



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 322 213**

51 Int. Cl.:

**G01N 30/02** (2006.01)

**C07K 14/205** (2006.01)

**C12N 15/00** (2006.01)

**C07K 16/12** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99911992 .8**

96 Fecha de presentación : **07.04.1999**

97 Número de publicación de la solicitud: **1068522**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.01.2001**

54

Título: **Proteína NAP de *Helicobacter pylori*.**

30

Prioridad: **08.04.1998 GB 9807721**

73

Titular/es:  
**Novartis Vaccines and Diagnostics S.R.L.**  
**Via Fiorentina 1**  
**53100 Siena, SI, IT**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**17.06.2009**

72

Inventor/es: **Grandi, Guido**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**17.06.2009**

74

Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 322 213 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Proteína NAP de *Helicobacter pylori*.

5 Esta invención está relacionada con la proteína NAP de *Helicobacter pylori*.

**Antecedentes**

10 *Helicobacter pylori* es una bacteria espiral gramnegativa que infecta el estómago humano. Se cree que más del 50% de la población del mundo aloja la bacteria.

15 Los aislamientos clínicos de *H. pylori* se pueden caracterizar por la expresión de una citotoxina vacuolante (VacA), que induce la formación de vacuolas en las células epiteliales, y un antígeno inmunodominante asociado con citotoxina (CagA). Las cepas de tipo I, que predominan en pacientes con úlceras o cáncer, expresan ambas proteínas, mientras que las cepas de tipo II no expresan ninguna.

20 Se han descrito diversas proteínas antigénicas para *H. pylori* [p. ej., referencias 1 y 2], incluidas sus proteínas ureasa, VacA, flagela, y adhesinas. Una proteína conocida como NAP (proteína activadora de neutrófilos [3, 4], que se encuentra en las cepas tanto de tipo I como de tipo II, parece ser protectora cuando se analiza en el modelo de ratones con *H. pylori* [5].

25 La NAP es un homodécámero de subunidades de 15 kDa [6] y se ha propuesto que el complejo multimérico tiene una estructura de forma de anillo que espontáneamente forma estructuras paracristalinas hexagonales. La proteína ensamblada parece interactuar con los receptores de glucosingolíplicos de los neutrófilos humanos [7].

Sobre la base de la homología con las bacterioferritinas se ha sugerido que la NAP puede actuar como un tampón de hierro [3]. No obstante, hasta la fecha no se ha detectado la presencia ni de hierro ni del grupo hemo. También se ha comunicado que la proteína es un antiporte de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  [8].

30 Como su nombre sugiere, la NAP estimula la activación y la adhesión de los neutrófilos a las células endoteliales. Mientras que se ha sugerido que no es probable que su función esté relacionada con su función intracelular [3], la actividad proadhesiva puede neutralizarse con antisuero [6]. Dado que la activación de neutrófilos y la adhesión a las células endoteliales constituyen mecanismos de inflamación y dado que *H. pylori* es responsable de la inflamación del estómago, parece probable que la NAP represente el factor, o un factor, de *H. pylori* responsable de la inflamación del estómago, probablemente en una etapa temprana de la enfermedad de úlcera gástrica cuando se observa una acumulación abundante de neutrófilos en la mucosa gástrica superficial.

35 Se ha descrito un protocolo para la purificación del decámero NAP de *H. pylori* [6], que implica el uso de cromatografía en agarosa, tamización molecular y cromatografía de intercambio iónico. Esto dio un rendimiento del 72%. También se ha publicado la producción de NAP recombinante en *E. coli* [7]. El gen se clonó en el plásmido pTrx-Fus para producir una proteína de fusión tioredoxina. A continuación, la proteína se purificó del mismo modo que la proteína nativa. Se ha publicado que la tioredoxina N-termina no afectaba a la actividad biológica de la NAP.

45 No obstante, sigue habiendo la necesidad de NAP pura sin la presencia de artefactos de clonación, dominios de fusión o similares. Por tanto, es un objeto de la invención proporcionar un procedimiento para la purificación de NAP nativa. Es otro objeto que este procedimiento debería ser directo, fácilmente escalable y económicamente factible. Es otro objeto que el procedimiento debería proporcionar una proteína altamente pura.

50 En la actualidad, los autores han encontrado que la NAP tiene una solubilidad acuosa sorprendentemente alta, que permanece soluble incluso a una saturación de sulfato amónico al 80%.

**Descripción de la invención**

55 De acuerdo con la presente invención se proporciona un procedimiento para enriquecer la presencia de NAP de *H. pylori* en una mezcla de proteínas, que comprende la etapa de precipitación por saturación de otras proteínas.

60 La etapa de precipitación por saturación deja la mayoría de NAP en forma soluble. Aunque se puede usar cualquier sal adecuada, se prefiere usar sulfato amónico. La concentración final de sal es una saturación del 50% o más (p. ej., 60%, 70%, 80% o más). Preferentemente, la etapa de precipitación por saturación precipita al menos el 50% de las proteínas presentes en la mezcla (p. ej., 60%, 70%, 80% o más). En la referencia 11 se publica la precipitación por saturación de sonificados de *H. pylori*.

65 Dada la sorprendentemente alta solubilidad de la NAP, esta etapa de precipitación por saturación sola elimina la mayoría de las proteínas, con lo que enriquece considerablemente la presencia de NAP.

La mezcla resultante de proteínas solubles, enriquecida para NAP, se somete después a posterior enriquecimiento. No obstante, es preferible aclarar la mezcla primero con el fin de eliminar el material precipitado en la etapa de precipitación por saturación. Normalmente esto se consigue mediante filtración o, preferentemente, mediante centrifugación.

## ES 2 322 213 T3

El posterior enriquecimiento utiliza cromatografía de quelato metálico [9]. Se puede usar cualquier ion metálico inmovilizado (p. ej., cinc, cobalto, cobre), pero se prefiere níquel.

5 Mediante “purificación” se quiere decir que NAP forma al menos el 75% (en peso) de la mezcla resultante (p. ej., 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o más).

10 La mezcla proteica puede ser cualquier forma adecuada de proteína NAP. Entre los ejemplos se incluyen las propias bacterias *H. pylori*, u otros huéspedes que expresan el gen que codifica la NAP de *H. pylori* (tal como bacterias transformadas). Preferentemente, estas se lisan o rompen antes del enriquecimiento/purificación de la NAP con el fin de permitir el acceso a sus componentes citoplásmicos (p. ej., sonicación, prensa francesa, prensa Hughes, lisis enzimática, molturación, congelación/descongelación etc.).

15 Las condiciones y reactivos preferidos para realizar los procedimientos de la invención son los que se establecen en los ejemplos que figuran a continuación (p. ej., cepas bacterianas, vectores, enzimas de restricción, medios de cultivo, temperaturas, tampones, métodos analíticos, etc.). Por ejemplo, con el fin de eliminar los componentes de bajo peso molecular, se prefiere incluir al menos una etapa de diálisis durante el procedimiento de enriquecimiento/purificación.

20 La NAP puede tener la misma secuencia que la NAP natural en *H. pylori*, sin las secuencias de aminoácidos que normalmente se introducen durante el procedimiento de recombinación o expresión recombinante (p. ej., colas de polihistidina, fusiones de tioredoxina, fusiones de GST, secuencias inter-terminales, etc.).

25 De acuerdo con la invención, se proporciona además un procedimiento para la preparación de un agente diagnóstico o agente terapéutico (p. ej., una composición inmunogénica o vacuna), que comprende enriquecimiento/purificación de NAP tal y como se ha descrito en lo que antecede, seguido por la formulación adecuada. Para los agentes que se van a administrar, por ejemplo a animales, esto podría implicar formular la NAP en un tampón fisiológicamente aceptable. Para una composición inmunogénica o vacuna, esto podría incluir la adición de, por ejemplo, un adyuvante. Para un reactivo diagnóstico, esto podría implicar la adición a la NAP de un marcador detectable (p. ej., un marcador radioactivo o fluorescente). Estas etapas de formulación están bien dentro de la capacidad del trabajador experto.

30 En formas de realización preferidas, los agentes diagnósticos o terapéuticos preparados mediante la invención comprenden proteínas o antígenos adicionales de *H. pylori*. Por ejemplo, las composiciones podrían comprender VacA (citotoxina vacuolante) y/o CagA (antígeno asociado a citotoxina) y/o proteínas ureasa además de NAP.

35 Las vacunas pueden ser profilácticas (es decir, para prevenir la infección) o terapéuticas (es decir, para tratar la enfermedad tras la infección).

40 Tales vacunas comprenden antígeno o antígenos, normalmente en combinación con “portadores farmacéuticamente aceptables”, que incluyen cualquier portador que por sí mismo no induzca la producción de anticuerpos dañinos para el individuo que recibe la composición. Normalmente, los portadores adecuados son macromoléculas grandes de lenta metabolización, tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros aminoácídicos, agregados lipídicos (tales como gotas de aceite o liposomas) y partículas víricas inactivas. Tales portadores son bien conocidos para los expertos en la técnica. Además, estos portadores pueden funcionar como agentes inmunoestimulantes (“adyuvantes”). Además, el antígeno puede conjugarse con un toxoide bacteriano.

45 Entre los adyuvantes preferidos para potenciar la eficacia de la composición se incluyen: (1) sales de aluminio (alúmina), tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio, etc.; (2) formulaciones de emulsión de aceite en agua (con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos tales como péptidos de muramilo o componentes de la pared celular bacteriana), tales como, por ejemplo (a) MF59<sup>TM</sup> (documento 90/14837), que contiene 5% de escualeno, 0,5% de Tween<sup>TM</sup> 80 y 0,5% de Span 85 (que opcionalmente contiene diversas cantidades de MTP-PE, aunque no es necesario) formulado en partículas de submicrones usando un microfluidizador (b) SAF, que contiene 10% de escualeno, 0,4% de Tween 80, 5% de polímero bloqueado con plurónico L121 y thr-MDP bien microfluidizado en una emulsión de submicrones o agitado con vórtex para generar una emulsión de un tamaño de partícula mayor y (c) sistema adyuvante Rib<sup>TM</sup> (RAS), que contiene 2% de escualeno, 0,2% de Tween 80, y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo compuesto por monofosforolípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM) y esqueleto de la pared celular (CWS), preferentemente MPL + CWS (Detox<sup>TM</sup>); (3) se pueden usar adyuvantes de saponina, tales como Stimulon<sup>TM</sup> o partículas generadas a partir de ellos tales como ISCOM (complejos inmunoestimulantes); (4) adyuvantes completos e incompletos de Freund (CFA e IFA); (5) citocinas, tales como interleucinas (p. ej., IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, etc.), interferones (p. ej., IFN $\gamma$ ), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF), etc.; y (6) otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimulantes para potenciar la eficacia de la composición. Se prefieren alúmina y MF59<sup>TM</sup>.

65 Como se ha mencionado en lo que antecede, los péptidos de muramilo incluyen, entre otros, N-acetil-muramil-L-treonil-D-iso-glutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-hidroxi-fosforiloxi)-etilamina (MTP-PE), etc.

Las composiciones inmunogénicas (p. ej., el antígeno, portador farmacéuticamente aceptable y adyuvante) normalmente contendrán diluyentes, tales como agua, solución salina, glicerol, etanol. etc. Además, en dichos vehículos

pueden estar presentes sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias de tamponamiento de pH y similares.

Normalmente, las composiciones inmunogénicas se preparan en forma de inyectables, bien como soluciones o suspensiones líquidas; también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para solución, o suspensión, en vehículos líquidos antes de la inyección. La preparación también se puede emulsionar o encapsular en liposomas para potenciar el efecto adyuvante, como se ha comentado en lo que antecede.

Las composiciones inmunogénicas usadas como vacunas comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz de los polipéptidos antigénicos, así como cualquier otro de los componentes mencionados en lo que antecede, según sea necesario. Por “cantidad inmunológicamente eficaz” se quiere decir que la administración de dicha cantidad a un individuo, bien en una dosis única o como parte de una serie, es eficaz para el tratamiento o la prevención. Esta cantidad varía dependiendo de la salud y el estado físico del individuo que va a ser tratado, el grupo taxonómico del individuo que se va a tratar (p. ej., primate no humano, primate, *etc.*), la capacidad del sistema inmunitario del individuo para sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseado, la formulación de la vacuna, la valoración del médico encargado del tratamiento de la situación médica y otros factores relevantes. Cabe esperar que la cantidad entre dentro de un amplio rango que se puede determinar a través de ensayos de rutina.

Las composiciones inmunogénicas normalmente se administran por vía parenteral, *por ejemplo* mediante inyección, bien subcutánea o intramuscular. También se pueden administrar a superficies mucosas (p. ej., oral o intranasal) o en forma de formulaciones pulmonares, supositorios o aplicaciones transdérmicas. La posología terapéutica puede ser un calendario de dosis única o un calendario de dosis múltiples. La vacuna puede administrarse junto con otros agentes inmunorreguladores.

La NAP enriquecida de acuerdo con la invención también se puede usar en inmunoensayos para detectar niveles de anticuerpos (o, por el contrario, se pueden usar anticuerpos anti-NAP para detectar niveles de antígenos). Se pueden desarrollar inmunoensayos basados en antígenos recombinantes bien definidos para reemplazar procedimientos diagnósticos invasivos. Se pueden detectar anticuerpos frente a NAP dentro de muestras biológicas, incluidas, por ejemplo, muestras de sangre o de suero. El diseño de inmunoensayos está sujeto a una gran cantidad de variación y una variedad de ellos se conocen en la técnica. Los protocolos para el inmunoensayo se pueden basar en, por ejemplo, ensayos de competición, de reacción directa o de tipo sándwich. Asimismo, los protocolos pueden usar, por ejemplo, soportes sólidos o puede ser mediante inmunoprecipitación. La mayoría de los ensayos implican el uso de anticuerpo o polipéptido marcado; los marcadores pueden ser, por ejemplo, moléculas fluorescentes, quimioluminiscentes, radioactivos o tintes. También se conocen ensayos que amplifican las señales de la sonda; ejemplos de los cuales son ensayos que utilizan biotina y avidina, e inmunoensayos marcados y mediados por enzimas, tales como ensayos ELISA.

### Descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la secuencia completa del gen que codifica la NAP en la cepa CCUG, que se clonó en el plásmido Psm214g para dar Psm214-NAP. La figura también muestra la secuencia en el vector plasmídico que flanquea al extremo 5' del gen (minúsculas) y la secuencia de aminoácidos deducida.

La Figura 2 muestra una comparación de la secuencia de nucleótidos de la NAP clonada con la de las referencias 6 y 8. Se pueden observar diferencias que conducen a diferencias de aminoácidos (Figura 3) en los residuos 8, 58 y 80 (en comparación con la referencia 6) y los residuos 8, 73, 97, 101 y 140 (en comparación con la referencia 8, deducida del la secuencia completa del genoma).

La Figura 4 muestra un SDS-PAGE (A) y una transferencia de tipo western (B) de las proteínas celulares totales de *E. coli*. Calle 1: extracto total de las células transformadas; calle 2: control negativo; calle 3: marcadores de PM bajo.

La Figura 5 muestra una tinción Poinceau (A) y transferencia de tipo western (B) de *E. coli* transformada. Calle 1: extracto soluble; calle 2: extracto insoluble; calle 3: marcadores de PM bajo.

La Figura 6 muestra una tinción Poinceau (A) y transferencia de tipo western (B) de *B. subtilis* transformada. Calles 1 y 2: cepa SMS118, extractos solubles e insolubles, respectivamente; Calles 3 y 4: cepa SMS300, extractos solubles e insolubles, respectivamente; calle 5: control negativo (*B. subtilis* transformado con pSM214 sin el inserto NAP).

La Figura 7 ilustra el efecto de la precipitación por saturación mediante sulfato amónico. Calles 1 y 2: saturación al 60%, sedimento y sobrenadante (de *E. coli*), respectivamente; calles 3 y 4: saturación incrementada del 60% al 80% (sedimento y sobrenadante, respectivamente); calle 5: NAP purificada; calle 6: marcadores.

La Figura 8 muestra la pureza del producto NAP final. Las calles 1-3 contienen material purificado de *E. coli*; las calles 507 contienen material purificado de *B. subtilis* (SMS118). De izquierda a derecha, estas calles contienen 1  $\mu$ g, 2  $\mu$ g y 3  $\mu$ g de proteína, respectivamente. Las calles 4 y 8 son marcadores.

## Ejemplos

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están dentro de la experiencia en la técnica. Tales técnica se explican completamente en la literatura, por ejemplo Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición (Sambrook, 1989); ADN Cloning, Volúmenes I e ii (ed. Glover 1985); Oligonucleotide síntesis (ed. GAT 1984); Nucleic Acid Hybridization (ed. Hames & Higgins 1984); Transcription and Translations (ed. Hames & Higgins 1984); Animal Cell Culture (ed. Freshney 1986); Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press, 1986); A Practical Guide to Molecular Cloning (Perbal, 1984); the Methods in Enzymology series (Academic Press, Inc.), especialmente los volúmenes 154 y 155; Gene Transfer vectors for Mammalian Cells (ed. Miller & Calos, 1987, Cold spring Hervor Laboratory); Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology (ed. Mayer & Walker, 1987); Protein Purification: Principles and Practice (Scopes, 1987); Handbook of Experimental Immunology, Volúmenes I-IV (ed. Weir & Blackwell 1986).

### 15 Clonación del gen codificador de NAP

El gen mostrado en la Figura 1 se amplificó a partir del cromosoma CCUG usando los siguientes cebadores de PCR, que también introdujeron los sitios de restricción *SacI* y *HindIII*

20  
 5' - ctcgagctctagaggggtattaataatgaaaacattgaat-3'  
 25  
 5' - cccttaagcttttaagccaaatgagcttc-3' .

El producto de amplificación se digirió con *SacI* y *HindIII* y se ligó en el plásmido pSM214g [10], que se había digerido con las mismas dos enzimas. Este plásmido es un vector de expresión de tipo lanzadera entre *E. coli* y *B. subtilis*. Como se puede apreciar a partir de la Figura 1, el gen recombinante se expresa bajo el control de un promotor constitutivo y un sitio de unión del ribosoma, que funcionan tanto en *E. coli* como en *B. subtilis*.

El plásmido ligado se usó para transformar *E. coli* y los clones positivos se seleccionaron en placas de cloranfenicol. Se aisló y caracterizó un plásmido de un clon positivo ("pSM214-NAP"). Los lotes de glicerol de este clon se almacenaron a -80°C.

Además, el plásmido se usó para transformar *B. subtilis*, que también se almacenó en forma de lotes de glicerol a -80°C.

### 40 Análisis de expresión preliminar

Colonias sencillas de cepas de *E. coli* o *B. subtilis* transformadas se inocularon en 4 ml de medio LB-CAP (es decir, medio LB + 20 µg/ml de cloranfenicol) y se cultivaron hasta 14 horas a 37°C. Se cultivaron las cepas control que contenían el vector de transformación sin el inserto NAP.

Los cultivos de *E. coli* se recogieron y resuspendieron en tampón de muestra de carga en SDS-PAGE con el tampón de muestra cargado. Los cultivos de *B. subtilis* se recogieron, trataron con 0,3 mg/ml de lisozima (30 minutos, 37°C) y después se añadió tampón de muestra de carga en SDS-PAGE 3 veces. Las muestras se incubaron durante 5 minutos a 95°C y se separaron mediante SDS-PAGE, tras lo cual se analizaron las proteínas mediante tinción con azul de Coomassie y transferencia de tipo western. La transferencia se visualizó con un antisuero obtenido mediante inmunización de un conejo con una fusión de NAP-tioredoxina (Figura 4).

Las bacterias transformadas expresan claramente una proteína de 15 kDa no presente en las cepas no transformadas, como se muestra mediante el antisuero de conejo.

### Cultivo y lisis celular

60 Colonias sencillas de cepas de *E. coli* o *B. subtilis* transformadas se inocularon en 5 ml de medio LB-CAP y se incubaron durante 37°C durante 10 horas. A continuación, los cultivos de 5 ml se usaron para inocular matraces de 2 litros que contenían 500 ml de LB-CAP. Tras una incubación de 14 horas a 37°C en un agitador rotatorio (250 ciclos/min), las células se recogieron mediante centrifugación a 6000 g durante 20 minutos a 4°C. Los sedimentos celulares se rompieron usando sonicación o una prensa francesa.

65 Para la sonicación, los sedimentos se resuspendieron en 8 ml de tampón A (Tris-HCl 20 mM, pH 7,8) suplementado con 0,3 mg/ml de lisozima. Tras incubación en hielo (10 minutos) y después a 37°C (7 minutos) se añadieron 35 µl de una solución 2 mg/ml de ADNasaI (sigma D-4263). Las muestras se introdujeron en hielo y se sonicaron ampliamente

## ES 2 322 213 T3

hasta la desaparición de la viscosidad (sonificador Branson 450, punta media, ciclo de tarea 50, control de rendimiento 5, aproximadamente ciclos de 25 x 2 minutos de 1 minuto de sonicación/1 minuto en hielo). El lisado se llevó hasta 14 ml con tampón A y se centrifugó a 20000 g durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante (extracto total soluble) y los sedimentos (extracto total insoluble) se separaron y se usaron inmediatamente o se almacenaron a -20°C.

Para la rotura con la prensa francesa, las células se resuspendieron en 15 ml de tampón A y se lisaron mediante tres pases en la prensa. Las proteínas solubles se recogieron mediante centrifugación a 12000 g durante 30 minutos a 4°C y el sobrenadante se llevó hasta 28 ml con tampón A.

El análisis SDS-PAGE de los extractos totales solubles e insolubles (Figuras 5 y 6) muestra que el suero producido contra NAP sólo reacciona con la fracción soluble, lo que indica que la NAP es totalmente soluble en el tampón A.

### *Purificación de proteínas*

Las proteínas totales solubles de *B. subtilis* se diluyeron con tampón A para dar una concentración de proteína total de 8 mg/ml (Bradford). Se añadió sulfato amónico hasta una concentración final de saturación del 60% y el procedimiento de precipitación por saturación se dejó durante la noche a 4°C con agitación suave. Las proteínas precipitadas se eliminaron mediante centrifugación a 12000 g durante 30 minutos a 4°C y el sobrenadante se dializó durante la noche contra el tampón A.

La solución dializada se cargó en una columna FF de sefarosa quelante activada por níquel (1 x 8 cm) equilibrada con tampón A. La columna se lavó con tampón A + NaCl 200 mM. La elución de proteínas se realizó con un gradiente lineal de 46 ml de imidazol 0-40 mM, seguido por un segundo gradiente de 10 ml de imidazol 40-100 mM (caudal 0,5 ml/min). A continuación, la elución se continuó con 25 ml de imidazol 100 mM.

Las fracciones se analizaron mediante SDS-PAGE y las que contenían NAP se combinaron y dializaron contra tampón PBS (Ph 7-7,5).

La NAP se purificó a partir de *E. coli* del mismo modo a excepción de que el procedimiento de precipitación por saturación usó una saturación del 80%.

### *Pureza*

De 1 litro de cultivo, los resultados de las purificaciones fueron:

Bacteria	NAP (mg)	Pureza (SDS-PAGE)
<i>B. subtilis</i>	10	90%
<i>E. coli</i>	30	95%

En la Figura 8 se proporciona una indicación de pureza, mediante tinción con azul de Coomassie. El material de *E. coli* parece ser ligeramente más puro. Mediante análisis densitométrico se estima un rendimiento del 80%.

### *Precipitación por saturación*

Parece que la NAP es soluble incluso a concentraciones muy elevadas de sulfato amónico. Como se muestra en la figura 7, la NAP permanece soluble incluso a una saturación del 80%. La calle 4 del gel muestra que la precipitación por saturación sólo proporciona un grado elevado de purificación.

### *Ensamblaje multimérico*

La capacidad de la NAP purificada para ensamblarse en una forma multimérica se investigó usando cromatografía de exclusión (no reductora, no-desnaturalizante). La NAP se cargó en una columna de sefarosa 12 HR 10/30 equilibrada en tampón (Tris-HCl 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7,8= y se eluyó a 0,5 ml/min. Con independencia de la fuente de la NAP, la proteína eluyó en un único pico con el mismo tiempo de retención con la alcohol deshidrogenasa de levadura (PM 150 kDa), lo que indica una estructura decamérica [6].

## ES 2 322 213 T3

### Secuencia N-terminal

La secuenciación del N-terminal de la NAP purificada se llevó a cabo usando un secuenciador de proteínas Beckmann LF 3000 equipado con un análisis en línea RP-HPLC de aminoácidos de PTH. Los 10 aminoácidos secuenciados fueron idénticos a los deducidos a partir de la secuencia génica mostrada en la Figura 1.

### Comparación con la proteína nativa

Las células CCUG de *H. pylori* se recogieron de la superficie de placas con agar sangre, se lavaron con PBS helado y se resuspendieron en tampón de lisis (Tris-HCl 20 mM, EDTA 2,5 mM, lisozima 0,3 mg/ml, pH 7,8). La suspensión celular se incubó a 37°C durante 20 minutos, se sonicó y se centrifugó a 20000 g durante 40 minutos. El sobrenadante (proteínas solubles) se almacenó a -20°C hasta su uso.

El tiempo de retención en cromatografía de filtración en gel para la NAP purificada de *E. coli* o de *B. subtilis* fue idéntico al del extracto de proteína soluble de *H. pylori*.

Debe entenderse que la invención se describe en lo que antecede únicamente a modo de ejemplo y que se pueden realizar modificaciones sin salirse del alcance de la invención.

### Referencias

1. Telford JL, Covacci A, Rappuoli R, Ghiara P (1997) Immunobiology of *Helicobacter pylori* infection. *Curr Opin Immunol* 9: 498-503.
2. Telford JL, Covacci A, Ghiara P, Montecucco C, Rappuoli R, (1994) Unravelling the pathogenic role of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer: potential new therapies and vaccines. *TIBTECH* 12: 420-426.
3. Evans DJ, Evans DG, Lampert HC, Nakano H (1995) Identification of new prokaryotic bacterioferritins from *Helicobacter pylori*, *Anabaena variabilis*, *Bacillus subtilis* and *Treponema pallidum* by análisis of gene sequences. *Gene* 153: 123-127.
4. WO96/0127 y WO96/01273 especialmente SEC ID N° 6; véase también el documento WO97/25429.
5. Marchetti M, Aricó B, Burrone D, Figura N, Rappuoli R, Ghiara P (1995) Development of a mouse model of *Helicobacter pylori* infection that mimics human disease. *Science* 267: 1655-1658.
6. Evans DJ, Evans DG, Takemura T, Nakano H, Lampert HC, Gram. DY, Granger DN, Kviety PR (1995) Characterization of a *Helicobacter pylori* Neutrophil-Activating Protein. *Infect Immunol* 63(b): 2213-2220.
7. Teneberg S, Millar-Podraza H, Lampert HC, Evans DJ, Evans DG, Danielsson D, Karlsson K-A (1997) Carbohydrate binding specificity of the neutrophil-activating protein of *Helicobacter Pylori*. *J Biol Chem* 272: 19067-19071
8. Tomb J-F y col. (1997) The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 388 539-547.
9. Sulkowski E (1985) Purification of proteins by IMAC. *TIBTECH* 3: 1-7.
10. A derivative of pSM214- Bellini y col., *J. Biotechnol*, 18: 177-192- in which the Amp gene has been replaced with a multi-cloning site.
11. Nielsen y Andersen (1992) *Gut*: 33: 738-742.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un procedimiento para enriquecer la presencia de NAP de *H. pylori* en una mezcla de proteínas, que comprende las etapas de precipitación por saturación y cromatografía con quelado metálico, en el que la concentración final de sales de la etapa de precipitación por saturación es de una saturación de al menos el 50%.
2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho metal es níquel.
- 10 3. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha NAP se produce mediante un huésped recombinante y en el que dicha NAP tiene la misma secuencia que la NAP natural que se produce en *H. pylori*.
- 15 4. Un procedimiento para la preparación de un agente diagnóstico o agente terapéutico, que comprende: (i) enriquecer la NAP de *H. pylori* mediante el procedimiento de cualquier reivindicación precedente; y (ii) formular la NAP enriquecida para dar el agente.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que el agente es una composición inmunogénica o vacuna.
- 20 6. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que la etapa (ii) implica formular la NAP en un tampón fisiológicamente aceptable.
7. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que la etapa (ii) implica la adición de un adyuvante.
- 25 8. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que la etapa (ii) implica la adición de un marcador detectable a la NAP.

30

35

40

45

50

55

60

65



**FIG. 1**

Promotor                      SacI                      RBS

cttllabgtataacagatllccataaattctgagagcctctagaggggtatcaataaATGAAATACA  
 MetLysThr

TTTGAATTTTATAGACATTTGCCAAGCGGATGCGATCGGTGTGTTTATGAAAGTGCATAAC  
 PheGluIleLeuArgHisLeuGlnAlaAspAlaIleValIleuPheMetLysValHisAsn

TTCCATTGCCAATGTGAAAGCCACCGATTTTTTCAATGTGCATAAAGCCACTGAAGAAATT  
 PheHisTrpAsnValLysGlyThrAspPheAsnValHisLysAlaThrGluGluIle

TATGAAAGAGTTTGGGACATGTTTGTATGATCTCCCTGAAAGGATCGTTCAATTAGGACAC  
 TyrGluGluPheAlaAspMetPheAspAspLeuAlaGluArgIleValGlnLeuGlyHis

CACCCCTTNGTACTTTATCTGAAGCACTCAAACTCCTCGTCAAGAGAACTAAA  
 HisProLeuValThrLeuSerGluAlaLeuLysLeuThrArgValLysGluGluThrLys

---

ACGAGCTTCCACTCTAAAGACATCTTTAAAGAAATTTAGGCCGATTACAACACCTAGAA  
 ThrSerPheHisSerLysAspIlePheLysGluIleLeuGlyAspTyrLysHisLeuGlu

AAAGAAATTTAAAGAGCTTCTAACACTGCTGAAAAGAGCGGATAAAGTCACCGTAACT  
 LysGluPheLysGluLeuSerAsnThrAlaGluLysGluGlyAspLysValThrValThr

TATGCCGACGATCAATTGGCCCAAGTTGCCAAAAATCCATTTGGATGCTAGAAGCTCATTG  
 TyrAlaAspGlnLeuAlaLysLeuGlnLysSerIleTrpMetLeuGluAlaHisLeu

GCTtaaagctt  
 AlaEnd HindIII

**FIG. 1 (CONTD.)**

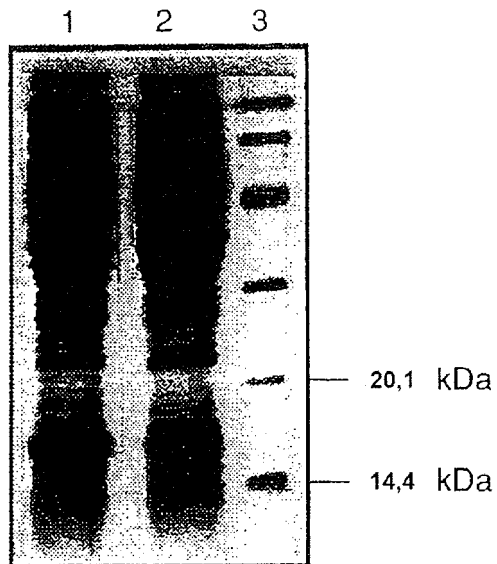
SEQ ID 1	1	A	T	G	A	A	A	C	A	T	T	T	T	A	A	G	A	C	A	T	T	T	G	C	A	A	G	C	G	G	A	T	G	C	A	T	G	C	G	A	T	G	C	A	T	G	T	T	T	A	T	G	A	A
EVANS	1	A	T	G	A	A	A	C	A	T	T	T	T	A	A	A	A	C	A	T	T	T	G	C	A	A	G	C	G	A	T	G	C	A	T	G	C	A	T	G	C	A	T	G	T	T	T	A	T	G	A	A		
GENOMA	1	A	T	G	A	A	A	C	A	T	T	T	T	A	A	A	A	C	A	T	T	T	G	C	A	A	G	C	G	A	T	G	C	A	T	G	C	A	T	G	C	A	T	G	T	T	T	A	T	G	A	A		
SEQ ID 1	61	G	T	G	C	A	T	A	A	C	T	T	C	C	A	T	T	G	A	A	A	G	C	A	C	C	G	A	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
EVANS	61	G	T	G	C	A	T	A	A	C	T	T	C	C	A	T	T	G	A	A	A	G	C	A	C	C	G	A	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T		
GENOMA	61	G	T	G	C	A	T	A	A	C	T	T	C	C	A	T	T	G	A	A	A	G	C	A	C	C	G	A	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T			
SEQ ID 1	121	G	A	G	A	A	T	T	A	T	A	T	A	T	G	A	A	G	A	G	A	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T		
EVANS	121	G	A	G	A	A	T	T	A	T	A	T	A	T	G	A	A	G	A	G	A	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T		
GENOMA	121	G	A	G	A	A	T	T	A	T	A	T	A	T	G	A	A	G	A	G	A	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T			
SEQ ID 1	181	T	A	G	G	A	C	A	C	C	C	T	T	A	G	T	G	A	C	T	T	A	T	C	T	G	A	A	G	C	A	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T			
EVANS	181	T	A	G	G	A	C	A	C	C	C	T	T	A	G	T	G	A	C	T	T	A	T	C	T	G	A	A	G	C	A	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T		
GENOMA	181	T	A	G	G	A	C	A	C	C	C	T	T	A	G	T	G	A	C	T	T	A	T	C	T	G	A	A	G	C	A	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T			
SEQ ID 1	241	G	A	A	C	T	A	A	A	C	G	G	C	T	T	C	C	A	C	T	C	T	A	A	A	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A		
EVANS	241	G	A	A	C	T	A	A	A	C	G	G	C	T	T	C	C	A	C	T	C	T	A	A	A	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A		
GENOMA	241	G	A	A	C	T	A	A	A	C	G	G	C	T	T	C	C	A	C	T	C	T	A	A	A	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A			
SEQ ID 1	301	C	A	C	T	A	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				
EVANS	301	C	A	C	T	A	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				
GENOMA	301	C	A	C	T	A	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A					
SEQ ID 1	361	A	C	C	G	T	A	A	C	T	T	A	T	G	C	C	A	A	T	T	G	C	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				
EVANS	361	A	C	C	G	T	A	A	C	T	T	A	T	G	C	C	A	A	T	T	G	C	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				
GENOMA	361	A	C	C	G	T	A	A	C	T	T	A	T	G	C	C	A	A	T	T	G	C	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				
SEQ ID 1	421	G	C	T	C	A	T	T	T	G	C	T	T	A	A																																							
EVANS	421	G	C	T	C	A	T	T	T	G	C	T	T	A	A																																							
GENOMA	421	G	C	T	C	A	T	T	T	G	C	T	T	A	A																																							

FIG. 2

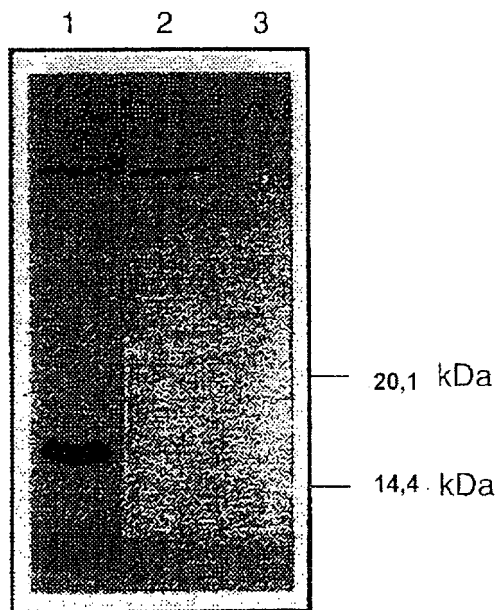
**FIG. 3**

SEQ ID 2	1	MKT	FEIL	RHL	QADA	I	V	L	F	M	K	V	H	N	F	H	N	V	K	G	T	D	F	F	F	N	V	H	K	A	T	E	E	I	Y	E	E	F	A	D	M	F	D	D	L	A	E	R	I	V	Q									
EVANS	1	MKT	FEIL	KHL	QADA	I	V	L	F	M	K	V	H	N	F	H	N	V	K	G	T	D	F	F	F	N	V	H	K	A	T	E	E	I	Y	E	E	F	A	D	M	F	D	D	L	A	E	R	I	V	Q									
GENOMA	1	MKT	FEIL	KHL	QADA	I	V	L	F	M	K	V	H	N	F	H	N	V	K	G	T	D	F	F	F	N	V	H	K	A	T	E	E	I	Y	E	E	F	A	D	M	F	D	D	L	A	E	R	I	V	Q									
SEQ ID 2	6 1	L	G	H	P	L	V	T	L	S	E	A	L	K	L	T	R	V	K	E	E	T	K	T	S	F	H	S	K	D	I	F	K	E	I	L	G	D	Y	K	H	L	E	K	E	F	K	E	L	S	N	T	A	E	K	E	G	D	K	V
EVANS	6 1	L	G	H	P	L	V	T	L	S	E	A	L	K	L	T	R	V	K	E	E	T	K	T	S	F	H	S	K	D	I	F	K	E	I	L	G	D	Y	K	H	L	E	K	E	F	K	E	L	S	N	T	A	E	K	E	G	D	K	V
GENOMA	6 1	L	G	H	P	L	V	T	L	S	E	A	L	K	L	T	R	V	K	E	E	T	K	T	S	F	H	S	K	D	I	F	K	E	I	L	E	D	Y	K	Y	L	E	K	E	F	K	E	L	S	N	T	A	E	K	E	G	D	K	V
SEQ ID 2	1 2 1	T	V	T	Y	A	D	D	Q	L	A	K	L	Q	K	S	I	W	M	L	E	A	H	L	A	*																																		
EVANS	1 2 1	T	V	T	Y	A	D	D	Q	L	A	K	L	Q	K	S	I	W	M	L	E	A	H	L	A	*																																		
GENOMA	1 2 1	T	V	T	Y	A	D	D	Q	L	A	K	L	Q	K	S	I	W	M	L	Q	A	H	L	A	*																																		

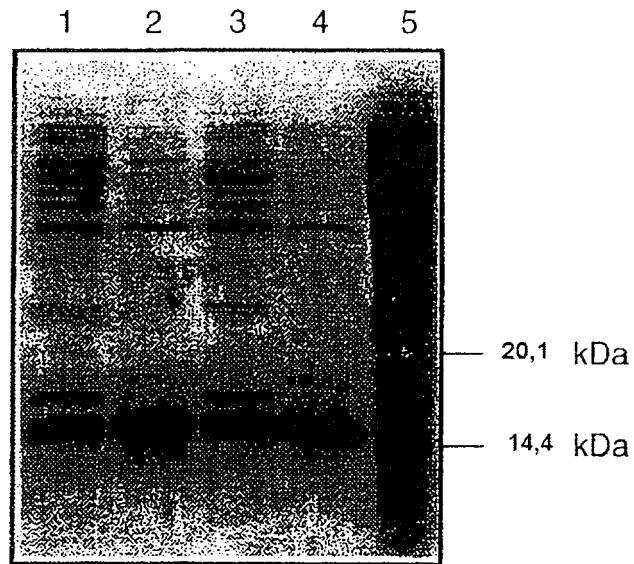
**FIG. 4(A)**



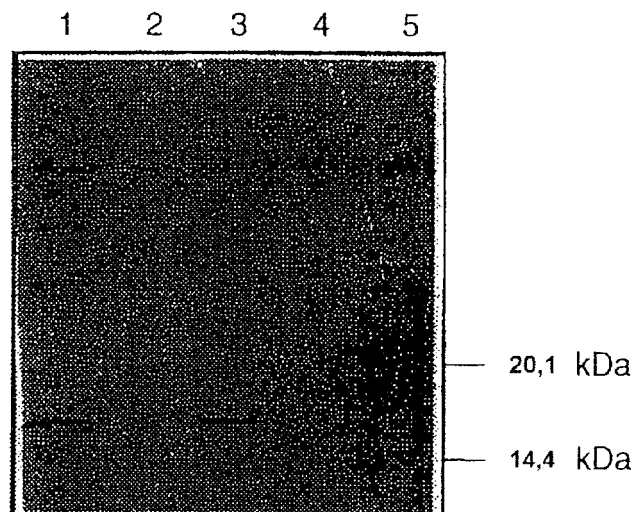
**FIG. 4(B)**



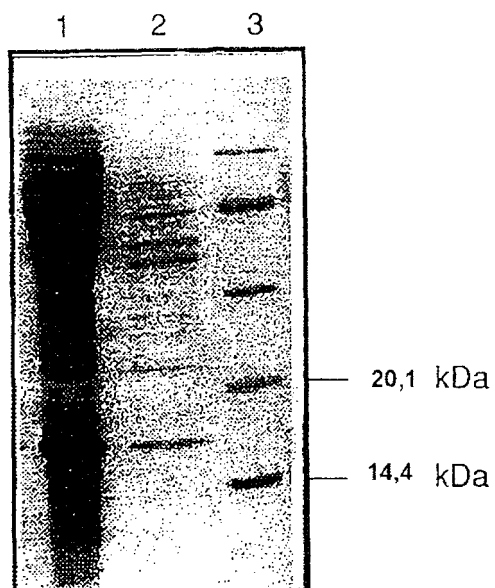
**FIG. 5(A)**



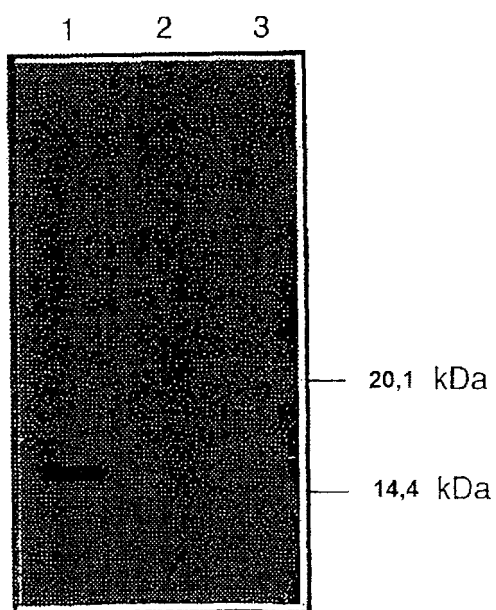
**FIG. 5(B)**



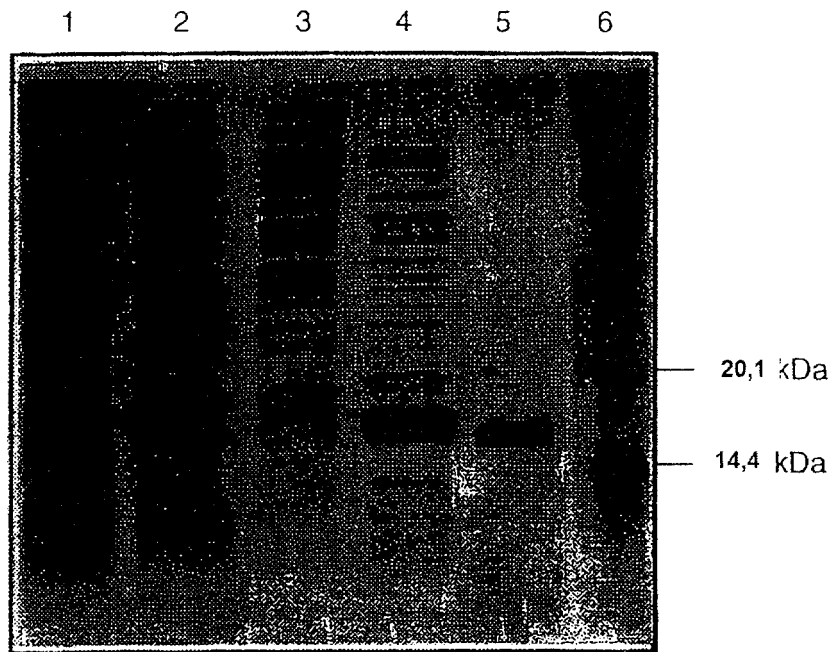
**FIG. 6(A)**



**FIG. 6(B)**



**FIG. 7**



**FIG. 8**

