

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201990633 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2019.11.29

(22) Дата подачи заявки
2017.09.13

(51) Int. Cl. C07K 14/195 (2006.01)
A61K 39/02 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)

(54) БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ИНГИБИТОРЫ

(31) 62/401,572; 62/404,690

(32) 2016.09.29; 2016.10.05

(33) US

(86) PCT/US2017/051352

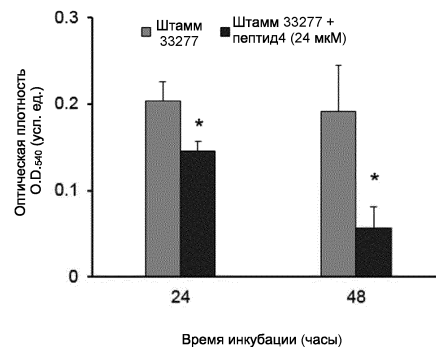
(87) WO 2018/063801 2018.04.05

(71) Заявитель:
МЕХАРРИ МЕДИКАЛ КОЛЛЕДЖ
(US)

(72) Изобретатель:
Се Хуа (US)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Предложены пептиды, относящиеся к особым участкам фермента аргининдеиминазы бактерии *Streptococcus cristatus*, препятствующие образованию биоплёнок, содержащих патоген полости рта *Porphyromonas gingivalis*, и модулирующие вирулентность *P. gingivalis*. Предложены фармацевтические композиции, содержащие указанные пептиды, и способы их применения.



A1

201990633

201990633

A1

Бактериальные ингибиторы

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 62/401,572, поданной 29 сентября 2016 г. (находится на рассмотрении) и приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 62/404,690, поданной 5 октября 2016 г. (находится на рассмотрении). Содержание обеих заявок полностью включено посредством ссылок.

ЗАЯВЛЕНИЕ ОТНОСИТЕЛЬНО ИССЛЕДОВАНИЯ ИЛИ РАЗРАБОТКИ, ФИНАНСИРУЕМОЙ ИЗ ФЕДЕРАЛЬНОГО БЮДЖЕТА

Настоящее изобретение создано при государственной поддержке в соответствии с грантами с номерами DE022428, DE014699, DE025332, DE012505 и DE023193, присужденными NIDCR, и грантом с номером RR024975, присужденным NCRР (в настоящее время при посредничестве NCATC значащегося как грант номер 000445). Государство имеет определенные права на данное изобретение.

В настоящей заявке «государство» относится к государственной власти Соединенных Штатов Америки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

А. ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится, в целом, к лечению и профилактическим мероприятиям в отношении заболеваний, опосредованных микробами. Предложены соответствующие виды лечения и профилактические мероприятия, так же как способы, для применения в соответствии с указанным назначением.

В. УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Периодонтит представляет собой одно из наиболее широко распространенных инфекционных заболеваний во взрослом возрасте; по существующим оценкам от 5 до 20% населения Земли страдает от генерализованного хронического периодонтита. Помимо

непосредственного влияния на состояние полости рта, существует связь между периодонтитом и некоторыми тяжелыми хроническими заболеваниями, такими как ишемическая болезнь сердца и диабет. Причиной хронического периодонтита служит нарушение гомеостаза ткани периодонта и микроорганизмов, приводящее впоследствии к неконтролируемому воспалению. В полости рта можно обнаружить тысячу видов бактерий, у одного индивидуума их может быть около двухсот. По-видимому, *Porphyromonas gingivalis* является ключевым патогеном и играет важную роль в развитии микробиоты, провоцирующей развитие периодонтита. Несмотря на то, что *P. gingivalis* представляет собой вид, который редко встречается в биоплёнках, было выявлено, что он существенно изменяет состав бактерий-комменсалов в полости рта мышей, включая виды *Streptococcus*. *P. gingivalis* вовлекается в бактериальные сообщества видами, участвующими в первых этапах колонизации, такими как стрептококки полости рта. Несмотря на то, что нет прямых свидетельств, что виды, участвующие в первых этапах колонизации, связаны с периодонтитом, некоторые из этих организмов могут обеспечивать субстрат для патогенов, вызывающих периодонтит и поддерживать их метаболизм. Примечательно, что *in vitro* и *in vivo* была показана важность коагрегации или коадгезии при образовании биоплёнок зубного налета. Примером хорошо изученного взаимодействия видов, участвующих в ранних и последующих этапах колонизации, является коадгезия *Streptococcus gordonii* и *P. gingivalis* при образовании зубного налета. В исследованиях было показано участие в этом процессе различных групп адгезинов. Поэтому, вероятно, что подобные специфические белок-белковые взаимодействия способствуют колонизации *P. gingivalis* существующих биоплёнок, состоящих из *S. gordonii* и родственных стрептококков полости рта.

Несмотря на то, что антагонистические взаимоотношения изучены меньше, существуют сообщения об антагонизме бактерий полости рта. Например, *P. gingivalis* не образует содержащую два вида бактерий биоплёнку со *Streptococcus oralis*, не происходит и его коагрегация со *Streptococcus mutans*.

Периодонтит вызывают биоплёнки, а не бактерии в свободном («планктонном») состоянии, поэтому колонизация *P. gingivalis* с образованием зубного налета является ключевым этапом инициации периодонтита. Действительно, большая часть клинических изолятов *P. gingivalis* характеризуется наличием фимбрий, в особенности те из них, которые выделены со дна зубодесневых карманов. Фимбрии первого типа (длинные фимбрии), образованные белком FimA, являются хорошо изученными факторами вирулентности, принимающими участие в колонизации, образовании биоплёнок,

проникновении в клетки организма, резорбции костной ткани и в избегании защитных систем организма. Было показано, что индукция иммунного ответа на белок FimA фимбрий *P. gingivalis*, начинается с его распознавания при взаимодействии с толл-подобным рецептором 2; в результате активируется путь передачи сигнала, зависимый от MyD88, опосредующий противомикробную активность; путь передачи сигнала, зависимый от фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K), стимулирующий адгезию: продукция компонента рецептора белка системы комплемента 3 (CR3) – интегрин $\beta 2$ и/или фактора некроза опухолей α (TNF- α).

Лечение периодонтита, как правило, включает в себя механические способы лечения, как хирургические так и нехирургические, которые иногда дополняют системным или местным введением антибиотиков, особенно при лечении острого или трудно поддающегося лечению периодонтита. По-видимому, дополнительное применение антибиотиков улучшает результаты механических способов лечения. Однако результаты метаанализа говорят о том, что польза от лечения антибиотиками уравнивается их побочными эффектами. Сомнения в необходимости применения антибиотиков связаны с тем, что они нарушают полезное взаимодействие между организмом человека и микробиотой комменсалов и приводят к возникновению устойчивости бактерий полости рта к антибиотикам.

Таким образом, существует необходимость в способах лечения, способных специфически препятствовать колонизации периодонтальными патогенами, такими как *P. gingivalis*, не способствующих при этом возникновению устойчивости к антибиотикам и не приводящих к уничтожению популяции полезных бактерий. Необходимы также способы, препятствующие патогенности *P. gingivalis* и противодействующие его способности к образованию биоплёнок.

Краткое описание изобретения

Было обнаружено, что определенные (но не все) фрагменты аргининдеаминазы бактерии *Streptococcus cristatis* можно применять для борьбы с инфекцией *P. gingivalis*. Их действие состоит в предотвращении образования биоплёнок, содержащих патоген полости рта *P. gingivalis* и в способности снижать экспрессию белков, связанных с вирулентностью патогена полости рта *P. gingivalis* (например, белка основной субъединицы короткой фимбрии Mfa1, контролируемого геном *mfa1*), каталитического домена протеазы гингипейн (Gingipain) R1 (RgpA/B), адгезинового домена гингипейн R1 и лизиновой

протеазы гингипейн (Kgp, контролируемого геном *kgp*). Некоторые из указанных фрагментов находятся в С- концевом участке белка, в то время как участок, отвечающий за деиминазную активность фермента находится в N-концевом участке. Другие фрагменты находятся в N-концевом участке, несмотря на то, что было обнаружено, что N-концевой участок в целом не обладает активностью, которая обеспечивает образование биоплёнки.

Согласно первому аспекту настоящего изобретения предложен пептид для модуляции процесса образования биоплёнки бактерией, с последовательностью, которая идентична по меньшей мере одной из последовательностей SEQ ID NO: 2 – 7 не менее, чем на 60%, и при этом указанный пептид не имеет существенной активности аргининдеиминазы.

Согласно второму аспекту настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция для лечения или профилактики симптома или состояния, связанного с зубным налетом, содержащая соединение, содержащее последовательность пептида, которая идентична по меньшей мере одной из последовательностей SEQ ID NO: 2 – 7 не менее, чем на 60%, и при этом указанный пептид не имеет существенной активности аргининдеиминазы.

Согласно третьему аспекту настоящего изобретения предложен способ лечения или профилактики симптома или состояния субъекта, связанного с зубным налетом, включающий местное введение (применение) к поверхностям зуба и/или десны пациента терапевтически эффективного количества соединения, содержащего последовательность пептида, которая идентична по меньшей мере одной последовательности SEQ ID NO: 2 – 7 не менее, чем на 60%, и при этом указанный пептид не имеет существенной активности аргининдеиминазы.

Согласно четвертому аспекту настоящего изобретения предложено применение соединения для получения фармацевтической композиции для лечения или профилактики связанного с зубным налетом симптома или состояния, где указанное соединение содержит последовательность пептида, которая по меньшей мере идентична одной из последовательностей SEQ ID NO: 2 – 7 не менее, чем на 60%, и при этом указанный пептид не имеет существенной активности аргининдеиминазы.

Согласно пятому аспекту настоящего изобретения предложен способ снижения вероятности образования биоплёнки, содержащей популяцию *Porphyromonas gingivalis* на поверхности, включающий воздействие на указанную поверхность эффективной

концентрации соединения, содержащего последовательность пептида, идентичную по меньшей мере одной из последовательностей SEQ ID NO: 2 – 7 не менее, чем на 60%, и при этом указанный пептид не имеет существенной активности аргининдеиминазы.

Согласно шестому аспекту настоящего изобретения предложен способ снижения уровня экспрессии гена бактерии, связанного с биоплёнкой, включающий воздействие на бактерию эффективной концентрации соединения, содержащего последовательность пептид, которая идентична по меньшей мере одной из последовательностей SEQ ID NO: 2 – 7 не менее, чем на 60%, и при этом указанный пептид не имеет существенной активности аргининдеиминазы.

Согласно седьмому аспекту настоящего изобретения предложена нуклеиновая кислота, кодирующая пептид согласно первому аспекту настоящего изобретения, или комплементарная нуклеиновой кислоте, кодирующей указанный пептид.

Согласно восьмому аспекту настоящего изобретения предложен способ снижения уровня экспрессии гена, ассоциированного с вирулентностью у бактерии, включающий осуществление воздействия на указанную бактерию эффективной концентрации соединения, содержащего последовательность пептида, которая идентична по меньшей мере одной из последовательностей SEQ ID NO: 3 – 7 не менее, чем на 60%, где указанный ген, ассоциированный с вирулентностью, выбран из группы состоящей из: белка основной субъединицы короткой фимбрии (*mfa1*), каталитического домена гингипейн R1 (*rgpA/B*), адгезинового домена протеазы гингипейн R1 (*rgpA*) и лизиновой протеазы гингипейн (*kgp*).

Вышеизложенное представляет собой упрощенное краткое изложение, сделанное с целью обеспечения базового понимания некоторых аспектов заявленного изобретения. Данное краткое изложение не является исчерпывающим. Оно не ставит своей целью выделить ключевые или критические составные элементы или ограничить объем заявленного изобретения. Данное изложение служит лишь для того, чтобы представить в упрощенной форме некоторые концепции как вводная часть для представленного ниже более подробного описания.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фиг. 1А-1В. Показан уровень экспрессии гена *fimA* в клетках *P. gingivalis* в контакте с *S. cristatus*. Значения погрешностей представляют стандартные отклонения. Звездочка

указывает на статистически достоверное различие в уровнях экспрессии гена *fimA* в клетках *P. gingivalis* (n=3; t-критерий; p<0,05).

Фиг.2. Показано полученное с помощью иммунофлуоресцентного анализа с применением антител изображение взаимодействия *P. gingivalis* штамма 33277 или *A. actinomycetemcomitans* штамма Y4 с ArgA. В верхнем ряду снимки, полученные с помощью дифференциальной интерференционно-контрастной микроскопии (DIC), на которых видно расположение бактерий. Красный цвет на снимках в нижнем ряду – флуоресценция TRITC, которым были помечены антитела, специфичные к белку ArgA *S. cristatus*; таким образом визуализирован белок ArgA, связавшийся с клетками *P. gingivalis* штамма 33277 и с клетками *A. actinomycetemcomitans* штамма Y4.

Фиг.3. Показано взаимодействие между белком ArgA и белками поверхности *P. gingivalis*. Результатами ДСН-электрофореза в полиакриламидном геле (SDS-PAGE) являются три основных полосы, которые были идентифицированы как белок RagB (PGN_0294) *P. gingivalis*, белок ArgA *S. cristatus* и белок PGN_0806, принадлежащий к семейству белков протонного канала MotA/TolQ/ExbB. Дорожка 1 – экстракт только *P. gingivalis*; Дорожка 2 – экстракт только штамма CC5A; Дорожка 3 – экстракты *P. gingivalis* и штамма CC5A *S. cristatus*.

Фиг.4. Показано относительное связывание пептидов из набора с экстрактами поверхностных структур штаммов *P. gingivalis*: 33277 (верхняя кривая), мутанта 0782 (средняя кривая) и мутанта ragB (нижняя кривая). На графике интенсивности сигнала, считанного с микрочипа, несущего набор пептидов, видны пики, соответствующие отдельным участкам белка ArgA. Пять самых выраженных пиков пронумерованы.

Фиг.5. Показана активность пептида4 в отношении ингибирования экспрессии генов, связанных с вирулентностью *P. gingivalis*. Определяли концентрацию полумаксимального ингибирования (IC50), проводя три независимых эксперимента по определению уровней мРНК *fimA*, *mfa1*, *rgpA/B* и *kgp* в присутствии пептида4 в концентрациях 0, 4, 16 и 64 мкМ. Величину IC50 для каждого гена вычисляли, используя программу-надстройку для Microsoft Excel для аппроксимации кривых. Звездочки указывают на статистически достоверное различие величины IC50 пептида4 для отдельных генов по сравнению с геном *fimA* (P < 0,05; t-критерий).

Фиг 6А – 6В. Показано сравнение экспрессии генов, связанных с вирулентностью *P. gingivalis* у штамма 33277 и мутантных штаммов на его основе. Уровень экспрессии *fimA*,

mfa1, *rgpA/B*, *rgpA* и *kgp* определяли с помощью qRT-PCR. Штаммы *P. gingivalis* культивировали на среде TSB в отсутствие пептида4 и в его присутствии в концентрации 16 мкМ. (А) Уровни мРНК указанных генов у штаммов 33277, *pgn_0806* и *ragB*, выращенных на среде с добавлением пептида4 показаны относительно уровней экспрессии *P. gingivalis* 33277 на среде без пептида4 (1 единица). (В) Мутанты по генам *fimR* (Δ *fimR*) и *fimS* (Δ *fimS*) росли в присутствии и в отсутствие пептида4. Каждый столбец диаграммы представляет уровень экспрессии генов *fimA* или *mfa1* мутантных штаммов, растущих с пептидом4 (16 мкМ) относительно уровней экспрессии у штаммов, росших без пептида4 (1 единица). Показанные результаты представляют собой среднее со стандартными отклонениями, полученными из трех независимых экспериментов. Звездочки указывают на статистически достоверные различия в уровнях экспрессии генов у штаммов *P. gingivalis*, выращенных в присутствии и в отсутствие пептида4 ($P < 0,05$; t-критерий).

Фиг. 7А – 7В. Показана продукция белков фимбрий и протеаз гингипейн у *P. gingivalis* в ответ на пептид4. (А) Уровни экспрессии белков *FimA*, *Mfa1*, представителя протеаз гингипейн *Hgp44* и белка *PGN_0128* (иммунореактивного антигена массой 53 кДа) в экстрактах поверхностных структур *P. gingivalis* штамма 33277, подвергнутого действию пептида4 в концентрациях 0, 3, 12 и 48 мкМ, анализировали при помощи вестерн-блоттинга. (В) Полуколичественную оценку вестерн-блотов провели при помощи программы ImageJ. Каждый столбец диаграммы представляет интенсивность полосы белка. Звездочка указывает на статистически достоверное различие между относительной интенсивностью полос для *P. gingivalis*, подвергшейся действию пептида4 (3, 12 или 48 мкМ) по сравнению с теми же белками у *P. gingivalis*, не подвергавшейся данному воздействию (0 мкМ, 1 единица) ($P < 0,05$; t-критерий).

Фиг. 8А – 8В. Показана трансмиссионная электронная микроскопия фимбрий *P. gingivalis*. Фимбриальные структуры визуализировали, используя трансмиссионный электронный микроскоп. *P. gingivalis* штамма 33277 культивировали на чашках на среде TSB в течение 48 часов без пептида4 (А) или в его присутствии (В), затем готовили препараты путем негативного контрастирования молибдатом аммония. Размер линейки – 0,2 мкм.

Фиг. 9А – 9В. Сопоставлены кривые роста штаммов *P. gingivalis* в присутствии и в отсутствие P4. *P. gingivalis* штамм 33277 (А) и W83 (В) культивировали в среде TSB в отсутствие и в присутствии P4 (24 мкМ). На протяжении 30 часов измеряли OD₆₀₀ -

оптическую плотность культуры. Кривые отображают среднее из трех проб, планками погрешностей показаны стандартные отклонения.

Фиг. 10А – 10В. Показана количественная оценка способности прикрепления *P. gingivalis* к поверхности, покрытой слюной. Анализ прикрепления проводили в 96-луночных полистиреновых микротитровальных планшетах. Лунки предварительно покрывали цельной слюной человека, засеивали *P. gingivalis* штамм 33277 (А) или W83 (В) и инкубировали либо с Р4 (24мкМ), либо с контрольным пептидом при 37°С в анаэробной среде. Способность *P. gingivalis* к прикреплению и образованию микроколоний на поверхности оценивали после окрашивания кристаллвиолетом. Каждый столбец представляет среднее ± стандартное отклонение величины способности к прикреплению из трех независимых экспериментов.

Фиг. 11. Показано образование *P. gingivalis* 33277 и *S. gordonii* DL1 гетеротипических биоплёнок. Биоплёнки *S. gordonii* DL1 формировали на полистиреновых поверхностях, покрытых цельной слюной человека. *P. gingivalis* 33277, которую культивировали с пептидом Р4 (24 мкМ) или без него, помещали на 4 часа для взаимодействия с биоплёнкой *S. gordonii* DL1. Включившиеся в состав биоплёнки клетки *P. gingivalis* 33277 подсчитывали при помощи qPCR. Каждый столбец представляет количество *P. gingivalis* 33277, обнаруженных в биоплёнке. Планки погрешностей обозначают стандартные отклонения.

Фиг 12А – 12D. Показано диспергирование *P. gingivalis* из гетеротипических биоплёнок под действием Р4. *P. gingivalis* 33277, выращенную без Р4, помещали в лунки шестилуночного планшета, покрытые биоплёнкой *S. gordonii* DL1, для образования гетеротипических биоплёнок. Затем в лунки добавляли Р4 (24 мкМ). Количество клеток *P. gingivalis* в ростовой среде (А), связавшихся с биоплёнками *S. gordonii* (В), общее количество *P. gingivalis* 33277 в лунках и количество *S. gordonii* в ростовой среде определяли, используя qPCR. Сравнивали количество бактериальных клеток в лунках в присутствии Р4 или без него; звездочка указывает на статистически достоверное различие в числе клеток *P. gingivalis* в лунках в присутствии или в отсутствие Р4 ($P < 0,05$; t-критерий).

Фиг. 13А – 13В. Показано опосредованное пептидом Р4 ингибирование инвазии *P. gingivalis* в кератиноциты полости рта. Количество проникших в кератиноциты полости рта человека (НОК) клеток *P. gingivalis* определяли при помощи теста защиты от

антибиотиков. *P. gingivalis* штамм 33277 (А) или W83 (В) культивировали с 24 или 48 мкМ Р4 соответственно. Число интернализированных клеток *P. gingivalis* представлено в виде среднего \pm стандартное отклонение из трех наблюдений. Звездочка указывает на статистически достоверное различие в уровнях инвазии для клеток *P. gingivalis*, культивируемых в присутствии или в отсутствие Р4 ($P < 0,05$; t-критерий).

Фиг. 14А – 14D. Показано сравнение активности протеаз гингипейн в клетках *P. gingivalis*. Исследовали ферментативную активность белков Rgp или Kgp, связанную с клетками *P. gingivalis* (А-В) или в культуральной среде *P. gingivalis* (С-Д). *P. gingivalis* штаммов 33277 или W83 выращивали в присутствии или в отсутствие Р4 (48 мкМ) в течение 24 часов, затем бактериальные клетки и ростовую среду разделяли центрифугированием. Измерения активности протеаз гингипейн штамма KDP128 (мутант rgpA⁻, rgpB⁻ и kgp⁻) оценивали, что служило негативным контролем. Звездочки указывают на статистически достоверное различие уровней активности протеаз у штаммов *P. gingivalis*, выращенных в присутствии и в отсутствие Р4 ($P < 0,05$; t-критерий).

Фиг 15А – В. Показано определение уровня IL-8 в ростовой среде клеток НОК. Клетки НОК подвергали воздействию *P. gingivalis* штаммов 33277 или W83 при множественности заражения (MOI – multiplicity of infection) равной 10 в течение 2 и 18 часов, после чего супернатант и клетки НОК собирали, соответственно. Содержание IL-8 в культуральной среде (а – б) определяли при помощи ИФА, используя набор ELISArray. Каждый столбец представляет среднее значение и стандартное отклонение из трех повторов. Звездочки указывают на статистически достоверное различие концентрации IL-8 в супернатантах культур НОК, обработанных *P. gingivalis*, выращенной в присутствии и в отсутствие Р4 ($P < 0,05$; t-критерий).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

А. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Если не указано иное, все термины (включая технические и научные термины), используемые в настоящей заявке, имеют то же значение, которое обычно подразумевается специалистом в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Кроме того, следует понимать, что термины, определение которых приведено в общепринятых словарях, следует интерпретировать в значении, соответствующем их значению в контексте данного изобретения, и не следует понимать в идеализированном или избыточно формальном смысле, если это специально не указано в

настоящей заявке. Для краткости или ясности общеизвестные функции или конструкции могут не быть подробно описаны.

Терминология, используемая в настоящей заявке, предназначена лишь для описания конкретных вариантов реализации и не является ограничивающей. В настоящей заявке формы единственного числа включают также формы множественного числа, если из контекста очевидно не следует иное.

Термины «первый», «второй» и т.п. использованы в настоящем изобретении для описания различных признаков или элементов, но указанные признаки или элементы не следует ограничивать данными терминами. Данные термины использованы лишь для того, чтобы отличать один признак или элемент от другого признака или элемента. Таким образом, первый признак или элемент, рассмотренный ниже, может быть назван вторым признаком или элементом, и таким же образом второй признак или элемент, рассмотренный ниже, может быть назван первым признаком или элементом, без отступления от сущности, раскрытой в рамках настоящего изобретения.

Термин «состоящий по существу из» означает, что, помимо перечисленных элементов, заявленный объект изобретения может содержать также другие элементы (стадии, структуры, ингредиенты, компоненты и т.д.), которые не ухудшают функциональность заявленного объекта изобретения в отношении его предполагаемого назначения, указанного в данном описании. Важно, что данный термин исключает другие элементы, ухудшающие функциональность заявленного объекта изобретения в отношении его предполагаемого назначения, указанного в данном описании, даже если указанные другие элементы могут улучшать функциональность заявленного объекта изобретения для какой-либо другой цели.

Термины «примерно» и «приблизительно» обычно означают допустимую степень погрешности или отклонения для измеренного количественного значения, с учетом природы или точности измерений. Как правило, типичная величина погрешности или отклонения находится в пределах 20 процентов (%), предпочтительно в пределах 10% и более предпочтительно в пределах 5 % от данного значения или диапазона значений. Для биологических систем термин «приблизительно» относится к допустимому стандартному отклонению или погрешности, предпочтительно не превышающей 2-кратное значение от указанной величины. Если не указано иное, числовые значения, представленные в настоящем описании, являются приблизительными, то есть термин «примерно» или

«приблизительно» подразумевается, не будучи указанным в явном виде. Числовые значения в составе формулы изобретения являются точными, если не указано иное.

Термины «профилактика», «предупредить», «предупреждающий», «подавление», «подавлять» и «подавляющий», используемые в настоящем изобретении, относятся к порядку действий (таких как введение фармацевтической композиции), осуществляемых до возникновения клинических проявлений болезни или патологического состояния, с целью снижения их вероятности или тяжести. Эффективность таких действий не подразумевает стопроцентное снижение вероятности или тяжести.

Термины «лечение», «лечить» и «лечащий» в настоящем изобретении относятся к порядку действий (таких как применение фармацевтической композиции), осуществляемых после возникновения клинических проявлений болезни или патологического состояния, с целью устранения или снижения уровня клинических проявлений болезни или патологического состояния. Эффективность лечения не подразумевает стопроцентного результата.

Термин «нуждающийся в лечении» в настоящем изобретении относится к принятому лицом, осуществляющим уход или лечение, решению о том, что пациент нуждается в лечении, или получит от лечения пользу. Такое решение принимают на основании различных факторов, относящихся к сфере профессиональной компетенции лица, осуществляющего уход или лечение, но которые включают информированность о том, что пациент болен или заболит в результате состояния, которое можно лечить с применением способа или устройства согласно настоящему изобретению.

Термин «нуждающийся в профилактике» в настоящей заявке относится к принятому лицом, осуществляющим уход или лечение, решению о том, что пациент нуждается в профилактике, или получит от профилактики пользу. Такое решение принимают на основании различных факторов, относящихся к сфере профессиональной компетенции лица, осуществляющего уход или лечение, но которые включают информированность о том, что пациент заболит или может заболеть в результате состояния, которое можно предупредить с применением способа или устройства согласно настоящему изобретению.

Термин «индивидуум», «субъект» или «пациент» в настоящей заявке относится к любому животному, включая млекопитающих, таких как мыши, крысы, другие грызуны, кролики, собаки, кошки, свиньи, крупный рогатый скот, овцы, лошади или приматы, а также

людей. Указанный термин может относиться к самцам или самками, или к обоим полам, или может исключать самцов или самок.

Термин «терапевтически эффективное количество» (или просто «эффективное количество») в настоящей заявке относится к количеству соединения, используемого как отдельно, так и в составе фармацевтической композиции, способному оказывать любое доступное для обнаружения, положительное влияние на любой симптом, клиническое проявление или характеристики болезни или состояния. Положительное влияние не подразумевает стопроцентного результата.

Термин «фармацевтически приемлемые соли» в настоящей заявке включает соли активных соединений, полученные из относительно нетоксичных кислот или оснований, в зависимости от того, какие замещающие группы присутствуют в конкретных соединениях, описанных в настоящем документе. Если соединения согласно настоящему изобретению содержат функциональные группы, обуславливающие их относительно кислотные свойства, можно получить их соли за счет присоединения оснований, приводя в контакт нейтральную форму таких соединений с достаточным количеством требуемого основания, либо в чистом виде, либо в подходящем инертном растворителе. Примеры фармацевтически приемлемых солей, получаемых присоединением оснований, включают соли натрия, калия, кальция, аммония, органических аминов или магния, или подобные соли. Если соединения согласно настоящему изобретению содержат функциональные группы, обуславливающие их относительно основные свойства, можно получить их соли за счет присоединения кислот, приводя в контакт нейтральную форму таких соединений с достаточным количеством требуемой кислоты, либо в чистом виде, либо разбавленной в подходящем инертном растворителе. Примеры фармацевтически приемлемых солей, получаемых присоединением кислот, включают соли неорганических кислот, таких как соляная, бромистоводородная, азотная, угольная, однозамещенная угольная, фосфорная, однозамещенная фосфорная, двухзамещенная фосфорная, серная, однозамещенная серная, йодистоводородная или фосфорные кислоты и т.п., а также соли относительно нетоксичных органических кислот, таких как уксусная, пропионовая, изомаасляная, щавелевая, малеиновая, малоновая, бензойная, янтарная, субериновая, фумаровая, миндальная, фталевая, бензолсульфоновая, п-толилсульфоновая, лимонная, винная, метансульфоновая и т.п. Также включены соли аминокислот, такие как аргинат и т.п., и соли органических кислот, таких как глюкуроновая или галактуриновая кислоты и т.п. (см., например, Berge S.M. et al., "Pharmaceutical Salts", Journal of Pharmaceutical Science, 1977, 66, 1-19). Некоторые конкретные соединения согласно настоящему изобретению

содержат и основную, и кислотную функциональные группы, что позволяет получать соли этих соединений за счет присоединения как оснований, так и кислот.

Термин «нуклеотид» в настоящей заявке относится к любому нуклеотиду, природному или синтетическому. Он включает обычные основания ДНК и РНК (A, G, C, T, U), аналоги оснований, например, инозин, 5-нитроиндазол и другие, имидазол-4-карбоксамид, производные пуринов или пиримидинов, например, модифицированное пиримидиновое основание 6Н,8Н-3,4-дигидропиримидо[4,5-с][1,2]оксазин-7-он (иногда обозначаемый как основание “Р”, связывающееся с А или G) и модифицированное пуриновое основание N6-метокси-2,6-диаминопурин (иногда обозначаемый как основание “К”, связывающееся с С или Т), такие аналоги нуклеозидов как гипоксантин, N-4-метилдезоксигуанозин, 4-этил-2’-дезоксцитидин, 4,6-дифторбензимидазол и 2,4-дифторбензен, несущие пиреновый флуорофор аналоги нуклеозидов, входящие в состав зондов на основе конформационно-блокированных («закрытых») нуклеиновых кислот (LNA – locked nucleic acids), деаза- или аза-модифицированные пурины и пиримидины, пиримидины с заместителями в положении 5 или 6 и пурины с заместителями в положениях 2, 6 или 8, 2-аминоаденин (nA), 2-тиоурацил (sU), 2-амино-6-метиламинопурин, O-6-метилгуанин, 4-тио-пиримидины, 4-аминопиримидины, 4-диметилгидразин-пиримидины, O-4-алкил-пиримидины и гидрофобные аналоги оснований, образующие дуплексную ДНК без образования водородных связей. Основания могут соединяться за счет различных связей и конформаций, включая фосфодиэфирные, тиофосфатные или метилфосфонатные связи, пептидо-нуклеиновые связи.

Термин «полинуклеотид» в настоящей заявке относится к мультимерному соединению, содержащему соединенные нуклеотиды, образующие полимер, включая обычные РНК, ДНК, «закрытые» нуклеиновые кислоты (LNA – locked nucleic acids), конформационно-блокированные за счет внутримолекулярных мостиков нуклеиновые кислоты (BNA – bridged nucleic acids), сополимеры всех вышеупомянутых соединений и их аналогов.

Термин «нуклеиновая кислота» в настоящей заявке относится к одноцепочечным полинуклеотидам или к дуплексу из двух полинуклеотидов. Такие дуплексы не обязательно ренатурированы не всем протяжении и могут содержать разрывы (гэпы) и выпетливающиеся участки.

В настоящей заявке понятие «комплементарные» друг другу нуклеиновые кислоты означает, что нуклеотидная последовательность одной нити нуклеиновой кислоты,

благодаря ориентации атомов водорода нуклеотидов, связана водородными связями с последовательностью противоположающей нити нуклеиновой кислоты (безусловно, нить нуклеиновой кислоты может быть также и комплементарна самой себе). Обычно для ДНК А комплементарен Т и С комплементарен G, а для РНК С комплементарен G и U комплементарен А. Комплементарность может быть полной и существенной / достаточной. Полная комплементарность между двумя нуклеиновыми кислотами означает, что две нуклеиновые кислоты способны сформировать дуплекс, в котором каждое из оснований связано с комплементарным основанием согласно модели Уотсона и Крика. «Существенная» или «достаточная» комплементарность означает, что последовательность одной нити не полностью комплементарна последовательности противоположной нити, но между основаниями двух нитей образуется достаточное количество связей, чтобы образовать стабильный гибридный комплекс при данной совокупности условий гибридизации (таких как концентрация солей и температура). Эти условия можно прогнозировать, используя данные о последовательностях и стандартные модели для расчета температуры плавления (T_m) гибридизованных нитей или определяя температуру плавления эмпирически, используя признанные методы. Под T_m понимают температуру, при которой популяция гибридных комплексов, образованных нитями двух нуклеиновых кислот оказывается денатурированной на 50%. Температура ниже T_m способствует формированию гибридных комплексов, в то время как температура выше T_m способствует плавлению или разделению нитей гибридного комплекса. Специфичность гибридизации основана на температуре плавления (T_m) денатурированной нуклеиновой кислоты, как это изложено в Berger and Kimmel (1987, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology, 152, Academic Press, San Diego CA). T_m денатурированного дуплекса зависит от состава оснований дуплекса, частоты неспаренных оснований и от ионной силы реакционной среды. Специалист, обладающий обычной квалификацией, может рассчитать T_m , основываясь на этих двух факторах и используя общепринятые алгоритмы. Максимальная специфичность обычно имеет место при температуре приблизительно на 5°C ниже T_m , высокая специфичность – при температуре приблизительно на 5 - 10°C ниже T_m , средняя специфичность – при температуре приблизительно на 10 - 20°C ниже T_m и низкая специфичность – при температуре приблизительно на 20 - 25°C ниже T_m . Как должно быть понятно специалисту в данной области техники, гибридизация в условиях максимальной специфичности может быть использована для идентификации или обнаружения идентичных нуклеотидных последовательностей, в то время как гибридизация в условиях средней (или низкой) специфичности может быть использована для идентификации

сходных или родственных последовательностей. Термин «специфичный» в данной заявке относится к среднему уровню специфичности. Если не указано иное, любая ссылка на комплементарность в данном описании относится к комплементарности, обнаруживаемой в условиях средней специфичности. Такие термины как максимально специфичный, высоко специфичный, слабо специфичный относятся к условиям максимальной специфичности, высокой специфичности и низкой специфичности, соответственно.

Термин «пептид» относится к полимеру двух или более аминокислот. Составляющие его аминокислоты могут включать 20 «стандартных» аминокислот, но не ограничиваются ими и могут включать нестандартные или модифицированные аминокислоты.

В. АКТИВНЫЕ ФРАГМЕНТЫ АРГИНИНДЕИМИНАЗЫ

Было обнаружено, что отдельные фрагменты аргининдеаминазы *S. cristatus* можно использовать, чтобы влиять на образование биоплёнки *P. gingivalis*, влияя тем самым на многочисленные последующие осложнения, прямо или косвенно вызываемые этим широко распространённым патогеном. Соединения, содержащие подобные пептиды, могут, как следствие, иметь лечебный и профилактический эффект при периодонтите или наличии у пациента связанных с периодонтитом симптомов и состояний. Конкретно, было обнаружено, что можно подавлять образование биоплёнки *P. gingivalis*, используя соединения, содержащие пептид, имеющий последовательность с идентичностью по меньшей мере 60% с по меньшей мере одним из SEQ ID NO: 2-7 и отличающийся отсутствием существенной активности аргининдеаминазы. В настоящей заявке такие соединения обозначают как «активные соединения».

Последовательность аргининдеаминазы *S. cristatus* по имеющимся данным:

MSTHPHVFS EIGKLLKVML HRPGKELENL LPDYLERLLF DDIPFLEDAQ SEQ ID NO: 1
KENDAFAQAL RDEGIEVLYL EKLAAESLIS PEIREQFIEE YLEEANIRGR
ETKKAIRELL HGIKDNQELV EKTMAQVQKA ELPEIPDEAK GLTDLVESDY
PFAIDPMPNL YFTRDPFATI GNAVSLNHMF ADTRNRETTY GKYIFKYHPE
YAGKVELVYN REEDTRIEGG DELVLSKDVL AVGISQRTDA ASIEKLLVNI
FKKNVGFKKV LAFEFANNRK FMHLDTVFTM VDYDKFTIHP EIEGDLRVYS
VTYENEKLLI VEEKGDLAEL LAQNLGVEKV HLIRCGGGNI VAAGREQWND
GSNTLTIAPG VVVVYDRNTV TNKILEEYGL RLIKIRGSEL VRGRGGPRCM
SMPFEREEV

C-концевой домен подчеркнут (SEQ ID NO: 2). Некоторые варианты реализации пептида родственны фрагментам C-концевого домена (т. е. имеют с ними не менее, чем 60% идентичности); было обнаружено, что фрагмент C-концевого домена, состоящий из 208 аминокислот, оказывает влияние на экспрессию гена *fimA* *P. gingivalis*. Было также обнаружено, что C-концевой домен не обладает какой-либо деиминазной активностью. Другие варианты реализации пептида относятся к меньшим фрагментам C-концевого домена. Отдельные варианты реализации пептида относятся к по меньшей мере одному из нижеперечисленных фрагментов C-концевого домена, для которых была показана способность связываться с белками поверхности *P. gingivalis*: VYNREEDTRIEGGDEL (SEQ ID NO: 5), NIFKKNVGFKK (SEQ ID NO: 6), и ELVRGRGGPRCMSGMPF (SEQ ID NO: 7). Следует отметить, что по данным структурного моделирования в нативном белке пептид с последовательностью SEQ ID NO: 6 находится на конце α -спирали, за которой следуют несколько аминокислотных остатков, образующих нерегулярный поворот, за которыми, в свою очередь, располагается β -слой. Поэтому некоторые варианты реализации пептида содержат последовательность, родственную SEQ ID NO: 6, фланкированную 4 – 8 аминокислотными остатками с N-конца и с C-конца.

Некоторые варианты реализации пептида родственны фрагментам N-концевого домена. Хотя N-концевой домен в целом не влияет на экспрессию гена *fimA* *P. gingivalis*, было показано, что его малые фрагменты связываются с белками поверхности *P. gingivalis*. Конкретные примеры таких малых фрагментов включают в себя IRGRETKK (SEQ ID NO: 3) и NHMFADTRNRE (SEQ ID NO: 4).

Размер пептида можно варьировать исходя из специфики его применения. Например, изменяя размер пептида, можно корректировать его растворимость, устойчивость к протеазам и изоэлектрическую точку (pI). Некоторые варианты реализации пептида имеют размер от 5 до 208 аминокислот, другие варианты реализации имеют размер не более, чем 200, 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, или 5 аминокислот в длину.

Идентичность последовательности пептида должна составлять не менее 60%. В других вариантах реализации идентичность составляет не менее 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97.5%, 98%, 99%, 99.9%, 99.99% или 100%.

Специалист в данной области сможет определить подходящие варианты последовательностей SEQ ID NO: 2-7. Например, даже в относительно консервативных участках можно произвести замену нативных аминокислотных остатков на аминокислоты

со сходными химическими свойствами, сохраняя при этом активность (консервативные замены аминокислотных остатков). Поэтому даже участки, которые могут быть важны для биологической активности или структурной организации, можно подвергать консервативным заменам аминокислотных остатков, не нарушая при этом биологическую активность и не влияя негативно на структуру пептида.

В результате консервативных модификаций любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 2-7 (и соответствующих им модификаций кодирующих нуклеотидных последовательностей) можно получить производное пептида, имеющее сходные с нативными последовательностями функциональные и химические характеристики. В противоположность этому, значительных изменений функциональных и/или химических характеристик последовательностей SEQ ID NO: 2-7 можно достичь, подбирая замены, значительно отличающиеся своим влиянием на структуру каркаса молекулы в области замены.

Например, «консервативная замена аминокислот» может включать замену нативного аминокислотного остатка на ненативный остаток такой, что он либо слабо влияет, либо не оказывает влияния на полярность или заряд аминокислотного остатка в этом положении. Более того, любой нативный аминокислотный остаток в полипептиде может быть также заменен аланином.

Консервативные замены аминокислот также включают в себя не встречающиеся в природе аминокислотные остатки, которые обычно включают путем химического синтеза пептидов, а не при помощи синтеза в биологических системах. К такого рода производным относятся пептидомиметики и другие ревертированные или инвертированные формы функциональных групп аминокислот. Специалисту в данной области будет понятно, что молекулы нуклеиновых кислот и полипептидов, описанные в данной заявке, могут быть получены как методами химического синтеза, так и при помощи методик рекомбинации.

Существующие в природе аминокислотные остатки можно разделить на классы, основываясь на общих свойствах боковых цепей: 1) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile; 2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln; 3) кислотные: Asp, Glu; 4) основные: His, Lys, Arg; 5) аминокислотные остатки, которые влияют на ориентацию цепи: Gly, Pro; и 6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

Например, неконсервативные замены могут включать в себя замену представителя одного из этих классов на представителя другого класса. Такие замещенные аминокислотные остатки могут быть внедрены в участки последовательностей SEQ ID NO: 2-7, которые гомологичны у ортологов этих последовательностей или в негомологичные участки молекулы.

Производя такого рода изменения, следует учитывать индекс гидрофобности (hydrophobic index) аминокислот. Каждой аминокислоте был присвоен индекс гидрофобности на основе параметров ее гидрофобности и заряда; значения этих индексов: изолейцин (+4,5); валин (+4,2); лейцин (+3,8); фенилаланин (+2,8); цистеин/цистин (+2,5); метионин (+1,9); аланин (+1,8); глицин (-0,4); треонин (-0,7); серин (-0,8); триптофан (-0,9); тирозин (-1,3); пролин (-1,6); гистидин (-3,2); глутамат (-3,5); глутамин (-3,5); аспарат (-3,5); аспарагин (-3,5); лизин (-3,9); и аргинин (-4,5).

Важность индекса гидрофобности аминокислот для придания белку интерактивной биологической функциональности рассмотрена в статье (Kyte et al., J. Mol. Biol., 157:105-131, 1982). Известно, что отдельные аминокислоты могут быть заменены другими, имеющими сходный индекс гидрофобности или одинаковую оценку, с сохранением при этом биологической активности.

Основываясь на индексе гидрофобности при внесении изменений, возможно производить замены аминокислот, индекс гидрофобности которых отличается на +/-2, в других вариантах реализации индексы гидрофобности различались в пределах +/-1, в еще одном варианте реализации индексы гидрофобности различались в пределах +/-0,5.

В данной области техники известно также, что замены подобных аминокислот можно эффективно производить на основе гидрофильности. Расположение участков полипептида с максимальной гидрофильностью, обусловленной гидрофильностью расположенных рядом аминокислот, коррелирует с биологическим свойством белка.

Аминокислотным остаткам можно присвоить следующие значения гидрофильности: аргинин (+3,0); лизин (+3,0); аспарат (+3,0 +/-0,1); глутамат (+3,0 +/-0,1); серин (+0,3); аспарагин (+0,2); глутамин (+0,2); глицин (0); треонин (-0,4); пролин (-0,5 +/-0,1); аланин (-0,5); гистидин (-0,5); цистеин (-1,0); метионин (-1,3); валин (-1,5); лейцин (-1,8); изолейцин (-1,8); тирозин (-2,3); фенилаланин (-2,5); триптофан (-3,4).

Основываясь на индексе гидрофильности при внедрении изменений, возможно производить замены аминокислот, индекс гидрофобности которых отличается на +/-2, в других вариантах реализации индексы гидрофобности различались в пределах +/-1, в еще одном варианте реализации индексы гидрофобности различались в пределах +/-0,5.

Замены можно производить в целях увеличения или уменьшения растворимости пептида. Например, замена несущественных гидрофобных аминокислот на заряженные или полярные аминокислоты способствует увеличению растворимости. Замены можно также производить в целях снижения скорости биодegradации пептида, например, заменяя несущественные аминокислоты неприродными аминокислотами.

Специалист в данной области техники может определить, какие замены аминокислот (как консервативные, так и неконсервативные) можно произвести в тот момент, когда в них возникнет необходимость. Например, можно использовать замены аминокислот для выявления функционально значимых аминокислотных остатков в полипептиде Angptl4 или для того, чтобы снизить или повысить сродство последовательностей SEQ ID NO: 2-7 к определенной мишени с целью увеличения или уменьшения активности.

Примеры замен аминокислот даны в ТАБЛИЦЕ 1.

ТАБЛИЦА 1: Замены аминокислот		
Исходная аминокислота	Допустимая замена	Предпочтительная замена
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Glu	Glu
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucine	Leu
Leu	Ile, Val, Met, Ala, Phe, Norleucine	Ile
Lys	Arg, 1,4-diaminobutyric acid, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala, Gly	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, Norleucine	Leu

В дополнение к этому, специалист в данной области техники может проанализировать работы, касающиеся связи структуры и функций, в которых были выявлены аминокислотные остатки, играющие важную роль в структуре и биологической активности сходных полипептидов. С учетом такого сравнения можно предсказать важность тех аминокислотных остатков в последовательностях SEQ ID NO: 2-7, которые соответствуют важным для биологической активности и структуры аминокислотным остаткам сходных полипептидов. Специалист в данной области может выбрать сходные с точки зрения химии замены аминокислот для тех аминокислотных остатков последовательностей SEQ ID NO: 2-7, для которых была предсказана их важная роль.

Специалист в данной области может также проанализировать трехмерную структуру и аминокислотную последовательность в связи с этими данными о сходных полипептидах. С учетом этой информации специалист в данной области техники может предсказать, как аминокислотные остатки в последовательностях SEQ ID NO: 2-7 согласуются с их трехмерной структурой. Специалист в данной области техники может предпочесть не производить радикальные изменения аминокислотных остатков, которые, согласно прогнозу, должны располагаться на поверхности молекулы белка, поскольку такие аминокислотные остатка могут участвовать в важных взаимодействиях с другими молекулами. Более того, специалист в данной области техники может создать тестовые производные последовательностей SEQ ID NO: 2-7, содержащие единичные замены аминокислот для каждого из заданных аминокислотных остатков. Эти производные можно затем исследовать, используя известные специалистам в данной области техники функциональные тесты, а также согласно настоящему изобретению. Такие производные можно использовать для сбора информации о подходящей замене. Например, если будет обнаружено, что изменение определенного аминокислотного остатка приводит к исчезновению, снижению биологической активности, или к возникновению нежелательной активности, производные с таким изменением будут исключены. Другими словами, основываясь на информации, полученной из такого рода стандартных экспериментов, специалист в данной области техники может легко определить аминокислоты, для которых дальнейшие замещения будут исключены, либо только для них, либо в комбинации с другими изменениями.

Прогнозам вторичной структуры на основе анализа последовательности аминокислот было посвящено большое количество научных публикаций (смотри Chou et al.,

Biochemistry, 13(2):222-245, 1974; Chou et al., Biochemistry, 113(2):211-222, 1974; Chou et al., Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 47:45-148, 1978; Chou et al., Ann. Rev. Biochem., 47:251-276, 1979; and Chou et al., Biophys. J., 26:367-384, 1979). Более того, в настоящее время доступны компьютерные программы, облегчающие прогноз вторичной структуры полипептидов. Приведенные примеры включают такие программы, основанные на анализе Джеймсона-Волфа (Jameson-Wolf analysis) (Jameson et al., Comput. Appl. Biosci., 4(1):181-186, 1998; and Wolf et al., Comput. Appl. Biosci., 4(1):187-191; 1988), программу PepPlot.RTM (Brutlag et al., CABS, 6:237-245, 1990; and Weinberger et al., Science, 228:740-742, 1985) и другие новые программы для прогнозирования третичной структуры белков (Fetrow et al., Biotechnology, 11:479-483, 1993).

Более того, в настоящее время доступны компьютерные программы, облегчающие прогноз вторичной структуры. Один метод прогноза вторичной структуры основан на моделировании по гомологии. Например, два полипептида или белка, имеющие идентичность больше 30% или сходство больше 40% часто имеют сходную топологию структур. Растущий в последнее время объем данных в Банке данных белков (PDB – Protein Data Base) обеспечил расширенные возможности для прогнозирования вторичной структуры, включая потенциальное количество изгибов в структуре полипептида или белка (смотри Holm et al., Nucl. Acid. Res., 27(1):244-247, 1999).

Дополнительные методы прогнозирования вторичной структуры включают в себя «пронизывание» (“threading”) (Jones, D., Curr. Opin. Struct. Biol., 7(3):377-87, 1997; Suppl et al., Structure, 4(1):15-9, 1996), «анализ профиля» (“profile analysis”) (Bowie et al., Science, 253:164-170, 1991; Gribskov et al., Meth. Enzym., 183:146-159, 1990; and Gribskov et al., Proc. Nat. Acad. Sci., 84(13): 4355-4358, 1987), и «эволюционную связь» (“evolutionary linkage”) (смотри Home, выше и Brenner, выше).

Каждая из форм полипептидов, обсуждаемых в данной заявке, может также содержать последовательность, пригодную для использования при идентификации или очистке полипептида; примером такой последовательности является С-концевая метка V5. Все изложенное относится также и к последовательностям нуклеиновых кислот (таким как последовательности кДНК, но не ограничиваясь ими), кодирующим подобные полипептиды, включая их производные, как описано в настоящей заявке. Примеры таких нуклеиновых кислот включают нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды SEQ ID NO: 1-7. Они могут включать нуклеиновые кислоты, содержащие любую из последовательностей SEQ ID NO: 8 (кодирующую SEQ ID NO: 1), 9 (кодирующую SEQ ID

NO: 2), 10 (кодирующую SEQ ID NO: 3), 11 (кодирующую SEQ ID NO: 4), 12 (кодирующую SEQ ID NO: 5), 13 (кодирующую SEQ ID NO: 6) и 14 (кодирующую SEQ ID NO: 7).

С. ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ

Предложена фармацевтическая композиция для лечения и профилактики состояния или симптома, связанных с образованием зубного налета и содержащая любое из активных соединений, предложенных выше. Композиции, согласно настоящему изобретению, могут содержать по меньшей мере одно такое активное соединение в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем. Примеры таких носителей и технологий изготовления лекарственных препаратов можно найти в Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20th Ed., Lippincott, Williams & Wilkins, Daniel Limmer, editor) и они в целом хорошо понятны для специалиста в данной области техники. Чтобы составить фармацевтически приемлемую композицию, пригодную для введения, данные композиции должны содержать терапевтически эффективное количество активного соединения.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению могут быть использованы в способах лечения и профилактики согласно настоящему изобретению. Данные композиции вводят пациенту в количествах, достаточных, чтобы доставить терапевтически эффективное количество активного соединения с тем, чтобы обеспечить эффективность способов лечения и профилактики согласно настоящему изобретению. Терапевтически эффективное количество может варьировать в соответствии со многими факторами, такими как состояние пациента, масса, пол и возраст. Например, в некоторых вариантах реализации данной композиции содержание активного соединения доходит до полудетальной дозы (LD50). LD50 может быть определена при помощи стандартных токсикологических методик или на основе данных ранее проведенных исследований. В качестве альтернативы, возможно приготовление фармацевтической композиции для достижения желаемой концентрации активного соединения на поверхности зуба и/или десны субъекта.

Другие факторы включают способ и место введения. Фармацевтические композиции могут быть приготовлены для обеспечения субъекта любым из способов, известных в данной области техники. Примеры дозированных форм включают в себя препараты для подкожного, внутривенного, местного, накожного, орального, внутрикостного,

внутримышечного, интраназального и легочного применения. Композиции согласно настоящему изобретению могут быть приготовлены для введения субъекту как только однократно, так и более, чем один раз. Кроме того, в случае более, чем однократного введения композиции, могут быть применены различные схемы приема, такие как раз в день, раз в неделю, раз в месяц или раз в год. Также композиции могут быть приготовлены для введения субъекту более одного раза в день. Терапевтически эффективное количество активного соединения и надлежащая схема дозирования могут быть определены путем тестирования с тем, чтобы достичь оптимальной активности, минимизировав при этом любые потенциальные побочные эффекты. В дополнение к этому, может оказаться целесообразным приготовление композиции для совместного или последовательного введения с другими агентами.

Композиции согласно настоящему изобретению могут быть приготовлены для системного введения, такого как внутривенное введение, или для местного введения, такого как подкожная инъекция, нанесения геля, лекарственных форм на основе волокон, пасты или крема.

Композиции согласно настоящему изобретению могут дополнительно содержать агенты, повышающие растворимость, период полувыведения, абсорбцию и т. п. активного соединения. Кроме того, композиции согласно настоящему изобретению могут дополнительно содержать агенты, ослабляющие нежелательные побочные эффекты и/или снижающие токсичность активного соединения. Примеры таких агентов приведены во многих источниках, таких как Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20th Ed., Lippincott, Williams & Wilkins, Daniel Limmer, редактор).

Композиции согласно настоящему изобретению можно приготовить в виде многочисленных лекарственных форм для введения. Например, предложенные композиции могут быть в форме таблеток, капсул, саше, лепешек, пастилок, пилюль, порошков, гранул, эликсиров, настоек, растворов, суспензий, сиропов, мазей, кремов, паст, эмульсий или растворов для внутривенного введения или инъекции. Другие лекарственные формы включают формы для чрескожного введения при помощи пластыря или мази. Следующий вариант введения включает формы, предназначенные для доставки с помощью небулайзеров или ингаляторов с дозаторами. Любой из вышеуказанных способов можно модифицировать, чтобы обеспечить составы с отложенным и/или замедленным высвобождением.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению могут дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель. Такие носители могут включать наполнители, адъюванты, поверхностно-активные вещества, суспендирующие агенты, эмульгирующие агенты, инертные наполнители, разбавители, вспомогательные вещества, смачивающие агенты, связующие вещества, смазывающие вещества, буферные агенты, разрыхлители и носители, а также вспомогательные агенты, такие как окрашивающие агенты и вкусо-ароматические агенты (в совокупности описанные в настоящей заявке как носитель). Как правило, фармацевтически приемлемый носитель является химически инертным в отношении активных соединений и не проявляет неблагоприятные побочные эффекты или токсичность в условиях применения. Фармацевтически приемлемые носители могут включать полимеры и полимерные матрицы. Природа фармацевтически приемлемого носителя может различаться в зависимости от конкретной используемой лекарственной формы и от других характеристик композиции.

Например, в композициях для перорального введения в твердой форме, такой как таблетки, капсулы, саше, лепешки, пастилки, пилюли, порошки или гранулы, активное соединение можно комбинировать с пероральным нетоксичным, фармацевтически приемлемым инертным носителем, таким как инертные наполнители, подходящие связующие вещества, смазывающие вещества, разрыхлители и вспомогательные агенты. Подходящие связующие вещества включают, без ограничения, крахмал, желатин, природные сахара, такие как глюкоза или бета-лактоза, кукурузные подсластители, природные и синтетические камеди, такие как гуммиарабик, трагакант или альгинат натрия, карбоксиметилцеллюлозу, полиэтиленгликоль, воски и т.п. Смазывающие агенты, используемые в указанных лекарственных формах, включают, без ограничения, олеат натрия, стеарат натрия, стеарат магния, бензоат натрия, ацетат натрия и т.п. Разрыхлители включают, без ограничения, крахмал, метилцеллюлозу, агар, бентонит, ксантановую камедь и т.п. Формы таблеток могут содержать один или более из следующих компонентов: лактоза, сахароза, маннит, кукурузный крахмал, картофельный крахмал, альгиновая кислота, микрокристаллическая целлюлоза, гуммиарабик, желатин, гуаровая камедь, коллоидный диоксид кремния, кроскармеллоза натрия, тальк, стеарат магния, стеарат кальция, стеарат цинка, стеариновая кислота, а также другие носители, описанные в данном документе. Формы пастилок могут содержать активный ингредиент во вкусо-ароматическом веществе, обычно сахарозе и гуммиарабике или трагаканте, а также пастилки, содержащие активный ингредиент в инертной основе, такой как желатин и

глицерин или сахароза и гуммиарабик, эмульсии и гели, содержащие, помимо активного ингредиента, указанные носители, известны в данной области техники.

Фармацевтическая композиция может представлять собой средство для чистки зубов. Преимуществом средств для чистки зубов является широкая доступность для потребителей. Поэтому люди хорошо знакомы с применением средств для чистки зубов, и в большинстве стран гигиена полости рта включает чистку зубов по меньшей мере один раз в сутки. Кроме того, средства для чистки зубов эффективны для местного введения за счет нанесения активных соединений на поверхности зуба и/или десны.

Средство для чистки зубов может быть выбрано из группы, состоящей из пасты, геля, средства для полоскания рта, порошка и мыла для зубов. В некоторых вариантах реализации предложенной композиции средство для чистки зубов представляет собой пасту или гель, содержащий по меньшей мере один из следующих компонентов: абразива, поверхностно-активного вещества, увлажнителя и загустителя. Подобные абразивы включают гидратированный диоксид кремния, дикальций фосфат дигидрат, карбонат кальция, бикарбонат натрия, пирофосфат кальция и оксид алюминия. Подобные поверхностно-активные вещества включают лаурилсульфат натрия, N-лаурилсаркозинат натрия, плуроники, лаурилсульфоацетат натрия. Подобные противокариозные агенты включают фторид. Подобные ингредиенты для профилактики образования зубного камня включают пирофосфат тетранатрия, Gantrez S-70, триполифосфат натрия и сополимер метилвинилового эфира/малеинового ангидрида. Средство для чистки зубов может также содержать один или более из следующих компонентов: вода; кислотнo-щелочные буферы; увлажнители (для предотвращения пересыхания и усиления приятного ощущения во рту), такие как глицерин, сорбит, полипропиленгликоль, ксилит и полиэтиленгликоль; загустители, такие как загустители на основе диоксида кремния, алюмосиликаты натрия и глины; камеди, такие как карбоксиметилцеллюлоза натрия, простые эфиры целлюлозы, ксантановая камедь, каррагенаны, альгинат натрия и карбополы; антибактериальные агенты; вкусо-ароматические агенты, такие как не растворимые в воде эфирные масла; подсластители, такие как сахарин, декстроза, левулоза, цикламат, аспарат; окрашивающие агенты; и связующие вещества для обеспечения необходимой консистенции и формы.

Для перорального введения при помощи средства для полоскания рта, активное соединение можно комбинировать с одним или более из следующих компонентов: вода и спирт (такой как этиловый спирт). Средство для полоскания полости рта может

дополнительно содержать один или более из следующих компонентов: поверхностно-активные агенты, ингредиенты для профилактики образования зубного камня, противокариозные агенты, буферы, увлажнители, антибактериальные агенты, вкусоароматические агенты и окрашивающие агенты, описанные в предыдущем разделе.

В конкретном варианте реализации средство для чистки зубов представляет собой порошок, содержащий любые абразивы, описанные выше. Порошок может также содержать любые сухие компоненты, представленные выше в качестве компонентов, подходящих для зубной пасты. В другом конкретном варианте реализации средство для чистки зубов представляет собой мыло для зубов, содержащее одно или несколько из масел и воды. Масло может быть любым из считающихся пригодным для зубного мыла, таким как оливковое масло, кокосовое масло, эфирное масло и масло перечной мяты.

Фармацевтическая композиция может представлять собой жевательную резинку. Жевательная резинка может содержать активное соединение и основу, такую как синтетический каучук на основе бутадиена, берестовый деготь, чикли, мастиковая камедь, смола канадской ели, парафиновый воск, смола бальзамового дерева, стирол-бутадиеновый каучук, сополимер изобутилена-изопрена и нефтяной воск. Основа должна быть в концентрации, достаточной для придания ей желаемой консистенции, что может быть сделано специалистом в данной области техники. Можно добавлять вкусоароматические агенты, включая перечисленные выше.

Предложенная композиция может жидкостью для перорального введения, такой как настойка, раствор, суспензия, эликсир и сироп, активные соединения согласно настоящему описанию могут быть растворены в растворителях, таких как вода, солевой раствор или спирты. Кроме того, пероральные жидкие формы могут содержать надлежащим образом ароматизированные суспендирующие или диспергирующие агенты, такие как синтетические и природные камеди, например, трагакант, гуммиарабик, метилцеллюлоза и т.п. Кроме того, при желании или по необходимости в смесь также можно вводить соответствующие окрашивающие агенты или другие вспомогательные агенты. Другие диспергирующие агенты, которые можно использовать, включают глицерин и т.п.

Лекарственные формы, предназначенные для парентерального введения, включают водные и неводные, изотонические, стерильные растворы для инъекций, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатические компоненты и растворенные

вещества, обеспечивающие изотоничность лекарственной формы с кровью пациента, а также водные и неводные стерильные суспензии, которые могут содержать суспендирующие агенты, солюбилизаторы, загустители, стабилизаторы и консерванты. Композиция может включать физиологически приемлемый растворитель, такой как стерильная жидкость или смесь жидкостей, включая воду, солевой раствор, водный раствор декстрозы и родственные растворы сахаров, спирт, такой как этанол, изопропанол или гексадециловый спирт, гликоли, такие как пропиленгликоль или полиэтиленгликоль, такой как полиэтиленгликоль 400, кетали глицерина, такие как 2,2-диметил-1,3-диоксолан-4-метанол, простые эфиры, масла, жирные кислоты, сложные эфиры жирных кислот или глицериды, или ацетилированные глицериды жирных кислот с добавлением или без добавления фармацевтически приемлемого поверхностно-активного вещества, такого как мыло, масло или детергент, суспендирующего агента, такого как пектин, карбомеры, метилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза или карбоксиметилцеллюлоза, или эмульгирующих агентов и других фармацевтических адъювантов.

Масла, которые можно использовать в парентеральных лекарственных формах и в средствах для чистки зубов включают нефтяные, животные, растительные или синтетические масла. Конкретные примеры масел включают арахисовое, соевое, кунжутное, хлопковое, кукурузное, оливковое, вазелиновое и минеральное масло. Подходящие жирные кислоты для применения в парентеральных лекарственных формах включают сложные эфиры полиэтиленсорбита и жирных кислот, такие как сорбитанмоноолеат, и высокомолекулярные аддукты этиленоксида с гидрофобным основанием, получаемые конденсацией пропиленоксида с пропиленгликолем, олеиновую кислоту, стеариновую кислоту и изостеариновую кислоту. Примерами приемлемых сложных эфиров жирных кислот являются этилолеат и изопропилмиристат. Приемлемые мыла для применения в парентеральных лекарственных формах включают соли жирных кислот со щелочными металлами, аммиаком и триэтанололамином, а подходящие детергенты включают: (а) катионные детергенты, такие как, например, галогениды диметилдиалкиламмония и галогениды алкилпиридиния; (b) анионные детергенты, такие как, например, алкил-, арил- и олефинсульфонаты, алкил-, олефин-, эфир- и моноглицеридсульфаты и сульфосукцинаты; (с) неионогенные детергенты, такие как, например, жирные аминоксиды, алканоламиды жирных кислот и сополимеры полиоксиэтилена и полипропилена; (d) амфотерные детергенты, такие как, например,

алкил-бета-аминопропионаты и четвертичные аммониевые соли 2-алкилимидазолина; и (е) их смеси.

В таких лекарственных формах можно использовать подходящие консерванты и буферы. Для минимизации или исключения раздражения в области инъекции такие композиции могут содержать одно или более неионогенных поверхностно-активных веществ, имеющих гидрофильно-липофильный баланс (ГЛБ) от приблизительно 12 до приблизительно 17.

Лекарственные формы для местного введения, такие как мази, кремы, пасты и эмульсии, содержащие активное соединение, можно смешивать с различными материалами-носителями, общеизвестными в данной области техники, такими как, например, спирты, гель алоэ вера, аллантоин, глицерин, масляные растворы витамина А и Е, минеральное масло, миристилпропионат ППГ2 и т.п., с получением спиртовых растворов, местных очищающих средств, очищающих кремов, гелей для кожи, лосьонов для кожи и шампуней в формах крема или геля. Также можно использовать добавки препарата для отшелушивания кожи или скраба для кожи. Такие препараты для местного введения можно наносить на пластырь, бандаж или перевязочный материал для чрескожного поступления, или можно наносить на бандаж или перевязочный материал для поступления непосредственно на участок раны или повреждения кожи.

Активные соединения согласно настоящему описанию также можно приготовить для введения в форме липосомных систем доставки, таких как мелкие однослойные везикулы, крупные однослойные везикулы и везикулы неглобулярной формы (antimetrics). Липосомы можно получать из различных фосфолипидов, таких как холестерин, стеариламин или фосфатидилхолины. Такие липосомы также могут содержать моноклональные антитела для направленной доставки липосомы к конкретному типу клеток или группе типов клеток.

Активные соединения согласно настоящему изобретению также могут быть связаны с растворимыми полимерами в качестве носителей лекарственного средства с возможностью нацеливания. Такие полимеры могут включать поливинилпирролидон, сополимер пирана, полигидроксипропилметакрил-амидфенол, полигидроксиэтилспартамидфенол или полиэтиленоксидполилизин, замещенный остатками пальмитоила. Кроме того, активные соединения согласно настоящему изобретению могут быть связаны с классом биоразлагаемых полимеров, подходящих для

достижения контролируемого высвобождения лекарственного средства, например с полимолочной кислотой, поли-эпсилон-капролактоном, полигидроксимасляной кислотой, сложным полиортоэфирами, полиацетальми, полигидропиранами, полицианоакрилатами и попеременно-сшитыми или амфипатическими блок-сополимерами гидрогелей.

D. СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ

Предложен способ лечения или профилактики состояния или симптома, связанного с образованием зубного налета, у субъекта, включающий в себя местное введение (применение) на поверхность зуба и/или десны субъекта терапевтически эффективного количества любого из описанных выше активных агентов. Биоплёнки зубного налета, населенные *P. gingivalis*, имеют тенденцию к высокой вирулентности, что приводит к высокой частоте заболеваний зубов и десен (таких как гингивит и периодонтит). Периодонтит, обусловленный *P. gingivalis* может, в свою очередь, приводить к тяжелым системным патологическим состояниям, включая атеросклероз, заболевание, вызываемое вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), потерю зуба, коронарную болезнь сердца, инсульт, преждевременные роды, низкую массу тела при рождении, диабет в фазе декомпенсации, респираторные патологии, ревматоидный артрит и астму.

Предложенный способ лечения и/или профилактики включает введение субъекту активного соединения в количестве, достаточном для лечения или профилактики образования зубного налета или симптома и состояния, связанного с зубным налетом (терапевтически эффективного количества). Данный способ часто дополнительно включает выявление пациента, нуждающегося в таком лечении или профилактике. Слишком малое количество активного соединения не сможет обеспечить терапевтический эффект. С другой стороны, избыточное количество активного соединения может привести к нежелательным побочным эффектам.

Терапевтически эффективное количество может варьировать в соответствии со многими факторами, такими как состояние пациента, масса, пол и возраст. Например, некоторые варианты реализации данного способа включали в себя введение активного соединения в дозах, достигающих до полулетальной дозы (LD50). Другие варианты реализации способа включают в себя применение дозировок, достигающих до 50%, 25%, 10%, 1%, 0,1%, или 0,01% от LD50. LD50 может быть определена при помощи стандартных токсикологических методик или на основе данных ранее проведенных исследований. В качестве альтернативы, способ может включать в себя доставку желаемой концентрации активного соединения на поверхности зуба и/или десны субъекта.

Если после введения активного соединения субъект все еще страдает от периодонтита или состояния или симптома, ассоциированного с периодонтитом, или для него существует риск их возникновения, возможным этапом в предложенном способе может быть продолжение введения активного соединения или фармацевтической композиции.

В одном варианте реализации предложенный способ включает в себя доставку активного соединения к поверхностям зуба и/или десны субъекта. Доставлять активное соединение к поверхностям зуба и/или десны субъекта целесообразно, поскольку они являются местом, где за счет деятельности *P. gingivalis* формируется зубной налет. Присутствие активного соединения на поверхности зуба и/или десны субъекта необходимо для предотвращения образования на них зубного налета. Направленная доставка к поверхности зубов и/или десен может также обеспечить профилактику нежелательных эффектов в других тканях или органах. В другом варианте реализации предложенный способ включает местное введение активного соединения в полость рта субъекта. Применение активного соединения в полости рта субъекта целесообразно, поскольку поверхности зубов и/или десен находятся в ротовой полости. Конкретный вариант реализации включает местное введение активного соединения в полость рта пациента, причем активное соединение применяют в виде зубной пасты или жевательной резинки. Зубная паста или жевательная резинка, содержащие активное соединение, удобны для лечения или профилактики образования зубного налета или симптомов и состояний, связанных с ним, поскольку такие лекарственные формы могут содержать также добавки для улучшения общего гигиенического состояния полости рта (например, фторид). Скорее всего, люди уже используют подобные препараты для обычной гигиены полости рта, поэтому пациенты с большей вероятностью будут соблюдать схему лечения, что приведет к лучшим результатам.

Е. СПОСОБЫ ПОДАВЛЕНИЯ ОБРАЗОВАНИЯ БИОПЛЁНОК

Предложен способ снижения вероятности образования на поверхности биоплёнки, содержащей популяцию *P. gingivalis*, включающий воздействие на поверхность эффективной концентрации любого из активных агентов, описанных выше.

Ф. СПОСОБЫ СНИЖЕНИЯ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ОТВЕТСТВЕННЫХ ЗА ВИРУЛЕНТНОСТЬ ГЕНОВ

Было обнаружено, что экспрессию генов фимбрилина *mfa1*, *rgpA/B*, *rgpA* и *kgp* можно подавить, используя соединения, описанные выше и включающие определенные фрагменты белка ArgA из *S. cristatus*. Известно, что упомянутые гены участвуют в

образовании биоплёнки и в вирулентности *P. gingivalis*. Предложен способ снижения уровня экспрессии генов, связанных с образованием бактерией биоплёнки или с ее вирулентностью, включающий воздействие на бактерию эффективной концентрации любого из активных агентов, описанных выше. Контакт может происходить *in vitro* или *in vivo*. Примерами генов, связанных с образованием биоплёнки являются гены фимбриллинов (например, ген большой субъединицы фимбрии *fimA*). Примерами генов, связанных с вирулентностью *P. gingivalis*, могут служить гены протеазы гингипейн (gingipain), такие как *mfa1*, *rgpA/B*, *rgpA* и *kgp*. В конкретной реализации способа бактерией, на которую направлен способ, является *P. gingivalis*. Эффективную концентрацию можно определить эмпирически, воздействуя на бактерию варьирующими концентрациями активного агента. В конкретном варианте реализации способа концентрация составляет 15 мкМ.

G. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

Предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие каждый из пептидов, описанных как используемые в качестве активного агента. Такие нуклеиновые кислоты находят применение в различных областях, таких как экспрессия пептидов, перенос генов и генная терапия. Основная реализация нуклеиновой кислоты включает кодирующий участок, который кодирует пептид. Альтернативный вариант основной реализации нуклеиновой кислоты включает кодирующий участок, комплементарный последовательности, кодирующей пептид. Комплементарный участок может быть полностью комплементарен последовательности, кодирующей пептид, или может гибридизоваться с последовательностью, кодирующей пептид, в условиях максимальной, высокой, средней или низкой специфичности. Кроме того, нуклеиновая кислота может включать один или большее число регуляторных участков, функционально связанных с кодирующим участком, таких как промотор, энхансер, участок связывания репрессора или сайленсер. В некоторых реализациях нуклеиновой кислоты промотор расположен непосредственно вверх по течению (в 5' направлении) от кодирующего участка. В конкретной реализации нуклеиновой кислоты промотор является конститутивным.

Предложена также клетка, содержащая любую из нуклеиновых кислот, описанных выше. Клетка может найти применение, например, для продукции полипептида с целью дальнейшего выделения или анализа. Клетка может бы также быть клеткой субъекта, подвергшегося генной терапии.

Данная клетка может быть одноклеточным организмом или клеткой многоклеточного организма. Преимуществом многих одноклеточных организмов является легкость культивирования их *in vitro* в сравнении с клетками многоклеточных организмов. В некоторых реализациях клетка представляет собой одноклеточный эукариотический организм. Для данного способа из одноклеточных эукариотических организмов пригодны грибы и протисты. Одноклеточные организмы особенно удобны для клонирования, репликации и поддержания представляющих интерес нуклеиновых кислот. Модельные одноклеточные организмы, которые обычно используются для этих целей, включают в себя дрожжи, другие грибы, бактерии, протисты и археи. Характерные модельные организмы хорошо известны специалистам в данной области техники, они включают в себя бактерии, такие как *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *Mycoplasma genitalium* и различные *Synechocystis sp.*, протисты, такие как *Dictyostelium discoideum*, *Tetrahymena thermophila*, *Emiliania huxleyi*, и *Thalassiosira pseudonana* и грибы, такие как *Aspergillus sp.*, *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae* и *Schizosaccharomyces pombe*.

В некоторых вариантах реализации клетка является клеткой животного. Методики культивирования клеток животных хорошо известны, и специалисты в данной области техники могут разработать способы работы с культуральными клетками, соответствующие данному типу клеток животных, без лишнего экспериментирования. Преимуществом клеток животных является то, что их реакции близки к тому, как реагировали бы ткани животного *in vivo*. Клетка животного может быть, например, клеткой птицы, млекопитающего, мыши, серой крысы, хлопковой крысы, песчанки, морской свинки, хомячка, другого грызуна, кролика, собаки, кошки, свиньи, быка, овцы, козы, лошади, домашней птицы, примата и человека. Клетка может расти в монокультуре, или сосуществовать с более чем одним типом клеток при совместном культивировании.

Предложен также вектор, содержащий любую из нуклеиновых кислот, раскрытых выше. Известно много подходящих векторов, таких как вирусы, плазмиды, космиды, фосмиды, фагмиды, искусственные хромосомы, дрожжевые искусственные хромосомы, человеческие искусственные хромосомы, векторы для трансформации растений и липосомы.

Н. ПРИМЕРЫ

Рабочий пример 1: Идентификация пептидов *Streptococcus cristatus*, связывающихся с белками поверхности *Porphyromonas gingivalis*.

Была выдвинута гипотеза о том, что между *Streptococcus cristatus* и *P. gingivalis* существуют антагонистические взаимоотношения, при этом предполагали, что аргининдеиминаза (ArcA) *S. cristatus* является сигнальной молекулой, ответом на которую со стороны *P. gingivalis* служит репрессия экспрессии и продукции белка FimA. В данном примере показано, что для межклеточных взаимодействий между *P. gingivalis* и *S. cristatus* необходимо их непосредственное взаимодействие. Обнаружили, что два белка поверхности *P. gingivalis*, PGN_0294 и PGN_0806, взаимодействуют с ArcA *S. cristatus*. При помощи анализа набора пептидов, иммобилизованных на микрочипе, были идентифицированы несколько сайтов ArcA, связывающихся с *P. gingivalis*, что привело к выявлению 11-членного пептида (11-мер), имеющего последовательность нативного белка ArcA, и подавляющего экспрессию генов, участвующих в построении фимбрий и в синтезе протеаз гингипейн. Эти данные указывают на то, функциональный мотив белка ArcA достаточен для того, чтобы селективно изменять экспрессию генов, связанных с вирулентностью *P. gingivalis*, а PGN_0294 и PGN_0806 могут служить рецепторами для ArcA. Эти открытия обеспечивают представление о молекулярных механизмах, которые должны лежать в основе разработки агентов, препятствующих возникновению и образованию патогенного сообщества, индуцируемого *P. gingivalis*.

Методы

Штаммы бактерий и условия культивирования. Штаммы *P. gingivalis* и штамм Y4 *Actinomyces comitans* выращивали из криоконсервированных культур в триптиказо-соевом бульоне (TSB) или на чашках с кровавым агаром на среде TSB с добавлением дрожжевого экстракта (1 мг/мл), гемина (5 мкг/мл) и менадиона (1 мкг/мл) и инкубировали при 37 °C в анаэробной камере (85% N₂, 10% H₂, 5% CO₂). Штамм CC5A *S. cristatus* и изогенный штамм *ΔarcA16* культивировали на триптиказо-пептонном бульоне (TPB) с добавлением 0,5% глюкозы при 37 °C в аэробных условиях. При необходимости в ростовую среду добавляли эритромицин (5 мкг/мл) или тетрациклин (0,5 мкг/мл).

Исследования совместного культивирования в системе transwell. Клетки *P. gingivalis* (в количестве 10⁵) высевали в каждую лунку шестилуночного культурального планшета, затем клетки *S. cristatus* штамма CC5A или его мутантной формы *ΔarcA* (в количестве 10⁷) помещали на вставки transwell, снабженные поликарбонатной пористой мембраной с размером пор 0,4 мкм или 8 мкм. После инкубации в течение 16 часов, бактериальные клетки из каждой лунки отделяли при помощи центрифугирования. Для определения

количества клеток штамма СС5А, мигрировавших в нижнюю часть лунки, бактерии из нижней части лунки собирали центрифугированием и высвобождали ДНК кипячением в течение 20 мин. Количество бактерий определяли методом количественной ПЦР (qPCR), используя праймеры, специфичные для гена *arcA* штамма СС5А и последовательности 16s-рРНК штамма 33277 (Таблица 2). РНК *P. gingivalis* очищали, используя спин-колонку mini RNeasy, позволяющую селективно лизировать клетки *P. gingivalis*, но не клетки *S. cristatus*. Уровень экспрессии гена *fimA* в клетках *P. gingivalis* измеряли, используя количественную ПЦР в реальном времени (RT-qPCR) (см. далее).

Выделение РНК и количественная ПЦР. Клетки *P. gingivalis* гомогенизировали в тризоле (Trizol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) и очищали РНК, используя спин-колонку mini RNeasy (Qiagen, Valencia, CA). Гомогенат непосредственно в колонке обрабатывали очищенной от РНКазы ДНКазой и суммарную РНК анализировали при помощи биохимического анализатора Agilent 2100, чтобы удостовериться в качестве образцов. Праймеры приведены в Таблице 2. Реакции амплификации включали в себя обратную транскрипцию, которую проводили при помощи набора реагентов iScript Reverse Transcription Supermix фирмы Bio-Rad в амплификаторе TC-3000 (Techne, Staffordshire, ST15 OSA, UK), а количественную реакцию ПЦР проводили, используя набор реактивов QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (Qiagen) в амплификаторе с системой детекции флуоресценции MyiQ™ (Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules, CA) в соответствии с инструкциями производителя. Ген 16s рРНК *P. gingivalis* использовали в качестве внутреннего контроля для калибровки измерений. Чтобы удостовериться в специфичности праймера, проводили анализ кривой плавления на наличие единственного пика. Уровни экспрессии исследуемых генов определяли относительно необработанного калибровочного образца, используя метод сдвига порогового цикла (ΔСТ). ΔСТ рассчитывали, вычитая среднее значение СТ тестового образца из среднего значения СТ калибровочного образца, и полученное значение использовали для вычисления их отношения, предполагая эффективность амплификации равной 100%. За счет того, что во все сравниваемые образцы загружают одно и то же количество суммарной РНК, величина ΔСТ отображает различие в уровнях экспрессии гена между образцами.

ТАБЛИЦА 2: Олигонуклеотидные праймеры			
Ген	Название праймера	Последовательности праймеров(5´-3´)	SEQ ID NO.
<i>fimA</i>	FimA-88F	CGGAACGAATAACCCAGAGA	15
	FimA-88R	CTGACCAACGAGAACCCACT	16
<i>mfa1</i>	Mfa1-F	CAGATGGGTTGTTGCTCA	17
	Mfa1-R	ATGGAAAGTGCTGCTGGTAG	18

<i>kgp</i>	Kgp-133F	CTATTGGGAACTGCTGTGTTAC	19
	Kgp-133R	TCCTCGCCCCAATAAGAATTC	20
<i>rgp</i>	Rgp-194F	CAACAGCAACCAGCTACCGT	21
	Rgp-194R	CGTTCATCTCATCCTGCCCG	22
<i>rgpA</i>	RgpA-156F	GACGGTTATTAAGACCATCAACAC	23
	RgpA-156R	TCCACGCTGCGAGCGGTAT	24
<i>sod</i>	Sod-235F	AATTCCACCACGGTAAGCAC	25
	Sod-235R	GAGCCGAATTGTTTGTTCGAT	26
<i>pgn0128</i>	Pgn0128-114F	TAATGGGAAAGAGCGAGCAGT	27
	Pgn0128-114R	ACAGGGCATTTAGCACAACC	28
<i>16s-rRNA</i>	16s-rRNAF	TGGGTTTAAAGGGTGCGTAG	29
	16s-rRNAR	CAATCGGAGTTCCTCGTGAT	30
<i>arcA</i>	arcA186-F	TCCAATGCCAAACCTTTACT	31
	arcA186-R	ATACGAGTATCTTCTTCACG	32

Конфокальная микроскопия. Из штамма *S. cristatus* CC5A выделяли белок *ArcA* (50 мкг) как описано в (Teles R, Teles F, Frias-Lopez J, Paster B, Haffajee A. 2013. Lessons learned and unlearned in periodontal microbiology. *Periodontal* 2000 62: 95-162), смешивали с клетками *P. gingivalis* (10^8) в изотоническом фосфатном буфере (PBS) и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. После трехкратной отмывки PBS, комплексы бактерий со связавшимся белком оставляли для «забивки» на 1 ч. в 5% растворе бычьего сывороточного альбумина (BSA) в PBS. Для определения белка *ArcA*, связанного с клетками *P. gingivalis*, клетки окрашивали, сначала обрабатывая поликлональными антителами кролика к белку *ArcA* (1:400), затем конъюгированными с тетраметилродаминизотиоцианатом (TRITC, 1:500) антителами козы к антителам кролика (AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG). Визуализацию проводили при помощи конфокального микроскопа LSM 510 с подобранными фильтрами (543 нм - возбужденное излучение и 560 нм – испускаемое излучение).

Анализ соосаждения (pull-down assay). Чтобы выделить и идентифицировать молекулу (молекулы) поверхности *P. gingivalis*, взаимодействующие с белком *ArcA*, провели анализ соосаждения (pull-down assay). Экстракты структур поверхности *P. gingivalis* готовили, разрушая клетки ультразвуковым дезинтегратором Sonic Dismembrator (Fisher Scientific; установки системы управления 8, 20 сек × 3), обломки клеток удаляли центрифугированием с последующей фильтрацией (размер пор 0,2 мкм). Экстракты поверхностных структур штамма 33277 смешивали с очищенным *ArcA* на ротаторе при комнатной температуре в течение 1 часа, затем вводили в колонку с сорбентом из сефарозы 4В с пришитыми антителами к *ArcA* (Sigma-Aldrich). После инкубации при комнатной температуре в течение 1 часа, колонку три раза промывали PBS, содержащим

0,01% Твин (Tween), и белки элюировали 0,1М глицином рН 2,4. После SDS-электрофореза в полиакриламидном геле (SDS-PAGE), полосы белковых фракций вырезали и белки идентифицировали при помощи сочетания жидкостной хроматографии и масс-спектрологии.

Конструирование *pgn_0294 (ragB)* и *pgn_0806 (motA/tolQ/exbB)* мутантов. Инсерционные мутанты (*pgn_0294* и *pgn_0806*) были созданы при помощи ПЦР-опосредованного мутагенеза, независимого от лигирования (LIC-PCR) (63 – 65). В результате трех этапов ПЦР в адресные гены была вставлена кассета с последовательностями *ermF-ermAM* размером 2,1 кб и получены фрагменты, имеющие структуру *pgn_0294-erm-pgn_0294* или *pgn_0806-erm-pgn_0806*, как это было описано ранее(64). Конечные продукты ПЦР были затем введены в клетки *P. gingivalis* 33277 при помощи электропорации. Отбор мутантов производили на среде TSB, содержащей эритромицин (5 мкг/мл). Наличие инсерционной мутации подтверждали при помощи ПЦР, мутантные штаммы получили названия *P. gingivalis Δ0806* или *ΔragB*.

Скрининг взаимодействия белков. Экстракты поверхностных структур *P. gingivalis* получали при помощи разрушения клеток ультразвуком (суммарно 1 мин. за три раза) и центрифугирования (13000 g, 30 мин) с последующей фильтрацией (размер пор 0,2 мкм). Анализ набора пептидов, иммобилизованных на микрочипе, был проведен PEPperPRINT (Heidelberg, Germany). Для анализа белка *ArcA* были созданы наборы пептидов, иммобилизованных на микрочипе; в набор входили 409 различных пептидов, представляющих собой фрагменты *ArcA*, причем каждый пептид состоял из 15 аминокислот, 14 аминокислот в последовательности двух соседних пептидов перекрывали друг друга. После «забивки» и отмывки, микрочипы инкубировали с экстрактами поверхностных структур (100 мкг/мл), выделенными из штаммов *P. gingivalis*: 33277, мутантного 0806 и мутантного *ragB*. Белки поверхности *P. gingivalis*, связавшиеся с фрагментами *ArcA* на микрочипе выявляли, используя антитела кролика к *P. gingivalis* и антитела овцы к антителам кролика (sheep anti-rabbit IgG (H + L) DyLight680). Микрочипы анализировали при помощи сканера LI-COR Odyssey Imaging System.

Синтез пептидов и их активность. Пептиды синтезировали PEPperPRINT и Biomatik (Delaware), очистку пептидов производили при помощи высокопроизводительной жидкостной хроматографии (HPLC) до показателя чистоты $\geq 90\%$. Пептиды ресуспендировали в PBS, свободном от нуклеаз и протеаз, дозировали и хранили при -20°C. Ингибиторную активность пептидов определяли как описано в (Hajishengallis, G.,

Darveau, R. P. & Curtis, M. A. The keystone-pathogen hypothesis. *Nature reviews. Microbiology* 10, 717-725, doi:10.1038/nrmicro2873 (2012)) с небольшим изменением. Пептиды смешивали с 5×10^5 клеток *P. gingivalis*, высевали на чашки со средой TSB с кровавым агаром и культивировали в течение 60 ч в анаэробных условиях. Уровни экспрессии мРНК, кодирующей белки фимбрий и протеазы гингипейн определяли при помощи количественной ПЦР, уровень синтеза упомянутых белков – при помощи вестерн-блоттинга.

Вестерн-блоттинг. Клетки *P. gingivalis* лизировали, используя реагент для экстракции белка BUGBUSTER® Protein Extraction Reagent (EMD Millipore, Darmstadt, Germany), концентрацию белка определяли, при помощи набора для определения белка производства Bio-Rad. Лизаты (0,5 мкг) разделяли в 12% акриламиде при помощи SDS-PAGE и переносили на нитроцеллюлозные мембраны (Invitrogen, Carlsbad, CA) при помощи камеры для переноса Mini Transblot Electrophoretic transfer cell (Bio-Rad) при напряжении 100 В в течение 1 ч. Производили «забивку» мембраны 3% раствором BSA в PBS в течение 1 часа, затем в течение 1 часа инкубировали с разведенными 1:1000 поликлональными антителами анти-FimA, анти-Mfa1, анти-HGP44 (С-концевой адгезиновый домен протеаз гингипейн) или анти-PGN-0128. После отмывки PBS мембраны инкубировали в течение 1 часа с вторичными антителами к антителам кролика с конъюгированной пероксидазой хрена. Визуализацию белков производили при помощи хемилюминесценции с использованием энхансера (GE Healthcare Bio-Sciences Corp, Pittsburgh, PA), для измерений использовали полуколичественный метод и программу ImageJ (NIH, Bethesda, Maryland).

Трансмиссионная электронная микроскопия. Клетки *P. gingivalis* выращивали на чашках с кровавым агаром на среде TBS в течение 48 часов с добавлением или без добавления пептида⁴. Затем бактериальные клетки собирали и ресуспендировали в PBS. 20 мкл суспензии бактерий помещали на медную сетку с формваровой пленкой-подложкой (200 mesh, Electron Microscopy Sciences, PA) и высушивали на воздухе. Затем проводили негативное контрастирование клеток 0,5% молибдатом аммония в течение 4 мин и наблюдали их при помощи электронного трансмиссионного микроскопа (Philips CM-12, Portland, OR) с ускоряющим напряжением 80 кВ.

Статистический анализ. Для определения статистической достоверности различий в полученных результатах об уровне экспрессии генов и скорости роста для различных

штаммов *P. gingivalis*, использовали t-критерий Стьюдента. Значение $p < 0,05$ считалось статистически достоверным.

Результаты

Для взаимодействия *P. gingivalis* и *S. cristatus* необходим непосредственный контакт. Чтобы проверить, происходит ли взаимодействие *P. gingivalis* и *S. cristatus* за счет прямого межклеточного контакта, *P. gingivalis*, штамм 33277 и *S. cristatus*, штамм СС5А или его производный мутантный штамм *argA* разделяли, используя систему “transwell” с размерами пор мембраны 0,4 мкм или 8 мкм. После 16 часов инкубации, бактерии из нижней части каждой лунки собирали и определяли количество клеток *P. gingivalis* 33277 и *S. cristatus* СС5А с помощью количественной ПЦР. При размере пор 8 мкм в нижнюю часть лунки мигрировало $7,8 \times 10^4$ клеток СС5А из общего количества высевных клеток 1×10^7 , в то время, как при использовании мембраны с порами 0,4 мкм, в нижней части лунки обнаруживали меньше, чем 1,5 клетки *S. cristatus* (Фиг. 1А). Затем выделяли РНК *P. gingivalis* и определяли уровень экспрессии гена *fimA* при помощи qRT-PCR. При использовании мембраны “transwell” с размером пор 8 мкм, уровень экспрессии гена *fimA* сокращался приблизительно в 2,5 раза (Фиг. 1В). Когда мембрана с размером пор 0,4 мкм препятствовала контакту между клетками *P. gingivalis* и *S. cristatus*, подавления экспрессии гена *fimA* не наблюдали, что позволяло предположить, что для взаимодействия клеток *P. gingivalis* и *S. cristatus* необходим прямой межклеточный контакт.

Исследования клеток *P. gingivalis* и очищенного белка ArgA, проведенные при помощи иммунофлуоресценции, подтверждают прямые взаимодействия между *P. gingivalis* и белком ArgA *S. cristatus*. При помощи конфокальной микроскопии были выявлены меченные флуоресцентной меткой комплексы *P. gingivalis* с белком ArgA. Как показано на Фиг. 2, белок ArgA имеет высокое сродство к *P. gingivalis* штамма 33277, но не к AaY4, указывая на наличие специфических взаимодействий между белком ArgA и молекулами поверхностных структур *P. gingivalis*.

Выделение белка (белков) поверхности *P. gingivalis*, взаимодействующих с белком ArgA *S. cristatus*. Чтобы выделить и идентифицировать молекулы поверхностных структур *P. gingivalis*, взаимодействующие с белком ArgA, провели анализ соосаждения (pull-down assay). Для выделения из смеси клеточного лизата *P. gingivalis* и белка ArgA компонентов, взаимодействующих с ArgA, использовали колонку с сорбентом из сефарозы 4В с пришитыми антителами к ArgA. Белки, элюированные с колонки,

анализировали при помощи SDS-PAGE. Было обнаружено 3 полосы с молекулярными массами приблизительно 55, 47 и 30 кДа (Фиг. 3). Методом вестерн-блоттинга показано, что белок с массой 47 кДа представляет собой белок ArcA *S. cristatus* (данные не показаны). Белки, образующие две другие полосы, были идентифицированы методом масс-спектрологии (MS) как белки *P. gingivalis* RagB (PGN_0294) и белок семейства белков протонного канала MotA/TolQ/ExbB (PGN_0806), что позволило предположить, что эти два белка являются рецепторами ArcA.

Идентификация ключевого функционального мотива ArcA. Белок ArcA *S. cristatus* имеет молекулярную массу 47 кДа и состоит из 409 аминокислот. Мы предприняли попытку идентифицировать ключевые аминокислоты и мотив(ы) белка ArcA, отвечающие за его активность как ингибитора экспрессии гена *fimA*. На первой стадии для выявления участков ArcA, связывающихся с *P. gingivalis*, было предпринято исследование набора пептидов, иммобилизованных на микрочипе. Микрочипы инкубировали с экстрактами поверхностных структур, выделенными из штаммов *P. gingivalis*: 33277, мутантного 0806 и мутантного *ragB*, связывание выявляли, используя антитела к *P. gingivalis*. Хотя в абсолютном отношении способность компонентов разных штаммов к связыванию (интенсивность флуоресценции) сильно различалась, возможно, за счет деградации белков в экстрактах поверхностных структур некоторых штаммов, общая картина была неизменна. Из нескольких наблюдаемых пиков (Фиг.4), наибольшим сродством при связывании с белками *P. gingivalis* 33277 обладал пептид с последовательностью NIFKKNVGFKK (пик 4), представляющий из себя аминокислотные остатки в позициях 249 – 259 и проявляющийся как наибольший пик. Когда с микрочипами инкубировали экстракты поверхностных структур мутантных Δ 0806 или Δ ragB, этот пик переставал быть наибольшим, подтверждая тем самым участие в распознавании ArcA белков *P. gingivalis* PGN_0806 и RagB.

Основываясь на данных о пиках, полученных при анализе набора пептидов, синтезировали пять пептидов (1 – 5 в Таблице 1); влияние каждого из этих пептидов на экспрессию генов исследовали, включая их в ростовую среду *P. gingivalis*. Как показано в Таблице 3, пептид4, состоящий из 11 аминокислотных остатков с последовательностью C-концевого участка белка ArcA снижал экспрессию генов *fimA*, *mfa1*, *kgp*, *rgpA/B* (кодирующего каталитические участки белка *rgpA/B*), and *rgpA* (кодирующего адгезиновые домены *RgpA*) как минимум в 2 раза в концентрации 16мкМ. Экспрессия гена *pgn_0128*, кодирующего 53 кДа иммунореактивный антиген, в ответ на присутствие пептида4 не изменялась, указывая на специфичность данного пептида для подгруппы

генов, связанных с вирулентностью. При концентрации 64 мкМ наблюдали увеличение ингибирующей активности на 60-70% (не показано), что позволяет предположить, что этот участок, возможно, является ключевым активным мотивом ArgA. Этими результатами также установлено, что влияние белка ArgA на вирулентность *P. gingivalis* простирается дальше репрессии *fimA* и включает в себя гены протеаз гингипейн и малой субъединицы фимбрий, как показано и другими. Построив кривую зависимости от дозы (0, 4, 16, 64 мкМ), определили концентрацию полумаксимального ингибирования (IC50), чтобы оценить эффективность пептида4 для репрессии экспрессии этих генов. Как показано на Фиг. 5, обнаружили, что пептид4 наиболее эффективен в ингибировании гена *rgpA* (при амплификации использовали праймеры, относящиеся к участку, кодирующему HGP44, связывающий домен белка RgpA), гена *rgpA/B* (при амплификации использовали праймеры, относящиеся к участку, кодирующему каталитические домены белков RgpA и B) и гена *fimA*, величины IC50 составляли при этом $11,2 \pm 2,1$ мкМ, $11,7 \pm 2,3$ мкМ, $12,4 \pm 3,4$ мкМ, соответственно. Было также показано, что IC50 пептида4 значительно ниже для гена *mfa1* ($19,2 \pm 3,3$ мкМ) по сравнению с IC50 для гена *kgp* ($64,3 \pm 3,8$ мкМ). Следует подчеркнуть, что пептиды 1, 2, 3, и 5 также проявляли некоторую ингибиторную активность, хотя и в меньшей степени. Эти участки, наряду с пептидом4, могут участвовать в образовании структурного модуля, который может иметь большую способность к связыванию, чем пептид4 сам по себе. Эти находки создают основу для дальнейшей работы над ингибиторами *P. gingivalis*, исходя из их молекулярной структуры.

ТАБЛИЦА 3

Пептид	Последовательность пептида и положение аминокислотного остатка	Относительные уровни экспрессии					
		<i>fmA</i>	<i>mfa1</i>	<i>rgpA/B</i>	<i>rgpA</i>	<i>kgp</i>	<i>pgn0128</i>
P1	I ₉₇ RGRETKK	0.88 ± 0.08	0.85 ± 0.05	0.89 ± 0.05	0.86 ± 0.07	1.06 ± 0.12	0.96 ± 0.06
P2	N ₁₇₇ HMFADTRNRE	0.80 ± 0.03	0.80 ± 0.10	0.78 ± 0.07	0.81 ± 0.03	0.90 ± 0.05	0.88 ± 0.03
P3	V ₂₀₈ YNREEDTRIEGGDEL	0.87 ± 0.10	0.82 ± 0.07	0.98 ± 0.06	0.84 ± 0.06	0.99 ± 0.12	0.91 ± 0.07
P4	N ₂₄₉ IFKKNVGFKK	0.40 ± 0.06*	0.51 ± 0.05*	0.38 ± 0.04*	0.39 ± 0.04*	0.47 ± 0.06*	0.94 ± 0.06
P5	E ₃₈₉ LVRGRGGPRCMSMPF	0.97 ± 0.05	0.83 ± 0.04	0.72 ± 0.05	0.73 ± 0.06	0.96 ± 0.12	0.91 ± 0.06

В представленной выше Таблице 3 показана дифференциальная экспрессия генов, связанных с вирулентностью *P. gingivalis*, в присутствии пептидов, представляющих

фрагменты белка ArcA. Штамм 33277 *P. gingivalis* растили на среде TSB в присутствии или в отсутствие пептида в концентрации 16 мкМ. Уровни транскрипции измеряли при помощи ПЦР в реальном времени. Количества мРНК каждого из генов указано относительно его уровня экспрессии в отсутствие пептидов; этот уровень принят за 1. Приведенные результаты являются средними и стандартными отклонениями, полученными из трех независимых экспериментов. Звездочками отмечена статистически достоверные изменения уровней экспрессии не меньше, чем в два раза, при росте *P. gingivalis* на среде TBS в присутствии и в отсутствие пептидов ($P < 0,05$; t-критерий).

Чтобы подтвердить, что белки PGN_0806 и RagB действуют как рецепторы при взаимодействии *P. gingivalis* и *S. cristatus*, изучали экспрессию генов в присутствии или в отсутствие пептида⁴ у штаммов *Δ0806* и *ΔragB* и сравнивали ее с экспрессией у штамма 33277 дикого типа. Результаты показали, что потеря PGN_0806 предотвращала зависимую от пептида⁴ регуляцию генов *fimA*, *mfa1*, *rgp*, и *kgp* (Фиг. 6A). Хотя мутация *ragB* не полностью блокировала действие пептида⁴, в отношении всех генов-мишеней наблюдали заметное снижение его ингибирующего действия. Ранее было обнаружено, что двухкомпонентная регуляторная система (FimS/R) является активатором экспрессии гена *fimA*. Была исследована роль системы (FimS/R) в межклеточных взаимодействиях *P. gingivalis* и *S. cristatus*. Хотя уровни экспрессии генов *fimA* и *mfa1* у мутантов *fimS* и *fimR* были снижены приблизительно в 20 и в 4 раза (данные не показаны), зависимость от пептида⁴ регуляция экспрессии FimA в отсутствие FimS и FimR осталась неповрежденной, что позволяет предположить, что система FimS/R не участвует в рассматриваемом бактериальном межклеточном взаимодействии. Эти результаты предоставляют весомое подтверждение тому, что белки PGN_0806 и RagB, либо по отдельности, либо совместно, действуют как рецепторы в бактериальных межклеточных взаимодействиях *P. gingivalis* и *S. cristatus*.

Также определяли продукцию белков фимбрий и протеаз гингипейн на уровне трансляции, используя вестерн-блоттинг. Штамм 33277 *P. gingivalis* культивировали в присутствии пептида⁴ в концентрациях 0, 3, 12 и 48 мкМ (0×, ¼×, 1× и 4× IC₅₀ для экспрессии гена *fimA*) в течение 48 часов. Как показано на Фиг. 7A и 7B, продукция FimA, Mfa1 и HGP44 (связывающего домена белка RgpA) существенно снижалась в присутствии 12 и 48 мкМ пептида⁴. Однако, продукция иммунореактивного антигена массой 53 кДа не изменялась, совпадая с закономерностями экспрессии, наблюдавшимися на уровне транскрипции. Вдобавок, при помощи трансмиссионной электронной микроскопии было показано, что на поверхности клеток *P. gingivalis*, растущей на среде с пептидом⁴ (16

мкМ) присутствовало небольшое количество фимбрий по сравнению с клетками *P. gingivalis*, растущими без пептида4 (Фиг. 8А и 8В).

Обсуждение

Были обнаружены пять участков, связывающихся с белком ArcA. Примечательно, что функциональный мотив белка ArcA, расположенный на С-концевом участке молекулы и включающий аминокислоты 249-259, и пептид (пептид4), полученный из этой последовательности, оказывали ингибирующее действие как на синтез мРНК, так и на синтез белков фимбрий (FimA и Mfa1) и протеаз гингипейн (RgpA/B и Kgp). Следовательно, этот пептид является потенциальным кандидатом для создания ингибиторов, направленных против *P. gingivalis*. Исходя из наших наблюдений специфического связывания белка ArcA с поверхностью клеток *P. gingivalis*, кажется правдоподобным, что пептидные ингибиторы будут специфичны для этого организма и не будут оказывать заметного подавляющего действия на организмы, участвующие в ранних этапах колонизации (стрептококки и актиномицеты). Направленность только на *P. gingivalis*, как кажется, будет достаточна, чтобы воспрепятствовать развитию дисбиотической биоплёнки, поскольку *P. gingivalis* считают ключевым патогеном.

Рецепторы поверхности клеток являются важными элементами системы передачи сигналов, и обладают свойством связываться со специфическим сигналом (воспринимать его), следом за этим вызывая специфический клеточный ответ. В хорошо известный процесс передачи сигнала у бактерий вовлечена двухкомпонентная регуляторная система, которая включает сенсорную гистидинкиназу и регуляторный белок, отвечающий на сигнал. Двухкомпонентная система передачи сигнала FimS/R у *P. gingivalis* преимущественно регулирует экспрессию гена *fimA* и некоторых других генов, включая *mfa122*. Однако, как показывают результаты данного исследования, система FimS/R не участвует во взаимодействии между *P. gingivalis* и *S. cristatus*, поскольку уровни экспрессии *fimA* и *mfa1* изменялись в ответ на пептид4 и у мутантов *fimS* и *fimR*. Тем не менее, были идентифицированы два белка поверхности *P. gingivalis*, взаимодействующие с белком ArcA *S. cristatus*, в особенности, с участком ArcA, представленным пептидом4, - RagB (PGN_0294), основной иммунодоминантный антиген *P. gingivalis* и PGN_0806, отмеченный также как белок семейства белков протонного канала MotA/TolQ/ExbB. Примечательно, что есть сообщения о том, что у *Pseudomonas aeruginosa* в передаче сигнала участвует комплекс белков TonB-ExbB-ExbD. Причем RagA, который считают ассоциированным с RagB на поверхности *P. gingivalis*, является TonB-зависимым

рецептором. В данной работе показано, что мутация в гене *ragB* частично блокирует ингибирующее действие белка ArcA в отношении гена *fimA*, в то время как у штамма *P. gingivalis*, несущего мутацию в гене *pgn_0806*, ответ на пептид4 полностью отсутствовал. Эти данные подтверждают роль белков PGN_0806 и RagB как рецепторов в процессе взаимодействия *P. gingivalis* и *S. cristatus*. Хотя сигнальный пептид и потенциальный рецептор(ы) были идентифицированы, механизмы передачи межклеточного сигнала до сих пор неизвестны. В предыдущей работе было показано, что у мутанта по гену *priT* падала экспрессия гена *rgpA*, но не гена *kgp*, что указывало на то, что регуляция экспрессии генов *kgp* и *rgp* не координирована. Поэтому делают предположения о том, что в регуляции генов *fimA*, *mfal*, *kgp* и *rgp* принимают участие независимые внутриклеточные передатчики.

В заключение, был идентифицирован функциональный домен белка ArcA *S. cristatus*, имеющий высокое сродство к поверхности клетки *P. gingivalis* и способный подавлять экспрессию нескольких хорошо известных генов, связанных с вирулентностью и участвующих в производстве фимбрий и протеаз гингипейн. Были открыты два белка поверхности клетки *P. gingivalis*, RagB и PGN_0806, взаимодействующие с белком ArcA и необходимые для бактериального межклеточного взаимодействия *P. gingivalis* и *S. cristatus*. Эти результаты характеризуют функциональную сторону и раскрывают молекулярные механизмы антагонистических взаимоотношений между этими двумя бактериями полости рта, о которых мы сообщали ранее. Практическое применение этих результатов создаст основу для стратегий лечения, направленных на то, чтобы уменьшить колонизацию полости рта *P. gingivalis* и подавить патогенность связанных с развитием зубного налета, ассоциированного с периодонтитом.

Прогностический пример 2. Определение параметров и конструирование малых пептидов, производных от функциональных доменов белка ArcA, которые подавляют экспрессию гена *fimA* и генов протеаз гингипейн у *P. gingivalis*.

ArcA является основным связанным с клеточной стенкой белком поверхности у стрептококков группы А. ArcA действует как эффективный ингибитор экспрессии гена *fimA* и образования биоплёнки у *P. gingivalis*. Цели данного прогностического примера – сконструировать более мощный ингибитор, который может подавить экспрессию генов, связанных с вирулентностью *P. gingivalis*, и оптимизировать свойства этого пептидного ингибитора. Предполагается, что для регуляции экспрессии генов, связанных с вирулентностью *P. gingivalis*, достаточно короткого пептида, производного от ArcA. В

этой связи, основной акцент в данном разделе сделан на механизм, затрагивающий непосредственную роль белка ArcA в потенциале вирулентности *P. gingivalis*. Чтобы подтвердить эту модель, следует провести функциональные исследования *in vitro*, включающие анализы ферментативной активности, экспрессии генов и колонизации. Следует провести тесты и проделать сравнения реакций на пептидные ингибиторы у разных штаммов *P. gingivalis*, включая и имеющий фимбрии штамм 33277, и лишенный фимбрий штамм W83.

Предварительные данные показали, что P4 подавлял экспрессию генов *fimA* и *rgp* примерно на 50% при концентрации 15 мкМ. Чтобы создать функциональный пептид с большей ингибиторной активностью, следует создать более длинные пептиды, чтобы облегчить формирование вторичных структур и восстановить трехмерную структуру функционального мотива белка ArcA. Согласно прогнозам вторичной структуры белка ArcA, выполненным при помощи программ Jpred4, Psipre и Juf09D, считают, что последовательность P4 включает конец α -спирали, за которой следуют несколько аминокислотных остатков, образующих нерегулярный поворот, после чего начинается β -слой. Поэтому следует сконструировать 19- и 27-членные пептиды путем добавления, соответственно, 4 или 8 аминокислотных остатков к каждому концу P4, основываясь на последовательности ArcA. Способность пептидов подавлять экспрессию генов *fimA* и *rgp* нужно протестировать и сделать сравнения. Если будет обнаружено увеличение, в сравнении с P4, ингибирующей способности пептидов с увеличением размера, пептиды с наибольшей активностью следует анализировать далее, создав два пептида, имеющих дополнительные аминокислотные остатки только на одном конце P4. Например, если P4 с дополнительными аминокислотными остатками на N-конце продемонстрирует более высокую ингибирующую активность, скорее всего, α -спираль является критичной для функциональной активности. Как только будет определена критичная длина P4, можно будет установить ключевые аминокислотные остатки, используя мутагенез, например, сканирование аланином. Аминокислотные остатки P4 будут последовательно замещать аланином, что устраняет взаимодействия между боковыми цепями аминокислот, не изменяя конформацию главной цепи. Затем будет сконструирована библиотека пептидов, в которой будет представлена систематизированная комбинация аминокислот в ключевых позициях.

Будет также использована циклизация пептидов с целью увеличения ингибирующей активности функционального пептида. Циклические пептиды могут обеспечить

специфические особенности конформации за счет изменения взаимодействия между боковыми цепями.

Эти аналогичные пептиды следует исследовать, независимо от их ингибирующей активности, на предмет растворимости, стабильности и цитотоксичности. Р4 растворим в буфере (PBS) и в TBS (ростовой среде для *P. gingivalis*), однако, вносимые в пептид модификации могут повлиять на растворимость его аналогов. В этом случае следует произвести замены несущественных гидрофобные аминокислоты на заряженные или полярные. Исследования стабильности пептидных ингибиторов должны состоять из разных вариантов инкубации пептидов: 1) при 37°C; 2) в слюне; 3) в присутствии клеток *P. gingivalis* в течение 24 часов. Следует использовать основанную на данных тандемную масс-спектрографию в условиях положительной ионизации, позволяющую исследовать фрагментацию наиболее выраженного пика, полученного на предыдущем масс-спектре. Стартовые исследования показали, что Р4 стабилен при 37°C в течение 24 часов. Обнаружив быструю деградацию, несущественные аминокислоты активного пептида следует заменить искусственными аминокислотами. Аминокислоты, не входящие в состав белков могут увеличить стабильность пептида. Нужно исследовать биологические воздействия пептидов на клетки полости рта. Воздействию 60 или 15 мкМ пептидов в течение 24 или 48 часов следует подвергнуть кератиноциты полости рта человека (НОК – human oral keratinocytes) и фибробласты десны (HGF – human gingival fibroblasts) (ScienCell Research Laboratories). Следует провести анализы с применением лактатдегидрогеназы (LDH – lactate dehydrogenase), в которых количество выделенной в культуральную среду LDH служит маркером погибших клеток, либо скорость распада LDH служит критерием количества оставшихся живыми клеток.

Конечная цель состоит в том, чтобы обнаружить эффективный пептидный ингибитор, который будет выбран для функциональных исследований, включающих определение уровней мРНК генов *P. gingivalis*, связанных с вирулентностью, с активностью протеаз гингипейн, с формированием фимбрий и образованием биоплёнки. Ингибирующее действие пептидов на экспрессию генов, связанных с вирулентностью *P. gingivalis*, нужно измерить с использованием RT-qPCR как описано в (Wang BY, Wu J, Lamont RJ, Lin X, Xie H. 2009. Negative correlation of distributions of *Streptococcus cristatus* and *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque. *J Clin Microbiol* 47: 3902-6). Экспрессия генов, связанных с вирулентностью и участвующих в таких процессах как формирование фимбрий (*fimA*), протеиназная активность (*rgpA* и *rgpB*) и усвоение железа (*hmu* и *Y*) должна быть основным признаком пептидных ингибиторов. Концентрации полумаксимального

ингибирования (IC50), определенные по построенным кривым зависимости эффекта от дозы, должны быть мерой эффективности пептида для подавления экспрессии этих генов и стандартом для функциональных анализов. Все функциональные анализы должны проводиться с использованием серии разведений, включающих $4 \times IC_{50}$, IC_{50} и $\frac{1}{4} \times IC_{50}$.

Когда эффективный пептидный ингибитор будет идентифицирован, с использованием трансмиссионной электронной микроскопии следует исследовать фимбрии на поверхности клеток *P. gingivalis* после воздействия пептидного ингибитора (Kadowaki, T. et al. Arg-gingipain acts as a major processing enzyme for various cell surface proteins in Porphyromonas gingivalis. The Journal of biological chemistry 273, 29072-29076 (1998)). Нужно исследовать влияние пептидных ингибиторов на образование биопленок *P. gingivalis* и гетеротипических биопленок, образуемых *P. gingivalis* и *Streptococcus gordonii* как описано в (Eke, P. I. et al. Update on Prevalence of Periodontitis in Adults in the United States: NHANES 2009 to 2012. Journal of periodontology 86, 611-622, doi:10.1902/jop.2015.140520 (2015); Capestany CA, Kuboniwa M, Jung IY, Park Y, Tribble GD, Lamont RJ. 2006. Role of the Porphyromonas gingivalis InlJ protein in homotypic and heterotypic biofilm development. Infect Immun 74: 3002-5). Бактериальные биопленки следует выращивать либо в шестилуночных планшетах для последующей количественной оценки при помощи qPCR, либо в стеклянных чашках для анализа при помощи конфокальной микроскопии. Следует также исследовать роль пептидного ингибитора в подавлении инвазии *P. gingivalis* при помощи конфокальной микроскопии и анализа защитного действия антибиотиков (Ho MH, Chen CH, Goodwin JS, Wang BY, Xie H. 2015. Functional Advantages of Porphyromonas gingivalis Vesicles. PLoS One 10: e0123448; Chaudhuri S, Pratap S, Paromov V, Li Z, Mantri CK, Xie H. 2014. Identification of a diguanylate cyclase and its role in Porphyromonas gingivalis virulence. Infect Immun 82: 2728-35). Для дальнейших исследований роли пептидного ингибитора будет проведен эксперимент *ex-vivo* с использованием образцов зубного налета, взятых у пациентов, страдающих периодонтитом. Популяция пациентов должна состоять из 40 мужчин и женщин в возрасте от 21 до 65 лет. Пациенты будут отобраны на кафедре периодонтологии медицинского колледжа Мехарри (Dept. of Periodontology at Meharry Medical College). Основываясь на определении Американской академии периодонтологии (American Academy of Periodontology) (Wilensky, A., Polak, D., Houry-Haddad, Y. & Shapira, L. The role of RgpA in the pathogenicity of Porphyromonas gingivalis in the murine periodontitis model. Journal of clinical periodontology 40, 924-932, doi:10.1111/jcpe.12139 (2013)), пациенты с периодонтитом должны иметь: зубов > 16; 2 или более

межпроксимальных участка, имеющих клиническую потерю прикрепления (CAL - clinical attachment loss) > 4 мм и 2 или более с карманами глубиной > 5 мм. Критерием включения в эту группу будет отсутствие лечебных процедур по поводу периодонтита: удаления зубного камня и сглаживания поверхности корней – в течение одного года; хирургических операций по поводу периодонтита – в течение пяти лет. До начала исследования от всех пациентов будет получено информированное согласие. Пробы наддесневого и поддесневого зубного налета будут взяты у отобранных пациентов до начала какого-либо стоматологического лечения посредством стерильных бумажных наконечников из среднещечных (мезиобуккальных) бороздок первого моляра, первого премоляра, клыка и центрального резца как описано в (Wang BY et al., см. выше). Бумажные наконечники должны быть вставлены в бороздки на 30 сек., а затем перенесены в пробирки с 5 мл TSB. Пробирки немедленно помещают в анаэробную камеру, где бактерии культивируют в течение 24 часов. Каждую пробу затем разделяют на две лунки (каждая по 2,5 мл) в шестилуночном культуральном планшете с добавлением пептидного ингибитора, или без него, и продолжают культивировать в течение 48 часов до образования гетеротипических биоплёнок. Планктонные (свободноплавающие) и сидячие (прикрепленные) собирают и ресуспендируют в тризоле. Количество *P. gingivalis* определяют при помощи qPCR, используя набор QuantiTect SYBR Green PCR Kit с видоспецифичными праймерами к 16s-рРНК *P. gingivalis*. Стандарты, используемые для определения количества *P. gingivalis* готовят, используя геномную ДНК штамма дикого типа 33277. Когда обнаружена *P. gingivalis*, определяют генотип *fimA* штаммов, используя ПЦР со специфичными к разным генотипам *fimA* праймерами (Zheng C, Wu J, Xie H. 2011. Differential expression and adherence of Porphyromonas gingivalis FimA genotypes. Mol Oral Microbiol 26: 388-95).

Аргинин- и лизинспецифическую ферментативную активность клеток *P. gingivalis*, растущих в присутствии пептидных ингибиторов, определяют, используя флуорогенные субстраты L-аргинин-7-амино-4-метилкумарин (L-Arg-AMC) и L-лизин-7-амино-4-метилкумарин (L-Lys-AMC) (Olsen, I. & Potempa, J. Strategies for the inhibition of gingipains for the potential treatment of periodontitis and associated systemic diseases. Journal of oral microbiology 6, doi:10.3402/jom.v6.24800 (2014)) и сравнивают ее с ферментативной активностью клеток *P. gingivalis*, растущих без воздействия пептидных ингибиторов.

Предложенная схема конструирования пептидов приведет к созданию более сильнодействующего пептидного ингибитора, эффективность которого для подавления экспрессии таких связанных с вирулентностью генов, как *fimA* и *grp*, будет характеризоваться величиной $IC_{50} \leq 1$ мкМ. Ожидают, что, подобно P4,

сильнодействующий пептидный ингибитор будет подавлять экспрессию нескольких хорошо известных генов, связанных с вирулентностью, включая гены, кодирующие адгезины и протеиназы. Как результат, в присутствии пептидного ингибитора продукция и построение фимбрий у *P. gingivalis* будут уменьшенными или аномальными, а способность *P. gingivalis* к прикреплению, вероятно, сильно упадет. Однако, если не удастся найти более сильнодействующий пептид, чем P4, альтернативная стратегия заключается в том, чтобы искать эффективную комбинацию двух или более коротких пептидов, чтобы усилить ингибиторную активность. Авторы будут конструировать пептиды, основываясь на существующих в природе аминокислотных последовательностях других белков, дающих пики связывания, поскольку было обнаружено, что и другие белки проявляют некоторую ингибиторную активность, хотя и при намного больших концентрациях.

Рабочий пример 3: воздействие на фенотипические свойства вирулентности *P. gingivalis*

Приведенные выше примеры показывают, что 11-членный пептид (P4), полученный на основе аргининдеиминазы *Streptococcus cristatus*, способен подавлять экспрессию и продукцию нескольких хорошо известных факторов вирулентности *P. gingivalis*, включая белки фимбрий и протеазы гингипейн. Данная работа была расширена, чтобы выяснить влияние этого пептида на фенотипические свойства *P. gingivalis*, связанные с потенциалом ее вирулентности. Было обнаружено, что, хотя скорость роста *P. gingivalis* под действием пептида P4 не менялась, процессы формирования монотипических и гетеротипических биоплёнок и инвазии в эпителиальные клетки полости рта были подавлены. Вдобавок, уменьшая вызванную протеазой гингипейн деградацию интерлейкина 8 (IL8), протеин P4 препятствует обусловленным *P. gingivalis* нарушениям врожденного иммунитета. Следовательно, P4 обладает качествами, которые можно использовать для того, чтобы контролировать численность *P. gingivalis* в составе бактериальных сообществ полости рта и предотвратить реализацию ее вирулентного потенциала.

Методы

Штаммы бактерий и условия культивирования. Штаммы *P. gingivalis* выращивали из криоконсервированных культур в триптиказо-соевом бульоне (TSB) или на чашках с кровяным агаром на среде TSB с добавлением дрожжевого экстракта (1 мг/мл), гемина (5 мкг/мл) и менадиона (1 мкг/мл) и инкубировали при 37°C в анаэробной камере (85% N₂,

10% H₂, 5% CO₂). Штамм DL1 *S. gordonii* в культивировали на триптиказо-пептонном бульоне (TPB) с добавлением 0,5% глюкозы при 37°C в аэробных условиях.

Синтез пептида и его активность. P4 и контрольный пептид (пептид26, состоящий из 11 аминокислот, находящихся в исходной молекуле сразу же в направлении 3' за P4) были синтезированы Biomatik (Wilmington, DE) и очищены при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) до достижения чистоты $\geq 95\%$. Очищенный пептид ресуспендировали в PBS, свободном от нуклеаз и протеаз, разливали по аликвотам и хранили при -20°C.

Анализ образования монотипической биоплёнки. Прикрепление *P. gingivalis* к покрытым слюной поверхностям оценивали как описано ранее (O'Toole, G. A. & Kolter, R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Molecular microbiology* 28, 449-461 (1998)). Вкратце, штаммы *P. gingivalis* растили до середины фазы логарифмического роста (оптическая плотность OD₆₀₀ = 0.8) и концентрировали центрифугированием. Бактериальные клетки (10⁸) ресуспендировали в TSB, переносили в лунки 96-луночного полистиренового планшета (Corning Inc., Corning, NY), предварительно покрытые цельной слюной человека, двукратно разбавленной PBS, и инкубировали при 37°C. После промывки биоплёнки красили 1% кристаллвиолетом и экстрагировали краситель 95% этанолом. Поглощение растворенного в этаноле красителя измеряли при длине волны 540 нм на спектрофотометре (Ultrospec 2100 Pro; Amersham Pharmacia Biotech).

Анализ образования гетеротипической биоплёнки. Для создания гетеротипических биоплёнок *P. gingivalis* и *S. gordonii* использовали полистиреновые шестилуночные культуральные планшеты. Клетки штамма DL1 *S. gordonii* (2×10⁹) сперва культивировали в аэробной среде в покрытых слюной лунках при 37°C в течение 3 ч., несвязавшиеся клетки удаляли трехкратной промывкой PBS. Клетки *P. gingivalis* (2×10⁹), растущие в среде TSB, в присутствии P4 или без него, собирали, ресуспендировали в ¼TSB (1:3 TSB и PBS), добавляли к лункам, содержащим биоплёнку стрептококка и инкубировали в анаэробной среде при 37°C в течение 4 ч. Количество сидячих *P. gingivalis* в биоплёнках *S. gordonii* определяли с помощью qPCR. Клетки бактерий лизировали при помощи лизирующего раствора (раствор А; Invitrogen, Waltham, MA) и экстрагировали ДНК, используя Easy-DNA kit (Invitrogen). Количество клеток *P. gingivalis* в биоплёнках определяли при помощи PCR; использовали QuantiTect SYBR green PCR kit с праймерами гена 16S-pPHK *P. gingivalis* (Wu, J. & Xie, H. Role of arginine deiminase of *Streptococcus*

crystatus in *Porphyromonas gingivalis* colonization. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 54, 4694-4698, doi:10.1128/AAC.00284-10 (2010)). Стандарты для определения количества *P. gingivalis* в гетеротипических биоплёнках готовили, используя геномную ДНК *P. gingivalis* штамма 33277. Из свежей культуры штамма 33277 готовили серию разведений в PBS и рассеивали на чашки со средой TBS, чтобы получить число колониеобразующих единиц (CFUs – colony forming units) на миллилитр для каждого разведения.

Чтобы определить, способствует ли P4 выходу клеток *P. gingivalis* из гетеротипической биоплёнки, или/и он препятствует их возвращению, произвели модифицированный анализ биоплёнки. Клетки *P. gingivalis*, культивируемые без P4, сначала добавляли к находившимся в лунках шестилуночных полистироновых планшетов *S. gordonii* штамма DL1 и инкубировали в течение 4 ч. После удаления несвязанных *P. gingivalis* добавляли свежую среду TSB в половинном разведении (1:1 TSB и PBS), содержащую P4 и гентамицин (50 мкг/мл), планшеты инкубировали при малой скорости встряхивания в анаэробных условиях. Неприкрепленные клетки *P. gingivalis* собирали три раза с интервалом 24 часа, сидячие клетки бактерий собирали по истечении 72 часов. Бактериальную ДНК очищали, используя набор Easy-DNA kit (Invitrogen) и определяли количество клеток *P. gingivalis* с помощью qPCR.

Активность аргинин- и лизинспецифических протеиназ. Активность протеиназ гингипейн в цельных клетках *P. gingivalis* измеряли в 96-луночных планшетах, как описано в (Ho MH, Chen CH, Goodwin JS, Wang BY, Xie H. 2015. Functional Advantages of *Porphyromonas gingivalis* Vesicles. *PLoS One* 10: e0123448; Dashper, S. G. et al. Lactoferrin inhibits *Porphyromonas gingivalis* proteinases and has sustained biofilm inhibitory activity. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 56, 1548-1556, doi:10.1128/AAC.05100-11 (2012)). *P. gingivalis* штаммов 33277 или W83 культивировали в анаэробных условиях до достижения стационарной фазы ($OD_{600} = 1,2$). Бактериальные клетки отделяли центрифугированием от культуральной среды и ресуспендировали в 2 мл ледяного буфера TC150 (pH 8,0, 5 мМ цистеина, 50 мМ Трис-HCl, 150 мМ NaCl и 5 мМ CaCl₂). Суспензию клеток *P. gingivalis* ($2,5 \times 10^6$ клеток) или 100 мкл культуральной среды ресуспендировали в буфере TC150 и смешивали со 100 мкл раствора субстрата (2 мМ N-а-бензоил –Arg-p-нитроанилид (BAPNA) или уксуснокислый N-(p-тозил)-Gly-Pro-Lys 4-нитроанилид (GPK-NA), 30% изопропанол (объем/объем), 400мМ Трис-HCl (pH 8), 100мМ NaCl и 2 мМ цистеин) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Реакционные смеси инкубировали при 37°C в течение 4 часов после чего измеряли поглощение при длине волны 405 нм на микропланшетном фотометре (Bio-Rad, Hercules, CA).

Анализ бактериальной инвазии. Способность *P. gingivalis* к инвазии определяли при помощи теста защиты от действия антибиотиков (Xie, H., Cai, S. & Lamont, R. J. Environmental regulation of fimbrial gene expression in Porphyromonas gingivalis. Infect Immun 65, 2265-2271 (1997)). Кератиноциты полости рта человека (НОК – human oral keratinocytes, 5×10^5) (ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, CA) высевали в шестилуночный планшет. После контакта с клетками *P. gingivalis* штаммов 33277 или W83 в течение 1 ч., НОК промывали PBS, чтобы удалить несвязанные бактерии, и затем постоянно культивировали в течение следующих 4 ч. в присутствии антибиотиков гентамицина (300 мкг/мл) и метронизадола (200 мкг/мл), чтобы удалить бактерии, находящиеся вне клеток. Затем НОК три раза промывали PBS и лизировали стерильной дистиллированной dH₂O. Интернализированные бактерии высевали на чашки с кровавым агаром на среде TSB. Чашки инкубировали в анаэробных условиях при 37°C в течение 7 дней затем подсчитывали количество колониеобразующих единиц *P. gingivalis*.

Иммуноферментный анализ (ELISA). Для иммуноферментного анализа использовали набор для определения интерлейкина 8 (IL-8) человека Single Analyte ELISArray kit (Qiagen, Redwood City, CA) в соответствии с инструкциями производителя. Клетки НОК (1×10^5) подвергали контакту с клетками *P. gingivalis*, ранее росшими на среде с P4 или без него, в течение 2 или 18 часов. Культуральную среду клеток НОК отбирали и анализировали при помощи ELISA. Количество IL-8 определяли, используя стандартную кривую для данного цитокина.

Статистический анализ. Для определения статистической достоверности различий в полученных результатах о функциях и скорости роста различных штаммов *P. gingivalis* в условиях наличия и отсутствия P4, использовали t-критерий Стьюдента. Значение $p < 0,05$ считалось статистически достоверным. Все анализы проводили на трех аналогичных образцах.

Результаты

Влияние P4 на образование биоплёнки *P. gingivalis*. Штаммы *P. gingivalis* 33277 и W83 из Американской коллекции типовых культур (ATCC - American Type Culture Collection) были выбраны как представители двух форм: имеющих фимбрии и не имеющих капсулу и лишенных фимбрий и имеющих капсулу, чтобы исследовать изменение фенотипических характеристик *P. gingivalis* в ответ на P4. Как показано на Фиг. 9А и Фиг. 9В, скорость роста *P. gingivalis* штаммов 33277 и W83 в присутствии P4 (24 мкМ) существенно не

изменялась, по сравнению с ростом без Р4. Это наблюдение позволяет предположить, что механизм действия Р4 не связан с гибелью бактерий, что находится в согласии с нашими предыдущими выводами о том, что Р4 подавляет у *P. gingivalis* экспрессию и продукцию белков фимбрий и протеаз гингипейн. Несмотря на то, что основной нишей *P. gingivalis* является поддесневая область, данный организм колонизирует также наддесневые бляшки и поверхности слизистой оболочки полости рта. Безусловно, эти локализации, подвергаясь воздействию жидкой слюны, могут соответствовать ранним событиям колонизации. Поэтому исследовали способность штаммов *P. gingivalis* прикрепляться к поверхностям, покрытым слюной, в условиях роста в присутствии Р4 и без него. После инкубации в течение 24 ч., у штамма 33277 *P. gingivalis*, растущего в присутствии Р4 (24 мкМ), было отмечено снижение прикрепления приблизительно на 25% по сравнению с контролем, растущим без Р4 (Фиг. 10А), в то время как после 48 ч. инкубации снижение прикрепления достигало 70%. Было исследовано также влияние на образование биоплёнки *P. gingivalis* контрольного пептида (пептид26, состоящий из 11 аминокислот, находящихся в исходной молекуле сразу же в направлении 3' за Р4). Данный пептид не оказывал существенного влияния на образование биоплёнки. Исследовали также воздействие Р4 на образование монотипической биоплёнки штаммом W83. Клетки данного штамма культивировали в присутствии 24 мкМ или 48 мкМ Р4. Способность штамма W83 к образованию биоплёнки ниже, чем у штамма 33277, и после 24 ч. инкубации, влияния Р4 на образование биоплёнки не отметили. Однако, после 48 ч. инкубации обнаружили 33% и 54% снижение образования биоплёнки бактериями, культивируемыми в присутствии 24 мкМ или 48 мкМ Р4 (Фиг. 10В). Эти результаты указывают на то, что Р4 способен подавлять образование биоплёнки как штаммом 33277, так и штаммом W83, при этом более эффективно ингибируется штамм 33277, возможно, благодаря тому, что у него в процесс формирования биоплёнки вовлечены адгезины фимбрий.

Двухвидовые сообщества *P. gingivalis* и *S. gordonii* являются одним из лучше всего документированных примеров синергизма во взаимоотношениях бактерий полости рта. Молекулы на поверхности клеток, участвующие в коадгезии, хорошо описаны и включают FimA и Mfa1 *P. gingivalis* и GADH и SspA/B стрептококка. Мы постулировали, что Р4 может препятствовать образованию гетеротипических биопленок *P. gingivalis* и *S. gordonii*, подавляя экспрессию генов *fimA* и *mfa1*. Чтобы проверить эту гипотезу, в покрытых слюной лунках сначала формировали субстрат из *S. gordonii* штамм DL1, с которым затем взаимодействовали *P. gingivalis* выращенные без Р4 или в его присутствии

(24 мкМ). Количество клеток *P. gingivalis* штамма 33277, связавшихся с биоплёнкой *S. gordonii* DL1, определяли при помощи qPCR. Количество связавшихся клеток *P. gingivalis*, выращенных без Р4, было в 2,5 раза больше, чем клеток, росших в присутствии Р4 (Фиг.11). Не удивительно, что связывание *P. gingivalis* штамма W83, лишённого фимбрий, с биоплёнками, образованными *S. gordonii*, не наблюдали (данные не показаны). Это еще раз доказывает роль белков FimA и Mfa1 фимбрий во взаимодействии между *P. gingivalis* и *S. gordonii*.

Были проведены тесты, ставящие своей целью выяснить, может ли Р4 снизить количество клеток *P. gingivalis* в сложившейся биоплёнке. Для этого сформировали гетеротипические биоплёнки *S. gordonii* и *P. gingivalis*, выращенные без Р4. После удаления несвязанных бактерий, добавили Р4 (24 мкМ). Планктонные *P. gingivalis* собирали 3 раза с 24-часовым интервалом, биоплёнку снимали через 72 часа. Количество планктонных и сидячих *P. gingivalis* определяли при помощи qPCR. Количество планктонных *P. gingivalis* существенно возрастало после обработки Р4 (Фиг. 12А). В соответствии с этим, количество клеток *P. gingivalis* в гетеротипической биоплёнке находилось в обратной зависимости от количества неприкрепленных клеток, и добавление Р4 к гетеротипической биоплёнке *P. gingivalis* и *S. gordonii* снижало количество *P. gingivalis* приблизительно на 50% после 72 часов (Фиг. 12В). Существенной разницы в общем количестве клеток *P. gingivalis* в присутствии и в отсутствие Р4 не было (Фиг.12С), число *S. gordonii* в культуральной среде в присутствии и в отсутствие Р4 не изменялось (Фиг. 12D). Эти данные свидетельствуют о том, что Р4 не влияет на жизнеспособность бактерий, его действие способствует откреплению клеток *P. gingivalis* от гетеротипической биоплёнки и препятствует их возвращению в биоплёнку. Кроме того, в этой модельной системе Р4 не влияет на колонизацию микробиоты, характерной для здорового организма.

Влияние Р4 на внутриклеточную инвазию *P. gingivalis*. Прикрепление *P. gingivalis* к эпителиальным клеткам обусловлено, в первую очередь, белком FimA и доменами протеаз гингипейн, имеющими адгезивные свойства. Прикрепление, в свою очередь, инициализирует интернализацию бактерий в клетку хозяина. Поскольку Р4 подавляет продукцию FimA и протеаз гингипейн, постулировали, что он может также ингибировать инвазию *P. gingivalis* в кератиноциты полости рта человека (НОК). Были проведены тесты защиты от действия антибиотиков, чтобы сравнить способность к инвазии штаммов 33227 и W83 *P. gingivalis*, культивируемых в присутствии или в отсутствие Р4. В согласии с предыдущими сообщениями, штамм W83 *P. gingivalis* проникал в клетки НОК намного менее эффективно, чем штамм 33277 (Фиг. 13А и 13В). Вдобавок, эффективность

инвазии штамма 33277 при росте с Р4 (24 мкМ) уменьшалась приблизительно в 4,8 раза по сравнению с контролем, растущим без Р4, в то время как для штамма W83, растущего в присутствии и в отсутствие Р4 (48 мкМ), эффективность инвазии изменялась в 5,2 раза.

Влияние Р4 на ферментативную активность протеаз гингивейн. Протеазы гингивейн *P. gingivalis* представляют собой многофункциональные белки с адгезивными и каталитическими доменами. Исследовали и сравнивали аргинин- или лизинспецифическую активность у штаммов *P. gingivalis*, растущих с пептидом Р4 или без него. Как негативный контроль использовали тройной мутант *rgpA⁻, rgpB⁻ kgp⁻* (KDP128); как и ожидалось, у мутанта не было отмечено никакой аргинин- или лизинспецифической ферментативной активности (Фиг. 14А-14D). Связанная с клетками аргининспецифическая протеазная активность у штамма 33277 *P. gingivalis*, культивируемого с Р4 (48 мкМ) упала на 50%, в то время как у штамма W83 при тех же условиях эксперимента, было обнаружено падение в 46%, по сравнению с контролем без Р4 (Фиг. 14А). Сходную величину ингибирования Р4 проявлял и в отношении связанной с клетками лизинспецифической протеазной активности штаммов 33277 и W83 *P. gingivalis* (Фиг. 14В 6b). Также отслеживали активность белков Rgp и Kgp в ростовой среде штаммов 33277 и W83, чтобы определять уровни секретируемых протеаз гингивейн. Результатом воздействия Р4 (48 мкМ) на штамм 33277 *P. gingivalis* было более чем 2,5-кратное падение активности Rgp и двухкратное уменьшение активности Kgp (Фиг. 14С и 14D). Аналогично, после воздействия Р4 (48 мкМ) на штамм W83, активность белков Rgp и Kgp в культуральном супернатанте была на 50% ниже. Можно предсказать, что значительное снижение протеазной активности белков Rgp и Kgp, индуцированное Р4, снизит и вирулентный потенциал *P. gingivalis*.

Изменение уровня IL-8 под действием Р4. Известно, что *P. gingivalis* селективно нарушает производство некоторых цитокинов и хемокинов, таких как IL-8. Поэтому, при помощи ELISA, мы сравнили накопление IL-8 в культуральной среде НОК, подвергшихся действию *P. gingivalis*, выращенных в присутствии Р4 (48 мкМ) или в его отсутствие. Результаты показали, что Р4 существенно снижал способность *P. gingivalis* штаммов 33277 и W83 подавлять накопление IL-8 (Фиг. 15). Эти данные указывают на то, что у Р4 есть потенциальная возможность корректировать вызываемые *P. gingivalis* нарушения врожденного иммунного ответа.

Обсуждение

Лечение хронического периодонтита и других его форм, как правило, включает в себя механическое удаление биоплёнки зубного налета, которые иногда дополняют общим или местным применением антибиотиков, особенно при лечении острого или не поддающегося консервативному лечению периодонтита. Хотя дополнительное применение может улучшить результаты механических методов лечения, результаты метаанализа говорят о том, что выигрыш от лечения антибиотиками уравнивается их побочными эффектами. Сомнения в необходимости применения антибиотиков связаны с тем, что они разрушают симбиотические или мутуалистические взаимоотношения между организмом хозяина и микробиотой комменсалов и приводят к возникновению устойчивых к антибиотикам бактерий полости рта. Следовательно, стратегической целью для сохранения здоровой микробиоты полости рта становится специфическая направленность на патогенные бактерии, а не неселективное подавление как патогенов, так и комменсалов.

Белки фимбрий, FimA и Mfa1 и протеазы гингипейн, RgpA, RgpB, и Kgp являются признанными факторами вирулентности *P. gingivalis*. Гены mfa1 и fimA присутствуют в геномах 20 штаммов *P. gingivalis* из 21 штамма, выделенных во всем мире за последние 25 лет, и все до сих пор исследованные штаммы *P. gingivalis* продуцируют протеазы гингипейн, которые являются как мембраносвязанными, так и секретируемыми в растворимой форме белками. Главная роль белков FimA и Mfa1 состоит в том, чтобы способствовать прикреплению бактерии к различным поверхностям полости рта, что ведет к образованию биоплёнки и к интернализации в клетки эпителия. Семейство гингипейн включает в себя две аргинин- и одну лизинспецифичную цистеиновые протеазы (RgpA, RgpB и Kgp). Протеазы гингипейн являются многофункциональными белками, играющими важную роль в поступлении питательных веществ и переработке белков и могут также разлагать белки матрикса и эффекторные молекулы иммунной системы хозяина. Протеазы гингипейн играют важную роль в образовании биоплёнки благодаря С-концевым адгезивным районам белков RgpA и Kgp или благодаря процессингу профимбрилина. В исследованиях на животных, в модели поражения тканей мыши, при использовании мутантов по генам протеиназ гингипейн обнаружили, что эти протеиназы, особенно Kgp, вносят основной вклад в процесс образования кожных абсцессов. Более того, в той же модели предварительная обработка *P. gingivalis* ингибитором Kgp также снижала вирулентность бактерий, что доказывает существенную роль протеаз гингипейн в инфекции *P. gingivalis*. В предыдущем исследовании Wilensky и др. также показали, что у мышей потерю костной ткани альвеол наблюдали лишь в том

случае, когда мышей перорально инфицировали штаммами *P. gingivalis*, экспрессирующими RgpA. Поэтому, подавление этих факторов вирулентности *P. gingivalis* стало основным направлением для стратегии профилактики и лечения периодонтита, появился длинный перечень обнаруженных ингибиторов протеаз гингипейн, включающий синтетические соединения, белки и пептиды, а также растительные экстракты. Однако исследуют также возможности терапии, основанной на прекращении других патогенных процессов, вызванных *P. gingivalis*. Было обнаружено, что некоторые молекулы, выделенные из натуральных морепродуктов, являются ингибиторами образования гетеротипического сообщества *P. gingivalis* и *S. gordonii* за счет подавления экспрессии генов *mfal* и *fimA*. Другими многообещающими ингибиторами образования биоплёнки являются малые пептиды, представляющие связывающий домен (BAR) белка SspB *S. gordonii*. Было показано, что они разрушают сообщество *P. gingivalis* и *S. gordonii* и предотвращают потерю костной ткани в модели, основанной на заражении мыши. Одним из ограничений этих ингибиторов является направленность каждого из них лишь на один фактор вирулентности *P. gingivalis*, либо на белок фимбрий, либо на протеазы гингипейн. В данном сообщении мы показываем, что P4, происходящий из последовательности белка ArcA *S. cristatus* имеет гораздо более широкий спектр действия и способен подавлять несколько факторов вирулентности одновременно. Такая множественность действий сильно увеличивает ценность данного пептида как мощного ингибитора, способного удалять штаммы *P. gingivalis*, по-разному экспрессирующие факторы вирулентности.

В данном исследовании было показано, что P4 не влияет на рост *P. gingivalis*, но существенно уменьшает количество клеток *P. gingivalis* как в монотипической биоплёнке, так и в гетеротипической биоплёнке, образованной *P. gingivalis* и *S. gordonii*. Можно прогнозировать, что снижение количества клеток *P. gingivalis* ведет к потере конкурентного преимущества и разрушению синергизма действия бактерий в составе сообщества. Другое важное открытие состоит в том, что P4 не только ингибирует образование биоплёнки *P. gingivalis*, но также разрушает установившиеся биоплёнки. Хотя механизм этого процесса неясен, предполагают, что P4 разрушает прикрепление и препятствует повторному вхождению открепившихся бактерий в биоплёнку. Диспергированные клетки *P. gingivalis* можно удалить из полости рта благодаря их сниженной способности к прикреплению к поверхностям полости рта и к инвазии в клетки хозяина. Таким образом, непосредственно воздействуя при помощи P4 на прикрепление *P. gingivalis*, можно стабилизировать здоровую микробиоту и поддерживать

гомеостаз между микробиотой полости рта и иммунной системой хозяина, чего может быть достаточно для профилактики и лечения периодонтитов, связанных с *P. gingivalis*.

Существуют сообщения, что в клетках эпителия полости рта, зараженных *P. gingivalis*, изменяется экспрессия IL-1 α , IL- β , IL-6, IL-8, IL-10 и NF- κ B. В отличие от многих бактерий, колонизирующих периодонт, которые индуцируют экспрессию IL-8 в клетках эпителия десны, *P. gingivalis* подавляет продукцию IL-8, что заставляет предположить исключительную роль *P. gingivalis* в управлении ответом клеток эпителия на сигналы хемокинов. Способность *P. gingivalis* изменять уровень IL-8 может играть ведущую роль в возникновении периодонтита, поскольку сохранение периодонта здоровым зависит от поддержания градиента этого хемокина для рекрутирования нейтрофилов в десневую борозду. Пептид P4 ослабляет способность *P. gingivalis* снижать накопление IL-8 в супернатанте культуры эпителиальных клеток, из чего можно предположить, что P4 способен частично восстановить ущерб, нанесенный *P. gingivalis* иммунитету хозяина, что может способствовать поддержанию гомеостаза ткани периодонта.

В заключение, была оценена роль ингибирующего действия P4 на *P. gingivalis* в отношении образования биоплёнки, инвазии и активности протеиназ гингипейн. Было показано, что уникальной особенностью этого пептида является то, что он эффективно снижает все эти свойства *P. gingivalis*, связанные с вирулентностью. Способность P4 селективно удалять *P. gingivalis* из зубного налета и снижать ее вирулентный потенциал делает его привлекательным средством контроля состава микробных сообществ и поддержания здоровой микробиоты.

Рабочий пример 4. Цитотоксичность и стабильность P4.

Чтобы изучить цитотоксическое действие P4, уровень повреждения плазматической мембраны клеток НОК определяли при помощи Pierce LDH Cytotoxicity Assay Kit. Клетки НОК высевали в шестилуночный планшет в количестве 1×10^5 клеток на лунку и культивировали в среде для кератиноцитов полости рта (Oral Keratinocyte Medium) с добавлением антибиотиков (100ед/мл пенициллина и 100мкг/мл стрептомицина) и 10% фетальной сыворотки теленка при 37°C в увлажняемом инкубаторе в атмосфере 5% CO₂ в течение 24 часов. Затем клетки инкубировали в ростовой среде с добавлением P4 (50 или 200 мкМ) в течение 48 часов. Ростовую среду собирали для определения цитотоксичности на основе активности лактатдегидрогеназы (LDH) в соответствии с инструкциями производителя (Thermo Scientific). Для оценки влияния P4 на апоптоз клеток НОК, клетки

отбирали и окрашивали при помощи набора Annexin V-FITC Apoptosis Kit (Invitrogen), которым окрашиваются мертвые клетки и клетки в процессе апоптоза. Количество подвергающихся апоптозу и мертвых клеток (аннексин V+/PI+) определяли на проточном флуориметре. Как показано на Фиг. 9А и 9В, даже при столь высоких концентрациях как 200мкМ (приблизительно в 200 раз больше, чем требуется, чтобы снизить уровень экспрессии генов *fimA* и *rpg* на 50%, ID50), P4 не вызывал у клеток НОК повреждение клеточной мембраны и апоптоз.

Для определения стабильности P4 в растворе, P4 инкубировали в H₂O, PBS и цельной слюне при 37°C в течение 24 часов. Затем проводили сравнительный анализ образцов P4 с использованием комбинации жидкостной хроматографии и тандемного масс-спектрографического анализа (LC-MS/MS analysis). Вкратце, 2 мкл P4 вводили в капиллярную колонку с наполнителем силикагелем C18 и проводили градиентное элюирование 5-20% ацетонитрила с 0,1% муравьиной кислоты (FA formic acid) в течение 30 мин. Масс-спектры получали после положительной ионизации на масс-спектрометре Orbitrap LTQ XL (Thermo). Как показано в Таблице 4, H₂O и PBS не влияли на стабильность P4 при 24-часовой инкубации, но после того, как P4 инкубировали в разведенной цельной слюне (PBS:слюна 1:1), отмечали постепенное снижение интенсивности сигнала после 0, 0,5, 1, 2, 4, и 24 часов инкубации, и после 48 часов инкубации характерный для P4 пик совершенно терялся на фоне шума. Следует отметить, что эти результаты показывают только относительные уровни P4 в этих растворах, и нельзя заключить, что лишь одна десятая P4 осталась недеградированной. Однако, то, что сигнал обнаруживали после 24 ч. инкубации, позволяет предположить, что P4 может сохраняться в слюне как минимум 24 часа на некотором уровне.

Таблица 4

Среда для инкубации P4	Время обработки (часов)	Интенсивность сигнала пика 331.45 m/z
H ₂ O	0	$4.8 \times 10^6 \pm 4.5 \times 10^5$
H ₂ O	24	$2.1 \times 10^6 \pm 1.3 \times 10^5$
PBS	24	$4.6 \times 10^6 \pm 4.2 \times 10^5$
Слюна	0	$3.9 \times 10^6 \pm 3.1 \times 10^5$
Слюна	0.5	$3.6 \times 10^6 \pm 4.0 \times 10^5$
Слюна	1	$2.4 \times 10^6 \pm 2.2 \times 10^5$
Слюна	2	$1.7 \times 10^6 \pm 4.2 \times 10^5$
Слюна	4	$8.8 \times 10^5 \pm 2.7 \times 10^4$
Слюна	24	$4.2 \times 10^5 \pm 3.9 \times 10^4$
Слюна	48	$6.0 \times 10^3 \pm 4.1 \times 10^2$

I. Варианты реализации

В дополнение ко всему, что было изложено выше или заявлено на настоящий момент особо предполагается, что может быть заявлен любой из следующих вариантов реализации. Вариант реализации 1: Выделенный пептид, связывающийся с белком поверхности *P. gingivalis* и имеющий последовательность с идентичностью по меньшей мере 60% с по меньшей мере одним из: SEQ ID NO: 2-7. Вариант реализации 2. Фармацевтическая композиция для лечения или профилактики связанного с зубным налетом состояния или симптома, содержащая соединение, содержащее пептид по варианту реализации 1. Вариант реализации 3: Применение соединения в производстве фармацевтической композиции для лечения или профилактики связанного с зубным налетом состояния или симптома, отличающееся тем, что соединение содержит пептид по варианту реализации 1. Вариант реализации 4: По любому из вариантов реализации 2 – 3, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция приготовлена для местного введения. Вариант реализации 5: По любому из вариантов реализации 2 – 4, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция может представлять по меньшей мере одно из следующих: средство для чистки зубов, буккальное средство, сублингвальное средство, мазь для полости рта, крем для полости рта, паста для полости рта, эмульсия для полости рта и жевательная резинка. Вариант реализации 6: По любому из вариантов реализации 2 – 5, отличающийся тем, что пептид присутствует в терапевтически эффективном количестве для лечения или профилактики связанного с зубным налетом состояния или симптома у субъекта, нуждающегося в этом. Вариант реализации 7: По любому из вариантов реализации 2 – 6, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция является средством для чистки зубов. Вариант реализации 8: По любому из вариантов реализации 2 – 7, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция содержит консервант. Вариант реализации 9: По любому из вариантов реализации 2 – 8, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция содержит фармацевтически приемлемый носитель. Вариант реализации 10: По любому из вариантов реализации 2 – 9, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция содержит фармацевтически приемлемый носитель, выбранный из группы, состоящей из: наполнители, адъюванты, поверхностно-активные вещества, суспендирующие агенты, эмульгирующие агенты, инертные наполнители, разбавители, вспомогательные вещества, смачивающие агенты, связующие вещества, смазывающие вещества, буферные агенты, разрыхлители и носители, вспомогательные агенты, такие как окрашивающие агенты и вкусо-ароматические агенты. Вариант реализации 11: Способ лечения или профилактики состояния или симптома, связанного с зубным налетом у субъекта, включающий местное

применение на поверхности зубов и/или десен субъекта терапевтически эффективного количества соединения, содержащего пептид по варианту реализации 1. Вариант реализации 12: Способ по варианту реализации 11, отличающийся тем, что субъект нуждается в лечении или профилактическом лечении состояния или симптома, связанного с зубным налетом. Вариант реализации 13: По любому из вариантов реализации 2 – 12, отличающийся тем, что состояние или симптом, связанные с зубным налетом выбраны из группы, состоящей из: кариес зуба, гингивит, зубной камень, периодонтит, атеросклероз, заболевание, вызванное вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), выпадение зубов, поражения коронарной артерии, инсульт, преждевременные роды, малый массы при рождении, сахарный диабет в фазе декомпенсации, заболевания органов дыхания, ревматоидный артрит и астма. Вариант реализации 14: Способ снижения вероятности образования биоплёнки, содержащей популяцию *Porphyromonas gingivalis* на поверхности, включающий воздействие на поверхность эффективной концентрации соединения, включающего пептид по варианту реализации 1. Вариант реализации 15: Способ снижения экспрессии гена вирулентности бактерии или гена бактерии, связанного со способностью к образованию биоплёнки, включающий воздействие на бактерию эффективной концентрации соединения, включающего пептид, имеющий последовательность с идентичностью по меньшей мере 60% по меньшей мере с одной из последовательностей SEQ ID NO: 3-7, отличающийся тем, что бактериальный ген выбран из группы, состоящей из: гена фимбрилина *fimA*, генов протеазы гингипейн *mfal*, *ggrA/B*, *ggrA* и *kgr*. Вариант реализации 16: Способ по варианту реализации 15, отличающийся тем, что бактериальным геном является ген *fimA*. Вариант реализации 17: Способ по варианту реализации 15, отличающийся тем, что бактерией является *Porphyromonas gingivalis*. Вариант реализации 18: По любому из вариантов реализации 15 – 17, отличающийся тем, что способ осуществляется *in vitro*. Вариант реализации 19: По любому из вариантов реализации 15 – 18, отличающийся тем, что воздействие включает приведение контакт. Вариант реализации 20: По любому из вариантов реализации 15 – 19, отличающийся тем, что воздействие включает воздействие на бактерий в организме субъекта, нуждающегося в указанном воздействии. Вариант реализации 21: Нуклеиновая кислота, кодирующая пептид по варианту реализации 1. Вариант реализации 22: Нуклеиновая кислота, комплементарная нуклеиновой кислоте по варианту реализации 21. Вариант реализации 23: Клетка, содержащая нуклеиновую кислоту по любому из вариантов реализации 22 - 24. Вариант реализации 24: Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по любому из вариантов реализации 22 – 25. Вариант реализации 25: По любому из вариантов реализации 1 – 26, отличающийся тем, что пептид имеет идентичность по

меньшей мере 60% с одной из последовательностей: IRGRETKK, NHMFADTRNRE, VYNREEDTRIEGGDEL, NIFKKNVGFKK и ELVRGRGGPRCMSMPF. Вариант реализации 26: По любому из вариантов реализации 1 – 25, отличающийся тем, что пептид не имеет существенной активности аргининдеиминазы. Вариант реализации 27: По любому из вариантов реализации 1 – 26, отличающийся тем, что пептид является фрагментом в пределах позиций 208 – 409 SEQ ID NO: 1. Вариант реализации 28: По любому из вариантов реализации 1 – 27, отличающийся тем, что пептид имеет длину не более чем 202 аминокислоты. Вариант реализации 29: По любому из вариантов реализации 1 – 28, отличающийся тем, что пептид содержит только допустимые консервативные замены как указано в Таблице 1 в сравнении по меньшей мере с одним из указанных SEQ ID NO: 2-7. Вариант реализации 30: По любому из вариантов реализации 1 – 29, отличающийся тем, что пептид содержит только предпочтительные консервативные замены как указано в Таблице 1 в сравнении по меньшей мере с одним из указанных SEQ ID NO: 2-7. Вариант реализации 31: По любому из вариантов реализации 1 – 30, отличающийся тем, что пептид имеет последовательность с идентичностью по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 90, 95, 99 или 100% по меньшей мере с одним из SEQ ID NO: 2-7. Вариант реализации 32: По любому из вариантов реализации 1 – 31, отличающийся тем, что пептид имеет последовательность с идентичностью по меньшей мере 90, 95, 99 или 100% по меньшей мере с одним из SEQ ID NO: 2-7. Вариант реализации 33: По любому из вариантов реализации 1 – 32, отличающийся тем, что пептид имеет последовательность с идентичностью по меньшей мере 60% с SEQ ID NO: 6 и отличающийся тем, что соединение содержит не более чем 4 – 8 аминокислотных остатков, фланкирующих вышеупомянутый пептид по меньшей мере с одного из N-конца или C-конца. Вариант реализации 34: По любому из вариантов реализации 2 – 33, отличающийся тем, что соединение состоит из пептида. Вариант реализации 35: По любому из вариантов реализации 1 – 34, отличающийся тем, что длина пептида составляет не больше, чем 200, 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 или 5 аминокислотных остатков. Вариант реализации 36: По любому из вариантов реализации 1 – 35, отличающийся тем, что пептид имеет только консервативные замены в сравнении по меньшей мере с одним из указанных SEQ ID NO: 2-7. Вариант реализации 37: По любому из вариантов реализации 1 – 36, отличающийся тем, что пептид имеет только допустимые замены, указанные в Таблице 1 в сравнении по меньшей мере с одним из указанных SEQ ID NO: 2-7. Вариант реализации 38: По любому из вариантов реализации 1 – 37, отличающийся тем, что пептид имеет только предпочтительные замены, указанные в Таблице 1 в сравнении по меньшей мере с одним

из указанных SEQ ID NO: 2-7. Вариант реализации 39: По любому из вариантов реализации 1 – 38, отличающийся тем, что пептид имеет последовательность NIFKKNVGFKK.

Ж. Выводы

Следует понимать, что любые представленные элементы описанных вариантов реализации настоящего изобретения могут быть воплощены в одной структуре, одной стадии, одном веществе или т.п. Точно так же, данный элемент описанного варианта реализации может быть воплощен в нескольких структурах, стадиях, веществах или т.п.

В вышеизложенном описании представлены и описаны способы, механизмы, способы получения, композиции веществ и другие идеи настоящего изобретения. Кроме того, в настоящем описании представлены и описаны лишь некоторые варианты реализации предложенных способов, механизмов, способов получения, композиций веществ и других описанных элементов, но, как упомянуто выше, следует понимать, что идеи настоящего описания можно применять в различных других комбинациях, модификациях и условиях, и их можно изменять или модифицировать в пределах объема настоящего изобретения, описанного в данном документе, в соответствии с навыками и/или знаниями специалистов в соответствующей области техники. Варианты реализации, описанные выше, дополнительно предназначены для объяснения некоторых наилучших известных вариантов практического осуществления предложенных способов, механизмов, способов получения, композиций веществ и других элементов согласно настоящему описанию, а также для обеспечения возможности применения идей настоящего описания другими специалистами в данной области техники в предложенных или других вариантах реализации, а также с различными модификациями, необходимыми для конкретного введения или применения. Соответственно, предложенные способы, механизмы, способы получения, композиции веществ и другие элементы согласно настоящему изобретению не ограничены точными вариантами реализации и примерами, описанными в данном документе. Все заголовки разделов в настоящем документе приведены лишь для согласованности с предложениями 37 раздела Свода федеральных правил, § 1.77, или в противном случае для обеспечения организационной последовательности. Указанные заголовки не ограничивают или не характеризуют изобретение(-ия), изложенное в настоящем документе.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> МЕХАРРИ МЕДИКАЛ КОЛЛЕДЖ

<120> ИНГИБИТОРЫ БИОПЛЕНКИ

<130> 212149-301023

<150> 62/401,572

<151> 2016-09-29

<160> 32

<170> PatentIn версия 3.5

<210> 1

<211> 409

<212> БЕЛОК

<213> Streptococcus cristatus

<400> 1

Met Ser Thr His Pro Ile His Val Phe Ser Glu Ile Gly Lys Leu Lys
1 5 10 15

Lys Val Met Leu His Arg Pro Gly Lys Glu Leu Glu Asn Leu Leu Pro
20 25 30

Asp Tyr Leu Glu Arg Leu Leu Phe Asp Asp Ile Pro Phe Leu Glu Asp
35 40 45

Ala Gln Lys Glu His Asp Ala Phe Ala Gln Ala Leu Arg Asp Glu Gly
50 55 60

Ile Glu Val Leu Tyr Leu Glu Lys Leu Ala Ala Glu Ser Leu Ile Ser
65 70 75 80

Pro Glu Ile Arg Glu Gln Phe Ile Glu Glu Tyr Leu Glu Glu Ala Asn
85 90 95

Ile Arg Gly Arg Glu Thr Lys Lys Ala Ile Arg Glu Leu Leu His Gly
100 105 110

Ile Lys Asp Asn Gln Glu Leu Val Glu Lys Thr Met Ala Gly Val Gln
115 120 125

Lys Ala Glu Leu Pro Glu Ile Pro Asp Glu Ala Lys Gly Leu Thr Asp
130 135 140

Leu Val Glu Ser Asp Tyr Pro Phe Ala Ile Asp Pro Met Pro Asn Leu
145 150 155 160

Tyr Phe Thr Arg Asp Pro Phe Ala Thr Ile Gly Asn Ala Val Ser Leu
165 170 175

Asn His Met Phe Ala Asp Thr Arg Asn Arg Glu Thr Leu Tyr Gly Lys
180 185 190

Tyr Ile Phe Lys Tyr His Pro Glu Tyr Ala Gly Lys Val Glu Leu Val
195 200 205

Tyr Asn Arg Glu Glu Asp Thr Arg Ile Glu Gly Gly Asp Glu Leu Val
210 215 220

Leu Ser Lys Asp Val Leu Ala Val Gly Ile Ser Gln Arg Thr Asp Ala
225 230 235 240

Ala Ser Ile Glu Lys Leu Leu Val Asn Ile Phe Lys Lys Asn Val Gly
245 250 255

Phe Lys Lys Val Leu Ala Phe Glu Phe Ala Asn Asn Arg Lys Phe Met
260 265 270

His Leu Asp Thr Val Phe Thr Met Val Asp Tyr Asp Lys Phe Thr Ile
275 280 285

His Pro Glu Ile Glu Gly Asp Leu Arg Val Tyr Ser Val Thr Tyr Glu
290 295 300

Asn Glu Lys Leu Lys Ile Val Glu Glu Lys Gly Asp Leu Ala Glu Leu
305 310 315 320

Leu Ala Gln Asn Leu Gly Val Glu Lys Val His Leu Ile Arg Cys Gly
325 330 335

Gly Gly Asn Ile Val Ala Ala Gly Arg Glu Gln Trp Asn Asp Gly Ser
340 345 350

Asn Thr Leu Thr Ile Ala Pro Gly Val Val Val Val Tyr Asp Arg Asn
355 360 365

Thr Val Thr Asn Lys Ile Leu Glu Glu Tyr Gly Leu Arg Leu Ile Lys
370 375 380

Ile Arg Gly Ser Glu Leu Val Arg Gly Arg Gly Gly Pro Arg Cys Met
385 390 395 400

Ser Met Pro Phe Glu Arg Glu Glu Val
405

<210> 2

<211> 202

<212> BEJOK
<213> Streptococcus cristatus

<400> 2

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

Val Leu Ser Lys Asp Val Leu Ala Val Gly Ile Ser Gln Arg Thr Asp
20 25 30

Ala Ala Ser Ile Glu Lys Leu Leu Val Asn Ile Phe Lys Lys Asn Val
35 40 45

Gly Phe Lys Lys Val Leu Ala Phe Glu Phe Ala Asn Asn Arg Lys Phe
50 55 60

Met His Leu Asp Thr Val Phe Thr Met Val Asp Tyr Asp Lys Phe Thr
65 70 75 80

Ile His Pro Glu Ile Glu Gly Asp Leu Arg Val Tyr Ser Val Thr Tyr
85 90 95

Glu Asn Glu Lys Leu Lys Ile Val Glu Glu Lys Gly Asp Leu Ala Glu
100 105 110

Leu Leu Ala Gln Asn Leu Gly Val Glu Lys Val His Leu Ile Arg Cys
115 120 125

Gly Gly Gly Asn Ile Val Ala Ala Gly Arg Glu Gln Trp Asn Asp Gly
130 135 140

Ser Asn Thr Leu Thr Ile Ala Pro Gly Val Val Val Val Tyr Asp Arg
145 150 155 160

Asn Thr Val Thr Asn Lys Ile Leu Glu Glu Tyr Gly Leu Arg Leu Ile
165 170 175

Lys Ile Arg Gly Ser Glu Leu Val Arg Gly Arg Gly Gly Pro Arg Cys
180 185 190

Met Ser Met Pro Phe Glu Arg Glu Glu Val
195 200

<210> 3
<211> 8
<212> BEJOK
<213> Streptococcus cristatus

<400> 3

Ile Arg Gly Arg Glu Thr Lys Lys
1 5

<210> 4
<211> 11
<212> БЕЛОК
<213> Streptococcus cristatus

<400> 4

Asn His Met Phe Ala Asp Thr Arg Asn Arg Glu
1 5 10

<210> 5
<211> 16
<212> БЕЛОК
<213> Streptococcus cristatus

<400> 5

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

<210> 6
<211> 11
<212> БЕЛОК
<213> Streptococcus cristatus

<400> 6

Asn Ile Phe Lys Lys Asn Val Gly Phe Lys Lys
1 5 10

<210> 7
<211> 16
<212> БЕЛОК
<213> Streptococcus cristatus

<400> 7

Glu Leu Val Arg Gly Arg Gly Gly Pro Arg Cys Met Ser Met Pro Phe
1 5 10 15

<210> 8
<211> 1230
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Наиболее вероятная невырожденная последовательность

<400> 8
atgagcacc atccgattca tgtgttttagc gaaattggca aactgaaaa agtgatgctg 60
catcgcccgg gcaaagaact ggaaaacctg ctgccggatt atctggaacg cctgctgttt 120
gatgatattc cgtttctgga agatgcgag aaagaacatg atgctgtttgc gcagggcgtg 180
cgcgatgaag gcattgaagt gctgtatctg gaaaaactgg cggcggaaag cctgattagc 240

ccggaaattc gcgaaacagtt tattgaagaa tatctggaag aagcgaacat tcgcgggcgc	300
gaaaccaaaa aagcgattcg cgaactgctg catggcatta aagataacca ggaactggtg	360
gaaaaaacca tggcgggctg gcagaaagcg gaactgccgg aaattccgga tgaagcgaaa	420
ggcctgaccg atctggtgga aagcgattat ccgtttgca ttgatccgat gccgaacctg	480
tattttaccg gcgatccggt tgcgaccatt ggcaacgcgg tgagcctgaa ccatatgttt	540
gcggataccc gcaaccgcga aaccctgtat ggcaaatata tttttaaata tcatccggaa	600
tatgcgggca aagtggaact ggtgtataac cgcaagaag ataccgcgat tgaaggcggc	660
gatgaactgg tgctgagcaa agatgtgctg gcggtgggca ttagccagcg caccgatgcg	720
gcgagcattg aaaaactgct ggtgaacatt ttaaaaaaa acgtgggctt taaaaaagtg	780
ctggcgtttg aatttgcaa caaccgcaa tttatgcatc tggataccgt gtttaccatg	840
gtggattatg ataaatttac cattcatccg gaaattgaag gcgatctgcg cgtgtatagc	900
gtgacctatg aaaacgaaaa actgaaaatt gtggaagaaa aaggcgatct ggcggaactg	960
ctggcgcaga acctgggctg ggaaaaagtg catctgattc gctgcggcgg cggcaacatt	1020
gtggcgggcg gccgcgaaca gtggaacgat ggcagcaaca ccctgaccat tgcgccccgc	1080
gtggtggtgg tgtatgatcg caacaccgtg accaacaaaa ttctggaaga atatggcctg	1140
cgctgatta aaattcgcg cagcgaactg gtgcgcccc gcggcgccc gcgctgcatg	1200
agcatgccgt ttgaacgcga agaagtgtaa	1230

<210> 9
 <211> 606
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Наиболее вероятная невырожденная последовательность

<400> 9	
gtgtataacc gcaagaaga taccgcatt gaaggcggcg atgaactggt gctgagcaaa	60
gatgtgctgg cgggtgggcat tagccagcgc accgatgctg cgagcattga aaaactgctg	120
gtgaacattt ttaaaaaaa cgtgggcttt aaaaaagtgc tggcgtttga atttgcgaac	180
aaccgcaaat ttatgcatct ggataccgtg tttaccatgg tggattatga taaatttacc	240
attcatccgg aaattgaagg cgatctgctg gtgtatagcg tgacctatga aaacgaaaa	300
ctgaaaattg tggaagaaaa aggcgatctg gcggaactgc tggcgagaaa cctgggctg	360
gaaaaagtgc atctgattcg ctgcggcggc ggcaacattg tggcgggcgg cgcgcaacag	420
tggaacgatg gcagcaaac cctgaccatt gcgccgggcg tgggtggtggt gtatgatcgc	480
aacaccgtga ccaacaaaat tctggaagaa tatggcctgc gcctgattaa aattcgcggc	540
agcgaactgg tgcgccccgc cggcgcccc gcctgcatga gcatgccgtt tgaacgcgaa	600

gaagtg	606
<210> 10	
<211> 24	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> Наиболее вероятная невырожденная последовательность	
<400> 10	
attcgcggcc gcgaaccaa aaaa	24
<210> 11	
<211> 33	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> Наиболее вероятная невырожденная последовательность	
<400> 11	
aaccatatgt ttgcggatcc ccgcaaccgc gaa	33
<210> 12	
<211> 48	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> Наиболее вероятная невырожденная последовательность	
<400> 12	
gtgtataacc gcgaagaaga tacccgcatt gaaggcggcg atgaactg	48
<210> 13	
<211> 33	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> Наиболее вероятная невырожденная последовательность	
<400> 13	
aacattttta aaaaaaacgt gggctttaa aaa	33
<210> 14	
<211> 48	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> Наиболее вероятная невырожденная последовательность	
<400> 14	
gaactggtgc gcggccgcgg cggcccgcgc tgcattgaca tgccgttt	48

<210> 15
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> ПЦР праймер

 <400> 15
 сggaасgaат аасссаgаgа 20

<210> 16
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> ПЦР праймер

 <400> 16
 сtgассаасg аgаасссаст 20

<210> 17
 <211> 18
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> ПЦР праймер

 <400> 17
 саgатggggtt gttgсtса 18

<210> 18
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> ПЦР праймер

 <400> 18
 атggааagtg сtgсtggtag 20

<210> 19
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> ПЦР праймер

 <400> 19
 сtатtgggаа сtgсtggtt ас 22

<210> 20
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ПЦР праймер

 <400> 20
 tcctcgcccc aataagaatt c 21

<210> 21
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ПЦР праймер

 <400> 21
 caacagcaac cagctaccgt 20

<210> 22
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ПЦР праймер

 <400> 22
 cgttcacctc atcctgccccg 20

<210> 23
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ПЦР праймер

 <400> 23
 gacggttatt aagaccatca acac 24

<210> 24
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ПЦР праймер

 <400> 24
 tccacgctgc gagcggtat 19

<210> 25
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ПЦР праймер

<400> 25 aattccacca cggtaagcac	20
<210> 26 <211> 20 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> ПЦР праймер	
<400> 26 gagccgaatt gtttgtcgat	20
<210> 27 <211> 20 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> ПЦР праймер	
<400> 27 taatgggaag agcagcagct	20
<210> 28 <211> 20 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> ПЦР праймер	
<400> 28 acagggcatt tagcacaacc	20
<210> 29 <211> 20 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> ПЦР праймер	
<400> 29 tgggtttaaа ggggtcsgtag	20
<210> 30 <211> 20 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> ПЦР праймер	
<400> 30 caatcggagt tcctcgtgat	20

<210> 31
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ПЦР праймер

<400> 31
tccaatgcc aacstttact 20

<210> 32
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ПЦР праймер

<400> 32
atacgagtat cttcttcacg 20

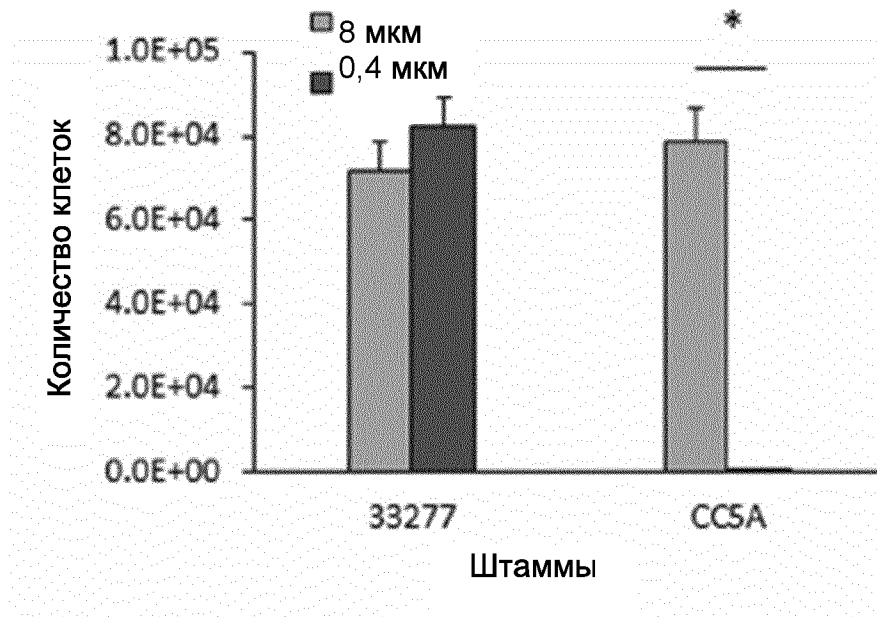
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный пептид, который связывается с белком поверхности *P. gingivalis* и имеет последовательность, которая по меньшей мере на 60% идентична по меньшей мере одной из последовательностей SEQ ID NO: 2-7.
2. Фармацевтическая композиция для лечения или профилактики связанного с зубным налетом состояния или симптома, при этом указанная композиция содержит соединение, которое содержит пептид по п. 1.
3. Применение соединения при получении фармацевтической композиции для лечения или профилактики связанного с зубным налетом состояния или симптома, при этом указанное соединение содержит пептид по п. 1.
4. Фармацевтическая композиция по п. 2, отличающаяся тем, что указанная фармацевтическая композиция приготовлена для местного введения.
5. Фармацевтическая композиция по п. 2, отличающаяся тем, что указанная фармацевтическая композиция представляет собой по меньшей мере одно из: средства для чистки зубов, буккального средства, сублингвального средства, мази для полости рта, крема для полости рта, пасты для полости рта, эмульсии для полости рта и жевательной резинки.
6. Фармацевтическая композиция по п. 2, отличающаяся тем, что указанный пептид присутствует в терапевтически эффективном количестве для лечения или профилактики связанного с зубным налетом состояния или симптома у субъекта, нуждающегося в этом.
7. Фармацевтическая композиция по п. 2, отличающаяся тем, что указанная фармацевтическая композиция представляет собой средство для чистки зубов.
8. Фармацевтическая композиция по п. 2, отличающаяся тем, что указанная фармацевтическая композиция содержит консервант.
9. Фармацевтическая композиция по п. 2, отличающаяся тем, что указанная фармацевтическая композиция содержит фармацевтически приемлемый носитель.
10. Фармацевтическая композиция по п. 2, отличающаяся тем, что указанная фармацевтическая композиция содержит фармацевтически приемлемый носитель, выбранный из группы, состоящей из: наполнителей, адъювантов, поверхностно-активных веществ, суспендирующих агентов, эмульгирующих агентов, инертных наполнителей, разбавителей, вспомогательных веществ, смачивающих агентов, связующих веществ, смазывающих веществ, буферных агентов, разрыхлителей и носителей, вспомогательных агентов, окрашивающих агентов и вкусо-ароматических агентов.

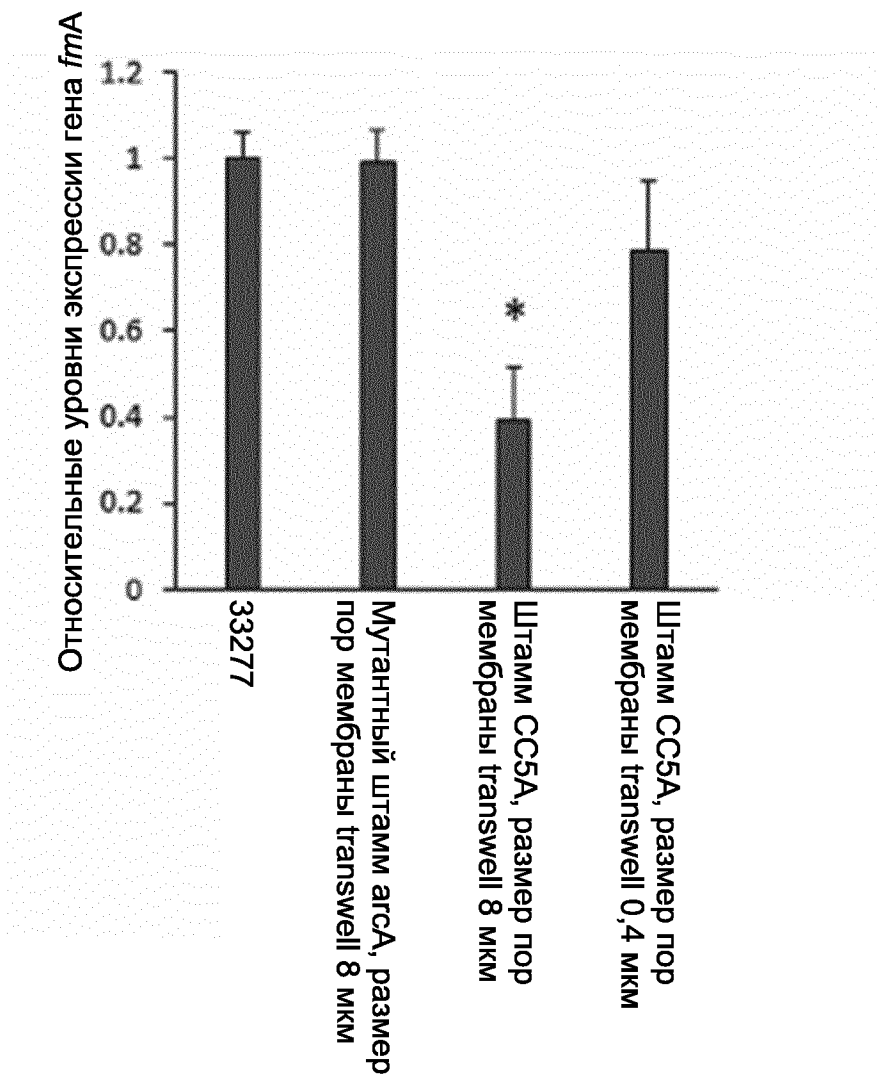
11. Способ лечения или профилактики состояния или симптома, связанного с зубным налетом, у субъекта, включающий местное введение на поверхности зуба и/или десны указанного субъекта терапевтически эффективного количества соединения, содержащего пептид по п. 1.
12. Способ по п.11, отличающийся тем, что указанный пептид является очищенным.
13. Способ по п.11, отличающийся тем, что указанный субъект нуждается в лечении или профилактическом лечении состояния или симптома, связанного с зубным налетом.
14. Способ по п.11, отличающийся тем, что указанное состояние или симптом, связанные с зубным налетом, выбраны из группы, состоящей из: кариеса зуба, гингивита, зубного камня, периодонтита, атеросклероза, заболевания, вызванного вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), выпадения зуба, поражения коронарной артерии, инсульта, преждевременных родов, малой массы при рождении, сахарного диабета в фазе декомпенсации, заболевания органов дыхания, ревматоидного артрита и астмы.
15. Способ снижения вероятности образования биопленки, содержащей популяцию *Porphyromonas gingivalis* на поверхности, указанный способ включает воздействие на указанную поверхность эффективной концентрации соединения, содержащего пептид по п. 1.
16. Способ по п.15, отличающийся тем, что указанный способ осуществляют *in vitro*.
17. Способ по п.15, отличающийся тем, что указанное воздействие включает приведение в контакт.
18. Способ по п.15, отличающийся тем, что указанное воздействие включает воздействие на бактерию в организме субъекта, нуждающегося в указанном воздействии.
19. Нуклеиновая кислота, кодирующая пептид по п. 1.
20. Нуклеиновая кислота, комплементарная нуклеиновой кислоте по п.19.
21. Клетка, содержащая нуклеиновую кислоту по п.19.
22. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п.19.
23. Любой из пп. 1 – 22, отличающийся тем, что указанный пептид не имеет существенной активности аргининдеиминазы.
24. Любой из пп. 1 – 22, отличающийся тем, что указанный пептид представляет собой фрагмент, ограниченный положениями 208 – 409 SEQ ID NO: 1.
25. Любой из пп. 1 – 22, отличающийся тем, что указанный пептид имеет длину не более чем 202 аминокислоты.

26. Любой из пп. 1 – 22, отличающийся тем, что указанный пептид содержит только допустимые консервативные замены как указано в Таблице 1 в сравнении по меньшей мере с одной из указанных последовательностей SEQ ID NO: 2-7.
27. Любой из пп. 1 – 22, отличающийся тем, что указанный пептид содержит только предпочтительные консервативные замены как указано в Таблице 1 в сравнении по меньшей мере с одной из указанных последовательностей SEQ ID NO: 2-7.
28. Любой из пп. 1 – 22, отличающийся тем, что указанный пептид имеет последовательность, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентична по меньшей мере одной из последовательностей SEQ ID NO: 2-7.
29. Любой из пп. 1 – 22, отличающийся тем, что указанный пептид имеет последовательность, которая по меньшей мере на 90, 95, 99 или 100% идентична по меньшей мере одной из последовательностей SEQ ID NO: 2-7.
30. Любой из пп. 1 – 22, отличающийся тем, что указанный пептид имеет последовательность, которая по меньшей мере на 60% идентична SEQ ID NO: 6, и при этом указанное соединение содержит не более чем от 4 до 8 аминокислотных остатков, фланкирующих указанный пептид по меньшей мере с одного из N-конца или C-конца.
31. Любой из пп. 2 – 22, отличающийся тем, что указанное соединение состоит из указанного пептида.
32. Любой из пп. 1 – 22, отличающийся тем, что длина указанного пептида составляет не более, чем 200, 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 или 5 аминокислотных остатков.
33. Любой из пп. 1 – 22, отличающийся тем, что указанный пептид имеет только консервативные замены в сравнении по меньшей мере с одной из указанных последовательностей SEQ ID NO: 2-7.
34. Любой из пп. 1 – 22, отличающийся тем, что указанный пептид имеет только допустимые замены, указанных в Таблице 1, в сравнении по меньшей мере с одной из указанных последовательностей SEQ ID NO: 2-7.
35. Любой из пп. 1 – 22, отличающийся тем, что указанный пептид имеет только предпочтительные замены, указанные в Таблице 1, в сравнении по меньшей мере с одной из указанных последовательностей SEQ ID NO: 2-7.
36. Любой из пп. 1 – 22, отличающийся тем, что указанный пептид состоит из пептида, который имеет последовательность SEQ ID NO: 6.

ФИГ. 1А



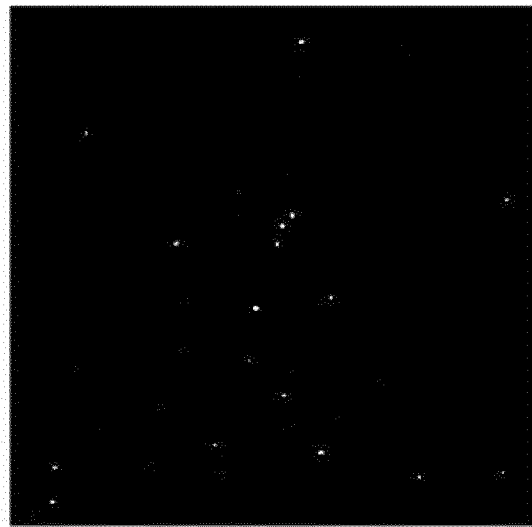
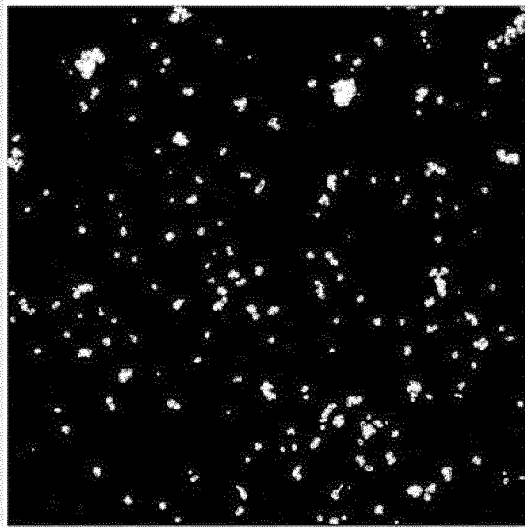
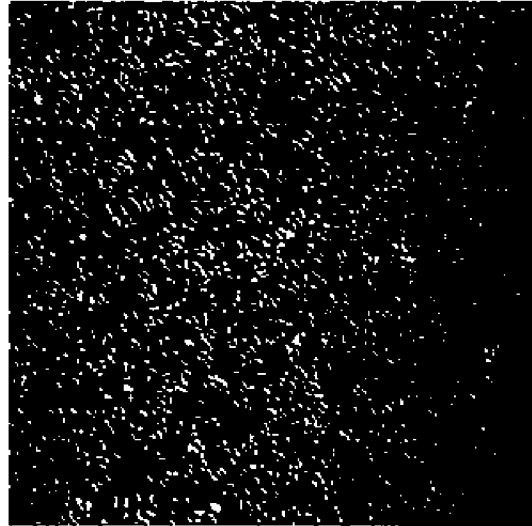
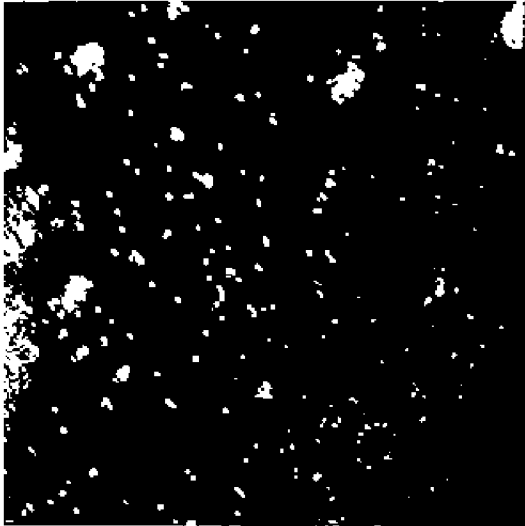
ФИГ. 1В



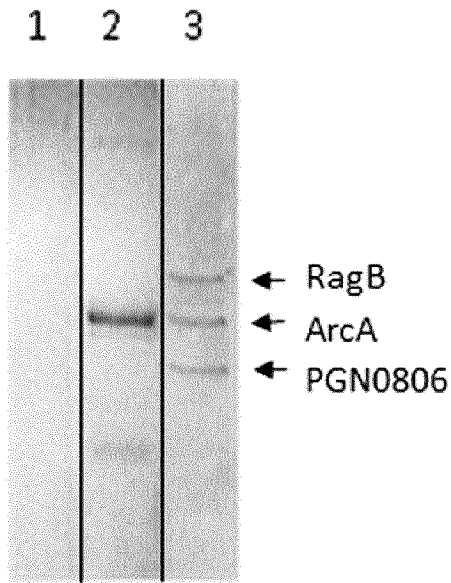
ФИГ. 2

Штамм 33277

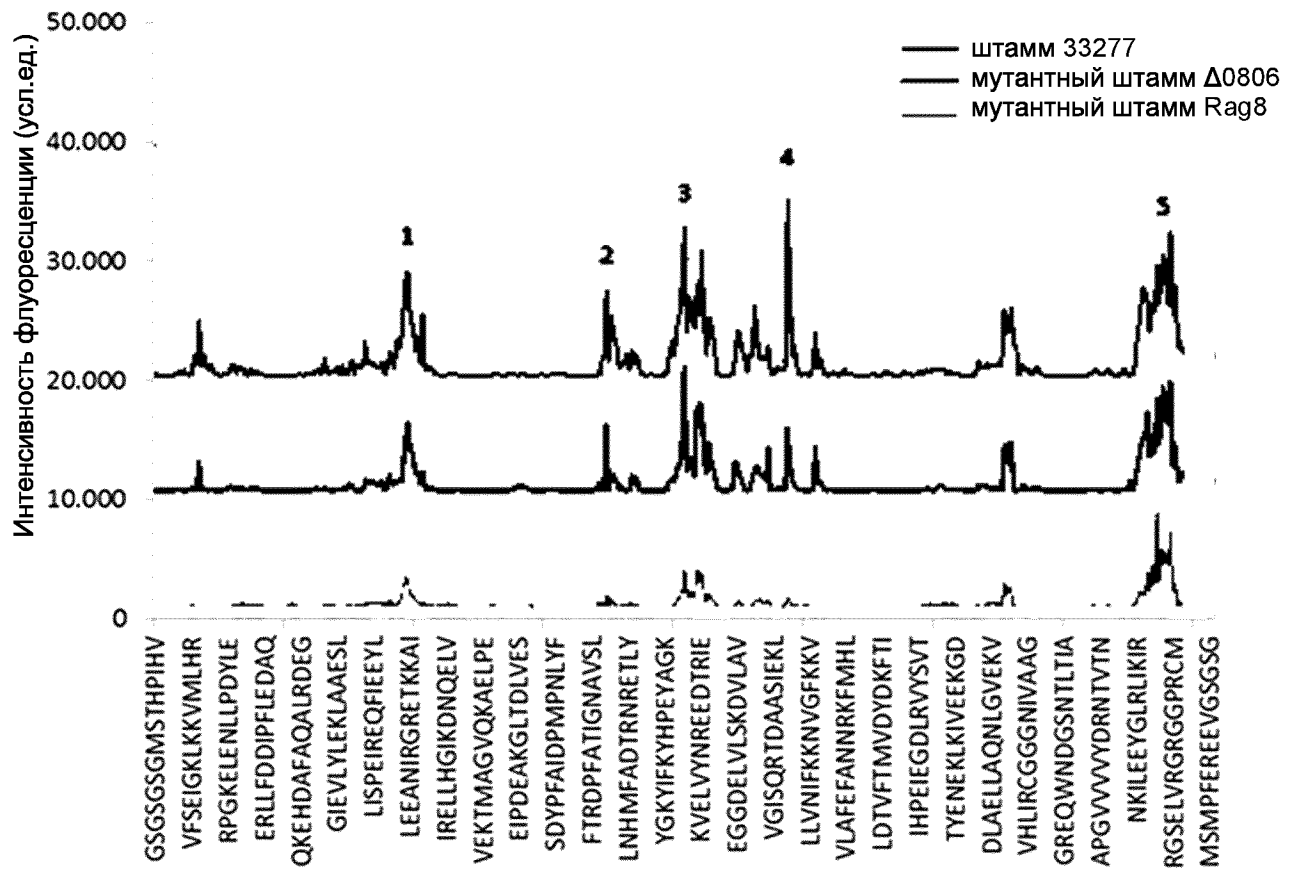
AaY4



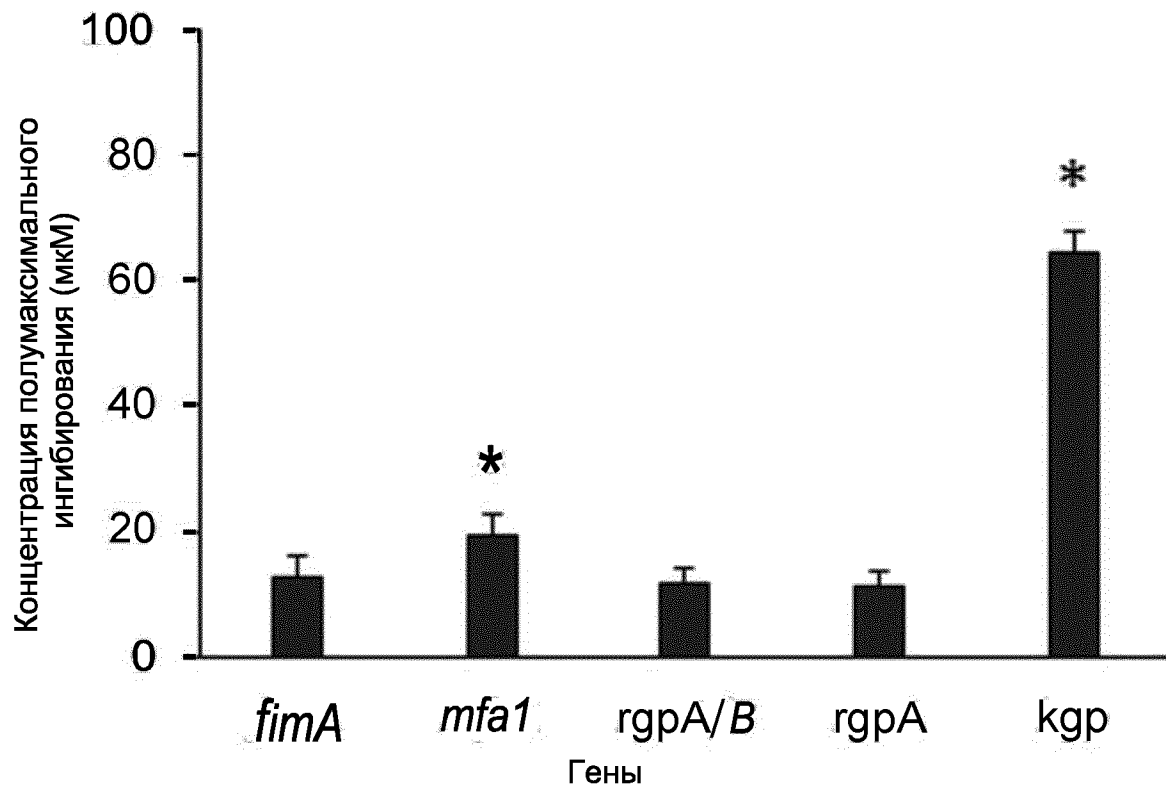
ФИГ. 3



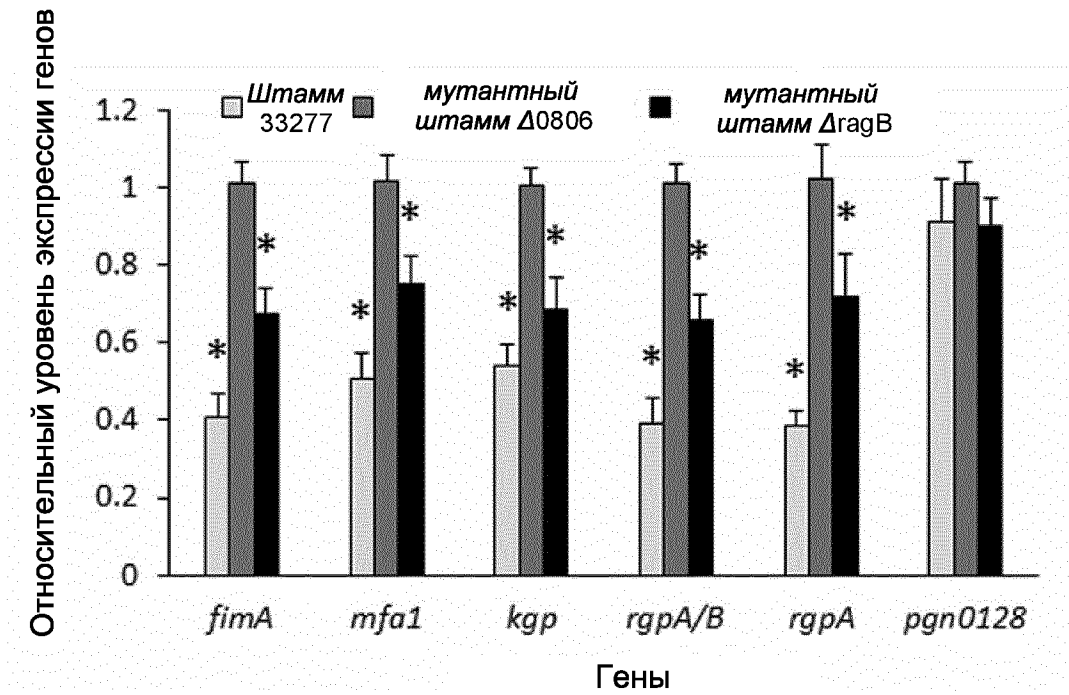
ФИГ. 4



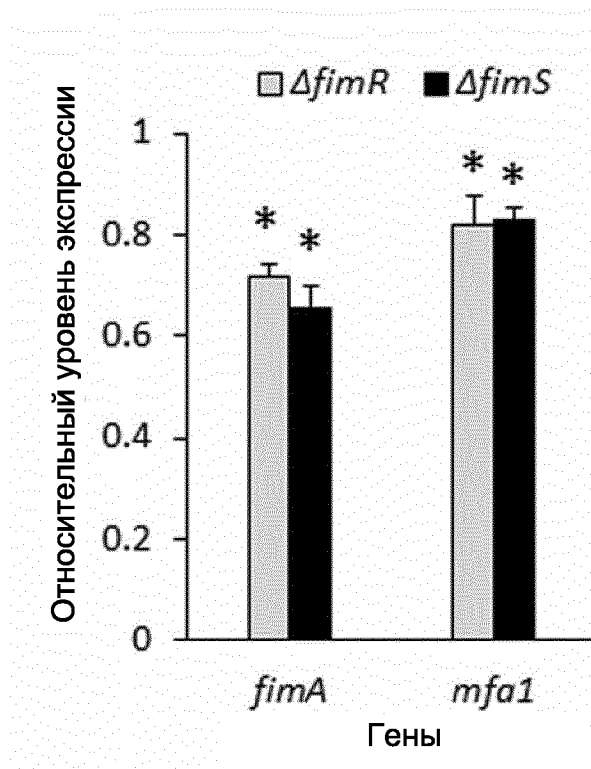
ФИГ. 5



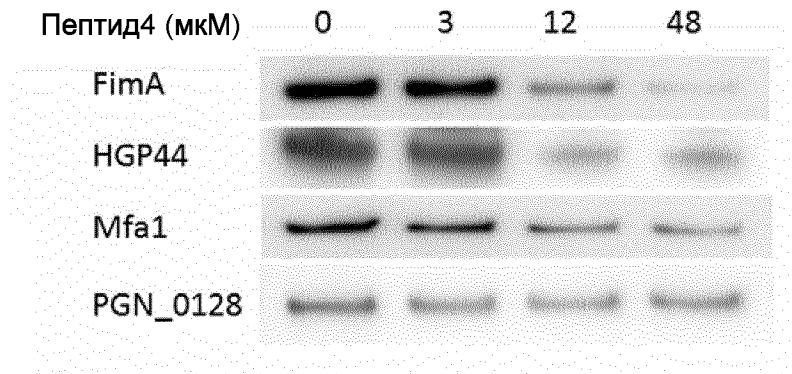
ФИГ. 6А



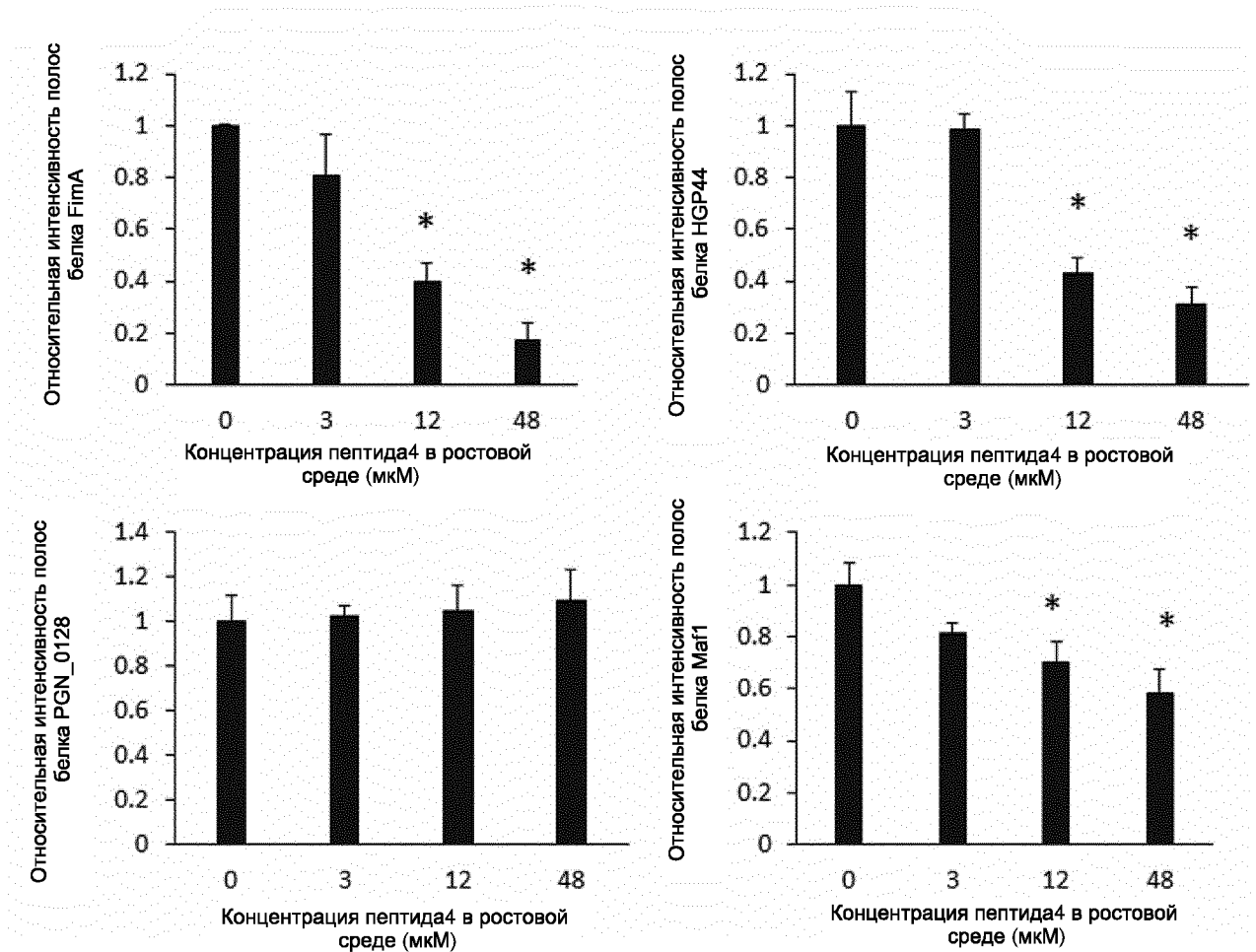
ФИГ. 6В



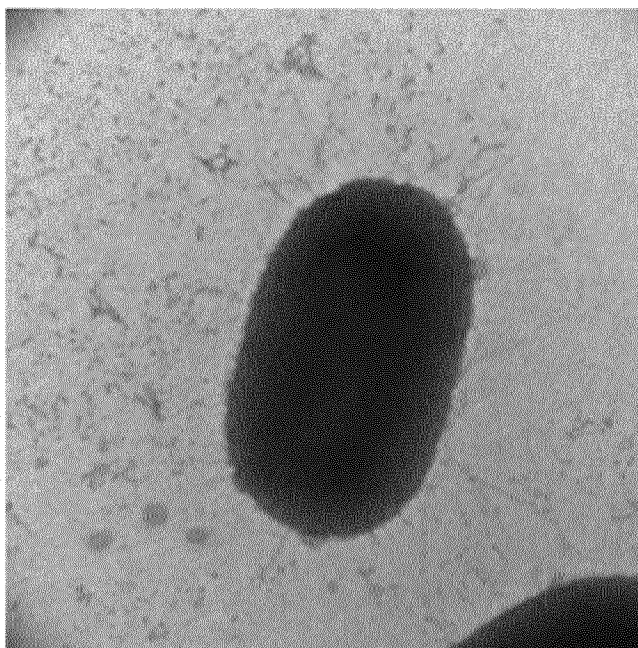
ФИГ. 7А



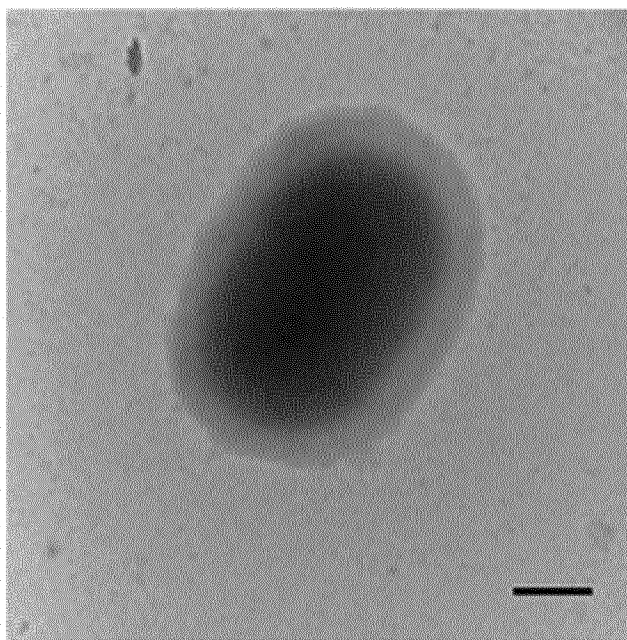
ФИГ. 7В



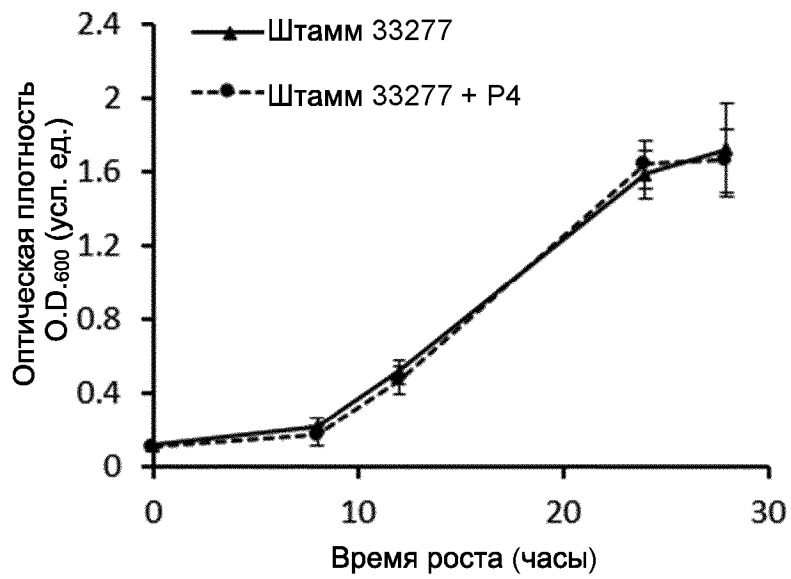
ФИГ. 8А



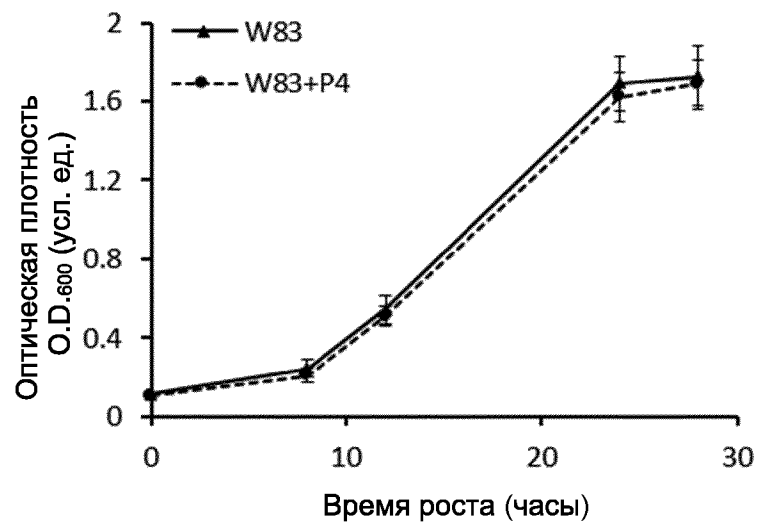
ФИГ. 8В



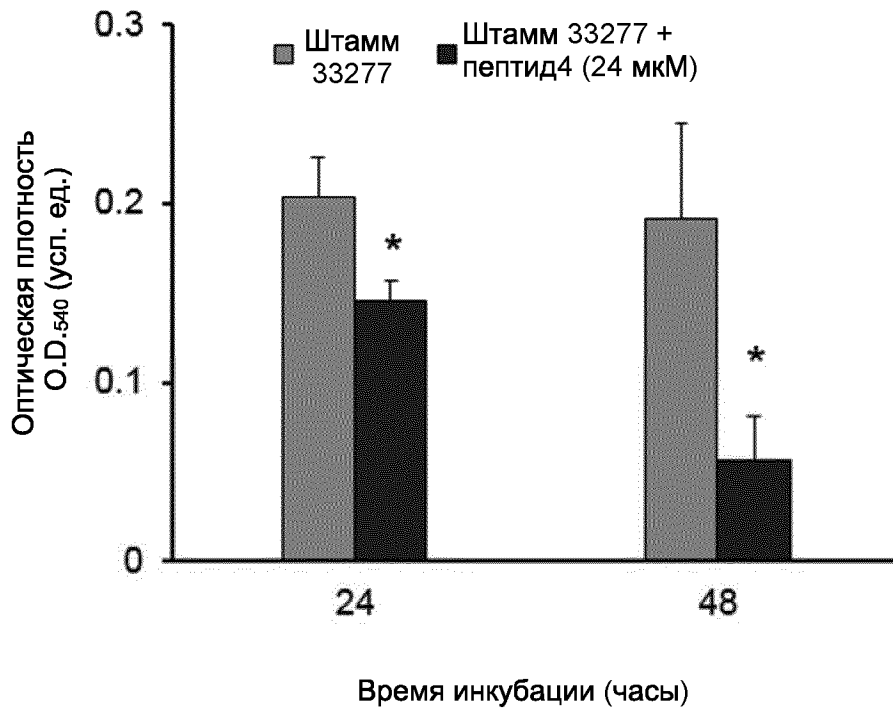
ФИГ. 9А



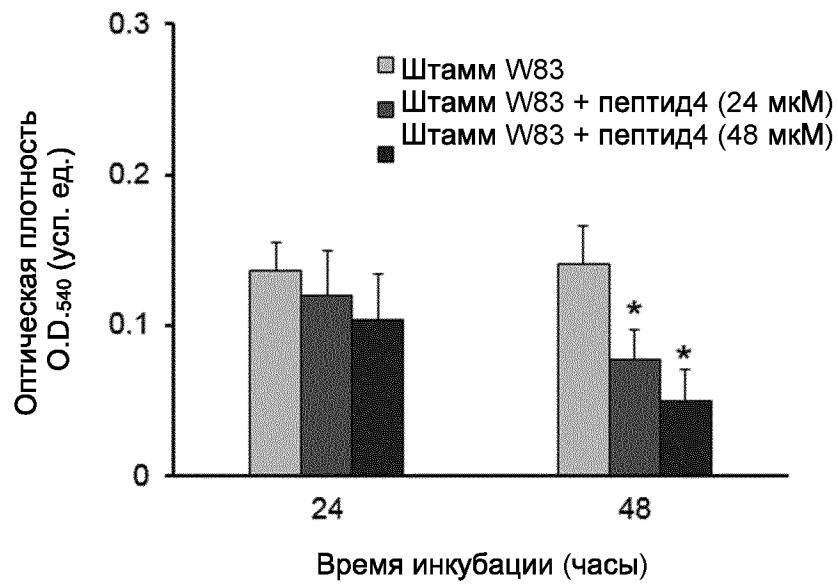
ФИГ. 9В



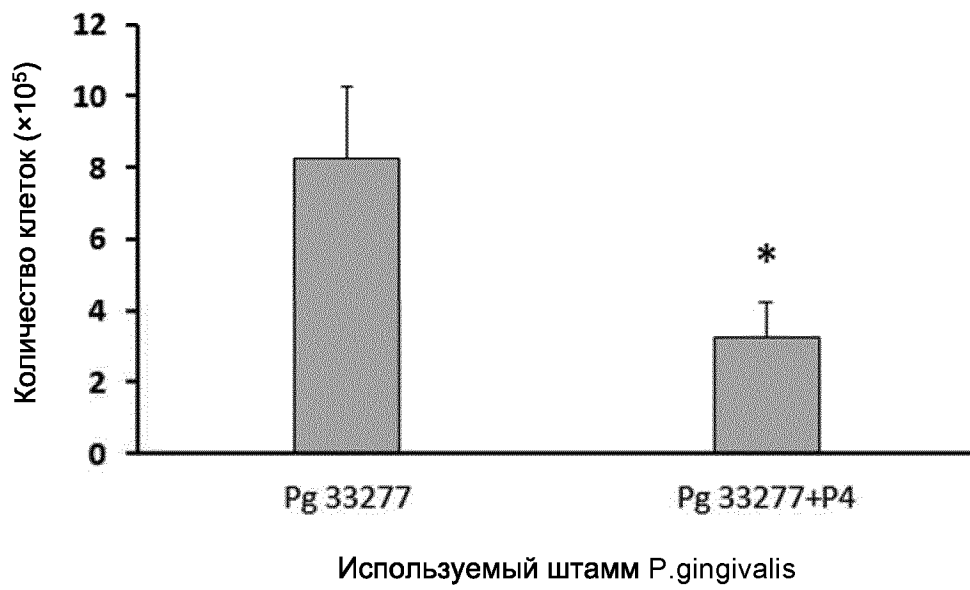
ФИГ. 10А



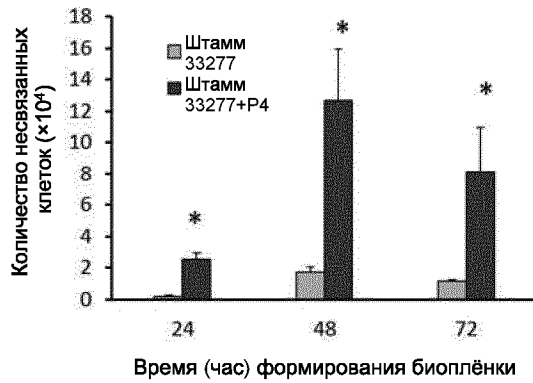
ФИГ. 10В



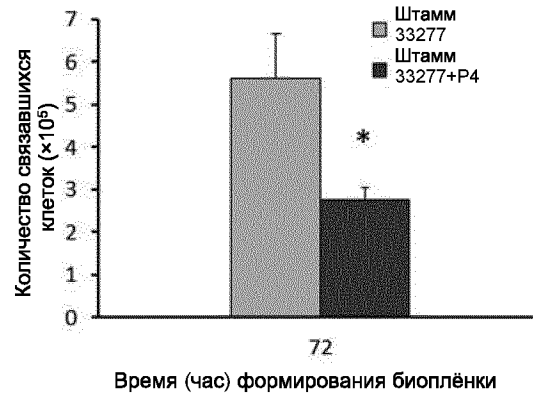
ФИГ. 11



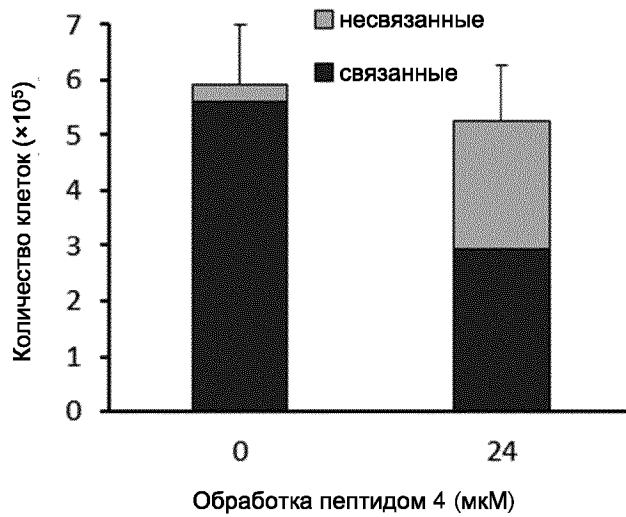
ФИГ. 12А



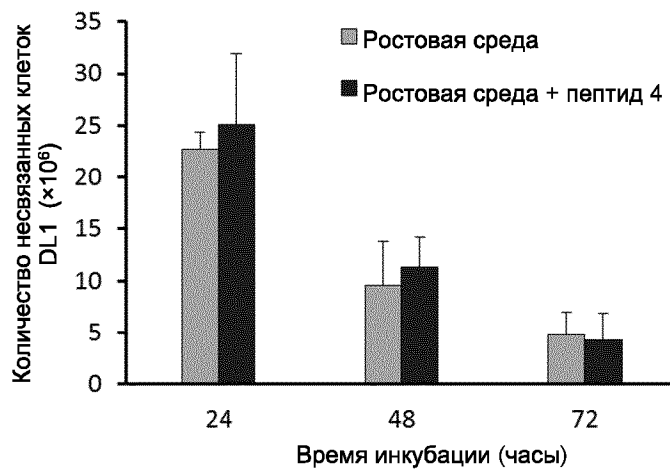
ФИГ. 12В



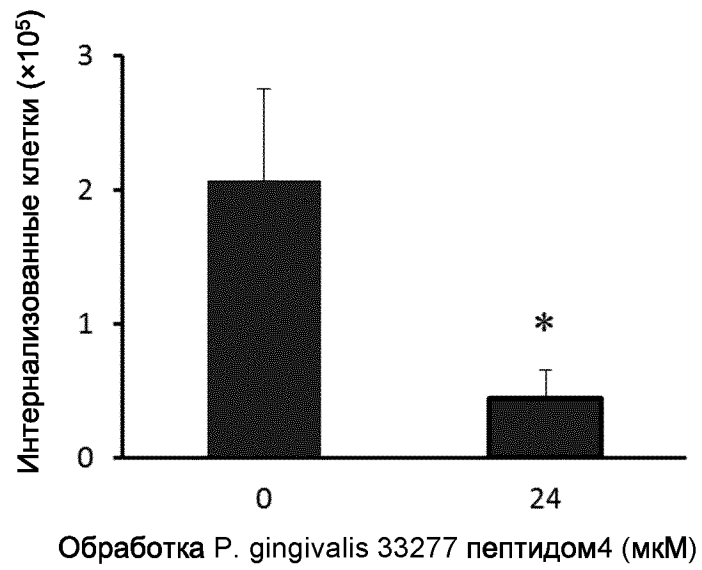
ФИГ. 12С



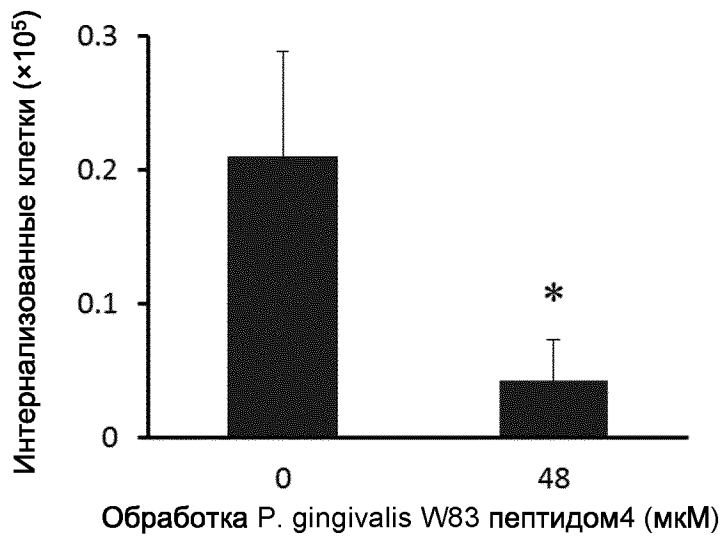
ФИГ. 12D



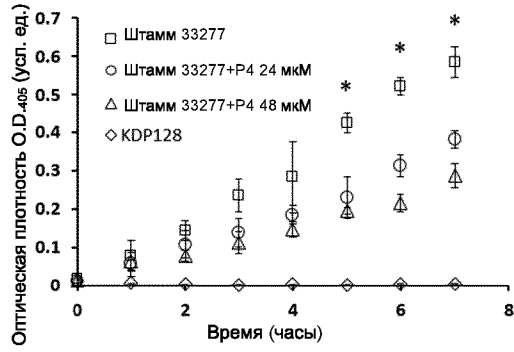
ФИГ. 13А



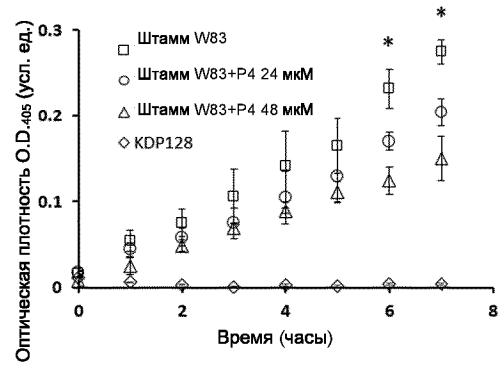
ФИГ. 13В



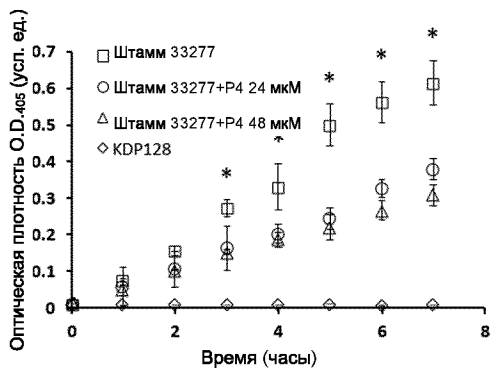
ФИГ. 14А



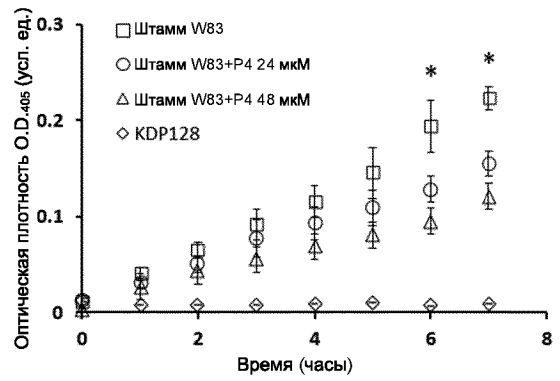
ФИГ. 14В



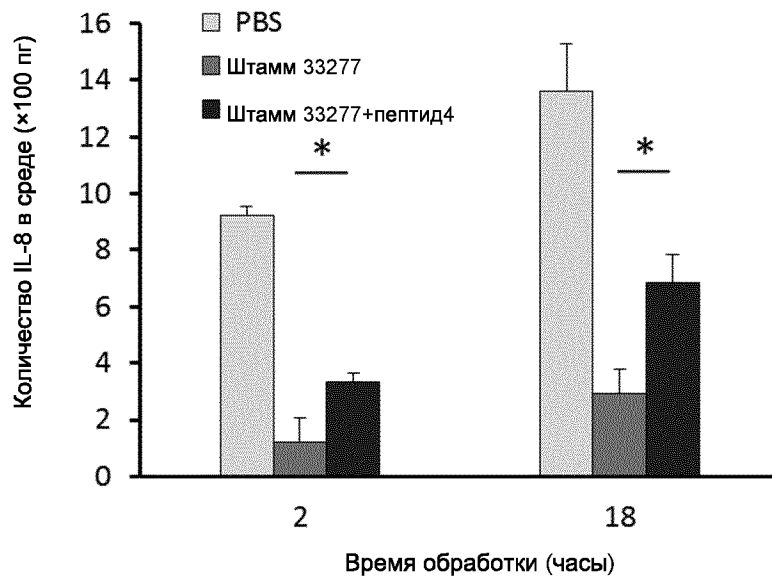
ФИГ. 14С



ФИГ. 14D



ФИГ. 15А



ФИГ. 15В

