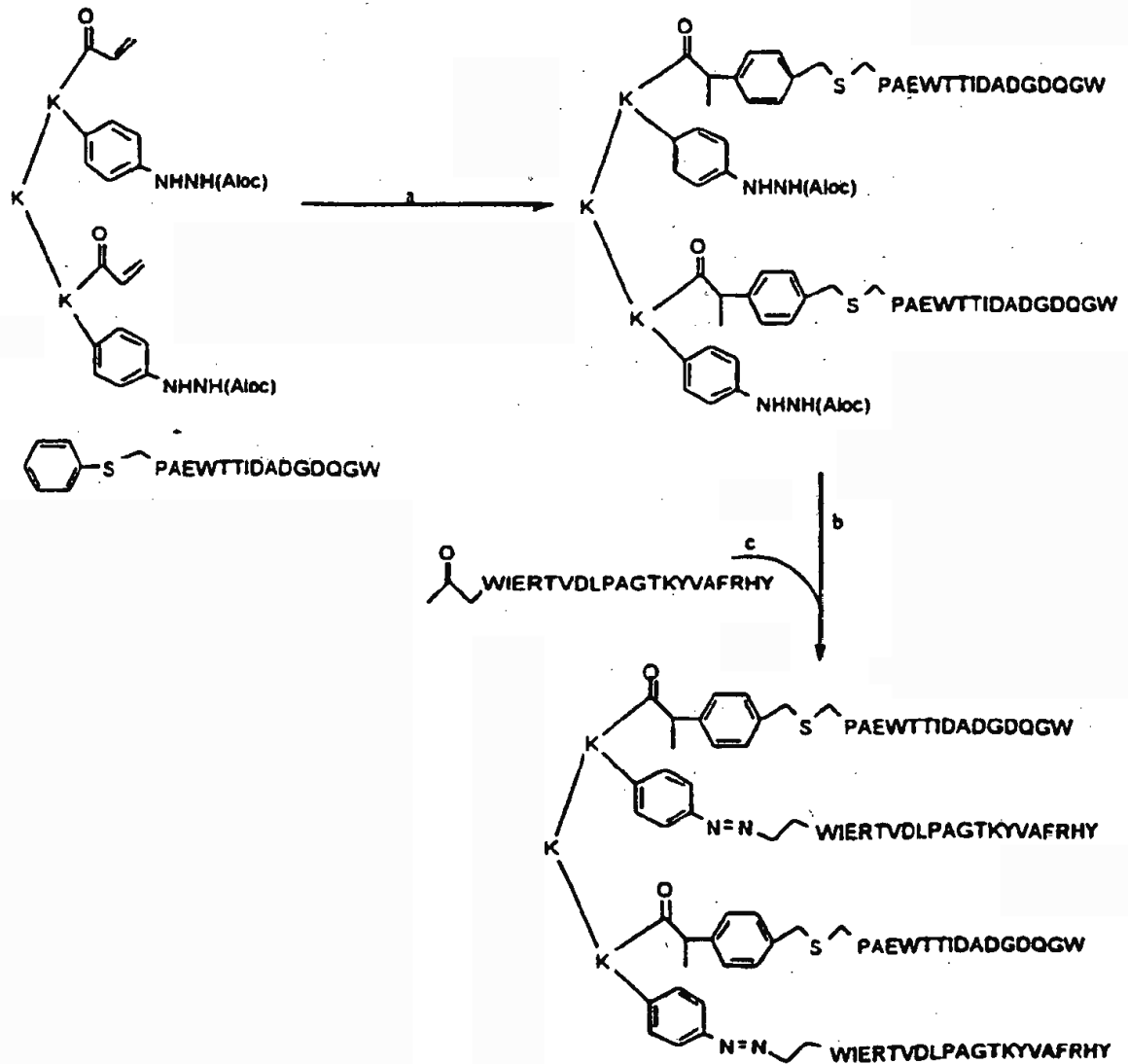


Figura 5

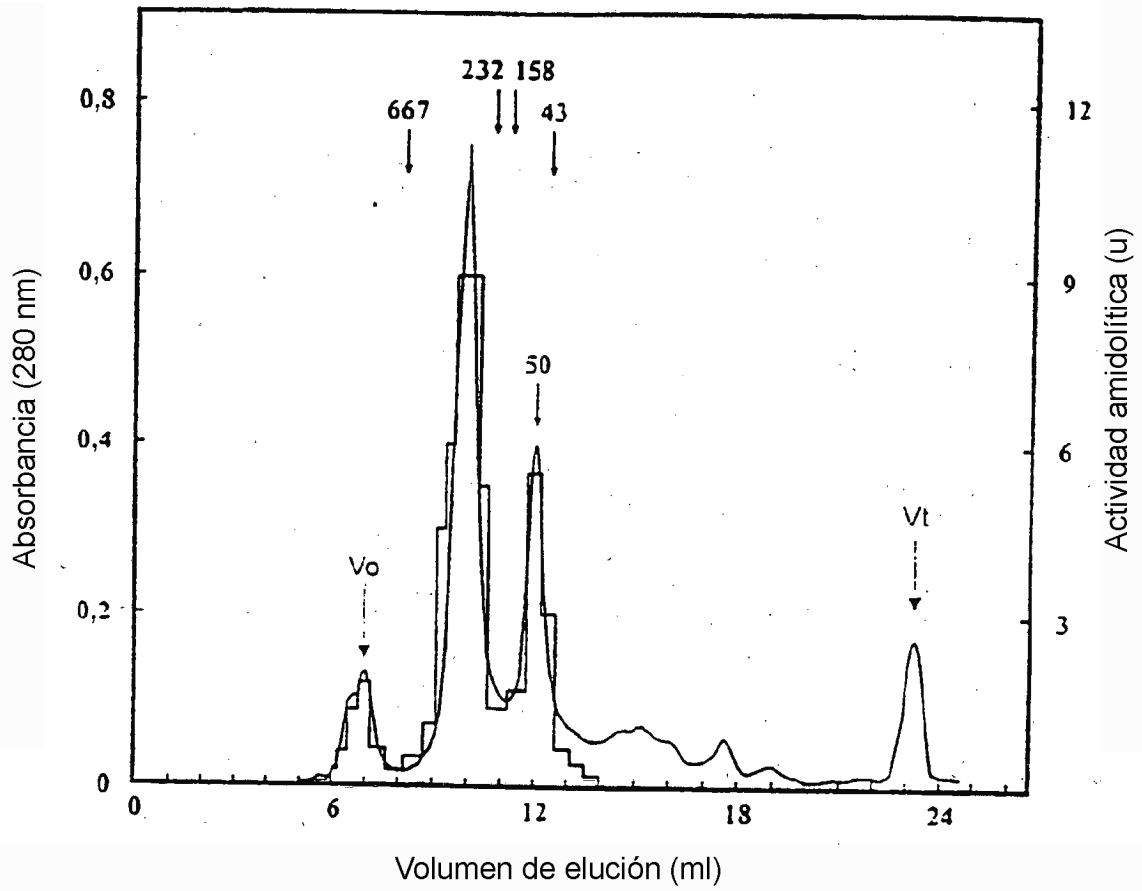


Figura 6

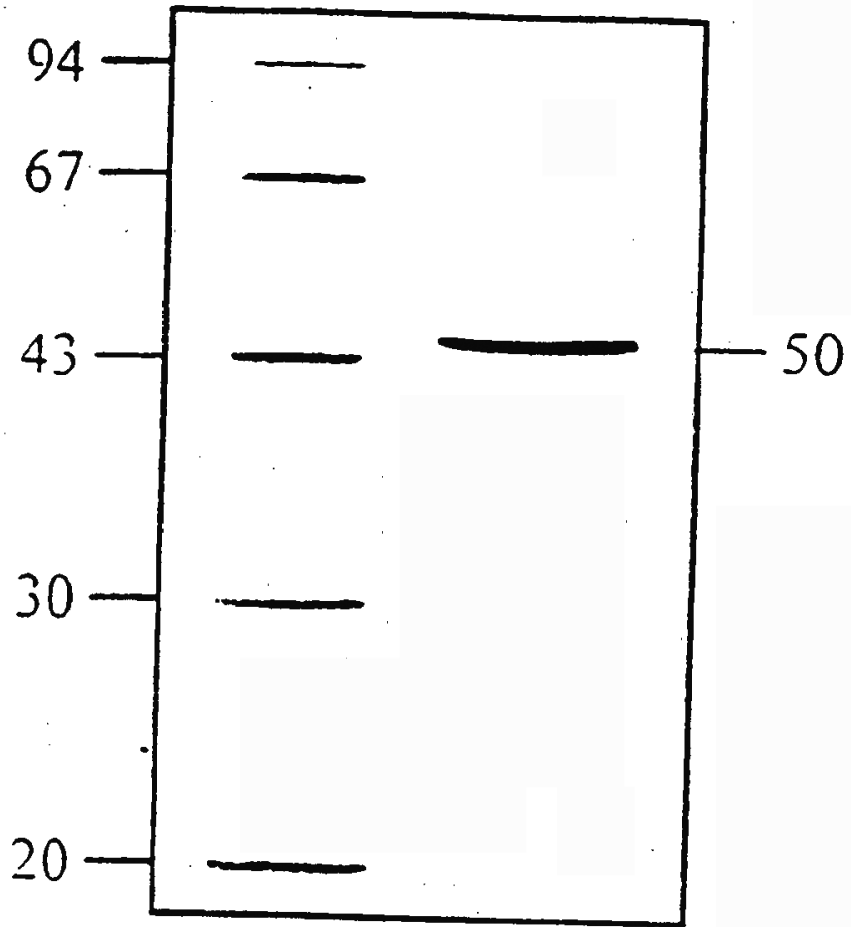


Figura 7

```

                230                                275
PrtRII50  ..YTPVEEKENG..RMIVIVPKKYEEDIEDFVDWKNQRGLRTEVKVAEDI
PrtR45    ..*****Q*****A*****G**K*****
PrtK48    DV**DHGDLY*TPV**L*VAGA*FK*ALKPWL**A*K*FYLD*HYTDEA

                276                                321
PrtRII50  ASPVTANAIQQFVKQEYEKE...GNDLTYVLLVGDHDKDIPA.KITPGIKS
PrtR45    *****I*****
PrtK48    EVGT*NASIKA*IHKK*NDGLAASAAPVFLA***TDV*SGE*GKKT*KV

                322                                371
PrtRII50  DQVYGQIVGNDHYNEVFIGRFSCESKEDLKTQIDRTIHYERNITTEDKWL
PrtR45    *****
PrtK48    TDL*YSA*DG*YFP*MYTF*M*AS*P*E*TNI**KVL**KATMPDKSY*

                372                                421
PrtRII50  GQALCIASAEAGGPSADNGESDIQHENIANLLTQYGYTKI IKCYDPGVTP
PrtR45    *****V*****
PrtK48    EKV*L**G*DYSWNSQV*QPT*KYG.MQYYYNQEH***DVYNYLKAPY*

                422                                471
PrtRII50  KNIIDAFNGGISLANYTGHGSETAWGTSHFGTTHVKQLTNSNQLPFIFDV
PrtR45    *****
PrtK48    .GCYSHL*T*V*F*****A*****ADPLLT*SQL*A***KDKYFLAIGN

                472                                521
PrtRII50  ACVNGDFLYNVPCFAEALMRAQKDGKPTGTVAIIASTINQSWASPMRGQD
PrtR45    *****FSM*****
PrtK48    C*ITAQ*D*VQ***G*VIT*...V*EK*AY*Y*G*SP*SY*GEDYYSV

                522                                561
PrtRII50  EMNEILCEKHP..NNIKRTFGGVTMNGMFAMVEKYKKDGEKM.....
PrtR45    *****
PrtK48    GA*AVFGVQPTFEGTSMGSYDATFLEDSYNTVNSIMWA*NLAATHAGNIG

                562                                501
PrtRII50  .....LDTWTVFGDPSLLVRTLVP TKMQVTAPANISASAQTFEVA
PrtR45    .....*****Q*NLTDASVN*S
PrtK48    NITHIGAHYYWEAYH*L**G*VMPYRAM*KTNTY*L**SLPQNQASYSIQ

                602                                550
PrtRII50  CDYNGAIATLSDDGDMVGTAIVK.DGKAI IKLNESIADETNLTLTVVGYN
PrtR45    *****I*AN*K*F*S*V*E.N*T*T*N.TGLTN*ST*****
PrtK48    ASAGSYV*.I*K**VLY**GVANAS*V*TVSMTKQ*TENG*YDVVITRS*

                651                                599
PrtRII50  KVTVIKDVKVEGTSIA.DVANDKPYTVAVSGKTITVESPAAGLTI FDMNG
PrtR45    *E***TINTN*EPNPYQPVSNLTA*TOGOKV*LKWDA*STKTNATTNTA
PrtK48    YLP***QIQ*..*EPSPYQPVSNLTA*TOGOKV*LKW*A*S*KKAEGSRE*

                700                                736
PrtRII50  RRVATAKNRMVFEAQNGVYAVRIATEGKTYTEKVIVK
PrtR45    *SVDGIRELVLLSVSDAPELL*.....
PrtK48    K*IGDG...L*VTIEPAND*.....

```

Figura 8

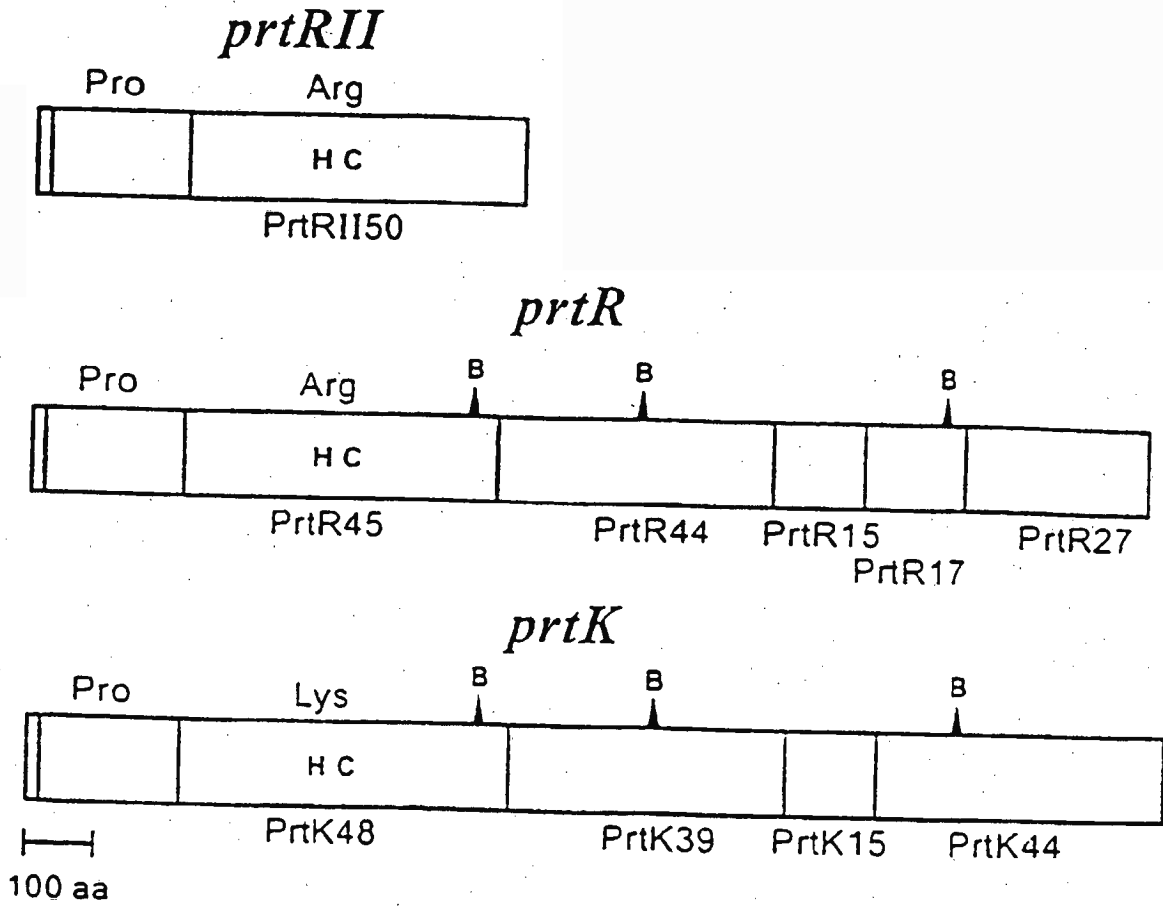


Figura 9

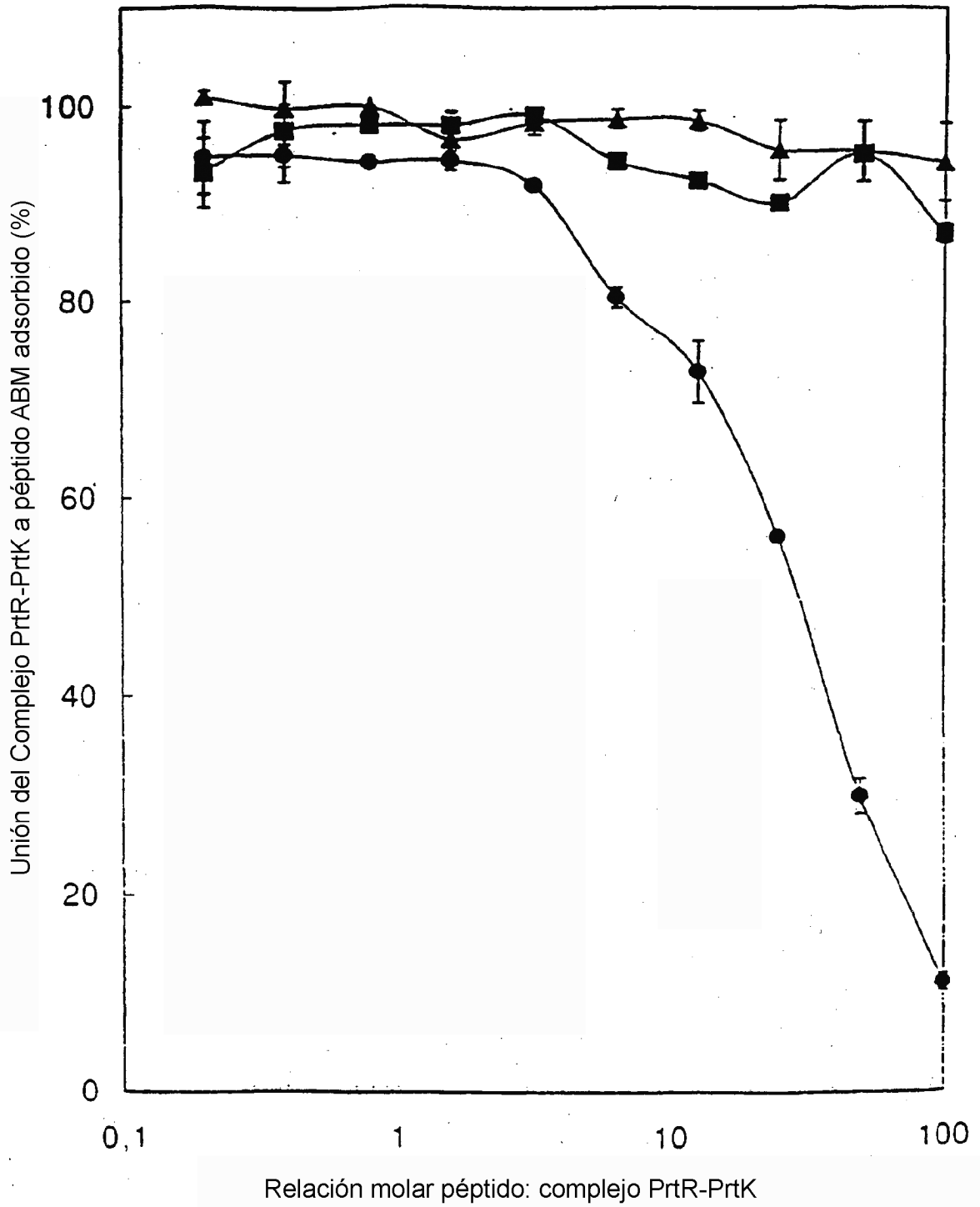


Figura 10

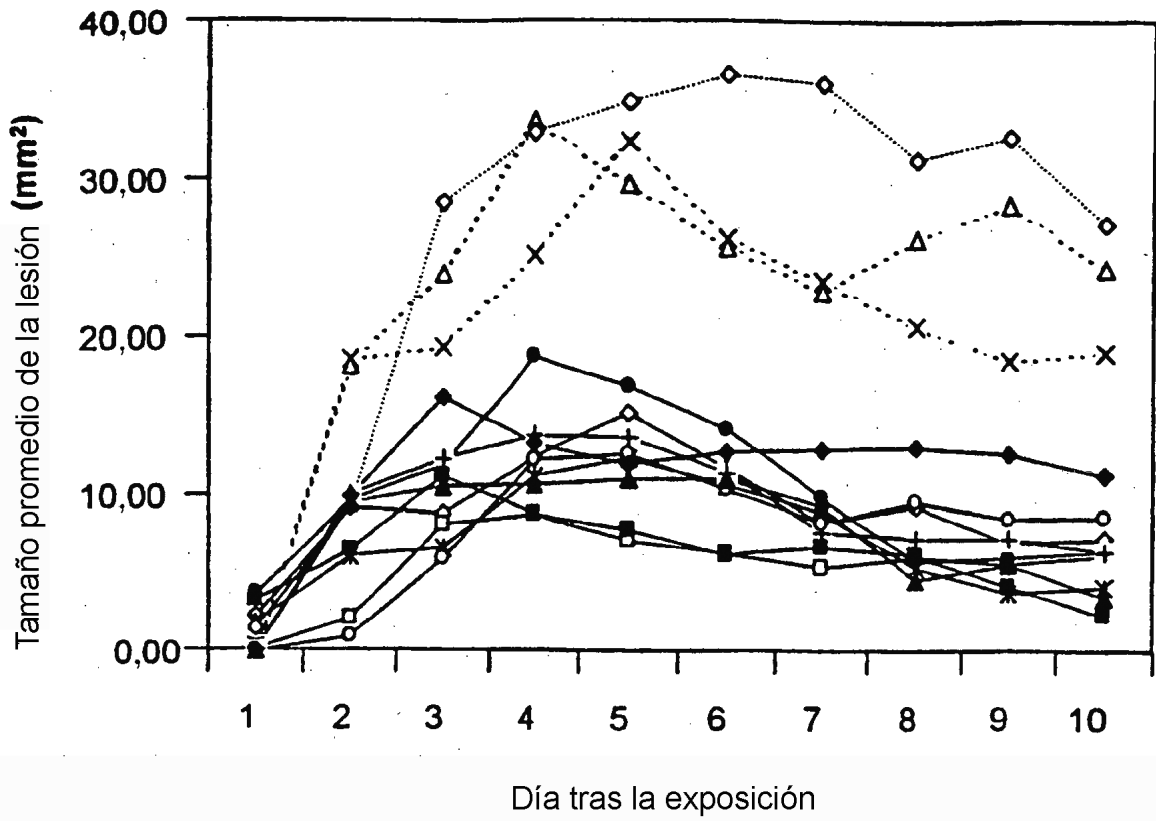


Figura 11