



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 689 29 510 T2** 2004.11.18

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 649 906 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **689 29 510.3**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **94 110 776.5**

(96) Europäischer Anmeldetag: **06.10.1989**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **26.04.1995**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **07.01.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **18.11.2004**

(51) Int Cl.⁷: **C12N 15/55**

C12N 9/80, C12Q 1/68, G01N 33/569

(30) Unionspriorität:

8813135 06.10.1988 FR

(73) Patentinhaber:

**Institut Pasteur, Paris, FR; Institut National de la
Santé et de la Recherche Médicale I.N.S.E.R.M.,
Paris, FR**

(74) Vertreter:

**WUESTHOFF & WUESTHOFF Patent- und
Rechtsanwälte, 81541 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, ES, FR, GB, GR, IT, LI, LU, NL, SE

(72) Erfinder:

Labigne, Agnès, F-91440 Bures Sur Yvette, FR

(54) Bezeichnung: **Nukleotidsequenzen, die für ein Protein mit Ureaseaktivität kodieren**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Nukleotidsequenzen, die eine Urease kodieren, wie sie natürlich bei *Campylobacter pylori* exprimiert wird, sowie biologische Anwendungen davon, insbesondere zur Detektion von *C. pylori* beim Menschen oder in der Umwelt.

[0002] *C. pylori* ist eine gram-negative Bakterie, die bis zum heutigen Tag ausschließlich an der Oberfläche der Schleimhaut des Antrumbereichs des Magens beim Menschen gefunden worden ist, und insbesondere rund um Verletzungen und Krater von Magengeschwüren und Zwölffingerdarmgeschwüren (Ulcus duodeni). 25% der Bevölkerung sind Träger von *C. pylori*: 8% weisen eine Ulcus-Erkrankung auf, 9% leiden unter funktioneller Dyspepsie (nicht-ulceröser Dyspepsie) und 8% sind asymptomatische Träger.

[0003] Alle bis zum heutigen Tag isolierten und beschriebenen *C. pylori* weisen die drei folgenden Eigenschaften auf:

[0004] Die Bakterien produzieren eine Urease, die über eine hohe Aktivität verfügt.

[0005] Sie haften sehr stark an Epithelzellen der Magenschleimhaut, diese Eigenschaft zeigt sich in vitro durch eine sehr starke Haftung an Hela-Zellen.

[0006] Die *C. pylori* produzieren und setzen ein Enzym frei, das eine proteolytische Aktivität aufweist, was zum Abbau der Schleimhaut führt und somit zu einer Schwächung der natürlichen Barriere, die die Magenschleimhaut schützt.

[0007] Die in situ Detektion von *C. pylori* beim Menschen und in der Umwelt und die Untersuchung von deren pathogener Fähigkeit – es wird angenommen, dass sie für aktive Gastritis beim Menschen verantwortlich ist – stoßen jedoch auf Schwierigkeiten bei der Kultivierung dieses Organismus.

[0008] Das Wachstum von *C. pylori* ist sehr langsam (6–7 Tage auf Gelose-Blut-Medium (milieu gélosé au sang)) und muss unter mikroaerophilen Bedingungen durchgeführt werden, da der Luftsauerstoff toxisch ist.

[0009] Die Forschung nach Mitteln zur Detektion dieser Bakterie führte die Erfinder zu der Identifizierung der Gene, die bei *C. pylori* für die Herstellung von Urease verantwortlich sind.

[0010] Die Bestimmung der Nukleotidsequenz eines intragenen Fragments hat die Bereitstellung eines Mittels ermöglicht, das als Sonde zur Detektion für die spezifische Identifizierung von *C. pylori* verwendet werden kann.

[0011] Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung liegt folglich in der Bereitstellung von neuen Nukleotidsequenzen, die fähig sind, für Proteine mit Urease-Aktivität zu kodieren, wie sie von *C. pylori* exprimiert werden.

[0012] Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung von Fragmenten dieser Sequenz, die als Sonden zur Detektion von *C. pylori* eingesetzt werden können.

[0013] Die vorliegende Erfindung betrifft ferner die Bereitstellung eines Proteins mit Urease-Aktivität, wie von *C. pylori* exprimiert, mit einer hohen Reinheit sowie Fragmente dieses Proteins.

[0014] Die Nukleotidsequenz gemäß der vorliegenden Erfindung ist dadurch gekennzeichnet, dass sie wenigstens einen Teil einer Sequenz umfasst, die für ein Protein mit Urease-Aktivität, wie von *C. pylori* exprimiert, kodiert.

[0015] Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist insbesondere eine Nukleotidsequenz, die fähig ist, mit Genen, die für ein Protein mit Urease-Aktivität kodieren, wie dem bei *C. pylori* exprimierten, zu hybridisieren, unter den folgenden Bedingungen: 68°C, 6 × SSC (1 × SSC ist aus 0,15 M NaCl und 0,015 M Natriumcitrat aufgebaut, pH 7), in Denhardt-Medium (1% Ficoll, 1% Polyvinylpyrrolidon, 1% Serumalbumin vom Rind).

[0016] Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die Nukleotidsequenz dadurch gekennzeichnet, dass sie die Information trägt, die für die Produktion eines Proteins mit Urease-Aktivität oder dessen Fragmente benötigt wird, wobei das Protein oder die Fragmente fähig sind, mit Antikörpern einen Immunkomplex zu bilden, die entweder gegen ein Protein mit Urease-Aktivität wie durch *C. pylori* exprimiert oder gegen

die Fragmente des letzteren gerichtet sind.

[0017] Die Sequenz gemäß der vorliegenden Erfindung ist ferner dadurch gekennzeichnet, dass sie wenigstens einen Teil eines Fragments von ungefähr 8 kb umfasst, das dem Fragment der EcoRI-Restriktion entspricht (ClaI, BamHI)-PstI (HindIII).

[0018] Die enzymatische Restriktionskarte dieses Fragments ist in der **Fig. 2** dargestellt.

[0019] Eine besonders bevorzugte Sequenz umfasst wenigstens einen Teil eines Fragments von ungefähr 4,2 kb (+/- 5%), das durch die entständigen Nukleotide begrenzt wird, die jeweils in einem Abstand von ungefähr 0,55 kb aufwärts der in der **Fig. 2** dargestellten Stelle H2 und ungefähr 0,7 kb abwärts der in der **Fig. 2** dargestellten Stelle B1 angeordnet sind.

[0020] Die Sequenzen, die aus diesem Fragment aufgebaut sind, tragen die für die Expression eines Proteins mit Urease-Aktivität, wie natürlich bei *C. pylori* exprimiert, notwendige Information.

[0021] Die Expression dieser Sequenzen kann sich bei jedem anderen Mikroorganismus ereignen, der fähig ist, die Information dieser Sequenzen nutzbringend zu verwenden, insbesondere bei einem *Campylobacter*-Stamm, dem von Natur aus Gene fehlen, die für die Produktion eines Proteins mit Urease-Aktivität kodieren (oder auch ein Stamm *Campylobacter Urease*-).

[0022] Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung eine rekombinante Sequenz, die eine der vorstehend definierten Sequenzen umfasst, gegebenenfalls mit einem Promotor, der fähig ist, die Transkription der Sequenz zu kontrollieren, und mit einer DNS-Sequenz assoziiert, die für Terminationssignale der Transkription kodiert.

[0023] Die vorliegende Anmeldung beschreibt ferner rekombinante Expressions- und Klonierungsvektoren, die fähig sind, eine geeignete Wirtszelle zu transformieren, umfassend wenigstens einen Teil einer wie vorstehend definierten Nukleotidsequenz unter der Kontrolle von Regulationselementen, die deren Expression erlauben.

[0024] Die bevorzugten rekombinanten Vektoren umfassen wenigstens einen Teil der Sequenz von ungefähr 4,2 kb, die vorstehend beschrieben worden ist.

[0025] Die transformierten Mikroorganismus-Stämme sind im Rahmen der vorliegenden Anmeldung ebenfalls beschrieben. Diese Stämme umfassen wenigstens eine der wie vorstehend angegeben Nukleotidsequenzen oder auch einen wie vorstehend definierter rekombinanten Vektor.

[0026] Der Stamm *E. coli* S17-1, hinterlegt am 16. August 1988 unter der Nummer I-795 bei der "Collection Nationale de Culture de Microorganismes (C. N. C. M) de l'Institut Pasteur" in Paris (Frankreich) trägt das Plasmid pILL590 von ungefähr 16,3 kb, das das Restriktionsfragment von ungefähr 8 kb EcoRI (ClaI, BamHI)-PstI (Hind III) umfasst, das vorstehend erwähnt worden ist.

[0027] Die vorliegende Erfindung betrifft ferner ein Protein, das eine Urease-Aktivität aufweist, vom gleichen Typ wie jenes, das natürlich bei *C. pylori* exprimiert wird, sowie peptidische Fragmente dieses Proteins.

[0028] Das Protein gemäß der vorliegenden Erfindung und dessen Fragmente entsprechen gemäß dem universellen genetischen Code den vorstehend definierten Nukleotidsequenzen, und insbesondere wenigstens einem Teil der Sequenz von ungefähr 4,2 kb.

[0029] Das Protein gemäß der vorliegenden Erfindung ist auch dadurch gekennzeichnet, dass es sich um ein Protein handelt, wie es durch Transformation von Wirtszellen mit Hilfe eines wie vorstehend definierten rekombinanten Vektors, Kultivieren der transformierten Wirtszellen in einem geeigneten Medium und Gewinnen des Proteins ausgehend von diesen Zellen oder direkt ausgehend vom Kulturmedium erhalten werden kann. Die Produktion von Urease oder deren Fragmenten gemäß diesem Verfahren ist ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

[0030] Das Protein gemäß der vorliegenden Erfindung und dessen Fragmente, die ferner auch durch chemische Synthese erhalten werden können, weisen vorzugsweise einen hohen Reinheitsgrad auf und werden verwendet, um nach klassischen Techniken polyklonale Antikörper zu bilden.

[0031] Solche polyklonalen Antikörper wie auch die monoklonalen Antikörper, die fähig sind, das vorstehend genannte Protein und dessen Fragmente spezifisch zu erkennen, sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

[0032] Die vorstehend definierten Nukleotidsequenzen werden nach klassischen Verfahren im Bereich der Genetik durch Klonierung und Identifizierung der Gene erhalten, die für die Synthese eines Proteins mit Urease-Aktivität bei *C. pylori* verantwortlich sind.

[0033] Die vorliegende Erfindung betrifft ferner auch biologische Anwendungen der Nukleotidsequenzen, der entsprechenden Proteine und der monoklonalen oder polyklonalen Antikörper.

[0034] Diese Anwendungen umfassen die Entwicklung von Sonden ausgehend von intragenen Fragmenten für die Detektion von *C. pylori*. Diese Ausführung umfasst insbesondere die Denaturierung der Doppelstrangsequenzen, um eine Einzelstrangsequenz zu erhalten, die als Sonde verwendet werden kann.

[0035] Die mit solchen Fragmenten durchgeführten Assays zum Detektieren des möglichen Vorliegens von komplementären Sequenzen bei verschiedenen *Campylobacter* und bei Mikroorganismen, die unterschiedlichen Arten angehören, zeigten die große Spezifität dieser Fragmente.

[0036] Die vorliegende Erfindung betrifft folglich Sonden zur Detektion, die dadurch gekennzeichnet sind, dass sie wenigstens einen Teil einer Nukleotidsequenz, wie sie vorstehend definiert worden ist, umfassen.

[0037] Jede Sonde, die sich von der vorstehenden Sonde im Hinblick auf die Nukleotidsequenz nur durch Substitutionen oder Alterationen von Nukleotiden unterscheidet, die zu keiner Modifikation der Hybridisierungseigenschaften mit dem Genom von *C. pylori* führen, liegen im Rahmen der vorliegenden Erfindung.

[0038] Das als Sonde verwendete DNS-Fragment umfasst eine Anzahl von Nukleotiden, die ausreicht, um die erforderliche Spezifität und die Bildung eines stabilen Hybrids zu erhalten.

[0039] Es ist möglich, Fragmente einzusetzen, die mehrere kb aufweisen, wobei Ergebnisse mit hoher Spezifität jedoch auch mit kürzeren Fragmenten von ungefähr 25 bis 40 Nukleotiden erhalten werden können.

[0040] Die für diesen Detektionstyp geeigneten Sonden werden vorzugsweise mit einem radioaktiven Element oder einer anderen Gruppe markiert, die eine Erkennung im Hybridzustand mit dem Präparat, das die zu untersuchende DNS enthält, ermöglicht.

[0041] In Übereinstimmung mit den klassischen Techniken werden diese Sonden mit einer biologischen Probe, die Bakterien umfasst, oder direkt mit diesen Bakterien oder deren Nukleinsäuren in Kontakt gebracht, unter Bedingungen, die eine mögliche Hybridisierung der Nukleotidsequenz der Sonde mit einer komplementären Sequenz, die gegebenenfalls in dem untersuchten Produkt vorliegt, zu ermöglichen.

[0042] Man kann beispielsweise die Flecken-Hybridisierungsmethode (*méthode d'hybridation sur taches*) durchführen. Diese Methode umfasst nach der Denaturierung von DNS, die zuvor ausgehend von Bakterien erhalten worden ist, die aus Antrum-Biopsien stammen, die Auftragung einer aliquoten Menge dieser DNS auf Nitrocellulosemembranen, die Hybridisierung jeder Membran unter üblichen Bedingungen mit der Sonde und die Detektion des gebildeten Hybrids auf klassische Art und Weise.

[0043] Man kann ferner eine Replik-Hybridisierungsmethode (*méthode d'hybridation sur réplique*) durchführen, gemäß der Southern-Technik. Diese Methode umfasst die elektrophoretische Auftrennung von DNS-Fragmenten, die nach Behandlung der DNS durch Restriktionsenzyme erzeugt worden sind, auf Agarose-Gel, die Übertragung nach einer alkalischen Denaturierung auf geeignete Membranen und deren Hybridisierung mit der Sonde unter üblichen Bedingungen. Es ist nicht immer erforderlich, eine vorhergehende Expression der DNS durchzuführen. Es ist ausreichend, wenn die DNS für die Sonde verfügbar gemacht wird.

[0044] Die Detektion für die spezifische Identifizierung der *C. pylori* kann ferner mit Hilfe von Amplifizierungstechniken der DNS (PCR) durchgeführt werden. Diese Techniken sind insbesondere in den US-Patenten 4,683,202 und 4,683,195 auf den Namen der Cetus Corporation beschrieben.

[0045] Für die Durchführung dieser Techniken werden zwei Stücke mit 10 bis 40 Nukleotiden, vorzugsweise etwa 20 Nukleotiden, eingesetzt, wobei diese Stücke in einer der Nukleotidsequenzen umfasst sind, die vor-

stehend definiert worden sind, oder geeignet sind, mit einem Teil einer der vorstehend definierten Nukleotidsequenzen zu hybridisieren, oder deren komplementäre Sequenzen. Vorzugsweise sind diese Stücke ungefähr 200 bis 250 Nukleotide entfernt, wenn sie hybridisiert (oder verbunden) sind, auf den Doppelsträngen der zu amplifizierenden DNS. Eine der Sequenzen ist fähig, an eine Nukleotidsequenz von einem der Doppelstränge der zu amplifizierenden DNS-Fragmente zu binden, wobei diese Sequenz an einem Ende dieses Fragments (z. B. dem 5'-Ende) angeordnet ist; die andere Sequenz ist fähig, an eine Nukleotidsequenz des zweiten Doppelstrangs eines zu amplifizierenden DNS-Fragments zu binden, wobei diese letztere Sequenz an dem entgegengesetzten Ende des Fragments im Vergleich zu der vorher genannten angeordnet ist (wobei dieses letztere Ende im vorgeschlagenen Beispiel auch als 3'-Ende bezeichnet werden kann).

[0046] Die bevorzugten Stücke sind in der Nukleotidsequenz des Restriktionsfragments H2-H3 aus der **Fig. 2** umfasst, und sind ungefähr 200 bis 250 Nukleotide entfernt.

[0047] Es handelt sich insbesondere um Fragmente an den jeweiligen Enden dieser Restriktionssequenz HindIII-HindIII.

[0048] Ein Verfahren zum in vitro Nachweis des möglichen Vorliegens von *C. pylori* in einer biologischen Probe umfasst die folgenden Schritte:

- gegebenenfalls die vorherige Amplifizierung der Menge an Nukleotidsequenzen, die in der Probe enthalten sein könnten, durch in Kontaktbringen der Probe mit wie vorstehend beschriebenen Stücken, wobei diese Stücke fähig sind, sich einerseits an das 5'-Ende eines Doppelstrangs dieser Nukleotidsequenz und andererseits an das 3'-Ende des anderen Doppelstrangs dieser Nukleotidsequenz zu binden, wobei dieses in Kontaktbringen von einem Gen-Amplifizierungsschritt in Gegenwart einer DNS-Polymerase und der vier Triphosphatnukleotide dATP, dCTP, dGTP, dTTP gefolgt wird, wobei die Vorgänge der Hybridisierung der Stücke und der Gen-Amplifizierung mehrere Male wiederholt werden,
- das in Kontaktbringen der biologischen Probe mit einer Nukleotidsonde gemäß der vorliegenden Erfindung unter Bedingungen, die die Herstellung eines Hybridisierungskomplexes ermöglichen, der sich zwischen der Sonde und der Nukleotidsequenz bildet,
- Detektion des Hybridisierungskomplexes.

[0049] Die vorliegende Erfindung stellt folglich Mittel bereit, die es ermöglichen, *C. pylori* in situ und in der Umwelt rasch mit einer großen Spezifität zu detektieren, ohne dass Kulturen durchgeführt werden müssen.

[0050] Solche Detektionsmittel sind besonders geeignet, um das natürliche Reservoir dieser Bakterien, die Übertragungsmethoden, die Verbreitungsmethoden und die Kontaminierungsmethoden zu untersuchen. Bei der in vitro Diagnostik, die auf den Biopsien angewendet wird, ermöglicht die Verwendung dieser Sonden einen deutlichen Zeitgewinn im Vergleich zu den aktuellen Techniken, die zusätzlich eine Technologie erfordern, die nur in spezialisierten Labors ausgeführt werden kann, insbesondere bakteriologische Techniken oder die Verwendung der Elektronenmikroskopie.

[0051] Bei der Verwendung des vorstehend definierten Fragments von ungefähr 8 kb als intragene Sonde konnten reproduzierbare Ergebnisse erhalten werden.

[0052] Aufgrund ihrer Spezifität für *C. pylori* stellen die Sonden auch ein Mittel von großer Bedeutung dar.

[0053] Um die pathogene Fähigkeit von *C. pylori* im Hinblick auf die Vorbeugung einer Infektion zu untersuchen, ist es somit möglich, die Rolle von *C. pylori* bei der Entwicklung von Ulcus-Erkrankungen zu untersuchen und die genetischen Determinanten zu identifizieren, die an der pathogenen Fähigkeit dieses Organismus beteiligt zu sein scheinen, im Hinblick auf die in vitro Erzeugung von isogenen Mutanten von *C. pylori*, d. h. Bakterien, die in jeder der Determinanten genetisch modifiziert worden sind; die in der Pathogenese der Infektion eine Rolle zu spielen scheinen, Mutanten, die in Tiermodellen untersucht werden könnten.

[0054] Die vorliegende Erfindung betrifft ferner die Detektion des Polymorphismus der Gene, die bei *C. pylori* für die Urease kodieren, mit Hilfe der vorstehend definierten nukleotidischen Sonden und geeigneter Restriktionsenzyme. Die Bedingungen, unter welchen diese Detektion durchgeführt wird, sind insbesondere in der Veröffentlichung von Gusella J. F. in J. of Clin. – investigations (1986), 77, 1723–1726 beschrieben.

[0055] Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls die immunologischen Anwendungen des kodierten Proteins, insbesondere für die Herstellung von einem spezifischen Antiserum sowie von polyklonalen und monoklonalen Antikörpern. Die polyklonalen Antikörper werden nach klassischen Techniken durch Injektion des Prote-

ins in Tiere, Gewinnung der Antiseren und anschließend der Antikörper ausgehend von den Antiseren, beispielsweise durch Affinitätschromatographie, gebildet.

[0056] Die monoklonalen Antikörper werden auf üblichem Weg hergestellt, durch Fusion von Myelomzellen mit Zellen von Ratten-Tieren (rate d'animaux), die zuvor mit Hilfe der Proteine gemäß der vorliegenden Erfindung immunisiert worden sind.

[0057] Die vorliegende Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zum in vitro Nachweis des möglichen Vorliegens von *C. pylori* in einer biologischen Probe, die dieses enthalten könnte, dadurch gekennzeichnet, dass es die folgenden Schritte umfasst:

- in Kontaktbringen der Probe mit einem Antikörper gemäß der vorliegenden Erfindung, unter Bedingungen, die die Bildung eines Immunkomplexes ermöglichen, der aus dem ganzen Protein oder einem Teil des Proteins mit Urease-Aktivität, das durch *C. pylori* produziert wird, und dem Antikörper gebildet wird, und
- Detektion des Immunkomplexes.

[0058] Für die Durchführung der in vitro Nachweismethoden, die vorstehend in Betracht gezogen worden sind und auf der Verwendung von Nukleotidsonden beruhen, wird vorzugsweise auf notwendige Mittel oder Kits zurückgegriffen, die folgendes umfassen:

- gegebenenfalls wenigstens ein Paar der Stücke gemäß der vorliegenden Erfindung,
- eine bestimmte Menge einer Nukleotidsonde gemäß der vorliegenden Erfindung,
- vorzugsweise ein Medium, das für die Bildung einer Hybridisierungsreaktion zwischen der zu detektierenden Sequenz und der Sonde geeignet ist,
- vorzugsweise Reagenzien, die die Detektion der Hybridisierungskomplexe, die sich zwischen der Nukleotidsequenz und der Sonde bei der Hybridisierungsreaktion gebildet haben, ermöglichen.

[0059] Für die Durchführung der vorstehend angegebenen in vitro Nachweismethoden, die auf der Verwendung von Antikörpern beruhen, wird vorzugsweise auf notwendige Mittel oder Kits zurückgegriffen, die folgendes umfassen:

- eine bestimmte Menge eines Antikörpers gemäß der vorliegenden Erfindung,
- vorzugsweise ein Medium, das für die Bildung einer immunologischen Reaktion zwischen wenigstens einem Teil des Proteins mit Urease-Aktivität, das durch einen *C. pylori*-Stamm produziert wird, und dem Antikörper geeignet ist,
- vorzugsweise Reagenzien, die die Detektion von Immunkomplexen ermöglichen, die sich zwischen wenigstens einem Teil des Proteins mit Urease-Aktivität und dem Antikörper bei der immunologischen Reaktion bilden.

[0060] Eine ausführlichere Untersuchung des Fragments von 4,2 kb, das vorstehend definiert worden ist, hat es ermöglicht, die Strukturgene, die für die größeren polypeptidischen Untereinheiten der Urease von *C. pylori* kodieren, zu lokalisieren.

[0061] Diese Untersuchung wurde durchgeführt, indem in den rekombinanten Plasmiden, die in *E. coli* und *C. jejuni* eingeführt wurden, Mutanten aufgebaut wurden, die nicht fähig sind, die Urease zu synthetisieren (Baskerville-A, Newell D. (1988), Gut. 29, 465–472). Das in vitro Transkriptions-Translations-System von *E. coli* wie auch ein Expressionssystem in Minizellen wurden verwendet, um innerhalb des Fragmentes von 4,2 kb von *C. pylori* die Gesamtheit der Gene zu identifizieren und zu lokalisieren, die für die Untereinheiten der Urease kodieren: zwei große Proteine von 26 kDa und 21 kDa sind identifiziert worden. Parallel dazu wurde nach verschiedenen Deletionen innerhalb des Fragmentes von 4,2 kb ein Transfersystem mittels Konjugation von einem *E. coli*-Stamm auf *C. jejuni* (vom gleichen Typ wie jenes, das in der folgenden Beschreibung ausführlich beschrieben wird) verwendet, um die Regionen zu identifizieren, die für die Expression der Urease-Aktivität unverzichtbar sind, und um die Deletion einer Region mit dem Wegfall eines Polypeptids und dem Verlust der Urease-Aktivität zu korrelieren. Es konnte so bestimmt werden, dass die Gene, die für die zwei Polypeptide kodieren, die für die Expression der Urease-Aktivität notwendig sind, in der zentralen Region von 03,35 kb lokalisiert sind, vor der Stelle H3 der **Fig. 2**, und nach der Stelle auf B1. Die Transkription der Gene, die für die Polypeptide von 61 kDa oder 26 kDa kodieren, wird in Richtung EcoRI-PstI durchgeführt. Das Fragment von 3,35 kb ist notwendig, aber nicht ausreichend für die Expression der Urease-Aktivität bei *C. jejuni*. Eine benachbarte Region von 0,85 kb, die davor lokalisiert ist, anscheinend nicht an der Expression der Polypeptide bei *E. coli* beteiligt, ist für die Expression der Urease-Aktivität bei *C. jejuni* unverzichtbar.

[0062] Die Analyse der Deletionsmutanten durch in vitro Transkription-Translation hat die Feststellung ermöglicht, dass die beiden Polypeptide von 26 und 61 kDa durch zwei benachbarte DNS-Fragmente kodiert wer-

den.

[0063] Die folgende Nukleotidsequenz (V) wird ebenfalls im folgenden beschrieben:

ATGAACTCAOCCCAAAGAGTTAGATAAGTTGATGCTOACTAOGCTGGAGAATTGGCT
 AAAAAAGCAAGAAAAAGGCATTAGCTTAACTATGTAGAAGCAGTAGCTTTGATTAGT
 GOOCATATTATGGAGAAGOGAGAGCTGGTAAAAAGACTGOGGCTGAATTGATGCCAGAA
 GGGGGCACTCTTTTAAAAOCAGATGATGTGATGGATGGOGTGGCAAGCATGATOCATGAA
 GTGGGTATTGAAGOGATGTTTCTGATGGGACTAACTOGTAAOOGTGCATAOCCCTATT
 GAGGOCATGGTAAATTAGTTCTGGTGAGTTGTTCTTAAAAAATGAAGACATCACTATC
 AACGAAGGCAAAAAAGOOGTAGOGTGAAAGTTAAAAATGTTGGOGACAGAOOGGTTCAA
 ATOGGCTCACACTTOCATTCTTTGAAGTGAATAGATGOCTAGACTTTGACAGAGAAAA
 ACTTTGGGTAAAGCTTAGACATTGOGAGOGGGACAGOGGTAGATTGAGOGCTGGOGAA
 GAAAAATCOGTAGAATTGATTGACATTGGOGGTACAGAGAATCTTTGGATTTAAGCA
 TTGGTTGATAGCAAGCAGACAAOGAAAGCAAAAAAATTGCTTTACACAGAGCTAAGAG
 CGTGGTTTTTCATGGOGCTAAAGOGATGACACTATGTAAAAACAATTAAGGAGTAA

[0064] Insbesondere beschreibt die vorliegende Anmeldung eine Nukleotidsequenz, die gemäß dem universellen genetischen Code der Aminosäuresequenz (VI) von 26 kDa (kodiert durch die Nukleotidsequenz (V)) entspricht, im folgenden dargestellt:

1
 MKLTPKELDKLMLHYAGELAKKRKEKGKLNVEAVALISAHIMEEARAGKKTAELMGE
 GRILLKPLDVMGVAAMIHEVGIEAMFPDGIKLVTVHIPIEANGKLVPGELFLKNEDITI
 NEGKAVSVKVRNVDGPRVQIGSEHFFEVNRCLDFDREKTFGKRUDIASGTAVREFEPE
 EKSVELIDIGNRRIFGNALVDROADNESKKIALHRAKERGFHGAKSDDNYVKTIKE
 239

239 Aminosäuren
 Molekulargewicht: 26 522 Dalton

[0065] Die folgende Nukleotidsequenz (VII) kodiert für die Aminosäuresequenz (VIII):

1

ATGAAAAGATTAGCAGAAAAGAATATGTTTCTATGTATGGTCTACTACAGGOGATAAA
 GTGAGATTGGGOGATACAGACTTGATOGCTGAAGTAGAACATGACTACAOCATTTATGGC
 GAAGAGCTTAAATTOGGTGGGGTAAAAOCTAAGAGAAGGCATGAGOCAATCTAACAAAC
 OCTAGCAAAGAAGAGTTGGATTTAATTATCTAFAOGCTTTAATOGTGGATTACAOOGGT
 ATTTATAAAGOGGATATTGGTATTAAAGATGGCAAAATOGCTGGCATTGGTAAAGGOGGT
 AACAAAGACATGCAAGATGGOGTTAAAAACAATCTTAGOGTAGGTCTGCTACTGAGGOC
 TTAGOOOGGTGAAGGTTTGATOGTAAOGGCTGGTGGTATTGACACACACATOCACITTCATT
 TCAOOOCAAACAATOOCTACAGCTTTTGCAAGOGGTGTAACAACCATGATTGGTGGTGGGA
 ACOGGTCTGCTGATGGCACTAATGOGACTACTATCACTOCAGGCAGAGAAATTTAAAA
 TGGATGCTCAGAGOGGCTGAAGATATTCTATGAATTTAGGTTTCTTGGCTAAAGGTAAAC
 GCTTCTAAOGATGOGAGCTTAGOOGATCAAATTGAAGOOOGGTGOGATTGGCTTTAAAAAT
 CAGGAGACTGGGGCAOACTOCTTCTGCAATCAATCATGOGTTAGATGTTGOGGACAAA
 TAGATGTGCAAGTGGCTATOCACACAGACACTTTGAATGAAGOOOGGTGTTGTAGAAGAC
 ACTATGGCTGCTATTGCTGGAOGCACTATGCACACTTTTCCACACTGAAGGOGCTGGOSGC
 GGCAOOGCTOCTGATATTATTAAAGTAGOOOGGTGAACACAACATTCTTTOOOGCTTTOACT
 AAOOOCAAOCATOOCTTTCAOOGTGAATACAGAAGCAGAGCAATGGACATGCTTATGGTG
 TGCOAOCATTTGGATAAAAGCATTAAAGAAGATGTTTCAAGTTOGCTGATTCAAGGATOOGC
 OCTCAAOCATTTGOGGCTGAAGACACTTTGCATGACATGGGGATTTTCTCAATCACAGT
 TCTGACTCTCAAGOGATGGGOOGTGTGGGTGAAGTTATCACTAGAACTTGGCAACAGCT
 GCAAAAAACAAGAAAGAAATTTGGOOOGCTTGAAAGAAGAAAAGGOGATAAOGACAACCTTC
 AGGATCAAAGCTACTTGTCTAAATACAOCATTAAOOOCAGOGATOGCTCATGGGATTAGC
 GAGTATGTAGGTTTCACTAGAAGTGGGCAAGTGGCTGACTTGGTATTGTGGAGTCCAGCA
 TTCTTTGGOGTGAAAOCCAACATGATCATCAAGGOGGATTCATTGOGTTAAGOCAAATG
 GOGATGOGAAOGCTTCTATOOCTAOOOCAAACOGGTTTATTACAGAGAAATGTTTOGCT
 CATCATGGTAAAGCTAAATAOGATGCAACATCACITTTTGTGTCTCAAGOGGCTTATGAC
 AAAGGCATTAAAGAAGAATTAGGACTTGAAAGACAAGTGTGGOOGGTAAAAAATTGCAGA
 AATATCACTAAAAAGACATGCAATTCAAOGACACTACTGCTCACATTGAAGTCAATCT
 GAAACTTAOCATGTGTTTOGTGGATGGCAAGAAGTAACTTCTAAAOCAAGOCATAAAGTG
 AGCTTGGOGCAACTCTTTAGCATTTTCTAG

1710

[0066] Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist insbesondere jede Nukleotidsequenz, die gemäß dem universellen genetischen Code wenigstens einem Teil der Aminosäuresequenz (VIII) von 61 kDa (kodiert durch die Nukleotidsequenz (VII)) entspricht, im folgenden dargestellt:

I
MIKISPKKEYVSMYGPTTGDKVRLGDTDLAEVEHDYITYGEELKFGGKTLREGM
SQSNNPSKEELDLITNALVDYTGMYKADIGIKDGIAGIGKGGNKDMQDGVKNN
LSVGPATEALAGEGLIVTAGGIDTHIHFISSPQQIPTAFASGVTTMIGGGTGPAD
GTNATTTTPGRRNLKWWMLRAAEEYSMNLGFLAKGNASNDASLADQIEAGAIGF
KIHEDWGTTSPAINHALDVADKYDVQVAIHTDTLNEAGCVEDTMAAIAGRTMH
TFHTEGAGGGHAPDIIVAGEHNILPASTNPTIPFTVNTAEHMDMLMVCHLD
KSIKEDVQFADSRIRPQTIAAEDTLHDMGIFSITSSDSQAMGRVGEVITRTWQT
ADKNKKEFGRLKEEKGDNDNFRIKRYLSKYTINPAIAHGISEYVGSVEVGKVAL
VLWSPAFFGVKPNMIKGGFIALSQMGDANASIPTQPVYYREMFHGHGKAKYD
ANITFVSQAAYDKGIKEELGLERQVLPVKNCRNITKKDMQFNDTTAHIEVNPETY
HVFVDGKEVTSKPANKVSLAQLFSIF
569

569 Aminosäuren

Molekulargewicht: 61 729 Dalton

[0067] Der Vergleich der Aminosäuresequenz VIII mit jener der Bohnen-Urease (Jack Bean), die insbesondere in Eur. J. Biochem 175, 151–165 (1988) beschrieben worden ist, zeigt überraschend einen hohen Homologiegrad der Aminosäuren. Diese Konservierung der Struktur hat es den Erfindern ermöglicht, die aktive Stelle der Urease-Untereinheit von 61 kDa abzuleiten, die insgesamt oder teilweise in der polypeptidischen Sequenz enthalten ist, die durch die Aminosäuren beschränkt wird, die an den Positionen 206 und 338 der vorstehend beschriebenen Sequenz VIII lokalisiert sind.

[0068] Die vorliegende Anmeldung beschreibt ferner die ganze oder einen Teil der Nukleotidsequenz IX, die nacheinander aus der Sequenz V und der Sequenz VII aufgebaut ist.

[0069] Die vorliegende Anmeldung beschreibt gleichfalls eine Nukleotidsequenz, die nach dem universellen genetischen Code wenigstens einem Teil der Aminosäuresequenz (X) von 87 kDa entspricht, die in Folge aus der Sequenz VI und der Sequenz VIII aufgebaut ist.

[0070] Die vorliegende Anmeldung beschreibt ferner Sonden zur Detektion des möglichen Vorliegens von *C. pylori* in einer biologischen Probe, dadurch gekennzeichnet, dass sie wenigstens einen Teil einer vorstehend definierten Nukleotidsequenz umfassen.

[0071] Es ist selbstverständlich, dass die Basen der Nukleotidsequenzen, die in Betracht gezogen werden, in einer anderen Reihenfolge vorliegen können als jene, die in den Genen aufgefunden wird, und/oder dass die Basen gegebenenfalls substituiert sein können, solange eine Sonde, die ausgehend von solchen Sequenzen entwickelt worden ist, eine charakteristische und eindeutige Antwort im Hinblick auf die Fähigkeit der Erkennung des Vorliegens von Genen, die für das Protein mit Urease-Aktivität von *C. pylori* kodieren, erteilt.

[0072] Jede Nukleotidsequenz, die mit der Sequenz der vorstehend genannten Nukleotidketten hybridisierbar ist, wie sie durch inverse enzymatische Transkription der korrespondierenden RNS oder auch durch chemische Synthese erhalten wird, liegt ebenfalls im Rahmen der vorliegenden Erfindung.

[0073] Jede Sonde, die sich von der vorhergehenden im Hinblick auf die Nukleotidsequenz nur durch Substitutionen oder Alterationen von Nukleotiden unterscheidet, die keine Modifikation der Hybridisierungseigenschaften mit dem Genom von *C. pylori* mit sich führen, liegt im Rahmen der vorliegenden Erfindung.

[0074] Die vorstehend genannten Sonden sind in Verfahren zur in vitro Diagnostik des möglichen Vorliegens von *C. pylori* in einer biologischen Probe verwendbar, wie vorstehend beschrieben.

[0075] Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Nukleotidstücke von ungefähr 10 bis ungefähr 40 Nukleotiden, wobei diese Stücke in einer der Nukleotidsequenzen V oder VII umfasst sind, wie sie vorstehend beschrieben worden sind (oder in einer von diesen Sequenzen V und VII abgeleiteten Sequenzen), oder wobei diese Stücke fähig sind, mit einem Teil von einer der vorstehend genannten Nukleotidsequenzen zu hybridisieren oder mit deren komplementären Sequenzen (insbesondere unter den vorstehend definierten Hybridisierungsbedingungen).

[0076] Die vorliegende Erfindung betrifft gleichfalls die Verwendung dieser Stücke in den vorstehend angegebenen in vitro diagnostischen Methoden für die vorbereitende Amplifizierung der Menge an Nukleotiden von *C. pylori*, die in einer biologischen Probe enthalten sein können, gemäß dem vorstehend beschriebenen Verfahren.

[0077] Die vorliegende Erfindung betrifft ferner rekombinante Vektoren zur Expression und zur Klonierung, die fähig sind, eine geeignete Wirtszelle zu transformieren, wobei sie die gesamte oder einen Teil einer Nukleotidsequenz umfassen, die mit den vorstehend genannten Nukleotidsequenzen V, VII und IX identisch oder davon abgeleitet ist.

[0078] Die vorliegende Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung von Proteinen, die der gesamten oder einem Teil der vorstehend genannten Sequenz X entsprechen, wobei das Verfahren die Transformation von geeigneten Wirtszellen (insbesondere vorstehend beschriebene Zellen) mit Hilfe von vorstehend beschriebenen Vektoren und das Gewinnen der so hergestellten Proteine umfasst, gegebenenfalls mit einem Reinigungsschritt dieser Proteine.

[0079] Das Verfahren zur Herstellung der Proteine, das vorstehend beschrieben worden ist, umfasst gegebenenfalls einen vorhergehenden Amplifizierungsschritt des Gens, das für das Protein kodiert, dessen Produktion erwünscht wird, wobei dieser Schritt mit Hilfe von Paaren von Stücken gemäß der vorliegenden Erfindung nach dem vorstehend beschriebenen Verfahren durchgeführt werden kann.

[0080] Die vorliegende Erfindung hat ferner die Polypeptide (oder Proteine) zum Gegenstand, die durch die vorstehend beschriebenen Nukleotidsequenzen kodiert werden. Insbesondere betrifft die Erfindung die Aminosäuresequenz X mit 87 kDa und deren Fragmente, wobei die Fragmente kein Peptidfragment der Sequenzen (VI, VIII) sind.

[0081] Die Erfindung betrifft ferner polyklonale und monoklonale Antikörper, die ausgehend von den ganzen oder Teilen der vorstehend beschriebenen Polypeptide erhalten werden und die fähig sind, mit diesen einen Immunkomplex zu bilden.

[0082] Die vorliegende Erfindung betrifft insbesondere Antikörper, vor allem monoklonale Antikörper, die mit Hilfe einer Peptidsequenz von wenigstens 10 bis 15 Aminosäuren der Sequenz VI oder der Sequenz VIII erhalten werden.

[0083] Die bevorzugten monoklonalen Antikörper gemäß der vorliegenden Erfindung sind gegen die ganze oder einen Teil der Sequenz gerichtet, die durch die Aminosäuren beschränkt wird, welche an den Positionen 206 und 338 der Sequenz VIII liegen und insbesondere jene, die mit Hilfe einer Peptidsequenz von wenigstens ungefähr 10 bis 15 Aminosäuren erhalten werden, die aus der Sequenz stammt, die von den Aminosäuren an den Positionen 206 und 338 der Sequenz VIII beschränkt wird.

[0084] Die Erfindung betrifft gleichfalls die Verwendung der vorstehend genannten Antikörper für die Durchführung von in vitro diagnostischen Methoden wie auch in Kits für eine in vitro Diagnostik der Infektion eines Individuums durch *C. pylori*, die vorstehend beschrieben.

[0085] Die Erfindung betrifft ferner immunogene Zubereitungen, die das ganze oder einen Teil der vorstehend beschriebenen Polypeptide umfassen, und insbesondere die gesamte oder einen Teil der Polypeptidsequenz, die durch Aminosäuren beschränkt wird, welche an den Positionen 206 und 338 der Sequenz VIII liegen, in Verbindung mit einem pharmazeutisch verträglichen Vehikel.

[0086] Solche immunogenen Zubereitungen sind als Impfzubereitungen für die Vorbeugung der Infektion eines Individuums durch *C. pylori* geeignet.

[0087] Die vorliegende Erfindung betrifft ferner pharmazeutische Zubereitungen, die einen (oder mehrere)

Antikörper, wie sie vorstehend beschrieben worden sind, umfassen, und insbesondere Antikörper, die fähig sind, mit einem Teil oder der gesamten Peptidsequenz, die durch die Aminosäuren beschränkt wird, welche an den Positionen 206 und 338 der Sequenz VIII liegen, einen Immunkomplex zu bilden, in Verbindung mit einem pharmazeutisch verträglichen Vehikel.

[0088] Solche pharmazeutischen Zubereitungen gemäß der vorliegenden Erfindung sind zur Behandlung von Erkrankungen geeignet, die mit der Infektion eines Individuum durch *C. pylori* verbunden sind, insbesondere Gastritis und Magengeschwüre und Zwölffingerdarmgeschwüre.

[0089] Weitere Vorteile und Eigenschaften der Erfindung sind in der folgenden Beschreibung angegeben, betreffend die Klonierung der Gene, die für die Produktion des Proteins mit Urease-Aktivität bei *C. pylori* verantwortlich sind, die Sequenzierung der Region, die an der Expression des Proteins mit Urease-Aktivität beteiligt ist, und die Spezifität der Nukleotidsonden für die Detektion von *C. pylori*.

[0090] In dieser Beschreibung wird auf die **Fig. 1** und **2** Bezug genommen, die folgendes darstellen:

[0091] die **Fig. 1**, die Restriktionskarte eines Fragments PstI-EcoRI des rekombinanten Cosmids IID2, das die Information trägt, die für die Expression der Urease bei *C. jejuni* erforderlich ist, und

[0092] die **Fig. 2**, die Restriktionskarte eines Fragments von ungefähr 8 kb von pILL590.

1) Herstellung einer Genombank in einem Cosmid-Shuttle-Vektor, Klonierung der Gene, die an der Produktion der Urease bei *C. pylori* beteiligt sind

[0093] Die chromosomale DNS vom Stamm *C. pylori* (85 P) wird derart behandelt, dass DNS-Fragmente mit hohem Molekulargewicht erzeugt werden; ungefähr 300 µg dieser chromosomalen DNS werden einem partiellen Verdau, der durch die Restriktionsendonuklease Sau3A kontrolliert wird, unterworfen und auf einen Sucrosegradienten aufgetragen, um selektiv Fragmente des Verdauens zu isolieren, die zwischen 35 und 45 Kilobasen liegen. 1,5 µg dieser Fragmente werden in vitro an den Shuttle-Cosmid-Vektor pILL575 ligiert, linearisiert durch die Endonuklease BamHI und dephosphoryliert. pILL575 wurde ausgehend vom Shuttle-Cosmid pILL550 hergestellt, das von Labigne-Roussel et al. in J. Bacteriol. 169: 5320–5323, 1987, beschrieben worden ist, in welchem die "cos"-Stelle des Lambda-Phagen inseriert worden ist (Fragment Bgl II von 1,7 kb von pERG 153, inseriert an der Stelle Pvu II von pILL550); es ist folglich durch Konjugation mobilisierbar, kodiert für eine Resistenz gegen Kanamycin, die sich sowohl bei *E. coli* als auch bei *Campylobacter* (Km^r) exprimiert und sich sowohl bei *E. coli* als auch bei *C. jejuni* aufgrund des Vorliegens von zwei Replikations-Startpunkten repliziert, der eine Startpunkt funktioniert nur bei *E. coli*, der andere nur bei *Campylobacter*. Die Produkte dieser Ligation werden in vitro in Lambda-Teilchen eingepackt, anschließend durch Transfektion in einen *E. coli*-Stamm eingeführt, der ein Plasmid IncP enthält, das fähig ist, die Transferfunktionen der rekombinanten Cosmide trans zu komplementieren. Die *E. coli*-Kolonien, die infiziert und gegen Kanamycin resistent sind, werden umgehend einzeln bei –80°C konserviert, eine Cosmid-Genombank, die für die Gesamtheit des Genoms von *Campylobacter pylori* repräsentativ ist, wird bei *E. coli* gebildet, indem ungefähr 500 unabhängige Klone konserviert werden.

[0094] Jedes der rekombinanten Cosmide wird anschließend durch Konjugation von *E. coli* an einen Empfängerstamm von *Campylobacter jejuni* C31 transferiert, der von Natur aus Urease⁺ ist.

[0095] Bei jedem dieser Kanamycin-resistenten Transkonjugate wird untersucht, ob eine Synthese einer Urease durch *Campylobacter jejuni* auftritt.

[0096] Ein Cosmid aus 106 analysierten Cosmiden wird isoliert, der eine genetische Information trägt, die dem *Campylobacter jejuni* C31 die Fähigkeit verleiht, eine Urease zu produzieren. Das rekombinante Cosmid (IID2) weist eine Größe von 54 Kilobasen auf. Die relative Lage der Spaltungsstellen durch die Restriktionsendonukleasen PstI, BamHI, SmaI und EcoRI auf dieser Sequenz ist in der **Fig. 1** dargestellt.

2) Identifizierung des Gens oder der Gene, die für die Urease-Produktion bei *Campylobacter pylori* erforderlich ist bzw. sind

[0097] Es wird eine Subklonierung der Urease-Gene durchgeführt, indem ausgehend von der Cosmid-DNS IID2, hergestellt bei *E. coli*, partielle Verdauungen durch Endonuklease Sau3A durchgeführt werden, um Fragmente der partiellen Verdauung zu generieren, die 8 bis 15 Kilobasen aufweisen. Es wird der kleinste bei *E.*

coli klonierte Plasmidhybrid gesucht, der die Fähigkeit zur Produktion einer Urease nach dem Transfer durch Konjugation in den *Campylobacter*-Empfänger verleiht.

[0098] 4 Plasmide aus den 37 untersuchten Plasmiden tragen die Information, die notwendig ist für die Expression der Urease von *Campylobacter jejuni*: pILL586, pILL589 und pILL590 (siehe **Fig. 2**).

[0099] Durch Vergleich der Restriktionskarten dieser 4 Hybride kann das Vorliegen einer Nukleotidsequenz von 4,2 Kilobasen in allen 4 Hybriden festgestellt werden, was darauf hindeutet, dass sich hierbei um die für die Expression der Urease erforderliche Region handelt. Es wurden eine gewissen Anzahl von Deletionen durchgeführt, die diese Schlussfolgerungen bestätigen (siehe **Fig. 2**).

[0100] Das Fragment EcoRI-PstI von pILL590 wurde als Sonde bei Hybridisierungen mit der gesamten DNS von *C. pylori* 85 P im Hinblick darauf durchgeführt, um zu bestätigen, dass die unterschiedlichen Restriktionsfragmente, die mit BamHI und HindIII ausgehend von pILL590 erzeugt worden sind, in 85 P vorhanden waren. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass die Sequenz von 8 kb, die im pILL590 auftritt, keinen Umordnungen im Rahmen der verschiedenen Klonierungsschritte unterworfen worden ist.

3) Nukleotidsequenz der Region, die mit der Expression der Urease assoziiert ist

[0101] Die Sequenz des Fragments HindIII, die zwischen den Stellen H2 und H3 umfasst ist, entspricht der Sequenz der 294 Nukleotide der Kette (I).

[0102] Die folgende Sequenz von 610 Nukleotiden der Kette (II) ist innerhalb des Fragments, das durch die Stellen H4 und B1 definiert wird (**Fig. 2**).

4) Spezifität der Nukleotidsonden für die Detektion von *Campylobacter pylori*

[0103] Das Fragment EcoRI-PstI von 8 kb, das von pILL590 stammt, wurde als radioaktive Sonde in verschiedenen Hybridisierungsversuchen eingesetzt.

[0104] 32 *Campylobacter pylori* wurden mittels Kolonie-Hybridisierung untersucht und zeigten ein positives Signal; unter den 35 *Campylobacter jejuni* fetus und coli, die untersucht wurden, zeigte keines ein positives Signal unter klassischen stringenten Hybridisierungsbedingungen (50% Formamid, 37°C, 3XSSC).

[0105] Unter den gleichen Bedingungen zeigte die Sonde *C. pylori* von 8 Kilobasen kein positives Signal mit der im folgenden angegebenen Liste von Mikroorganismen, die alle von Natur aus Urease-Produzenten darstellen:

[0106] *Klebsiella oxytoca* (3 Stämme), *Klebsiella pneumoniae* (3 Stämme), *Proteus mirabilis* (3 Stämme), *Proteus morganii* (3 Stämme), *Proteus vulgaris* (2 Stämme), *Providencia stuartii* (3 Stämme), *Pseudomonas picketti* (3 Stämme), *Yersinia enterocolitica* (3 Stämme), 5 Stämme von *Acinetobacter Urease*⁺, 2 Stämme von *Escherichia coli Urease*⁺ und 3 Stämme von *Citrobacter freundii Urease*⁺.

[0107] Das Fehlen von positiven Fehlergebnissen mit dem Fragment von 8 kb garantiert die Spezifität der bereitgestellten Nukleotidsonden.

[0108] Ein Verfahren zur Herstellung von Antikörpern umfasst:

- die Immunisierung eines Tieres mit Hilfe eines wie vorstehend definierten Polypeptids, und
- die Gewinnung der gebildeten Antikörper gemäß klassischen Techniken.

[0109] Ein geeignetes Herstellungsverfahren von Nukleinsäuren (die höchstens 200 Nukleotide umfassen – oder pb, sofern es sich um doppelsträngige Nukleinsäuren handelt) gemäß der vorliegenden Erfindung auf chemischem Weg umfasst die folgenden Schritte:

- die Synthese von DNS unter Verwendung der automatisierten Methode mit beta-Cyanoethyl-Phosphorimidit, die in *Bioorganic Chemistry* 4; 274–325, 1986 beschrieben ist,
- die Klonierung der so erhaltenen DNS in einen geeigneten Plasmidvektor und die Gewinnung der DNS durch Hybridisierung mit einer geeigneten Sonde.

[0110] Ein Herstellungsverfahren auf chemischem Weg von Nukleinsäure mit einer Länge von mehr als 200 Nukleotiden – oder pb (falls es sich um doppelsträngige Nukleinsäuren handelt) umfasst die folgenden Schritte:

- Verknüpfung von chemisch hergestellten Oligonukleotiden, die an ihren Enden mit unterschiedlichen Restriktionsstellen versehen sind, wobei die Sequenzen mit der Aminosäurekette des natürlichen Polypeptids kompatibel sind, nach dem Prinzip, das in Proc. Nat. Acad. Sci. USA 80; 7461–7465, 1983, beschrieben ist,
- die Klonierung der so erhaltenen DNS in einen geeigneten Plasmidvektor und die Gewinnung der erwünschten Nukleinsäure durch Hybridisierung mit einer geeigneten Sonde.

Patentansprüche

1. Nukleotidsequenz, die gemäß dem universellen genetischen Code der Sequenz entspricht, die zwischen den Aminosäuren an den Positionen 206 und 338 der Sequenz (VIII) liegt.
2. Nukleotidsequenz, dadurch gekennzeichnet, dass sie durch 2 Restriktionsstellen aus **Fig. 2**, die zwischen den Stellen H1 und B2 liegen und die Stellen H1, H2, H3, H4, B1 und B2 umfassen, begrenzt wird.
3. Peptidfragmente, dadurch gekennzeichnet, dass sie ausgewählt werden aus
 - a) der Aminosäuresequenz (X) mit 87 kDa
 - b) einem Fragment der Sequenz a), wobei das Fragment eine Urease-Aktivität aufweist und kein Peptidfragment der Sequenz (VI) oder (VIII) ist.
4. Verfahren zur Herstellung eines Immunkomplexes zwischen einem Protein mit Urease-Aktivität, exprimiert durch *C. pylori*, oder Fragmenten davon gemäß Anspruch 3 und Antikörpern, wobei das Verfahren dadurch gekennzeichnet ist, dass das Protein oder die Peptidfragmente mit einer biologischen Flüssigkeit, die die Antikörper enthält, in Kontakt gebracht wird bzw. werden.
5. Verwendung der Sequenzen gemäß den Ansprüchen 1 und 2 als Detektionssonde in einem Verfahren zum in vitro Nachweis im Hinblick auf das Vorliegen von *C. pylori* in einer Probe, die dieses enthalten könnte.
6. Verwendung der Fragmente gemäß Anspruch 3 bei der Herstellung einer Zusammensetzung zur Induktion der Synthese von spezifischen Antikörpern gegen die Fragmente oder einer Immunantwort.
7. Verwendung der Peptidfragmente, ausgewählt aus a) der Aminosäuresequenz (VI) mit 26 kDa, b) der Aminosäuresequenz (VIII) mit 61 kDa oder c) einem Fragment der Sequenzen a) oder b), wobei das Fragment eine Urease-Aktivität aufweist, bei der Herstellung einer Zusammensetzung zur Induktion der Synthese von spezifischen Antikörpern gegen die Fragmente oder einer Immunantwort.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

