



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2011108943/10, 28.08.2009

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
28.08.2009

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:

29.08.2008 AU 2008904476;

23.10.2008 AU 2008905483;

09.02.2009 US 61/151,132;

30.06.2009 AU 2009903052

(43) Дата публикации заявки: 10.10.2012 Бюл. № 28

(45) Опубликовано: 20.12.2014 Бюл. № 35

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: FRAZER L.T. et al., Vaccination with recombinant adhesins from the RgpA"Kgp proteinase"adhesin complex protects against Porphyromonas gingivalis infection, Vaccine 24(2006)6542-6554. WO0147961 A1, 05.07.2001. US2004005276 A1, 08.01.2004. O'BRIEN-SIMPSON N.M. et al., An immune response directed to proteinase and adhesin functional epitopes (см. прод.)

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 29.03.2011

(86) Заявка РСТ:
AU 2009/001112 (28.08.2009)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2010/022463 (04.03.2010)

Адрес для переписки:

190000, Санкт-Петербург, ул. Малая Морская,
15, офис 5, BOX 1125, ООО "ПАТЕНТИКА",
М.И.Ниловой

(72) Автор(ы):

РЕЙНОЛДС,Эрик Чарльз (AU),

ОБРАЙН СИМПСОН,Нэйл Мартин (AU),

КРОСС,Кейт,Дж. (AU),

СЛАКЕСКИ,Нада (AU)

(73) Патентообладатель(и):

ОРАЛ ХЭЛС АУСТРАЛИА ПТИ ЛТД
(AU)

(54) ПРОФИЛАКТИКА, ЛЕЧЕНИЕ И ДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ БАКТЕРИЯМИ P.GINGIVALIS

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биохимии, в частности к химерным или гибридным белкам для индуцирования иммунного ответа против P. gingivalis. Раскрыта композиция для

индуцирования иммунного ответа против P. gingivalis, содержащая эффективное количество одного из вышеуказанных химерных или гибридных белков, способ профилактики

состояния или заболевания, связанного с *P. Gingivalis*, и способ снижения частоты или тяжести состояния или заболевания, связанного с *P. gingivalis* с их использованием. Также раскрыто применение вышеуказанных химерных или

гибридных белков для определения антител к *P. gingivalis* в биологическом образце. Изобретение позволяет эффективно индуцировать иммунный ответ против *P. gingivalis*. 7 н. и 9 з.п. ф-лы, 7 ил., 4 табл., 22 пр.

(56) (продолжение):

protects against Porphyromonas gingivalis-induced periodontal bone loss, J Immunol, 2005, Vol. 175, N. 6, pp.3980-3989. US7262271 B2, 28.08.2007. WO2005019249 A2, 03.03.2005. WO2011027257 A2, 10.03.2011. РОЙТ А. и др., Иммунология, Москва, "Мир", 2000, стр. 10-11

R U 2 5 3 5 8 9 8 C 2

R U 2 5 3 5 8 9 8 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C07K 14/195 (2006.01)*C07K* 16/12 (2006.01)*C07K* 4/04 (2006.01)*A61K* 39/02 (2006.01)*A61K* 39/40 (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: 2011108943/10, 28.08.2009

(24) Effective date for property rights:
28.08.2009

Priority:

(30) Convention priority:
29.08.2008 AU 2008904476;
23.10.2008 AU 2008905483;
09.02.2009 US 61/151,132;
30.06.2009 AU 2009903052

(43) Application published: 10.10.2012 Bull. № 28

(45) Date of publication: 20.12.2014 Bull. № 35

(85) Commencement of national phase: 29.03.2011

(86) PCT application:
AU 2009/001112 (28.08.2009)(87) PCT publication:
WO 2010/022463 (04.03.2010)Mail address:
190000, Sankt-Peterburg, ul. Malaja Morskaja, 15,
ofis 5, VOKh 1125, OOO "PATENTIKA",
M.I.Nilovoj

(72) Inventor(s):

REYNOLDS,Ehrik Charl'z (AU),
O'BRAJN SIMPSON,Nehjl Martin (AU),
KROSS,Kejt,Dzh. (AU),
SLAKESKI,Nada (AU)

(73) Proprietor(s):

ORAL KhEhLS AUSTRALIA PTI LTD (AU)

(54) **PROPHYLAXIS, TREATMENT AND DIAGNOSTICS OF INFECTION CAUSED BY P.GINGIVALIS BACTERIA**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnologies.

SUBSTANCE: invention describes a composition for induction of immune response against *P. gingivalis*, which contains an effective amount of one of the above chimeric or hybrid proteins, a prophylaxis method of a state or a disease related to *P. Gingivalis*, and a method for reduction of incidence or severity of the state ordisease related to *P. gingivalis* with their application. Besides, the invention describes use of the above chimeric or hybrid proteins for determination of antibodies to *P. Gingivalis* in a biological specimen.

EFFECT: invention allows effective induction of immune response against the specified etiologic agent.

16 cl, 7 dwg, 4 tbl, 22 ex

Область техники

Настоящее изобретение относится к пептидам и химерным или гибридным белкам и применению указанных белков для получения клеточного и гуморального ответа для профилактики и лечения состояний и заболеваний, вызываемых бактерией *P. Gingivalis*.

Уровень техники

Хронический периодонтит представляет собой воспалительное заболевание опорных тканей зубов, приводящее к резорбции альвеолярных отростков и потере зубов. Это заболевание представляет собой острую проблему в области здравоохранения во всех странах и, по оценкам, затрагивает до 15% взрослого населения, при этом в 5-6% случаев оно принимает тяжелые формы.

Развитие и прогрессирование хронического периодонтита связывают с конкретными грамотрицательными бактериями поддесневой бляшки. Присутствие бактерий *Porphyromonas gingivalis* в поддесневой бляшке тесно связано с заболеванием.

Сообщалось, что продолжительное присутствие бактерии *P. gingivalis* в поддесневой бляшке у пациентов с периодонтитом после лечения (удаления поддесневых отложений и полировки корней зуба) тесно связано с прогрессирующим разрушением альвеолярных отростков. Более того, было показано, что увеличение количества клеток бактерии *P. gingivalis* в поддесневой бляшке коррелирует с тяжестью заболевания, которую определяют по потере прикрепления зуба, глубине периодонтитного кармана и кровотечению при зондировании.

Показано, что инфекция ротовой полости *P. gingivalis* вызывает разрушение костей периодонта у мышей, крыс и приматов, отличных от человека. Также появляется все больше подтверждений взаимосвязи между периодонтитом и инфекцией *P. gingivalis* и сердечно-сосудистыми заболеваниями и некоторыми типами рака.

Сообщалось, что ряд факторов вирулентности способствует патогенности *P. gingivalis*, включая LPS, фимбрии, гемагглютинин, гемолизин и внеклеточные гидролитические ферменты (особенно Arg-X и Lys-X - специфичные протеиназы), известные как "трипсиноподобные ферменты *P. gingivalis*".

Указанная проблема здравоохранения настолько велика, что существует потребность в разработке иммунной сыворотки, в частности специфических антител, которые обеспечивают сильный протективный ответ на инфекцию *P. Gingivalis*, и средствах для ее обеспечения.

Одна из проблем состоит в том, что неясно, как получить сильный протективный ответ на инфекцию *P. gingivalis* при том, что существует множество факторов вирулентности, из которых можно выбирать.

Остаются не до конца понятными и сравнительная иммуногенность эпитопов факторов вирулентности, а также сравнительная иммуногенность эпитопов конкретного фактора, в частности, когда неясно остаются ли еще неизвестные эпитопы.

Одна из конкретных проблем заключается в том, что многие факторы вирулентности состоят из множества доменов, и их трудно экспрессировать таким образом, чтобы факторы имели ту же конформацию, которую имеют факторы *P. gingivalis*. Кроме того, при экспрессии этих доменов в виде отдельных единиц, т.е. по отдельности от других доменов факторов вирулентности, они склонны приобретать конформацию, отличную от той, которую имеют факторы *P. gingivalis*.

Также неизвестно, какой из множества различных способов модификации иммуногенности фактора вирулентности с наибольшей вероятностью будет обеспечивать протективный иммунный ответ.

В ходе исследований, положенных в основу настоящего изобретения, авторы изобретения обнаружили пептиды, аминокислотная последовательность которых идентична или гомологична аминокислотной последовательности, которая образует участок трипсиноподобного фермента *P. gingivalis*, где указанный участок определяет сайт указанного фермента для расщепления пептидной связи, расположенной на С-конце по отношению к остаткам Lys или Arg в пептиде, содержащем Lys или Arg, и встроили подобный пептид в химерный или гибридный белок, который при применении в качестве вакцины обеспечивает лучшую защиту тканей периодонта от разрушения, чем очищенный комплекс протеиназы и адгезина, образованный природным трипсиноподобным ферментом *P. Gingivalis*, или убитые цельные клетки.

Краткое описание изобретения

Согласно одному аспекту в настоящем изобретении предложен химерный или гибридный белок для индуцирования иммунного ответа на инфекцию *P. gingivalis*, при этом указанный белок содержит первый пептид, соединенный непосредственно или с помощью линкера со вторым пептидом, при этом:

(A) указанный первый пептид содержит:

- (i) часть последовательности или полную последовательность, которая является идентичной или гомологичной последовательности, представленной в SEQ ID No:1; или
- (ii) часть последовательности или полную последовательность, которая является идентичной или гомологичной последовательности, представленной в SEQ ID No:2;

(B) указанный второй пептид содержит:

- (i) часть последовательности или полную последовательность, которая является идентичной или гомологичной последовательности адгезинового домена Lys-X-протеиназы бактерии *P. gingivalis*; или
- (ii) часть последовательности или полную последовательность, которая является идентичной или гомологичной последовательности адгезинового домена Lys-X-протеиназы бактерии *P. Gingivalis*; или
- (iii) часть последовательности или полную последовательность, которая является идентичной или гомологичной последовательности адгезинового домена HqA бактерии *P. gingivalis*.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение обеспечивает химерный или гибридный белок для индуцирования иммунного ответа на инфекцию *P. gingivalis*, причем указанный белок содержит первый пептид, соединенный непосредственно или с помощью линкера с полипептидом, при этом:

(A) указанный пептид содержит:

- (i) часть последовательности или полную последовательность, которая является идентичной или гомологичной последовательности, представленной SEQ ID No:1; или
- (ii) часть последовательности или полную последовательность, которая является идентичной или гомологичной последовательности, представленной в SEQ ID No:2;

и

(B) указанный полипептид содержит:

- (i) часть последовательности или полную последовательность, которая является идентичной или гомологичной последовательности адгезинового домена Lys-X-протеиназы бактерии *P. Gingivalis*; или
- (ii) часть последовательности или полную последовательность, которая является идентичной или гомологичной последовательности адгезинового домена Arg-X-

протеиназы бактерии *P. Gingivalis*; или

(iii) часть последовательности или полную последовательность, которая является идентичной или гомологичной последовательности адгезинового домена *HaqA* бактерии *P. gingivalis*.

5 Согласно другому аспекту, настоящее изобретение обеспечивает пептид для стимулирования иммунного ответа на инфекцию *P. gingivalis*, при этом пептид содержит последовательность:

(i) которая является идентичной или гомологичной одной из последовательностей, представленных в SEQ ID No: 64-66; и

10 (ii) которая является идентичной или гомологичной последовательности, представленной в SEQ ID No: 67 или 68.

Согласно одному аспекту пептид, содержащий последовательность, которая является идентичной или гомологичной одной из последовательностей, представленных в SEQ ID No: 64-68, может быть обеспечен в форме химерного или гибридного белка, в котором

15 пептид соединен непосредственно или с помощью линкера со вторым пептидом, при этом второй пептид содержит:

(i) часть последовательности или полную последовательность, которая является идентичной или гомологичной последовательности адгезивного; домена *Lys-X*-протеиназы бактерии *P. gingivalis*; или

20 (ii) часть последовательности или полную последовательность, которая является идентичной или гомологичной последовательности адгезинового домена *Arg-X*-протеиназы бактерии *P. Gingivalis*; или

(iii) часть последовательности или полную последовательность, которая является идентичной или гомологичной последовательности адгезинового домена *HaqA* бактерии

25 *P. gingivalis*.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение обеспечивает композицию, такую как антигенная композиция, в частности вакцинную композицию, содержащую химерный или гибридный белок или пептид, подробно описанный выше, возможно в комбинации со вспомогательным веществом.

30 Согласно данному аспекту настоящее изобретение также обеспечивает способ профилактики или снижения частоты или тяжести состояний или заболеваний, вызываемых инфекцией *P. gingivalis*, у субъекта, который включает введение указанному субъекту химерного или гибридного белка согласно описанию выше или композиции согласно описанию выше.

35 Согласно данному аспекту настоящее изобретение также обеспечивает применение химерного или гибридного белка согласно описанию выше или композиции согласно описанию выше в составе лекарственного средства или для приготовления лекарственного средства для профилактики или снижения частоты или тяжести состояний или заболеваний, вызываемых инфекцией *P. gingivalis*, у субъекта.

40 Согласно другому аспекту настоящее изобретение обеспечивает антитело, в частности моноклональное антитело, полученное против химерного или гибридного белка или пептида, подробно описанного выше.

Согласно данному аспекту настоящее изобретение также обеспечивает способ профилактики или снижения тяжести состояний или заболеваний, вызываемых инфекцией

45 *P. gingivalis*, у субъекта, который включает введение указанному субъекту антитела согласно описанию выше.

Согласно данному аспекту настоящее изобретение также обеспечивает применение антитела согласно описанию выше в составе лекарственного и средства или для

приготовления лекарственного средства для профилактики или снижения частоты или тяжести заболеваний или состояний, вызываемых инфекцией *P. Gingivalis*, у субъекта.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение также обеспечивает молекулу нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность нуклеотидов, кодирующую химерный или гибридный белок, как подробно описано выше, возможно, функционально соединенную с по меньшей мере одним регуляторным элементом.

Согласно данному аспекту настоящее изобретение также обеспечивает вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, а также клетку прокариот или эукариот, содержащую указанную молекулу нуклеиновой кислоты.

Согласно данному аспекту настоящее изобретение также обеспечивает способ профилактики или снижения тяжести состояний или заболеваний вызываемых инфекцией *P. Gingivalis*, у субъекта, который включает введение субъекту молекулы нуклеиновой кислоты согласно описанию выше, вектора согласно описанию выше или клетки, прокариот или эукариот согласно описанию выше.

Согласно данному аспекту настоящее изобретение также обеспечивает применение молекулы нуклеиновой кислоты согласно описанию выше, вектора согласно описанию выше или клетки прокариот или эукариот согласно описанию выше в составе лекарственного средства или для приготовления лекарственного средства для профилактики или снижения тяжести заболеваний или состояний, вызываемых инфекцией *P. Gingivalis*, у субъекта.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение обеспечивает способ диагностики или наблюдения за состоянием или заболеванием, вызываемым инфекцией *P. Gingivalis*, у субъекта, который включает применение химерного или гибридного белка согласно описанию выше для определения антител к *P. gingivalis* в образце биологического материала, полученном от указанного субъекта.

Согласно данному аспекту настоящее изобретение также обеспечивает применение химерного или гибридного белка согласно описанию выше для определения антител к *P. gingivalis* в образце биологического материала, полученном от указанного субъекта.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение обеспечивает способ диагностики или наблюдения за состоянием или заболеванием, вызываемым инфекцией *P. Gingivalis*, у субъекта, который включает применение антитела согласно описанию выше для определения присутствия *P. gingivalis* в образце биологического материала, полученном от указанного субъекта.

Согласно данному аспекту настоящее изобретение также обеспечивает применение антитела согласно описанию выше для определения присутствия *P. gingivalis* в образце биологического материала, полученном от указанного субъекта.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение обеспечивает применение пептида, содержащего часть последовательности или полную последовательность, которая является идентичной или гомологичной последовательности Lys-X или Arg-X-протеиназы бактерии *P. gingivalis*, или нуклеиновой кислоты, кодирующей указанный пептид, для получения химерного или гибридного белка для стимулирования иммунного ответа на инфекцию *P. gingivalis*. Согласно данному аспекту указанный пептид может содержать последовательность, представленную в одной из SEQ ID No: 17, 18, 25 или 26.

Краткое описание чертежей

На Фигуре 1 показаны результаты окрашивания Кумасси геля после SDS-PAGE с рекомбинантными белками Кдр. Полоса 1=KAS2-KLA1, полоса 2=KLA1, полоса 3=KsA1, полоса 4=KAS1-KsA1. Маркеры молекулярного веса указаны в кДа.

На Фигуре 2 показано распознавание антителом пептида KAS2 и убитых формальдегидом клеток *P. gingivalis* W50. (А) Пептид KAS2 исследовали в реакции с сывороткой, выработанной на убитые формалином клетки *P. gingivalis* W50 (FK-W50), рекомбинантными белками KAS1-KsA1, KAS2-KLA1, и синтетическим конъюгатом KAS2-DT и PBS методом ELISA. (В) убитые формалином клетки *P. gingivalis* W50 исследовали в реакции с сывороткой, выработанной на убитые формалином клетки *P. gingivalis* W50 (FK-W5D) рекомбинантными белками KAS1-KsA1, KAS2-KLA1, KLA1 PBS методом ELISA. Ответ антител выражали в полученном титре ELISA при OD415 за вычетом двойного фонового уровня, каждое значение титра представляет собой среднее \pm стандартное отклонение трех значений.

На Фигуре 3 показана резорбция костей моляров верхней челюсти в горизонтальной плоскости, вызванная инфекцией *P. Gingivalis*, у мышей, иммунизированных по отдельности рекомбинантными белками и рекомбинантными химерными белками, убитыми формалином клетками *P. gingivalis* и вспомогательным веществом (PBS, IFA), или неинфицированных перорально (неиммунизированных) мышей. На фигуре 3 KAS2-KLA1 изображен в виде AS2-LA1, KLA1 изображен в виде LA1, KAS1-KsA1 изображен в виде AS1-sA1, KsA1 изображен в виде sA1. Резорбцию костей выражали в квадратных миллиметрах (мм^2) от цементно-эмалевого соединения (CEJ) до гребня альвеолярной кости (ABC) щечной стороны каждого моляра верхней челюсти с левой и правой стороны челюсти. Данные имели нормальное распределение согласно критерию однородности дисперсии Левена, и представлены в виде среднего ($n=12$) в мм^2 ; их анализировали с помощью одностороннего анализа дисперсии и Т3-критерия Даннета. (* обозначает группу, в которой наблюдалась значительно ($P<0.001$) меньшая резорбция кости по сравнению с контрольной (инфицированной) группой; t обозначает группу, в которой наблюдалась значительно ($P<0,001$) большая резорбция кости по сравнению с группой AS2-LA1).

На Фигуре 4 показаны ответы подклассов антител сыворотки иммунизированных мышей в модели периодонтита. Сыворотки мышей: А (до пероральной иммунизации) и В (после пероральной иммунизации), иммунизированных рекомбинантными белками KsA1, KLA1, KAS1-KsA1 и KAS2-KLA1 и убитыми формалином клетками *P. gingivalis* штамма W50, использовали для постановки анализа ELISA с убитыми формалином *P. gingivalis* штамма W50 в качестве иммобилизованного антигена. Ответы антител IgG (черные полосы), IgG1 (серые полосы), IgG2a (белые полосы), IgG2b (полоски с горизонтальной исчерченностью), IgG3 (полоски с диагональной исчерченностью) выражали в виде полученного титра ELISA ($\log 2$) за вычетом фонового уровня, каждое значение титра представляет собой среднее \pm стандартное отклонение трех значений.

На Фигуре 5 показаны результаты анализа PEPSCAN пептид-специфичной реактивности антитела на перекрывающиеся пептиды, представляющие последовательность 433-468 пептида KAS2. (А) KAS2 перекрывающиеся пептиды (перекрывающиеся пептиды) в реакции с сыворотками KAS1-KsA1 (белые полосы), KAS2-KLA1 (черные полосы). (В) KAS2 перекрывающиеся пептиды (перекрывающиеся пептиды) в реакции с сывороткой к конъюгату KAS2-DT. Каждая полоска показывает реактивность антитела (оптическая плотность [OD] при 415 нм).

На Фигуре 6 показано, что гибрид AS2-LA1 вызывает иммунный ответ у аутбредных мышей, при котором распознаются целые клетки *P. Gingivalis* и комплекс RgpA-Kgp.CD1 аутбредных мышей иммунизировали гибридом AS2-LA1 (50 мг/мышь) и полученные сыворотки использовали для постановки анализ ELISA с AS2-LA1 (А), убитыми формалином клетками *P. gingivalis* штамма W50 (В) и комплексом RgpA-Kgp (С) в

качестве иммобилизованных антигенов. На данной Фигуре KAS2-KLA1 изображен в виде AS2-LA1. Определяли титр каждого изотипа иммуноглобулина и полученные данные выражали в виде полученного титра ELISA ('000) за вычетом двойного фонового уровня, где каждое значение титра представляет собой среднее \pm стандартное отклонение

трех значений.

На Фигуре 7 изображена модель Кдр протеиназы. KAS2 [Asn433-Lys468], (A) KAS4 [Asp388-Val395] (B), KAS5 [Asn510-Asp516] (C) и KAS6 [Ile570-Tyr580] (D).

Подробное описание изобретения

Следует понимать, что изобретение, раскрытое и определенное в данном описании, распространяется на все альтернативные комбинации двух или более отдельных признаков, упоминаемых или очевидных из текста или чертежей. Все указанные различные комбинации составляют различные альтернативные аспекты изобретения.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что участки трипсиноподобных ферментов бактерии *P. gingivalis*, которые располагаются по обе стороны или иным образом определяют каталитический или активный сайт расщепления пептидной связи, обладают большой иммуногенностью и действительно достаточны для обеспечения гуморального ответа на инфекцию *P. gingivalis*. В частности, было обнаружено, что химерный или гибридный белок, содержащий один или более подобных участков, обеспечивает защиту от разрушения альвеолярного отростка челюсти, большую, чем иммунная сыворотка, полученная против цельных клеток, и другие иммуногены. Это открытие является особенно неожиданным, т.к. до настоящего момента считали, что каталитический домен трипсиноподобных ферментов бактерии *P. gingivalis* является сравнительно слабо иммуногенным.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение обеспечивает химерный или гибридный белок для стимулирования ответа на инфекцию *P. gingivalis*, причем указанный белок содержит первый пептид, соединенный непосредственно или с помощью линкера со вторым пептидом, при этом:

(A) указанный первый пептид содержит:

(i) часть последовательности или полную последовательность, которая является идентичной или гомологичной последовательности, представленной в SEQ ID No:1; или

(ii) часть последовательности или полную последовательность, которая является идентичной или гомологичной последовательности, представленной в SEQ ID No:2; и

(B) указанный второй пептид содержит:

(i) часть последовательности или полную последовательность, которая является идентичной или гомологичной последовательности адгезинового домена Lys-X-протеиназы бактерии *P. gingivalis*; или

(ii) часть последовательности или полную последовательность, которая является идентичной или гомологичной последовательности адгезинового домена Agd-X-протеиназы бактерии *P. gingivalis*; или

(iii) часть последовательности или полную последовательность, которая является идентичной или гомологичной последовательности адгезинового домена HagA бактерии *P. gingivalis*. В настоящем описании термин «пептид» обозначает последовательность, содержащую до 40 аминокислотных остатков, предпочтительно 5-40 аминокислотных остатков.

Согласно одному варианту реализации вместо термина «второй пептид» используется термин «полипептид». Термин «полипептид» обозначает аминокислотную

последовательность, составляющую в длину по меньшей мере приблизительно 40 аминокислотных остатков.

Таким образом, согласно другому аспекту обеспечивается химерный или гибридный белок для стимулирования иммунного ответа на инфекцию *P. gingivalis*, при этом указанный белок содержит пептид, соединенный непосредственно или с помощью линкера с полипептидом, при этом:

(А) указанный пептид содержит:

(i) часть последовательности или полную последовательность, которая является идентичной или гомологичной последовательности, представленной в SEQ ID No:1;

или

(ii) часть последовательности или полную последовательность, которая является идентичной или гомологичной последовательности, представленной в SEQ ID No:2;

и

(В) указанный полипептид содержит:

(i) часть последовательности или полную последовательность, которая является идентичной или гомологичной последовательности адгезинового домена Lys-X-протеиназы бактерии *P. Gingivalis*; или

(ii) часть последовательности или полную последовательность, которая является идентичной или гомологичной последовательности адгезинового домена Агд-X-протеиназы бактерии *P. gingivalis*; или

(iii) часть последовательности или полную последовательность, которая является идентичной или гомологичной последовательности адгезинового домена HagA бактерии *P. gingivalis*.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение обеспечивает пептид для стимулирования иммунного ответа на инфекцию *P. Gingivalis*, выбранный из группы, состоящей из:

(i) последовательности, которая является идентичной или гомологичной последовательности, представленной в одной из SEQ ID No: 64-66; и

(ii) последовательности, которая является идентичной или гомологичной последовательности, представленной в SEQ ID No: 67 или 68.

Согласно одному аспекту изобретения, в котором пептид содержит последовательность SEQ ID No: 64-68, указанный пептид может быть обеспечен в виде химерного или гибридного белка, в котором пептид соединен непосредственно или с помощью линкера со вторым пептидом. Согласно этому варианту реализации второй пептид химерного или гибридного белка содержит:

(i) часть последовательности или полную последовательность, которая является идентичной или гомологичной последовательности адгезинового домена Lys-X-протеиназы бактерии *P. gingivalis*; или

(ii) часть последовательности или полную последовательность, которая является идентичной или гомологичной последовательности адгезинового домена Arg-X-протеиназы бактерии *P. gingivalis*; или

(iii) часть последовательности или полную последовательность, которая является идентичной или гомологичной последовательности адгезинового домена Hag бактерии *P. gingivalis*.

Согласно описанному выше варианту реализации термин «полипептид» используется вместо термина «второй пептид». Таким образом, согласно другому аспекту обеспечивается химерный или гибридный белок для стимулирования иммунного ответа на инфекцию *P. gingivalis*, при этом указанный белок содержит пептид, соединенный

непосредственно или с помощью линкера с полипептидом, при этом:

(А) указанный пептид содержит:

(i) последовательность, которая является идентичной или гомологичной последовательности, представленной в одной из SEQ ID No: 64-66; или

5 (ii) последовательность, которая является идентичной или гомологичной последовательности, представленной в SEQ ID No: 67 или 68; и

(В) указанный полипептид содержит:

(i) часть последовательности или полную последовательность, которая является идентичной или гомологичной последовательности адгезинового домена Lys-X-
10 протеиназы бактерии *P. gingivalis*; или

(ii) часть последовательности или полную последовательность, которая является идентичной или гомологичной последовательности адгезинового домена Arg-X-
протеиназы бактерии *P. gingivalis*; или

(iii) часть последовательности или полную последовательность, которая является
15 идентичной или гомологичной последовательности адгезинового домена HagA бактерии *P. gingivalis*.

В настоящем описании термин «гомолог» пептида или полипептида обозначает пептид или полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая является гомологичной или имеет сходство с аминокислотной последовательностью
20 указанного первого пептида или полипептида, предпочтительно по меньшей мере на 90% последовательности предпочтительно по меньшей мере на 95% последовательности более предпочтительно по меньшей мере на 98% последовательности, при сравнении методом алгоритма BLAST, при этом параметры алгоритма подбирают таким образом, чтобы получить максимальное соответствие анализируемой последовательности по
25 всей длине последовательности сравнения. Термин «сходство последовательности» обозначает точное соответствие между аминокислотами сравниваемых последовательностей. Подобные гомологи можно получать из природных вариантов или изолятов Lys-X- протеиназы или Arg-X-протеиназы *P. gingivalis*. В другом случае гомолог может представлять собой вариант пептида или полипептида Lys-X-протеиназы
30 или Arg-X-протеиназы *P. gingivalis*, имеющий «консервативную замену», в котором один или более аминокислотный остаток заменен без изменения общей конформации функции пептида или полипептида, включая, но не ограничиваясь ими, замену аминокислоты на аминокислоту с похожими свойствами. Аминокислоты с похожими свойствами известны в данной области техники. Например, полярные/гидрофильные
35 аминокислоты, которые могут быть взаимозаменяемыми, включают аспарагин, глутамин, серин, цистеин, треонин, лизин, аргинин, гистидин, аспарагиновую кислоту и глутаминовую кислоту; неполярные/гидрофобные аминокислоты, которые могут быть взаимозаменяемыми, включают глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, тирозин, фенилаланин, триптофан и метионин; кислые аминокислоты, которые могут
40 быть взаимозаменяемыми, включают аспарагиновую и глутаминовую кислоты, и основные аминокислоты, которые могут быть взаимозаменяемыми, включают гистидин, лизин и аргинин. Предпочтительно такие варианты с консервативными заменами имеют менее 20, более предпочтительно менее 15, более предпочтительно менее 10 и наиболее предпочтительно менее 5 замен аминокислот.

45 Участок трипсиноподобного фермента бактерии *P. Gingivalis*, в частности Lys-X-протеиназы (Kgp) или Arg-X-протеиназы (RgpA), который определяет сайт для расщепления пептидной связи, можно определить согласно настоящему описанию, в частности относительно Фигуры 7 и Примера 9, в которых приводится пример методики

для предсказания трехмерной конформации каталитического сайта в том виде, в котором он присутствует на *P. Gingivalis* для Lys-X протеиназы. Пример 10 обеспечивает способ моделирования трехмерной, конформации Arg-X-протеиназы.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, химерный или гибридный белок, или первая и вторая части пептида, могут быть образованы из пептидомиметика. Пептидомиметик представляет собой молекулу, которая имитирует одно или более свойство пептида, например конформацию, и которая состоит из аминокислотных остатков, некоторые из которых могут отсутствовать в природе.

Определив иммуногенные участки каталитического сайта, авторы изобретения определили последовательность различных пептидных иммуногенов, против которых может быть получен иммунный ответ. В частности, были определены следующие 6 участков, которые располагаются по обе стороны или иным образом, определяют каталитический сайт: KAS1/RAS1, KAS2/RAS2, KAS3/RAS3, KAS4/RAS4, KAS5/RAS5 и KAS6 (см. Таблицу 1). С учетом полученной информации, авторы изобретения проанализировали базы данных последовательностей белков для определения пептидов, которые имеют гомологию с аминокислотными последовательностями, которые образуют участки, расположенные по обе стороны от каталитического сайта, и поэтому представляют собой иммуногенные эпитопы, встречающиеся у *P. gingivalis*. Последовательности этих пептидов определяются структурными формулами.

Таблица 1. Последовательности, которые расположены по обе стороны от активного сайта Kgp и RgpA.

Участок	Kgp Lys - X (нумерация согласно SEQ ID No.62)	Kgp Lys - X консенсус	RgpA Arg-X (нумерация согласно SEQ ID No.61)	RgRA Arg-X консенсус
PAS1K/ PAS1R	PAS 1 K (432-453)	LNTGVSFANYT AHGSETAWAD P (SEQ ID NO: 30)	PAS1R (426-446)	FNGGISLANYTG HGSETAWGT (SEQ ID NO: 34)
KAS1/ RAS1	KAS1 (432-454)	LNTGV[G/S]FAN YTAHGSET[S/A] WADP[S/L] (SEQ ID NO: 27)	RAS1 (426-448)	FNGGISL[V/A]NY TGHGSETAWGT SH (SEQ ID NO: 31)
KAS2/ RAS2	KAS2 (433-468)	NTGV[G/S]FANY TAHGSET[S/A] WADP[S/L] [L/V]T [A/T][T/S]Q[V/L]K ALTNK[D/N]K (SEQ ID NO: 28)	RAS2 (427-462)	NGGISL[V/A]NYT GHGSETAWGTS HFGTTHVKQLTN SNQ (SEQ ID NO: 32).
KAS3/RAS3	KAS3 (436-455)	V[G/S]FANYTAH GSET[S/A] WAD P[S/L][L/V] (SEQ ID NO: 29)	RAS3 (430-449)	ISL[V/A]NYTQH© SETAWGTSHF (SEQ ID NO: 33)
KAS4/RAS4	KAS4 (388-395)	D[S/Y][Y/S]WN[P /S][K/Q] [I/V] (SEQ ID NO: 64)	RAS4 (379-386)	EGGPSADN (SEQ ID NO: 67^)
KAS5/RAS5	KAS5 (510-516)	NSYWGED (SEQ ID NO: 65)	RAS5 (508-514)	[N/D]Q[S/Y]WA[S/ P]P (SEQ ID NO: 68)
KAS6	KAS6 (570-580)	IGN[V/I]THIGAH Y (SEQ ID NO: 66)		

Авторы изобретения обнаружили, что химерные белки, содержащие указанные пептиды, можно использовать различным образом. Например, согласно настоящему описанию, некоторые из них вызывают гуморальный ответ, который обеспечивает высокую защиту при лечении или профилактике разрушения костей, которое наблюдается при периодонтите. Эти пептиды также можно применять для проведения диагностических анализов, в которых они позволяют обнаружить или наблюдать за особенностями сыворотки пациента, что позволяет определить инфицирован ли пациент и, если он инфицирован, требуется ли лечение и, если лечение было проведено, - оказалось ли оно эффективным.

Следует понимать, что участок трипсиноподобного фермента *P. gingivalis*, который определяет сайт фермента, ответственный за расщепление пептидной связи,

расположенной на С-конце от остатков Lys или Arg, не содержит полную последовательность Lys-X-протеиназы или Arg-X-протеиназы.

В настоящем описании термины «гетерологичный белок» или «химерный или гибридный белок» обозначают белок, который состоит из функциональных единиц, доменов, последовательностей или участков аминокислот, полученных из различных источников, или полученных из одного источника и собранных таким образом, что их организация отличается от организации молекулы, из которой единица, домен, последовательность или участок были получены. Общей чертой химерных или гибридных белков согласно настоящему изобретению является то, что они содержат по меньшей мере один пептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая совпадает или обладает гомологией с последовательностью трипсиноподобного фермента *P. gingivalis*, которая определяет каталитический сайт, ответственный за расщепление пептидной связи.

Согласно предпочтительному варианту реализации, если первый пептид содержит пептид из участка Kgp [432-468], он предпочтительно представляет собой (i) пептид, который содержит последовательность, выбранную из: VSFANYT и VGFANYT, более предпочтительно, последовательность, выбранную из GVSFANYT, GVGFANYT, VSFANYTA и VGFANYTA; или (i, i) пептид, который содержит последовательность, выбранную из: ETAWAD, ETSWAD, TAWADP и TSWADP, предпочтительно, последовательность, выбранную из: SETAWAO, SETSWAD, ETAWADP, ETSWADP, TAWADPL и TSWADPL, более предпочтительно, последовательность, выбранную из: GSETAWAD, GSETSWAD, SETAWADP, SETSWADP, ETAWADPL, ETSWAD PL, TAWADP LL и TSWADPLL. Более предпочтительно, данный пептид выбирают среди пептидов KAS1 [432-454]; KAS2[433-468] и KAS3[436-455], показанных в Таблице 1. В другом случае, данный пептид может представлять собой пептид PAS1K[432-453], также известный, как PAS1(K48), описанный в международной заявке на патент PCT/AU 98/00311 (WO 98/049192). Указатели последовательностей, соответствующие данным пептидам, приведены в Таблице 3.

Аналогично, согласно другому предпочтительному варианту реализации, в котором первый пептид содержит пептид из участка RgpA [426-462], данный пептид предпочтительно выбирают среди пептидов RAS1[426-448], RAS2[427-462] и RAS3[430-449], показанных в Таблице 1. В другом случае первый пептид может представлять собой пептид PAS1 R[426-446], также известный как PAS1(R45), описанный в международной заявке на патент PCT/AU 98/00311 (WO 98/049192).

В химерном или гибридном белке согласно настоящему описанию второй пептид может представлять собой пептид адгезинового домена трипсиноподобного фермента бактерии *P. gingivalis*, такого как Lys-X- протеиназа (Kgp) или Arg-X-протеиназа (RgpA) или HagA (см. Таблицу 2). В некоторых случаях указанные домены известны под названием гемагглютинины. В Lys-X-протеиназе предпочтительными доменами являются KA1, KA2, KA3, KA4, KA5, показанные в Таблице 2. В Arg-X-протеиназе предпочтительными доменами являются RA1, RA2, RA3 и RA4, показанные в Таблице 2. В HagA предпочтительными доменами являются HaqA1, HaqA1* и HaqA1**.

Таблица 2. Адгезиновые домены протеиназ Kgp и RgpA.

	A1	sA1	LA1	A2	A3	A4	A5
Kgp Lys-X протеиназа SEQ ID No. 62	KA1 (738-1099) SEQ ID NO: 35	KsA1 (759-989) SEQ ID NO:36	KLA1 (751-1056) SEQ ID NO:37	KA2 (1157-1275) SEQ ID NO:40	KA3 (1292-1424) SEQ ID NO:41	KA4 (1427-1546) SEQ ID NO:42	KA5 1 (1548-1732) SEQ ID NO: 43
RgpA Arg-X протеиназа SEQ ID	RA1 (720-1081) SEQ ID NO:38	RsA1 (831-971) SEQ ID NO:39	-	RA2 (1139-1257) SEQ ID NO: 44	RA3 (1274-1404) SEQ ID	RA4 (1432-1706) SEQ ID	-

No. 61					NO: 45	NO: 46	
HagA SEQ ID NO. 63	HagA1 (26-351) (SEQID NO: 80), HagA1* (366-625) (SEQID NO:81), HagA1** (820-1077) (SEQID NO:82) or HagA1** (1272-1529) (SEQID NO:82)						

Кроме улучшения гуморального ответа на пептид согласно настоящему изобретению, такой как KAS1, KAS2, KAS3, KAS4, KAS5 и KAS6 или RAS1, RAS2 и RAS3, RAS4 и RAS5, при условии включения совместно с пептидом в состав химерного или гибридного белка, адгезиновый домен также содержит иммуногенные эпитопы, что создает различные особенности для запуска протективного иммунного ответа. Обнаружение того, что иммуногенные эпитопы адгезинового домена сохраняются в форме, соответствующей трипсиноподобному ферменту бактерии *P. gingivalis* при обеспечении в составе химерного или гибридного белка, является неожиданным.

Следует понимать, что в данных вариантах реализации изобретения химерный или гибридный белок может содержать любой один или более пептид, выбранный среди KAS1/RAS1, KAS2/RAS2, KAS3/RAS3, KAS4/RAS4, KAS5/RAS5 и KAS6/RAS6, совместно с любым одним или более адгезиновым доменом трипсиноподобного фермента бактерии *P. gingivalis*, в частности, с любым одним или более адгезиновым доменом Lys-X-протеиназы (KA1, KA2, KA3, KA4 и KA5) или Arg-X-протеиназы (RA1, RA2, RA3 и RA4) или доменами HagA, HagA1, HagA1* и HagA1**.

Также следует иметь в виду, что адгезиновый домен не обязательно должен быть полностью доменом трипсиноподобного фермента бактерии *P. Gingivalis*. Например, адгезиновый домен может представлять собой фрагмент подобного домена, в частности, предпочтительными фрагментами являются фрагменты KsA1 и KLA1 домена A1 Lys-X-протеиназы (см. Таблицу 2). Если домен представляет собой фрагмент адгезинового домена, он обычно содержит один или более специфичный для адгезинового домена эпитоп. Указатели последовательностей, соответствующих адгезино связанным пептидам, приведены в Таблице 3.

Согласно одному варианту реализации второй пептид или полипептид содержит последовательность, представленную в одной или более из SEQ ID No: 69-79 или одной или более из SEQ ID No 83-85.

Химерный или гибридный белок согласно настоящему изобретению может содержать дополнительные пептиды, выбранные из участка Kgp [432-468]Lys-X- протеиназы, и/или один или более дополнительный пептид, выбранный из участка RgpA[426-462] Arq-X-протеиназы.

Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения химерный или гибридный белок содержит один или более из KAS1, KAS2, KAS3, KAS4, KAS5 и KAS6, или один или более из RAS1, RAS2, RAS3, RAS4 и RAS5 совместно с KsA1 или KLA1.

Таким образом, согласно некоторым вариантам реализации химерный или гибридный белок может содержать по меньшей мере один дополнительный пептид, при этом указанный дополнительный пептид содержит:

- (i) часть последовательности или полную последовательность, которая является идентичной или гомологичной последовательности, представленной SEQ ID No:1; или
- (ii) часть последовательности или полную последовательность, которая является идентичной или гомологичной последовательности, представленной в SEQ ID No:2;

или

(iii) часть последовательности или полную последовательность, которая является идентичной или гомологичной последовательности адгезинового домена Lys-X-протеиназы бактерии *P. gingivalis*, или

5 (iv) часть последовательности или полную последовательность, которая является идентичной или гомологичной последовательности адгезинового домена Arg-X-протеиназы бактерии *P. gingivalis*; или

(v) часть последовательности или полную последовательность, которая является идентичной или гомологичной последовательности адгезинового домена HqA бактерии
10 *P. gingivalis*.

Другие примеры доменов, единиц, последовательностей или участков, которые можно включать в состав химерного или гибридного белка согласно настоящему описанию, включают домены для связывания с рецепторами или лигандами, такими как связывающий участок Fc или рецепторы Fc, домены для увеличения времени
15 полураспада, такие как альбумин, или домены для облегчения экспрессии или выделения химерного или гибридного белка.

В химерных или гибридных белках согласно настоящему изобретению С-концевой остаток первого пептида может быть ковалентно связан с N-концевым остатком полипептида адгезинового домена, или N-концевой остаток первого пептида может
20 быть ковалентно связан с С-концевым остатком адгезинового домена полипептида. Согласно этому варианту реализации первый пептид и полипептид адгезинового домена обозначают термином «непосредственно соединенные» или «прилегающие».

Согласно другим вариантам реализации химерный или гибридный белок содержит линкерную последовательность для соединения первого пептида с полипептидом
25 адгезинового домена. Линкер как аминокислотный, так и не аминокислотный, может соединять пептид и полипептид. Предпочтительно, линкер не является иммуногенным. Подходящие линкеры могут содержать до 15 аминокислот в длину, однако предпочтительно содержат меньше пяти аминокислот в длину. Линкер может служить для приведения первого пептида и полипептида адгезинового домена в более близкое
30 пространственное расположение, чем характерное для трипсиноподобного фермента бактерии *P. gingivalis*. В другом случае он может разносить первый пептид и полипептид, адгезинового домена.

Химерные или гибридные белки согласно настоящему изобретению можно получить с помощью систем экспрессии рекомбинантных молекул (например, методы
35 рекомбинантной ДНК) или методом химического синтеза (например, твердофазного пептидного синтеза). Эти методы хорошо известны в данной области техники.

Гетерологичный или химерный белок является особенно перспективным, т.к. он улучшает гуморальный ответ по сравнению с ответом, вызванным при применении первого или второго пептидного компонента химерного или гибридного белка.

40 Авторы изобретения обнаружили, что химерные белки, содержащие такие пептиды, обладают множеством полезных свойств. Например, согласно настоящему описанию некоторые из них вызывают гуморальный ответ, который является высокопротективным для лечения или профилактики разрушения костей, которое наблюдается при хроническом периодонтите. Указанные пептиды также можно применять для проведения
45 диагностических анализов, в которых они позволяют определить или наблюдать за особенностями сыворотки пациента, посредством чего определяется, инфицирован ли пациент, и если он инфицирован, то требуется ли лечение или, если лечение уже проведено, является ли оно эффективным.

Согласно одному варианту реализации химерный или гибридный белок вызывает защитный иммунный ответ, который по меньшей мере снижает до минимального уровня или ограничивает разрушение соединительной ткани, вызванное инфекцией *P. gingivalis*. Согласно одному варианту реализации защитный иммунный ответ по меньшей мере

5 снижает до минимального уровня или ограничивает разрушение костей, вызванное инфекцией *P. gingivalis*. В настоящем описании обсуждается модельная система измерения разрушения кости, вызванного инфекцией *P. gingivalis*. Обычно защитный иммунный ответ преимущественно представляет собой гуморальный ответ. Согласно некоторым вариантам реализации защитный иммунный ответ также включает клеточный ответ.

10 Настоящее изобретение также обеспечивает композицию, содержащую химерный или гибридный белок, подробно описанный выше. Обычно композиция является антигенной или иммуногенной. В частности, настоящее изобретение обеспечивает композицию, подходящую для стимулирования протективного или терапевтического иммунного ответа на инфекцию *P. gingivalis*, содержащую химерный или гибридный

15 белок, дополнительно вместе с адъювантом. Такая композиция также может содержать другой компонент для модулирования или усиления иммунного ответа. Согласно одному варианту реализации композиция представлена в форме вакцины.

Известны различные вспомогательные вещества, которые можно применять вместе с вакцинами. Вспомогательные вещества позволяют посредством модулирования

20 иммунного ответа достигать выработки более надежного иммунитета при применении меньшего количества или доз антигена по сравнению с применением только вакцины. Примеры вспомогательных веществ включают неполное вспомогательное вещество Фрейнда (IFA), вспомогательное вещество 65 (содержащий арахисовое масло, моноолеат маннида и моностеарат алюминия), масляные эмульсии, вспомогательное вещество

25 Риби, ПАВ полиолы, полиамины, авридин, Quil A, сапонин, MPL, QS-21, минеральные гели такие, как соли алюминия и кальция, наночастицы такие, как гидроксипатит, фосфат кальция, соли алюминия, олигомеры Сахаров и полимеры, такие как маннан, хитозан. Другие примеры включают эмульсии «масло-в-воде», такие как SAF-1, SAF-0, MA59, Seppic ISA720, и другие аэрозольные вспомогательные вещества, такие как

30 ISCOM™ и ISCOM matrix™. Обширный, но не исчерпывающий список примеров вспомогательных веществ представлен в Cox и Coulter 1992 [In: Wong WK (ed.) Animals parasite control utilising technology. Boca Raton; CRC press, 1992; 49-112]. Помимо вспомогательного вещества, в состав композиции вакцины могут входить

фармацевтически приемлемые носители, наполнители, буферы или разбавители, по

35 мере необходимости. Одну или более дозу вакцины, содержащую вспомогательное вещество, можно вводить в профилактических или терапевтических целях для лечения развившегося периодонтита.

Согласно предпочтительному варианту реализации химерный или гибридный белок сочетают с мукозальным вспомогательным веществом и вводят перорально,

40 трансбуккально или назально. К примерам мукозальных вспомогательных веществ относятся наночастицы, холерный токсин и термолабильный токсин *E. coli*, нетоксичные В-субъединицы указанных токсинов, мутантные формы данных токсинов, которые имеют пониженную токсичность. Другие методы, которые можно применять для доставки антигенных белков перорально/трансбуккально/назально, включают

45 встраивание белка в или абсорбцию белка на частицах биodeградируемого полимера (например, акрилатах или полиэфирах) методом микроинкапсулирования для улучшения поглощения микросфер из желудочно-кишечного тракта или других слизистых оболочек и для защиты белков от распада. Липосомы, ISCOM™, гидрогели представляют собой

примеры возможных методов, которые можно улучшить с помощью включения направляющих молекул, таких как ЛТВJ СТВ, или пектинов для доставки антигенных белков к иммунной системе слизистых оболочек. Кроме антигенных, белков и мукозального вспомогательного вещества или системы доставки, в состав вакцины могут входить традиционные фармацевтически приемлемые носители, наполнители, оболочки, дисперсионные среды, антибактериальные или противогрибковые агенты и буферы или разбавители, при необходимости.

Согласно данному аспекту настоящее изобретение также обеспечивает способ профилактики или снижения частоты возникновения или тяжести состояния или заболевания, вызываемого инфекцией *P. Gingivalis*, у субъекта, который включает введение указанному субъекту химерного или гибридного белка, согласно описанию выше, или композиции согласно описанию выше. Субъект может представлять собой человека или другое животное, и предпочтительно является человеком.

Обычно состояние или заболевание, вызываемое инфекцией *P. gingivalis*, представляет собой хронический периодонтит, однако также оно может представлять собой разрушение костей, в частности, разрушение костей альвеолярного отростка или болезнь коронарных артерий.

Известно множество способов введения вакцинной композиции человеку или животному, включающее, но не ограничивающееся указанными, чрескожный, внутримышечный, внутривнутренний, внутривенный, подкожный, интраназальный, подъязычный, трансбуккальный и пероральный способ введения. Указанные способы введения особенно полезны для вакцинации.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение обеспечивает антитело, предпочтительно моноклональное антитело, полученное против химерного или гибридного белка согласно подробному описанию выше.

Указанные антитела можно получать стандартными способами и применять для пассивной иммунизации субъекта. Соответственно, согласно данному аспекту настоящее изобретение также обеспечивает способ профилактики или снижения тяжести состояния или заболевания, вызываемого *P. gingivalis*, у пациента, который включает введение пациенту антитела согласно описанию выше.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение обеспечивает молекулу нуклеиновой кислоты, включающую нуклеотидную последовательность, кодирующую химерный или гибридный белок согласно подробному описанию выше, дополнительно функционально соединенную по меньшей мере с одним регуляторным элементом.

Согласно одному варианту реализации нуклеиновая кислота обеспечивается в выделенном или существенно очищенном виде.

Молекула нуклеиновой кислоты может быть, например, встроена в соответствующий вектор экспрессии для продукции химерного белка в виде рекомбинантного белка посредством введения вектора в прокариотическую или эукариотическую клетку - хозяина. Для успешной экспрессии рекомбинантного вектора необходимо, чтобы вектор экспрессии содержал регуляторные элементы транскрипции и трансляции, совместимые и распознаваемые конкретной клеткой-хозяином, используемой для экспрессии. Для экспрессии рекомбинантного белка можно использовать различные типы клеток-хозяев, которые включают, но не ограничиваются указанными, бактерии, трансформированные вектором на основе бактериофага, плазмидой и космидой; дрожжи, содержащие вектор дрожжей, грибы, содержащие векторы на основе грибов; линии клеток насекомых, инфицированные вирусом (например, бакловирусом), и линии клеток млекопитающих, трансфицированные векторами экспрессии на основе плазмид или вирусов, или

инфицированные рекомбинантным вирусом (например, вирусом коровьей оспы, аденовирусом, аденоассоциированным вирусом, ретровирусом и т.д.).

Способами, известными в области молекулярной биологии, в вектор экспрессии можно вводить различные промоторы и энхансеры для повышения экспрессии рекомбинантного белка, при условии, что повышенная экспрессия аминокислотных последовательностей совместима (например, нетоксична) с конкретной используемой клеткой-хозяином.

Выбор промотора зависит от используемой системы экспрессии. Промоторы различаются по силе, т.е. способности усиливать транскрипцию. Обычно желательно использовать сильный промотор для достижения высокой уровня транскрипции кодирующей нуклеотидной последовательности экспрессии рекомбинантного белка. Например, известные в данной области техники промоторы бактерий, фагов или плазмид, при наличии которых наблюдали высокий уровень транскрипции в системе клетки-хозяина, включая *E. Coli*, включают промотор *lac*-оперона, *trp*-оперона, промотор *gcsA*, промотор *pRNK*, промоторы P_R и P_L , *lacUV5*, *ompF*, *bla*, *lpp* и т.п., и их можно использовать для обеспечения транскрипции встроенной нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотные последовательности.

Другие регуляторные элементы эффективной транскрипции или трансляции включают энхансеры и регуляторные сигналы. Последовательности-энхансеры являются элементами ДНК, которые, по-видимому, увеличивают эффективность транскрипции сравнительно независимо от расположения и ориентации относительно ближайшей кодирующей нуклеотидной последовательности. Таким образом, в зависимости от используемой системы вектора экспрессии клетки-хозяина энхансер может располагаться в прямом или обратном направлении относительно встроенных кодирующих последовательностей для усиления эффективности транскрипции. Для регуляции экспрессии кодирующей последовательности можно использовать другие регуляторные последовательности, например, сигналы инициации транскрипции или трансляции.

Согласно другому варианту реализации вектор может представлять собой вирусный или бактериальный вакцинный вектор и может применяться для обеспечения рекомбинантной вирусной вакцины, рекомбинантной бактериальной вакцины, рекомбинантной аттенуированной бактериальной вакцины или инактивированной рекомбинантной вирусной вакцины. Вирус коровьей оспы является наиболее известным примером инфекционного вируса в данной области техники, который был изменен методами инженерии таким образом, что способен экспрессировать вакцинные антигены, полученные от других организмов. Рекомбинантный живой вирус коровьей оспы, который ослаблен или иным образом обработан так, что не вызывает заболевание сам по себе, используют для иммунизации хозяина. Последующая репликация рекомбинантного вируса в организме хозяина обеспечивает постоянную стимуляцию иммунной системы антигенами вакцины, с помощью чего обеспечивается длительный иммунитет.

Другие живые вакцинные векторы включают: аденовирус цитомегаловирус и, предпочтительно, поксвирусы, такие как вирус коровьей оспы [Paoletti and Panicali, US Patent No. 4603112] и аттенуированные штаммы *Salmonella* [Stocker et al., патент США 5210035; 4837151; и 4735801; и Curtiss et al., 1988, Vaccine 6:155-160]. Живые вакцины являются особенно предпочтительными, т.к. они постоянно стимулируют иммунную систему, что может обеспечивать очень длительный иммунитет. Если иммунный ответ является защитным в отношении последующей инфекции *P. gingivalis*, саму живую вакцину можно использовать в профилактической вакцине против инфекции *P. gingivalis*.

В частности, живая вакцина может быть создана на основе комменсальной бактерии ротовой полости. Эту бактерию можно трансформировать вектором, несущим рекомбинантный химерный белок, и затем ее можно применять для заселения ротовой полости, в частности слизистой оболочки ротовой полости. После колонизации бактерией слизистой оболочки ротовой полости экспрессия рекомбинантного белка будет стимулировать выработку нейтрализующих антител лимфоидной тканью слизистой. Для дополнительной иллюстрации настоящего варианта реализации нуклеотидные последовательности, кодирующие химерные белки, с помощью методов молекулярной биологии, известных в данной области техники, можно вставить в геномную ДНК вакцинного вируса в сайт, который способствует экспрессии эпитопов, но не оказывает отрицательного действия на рост или репликацию вектора на основе вакцинного вируса. Полученный рекомбинантный вирус можно использовать в качестве иммуногена в составе вакцины. Аналогичные методы можно использовать для создания лекарственной формы инаktivированной рекомбинантной вирусной вакцины, кроме тех случаев, когда рекомбинантный вирус инаktivирован химическими методами, известными в данной области техники, перед использованием в качестве иммуногена и без существенного влияния на иммуногенность экспрессированного иммуногена. Инаktivированные рекомбинантные вакцины можно приготовить с включением соответствующего вспомогательного вещества для усиления иммунного ответа на антигены вакцины.

Настоящее изобретение также обеспечивает применение молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность нуклеотидов, кодирующую химерный или гибридный белок согласно изобретению непосредственно в виде лекарственной формы вакцины. Нуклеотидные последовательности, кодирующие химерные белки, функционально соединенные с одним или более регуляторным элементом, можно вводить непосредственно для вакцинации пациента («направленный перенос генов») против патогенных штаммов *P. gingivalis*. Направленный перенос генов прививаемому пациенту, приводящий к экспрессии генетического материала в клетках привитого пациента, таких как клетки эндотелия, а также ткани крупных органов, был показан с помощью методов, известных в данной области техники, таких как внутривенная инъекция экспрессирующих плазмид: комплекс катионных липосом [Zhu et al., 1993, Science 261:209-211]. Другие эффективные способы доставки векторной ДНК в клетки-мишени известны в данной области техники. В одном примере очищенную рекомбинантную плазмидную ДНК, содержащую вирусные гены, использовали для введения парентерально, мукозально или методом генной пушки) в вакцину для стимулирования защитного иммунного ответа [Fynan et al., 1993, Proc Natl Acad Sci USA 90:11478-11482]. В другом примере клетки, полученные от пациента, можно трансфицировать или можно провести электропорацию стандартными методами, известными в данной области техники, что приводит к проникновению ДНК рекомбинантного вектора внутрь клетки-мишени. Клетки, содержащие ДНК рекомбинантного вектора, можно отобрать с помощью методов, известных в данной области техники, например, путем включения маркера селекции в вектор, и отобранные клетки можно вернуть в организм пациента для экспрессии рекомбинантного белка.

Согласно данному аспекту настоящее изобретение также обеспечивает способ профилактики или снижения частоты или тяжести состояния или заболевания, вызываемого инфекцией *P. gingivalis*, у субъекта, который включает введение субъекту молекулы нуклеиновой кислоты, согласно описанию выше, вектора согласно описанию выше, или клетки прокариота или эукариота согласно описанию выше.

Согласно другим вариантам реализации предложена фармацевтическая композиция, содержащая химерный или гибридный белок или антитело согласно описанию выше. Указанная композиция может дополнительно содержать разбавитель, наполнитель, носитель или химиотерапевтический агент для лечения состояния или заболевания, вызываемого инфекцией *P. gingivalis*, и может быть адаптирована для перорального введения. Композицию согласно настоящему заболеванию можно включить в состав пастилок или жевательных резинок и других продуктов, например, путем примешивания к теплой основе жевательной резинки или покрытия наружной поверхности основы жевательной резинки, примерами которых являются джелутонг, латекс, винилитовые смолы и т.д., желательно с традиционными пластификаторами или смягчителями, сахаром или другими подсластителями, такими как глюкоза, сорбит и т.п.

Пероральную композицию согласно настоящему изобретению, которая содержит перечисленные выше компоненты, можно приготовить и применять в различных формах, подходящих для перорального введения, таких как средства для ухода за зубами, включая зубные порошки и зубные эликсиры, ополаскиватели для полости рта, пастилки, жевательные резинки, пасты, крем для массажа десен, молочные продукты и другие продукты питания. Пероральная композиция согласно настоящему изобретению может дополнительно включать известные ингредиенты в зависимости от типа и формы конкретной пероральной композиции.

Согласно некоторым предпочтительным формам изобретения пероральная композиция, по существу, может представлять собой жидкость, например ополаскиватель для полости рта. В таких лекарственных средствах носитель обычно представляет собой водно-спиртовую смесь, желательно содержащую увлажняющий компонент согласно описанию ниже. Обычно отношение по массе воды к спирту находится в интервале приблизительно от 1:1 приблизительно до 20:1. Общее количество смеси водно-спиртовой смеси в лекарственных средствах такого типа находится в пределах приблизительно, от 70 приблизительно до 99,9% по весу лекарственной формы. Спирт обычно представляет собой этанол или изопропанол, предпочтительно этанол.

рН таких жидких и других лекарственных форм согласно настоящему изобретению обычно находится в пределах от приблизительно 5 до приблизительно 9 и в основном от приблизительно 5.0 до приблизительно 7.0. Значение рН можно регулировать добавлением кислоты (например, лимонной или бензойной кислоты) или основания (например, гидроксида натрия) или буфера (например, цитрата, бензоата, карбоната или бикарбоната натрия, динатрийгидрофосфата, натрийгидрофосфата и т.п.).

В случае других желательных форм согласно настоящему изобретению фармацевтическая композиция может представлять собой, по существу, твердое вещество или пасту, например, зубной порошок, пастилку или зубную пасту (зубной крем) или гелеобразную зубную пасту. Носитель в таких твердых или пастообразных пероральных лекарственных формах обычно содержит приемлемый для зубов полирующий материал.

В зубной пасте жидкий носитель может содержать воду и увлажняющий компонент в количестве в пределах приблизительно от 10% до приблизительно 80% по весу лекарственной формы. Примерами соответствующих увлажняющих компонентов/носителей являются глицерин, пропиленгликоль, сорбитол и полипропиленгликоль. Также предпочтительными являются жидкие смеси воды глицерина и сорбитола. В прозрачных гелях, в которых важным показателем является коэффициент преломления, предпочтительно используется приблизительно 2.5-30% по весу воды, приблизительно 70% по весу глицерина и приблизительно 20-80% по весу сорбитола.

Зубные пасты, кремы и гели обычно содержат натуральный или синтетический

загуститель или гелеобразующее средство в количестве приблизительно от 0.1 приблизительно до 10, предпочтительно приблизительно от 0.5 до приблизительно 5% по весу. Приемлемым загустителем является синтетический гекторит, синтетическая коллоидная глина, представляющая собой комплекс силиката магния и щелочного металла, известная под названием Лапонит (например, CP, SP 2002, D) выпускаемая фирмой Laporte, Industrie Limited. Лапонит D содержит по весу приблизительно 58,00% по весу приблизительно 58,00% по весу SiO_2 , 25.40% по весу, MgO 3.05% по весу Na_2O , 0.98% по весу Li_2O , немного воды и металлы в следовых количествах. Его истинный удельный вес составляет 2.53, а кажущаяся объемная плотность равна 1.0 г/мл при 8% влажности.

Другие приемлемые загустители включают ирландский мох, йота-каррагинан, трагантовую камедь, крахмал, поливинилпирролидон, гидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу (например, доступную под названием Натразол), натрийкарбоксиметилцеллюлозу и коллоидный диоксид кремния, такую как мелкоизмельченный Силоид (например, Силоид 244)). Также можно включать солибилизаторы, такие как увлажняющий полиолы, например, пропиленгликоль, дипропиленгликоль и гексиленгликоль, целлозольвы, такие как метилцеллозольв и этилцеллозольв, растительные масла и воска, содержащие по меньшей мере 12 атомов углерода в прямой цепи, такие как оливковое масло, касторовое масло и петролатум, а также сложные эфиры, такие как амилацетат, этилацетат и бензилбензоат.

Необходимо указать, что, как обычно, пероральные препараты должны продаваться или иным путем распространяться в упаковках с соответствующими этикетками. Так, сосуд со средством для ополаскивания рта должен иметь этикетку, характеризующую средство по составу, способу применения для ополаскивания или промывания рта, а зубная паста, крем или гель должны содержаться в сминаемых тюбиках обычно из алюминия, свинца с покрытием или пластика или содержаться в сдавливаемых, закачаных или находящихся под давлением диспергаторах, отмеряющих содержимое и имеющих этикетки, характеризующие компонентный состав зубной пасты, геля или зубного крема.

Органические поверхностно-активные вещества применяют в композициях настоящего изобретения для достижения повышенного профилактического действия, для содействия полному распределению в полости рта активного агента, а также для того, чтобы сделать настоящие композиции более косметически приемлемыми. Органические поверхностно-активные вещества по своей природе предпочтительно являются анионными, неионными или амфолитными и предпочтительно не взаимодействуют с активным агентом. В качестве поверхностно-активного вещества рекомендуется применять детергенты, придающие композиции очищающие и пенообразующие свойства. Подходящие примеры анионных поверхностно-активных веществ включают водорастворимые (соли моносulfатов моноглицеридов высших жирных кислот, таких как натриевая соль моносulfированного моноглицерида жирных кислот гидрированного кокосового масла, высших алкилсulfатов, таких как натрийлаурилсulfат, алкиларилсulfонатов, таких как найтридодецилбензолсulfонат, высших алкилсulfоацетатов, эфиров высших жирных кислот с 1,2 дигидроксипропансulfонатом и насыщенных высших алифатических ациламидов низших алифатических аминокарбоновых кислот, таких как содержащие 12-16 атомов углерода в жирнокислом, алкильном или ацильном радикале, и т.п. Примерами указанных последними амидов являются N-лауроилсаркозин, а также

натриевые, калиевые и этаноламиновые соли N-лауроил-, N-миристоил или N-пальмитоилсаркозина, которые не должны содержать мыла или аналогичных производных высших жирных кислот. Примерами подходящих для применения

водорастворимых неионных поверхностно-активных веществ являются продукты конденсации окиси этилена с различными вступающими в реакцию с ней соединениями, имеющими длинные гидрофобные (например, алифатические цепи приблизительно с 12-20 атомами углерода), и такие продукты конденсации ("этоксамеры") содержат гидрофильные полиоксиэтиленовые фрагменты, в их числе продукты конденсации полиэтиленоксида с жирными кислотами, жирными спиртами, жирными амидами, многоатомными спиртами (например, моностеарат сорбита) и полипропиленоксидом (например, плуроновые вещества).

Поверхностно-активное вещество обычно присутствует в количестве 0,1-5% по весу. Необходимо отметить, что поверхностно-активные вещества способствуют растворению активного агента согласно настоящему изобретению и, тем самым, уменьшают необходимые количества солюбилизующего увлажнителя.

В пероральные препараты настоящего изобретения могут быть введены и различные другие вещества, такие как осветители, консерванты, силиконы, хлорофильные соединения и/или аммонийсодержащие соединения, например, мочевины, диаммонийфосфат и их смеси. Такие вспомогательные вещества в случае их присутствия вводят в препараты в количествах, не оказывающих нежелательного влияния на желаемые свойства и показатели. Необходимо избегать присутствия значительных количеств солей цинка, магния и других металлов, обычно растворимых, способных образовывать комплексы с активными компонентами настоящего изобретения.

Также могут быть использованы любые приемлемые ароматизирующие и подслащающие вещества. Примеры приемлемых ароматизирующих компонентов включают ароматизирующие масла, например масло из кудрявой мяты, перечной мяты, винтегреное масло, сассофрасовое масло, гвоздичное масло, шалфейное масло, эвкалиптовое масло, майорановое масло, коричное масло, лимонное масло и апельсиновое масло, а также метилсалицилат. Приемлемые подслащающие вещества включают сахарозу, лактозу, мальтозу, сорбит, ксилит, цикламат натрия, периллартин аспаратилфенилаланина (амф), сахарин и т.п. Желательно чтобы ароматизирующие и подслащающие вещества по отдельности или вместе присутствовали в количестве от 0,1% до 5% или более на препарат.

Композиции для перорального введения можно приготовить любыми способами, известными в области изготовления фармацевтических композиций, при этом такие композиции могут содержать один или более агентов, выбранных из группы, состоящей из ароматизирующих и подслащающих средств, красителей и консервантов, для обеспечения фармацевтически удачных и приятных на вкус лекарственных средств. Таблетки содержат активные ингредиенты с примесью нетоксичных фармацевтически приемлемых наполнителей, которые подходят для изготовления таблеток. Такие наполнители могут представлять собой, например, инертные разбавители, такие как карбонат кальция, бикарбонат натрия, лактозу, фосфат кальция или натрия гранулирующие агенты и разрыхлители, например кукурузный крахмал или альгинатную кислоту; связывающие агенты, например желатин или акацию, и смазывающие агенты, например стеарат магния, стеариновую кислоту или тальк. Таблетки могут быть не покрыты оболочкой или быть покрыты с помощью известных методов для задержки распада и всасывания в желудочно-кишечном тракте или периодонтальном кармане, посредством чего обеспечивается постоянное действие в течение долгого времени.

Например, можно использовать материалы, задерживающие распад, такие как моностеарат глицерил или дистеарат глицерина.

Лекарственные формы для перорального введения также могут быть представлены в виде желатиновых капсул, в которых активный ингредиент смешан с инертным твердым разбавителем, например, карбонатом кальция, фосфатом кальция или каолином, или в форме мягких желатиновых капсул, в которых активный компонент смешан с водой или маслом, например арахисовым маслом или оливковым маслом.

Водные суспензии содержат активные материалы в смеси с наполнителями, подходящими для получения водных суспензий. Такие наполнители представляют собой суспендирующие агенты, например, арбоксиметилцеллюлозу натрия, метилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, альгинат натрия, поливинилпирролидон, трагакантовую камедь и камедь акации; диспергирующие или увлажняющие агенты могут представлять собой природные фосфатиды, например, лецитин или продукты конденсации оксидов алкиленов и жирных кислот, например, полиоксиэтилена стеарат, или продукты конденсации оксида этилена с длинноцепочечными алифатическими спиртами, например, гептадекаэтиленоксидетанол, или продукты конденсации оксида этилена с частичными сложными эфирами жирных кислот и гекситола, такие как полиоксиэтилен сорбитола моноолеат, или продукты конденсации оксида этилена с частичными сложными эфирами жирных кислот и ангидридов гекситола, например полиэтилен сорбитана моноолеат.

Водные суспензии могут содержать один или более консервантов или противомикробные агенты, например бензоаты, такие как этил- или н-пропил-п-гидроксibenзоат, другой пример - хлоргексидин глюконат, один или более красителей, один или более ароматизаторов, один или более подсластителей, таких как сахароза или сахарин.

Масляные суспензии можно приготовить посредством растворения активных ингредиентов в растительном масле, например арахисовом масле, оливковом масле, кунжутном масле или кокосовом масле, или в минеральных маслах, таких как жидкий парафин. Масляные суспензии могут содержать загуститель, например пчелиный воск, твердый парафин или цетиловый спирт. Подсластителями могут быть упомянутые выше агенты, при этом для получения приятных на вкус пероральных лекарственных средств можно добавлять ароматизаторы. Указанные композиции можно консервировать посредством добавления антиоксиданта, такого как аскорбиновая кислота.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение обеспечивает способ диагностики или наблюдения за состоянием или заболеванием, вызываемые инфекцией *P. gingivalis*, у субъекта, который включает применение химерного или гибридного белка согласно описанию выше для определения антител к *P. gingivalis* в образце биологического материала, полученного от субъекта.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение обеспечивает способ диагностики или наблюдения за состоянием или заболеванием, вызываемым инфекцией *P. gingivalis*, у субъекта, который включает применение антитела согласно описанию выше для определения наличия *P. gingivalis* в образце биологического материала, полученного от субъекта.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение обеспечивает пептид для стимулирования иммунного ответа на *P. gingivallis*, содержащий последовательность, представленную в одной из: SEQ ID No: 17, 18, 25 и 26. Согласно одному варианту реализации пептид содержит последовательность, гомологичную одной из: SEQ ID No:

17, 18, 25 и 26. Пептид может содержать в длину 5-40 аминокислот.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение обеспечивает нуклеиновую кислоту, кодирующую пептид, содержащий последовательность, представленную в одной из: SEQ ID No: 17, 18, 25 и 26.

5 Согласно другому аспекту настоящее изобретение обеспечивает применение пептида, содержащего последовательность, представленную в одной из: SEQ ID No: 17, 18, 25 и 26, или нуклеиновую кислоту, кодирующую пептид, содержащий последовательность, представленную в одной из: SBQ ID No: 17, 18, 25 и 26, для получения химерного или гибридного белка для стимулирования иммунного ответа на инфекцию *P. gingivalis*.

10 Согласно другому аспекту настоящее изобретение обеспечивает применение пептида, содержащего последовательность, представленную в одной из: SEQ ID No: 17, 18, 25 и 26, или нуклеиновую кислоту, кодирующую пептид, содержащий последовательность, представленную в одной из: SEQ ID No: 17, 18, 25 и 26, для стимулирования иммунного ответа на инфекцию *P. gingivalis*. Согласно одному варианту реализации пептид вводят
15 одновременно или последовательно с пептидом, содержащим:

(i) часть последовательности или полную последовательность, которая является идентичной или гомологичной последовательности адгезинового домена Lys-X-протеиназы бактерии *P. gingivalis*; или

(ii) часть последовательности или полную последовательность, которая является
20 идентичной или гомологичной последовательности адгезинового домена Arg-X-протеиназы бактерии *P. gingivalis*; или

(iii) часть последовательности или полную последовательность, которая является идентичной или гомологичной последовательности адгезинового домена HagA бактерии *P. gingivalis*.

25 Таблица 3

SEQID NO:	Аминокислотная последовательность	Фрагмент
1	LNTGV[G/S]FANYTAHGSET[S/A]WADP[S/L][L/V]T[An][T/S]Q[V /L]KALTNK[D/N]K	Kgp[432-468]
2	FNGGISL[V/A]NYTGHGSETAWGTSHFGTTHVKQLTNSNQ	RgpA[426-4621]
3	VSFANYT	
30 4	VGfANYT	
5	GVSFANYT	
6	GVGFANYT	
7	VSFANYTA	
8	VGfANYTA	
9	ETAWAD	
35 10	ETSWAD	
11	TAWADP	
12	TSWADP	
13	SETAWAD	
14	SETSWAD	
15	ETAWADP	
40 16	ETSWADP	
17	TAWADPL	
18	TSWADPL	
19	G SETAWAD	
20	GSETSWAD	
21	SETAWADP	
45 22	SETSWADP	
23	ETAWADPL	
24	ETSWADPL	
25	TAWADPLL	
26	TSWADPLL	

27	LNTGV[G/S]FANYTAHGSET[S/A]WADP[S/L]	KAS1
28	NTGV[G/S]FANYTAHGSET[S/A]WADP[S/L][UV]T[A/T][T/S]Q[V/L]KALTNK[D/N]K	KAS2
29	V[G/S]FANYTAHGSET[S/A]WADP[S/L][L/V]	KAS3
30	LNTGVSFANYTAHGSETAWADP	PAS1K
31	FNGGISL[V/A]NYTGHGSETAWGTSH	RAS1
32	NGGISL[V/A]NYTGHGSETAWGTSHFGTTHVKQLTNSNQ	RAS2
33	ISL[V/A]NYTGHGSETAWGTSHF	RAS3
34	FNGGISLANYTGHGSETAWGT	PAS1R
35	ANEAKWLAADNVWGDNTGYQFLLDADHNTFGSVIPATGPLFT GTASSNLYSANFEYLIPAN ADPVVTTQNIIVTGQGEWIPGGVY DYCITNPEPASGKMWIAGDGGNQPARYDDFTFEAGKK YTFTM RRAGMGDGTDMEDDDSPASYTYTVYRDGTIKEGLTATTFE EDGVAAGNHEYC VEVKYTAGVSPKVCCKDVTVEGSNEFAPVQN LTGSSVGQKVTLKWDAPNGTPNPNPNPNPN PGTTLSESFENG IPASWKTIDADGDGHGWKPGNAPGIAGYNSNGCVYSESEFLG GIGVLTDP NYLITPALDLPNGGKLTFWVCAQDANYASEHYAVY ASSTGNDASNFTNALLEETITA	KA1
36	FLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPANADP VVTTQNIIVTGQGEVVIPGG VYDYCITNPEPASGKMWIAGDGG NQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGDGTDMEDD DSPAS YTYTVYRDGTIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYCVEVKYTAGV	KsA1

37	SPKVCCKDVTVEGSNEFAPVQNLTGSSVGQKVTLKWDAPNGTP NPNPNPNPNPGTTLSESF WGDNTGYQFLLDADHNTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFE YLIPANADPWTTQNIIVT GQGEVVIPGGVYDYCITNPEPASGK MWIAGDGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGM GDGTDM EVEDDSPAASYTYTVYRDGTIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYC VEVKYTAGV SPKVCCKDVTVEGSNEFAPVQNLTGSSVGQKVTL KWDAPNGTPNPNPNPNPNPGTTLSESF ENGIPASWKTIDADGDGHGyVKPGNAPGIAGYNSNGCVYSESEFLGGIGVLTDPDNYLI7 PALDLPNGG	KLA1
38	SGQAEIVLEAHDVWNDGSGYQILLDADHDQYGQVIPS DHTL WPNCVSPANLFAFHEYTV PENADPSCSPTNMIMDGTASVNIPA GTYDFAIAAPQANAKIWIAGQGPTKEDDYVFEAGK KYHFLMKK MSGDGTTELTISEGGGSDYTYTVYRDGTIKEGLTATTFEEDG VATGNHEY CVEVKYTAGVSPKVCCKDVTVEGSNEFAPVQNLTG SAVGQKVTLKWDAPNGTPNPNPNPN PNPNPGTTTTLSESFENG IPASWKTIDADGDGHGWKPGNAPGIAGYNSNGCVYSESEFLG G IGVLTDPDNYLITPALDLPNGGKLTFWVCAQDANYASEHYAVY ASSTGNDASNFTNALLEE TITA	RA1
39	DDYVFEAGKKYHFLMKKMSGDGTTELTISEGGGSDYTYTVYR DGTIKEGLTATTFEED GVATGNHEYCVEVKYTAGVSPKVCCKD VTVEGSNEFAPVQNLTGSAVGQKVTLKWDAPN GTPNPNPNPNPNPNPGTTTTLSESF	RsA1
40	ADFTETFESSTHGEAPAEWTTIDADGDGQGWLCLSSGQLDWL TAHGGSNWSSFSWNGM ALNPDNYLISKDVTGATKVKYYYAV NDGFPCDHYAVMISKGTGNAGDFTWFEETPNGIN „L”,-	KA2
41	RQSWYIERTVDLPAGTKYVAFRHYNCSLDNYILLDDIUFTMGGi SPTPTDYTYTVYRDGTK IKEGLTETTTFEEDGVATGNILEYCV EV KYTAGVSPKKCVNVTVNSTQFNPVQNLTAEQAP NSMDAILKW NAPAS	KA3
42	AEVLNEDFENGIPASWKTIDADGDGNNWTTTPPPGGSSFAGH NSAICVSSASYINFEGPQN PDNYLVTPELSLPGGGTLTFWVCA QDANYASEHYAVYASSTGNDASNANALLEEVLT A	KA4
43	TWTAPEAIRGTRAQGTWYQKTVQLPAGTKYVAFRHFGCTDF FWINLDDWITSGNAPS Y YTIYRNNTQIASGVTETTYRDPDLA TGFYTYGVKWYPNGESAIETATL NITSLADVTAQKP YTLTWG KTTITVTCQGEAMIYDMNGRRLAAGRNTWYTAQGGHYAVMW VDGKSYVEKLAVK	KA5
44	ADFTETFESSTHGEAPAEWTTIDADGDGQGWLCLSSGQLDWL TAHGGTNWSSFSWNGM ALNPDNYLISKDVTGATKVKYYYAV NDGFPGDHYAVMISKGTGNAGDFTWFEETPNGIN	RA2
45	PQSVWIERTVDLPAGTKYVAFRHYNCSLDNYILLDDIQFTMG SPTPTDYTYTVYRDGTK IKEGLTETTTFEEDGVATGNHEYCVEV KYJAGYSPKKCVNVTVNSTQFNPVKNLKAQPDGG DVVLKWEA PSA	RA3
46	ANEAKVVLAADNVWGDNTGYQFLLDADHNTFGSVIPATGPLFT GTASSDLYSANFESLIP ANADPVVTTQNIIVTGQGEVVIPGGVY DYCITNPEPASGKMWIAGDGGNQPARYDDFTFE AGKKYTFTM RRAGMGDGTDMEDDDSPAASYTYTVYRDGTIKEGLTETTYR DAGMSAQ SHEYCVEVKYTAGVSPKVCVDYIPDGVADVTAQKP YTLTWGKTTITVTCQGEAMIYDMNG RRLAAGRNTWYTAQGG YYAVMWVDGKSYVEKLAIK	RA4

SEQ ID NO:	Нуклеотидная последовательность	
47	GACCATGGCTCATCACCATCACCATCACAATACCGGAGT CAGCTTTGCA	KAS2-прямой
48	GACTCGAGTTATTTGTCCTTATTAGTGAGTGCTTTC,	KAS2-обратный,
49	GACCATGGCTTGGGGAGACAATACGGGTTAC	KLA1- прямой
50	GACTCGAGACCTCCGTTAGGCAAATCC	KLA1-обратный
51	CCGTATTGTCCTCCCCATTTGTCCTTATTAGTGAGTGCTTT C	KAS2-KLA1-обрат- ный
52	CACTAATAAGGACAAATGGGGAGACAATACGGGTTAC	KAS2-KLA1-пря- мой
53	CATGGATCTGAGACCGCATGGGCTGATCCACTTTTCTTG TTGGATGCCGAT	KAS1-KsA1-пря- мой1

54	CCATGGCTTTGAATACCGGAGTCAGCTTTGCAAACCTATAC AGCGCATGGATCTGAG ACCGCA	KAS1-KSA1-пря- мой2
55	CTCGAGGAATGATTCGGAAAGTGTT	KAS1-KsA1-обрат- ный
56	CCATGGCTGATTATAGCTGGAATTCAGGTAGTCAGCT TTGCAAACCTATACA	Мульти-прямой1
57	CTTTGCAAACCTATACAGCGCATGGATCTGAGACCGCATG GGCTGATCCACTT	Мульти-прямой2
58	ATGGGCTGATCCACTTCTGAATTCATTATGGGGCGAGAT CGGCAATATTACC	Мульти-прямой3
59	GATCGGCAATATTACCATATTGGTGCTCATTACGCTTGG GGAGACAATACG	Мульти-прямой4
60	CTCGAGACCTCCGTTAGGCAATCCAATGCCGGTGTTAT CAGATAGTTGTCA	Мульти-обратный

SEQID NO:	Аминокислотная последовательность	Полная длина
10	MKNLNKFVSIALCSSLLGGMAFAQQTELGRNPNVRLLESTQQ SVTKVQFRMDNLKFTEVQTPK GIGQVPTYTEGVNLSEKG.MPTLPILSRSLAVSDTREMKEVEVSSKF^EKKNV.LIAPSKGMIMRNB DPKKIPYVYGKTYSQNKFFPGEIATLDDPFILRDVRGpyVNFAl PLQYNPVTKTLRIYTEITVAVSE TSEQGKNILNKKGTFFAGFEDT YKRMFMNYPGRYTPVEEKQNGRMIVIVAKKYEGLDKDFVDW KNQRGLRTEVKVAEDIASPVTANAIQQFVKQYEYEKEGNDLTYV LLIGDHKDIPAKITPGIKSDQV YGQIVGNDHNYNEVFIFRFSCEs KEDLKTQIDRTIHYERNITTEDKWLQALCIASAEGGPSADNG ESDIQHENVIANLLTQYGYTKIICYPDGPVTPKNIIDAFNGGISL ANYTGHGSETAWGTSHFQTT HVKQLTNSNQLPFIFDVACVNG DFLFSMPCFEALMRAQKDGKPTGTVAIIASTINQSWASPMR GQDEMNEILCEKHPNNIKRTFFGGVTMNGMFAMVEKYKKDGE KMLDWTWTFVFGDPSLIVRTLP TKMQVTPAQLNLTDAVNVS CDYNGAIATISANGKMFGSAVENGATINLTGLTNESTLTL TV VGYNKETVIKTINTNGEPNPYPQVSNLTATTQGGQKVTWKWDA PSTKTNATTNTARSVDGIR ELVLLSVSDAPELLRSQQAIEIVLEA HDVWNDGSGYQILLDADHDQYQGVIPSDTHTLWPNCSVP AN LFAPFEYTPENADPSCSPTNMIMDGTASVNIAGTYDFAIAA PQANAKIWIAGQGPTKEDD YVFEAGKKYHFLMKMKMGSGDGT ELTISEGGGSDYTYTYVYRDGTKIKETILTATRTEEDGATG NHE YCVEVKYTAGVSPKVCCKDVTVEGSNEFAPVQNLGSAVGQKL VTLKWDA PNGTPNPNNP PNPNPNPGTTTLESFENGIPASWK TIDADGDGHGWKPGNAPGIAGYNSNGCVYSESFLGGIG VLT PDNYLITPALDLPNGGKLTFWVCAQDANYASEHYAVYASSTG NDASNFTNALLEETITAK GVRSPREAMRGRIQGTWRQKTVDL P AGTKYVAFRHFQSTDMFYIDLDEVEIKANGKRADFTETF ESST HGEAPAEWTTIDADGDGGQWLCLSSGQLDWLTAHGGTNW SSFSWNGMALNPDNYLISK DVTGATKVKYYYAVNDGFPDGH YAVMISKTGTNAGDFTWFEETPNGINKGGARFGLSTEADGA KPQSVWIERTVDLPAGTKYVAFRHYNCSDLNYILLDDIQTMTG GSPTPTDYTYTYVYRDGTKIKE GLTETTFEEDG VATGNHEYCV EVKYTAGVSPKKCVNVTVNSTQFNPNVKNLKAQPDGGDVLK WEAPSAKKTEGSREVKRIGDGLFVTIEPANDVRANEAKWLAA DNVWGDNTGYQFLDADHNT FGSVPLTGLTGTASSDLYS ANFESLIPANADPWTQNIHVTGQGEWIPGGVYDYCITNPEP AS GKMWIAGDGGNQPARYDDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGD pTDMEEVDDSPASYTYTYVYRDGT KIKEGLTETTYRDAPMSAQ SHEYCVVEVKYTAGVSPKVCVDYIPGGVADVTAQKPYTLTVVG K TITVTCQGEAMIIDMNGRRLAAGRNTVVYTAQGGYYAVMVV VDGKSYVEKLAIK	RgpA
25	MRKLLLLIAASLLGVGLY AQSAAIKLDAPTTRTCTNNSFKQFD ASFSFNEVELTKVETKGGTFA SVSIPGAFPTGEVGSPEVPVR KLIAVPVGATPWRVKSFTQVYSLNQYGEKLMPHQPSMSK S DDPEKVPFVYNAAYARKGFVGQELTQVEMLGTMRGVRIAA LTINPVQYDVVANQLKVRNNI EIEVSFQGADEVATQRLYDASF SPYFETAYKQLFNRDVYTDHGDLNTPVRMLVAVAGAKFKE AL KPWLTKWAQKGFYLDVHYTDEAEVGTTNASIAFIHKKYNDG LAASAAPVFLAIVGDTDV ISGEKGGKTKKVTDLYSYAVDGDYF PEMYTFRMSASSPEELTNIDKVLMEKATMPDKSYLE KVLIIA GADYSWNSQVGQPTIKYGMQYYYNQEHGYTDVYNYLKAPYT	Kgp
30	GCYSHLNTGVSFANYTAHGETAWADPLLTSSQLKALTNKDK YFLAIGNCCITAQFDYVQPCFG EVITRVRKEKGAY AYGSSPNsy WGEDYYWSVGANAVFGVQPTFEGTSMGSYDATFLFSYNTV NSIMWAGNLAATHAGNIGNITHIGAHYYWEAYHVLGDGSVMP YRAMPKTNNTYTLPASLPQNQA SYSIQASAGSYVAISKDGYLYG TGVANASGVATVSMTKQITENGNYPWITRSNYLPVIKQIQVGI EPSYPQVSNLTATTQGGQKVTWKVVEAPEAKKAEGSPCKRIG DGLFVTIEPANDVRANEAKWL AADNVWGDNTGYQFLLDADH NTFGSVIPATGPLFTGTASSNLYSANFEYLIPANADPWTQNI V TGQGEWIPGGVYDYCITNPEPASGKMWIAGDGGNQPARY DDFTFEAGKKYTFTMRRAGMGD TDMEEVDDSPASYTYTYVY RDGTKIKEGLTATTFEEDGVAAGNHEYCVVEVKYTAGVSPKVC KDV TVEGNEFAPVQNLTGSSVGQKVTWKWDA PNGTPNPNNP NPNPNPGTTLESFENGIPASVKTIDA DGDGHGWKPGNAPG AGYNSNGCVYSESFLGGIGVLTDPDNYLITPALDLPNGGKLT FWVCAQD ANYASEHYAVYASSTGNDASNFTNALLEETITAKGV RSPKAIRGRIQGTWRQKTVDL P AGTKYV AFRHFQSTDMFYIDL DEVEIKANGKRADFTETFESSTHGEAPAEWTTIDADGDGGW LCLSSGQ LDWLTAHGGSNWSSFSWNGMALNPDNYLISKDV TGATKVKYYYAVNDGFPDGHYAVMISKTG TNAGDFTVFEET PNGINKGGARFGLSTEANGAKPQSVWIERTVDLPAGTKYVAF RHYNCSDLN YILLDDIQTMTGGSPTPTDYTYTYVYRDGTKIKEG LTETTFEEDG VATGNHEYCVVEVKYTAGVSPK KCVNYTVNSTQFNPNVQNLTAEQAPNSMDAILKWNALPAKRAEVLNEDFENG P ASWKTLD DGDGNWNTTTPPGGSSFAGRINSAICVSSASYN FEGPQNPDNYLVTPELSLPGGGTLFWVCAQ DANYASEHYA VYASSTGNDASNANALLEEVLTAKTWTAPAEAIRGTRAQGT WYQKTVQLPAG TKYVAFRHFQCTDFFWINLDDWITSGNAPS YTYTIYRNNTQIASGVTETTYRDPDLATGFYTYGV KVVPNGE SAJETATLNLITSLADVTAKPYTLTVVGKTITVTCQGEAMIIDM NGRRLAAGRNTW YTAQGGHYAVMWVDGKSYVEKLAVK	
40	MRKLNSLFLSLAVLLSLLCWGQTAAAQGGPKTAPSVTHQAVQK GIRTSAKDLRDPPIAGMARIIL EAHDVWEDGTGYQMLWDAD HNQYGASIPESFWFANGTIPAGLYDPFEYKVPVNADASFST N FVLDTASADIPAGTYDYVIINPNPGIHYVGEVSKGNDYVVE AGKTYHFTVQRQGGPDAAASVW TGEGGNEFAPVQNLQWSV SGQTVTLTWQAPASDKRTYVLNESFDTQTLPNGWTMIDADG DGH NWLSTINVYNTATHTGDMGAMFSKSWTASSGAKIDLSPDN YLVTPKFTVPENGKLSYVSSQEPW TNEHYGVLFSTTGNEAA NFIKLEETLGSCKPAPMNLVSEGVKAPAPYQERTIDL SAY AGQQ WLAFRHFQCTGIFRLYLDLVAVSGEGSSNDYTYTYVYR DNVVIAQNLATTFFNQENVAPGQYNY CVEYKYTAGF DVTVEGSNEFAPVQNLGSAVGQKVTWKWDA PNGTPNPNNP TTTLESFENGIP ASWKTIDADGDNWNTTTPPGGSSFAGH NSAICVSSASYNFEGPQNPDNYLVTPELSLNGGT LTFVVCQA QDANYASEHYAVYASSTGNDASNANALLEEVLTAKTVVTAP EAIRGTRVQGTWY QKTVQLPAGTKYVAFRHFQCTDFFWINLD DVEIKANGKRADFTETFESSTHGEAPAEWTTIDAD	HagA

	GDGQGWL CLSSGQLGWLT AHGGTNW ASFSWNGMALNPDNYLISKDVT GATKVKYKYAVNDG FPGDHYAVMISKGTNAGDFTWFEETP NGINKGGARFGLSTEANGAKPQSVWIERTVDLPAGTK YVAFR HYNCSLDNYILLDDIQFTMGGSPTPTDYTYTVYRDGTIKEGL TETTFEEDGVATGNHE YCVVEVKYTAGVSPKECVNVTVDVRFQ NPVQNLTGSAVGQKVTCLKWDAPNGTPNPNPGTTTLE SFEN GIPASWKTIDADGDGNNWTTTPPGGTSEAGHNSAICVSSAS	
--	---	--

5	YINFEQPONPDNYLVTPELSLPNGGTLTFWVCAQDANYASEH YAVYASSTGNDASNEAN ALLEEVLTAKTVVTAPEAIRGTRVQG TWYQKTVQLPAGTKYVAFRHFCTDFFWINLDD VEIKANGKR ADFTFESSTHGEAPAEWTTIDADGDGQGWLCLSSGQLDW LTAHGGTN WASFSWNGMALNPDNYLISKDVTGATKVKYKYA VNDGFPGDHYAVMISKGTNAGDR TVVFEETPNGINKSGRR GLSTEANGAKPQSVWIERTVDLPAGTKYVAFRHYNCSLDNIL L DDIQFTMGGSPTPTDYTYTVYRDGTIKEGLTETTFEEDGVA TGNHEVCVEVKYTAGVS PKECVNVTVDVQFNPVQNLTGSA VGQKVTCLKWDAPNGTPNPNPGTTTLESEFENGIPAS WKTIDA DGDGNNWTTTPPGGTSEAGHNSAICVSSASYINFEQPONPD NYLVTPELSLPN GGTLTFWVCAQDANYASEHYAVYASSTGND ASNFANALLEEVLTAKTWTAPEAIRGTR VQGTWYQKTVQLPA GTKYVAFRHFCTDFFWINLDDVEIKANGKRADFTETTFESSTH GE APAEWTTIDADGDGQGWLCLSSGQLGWLT AHGGTNWA SFSWNGMALNPDNYLISKDV TGATKVKYKYAVNDGFPGDHY AVMISKGTNAGDFTWFEETPNGINKGGARFGLSTEA NGAK PQSVWIERTVDLPAGTKYVAFRHYNCSLDNYILLDDIQFTMGGSPTPTDYTYTVY RDGTIKEGLTETTFEEDGVATGNHEVCVEV KYTAGVSPKECVNVTINPTQFNPVQNLTA EQAPNSMDAILKW NAPASKRAEVLNEDFENGIPASWKTIDADGDGNNWTTTPPG GSSF AGHNSAICVSSASYINFEQPONPDNYLVTPELSLPNGGTLTFWVCAQDANYASEHYAVY ASSTGNDASNFANALLEEVLTAKTVVTAPEAIRGTRVQGTWYQKTVPLPAGTKYVAFRHF GCTD FFWINLDDWITSGNAPSITYTYRNNTQIASGV TETTYRDPDL ATGFYTYGVKVVW PNGESAIAETATLNTSLADVT AQKPYTLTVV GKTITVTCQGEAMIDMNGRRLAAGRNTV VYTAQGGHYAVM VWDGKSYVEKLVAK	
---	---	--

SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность	Фрагмент
64	D[S/Y][Y/S]WN[P/S][K/Q][I/V]	KAS4
65	NSYWGED	IKAS5
66	IGN[V/I]THIGAHY	KAS6
67	EGGPSADN	RAS4
68	[N/D]Q[S/Y]WA[S/P]P	RAS5
69	PVSNLTATTQGGQKVTCLKWDAPST	ABM1 -RapA _{cat}
70	PVSNLTATTQGGQKVTCLKWEAPSA	ABM1-Kgpcat
71	PVQNLTGSSVGQKVTCLKWDAPST	ABM1-KgpA1
72	PVQNLTGSAVGQKVTCLKWDAPNG	ABM1 -RgpA1 & RgpAA3
73	PVKNLKAQPDGGDWLKWWEAPSA	ABM1 -HagAA1 ^{*/**}
74	PVQNLTAEQAPNSMDAILKWNA	ABM1 -KgpA3 HagAA3
75	PVQNLQWSVSGQTVTLTWQAPAS	ABM2-HagAA1
76	YTYTVYRDGTIKEGLTETTFEEDGVA	ABM2-ABM2-RgpAA4
77	YTYTVYRDNVVIAQNLATTFNQENVA	ABM2-HagA1*
78	YTYTVYRDGTIKEGLTA/ETTFEEDGVA	ABM2 любые Дру-гие адгезины
79	PNGTP(NP) ₁₋₆ GTT(T)LSSEF	ABM3- все адгезины
80	GGPKTAPSVTHQAVQKGIRTSKAKDLRDPAGMARIIEAHDV WEDGTGYQMLWDADHNQYG ASIPESFWFANGTIPAGLYDP FEYKVPVNADASFSPTNFVLDGTASADIPAGTYDYVIINRNRGII YIVGEGVSKGNDYVVEAGKTYHFTVQRQPGDAASVVVTGEG GNEFAPVQNLQWSVSGQTVTL TWQAPASDKRTYVLNBSFPTH QTLPNGWTMIDADGDGHNWLSTINVYNTATHTGDGAMFSKS W TASSGAKIDLSPDNYLTPKFTVPENGKLSYWSSQEPWTN EHYGVFLSTTGNEAANFTIKLLEET LGSG	HagA1 [26-351]
81	APAPYQERTIDL SAYAGQQVYLAFRHFCTGIFRLYLDDVAVS GEGSSNDYTYTVYRDNVVIAQN LTATTFNQENVAPGQYNYCV EVKYTAGVSPKVCCKDVTVEGSNEFAPVQNLTGSAVGQKVTCLK W DAPNGTPNPNPGTTTLESEFENGIPASWKTIDADGDGNNWTTTPPGGSSFAGHNSAICVSSASYIN FEGPQONPDNYLVTPELS LPNGGTLTFWVCAQDANYASEHYAVYASSTGNDASNFANALL EEEVLT	НадA1* [366-625]
82	PQSVWIERTVDLPAGTKYVAFRHYNCSLDNYILLDDIQFTMGGSPTPTDYTYTVYRDGTIKEGL TETTFEEDGVATGNHEVCVEV KYTAGVSPKECVNVTVDVQFNPVQNLTGSAVGQKVTCLKWDA	НадA1** [820-1077] или

83	PNGTPNPNPGTTTLESEFENGIPASWKTIDADGDGNNWTTTP PPGGTSEAGHNSAICVSSAS YINFEQPONPDNYLVTPELSLPN GGTLTFWVCAQDANYASEHYAVYASSTGNDASNFANA LLEEVLT	HagA1* [1272-1529]
84	PYQPVSNLTATTQGG	ABM1[436-450]
85	EGLTATTFEEDGVAA	ABM2 [672-686]
85	GTPNPNPNPNPNPNPGT	ABM3 [455-471]

Изложенные ниже примеры представлены с целью иллюстрации, но не ограничения,

настоящего изобретения.

Пример 1

Материалы и методы.

Штаммы бактерий и условия культивирования. Лиофилизированные культуры

5 *Porphyromonas gingivalis* W50 культивировали в анаэробных условиях при 37°C на кровяном агаре с добавлением 5 мкг/мл гемина, 0.5 мкг/мл цистеина (НВ агар, <10 пассажей). Через 3-4 дня колониями инокулировали среду для инфузии с экстрактами тканей мозга и сердца с добавлением 5 мкг/мл гемина, 0.5 мкг/мл цистеина (1).

Периодические культуры культивировали в анаэробных условиях на рабочей станции 10 МКЗ (Don Whitley Scientific Ltd., Adelaide, Australia). Клетки собирали во время экспоненциальной фазы роста методом центрифугирования (7500 д, 30 мин, 4°C) и дважды промывали буфером PG (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂ и 5 mM цистеина-HCl, pH 8.0) на анаэробной рабочей станции. Рост периодических культур контролировали при длине волны 650 нм на спектрофотометре (модель 295E, Perkin- 15 Elmer). Чистоту культур проверяли рутинным методом окрашивания по Грамму микроскопически и с помощью различных биохимических анализов согласно Slots (2).

Создание конструкций рЕТ28, содержащих последовательности адгезина и последовательности адгезина с добавленными на М-конце последовательностями Kgp протеиназы. Остатки Кдр, представляющие пептиды и химерные пептиды активного 20 сайта (AS) и домена адгезина КдрA1 (A1), экспрессировали на повышенном уровне в *E. coli* в виде рекомбинантных белков (г) с гекса-His метками с использованием векторов экспрессии рЕТ (Novagen). Рекомбинантные белки представляли собой rKAS2 и rKLA1, а г-химерные белки представляли собой rKAS2-KLA1, rKAS1-KsA1 и rKAS4-KAS3-KAS5-KAS6-KLA1 (также обозначаемые термином мультиKAS-KLAI). Аминокислотные 25 последовательности, представляющие различные домены A1 и AS, представленные в Таблицах 1 и 2. Различные домены KAS и KA1 гена *kgp* амплифицировали на основе рNS1 (3.5 kb BamHI *lys* фрагмент в рUC18) или геномной ДНК *P. gingivalis*, соответственно с использованием праймеров, указанных в Таблице 4, Taq ДНК-полимеразы (Invitrogen) и термоциклера PC-960 (Corbett Research Technologies). Для 30 получения продуктов ПЦР, кодирующих KAS2 и KLA1, соответственно, использовали пары праймеров: KAS2-прямой и KAS2-обратный и KLA1-прямой и KLA1-обратный при следующих условиях реакции: 94°C, 3 мин, затем 28 циклов при 94°C, 45 с (денатурация); 62°C, 40 с (отжиг) и 72°C, 20 с (элонгация), затем последний цикл при 72°C, 5 мин.

35 Химерный продукт ПЦР KAS2-KLA1 получали методом ПЦР SOEing следующим образом: получали ПЦР продукты с использованием праймеров KAS2-прямой и KAS2-KLA1-химера-обратный и KAS2-KLA1-химера-прямой и KLA1-обратный при описанных выше условиях. Затем проводили отжиг ПЦР-продуктов и заключительную ПЦР с использованием праймеров: KAS2-прямой и KLA1-обратный 94°C, 2 мин, затем 28 40 циклов при 94°C, 30 с; 50°C, 30 с и 72°C, 40 с, затем заключительный цикл при 72°C, 5 мин.

Для получения ПЦР-продукта KAS1-KsA1 проводили две последовательные ПЦР с использованием праймера KAS1-KsA1-обратный с каждым из праймеров KAS1-KsA1-прямой 1 и 2 по очереди (условия реакции: 94°C, 2 мин, затем 35 циклов при 94°C, 15 с; 45 63°C, 30 с и 72°C, 2 мин для получения ПЦР-продукта, KAS1-KsA1. Праймеры KAS1-KsA1-прямой и KAS1-KsA1-прямой1 и KAS1-KsA1-прямой2 на 3'-конце содержат последовательность, перекрывающуюся с b'-концом предыдущего ПЦР-продукта.

Для получения фрагмента мульти-KAS-KLA1 PCR проводили 4 последовательные

ПЦР с использованием праймера мульти-обратный с каждым из праймеров: мульти-прямой 1, 2, 3 и 4 по очереди (условия реакции 95°C, 2 мин, затем 35 циклов при 95°C, 20 с; 68°C, 1.5 мин) для получения ПЦР-продукта мульти-KAS-KLA1. Каждый праймер мульти-прямой на 3'-конце содержит последовательность, перекрывающуюся с 5'-концом предыдущего ПЦР-продукта.

Все ПЦР-продукты, кодирующие KAS2, KLA1, KAS2-KLA1, KAS1-KsA1 и мульти-KAS-KLA1, очищали на колонках (Qiagen), проводили лигирование TA вектор клонирования pGem-T Easy (Promega) и трансформировали E. coli JM109 согласно инструкции производителя. Очищенные рекомбинантные конструкции pGemT-Easy обрабатывали NcoI и XhoI, клонировали в обработанную NcoI/XhoI pET28b (Novagen) и трансформировали клетку-хозяина, в которой не происходит экспрессия, E. coli, JM109 [DH5a]. Рекомбинантные конструкции pET28 очищали и трансформировали клетку-хозяина, в которой происходит экспрессия, E. coli, BL21 (DE3) [HMS174(DE3)] (Novagen) и проводили отбор на среде LB, содержащей 50 мкг/мл канамицина согласно инструкции производителя. Целостность каждой вставки подтверждали методом секвенирования.

Конструировали олигонуклеотидные праймеры (Таблица 4) со встроенными сайтами рестрикции, стоп-кодонами и гекса-His метками при необходимости. Конструировали праймеры, использованные для rKAS2, rKLA1 и 1-KAS2-KLA1, с ограничением включения г-белки инородных кодирующих последовательностей до не более трех аминокислот и гекса-His метки. rKAS1 и rKLA1 конструировали таким образом, чтобы они содержали гекса-His метку на N-конце и C-конце соответственно, чтобы их можно было напрямую сравнивать с rKAS2-KLA1, который содержит гекса-His метку на N-конце и C-конце. В rKAS1-KsA1 и KAS-KLA1 His-метки расположены на C-концах.

Таблица 4. Олигонуклеотидные праймеры, использованные для амплификации нуклеотидных последовательностей, кодирующих фрагменты гибриды Kgp A1 и AS

Рекомбинантный (г)белок	Олигонуклеотиды	Последовательность (5'-3')	Особенности* (5'-3')
1-KAS2	KAS2-прямой	GACCATGGCTCATCACC ATCACCAT-CACAATACC GGAGTCAGCTTTGCA (SEQ ID NO: 47)	GA буфер-NcoI (включая стартовый кодон ATG)-CT-(His) ₆ -AS(nt 1992-2012)
	KAS2-обратный	GACTCGAGTTATTTGTC CTTATTAG TGAGTGCTTT C (SEQ ID NO: 48)	GA буфер-XhoI-TTA стоп-KAS1 (nt 2099-2075)
rKLA1	IKLA1-, прямой	GACCATGGGTTGGQGA GACAATACGGGTTAC (SEQ ID NO: 49)	GA буфер-NcoI (включая стартовый кодон ATG)-CT- A1 (nt 2946-2966)
	KLA1-обратный	GACTCGAGACCTCCGTT AGGCAAATCC (SEQ ID NO: 50)	GA буфер-XhoI-A1 (nt 3863-3845)
rKAS2-KLA1	KAS2-KLA1-обратный	CCGTATTGTCTCCCAT TTGTCCTT ATTAGTGAGT GCTTTC (SEQ ID NO: 51)	A1 (nt2961-2946)-KAS1 (nt 2099-2075)
	KAS2-KLA1-прямой	CACTAATAAGGACAAAT GGGGAGA CAATACGGG TTAC (SEQ ID NO: 52)	KAS1 (nt 2084-2099)-A1 (nt 2946-2966)
rKAS1-KsA1	KAS1-KsA1-прямой 1	CATGGATCTGAGACCGC ATGGGCT GATCCACTTT TCTTGTTGGATGCCGAT (SEQ ID NO: 53)	AS (nt 2025-2057)-A1 (nt 2970-2;987)
	KAS1-KsA1-прямой 2	CCATGGCTTTGAATACC GGAGTCA GCTTTGCAAA CTATACAGCGCATG GAT CTGAGACCGCASEQ ID NO: 54)	NcoI-CT-AS (nt 1989-2042)
	KAS1-KsA1-обратный	CTCGAGGAATGATTCGG AAAGTGTT (SEQ ID NO-55)	XhoI-A1(nt 3663-3644)
г мульти KAS-KLA1	мульти-	CCATGGCTGATTATAGC	NcoI-CT-KAS4 (nt 1857-
	прямой 1	TGGAATTCACAGGTAGT CAGCTTTG CAAADTATA CA (SEQ ID NO: 56)	188D)-KAS3, (nt.2001-2021)
	мульти-прямой 2	CTTTGCAAACTATACAG CGCATGG ATCTGAGACC GCATGGGCTGATCC	KAS3 (nt 2006-2057)

5		ACT T (SEQ ID NO: 57)	
	мульти-прямой 3	ATGGGCTGATCCACTTC TGAATTCT TATTGGGGC GAGATCGGCAATATT AC C (SEQ ID NO: 58)	KAS3 (nt 2042-2060)-KAS5 (nt 2223-2240)- KAS6 (nt 2403-2417)
	мульти-прямой 4	GATCGGCAATATTACCC ATATTGGT GCTCATTAC GCTTGGGGAGACAATACG, (SEQ ID NO: 59)	G-KAS6 (nt 2403-2435)-GCT (Ala спайсер)- A1(nt 2946-2960)
	мульти-обрат- ный	CTCGAGACCTCCGTTAG GCAAATCC AATGCCGGT GTTATCAGATAGTTG TC A (SEQ ID NO: 60)	Xho-A1 (nt 3863-3818)

* номера последовательностей нуклеотидов (nt) последовательности гена лизин-специфичной цистеиновой протеиназы номер доступа U75366

Экспрессия и очистка рекомбинантных белков

С конструкций рЕТ28:KLA1 (KAS2, KAS2-LA1, KAS1-SA1, мульти-KAS-KLA1) с помощью изопропил р-галактозидазы (IPTG) индуцировали экспрессию рекомбинантных белков. Все рекомбинантные белки вырабатывались в виде гибридных белков с меткой гекса-His, и их очищали в условиях денатурации с помощью системы очистки NI-NTA (Invitrogen). Вкратце, отдельные колонии трансформированных E.coli (DE3) инокулировали в 20 мл среды Лурия-Бертани (LB), содержащей 50 мкг/мл канамицина при 37°C в течение ночи при перемешивании на орбитальном шейкере. Затем указанным инокулятом инокулировали 1 л среды LB, содержащей 50 мкг/мл канамицина. После достижения культурой оптической плотности 5.0-7.0 при 600 нм (средняя-логарифмическая фаза роста) индуцировали экспрессию белка IPTG 0,1 мМ в течение 2 часов при температуре 37°C при перемешивании при 200 об/мин. Собирали клетки (7,5 г) и ресуспендировали их в денатурирующем связывающем буфере (8 М мочевины, 20 нМ фосфата натрия, pH 8.0, 500 мМ NaCl), клетки разрушали обработкой ультразвуком в режиме 3 × 15 с с интервалом 30 с с помощью клеточного дезинтегратора Branson Sonifer 250 (Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, CT) с микроносиком на установке 3, затем центрифугировали при 39,000 g в течение 30 мин при 4°C. Рекомбинантные белки очищали из супернатанта путем нанесения на преуравновешенную агарозную колонку Ni-NTA, после чего промывали денатурирующим буфером для отмывки (8 М мочевины, 20 нМ фосфата натрия, pH 6.0, 500 мМ NaCl) для элюации не связавшихся белков. Затем колонку промывали 10 объемами связывающего буфера В и элюировали рекомбинантный белок денатурирующим буфером для элюации (8 М мочевины, 20 нМ фосфата натрия, pH 6.0, 500 мМ NaCl, 0.5 М имидазола). Очищенный белок диализировали против 2М мочевины-PBS и хранили при -80°C.

Образцы рекомбинантных белков анализировали методом SDS-PAGE и определяли их молекулярные массы с помощью ProtParam (<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>). Концентрацию белков в образцах определяли методом Bio-Rad Protein Assay с использованием BSA (бычий сывороточный альбумин) в качестве стандарта.

Иммунизация и мышьяная модель периодонтита.

Эксперименты с мышами проводили, как было описано ранее (3)? с одобрения комитета по этике экспериментов над животными Университета Мельбурна. 6-8 недельных мышей BALB/c (по 12 мышей в группе), содержащихся в микроизоляторах, иммунизировали подкожно (s.c. 100 мкл) 50 мкг одного из рекомбинантных белков, комплексом RgpA-Kgp или 2×10⁹ убитыми формалином клетками P. gingivalis штамма W50 или PBS; каждый антиген эмульгировали в неполном адьюванте Фрейнда (IFA). Через 30 дней мышам проводили бустерную, инъекцию антигена (подкожная инъекция, эмульгированный в IFA) и 12 дней спустя забирали кровь из ретробульбарного венозного

сплетения. Через 4 дня после второй иммунизации мышам вводили канамицин (Sigma-Aldrich, New South Wales, Australia) в концентрации 1 мг/мл в неионизированной воде *ad libitum* в течение 7 дней. Через 3 дня после введения антибиотика (через 2 дня после кровопускания) мышам инокулировали перорально 4 раза через каждые 2 дня 1×10^{10} живых *P. gingivalis* W50 (25 мкг) в буфере PG (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂ и 5 mM цистеин-HCl, pH 8.0), содержащем 2% (вес/объем) карбоксиметилцеллюлозы (CMC; Sigma-Aldrich, New South Wales, Australia), контрольной группе вводили только буфер PG, содержащий 2% (вес/объем) CMC. Инокулум готовили в анаэробной камере и затем сразу же вводили в десневой край моляров верхней челюсти. Две недели спустя мышам вводили дополнительные 4 дозы (через 2 дня 1×10^{10} живых клеток *P. gingivalis* W50 (25 мкл) в буфере PG, содержащем 2% (вес/объем) CMC. Количество живых бактерий в каждом инокулуме проверяли с помощью посева на кровяной агар. Мышей кормили порошковым кормом (Barastock, Australia) и содержали в клетках с сетчатым дном для предотвращения опасности кровотечения. Через 4 недели после введения последней дозы мышам пускали кровь из ретробульбарного сплетения, мышей забивали, забирали верхнюю челюсть и делили ее на две части, одну половину (правую) использовали для измерения резорбции альвеолярной кости, а вторую половину (левую) использовали для постановки ПЦР в режиме реального времени.

Правые половины верхней челюсти кипятили в течение 1 минуты в деионизированной воде, механически очищали от плоти и погружали в 2% (вес/объем) гидроксид калия (16 часов, 25°C). Затем половину челюсти промывали (дважды деионизированной водой) и погружали в 3% (вес/объем) раствор перекиси водорода (6 часов, 25°C). После промывки половины челюсти (два раза деионизированной водой) ее окрашивали 0.1% (вес/объем) водным раствором метиленового синего и делали снимки буккальной стороны каждой половины челюстей с помощью камеры Olympus DP12, установленной на микроскопе для диссекции, с использованием программного обеспечения OLYSIA BioReport версия 3.2 (Olympus Australia Pty Ltd., New South Wales, Australia) для оценки горизонтальной резорбции костей. Горизонтальная резорбция костей происходит в горизонтальной плоскости, перпендикулярной гребню альвеолярной кости (ABC), что приводит к уменьшению высоты гребня. Каждую половину верхней челюсти выравнивали таким образом, что снимки молярных буквальных язычных бугорков каждого зуба накладывались, и на снимки наносили микрометрическую шкалу для того, чтобы измерения можно было стандартизировать для каждого снимка. Область от цементаэмалевого соединения до ABC каждого коренного зуба измеряли с использованием программного обеспечения OLYSIA BioReport версия 3.2. Измерения резорбции кости проводились в двух повторностях одним экспертом в условиях рандомизированного двойного слепого исследования.

Каждую, половит

Определение подклассов антител методом ELISA.

Для определения ответов подклассов антител сыворотки мышей проводили твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) в трех повторностях, нанося на лунки плоскодонного поливинилового микротитровального планшета (Dynatech Laboratories, McLean, VA) суспензию убитых формалином клеток *P. gingivalis* W50 в фосфатно-солевом буфере (PBS) (0.01 M Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, 0.15 M NaCl), pH 7.0, содержащем 0.1% (объемные) Tween 20 (PBST) с концентрацией 5 мкг/мл. После удаления покрывающего раствора в лунки вносили PBST, содержащий 2% (масса/объем) сухого молока, для блокирования непокрытого пластика в течение часа при комнатной

температуре. Лунки трижды промывали PBST и в каждую лунку добавляли серийные разведения сыворотки мыши в PBST, содержащем 0,5% (масса/объем) обезжиренного сухого молока (SK-PBST), и инкубировали в течение 16 часов при комнатной температуре. После этого лунки промывали шесть раз PBST, в SK-PBST добавляли разведения 1/2,000 IgG козы к IgM, IgA, IgG1, IgG2a, IgG2b или IgG3 мыши (Sigma, New South Wales, Australia), и оставляли связываться в течение 2 часов при комнатной температуре. Планшеты промывали шесть раз PBST и в каждую лунку добавляли разведения 1/5,000 конъюгата пероксидазы хрена с антителами кролика, специфичными к иммуноглобулинам (Sigma, New South Wales, Australia) в SK-PBST, и инкубировали планшеты в течение 1 часа при комнатной температуре. После того как лунки шесть раз промывали PBST связавшиеся антитела определяли, добавляя 100 мкл субстрата ABTS [0.9 mM 2,2'-азино-бис(3-этилбенз-тиазолин-6) сульфоновой кислоты в 80 mM лимонной кислоты, содержащей 0.005% (объемные) перекиси водорода, pH 4.0] в каждую лунку. Оптическую плотность определяли на считывателе микротитровальных планшетов (Bio-Rad microplate reader, model 450) при длине волны 415 нм.

Гель-электрофорез в полиакриамидном геле в присутствии додецилсульфата натрия SDS-PAGE и Вестерн-блоттинг.

Проводили анализ рекомбинантных белков (10 мкг) с использованием системы для электрофореза XCell surelock Mini-Cell. Рекомбинантные клетки смешивали с 20 мкл буфера для образцов (10% [масса/объем] SDS, 0.05% [масса/объем] бромфенолового синего, 25% [объемные] глицерина и 0.05% [объемные] 2- меркаптоэтанола). pH доводили до значения 8.0 1.5 M Tris-HCl и затем нагревали раствор в течение 5 мин при 100°C. Рекомбинантные белки (10 мкг/лунка) наносили на Novex 12% (масса/объем) готовые минигели с Tris-глицином, и проводили электрофорез при силе тока 30-50 мА и разности потенциалов 125 V с использованием системы электрофореза Novex (Novex, San Diego, CA). Белки визуализировали с помощью 0.25% (масса/объем) красителя Кумасси синего R250.

Анализ эпитопов последовательности пептидов активного сайта Кдр-протеиназы (KAS-2).

Определяли сайты связывания антител пептидов активного сайта Lys-специфичной протеиназы KAS2 (433-468 SEQ ID No: 28) с помощью синтеза биотинилированных на М-конце перекрывающихся пептидов, состоящих из 8 остатков (отступ на 1, перекрывание по 7 остаткам) на мультистержной системе синтеза пептидов (Chiron Technologies, Melbourne, Australia) с использованием стандартного протокола твердофазного синтеза Биотинилированные пептиды (мкг/мл) в 0.1 M PBS. pH 7.4 наносили на покрытые стрептавидином планшеты в течение ночи при 4°C (Nunc, NSW Australia). После этого лунки планшетов промывали 4 раза PBST и проводили картирование эпитопов пептидов, связавшихся с планшетом, методом анализа ELISA согласно инструкциям изготовителя Chiron Technologies с использованием сывороток мышей в разведении 1:1000 в 1% w/v обезжиренном сухом молоке в 0.1 M PBS, pH 7.4, содержащем 0.1% v/v Tween 20 (SK-PBST). После этого лунки промывали 6 раз PBST, добавляли разведения 1/2,000 IgG козы против IgG мыши (Sigma, New South Wales, Australia) в SK-PBST и оставляли в течение 2 часов при комнатной температуре. Планшеты промывали 6 раз PBST и в каждую лунку вносили разведения 1/5,000 конъюгата пероксидазы хрена с антителами кролика специфичными к иммуноглобулинам козы (Sigma, New South Wales, Australia) в SK PBST и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. После этого лунки планшета промывали 6 раз PBST, связавшиеся антитела определяли добавлением в каждую лунку по 100 мкл

субстрата ABTS [0.9 mM 2,2'-2,2'-азинобис(3-этилбензотиазолин 6) сульфоновая кислота в 80 mM лимонной кислоты, содержащей 0.005% (объемные) перекиси водорода, pH 4.0]. Оптическую плотность при длине волны 415 нм определяли на ридере микротитровальных планшетов (Bio-Rad ридер микротитровальных планшетов, модель 450).

Статистический анализ. Данные резорбции костей обрабатывали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и ТЗ теста Даннета (SPSS для Windows, версия 12). Титры антител подклассов IgA, IgM, и IgG статистически обрабатывали с использованием t-критерия Стьюдента с помощью программного обеспечения SPSS (SPSS для Windows, версия 12).

Пример 2

Характеристика и очистка рекомбинантных белков (KsA1, KLA1, KAS1-KsA1 и KAS2-KLA1).

Для описания защитной способности фрагментов домена адгезина A1 Кдр и химерной конструкции Kgp-протеиназы и фрагментов домена адгезина A1 Кдр в отношении инфекции *P. gingivalis*, получали и очищали рекомбинантные белки: KsA1 KLA1, KAS1-KSA1 и KAS2-KLA1. Рекомбинантные белки (KsA1 и KLA1) и рекомбинантные химерные белки (KAS1-KsA1 и KAS2-KLA1) очищали от телец включения методом Ni-хелатной аффинной хроматографии и очищенные белки анализировали с помощью SDS-PAGE (Фигура 1). Каждый очищенный рекомбинантный белок состоял из одной мажорной полосы белка с молекулярной массой 40, 36, 31 и 32 kDa, что соответствовало KAS2-KLA1, KLA1, KsA1 и KAS1-KsA1, и данные молекулярные массы соответствовали молекулярным массам рекомбинантных белков с His-меткой, определенным с помощью программы ProtParam. Для описания иммуногенности рекомбинантных белков, KsA1, KLA1, KAS1-KsA1 и KAS2-KLA1 использовали для иммунизации мышей, полученные сыворотки использовали в анализе с планшетами, покрытыми пептидом KAS2 и планшетами, покрытыми убитыми формалином клетками *P. gingivalis* (Фигура 2). По результатам анализа оказалось, что сыворотка с рекомбинантными химерными белками KAS1-KsA1 и KAS2-KLA1 распознавала пептид KAS2 (Фигура 2A) на том же уровне, что и сыворотка, специфичная к KAS2 (конъюгат KAS2-дифтерийный токсин), а также убитые формалином клетки *P. gingivalis* W60 (Фигура 2B). Однако сыворотка против рекомбинантного белка KLA1 распознавала только убитые формалином клетки *P. gingivalis* W50 (Фигура 2B).

Пример 3

Влияние иммунизации рекомбинантными белками (KsA1, KLA1, KAS1-KsA1 и KAS2-KLA1) на резорбцию альвеолярной кости, вызванную *P. gingivalis*, на мышинной модели периодонтита.

Рекомбинантные белки KsA1, KLA1, KAS1-KsA1 и KAS2-KLA1, убитые формалином *P. gingivalis* штамм W50 и комплекс RgpA-Kgp применяли для определения и сравнения степени защиты от резорбции альвеолярной кости, вызванной *P. gingivalis*, с использованием измененной мышинной модели разрушения костей периодонта, предложенной Baker et al. (4). Мышей иммунизировали (в 0 день и на 30 день) рекомбинантными белками KsA1, KLA1, KAS1-KsA1 или KAS2-KLA1, RgpA-Kgp комплексом или убитыми формалином клетками *P. gingivalis* штамма W50 (FK-VV50) или только адьювантом PBS мышам перорально вводили живые клетки *P. gingivalis* W50. Иммунизация всеми указанными рекомбинантными антигенами, комплексом RgpA-Kgp и клетками FK-W50 защищала мышей BALB/c от резорбции альвеолярной кости, вызванной инфекцией *P. gingivalis*, так как у указанных животных наблюдалась

значительно ($p < 0.001$) меньшая резорбция костей по сравнению с мышами из группы, иммунизированной PBS (Фигура 3). Однако у мышей, иммунизированных KAS2-KLA1, происходила меньшая резорбция костей, чем у мышей, иммунизированных KLA1 ($p < 0.01$); KsA1 ($p < 0.001$), комплексом RgpA-Kgp ($p < 0.001$), клетками FK-W50 ($p < 0.001$) и мышам, которым ничего не вводили ($p < 0.001$). Отсутствовало значительное различие степени кости между мышами, иммунизированными KAS2-KLA1, и мышами, иммунизированными KAS1-KsA1. Более того у мышей, иммунизированных KAS1-KsA1, наблюдали значительно меньшую резорбцию костей по сравнению с мышами, которым ничего не вводили ($p < 0.01$), и мышами, иммунизированными комплексом RgpA-Kgp ($p < 0.05$), оно не отличалось от резорбции костей у мышей, иммунизированных KsA1, KLA1; комплексом RgpA-Kgp и FK-W50.

Пример 4

Ответы подклассов антител на иммунизацию рекомбинантными белками (KsA1, KLA1, KAS1-KsA1 и KAS2-KLA1) на мышинных моделях периодонтита.

До и после перорального введения живых клеток *P. gingivalis* мышам пускали кровь и получали сыворотку крови с помощью центрифугирования. На Фигуре 4 показана реактивность подклассов антител по отношению к убитым формалином клеткам *P. gingivalis* W50 для каждого иммуногена (KsA1, KLA1, KAS1-KsA1 или KAS2-KLA1 или убитым формалином клеткам *P. gingivalis* штамма W50 (FK-W50)) на мышинной модели периодонтита. Все защитные иммуногены вызывали образование высокого титра антител IgG на FK-W50. Более того, каждый защитный антиген вызывал образование преимущественно антител подкласса IgG1, слабое образование антител IgG2a, IgG2b и IgG3, FK-50- специфичных антител (Фигура 4). Как до инокуляции (Фигура 4А), так и после инокуляции (Фигура 4 В) каждый иммуноген вызывал образование преимущественно антител подкласса IgG1.

Пример 5

Картирование эпитопов KAS2 (433-468).

Синтезировали биотинилированные перекрывающиеся пептиды, состоящие из 8 остатков (отступ на 1, перекрывание по 7 остаткам), для KAS2 (433-468) и их наносили на планшеты, покрытые стрептавидином. Затем определяли эпитопы, связывающие антитело, с использованием сыворотки мышей, иммунизированных KAS1-KsA1, KAS2-KLA1 и конъюгатом KAS2- дифтерийный токсин (Фигура 5). Двукратное увеличение оптической плотности (415 нм) по сравнению с фоном считали положительным ответом антитела (пороговая OD). Сыворотка распознавала следующие последовательности пептидов, полученные из SEQ ID No.28, а именно KAS1-KsA1, распознавал пептиды 435-442, 436-443, 445-452, 446-453 и 447-454 (пороговая OD=0.07, Фигура 5А) тогда, как KAS2 - KLA1 распознавал пептиды 435-442, 447-454 и 448-455 (пороговая OD=0.07, Фигура 5А). Это позволяет предположить, что происходило распознавание наименьшего количества эпитопов, а именно пептида 436-442 (VSFANYT и его вариант VGFANYT), пептида 447-452 (ETAWAD и его вариант ETSWAD) и пептида 448-453 (TAWADP и его вариант TSWADP). Пептиды, которые содержат эпитоп пептидов 436-442, включают GVSFANYT, GVGFANYT, VSFANYTA и VGFANYTA. Пептиды, которые содержат эпитопы пептидов 447-452 и/или 448-453, включают SETAWAD, SETSWAD, ETAWADP, ETSWADP, TAWADPL и TSWADPL, в частности GSETAWAD, GSETSWAD, SETAWADP, SETSWADP, ETAWADPL, ETSWADPL, TAWADPLL и TSWADPLL.

Пример 6

Синтез пептидов KAS и RAS для конъюгации с белком

Пептиды синтезировали ручным способом или с использованием микроволновой

системой синтеза пептидов CEM Microwave. При этом использовали стандартный протокол твердофазного синтеза пептидов Fmoc. Пептиды синтезировали в форме карбоксамида с использованием смолы Rink-AM-SURE (AAPTEC, KY, USA).

Соединение выполняли с активацией HBTU/HOBt с использованием 4 экв. Fmoc-аминокислоты и 6 экв. DIPEA. Fmoc группу удаляли 20% пиперидином в 1М HOBVDMF.

Смолы, несущие пептиды KAS и RAS, разбухали в DMF и М-концевые группы Fmoc удаляли 2% v/v DBU в DMF, содержащем 2% v/v пиперидина. Затем N-концевую аминокислотную группу получали с помощью группы S-ацетилмеркаптоуксусной кислоты (SAMA) с использованием 5 экв. SAMA-OPfp и 5 экв. HOBt. За реакцией наблюдали с помощью анализа тринитробензол сульфоновой кислоты (TNMBSA). При получении отрицательной реакции на TNBSA смолу промывали (5 × DMF, 3 × DCM и 3 × диэтиловый эфир). Затем смолу высушивали под вакуумом. Отделение пептидов от смолы проводили с использованием смеси для расщепления FA:фенол:TIPS:EDT:вода (92:2:2:2:2) в течение 2.5 ч в зависимости от содержания аргинина в пептиде. После расщепления смолу удаляли фильтрацией, и фильтрат концентрировали до объема приблизительно 1 мл в струе азота. После осаждения пептидных продуктов в ледяном эфире их центрифугировали и промывали три раза. Осадки с пептидами растворяли в 5-10 мл воды, содержащей 0.1% v/v TFA и нерастворимые остатки удаляли центрифугированием. Пептиды очищали с помощью обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (RP-HPLC) химические группы можно использовать для получения производных пептида для конъюгации с белками, они вносят реактивные группы такие группы, как галидные группы (бром, хлор, иод), малеимид, сукцинимидил, гидразин, оксим, тиол, которые затем могли использовать для соединения полученных производных пептида с белком таким, как KgpA1 через его природные остатки цистеина, или получали его производное, добавляя комплементарную реактивную группу, которая способствует механическому лигированию для образования конъюгата пептид-белок.

Конъюгация пептидов SAMA с KA1. В раствор, содержащий 10 мкг/мл рекомбинантного KA1 или другого домена адгезина комплекса RgpA-Kgp в фосфатно-солевом буфере (0.1М фосфат натрия, 0.9% NaCl, pH 7.4), добавляли 0.1 мл 1% w/v раствора эфира m-малеимид бензоил-М-гидроксисукцинимид (MBS) в DMF. Через 30 мин удаляли не вступивший в реакцию MBS и собирали модифицированный MBS KA1 с помощью гель-фильтрации с использованием колонки PD10 (Pharmacia, NSW, Australia), уравновешенной буфером для конъюгации (0.1М фосфат натрия, 5 мМ EDTA; pH 6.0). Очищенный SAMA-пептид (1.3 мМ) растворяли в 200 мл 6М гуанидин HCl, содержащем 0.5 М Tris; 2 мМ EDTA, pH 6.0 и растворяли в 800 мкл воды MilliQ, снимали защитную группу in-situ посредством добавления 25 мкл 2М NH₂OH (40 экв), растворенного в воде MilliQ. Собранный MBS-KA1 сразу же вводили в реакцию с лишенным защиты SAMA-пептидом и перемешивали в течение 1 часа при комнатной температуре. Конъюгат пептида-KA1 отделяли от не прореагировавшего пептида с помощью гель-фильтрации с использованием PD10 колонки, уравновешенной IPBS pH 7.4 и лиофилизировали. Реакцию контролировали с использованием анализа Элмана.

Пример 7

Получение антител

Поликлональную сыворотку на рекомбинантные белки получали с помощью подкожной иммунизации мышей белками. Мышей иммунизировали в первый день 25 мкг белка в неполном адъюванте Фрейнда и на 30 день 25 мкг белка в неполном адъюванте Фрейнда. Иммунизацию проводили с использованием стандартных процедур. Получали поликлональную сыворотку, имеющую высокий титр против белков. При

необходимости получали моноклональные антитела, направленные против определенных рекомбинантных белков с использованием стандартных методик.

Пример 8

Иммунизация для образования антител.

5 6-8-недельных мышей BALB/c или CD1 (аутбредные мыши породы Swiss) по 10 мышей в группе иммунизировали подкожно (с.с. 100 мкл) 50 мкг химерной конструкции KAS2-LA1 или антигеном, эмульгированном в неполном адьюванте Фрейнда (IFA). Через 30 дней мышам вводили антиген (с.с. инъекция, эмульгированная в IFA) и через 12 дней мышей забивали и проводили забор крови для получения сыворотки.

10 Определение подклассов антитела методом анализа ELISA. Для определения ответов подклассов антител сыворотки мышей проводили твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) в трех повторностях с использованием 5 мкг/мл раствора химерной конструкции KAS2-LA1 или убитых формалином клеток *P. gingivalis* W50 или комплекса RgpA-Kgp в фосфатно-солевом буфере (PBS) (0.01 M Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, 0.15 M NaCl), pH 7.0, содержащем 0.1% (объемные) Tween 20 (PBST), которое наносили, на лунки плоскодонных поливиниловых микротитровальных планшетов (Dynatech Laboratories, McLean, VA). После удаления указанного буфера для сорбции в лунки добавляли PBST, содержащий 2% (масса/объем) сухого обезжиренного молока для блокирования непокрытого пластика в течение 1 ч при комнатной температуре. После 20 этого лунки промывали 2 раза PBST, в каждую лунку добавляли серийные разведения сыворотки крови мыши в PBST, содержащего 0.5% (масса/объем) обезжиренного молока (SK-PBST) и инкубировали в течение 16 чв при комнатной температуре. После этого лунки промывали 6 раз PBST, в SK-PBST добавляли разведения 1/2,000 IgG козы к IgM IgA, IgG1, IgG2a, IgG2b, или IgG3 мыши (Sigma, New South Wales, Australia) и оставляли 25 связываться течение 2 часов при комнатной температуре. Планшеты промывали 6 раз PBST, лунки вносили разведения 1/5,000 конъюгата пероксидазы хрена с антителами кролика специфичными к иммуноглобулинам козы (Sigma, New South Wales, Australia) в SK-PBST и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. После этого лунки промывали 6 раз PBST, связавшиеся антитела определяли, добавляя в каждую 30 лунку по 100 мкл субстрата ABTS [0.9 mM 2,2'-2,2'-азинобис(3-этилбензотиазолин-6) сульфоновая кислота в 80 mM лимонной кислоты, содержащей 0.005% (объемные) перекиси водорода, pH 4.0]. Оптическую плотность при длине волны 415 нм измеряли с помощью считывателя микротитровальных планшетов (Bio-Rad ридер микротитровальных планшетов, модель 450).

35 Ответы подклассов антител, вызванный иммунизацией рекомбинантным белком KAS2-KLA1 аутбредных мышей (CD1, Swiss).

Мышей CD1 (Swiss) иммунизировали KAS2-LA1, пускали им кровь и получали сыворотку методом центрифугирования. На Фигуре 6 показана реактивность подклассов антител на химерную конструкцию KAS2-LA1, убитые формалином клетки *P. gingivalis* 40 W50 и комплекс RgpA-Kgp. Белок KAS2-LA1 вызывал выработку антител IgG с доминированием IgG1, которые распознавали белок KAS2-LA1 и перекрестно взаимодействовали с убитыми формалином клетками *P. gingivalis* W50 и комплексом RgpA-Kgp (Фигура 6). Более того, белок KAS2-LA1 вызывал образование только слабо иммунореактивных, IgG2a, IgG2 и IgG3 антиген-специфичных антител (Фигура 6).

45 Пример 9

Создание структурной модели Kgp и определение поверхностно доступных последовательностей активного сайта.

Данная работа показала, что пептиды активного сайта Kgp-протеиназы являются

высоко иммуногенными и создают защиту на высоком уровне от резорбции кости, вызванной инфекцией *P. gingivalis*. Для определения дополнительных пептидов активного сайта протеиназы, которые могут использоваться в вакцине, разработали модель каталитического домена Kgp с использованием набора программ Orchestrar Sybyl7.3 (Фигур 7). Данная модель основана на PDB структуре 1crv RgpB протеазы *P. gingivalis*, указанные белки обладают 23,58% парной идентичностью и Z-показатель равен 25.09 (высоко достоверная модель). При использовании мета веб сервера Meta-PPisp для определения взаимодействия белков предположили существование двух поверхностей с белок-белковыми взаимодействиями в Kgp: поверхность для связывания субстрата (как в RgpB) и вторая поверхность, свойственная Kgp. Главные различия между моделями RgpB и Kgp заключаются в петлях, которые ограничивают вторую взаимодействующую поверхность, и промежуток из 19 остатков (Val526 - Phe545), который невозможно смоделировать в Kgp, который попадает в пределы второй поверхности взаимодействия. На Фигуре 7 изображена модель Kgp, на которой толстые ленты обозначают поверхностно доступные последовательности, окружающие активный сайт Kgp, оказалось, что поверхностно доступные поверхности представляют собой Asp388-Gln394, Leu421-Ala423, Ala443- Glu447 с Ala451, Asn510-Trp513 и Ile570-Gly577 with Tyr580. Исходя из модели (Фигура 6) очевидно, что наряду с KAS2 (A), выделяются три другие последовательности KAS4 (Asp388- Val395) (B), KAS5 (Asn510-Asp516) (C) и KAS6 (Ile570-Tyr580) (D), также они имеют достаточную длину для того, чтобы стать мишенью вакцины. Таким образом, можно получить рекомбинантный химерный белок, который содержит каждый из указанных пептидов, и можно соединить его с N-концом KLA1 для получения мультиКАЗ-KLA1, который можно применять для стимулирования иммунного ответа и благодаря этому защищать от состояний или заболеваний, вызываемых инфекцией *P. gingivalis*.

Пример 10

Процесс моделирования Agp-X-протеиназы для обнаружения иммуногенных участков, расположенных с обеих сторон от каталитического сайта.

Трехмерную структуру Agp-X-протеиназы определяли согласно Eichinger A, Beisel HG, Jacob U, Huber R, Medrano FJ, Banbula A, Potempa J, Travis J, Bode W. Crystal structure of gingipain R: an Arg-specific bacterial cysteine proteinase with a caspase-like fold. EMBO J. 1999 Oct 15; 18(20):5453-62.

Пример 11

Ниже приведен пример состава в виде зубной пасты, содержащего антитела

Ингредиент	% (по весу)
Дикальцийфосфат дигидрат	50,0
Глицерин	20,0
Натрий-кабоксиметилцеллюлоза	1,0
Лаурилсульфат натрия	1,5
Лаурилсаркозинат натрия	0,5
Ароматизатор	1,0
Сахарин натрия	0,1
Хлоргексидина глюконат	0,01
Декстаназа	0,01
Сыворотка козы, содержащая специфичные антитела	0,2
Вода	баланс

Пример 12

Ниже приведен пример состава в виде зубной пасты.

Ингредиент	% (по весу)
------------	-------------

	Дикальцийфосфат дигидрат	50,0
	Сорбитол	10,0
	Глицерин	10,0
	Натрий-кабоксиметилцеллюлоза	1,3
5	Лаурилсульфат натрия	1,5
	Лаурилсаркозинат натрия	0,5
	Ароматизатор	1,0
	Сахарин натрия	0,1
	Монофторофосфат натрия	0,3
	Хлоргексидина глюконат	0,01
	Декстаназа	0,01
10	Сыворотка быка, содержащая специфичные антитела	0,2
	Вода	баланс

Пример 13

Ниже приведен пример состава в виде зубной пасты.

15	Ингредиент	% (по весу)
	Дикальцийфосфат дигидрат	50,0
	Сорбитол	10,0
	Глицерин	10,0
	Лауроил диэтаноламид	1,0
	Монолаурат сахарозы	2,0
20	Ароматизатор	1,0
	Сахарин натрия	0,1
	Монофторофосфат натрия	0,3
	Хлоргексидина глюконат	0,01
	Декстаназа	0,01
	Lg бычьего молока, содержащий специфичные антитела	0,2
25	Вода	баланс

Пример 14

Ниже приведен пример состава в виде зубной пасты.

	Ингредиент	% (по весу)
30	Сорбитол	22,0
	Ирландский мох	1,0
	Гидроксин натрия (50%)	1,0
	Gantrez	19,0
	Вода (деионизированная)	2,69
	Монофторофосфат натрия	0,76
	Сахарин натрия	0,3
35	Пирофосфат	2,0
	Гидратированный алюминий	48,0
	Ароматическое масло	0,95
	Моноклональные антитела мыши	0,3
	Лаурилсульфат натрия	2,00

Пример 15

Ниже приведен пример жидкого состава в виде зубной пасты.

	Ингредиент	% (по весу)
	Полиакрилат натрия	50,0
	Сорбитол	10,0
45	Глицерол	20,0
	Ароматизатор	1,0
	Сахарин натрия	0,1
	Монофторофосфат натрия	0,3
	Хлоргексидина глюконат	0,01

Этанол	,0
Lg лошади, содержащий специфичный антитела	0,2
Линолевая кислота	0,05
Вода	баланс

Пример 16

Ниже приведен пример состава в виде ополаскивателя для полости рта

Ингредиент	% (по весу)
Этанол	20,0
Ароматизатор	1,0
Сахарин натрия	0,1
Монофторофосфат натрия	0,3
Хлоргексидина глюконат	0,01
Лауроил диэтаноламид	0,3
Lg кролика, содержащий специфичные антитела	0,2
Вода	баланс

Пример 17

Ниже приведен пример состава в виде ополаскивателя для полости рта.

Ингредиент	(по весу)
Gantrez S-97	2,5
Глицерин	10,0
Ароматическое масло	0,4
Монофторофосфат натрия	0,05
Хлоргексидина глюконат	0,01
Лауроил диэтаноламид	0,2
Моноклональные антитела кролика	0,3
Вода	баланс

Пример 18

Ниже приведен пример состава в виде леденцов.

Ингредиент	% (по весу)
Сахар	75-80
Кукурузный сироп	1-20
Ароматическое масло	1-2
NaF	0,01-005
Моноклональные антитела кролика	0,3
Стеарат магния	1-5
Вода	баланс

Пример 19

Ниже приведен пример состава в виде массажного крема для десен.

Ингредиент	% (по весу)
Белый петролатум	8,0
Пропиленгликоль	4,0
Стеариловый спирт	8,0
Полиэтиленгликоль 4000	25
Полиэтиленгликоль 4000	37,0
Моностеарат сахарозы	0,5
Хлоргексидина глюконат	0,1
Моноклональные антитела мыши	0,3
Вода	баланс

Пример 20

Ниже приведен пример состава в виде жевательной резинки.

Ингредиент	% (по весу)
Основа камеди	30,0
Карбонат кальция	2,0
Кристаллический сорбитол	53,0
Глицерин	0,5
Ароматическое масло	0,1
Моноклональные антитела мыши	0,3
Вода	баланс

Пример 21

Ниже приведен пример фармацевтического состава.

Ингредиент	%(по весу)
Гуманизированные специфические моноклональные антитела	10
Стерильный фосфатно-солевой буфер	90

Пример 22

Ниже приведен пример состава в виде периодонтального геля.

Ингредиент	% (по весу)
Плюроник F127	20,0
Стеариловый спирт	8,0
Специфичные антитела	3,0
Кремния диоксид коллоидный (Aerosil 200)	1,0
Хлоргексидин глюконат	0,1
Вода	баланс

Следует понимать, что несмотря на то, что настоящее изобретение описано в деталях, примеры приведены исключительно в целях иллюстрации. Другие модификации вариантов реализации настоящего изобретения, которые очевидны специалисту в области молекулярной биологии, стоматологической диагностики и родственных дисциплин, находятся в рамках настоящего изобретения.

Список литературы

1. McKee A.S., A.S. McDermid A. Baskerville A.B. Dowsett D.C. Eliwood and P.D.Marsh. 1986. Effect of hemin on the physiology and virulence of *Bacteroides gingivalis* W50. Infect. Immun. 52:349-355.
2. Slots J. 1982. Importance of black-pigmented *Bacteroides* in human periodontal disease. Host parasite interactions in periodontal diseases. American Society for Microbiology.
3. O'Brien-Simpson N. M., R. Pathirana R. A. Paolini Y.-Y. Chen P.D. Veith T. V., R.N. Pike, N. Alley and E.C. Reynolds. 2005. An immune response directed to proteinase and adhesin functional epitopes protects against *Porphyromonas gingivalis*-induced bone loss. Journal of Immunology 175:3980-3989.
4. Baker P.J., R.T. Evans and D.C. Roopenian. 1994. Oral infection with *Porphyromonas gingivalis* and induced alveolar bone loss in immunocompetent and severe combined immunodeficient mice. Arch Oral Biol 39:1035-1040.

Формула изобретения

1. Химерный или гибридный белок для индуцирования иммунного ответа против *P. gingivalis*, содержащий первый пептид, соединенный непосредственно или с помощью линкера со вторым полипептидом, при этом:

(а) указанный первый пептид характеризуется участком трипсиноподобного фермента *P. gingivalis*, выбранным из группы, состоящей из SEQ ID NOs:1, 2, 27-34 и последовательностей, которые являются по меньшей мере на 90% идентичными указанным последовательностям;

(б) указанный второй полипептид характеризуется адгезиновым доменом *P. gingivalis* или фрагментом указанного домена, выбранным из группы, состоящей из:

(i) SEQ ID NOs:35-37 и последовательностей, которые являются по меньшей мере на 90% идентичными указанным последовательностям;

(ii) SEQ ID NOs:38, 39, 46, 81 и 82,

причем указанный участок трипсиноподобного фермента *P. gingivalis* и указанный адгезиновый домен *P. gingivalis* или его фрагмент способны индуцировать иммунный ответ против *P. gingivalis*.

2. Химерный или гибридный белок по п.1, отличающийся тем, что указанный первый пептид содержит последовательность [V/A]NYT[A/G]HGSETAW[A/G][D/T].

3. Химерный или гибридный белок по п.1, отличающийся тем, что указанный первый пептид характеризуется последовательностью, которая является идентичной или по меньшей мере на 90% идентичной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:27-30, и указанный второй полипептид характеризуется

последовательностью, которая является идентичной или по меньшей мере на 90% идентичной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:36-37.

4. Химерный или гибридный белок по п.3, отличающийся тем, что указанный первый пептид характеризуется последовательностью, которая является идентичной или по меньшей мере на 90% идентичной последовательности, представленной SEQ ID NO:28, и указанный второй полипептид характеризуется последовательностью, которая является идентичной или по меньшей мере на 90% идентичной последовательности, представленной SEQ ID NO:37.

5. Химерный или гибридный белок по п.3, отличающийся тем, что указанный первый пептид характеризуется последовательностью, которая является идентичной или по меньшей мере на 90% идентичной последовательности, представленной SEQ ID NO:27, и указанный второй полипептид характеризуется последовательностью, которая является идентичной или по меньшей мере на 90% идентичной последовательности, представленной SEQ ID NO:36.

6. Химерный или гибридный белок по п.1, отличающийся тем, что С-концевой остаток указанного первого пептида ковалентно связан непосредственно или с помощью линкера, длина которого составляет либо (i) до 15 аминокислот, либо (ii) меньше 5 аминокислот, с (а) N-концевым остатком или (б) С-концевым остатком второго полипептида.

7. Химерный или гибридный белок по п.1, отличающийся тем, что N-концевой остаток указанного первого пептида ковалентно связан непосредственно или с помощью линкера, длина которого составляет либо (i) до 15 аминокислот, либо (ii) меньше 5 аминокислот, с (а) N-концевым остатком или (б) С-концевым остатком указанного второго полипептида.

8. Химерный или гибридный белок для индуцирования иммунного ответа против *P. gingivalis*, содержащий первый пептид, соединенный непосредственно или с помощью линкера со вторым пептидом, при этом:

(а) указанный первый пептид выбран из группы, состоящей из SEQ ID NOs:1, 2, 27-34 и последовательностей, которые являются по меньшей мере на 90% идентичными указанным последовательностям;

(б) указанный второй пептид выбран из группы, состоящей из SEQ ID NOs:71, 78, 79, 83, 84, 85 и последовательностей, которые являются по меньшей мере на 90% идентичными указанным последовательностям,

причем указанные первый и второй пептиды способны индуцировать иммунный ответ против *P. gingivalis*.

9. Химерный или гибридный белок по п.8, отличающийся тем, что С-концевой остаток указанного первого пептида ковалентно связан непосредственно или с помощью линкера, длина которого составляет либо (i) до 15 аминокислот, либо (ii) меньше 5 аминокислот, с (а) N-концевым остатком или (б) С-концевым остатком указанного второго пептида.

10. Химерный или гибридный белок по п.8, отличающийся тем, что N-концевой остаток указанного первого пептида ковалентно связан непосредственно или с помощью линкера, длина которого составляет либо (i) до 15 аминокислот, либо (ii) меньше 5 аминокислот, с (а) N-концевым остатком или (б) С-концевым остатком указанного второго пептида.

11. Химерный или гибридный белок для индуцирования иммунного ответа против *P. gingivalis*, содержащий по меньшей мере две последовательности, которые являются идентичными или по меньшей мере на 90% идентичными последовательности участка трипсиноподобного фермента *P. gingivalis*, выбранной из группы, состоящей из KAS1 (SEQ ID NO:27), KAS2 (SEQ ID NO:28), KAS3 (SEQ ID NO:29), PAS1K (SEQ ID NO:30); RAS1 (SEQ ID NO:31), RAS2 (SEQ ID NO:32), RAS3 (SEQ ID NO:33) и PAS1R (SEQ ID NO:34); и по меньшей мере одну последовательность, характеризующуюся адгезиновым доменом *P. gingivalis* или его фрагментом, выбранным из:

(i) последовательностей SEQ ID NOS:35-37 или последовательностей, которые являются по меньшей мере на 90% идентичными указанным последовательностям, и
(ii) последовательностей SEQ ID NOS:38, 39, 46, 81 и 82, при этом указанный участок трипсиноподобного фермента *P. gingivalis* и указанный адгезиновый домен *P. gingivalis* или его фрагмент способны индуцировать иммунный ответ против *P. gingivalis*.

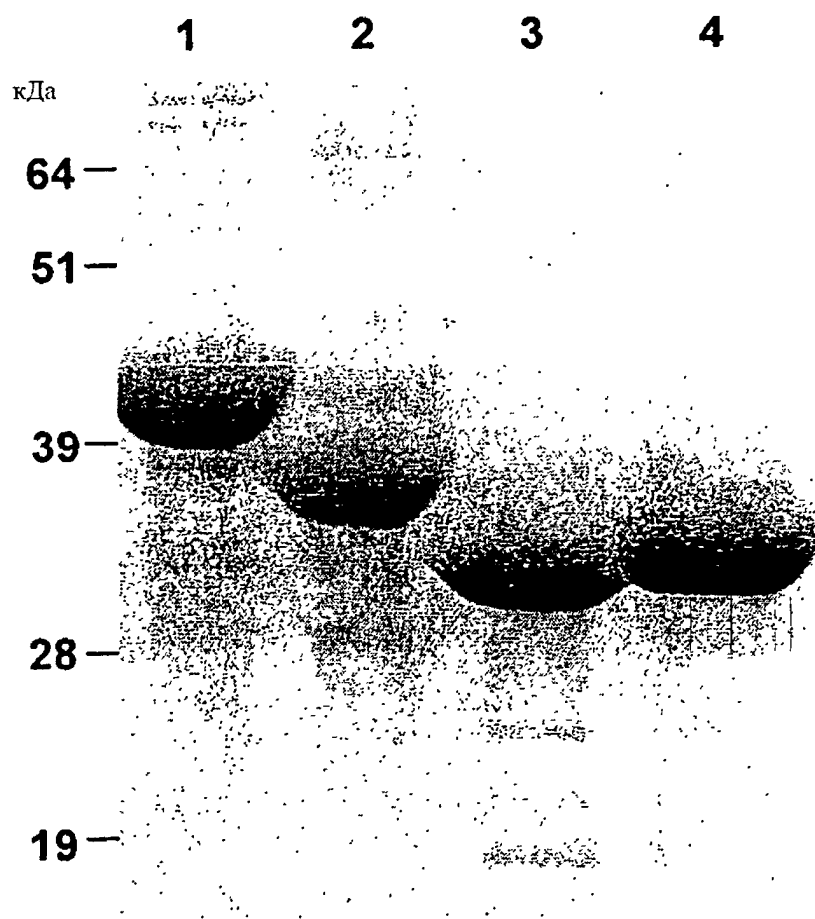
12. Композиция для индуцирования иммунного ответа против *P. gingivalis*, содержащая эффективное количество химерного или гибридного белка по любому из пп.1, 8 или 11.

13. Композиция по п.12, дополнительно содержащая вспомогательное вещество.

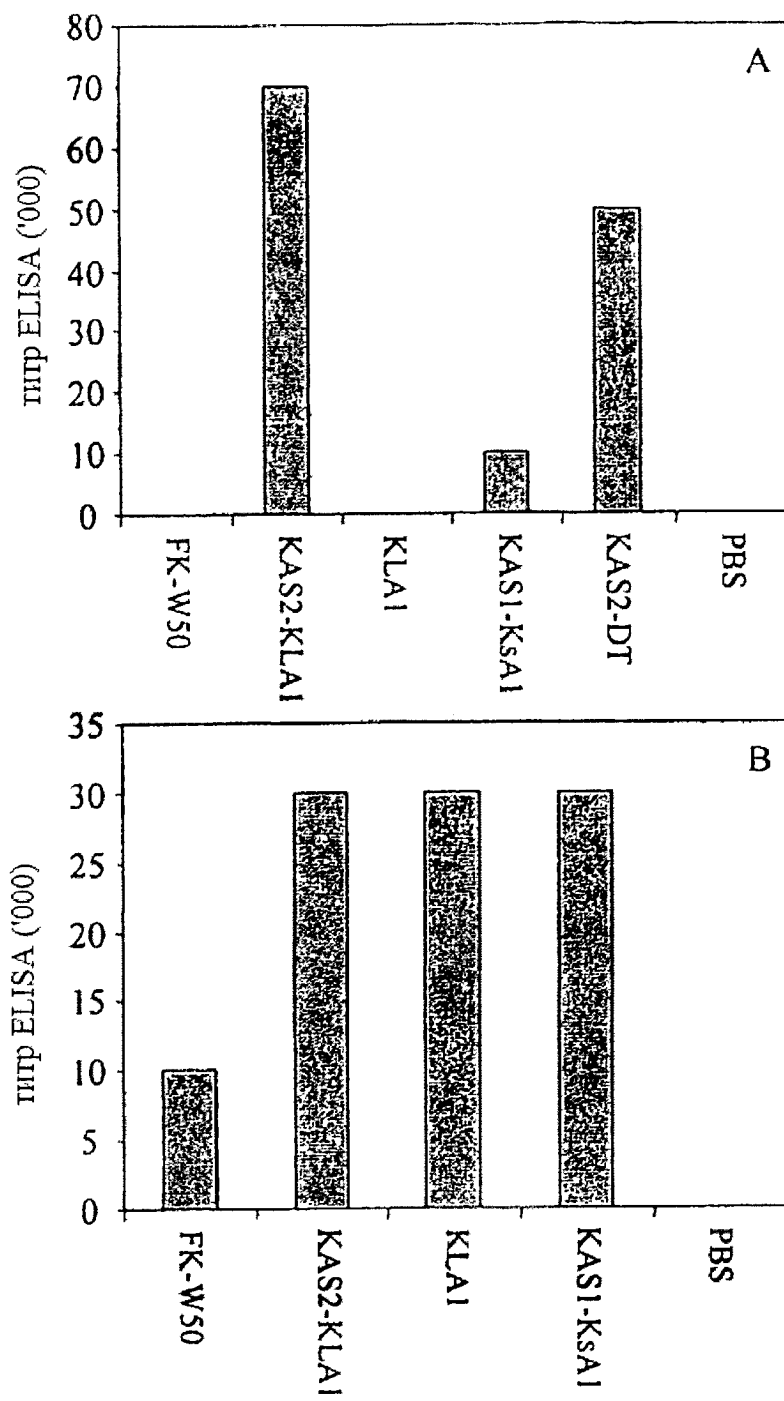
14. Способ профилактики состояния или заболевания, связанного с *P. Gingivalis* у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества химерного или гибридного белка по любому из пп.1, 8 или 11.

15. Применение химерного или гибридного белка по любому из пп.1, 8 или 11 для определения антител к *P. gingivalis* в биологическом образце.

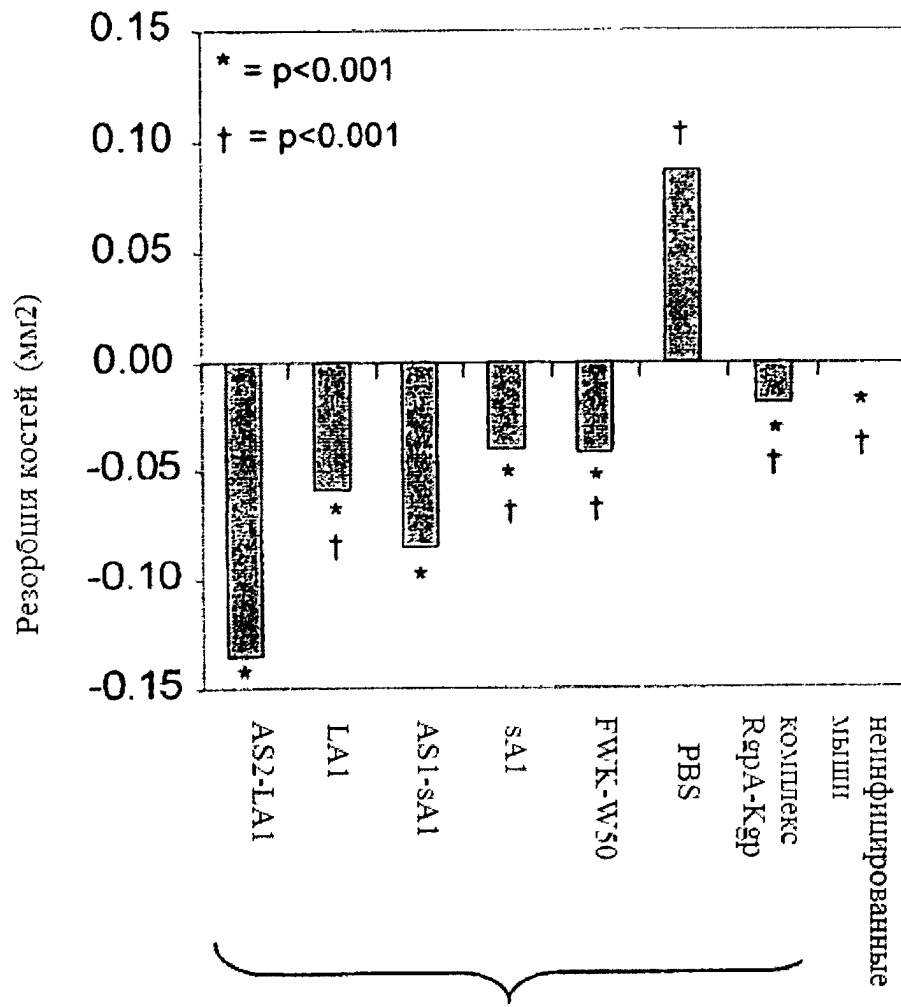
16. Способ снижения частоты или тяжести состояния или заболевания, связанного с *P. Gingivalis* у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества химерного или гибридного белка по любому из пп.1, 8 или 11.



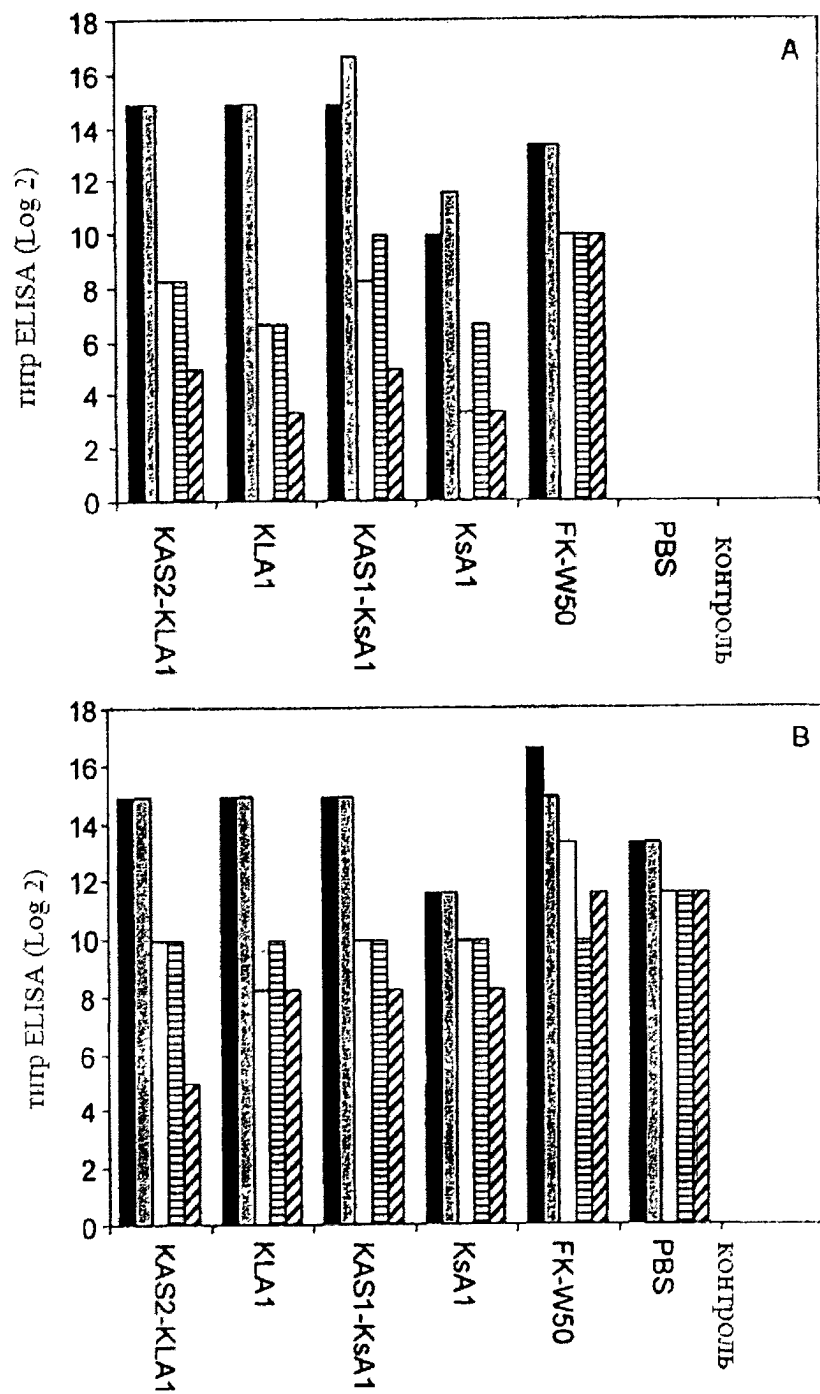
ФИГ. 1



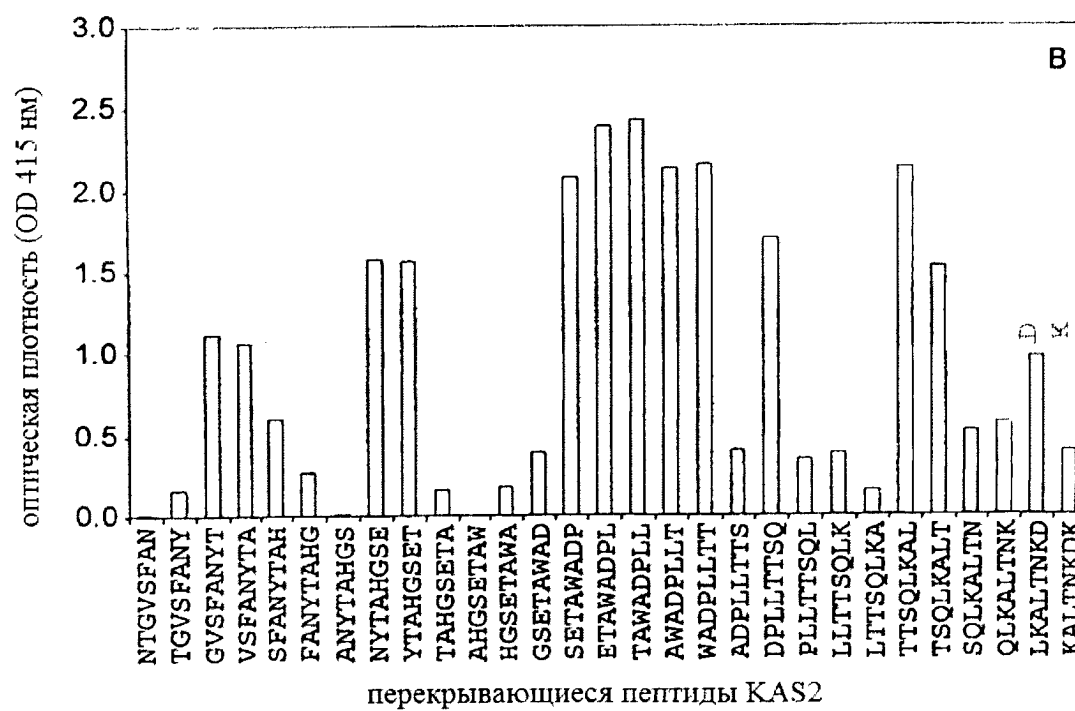
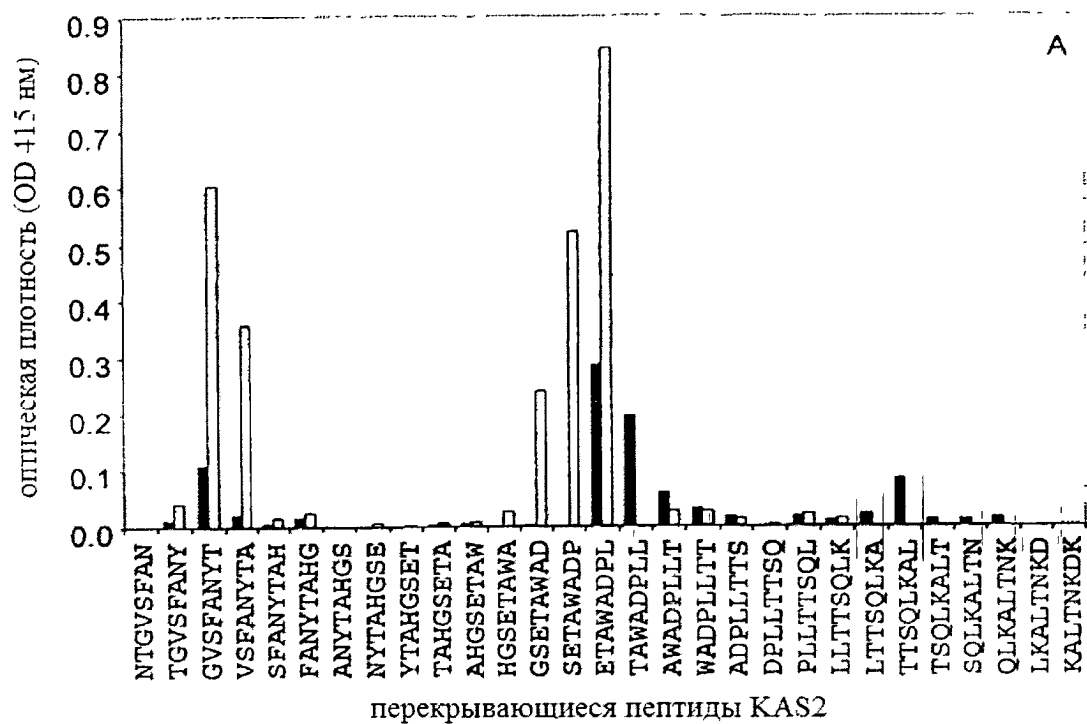
ФИГ. 2



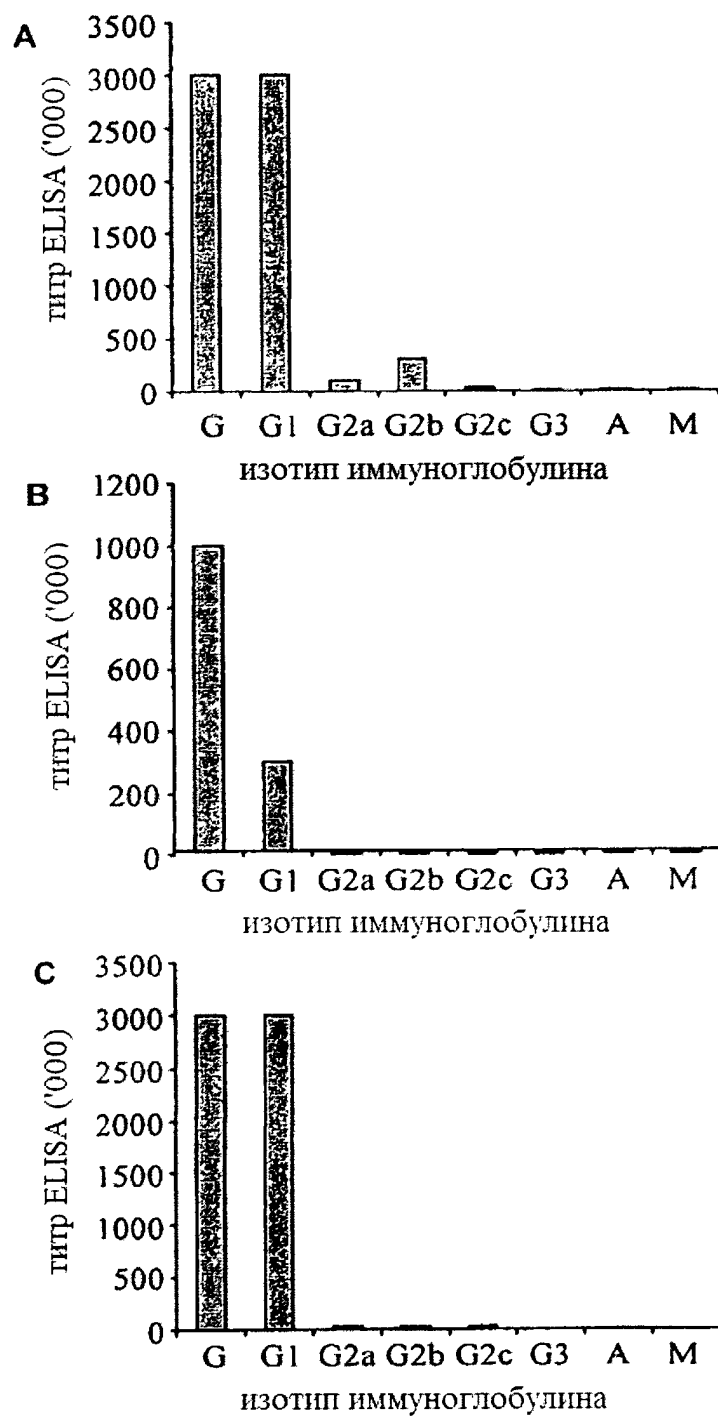
ФИГ. 3



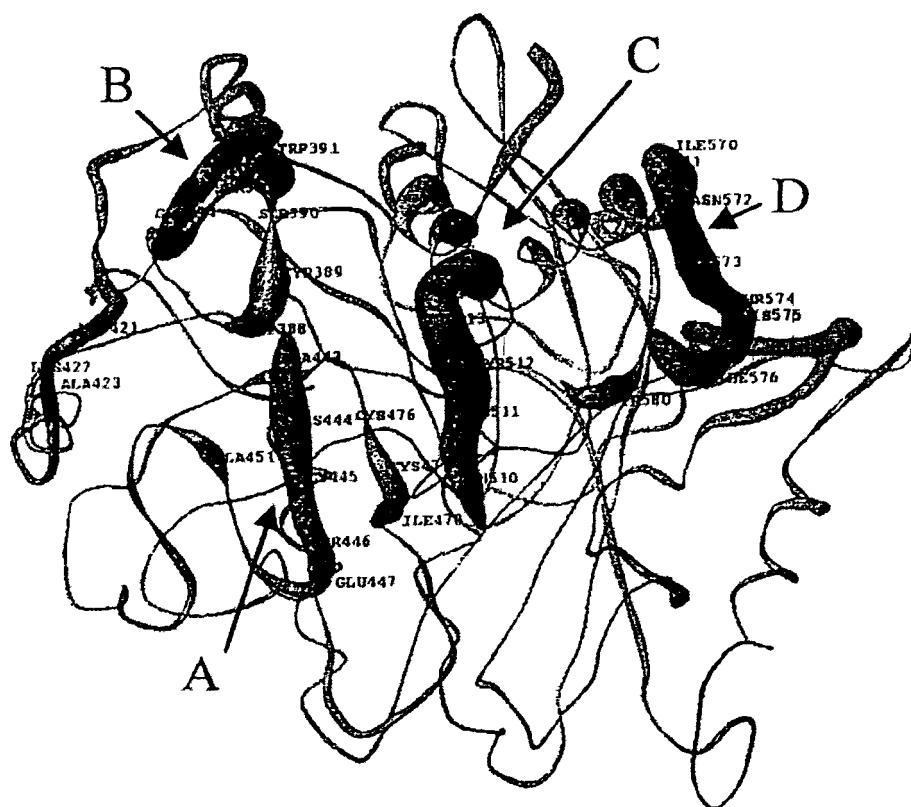
ФИГ. 4



ФИГ. 5



ФИГ. 6



ФИГ. 7