(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 693 33 585 T2** 2005.07.28

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 629 132 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **693 33 585.8**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US93/01558**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **93 906 142.0**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 93/016723**
(86) PCT-Anmeldetag: **24.02.1993**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **02.09.1993**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **21.12.1994**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **11.08.2004**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **28.07.2005**

(51) Int Cl.[7]: **A61K 39/00**
A61K 39/02, A61K 35/16, C07H 15/12, C12Q 1/00, C12Q 1/68

(30) Unionspriorität:
841644 **26.02.1992** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Vanderbilt University, Nashville, Tenn., US

(74) Vertreter:
Grünecker, Kinkeldey, Stockmair & Schwanhäusser, 80538 München

(72) Erfinder:
COVER, L., Timothy, Nashville, US; BLASER, J., Martin, Nashville, US

(54) Bezeichnung: **GEREINIGTES VAKUOLISIERENDES TOXIN AUS HELICOBACTER PYLORI UND METHODEN ZU DESSEN VERWENDUNG**

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

Stand der Technik

[0001] Die vorliegende Anmeldung ist eine teilweise Fortsetzung der US-Seriennummer 841 644, angemeldet am 26. Februar 1992.

Fachgebiet der Erfindung

[0002] Die vorliegende Erfindung betrifft ein vakuolisierendes Toxin aus Helicobacter pylori, Verfahren zur Verwendung des Toxins in diagnostischen Tests auf eine Prädisposition für Magengeschwüre und Magenkarzinome sowie Verfahren zur Verwendung des Toxins als Impfstoff zum Bereitstellen eines immunologischen Schutzes gegen eine H. pylori-Infektion.

Kurze Beschreibung des Stands der Technik

[0003] Helicobacter pylori ist ein gekrümmtes gramnegatives Bacterium, das häufig im Magen von Menschen vorkommt; wenn dieser Organismus einmal erworben wurde, liegt er noch Jahre oder Jahrzehnte vor (Blaser, M. J., (1990), J. Infect. Dis. 161: 626–633). Zahlreiche Hinweise zeigen nun, dass eine H. pylori-Infektion fast immer zu einer chronischen Gastritis führt (Dixon, M. F., (1991), Gastroenterol. and Hepatol. 6: 125–130). Obwohl die meisten Personen mit einer H. pylori-induzierten Gastritis ohne Symptome bleiben, stellt dieser Zustand einen signifikanten Risikofaktor für die Entwicklung von sowohl Magengeschwüren als auch Magen-Adenokarzinomen dar (Peterson, W. L., (1991), N. Engl. J. Med. 324: 1043–1048; und Nomura, A., Stemmermann, G. N., Chyou, P.-H., Kato, I., Perez-Perez, G. I., und Blaser, M. J., (1991), N. Eng. J. Med. 325: 1132–1136).

[0004] Die Pathogenese der H. pylori-Infektion wurde bisher noch nicht vollständig aufgeklärt. Es wird vermutet, dass die Produktion von hohen Spiegeln von Urease durch den Organismus (Dunn, B. E., Campbell, G. P., Perez-Perez, G. I., und Blaser, M. J., (1990), J. Biol. Chem. 265: 9464–9469) essentiell ist, um die Infektion des Magens zu initiieren und aufrechtzuerhalten (Eaton, K. A., Morgan, D. R., Krakowka, S., (1989), Infect. Immun. 57: 1119–1125). Eine weitere potentielle Determinante der Virulenz ist ein Toxin, das die Vakuolisierung von eukaryotischen Zellen induziert (Cover, T. L., Halter, S. A., Blaser, M. J., (1992), Human Pathol. 23: 1004–1010). Funktionell aktives Toxin wird durch 50 bis 60% der H. pylori-Isolate in vitro produziert (Leunk, R. D., Johnson, P. T., David, B. C., Kraft, W. G., und Morgan, D. R., (1988), J. Med. Microbiol. 26: 93–99; und Cover, T. L., Dooley, C. P., und Blaser, M. J., (1990), Infect. Immun. 58: 603–610). Antikörper, welche die Aktivität des Toxins neutralisieren, liegen in Seren von H. pylori-infizierten Personen vor, dies weist darauf hin, dass die Aktivität des vakuolisierenden Toxins in vivo von Bedeutung ist (Leunk, R. D., Ferguson, M. A., Morgan, D. R., Low, D. E., und Simor, A. E., (1990), J. Clin. Microbiol. 28: 1181–1184; und Cover, T. L., Cao, P., und Blaser, M. J., (1991), Gastroenterology 100: A570). Zwei Studien haben gezeigt, dass die Prävalenz einer Infektion mit Toxin-produzierenden H. pylori unter den H. pylori-infizierten Personen mit Magengeschwüren höher ist als unter den infizierten Personen, die nur an einer Gastritis leiden (Figura, N., Guglielmetti, P., Rossolini, A., Barberi, A., Cusi, G., Musmanno, R., Russi, M., und Quaranta, S., (1989), J. Clin. Microbiol. 27: 225–226; Goosens, H., Vlaes, L., Lambert, J. P., Glupczynski, Y., Burette, A., und Butzler, J. P., (1991), Microb. Ecol. Health Dis. 4: 130).

[0005] In früheren Arbeiten haben die Erfinder mehrere H. pylori-Proteine identifiziert, die in Kulturbrühe-Überständen mit einer vakuolisierenden toxischen Aktivität vorliegen, jedoch in Überständen, in denen keine toxische Aktivität vorhanden ist, fehlen oder in der Konzentration reduziert sind (Cover, T. L., Dooley, C. P., und Blaser, M. J., (1990), Infect. Immun. 58: 603–610). Außerdem haben die Erfinder gezeigt, dass das vakuolisierende Toxin sich von der H. pylori-Urease unterscheidet (Cover, T. L., Puryar, W., Perez-Perez, G. I., und Blaser, M. J., (1991), Infect. Immun. 59: 1264–1270). In dieser Anmeldung beschreiben die Erfinder die Reinigung und Charakterisierung des vakuolisierenden Toxins von H. pylori.

Zusammenfassung der Erfindung

[0006] Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, eine im Wesentlichen reine antigene Zusammensetzung mit der Aktivität eines vakuolisierenden Toxins bereitzustellen. Diese antigene Zusammensetzung kann entweder aus einem natürlichen Material gereinigt oder rekombinant hergestellt werden.

[0007] Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, das Gen bereitzustellen, das exprimiert werden kann, so dass ein rekombinantes vakuolisierendes Toxin oder Fragmente davon bereitgestellt

werden. Die partielle DNA-Sequenz des Gens ist in Sequenz Id. Nr. 1 dargestellt.

[0008] Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, eine gereinigte antigene Zusammensetzung bereitzustellen, die spezifisch Antikörper gegen das Toxin bindet.

[0009] Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, einen klinischen diagnostischen Test auf das Vorliegen einer Infektion mit Toxin-produzierenden H. pylori bereitzustellen und dadurch Patienten zu identifizieren, bei denen ein Risiko für Magengeschwüre oder Magenkarzinome besteht.

[0010] Eine Aufgabe der Erfindung besteht darin, einen Proteinimpfstoff bereitzustellen, der hohe Spiegel spezifischer Antikörper, die gegen das H. pylori-Toxin gerichtet sind, induziert und der Menschen gegen eine natürliche H. pylori-Infektion schützt.

[0011] Eine weitere Aufgabe der Erfindung besteht darin, polyclonale oder monoclonale Antikörper, die für das H. pylori-Toxin spezifisch sind, und Verfahren für ihre Verwendung zum Nachweisen des Toxins oder für therapeutische Zwecke bereitzustellen.

[0012] Diese und andere Ausführungsformen werden erreicht, indem die antigenen Zusammensetzungen, Impfstoffe, Verfahren, Antiseren oder Antikörper und Kits, die hier beschrieben werden, bereitgestellt werden.

[0013] In einer Ausführungsform der Erfindung wird eine gereinigte antigene Zusammensetzung mit der Aktivität eines vakuolisierenden Toxins (nachstehend als CB-Antigen bezeichnet) aus einem Kulturbrühe-Überstand von H. pylori extrahiert und weist ein Molekulargewicht von mehr als 972000 Dalton (durch Gelfiltrations-Chromatographie unter nicht-denaturierenden Bedingungen bestimmt), in denaturierter Form ein offensichtliches Molekulargewicht von 87000 ± 300 Dalton (durch Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese unter reduzierenden Bedingungen bestimmt (SDS-PAGE)) und einen isoelektrischen Punkt von etwa 6,1 auf. Das Antigen umfasst die aminoterminale Sequenz, die in Sequenz Id. Nr. 2 dargestellt ist, die inneren Aminosäuresequenzen, die in den Sequenz Id. Nr. 15 bis 17 dargestellt sind, und kann zusätzlich die Aminosäuresequenz umfassen, die durch die Nukleotidsequenz codiert ist, die in Sequenz Id. Nr. 1 angegeben ist. Der Begriff CB-Antigen ist als das funktionell aktive nicht-denaturierte vakuolisierende Toxin definiert; im Gegensatz dazu ist das Protein mit Mr = 87000 eine funktionell inaktive Untereinheit des CB-Antigens, die nur unter denaturierenden Bedingungen nachgewiesen wird. Der Begriff CB-Antigen soll antigene Fragmente des gesamten Toxins umfassen, die entweder von H. pylori stammen oder auch synthetisch oder rekombinant produziert werden können. Außerdem können gemäß der Erfindung Antigenproteine eingesetzt werden, die eine wesentliche Homologie zu dem CB-Antigen oder Fragmenten davon aufweisen. Weiterhin sind auch CB-Antigen-Analoga gemeint.

[0014] Antiserum oder monoclonale Antikörper, das/die gegen das CB-Antigen hervorgerufen wurde/n, kann/können eingesetzt werden, um auf das Vorliegen des Toxins zu testen. Testproben werden mit einem solchen Antiserum in Kontakt gebracht, worauf der Nachweis der Antikörperbindung an Komponenten der Testproben folgt. Wenn eine solche Bindung einen vorher festgelegten positiven Schwellenwert übersteigt, ist die Probe für das Toxin positiv.

[0015] Das CB-Antigen ist möglicherweise in der Lage, eine protektive Immunität gegen eine H. pylori-Infektion zu induzieren, wenn es an Menschen in nicht-virulenter Art und Weise verabreicht wird. Somit kann das Antigen in Kombination mit einem geeigneten Adjuvans als Impfstoff gegen eine zukünftige H. pylori-Infektion verwendet werden.

[0016] In einem Aspekt der Erfindung wird das CB-Antigen in Verfahren zum Nachweisen von Anti-Toxin-Antikörpern eingesetzt. Das gereinigte Toxin wird mit Proben von Körperflüssigkeiten in Kontakt gebracht, von denen man annimmt, dass sie Anti-Toxin-Antikörper enthalten. Nach einem solchen Kontaktieren werden bekannte Verfahren verwendet, um das Ausmaß einer Antigen-Antikörper-Komplexbildung zu bestimmen. Wenn die Bildung des Komplexes einen vorher festgelegten positiven Schwellenwert übersteigt, ist der Test positiv auf das Vorliegen von Anti-Toxin-Antikörpern.

[0017] Bevorzugte Techniken zum Nachweisen der Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf einen „Enzyme-Linked Immunosorbent Assay" (ELISA), indirekten Immunfluoreszenz-Test, eine Latex-Agglutination und einen auf Liposomen basierenden Test. Andererseits kann eine Western-Blot-Technik eingesetzt werden, in diesem Fall werden die Banden durch visuelle Inspektion nachgewiesen, wobei das wesentliche Auftreten von schwarzen Banden als positive Anzeige genommen werden

kann. Das Ausmaß des Nachweises des Antigen/Antikörper-Komplexes, der als ein positives Signal angesehen werden soll (d. h. eine Anzeige, dass die Testprobe einen Toxin-spezifischen Antikörper umfasst), hängt von den zum Nachweis gewählten Mitteln ab, kann im Allgemeinen jedoch als ein Wert definiert werden, der größer ist als der Mittelwert plus ein Intervall der Standardabweichung aus den Ergebnissen, die mit Proben aus einer negativen Kontrollgruppe ermittelt wurden, wobei alle anderen Parameter (Verdünnung der Probe, Inkubationszeit usw.) konstant gehalten werden. In einigen Ausführungsformen, bei denen eine höhere Spezifität erwünscht ist, kann der Mittelwert plus zwei oder der Mittelwert plus drei Standardabweichungen verwendet werden. Die negative Kontrollgruppe sollte aus Individuen bestehen, von denen man weiß, dass bei ihnen keine H. pylori-Infektion vorliegt.

[0018] In einem Aspekt der Erfindung werden Kits bereitgestellt, die die antigenen Zusammensetzungen innerhalb des Umfangs der Erfindung umfassen und die weiterhin Mittel zum Nachweisen des Vorliegens eines beliebigen Immunglobulins in einer Testprobe umfassen, das an Antigene in den Zusammensetzungen gebunden werden kann.

[0019] Außerdem können diagnostische Tests auf eine H. pylori-Infektion entwickelt werden, die auf einer Primer-gesteuerten Amplifikation von Nukleinsäureproben von Individuen basieren. Insbesondere können synthetische Oligonukleotide, die aus den Nukleotiden ausgewählt wurden, die in der Sequenz Id. Nr. 1 angegeben sind, in einer Polymerasekettenreaktion eingesetzt werden, um das H. pylori-Toxin auf nachweisbare Mengen zu amplifizieren.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0020] **Fig.** 1 zeigt eine Säulen-Chromatographie des vakuolisierenden Toxins von H. pylori. Die Eluate der Säule wurden auf Absorption bei 280 nm überwacht (durchgezogene Linien), und die Salzkonzentrationen sind durch gestrichelte Linien angegeben. Die Aktivität des vakuolisierenden Zytotoxins der Fraktionen wurde unter Verwendung des Neutralrot-Tests bestimmt und ist als Nettowert der optischen Dichte angegeben (gefüllte Kreise). A) PHENYLSUPEROSE-Chromatographie (Pharmacia) von Ammoniumsulfat-gefällten Überstandsproteinen. Das Vorliegen von Ammoniumsulfat (0,5 M) im Puffer von frühen Fraktionen (Volumen 1 bis 15 ml) trug zu der durch diese Fraktionen induzierten Aufnahme von Neutralrot bei (Cover, T. L., Puryear, W., Perez-Perez, G. I., Blaser, M. J., (1991), Infect. Immun. 59: 1264–1270). B) Der aus A) eluierte Peak wurde auf eine SUPREOSE 12-Säule (Pharmacia) aufgetragen und die toxische Aktivität im Ausschlussvolumen nachgewiesen. C) Fraktionen mit der aus der SUPEROSE 12-Säule (Pharmacia) eluierten toxischen Aktivität wurden auf eine MONO Q-Säule (Pharmacia) aufgetragen und die toxische Aktivität durch einen linearen Gradienten von NaCl eluiert.

[0021] Fig. 2 zeigt eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (12% Acrylamid) des H. pylori-Toxins (CB-Antigens) unter denaturierenden, reduzierenden Bedingungen. Die Bahnen sind: a) Proteine, die aus einem Kulturbrühen-Überstand von H. pylori 60190 durch eine 50% gesättigte Lösung von Ammoniumsulfat ausgefällt wurden; b) Toxin, teilweise gereinigt durch hydrophobe interaktive Chromatographie; c) Toxin, teilweise gereinigt durch Gelfiltrations-Chromatographie; d) gereinigtes CB-Antigen nach Anionenaustausch-Chromatographie, sichtbar gemacht als eine Bande mit Mr = 87000 unter denaturierenden, reduzierenden Bedingungen. Die Chromatographiebedingungen waren wie im Text beschrieben. Die Wanderung von Markerproteinen mit bekannten Molekulargewichten (in Kilodalton) ist jeweils an der linken Seite angegeben.

[0022] Fig. 3 zeigt einen Western-Blot-Nachweis der Proteinbande mit Mr = 87000 durch Kaninchen-Immunserum. Die Proteine, die aus der Kulturbrühe von H. pylori 60190 durch eine 50% gesättigte Lösung von Ammoniumsulfat ausgefällt wurden, wurden einer Elektrophorese auf einem 10% Acrylamid-Gel unterworfen, auf ein Nitrocellulose-Papier überführt, mit 1 : 10000-Verdünnungen von Kaninchenserum inkubiert und sodann die Antigene aufgetrennt. Bahn a) Präimmunserum; Bahn b) Antiserum, das gegen die gereinigte denaturierte Proteinuntereinheit von H. pylori mit Mr = 87000 produziert wurde. Das Antiserum erkannte nur die Bande mit Mr = 87000.

[0023] Fig. 4 zeigt das Neutralisieren der Aktivität des vakuolisierenden Toxins von H. pylori durch ein Antiserum, das gegen die gereinigte denaturierte Proteinuntereinheit mit Mr = 87000 hervorgebracht wurde. Das Präimmunserum und das Antiserum, das gegen die gereinigte Proteinuntereinheit mit Mr = 87000 von H. pylori hervorgebracht wurde, wurden auf eine Toxin-neutralisierende Aktivität getestet. Die Aufnahme von Neutralrot, die durch den rohen eingeengten Kulturbrühe-Überstand von H. pylori 60190 induziert wurde, ist durch die gestrichelte Linie angegeben. Bei einer Verdünnung von 1 : 64 neutralisierte das Antiserum die Toxin-Aktivität vollständig, wohingegen das Präimmunserum die Toxin-Aktivität nicht neutralisierte.

[0024] Fig. 5 zeigt den Nachweis des vakuolisierenden Toxins in H. pylori-Überständen. Eingeengte Kulturüberstände von acht tox^+ H. pylori-Stämmen und von acht tox^- Stämmen wurden 1 : 100 in Carbonatpuffer verdünnt und in einem ELISA auf Reaktivität mit Antiserum gegen die denaturierte Proteinuntereinheit mit Mr = 87000 getestet (Verdünnung 1 : 10000). Tox^+ Überstände erzeugten signifikant höhere optische-Dichte-Werte als tox^- Überstände (0,614 ± 0,11 gegenüber 0,046 ± 0,01, $p < 0,0001$).

[0025] Fig. 6 zeigt den serologischen Nachweis des gereinigten H. pylori-Toxins (CB-Antigens) durch menschliche Seren. Die Seren von 20 H. pylori-infizierten Personen und 20 nicht-infizierten Personen wurden 1 : 100 verdünnt und in einem ELISA auf IgG-Reaktivität mit dem gereinigten CB-Antigen getestet (15 ng/Mikrotitervertiefung). Seren von H. pylori-infizierten Personen erkannten das gereinigte Toxin signifikant besser als Seren von nicht-infizierten Personen (mittlere optische Dichte 0,424 ± 0,06 bzw. 0,182 ± 0,02, $p = 0,0009$).

Genaue Beschreibung der Erfindung und beste Art und Weise

[0026] Diese Arbeit stellt die erste Reinigung zur Homogenität des vakuolisierenden Toxins von H. pylori dar. Das Toxin wurde aus dem Kulturbrühe-Überstand durch Ammoniumsulfat-Fällung isoliert, hierauf folgten eine hydrophobe interaktive Chromatographie, Gelfiltrations-Chromatographie und Anionenaustausch-Chromatographie. Der Begriff im Wesentlichen rein bedeutet, dass das CB-Antigen in der antigenen Zusammensetzung in einer Konzentration vorliegt, die im Vergleich zu den anderen H. pylori-Produkten höher ist als die im Kulturbrühe-Überstand von H. pylori.

[0027] Diese Verfahren führten zur Gewinnung eines gereinigten funktionell aktiven Toxins mit einem Molekulargewicht von größer als 972000 Dalton unter nicht-denaturierenden Bedingungen (CB-Antigen). Die Reinigung dieses Proteins ging mit einem mehr als 5000-fachen Anstieg der spezifischen Aktivität des Toxins einher. Die Analyse des gereinigten Toxins (CB-Antigens) durch SDS-PAGE unter denaturierenden, reduzierenden Bedingungen zeigte das Vorliegen einer einzelnen Bande, die zu 87000 Dalton wanderte. Im ELISA reagierte ein gegen die denaturierte Proteinuntereinheit mit Mr = 87000 gerichtetes Antiserum mit den tox^+ H. pylori-Überständen in einem signifikant größerem Ausmaß als mit den tox^- H. pylori-Überständen. Außerdem neutralisierte Antiserum gegen die denaturierte Proteinuntereinheit mit Mr = 87000 die vakuolisierende toxische Aktivität von H. pylori 60190 und außerdem die durch andere H. pylori-Stämme produzierten Toxine. Zusammen sprechen diese Ergebnisse für eine Beteiligung des CB-Antigens an der vakuolisierenden Toxin-Aktivität und machen deutlich, dass die durch verschiedene H. pylori-Stämme erzeugten Toxine antigen verwandt sind.

[0028] Die Western-Blot-Analyse zeigte, dass die denaturierte Proteinuntereinheit mit Mr = 87000 im Zusammenhang zu stehen scheint mit einer Bande, die in unserer früheren Analyse von tox^+ H. pylori-Kulturüberständen identifiziert wurde (ursprünglich als Mr = 82000 beschrieben) (Cover, T. L., Dooley, C. P., und Blaser, M. J., (1990), Infect. Immun. 58: 603–610). Bei unseren früheren Untersuchungen von tox^+ H. pylori-Überständen wurde auch ein Protein mit Mr = 128000 identifiziert, das Seren von Patienten mit Magengeschwüren häufiger erkannten als Seren von H. pylori-infizierten Personen ohne Geschwürkrankheit (Cover, T. L., Dooley, C. P., und Blaser, M. J., (1990), Infect. Immun. 58: 603–610; Crabtree, J. E., Taylor, J. D., Wyatt, J. I., Heatley, R. V., Shallcross, T. M., Tompkins, D. S., und Rathbone, B. J., (1991), Lancet 338: 332–335). Die vorliegende Studie zeigt, dass das Protein mit Mr = 128000 nicht für die Expression der Aktivität des vakuolisierenden Toxins erforderlich ist und nicht immunologisch kreuzreaktiv ist mit der Proteinuntereinheit mit Mr = 87000.

[0029] Eine beliebige Probe, von der man annimmt, dass sie Antikörper enthält, kann gemäß den hier beschriebenen Verfahren getestet werden. Vorzugsweise sind die Proben, die getestet werden sollen, Körperflüssigkeiten, z. B. Blut, Serum, Urin, Tränen, Speichel und dergleichen. Zusätzlich zu Proben von Menschen können auch Proben von Säugetieren genommen werden, z. B. von Nicht-Mensch-Primaten, Pferden, Schweinen usw.. Aufgrund der Empfindlichkeit des beschriebenen Tests ist es möglich, die Probe vor dem Testen zu verdünnen. Die Verdünnung kann durch Zugabe einer beliebigen Flüssigkeit erfolgen, die jeweils mit der Probe, den zu testenden Antikörpern und der antigenen Zusammensetzung kompatibel ist. Wenn ein Serum als Probe eingesetzt wird, kann es z. B. mit einer oder mehreren Flüssigkeiten verdünnt werden, die aus der Gruppe ausgewählt sind, die aus Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung, pH 7,0 bis 7,4 (nachstehend „PBS"), PBS-enthaltendem Tween 20 (nachstehend „PBS T"), PBS T mit Thimerosal (nachstehend „PBS TT"), PBS TT mit Gelatine (nachstehend „PBS TTG"), und PBS TTG mit Rindergammaglobulin (nachstehend „PBS TTGG") besteht. Verdünnungen können beim Testen auf einen IgG-Antikörper so hoch wie ein Verhältnis von etwa 1 : 100 bis etwa 1 : 1000 sein. Obwohl Proben auch auf IgA- und IgM-Antikörper getestet werden können, sind IgG-Tests bevorzugt.

[0030] Bevorzugte Verdünnungen und Verdünnungsverhältnisse können gemäß der Probe, die getestet werden soll, variieren. Urin z. B. ist bereits relativ verdünnt und muss möglicherweise nicht weiter verdünnt werden. Jedoch ist es möglicherweise nicht erforderlich, Urin einzuengen, wie es häufig bei anderen Tests nötig ist. Vor dem Testen wird der pH-Wert des Urins vorzugsweise auf einen Wert zwischen etwa 7,0 und 7,4, den bevorzugten pH-Wert für die Antikörper-Funktion, eingestellt.

[0031] Zwar ist eine Verdünnung der Probe nicht erforderlich, man geht jedoch davon aus, dass eine Verdünnung die Wahrscheinlichkeit reduziert, dass signifikante Antigen/Antikörper-Komplexe in Abwesenheit von H. pylori-spezifischen Antikörpern gebildet werden. Das Ausmaß der Verdünnung sollte berücksichtigt werden, wenn der Schwelllenwert eines Antigen/Antikörper-Komplexes eingestellt wird, der als ein positives Signal angesehen werden soll.

[0032] Die vorliegende Beschreibung stellt ein einfaches Verfahren zum Herstellen des gereinigten Toxins (CB-Antigens) aus dem hinterlegten H. pylori-Stamm bereit, es wird jedoch betont, dass dieses Antigen einer Reihe von H. pylori-Stämmen gemeinsam ist. Der hinterlegte Stamm und die Beschreibung der vorliegenden Anmeldung stellen eine einfache Weise zum Isolieren dieses Antigens bereitstellen, es wird jedoch betont, dass die vorliegende Erfindung die Verwendung des Antigens allgemein umfasst, unabhängig von der Herkunft und vom Verfahren, durch das es hergeleitet wurde, z. B. durch rekombinante Produktion.

[0033] Vor dem Kontaktieren einer Testprobe mit antigenen Verbindungen gemäß der Erfindung ist es bevorzugt (jedoch nicht erforderlich), dass die antigene Zusammensetzung unter Verwendung herkömmlicher Techniken immobilisiert wird. In einer anderen Ausführungsform können auf Liposomen basierende Tests verwendet werden, wie nachstehend noch ausführlicher beschrieben wird. Für eine herkömmliche Immobilisierung können z. B. Polystyrol-Platten mit Antigen-Suspensionen inkubiert werden, die gemäß der Erfindung hergestellt wurden. Andererseits können z. B. Antigene, die als Proteinbanden auf einem Elektrophorese-Gel isoliert wurden, durch bekannte Verfahren auf einen Nitrocellulose-Bogen übertragen werden. Vgl. Towbin et al., (1979), Proc. Natl. Acad. Sci. 76: 4350–4354; Burnette et al., (1981), Biochem. 112: 95–203. Dem Fachmann sind zahlreiche andere Techniken bekannt, mit denen Antigene an im Wesentlichen inerte Substrate gebunden werden können.

[0034] Gebundene Antigene gemäß der Erfindung werden vorzugsweise mit einer verdünnten Flüssigkeit in Kontakt gebracht, welche die Probe enthält, die auf das Vorliegen eines Antikörpers gegen H. pylori getestet werden soll. Das Antigen und die Probe werden vorzugsweise mindestens 5 bis 15 Minuten inkubiert. Eine kürzere Zeit ist erforderlich, wenn die Inkubation bei oder in der Nähe der menschlichen Körpertemperatur von etwa 37°C erfolgt. Eine Inkubation bei anderen Temperaturen, z. B. bei 4°C, ist auch möglich, sie erfordert jedoch im Allgemeinen eine längere Inkubationszeit. Eine bevorzugte Inkubationszeit bei 37°C reicht von etwa 5 Minuten bis zu etwa 90 Minuten. Schnelle Tests können auch bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Die gebundenen Antigene sollten anschließend gespült werden, um die ungebundenen Antikörper zu entfernen, d. h. diejenigen, die für die Antigene nicht spezifisch sind. Vorzugsweise erfolgt das Spülen mit einer Pufferlösung, z. B. PBS T, PBS TT oder Tris/Tween/Natriumchlorid/Azid. Mehrere Spülgänge sind bevorzugt.

[0035] Während der Inkubation binden H. pylori-spezifische Antikörper an die immobilisierten Antigene, wodurch Antigen/Antikörper-Komplexe erzeugt werden. Während des Spülvorgangs werden alle ungebundenen Antikörper im Wesentlichen entfernt. Aufgrund der hohen Spezifität der Antigene der Erfindung werden Antikörper, die für H. pylori nicht spezifisch sind, durch das Spülen im Wesentlichen entfernt. Wenn die getestete Probe keine H. pylori-spezifischen Antikörper enthält, sind die immobilisierten Antigene natürlich im Wesentlichen frei von menschlichen Antikörpern, und der anschließende Test auf Antigen/Antikörper-Komplexe sollte kein wesentliches Vorliegen solcher Komplexe zeigen. Wenn andererseits die getestete Probe reich an H. pylori-spezifischen Antikörpern ist, sollten diese Antikörper an die immobilisierten Antigene gebunden haben, so dass eine große Menge des Antigen/Antikörper-Komplexes für den anschließenden Nachweis gebildet wurde.

[0036] Der Nachweis eines Antigen/Antikörper-Komplexes kann durch die verschiedensten bekannten Verfahren erfolgen. Bevorzugte Verfahren umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf „Enzyme-Linked Immunosorbent Assay" (ELISA), Latex-Agglutination, Western-Blot-Technik oder indirekten Immunfluoreszenz-Test.

[0037] Typischerweise werden die H. pylori-spezifischen Antikörper, die mit dem immobilisierten Antigen komplexiert sind, durch Kontakt mit markierten oder anders nachweisbaren zweiten Antikörpern nachgewiesen, die für das zu testende Immunglobulin spezifisch sind. Wenn die Testprobe z. B. ein menschliches Serum ist, ist der nachweisbare zweite Antikörper für menschliches Immunglobulin spezifisch. Die markierten zweiten Antikörper können für einen beliebigen menschlichen Antikörper spezifisch sein, vorzugsweise des Typs IgG

oder IgA, am stärksten bevorzugt IgG. Wenn eine akute Serokonversion angenommen wird, kann ein IgM-Test geeignet sein, bei dem ein markierter zweiter Antikörper verwendet wird, der für IgM spezifisch ist. Die zweiten Antikörper werden vorzugsweise mit den immobilisierten Antigenen etwa fünf Minuten bis etwa zwei Stunden, vorzugsweise 30 bis 60 Minuten, bei einer Temperatur von etwa 20°C bis etwa 37°C inkubiert. Danach werden die Antigene mit einer Pufferlösung gewaschen (vorzugsweise mehrere Male), um die gesamten ungebundenen markierten Antikörper zu entfernen. Durch das Waschen werden im Wesentlichen die gesamten markierten Antikörper entfernt, mit Ausnahme der Antikörper, die an das Immunglobulin gebunden haben, das auf den Antigenen vorliegt. Natürlich sollte der H. pylori-spezifische Antikörper im Wesentlichen das einzige menschliche Immunglobulin sein, das zu diesem Zeitpunkt vorliegt. Somit kann das Vorliegen des H. pylori-spezifischen Antikörpers indirekt gemessen werden, indem das Vorliegen oder die Abwesenheit des markierten zweiten Antikörpers bestimmt wird.

[0038] Es gibt zahlreiche bekannte Techniken zum Nachweisen der Markierung, die natürlich mit dem jeweils verwendeten Markierungstyp variieren. Z. B. kann ein Fluorescein-markierter Antikörper nachgewiesen werden, indem nach dem emittierten Licht bei der für Fluorescein charakteristischen Wellenlänge abgetastet wird. Andererseits wird eine Enzymmarkierung nachgewiesen, indem mit geeigneten Substraten inkubiert und eine Enzymaktivität nachgewiesen wird, vorzugsweise eine Aktivität, die eine Farbänderung zur Folge hat. Eine solche Aktivität kann durch eine visuelle Inspektion bestimmt werden, oder sie kann durch ein Spektrophotometer, das auf die geeignete Wellenlänge eingestellt ist, automatisch abgelesen werden.

[0039] Andererseits kann die Enzymmarkierung Meerrettich-Peroxidase sein, und das Substrat kann H_2O_2 und 2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure) sein, das in Gegenwart des Enzyms eine Verbindung produziert, die durch ein auf 414 nm eingestelltes Spektrophotometer nachgewiesen werden kann.

[0040] Beim Western-Blotting kann ein positives Signal nachgewiesen werden, wenn ein Enzym mit dem zweiten Antikörper verknüpft ist. Die Inkubation mit einem geeigneten Substrat produziert enzymatisch ein gefärbtes Produkt in unmittelbarer Nachbarschaft der durch diesen Prozess aufgetrennten Antigen-Bande. Das Vorliegen einer reaktiven Bande kann durch visuelle Inspektion nachgewiesen werden. In einem indirekten Immunfluoreszenz-Test können Fluorescein-markierte zweite Antikörper durch Fluoreszenz-aktivierte Detektoren oder durch visuelle Inspektion nachgewiesen werden.

[0041] Ein auf Liposomen basierender Test kann das Vorliegen von Fluorescein, einem Enzym oder einem Substrat innerhalb eines Liposoms umfassen, an dessen Oberfläche H. pylori-Antigene exprimiert werden. Diese Liposomen werden mit einer verdünnten Körperflüssigkeits-Probe, die getestet werden soll, inkubiert und danach gründlich gewaschen. Ein Liposom mit Immunglobulinen auf seiner Oberfläche, die einen Antigen/Antikörper-Komplex bilden, kann erkannt werden, indem ein zweiter Antikörper, der für das Immunglobulin spezifisch ist, auf das getestet wird, an die inneren Wände eines Polystyrolröhrchens, das die Liposomen enthält, gebunden wird. Diejenigen Liposomen, die an ihren Oberflächen gebundene Antikörper aufweisen, werden an den Wänden des Röhrchens immobilisiert, und die nicht-immobilsierten Liposomen werden anschließend weggewaschen. Die Liposomen können z. B. mit einem Detergens oder Komplement lysiert werden, und das Enzym oder Substrat, das im Inneren vorlag, ist nun frei und kann mit dem komplementären Substrat (oder Enzym) in der Lösung im Röhrchen reagieren. Die enzymatische Aktivität, vorzugsweise eine Farbänderungsreaktion, kann dann durch visuelle Inspektion oder durch eine spektrophotometrische Farbbestimmung nachgewiesen werden. Die enzymatische Aktivität über dem vorher festgelegten positiven Schwellenwerts zeigt das Vorliegen von H. pylori-spezifischen Antikörpern an.

[0042] Die Empfindlichkeit und die Spezifität des Antikörpernachweises gemäß der vorliegenden Erfindung wurden bestimmt, indem ein Serum verwendet wurde, das von Personen aus definierten Populationen gewonnen worden war. Durch ELISA wurden IgG-Antikörper gegen das gereinigte Toxin (CB-Antigen) in Seren von H. pylori-infizierten Personen identifiziert. Die ELISA-Werte der optischen Dichte, die durch Seren von etwa 50% der H. pylori-infizierten Personen erzeugt wurden, liegen über dem Bereich, der durch Seren von nicht-infizierten Personen produziert wurde. Dies legt nahe, dass etwa 50% der H. pylori-infizierten Personen mit Stämmen von H. pylori infiziert sind, die das Toxin produzieren. Genauso produzieren etwa 50% der H. pylori-Stämme in vitro das Toxin (Leunk, R. D., Johnson, P. T., David, B. C., Kraft, W. G., und Morgan, D. R., (1988), J. Med. Microbiol. 26: 93–99; Cover, T. L., Dooley, C. P., und Blaser, M. J., (1990), Infect. Immun. 58: 603–610).

[0043] In dieser Anmeldung sind die Ergebnisse als Mittelwert ± SEM angegeben. Die Werte der optischen Dichte wurden unter Verwendung des zweiseitigen T-Tests nach Student für unabhängige Variablen verglichen.

[0044] Außerdem kann der Nachweis von Nukleinsäuren in Proben schwierig sein, die Körperflüssigkeiten oder Gewebe umfassen, da nur eine kleine Menge Nukleinsäuren vorliegt oder da andere störende Stoffe in der Probe vorhanden sind, umfassend DNA oder RNA anderer Herkunft. Diese Einschränkungen können umgangen werden, indem ein analytisches Verfahren verwendet wird, das als Polymerasekettenreaktion (PCR) bezeichnet wird. Durch dieses Verfahren kann eine selektive Anreicherung einer spezifischen DNA-Sequenz durch eine exponentielle Amplifikation der Zielsequenz erreicht werden (Mullis et al., (1987), Met. Enzymol. 155: 335). Ein Verfahren zum Nachweisen des H. pylori-Toxins wird bereitgestellt, wobei eine Primer-gesteuerte Amplifikation von Oligonukleotiden verwendet wird, die aus der DNA-Sequenz ausgewählt sind, die in Sequenz Id. Nr. 1 angegeben ist, wodurch eine Probe von H. pylori-Toxinproduzierenden Nukleinsäuren auf einen nachweisbaren Spiegel amplifiziert wird.

[0045] Um die PCR-Amplifikation zu erleichtern, können Paare von Oligonukleotid-Primern verwendet werden, wie im US Patent 4 683 202 beschrieben (hier durch Bezugnahme eingeschlossen). Die Primer werden so entworfen, dass sie mit Sequenzen hybridisieren, welche die Ziel-DNA flankieren. Nach der in vitro-Amplifikation wird die amplifizierte Zielsequenz durch eine Hybridisierungssonde nachgewiesen. Z. B. wurde dieses analytische Verfahren für den direkten Nachweis von HIV-1 eingesetzt, wie von Ou et al., (1988), Science 238: 295–297, beschrieben. Die Amplifikationszyklen werden durch die Verwendung einer Polymerase erleichtert, die in Inkubationen bis zu 95°C thermisch stabil ist, wie von Saiki et al., (1988), Science 239: 487–491, beschrieben.

[0046] In bestimmten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung wurden synthetische Oligonukleotidsequenzen als Primer verwendet. Diese Sequenzen können durch bekannten chemische Verfahren hergestellt werden, und außerdem können kommerziell verfügbare DNA-Synthesizer verwendet werden. Z. B. kann die erforderliche Sequenz durch das Syntheseverfahren hergestellt werden, das von Beaucage et al., (1981), Tetrahedron Letters 22: 1859–1862, beschrieben wird. Ein weiteres Verfahren zum Synthetisieren eines Oligonukleotids auf einem Feststoff-Träger wird im US Patent 4 458 066 beschrieben. Eine automatische DNA-Syntheseapparatur kann eingesetzt werden, z. B. der DNA-Synthesizer, der von Applied Biosystems verkauft wird.

[0047] Insbesondere sind die Oligonukleotidsequenzen der Sondensequenzen durch die herkömmliche Buchstabenabkürzungen dargestellt, wobei die Nukleotide wie folgt bezeichnet sind: A für Adenosin, T für Thymidin, G für Guanosin und C für Cytosin sowie N für unbekannt. Diese Stränge sind in einer herkömmlichen 5'-prime-zu-3'-prime-Orientierung dargestellt. Die Abkürzungen, die in den degenerierten Primern verwendet werden, sind in Tabelle 3 angegeben.

Beispiel 1

Reinigen des Toxins

[0048] H. pylori 60190 (ATCC 49503), ein früher beschriebener Toxin-produzierender Stamm, wurde als Quelle zum Reinigen des Toxins eingesetzt. H. pylori 60190 wurde 48 Stunden bei 37°C in Brucella-Brühe, enthaltend 0,5% Aktivkohle (unbehandelt, granulär, 8 bis 20 Mesh, Sigma), in einer Umgebungsluft mit 5% CO_2 gezüchtet (Cover, T. L., Puryear, W., Perez-Perez, G. I., und Blaser, M. J., (1991), Infect. Immun. 59: 1264–1270). Die Kultur wurde bei 10000 × g 20 Minuten zentrifugiert und die im Überstand vorliegenden Proteine mit einer 50% gesättigten Lösung von Ammoniumsulfat ausgefällt. Nach dem Zentrifugieren bei 10000 × g, 15 Minuten, wurde der Niederschlag in 60 mM Tris-HCl (pH 7,7) resuspendiert.

[0049] Eine hydrophobe interaktive Chromatographie wurde auf einer PHENYLSUPEROSE HR 5/5-Säule (Pharmacia LKB Biotechnology Inc., Piscataway, NJ) mit einem Puffer durchgeführt, der 60 mM Tris-HCl und 0,5 M Ammoniumsulfat (pH 7,7) enthielt, und Proteine wurden mit 60 mM Tris-HCl (pH 7,7) eluiert. Eine Größenausschluss-Chromatographie wurde auf einer SUPEROSE 12 HR 16/50-Säule (Pharmacia) mit einem Puffer, der 60 mM Tris-HCl und 0,1 M NaCl (pH 7,7) enthielt, bei einer Fließrate von 0,12 ml/Minute durchgeführt. Eine Anionenaustausch-Chromatographie wurde auf einer MONO-Q HR 5/5-Säule (Pharmacia) in 20 mM Tris-HCl (pH 7,7) durchgeführt. Proteine wurden mit 20 mM Tris eluiert, enthaltend einen linearen Gradienten von 0,3 M NaCl bis 0,6 M NaCl über 10 ml. Die Säuleneluate wurden auf eine UV-Absorption bei 280 nm überwacht.

[0050] HeLa-Zellen wurden in Eagles modifiziertem minimalem essentiellem Medium, enthaltend 10% fetales Rinderserum (MEM-FBS), in Platten mit 96 Vertiefungen wie vorher beschrieben gezüchtet (Cover, T. L., Dooley, C. P., und Blaser, M. J., (1990), Infect. Immun. 58: 603–610). Die Toxinpräparate wurden in MEM-FBS seriell verdünnt und 10-µl-Aliquots mit adhärenten Zellen und 90 µl Medium in Platten mit 96 Vertiefungen 18

Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Zellvakuolisierung spektrophotometrisch quantitativ bestimmt, indem ein Neutralrot-Aufnahme-Test wie früher beschrieben verwendet wurde (Cover, T. L., Puryear, W., Perez-Perez, G. I., und Blaser, M. J., (1991), Infect. Immun. 59: 1264–1270). Der Titer der toxischen Aktivität in einer Probe wurde als die maximale Verdünnung der Probe definiert, die einen Wert der optischen Dichte größer als oder gleich drei SD über dem durch das Medium alleine erzeugten Wert produzierte. Die spezifische Aktivität einer Probe wurde definiert als das Verhältnis des reziproken Toxin-Titers zur Proteinkonzentration (in mg/ml). Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität wurde MEM-FBS mit Ammoniumchlorid (10 mM) angereichert, wobei es sich um eine Konzentration handelt, für die früher schon gezeigt wurde, dass sie eine toxische Aktivität möglich macht (Cover, T. L., Puryear, W., Perez-Perez, G. I., und Blaser, M. J., (1991), Infect. Immun. 59: 1264–1270), und die in etwa der Konzentration von Ammoniumionen im Magensaft von H. pylori-infizierten Menschen entspricht (Marshall, B. J., und Langton, S. R., (1986), Lancet i: 965–966).

[0051] Die Proteinkonzentrationen wurden entweder unter Verwendung des QUANTIGOLD Reagens (Diversified Biotech, Newton Centre, MA) oder anhand des „BCA Protein Assay Reagent Kit" (Pierce, Rockford, Illinois) gemessen, abhängig von der Konzentration der Proben, wobei als Standard Albumin eingesetzt wurde. Die SDS-PAGE wurde in einem modifizierten Laemmli-Gelsystem durchgeführt, wie von Ames beschrieben (Ames, G. F.-L., (1974), J. Biol. Chem. 249: 634–644), und Proteine wurden in Gelen unter Verwendung der Silberfärbung von Oakley et al. aufgetrennt (Oakley, B. R., Kirch, D. R., und Morris, N. R., (1980), Anal. Biochem. 105: 361–363). Molekulargewichts-Standards umfassten Kaninchenmuskel-Phosphorylase b (97400), Rinderseruamalbumin (66200), Hühnereiweiß-Ovalbumin (45000), Rinder-Kohlensäureanhydrase (31000) und Soja-Trypsininhibitor (21500) (Biorad, Richmond, CA).

[0052] Die Reinigung des vakuolisierenden Toxins von H. pylori umfasste eine Ammoniumsulfat-Fällung der im Kulturbrühe-Überstand vorliegenden Proteine, worauf nacheinander hydrophobe interaktive Gelfiltrations- und Anionenaustausch-Chromatographie folgten, wie vorstehend beschrieben. Die SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen und die Silberfärbung zeigten eine Reinigung zur Homogenität einer Proteinuntereinheit mit Mr = 87000 ± 300 (Fig. 2). Wie in Tabelle 1 zusammengefasst, zeigte die Analyse der spezifischen Aktivitäten in dem jeweiligen Stadium des Reinigungsprozesses, dass das Toxin (CB-Antigen) aus dem nicht-eingeengten Kulturbrühen-Überstand mehr als 5000-fach und aus dem Ammoniumsulfat-Niederschlag mehr als 25-fach gereinigt war. Somit wurde ein im Wesentlichen reines Präparat erhalten, in dem das Toxin in einer Konzentration vorlag, die im Vergleich zu anderen H. pylori-Produkten höher war als die im H. pylori-Kulturbrühen-Überstand. Gewonnen wurde das gereinigte Toxin mit 8 µg pro Liter Kulturüberstand, dies stellte weniger als 5% der toxischen Aktivität dar, die in dem ursprünglichen nicht-eingeengten Überstand vorlag.

[0053] Zusätzlich zu dem vorstehend beschriebenen Reinigungsverfahren kann ein im Wesentlichen reines Protein hergestellt werden, indem eine SUPEROSE 6-Säule (Pharmacia) anstelle einer SUPEROSE 12-Säule (Pharmacia) verwendet wird. Genauso können andere Modifikationen im Reinigungsverfahren durch den Fachmann eingeführt werden. Z. B. können Zusatzstoffe zugefügt werden, um eine Proteindegeneration zu vermeiden, z. B. PMSF, DTT, EDTA und 10% Glycerin.

Tabelle 1
Reinigen der Aktivität des vakuolisierenden Zytotoxins aus dem H. pylori-Stamm 60190

Reinigungsschritt	Spezifische Aktivität	Reinigung (-fach)
Kulturbrühe-Überstand	4,5 ± 1,5	1
Ammoniumsulfat-Niederschlag	950 ± 530	211
Phenylsuperose-Chromatographie	2000 ± 310	444
SUPEROSE 12-Chromatographie	16 000 ± 5 900	3556
MONO Q-Chromatographie	24 000 ± 5 600	5333

[1]Die Ergebnisse von drei Reinigungen sind dargestellt (Mittelwert ± SEM). Die Chromatographiebedingungen waren wie im Text angegeben. Die spezifische Aktivität war definiert als das Verhältnis des reziproken Titers der toxischen Aktivität zur Proteinkonzentration (in mg/ml).

Beispiel 2

Charakterisieren des CB-Proteins

[0054] Nach einer teilweisen Reinigung durch hydrophobe interaktive und Gelfiltrations-Chromatographie

wurde das Toxinpräparat einer Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen auf einem 7% Acrylamid-Gel unterworfen. Die Bande mit Mr = 87000 wurde ausgeschnitten und aus dem Gel eluiert und sodann mit 0,7 M Ammoniumbicarbonat versetzt. Danach wurde die Lösung auf eine PHENYLSUPEROSE HR 5/5-Säule (Pharmacia) aufgetragen und mit destilliertem Wasser eluiert. Eine aminoterminale Aminosäuresequenzierung erfolgte wie früher beschrieben (Pei, Z., Ellison, R. T., III, Lewis, R. V., und Blaser, M. J., (1988), J. Biol. Chem. 263: 6416–6420), und die Datenbanken der Natrional Biomedical Research Foundation und Swiss-Prot wurden nach möglichen Homologien mit bekannten Proteinen durchsucht. Die Analyse der Aminosäurezusammensetzung wurde durchgeführt, wie von Jones beschrieben (Jones, B. N., (1981), J. Lig. Chromatogr. 4: 565–586).

[0055] Die Aminosäurezusammensetzung der gereinigten, denaturierten Proteinuntereinheit mit Mr = 87000 ist wie folgt (in Mol-%): Asx 14,8, Glx 9,6, Ser 9,3, His 1,5, Gly 13,0, Thr 6,7, Arg 3,5, Ala 8,1, Tyr 3,8, Met 2,3, Val 6,7, Phe 4,6, Ile 6,7, Leu 9,3 (Lys, Trp, Pro und Cys wurden nicht bestimmt). Aufgrund von zwei Bestimmungen ist die Sequenz der 23 N-terminalen Aminosäuren wie in Tabelle 2 dargestellt (Sequenz Id. Nr. 2). Die N-terminale Sequenz ist reich an hydrophoben Aminosäuren, sie ist ungeladen und hat einen vorhergesagten isoelektrischen Punkt von 5,83. Die Struktur-Voraussagen nach Garnier-Robson zeigen, dass dieser Teil der Sequenz mit einer 100% verlängerten Konformation assoziiert ist.

[0056] Ein Vergleich zwischen der N-terminalen Sequenz der Proteinuntereinheit mit Mr = 87000 und anderen bekannten Proteinen zeigte keine starke Homologie. Jedoch bestand eine teilweise Homologie zwischen dem N-Terminus der Proteinuntereinheit mit Mr = 87000 und inneren Sequenzen zahlreicher anderer bekannter Proteine, von denen viele an Transportprozessen beteiligt sind (Tabelle 2) (Salkoff, L., Butler, A., Scavarda, N., und Wei, A., (1987), Nucleic Acids Res. 15: 8569–8572; Rogart, R. B., Cribbs, L. L., Muglia, L. K., Kephart, D. D., und Kaiser, M. W., (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 8170–8174; Takeyasu, K., Tamkun, M. M., Renaud, K. J., und Fambrough, D. M., (1988), J. Biol. Chem. 263: 4347–4354; Hesse, J. E., Wieczorek, L., Altendorf, K., Reicin, A. S., Dorus, E., und Epstein, W., (1984), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 4746–4750; Mandel, M., Moriyama, Y., Hulmes, J. D., Pan, Y.-C. E., Nelson, H., und Nelson, N., (1988), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5521–5524; Hiles, I. D., Gallagher, M. P., Jamieson, D. J., und Higgins, C. F., (1987), J. Mol. Biol. 195: 125–142; und Szkutnicka, K., Tschopp, J. F., Andrews, L., und Crillo, V. P., (1989), J. Bacteriol. 171: 4486–4493; Hawkins, A. R., Lamb, H. K., Smith, M., Keyte, J. W., und Roberts, C. F., (1988), Mol. Gen. Genet. 214: 224–231; Goldrick, D., Yu, G.-Q., Jiang, S. Q., und Hong, J.-S., (1988), J. Bacteriol. 170: 3421–3426). Aufgrund von Hydropathie-Analysen zeigte sich, dass die Sequenzen, die zu der H. pylori-Proteinuntereinheit mit Mr = 87000 homolog waren, häufig hydrophobe, Membran-überspannende Segmente darstellten. Zusätzlich zu den in Tabelle 2 angegebenen Proteinen lag eine teilweise Homologie vor mit dem Calciumkanal-Freisetzungs-Protein aus dem Schwein (Harbitz, I., Chowdhary, B., Thomsen, P. D., Davies, W., Kaufmann, W., Kran, S., Gustavsson, I., Christensen, K., und Hauge, J. G., (1990), Genomics 8: 243–248), dem Kainat-gesteuerten Ionenkanal-Vorläufer aus der Ratte (Hollmann, M., O'Shea-Greenfield, A., Rogers, S. W., und Heinemann, S., (1989), Nature 342: 643–648), der allgemeinen Aminosäure-Permease aus Saccharomyces cerevisiae (Jaunizux, J.-C., und Grenson, M., (1990), Eur. J. Biochem. 190: 39–44), der Arginin-Permease aus S. cerevisiae (Hoffmann, W., (1985), J. Biol. Chem. 260: 11831–11837), der Lactose-Permease aus E. coli (D. E., Groneborn, B., und Muller-Hill, B., (1980), Nature 283: 541–545), und dem Mannose-Permease EII-P MAN-Segment aus E. coli (Erni, B., Zanolari, B., und Kocher, H. P., (1987), J. Biol. Chem. 262: 5238–5247). Die teilweise Homologie zwischen dem N-Terminus der Proteinuntereinheit mit Mr = 87000 und verschiedenen Regionen mehrerer Familien von Ionenkanal- und Transportproteinen legt nahe, dass diese Beziehung möglicherweise signifikant ist.

Tabelle 2
Seguenzhomologie zwischen dem vakuolisierenden Toxin von H. pylori und Ionenkanal- oder Transportproteinen

Sequenz

Start Ende

```
H. pylori Mr=87 000 Proteinuntereinheit (Sequenz Id. 2)
1   A F F T T - V I - I P A I V G G I A T G T A V G T  23
    * * * * *   * :   :   * * *     : :             *
Natriumkanal:  Drosophila  (Sequenz Id. 3)
1355  A F F T T-V F G L E A I V K I V G L R Y H Y F T  1378
          * * * *   : *   * :   : :             :   :
Natriumkanal Protein i Herz: Ratte  (Sequenz Id. 4)
1752  L F F T T Y I I - I S F L I V V N M Y I A I I L E  1775
      * * * : *       :   :       * *     : * :     *
Na+-K+-Transport-ATPase alpha: Huhn  (Sequenz Id. 5)
241   A F F S T - N C - V E G T A V G I V I S T G D R T  263
          :       :   * * :   : * * :   : : : * * :
H+-K+-Transport-ATPase b-Kette:  E. coli  (Sequenz Id. 6)
256   V A L L V - C L - I P T T I G G L L S A S A V A G  278
          :       *   * *   : : : * *   :     : :
H+-Transport-ATPase Proteolipid-Kette:  Rind  (Sequenz Id. 7)

 50   E M I M K - S I - I P V V M A G I I A I Y G L V V  72
      * * :   :   * *   *         *   * * :
Oligopeptid-Permease : Salmonella typhimurium (Sequenz Id. 8)
104   A F L L A - V I - I G V S A G V I A A L K Q N T R  126
      * * * *       *     : * *         :
Galactose-Permease : Saccharomyces cerevisiae (Sequenz Id. 9)
486   A F F T P - F I - T S A I N F Y Y G Y V F M G C L  508
        * * : :   : :   *   : * *     :
Quinat-Permease: Aspergillus nidulans  (Sequenz Id. 10)
458   F F F A S - L M - I L S I V F V F F L I P E T K G  480
        * : : :   *           * *   : : *   * : * * *
Phosphoglycerat-Transporter: S. typhimurium (Sequenz Id. 11)
366   Q F L A S - V Q - T M E I V P S F A V G S A V G L  388
      * * * : *   :     :   :       * :       * :     *
Magen-H+K+-ATPase alpha-Untereinheit: Mensch  (Sequenz Id. 12)
254   A F F S T - M C - L E G T A Q G L V V N T G D R T  276
        *     *     *     :         * *   :   * : * : *
Ca++-ATPase aus sarkoplasmatischem Retikulum: Kaninchen (Sequenz Id. 13)

208   L F S G T - N I - A A G K A L G I V A T T G V S T  230
          :       *   * *   : : : * *   :     : :
Chromaffin granul. H+ -ATPase 16 kDa Proteolipid-Untereinheit: Rind
(Sequenz Id. 14)
 50   E M I M K - S I - I P V V M A G I I A I Y G L V V  72
      * * :   :   * *   *         *   * * :
```

* zeigt die Identität mit der Proteinuntereinheit mit Mr = 87000 von H. pylori an;
: zeigt konservative Substitutionen an.

[0057] Die Bestimmung der Molekülmasse des nicht-denaturierten Toxins (CB-Antigens) wurde auf einer SUPEROSE 6 HR 10/30-Säule (Pharmacia) mit einem Puffer durchgeführt, der 60 mM Tris-HCl und 0,1 M NaCl (pH 7,7) enthielt. Die Standards (Sigma, St. Louis, MO) umfassten Lachssperma-DNA (Ausschlussvolumen), Blue Dextran (2000000), Rinder-Thyroglobulin (669000), Pferdemilz-Apoferritin (443000), Betaamylase aus Süßkartoffeln (200000), Rinderserumalbumin (66000) und Kohlensäureanhydrase aus Rindererythrozyten (29000). Das Toxinpräparat, das in dieser Analyse verwendet wurde, wurde teilweise gereinigt durch hydrophobe interaktive und Gelfiltrations-Chromatographie und danach auf die SUPEROSE 6 HR 10/30-Säule

(Pharmacia) aufgetragen. Die Aktivität des vakuolisierenden Toxins, die in der Zellkultur nachgewiesen wurde, und außerdem die Bande mit Mr = 87000, die durch SDS-PAGE nachgewiesen wurde, lagen in mehreren Fraktionen vor, die jeweils ein Mr von größer als 972000 aufwiesen, dies legt eine Aggregation nahe. Um zu bestimmen, ob eine Aggregation durch Prozesse zustande kam, die beim Reinigen verwendet wurden, wurde ein nicht-eingeengter Kulturbrühe-Überstand von H. pylori 60190 durch die gleiche Säule passiert und Fraktionen in einem ELISA auf Reaktivität mit Antiserum gegen die Proteinuntereinheit mit Mr = 87000 getestet. Mehrere Fraktionen, die Proteine mit berechneten Molekulargewichten von mehr als 100000 enthielten, wurden durch das Antiserum erkannt, dies weist darauf hin, dass eine Aggregation der Proteinuntereinheit mit Mr = 87000 auch in dem nicht-bearbeiteten Überstand auftrat.

[0058] Der pI-Wert des gereinigten Toxins wurde durch eine isoelektrische Fokussierung bestimmt. Die isoelektrische Fokussierung wurde auf einer horizontalen Elektrophorese-Einheit „Resolve Alpha" (Isolab, Inc., Akron, OH) unter Verwendung eines 5% Acrylamid-Gels (LKB, Bromma, Schweden) durchgeführt, das 5 M Harnstoff und 2,5% Ampholyte (pH-Bereich 3,5 bis 9,5) enthielt. Die Standards (Sigma) waren Trypsin-Inhibitor (4,6), Beta-Lactoglobulin A (5,13), Rinder-Kohlensäureanhydrase II (B) (5,9), und menschliche Kohlensäureanhydrase B (6,6). Die gereinigte denaturierte Proteinuntereinheit mit Mr = 87000 von H. pylori und die Standards der isoelektrischen Fokussierung wurden durch Elektroblotting eine Stunde auf Nitrocellulose-Papier übertragen. Die Standards wurden durch Färbung mit Coomassie-Blau aufgetrennt, und das H. pylori-Protein wurde durch Immunblotting mit einem spezifischen Antiserum aufgetrennt, wobei die nachstehend beschriebenen Verfahren verwendet wurden. Das nicht-denaturierte Toxin wanderte nicht in einem 1% Agarose-Gel (Isolab, Akron, Ohio), vermutlich aufgrund seiner großen Größe. Deshalb wurde die Proteinuntereinheit mit Mr = 87000 aus einem SDS-PAGE-Gelfragment eluiert, und die Fokussierung in einem 5% Acrylamid-Gel, das 5 M Harnstoff enthielt, zeigte einen pI-Wert von etwa 6,1.

Beispiel 3

PCR-Amplifikation einer Toxin-codierenden DNA-Sequenz und Clonieren des Toxin-Gens

[0059] Um innere Aminosäuresequenzen zu bestimmen, wurde das CB-Antigen von H. pylori 60190 durch Säulenchromatographie gereinigt, wie von Cover et al., (1992), in: „Purification and Characterization of the Vacuolating Toxin from Helicobacter pylori", J. Biol. Chem. 267: 10570–10575, beschrieben. Vgl. Beispiel 1 für eine Beschreibung der Chromatographie.

[0060] Die gereinigte 87-kDa-Bande wurde auf einem PVDF-Papier immobilisiert und ausgeschnitten. Die Amido-schwarz-gefärbten ausgeschnittenen Proteinbanden wurden einmal mit Milli-Q-Wasser gewaschen und mit 0,5 ml von 200 µM NaOH/20% Acetonitril eine Minute entfärbt, worauf ein Waschgang mit Milli-Q-Wasser folgte. Die restlichen unspezifischen Proteinbindungsstellen wurden mit 0,5 ml von 0,2% PVP-40/Methanol (Gew./Vol.) bei Raumtemperatur 30 Minuten blockiert, worauf die Zugabe von 0,5 ml Milli-Q-Wasser folgte. Die Proben wurden sechs- bis zehnmal mit 1 ml Milli-Q-Wasser gewaschen, um überschüssiges PVP-40 zu entfernen, in Quadrate von etwa 1 × 1 mm geschnitten und wieder in das gleiche Eppendorf-Röhrchen gegeben. 50 µl von 1% RTX-100/10% Acetonitril/100 mM Tris-HCl, pH 8,0, wurden zu den Streifen zugegeben, worauf 5 µl Arg-C-Protease folgten. Die besten Ergebnisse wurden mit einem Spaltungspuffer-Volumen von weniger als 50 µl erhalten. Die Spaltung erfolgte 24 Stunden bei 37°C. In Experimenten, in denen > 0,001% SDS im Spaltungspuffer verwendet wurde, wurde vor der HPLC-Analyse eine Extraktion mit Heptan/Isoamylalkohol (4 : 1, Vol./Vol.) durchgeführt. Frank, R. W., und Bosserhoff, A., (1988), in „Methods in Protein Sequence Analysis" (Wittmann-Liebold, B., Hrsg.), S. 273–279, Springer Verlag, Berlin Heidelberg. Nach der Spaltung wurden die Proben fünf Minuten beschallt und danach fünf Minuten bei 1700 UpM zentrifugiert, anschließend wurde der Überstand in ein HPLC-Injektionsgläschen (Hewlett-Packard) überführt. Anschließend wurden Waschgänge mit 50 µl Spaltungspuffer (1×) und 50 µl 1,1% TFA (2×) mit Beschallen und Zentrifugieren wie vorstehend beschrieben durchgeführt. Alle Überstände wurden zu insgesamt 200 µl vereinigt. Wenn Proben nicht sofort durch HPLC analysiert wurden, wurde die Spaltung durch Zugabe von 2 µl 1% DFP/Ethanol (Vol./Vol.) zu den vereinigten Überständen gestoppt und das Gläschen bei –20°C aufbewahrt.

[0061] Die Peptidisolierung erfolgte auf einem 1090M HPLC (Hewlett-Packard, Avondale, PA), ausgestattet mit einem binären Lösungsmittel-Freisetzungssystem, einem Diodenmatrixdetektor, einer Injektionsvorrichtung für variable Volumina und einem automatischen Probennehmer. Der Ausfluss aus der Durchflusszelle wurde direkt an einen Fraktionssammler angeschlossen, wobei ein Kapillarschlauch mit einem Totvolumen von 9 µl verwendet wurde. Die Daten wurden mit einer Hewlett-Packard 79995 A Chem-Station Software gesammelt. Peptide wurden injiziert (200 µl) und auf einer Vydac C_{18}-Säule (2,1 × 250 mm) mit einer Fließrate von 150 µl/Minute bei Raumtemperatur aufgetrennt. Die Chromatographiebedingungen waren wie von Stone et al.

beschrieben, Stone, K. L., LoPresti, M. B., Williams, N. D., Crawford, J. W., DeAngelis, R., und Willaims, K. R., (1989), in: „Techniques in Protein Chemistry" (Hugli, T. E., Hrsg.), S. 377–390, Academic Press, New York. Kurz gesagt bestand der Gradient aus 1,6 bis 29,6% B (0 bis 63 Minuten), 29,6 bis 60% B (63 bis 95 Minuten), 60 bis 80% B (95 bis 105 Minuten), und die Puffer waren A = 0,1% TFA/Milli-Q-Wasser und Puffer B = 0,08% TFA/Acetonitril. Danach wurde die Säule bei 80% B 12 Minuten mit 150 µl/Minute gewaschen und bei 1,6% B 50 Minuten mit 300 µl/Minuten reäquilibriert. Die Peptid-Elution wurde bei 220 nm überwacht. Fraktionen wurden alle 0,5 Minuten gesammelt (75 µl/Fraktion) und bei –20°C gelagert, bis die Sequenzanalyse durchgeführt wurde. Danach erfolgte die Mikrosequenzierung der inneren Peptide wie in Fernandez, (1992), Anal. Biochem. 201: 255–264, beschrieben.

[0062] Die Mikrosequenzierung von drei Peptiden ergab die folgenden Aminosäuresequenzen (die Klammern geben mehrdeutige Reste an);
(L) GQFNGN(S)FT(S)YKDXAD
SEQUENZ Id. Nr. 15;
(N) IKNVEITR
SEQUENZ Id. Nr. 16;
(T) RV/IDFNAKNILIDNFLEINNR
SEQUENZ Id. Nr. 17.

[0063] Unter Verwendung dieser Informationen wurden degenerierte Oligonukleotid-Primer synthetisiert, die den Aminosäureresten Nr. 2 bis 8 der Sequenz Id. Nr. 2 und den Aminosäureresten Nr. 13 bis 20 des inneren Peptids, dem früher die Sequenz Id. Nr. 17 zugewiesen wurde, entsprachen.
5'TTYTTYACNACNGTNATHAT3'
SEQUENZ Id. Nr. 18;
5'GAYAAYTTYYTNGARATHAAYAA3'
(Sense)
SEQUENZ Id. Nr. 19;
3'CTRTTRAARRANCTYTADTTRTT5'
(Antisense)
SEQUENZ Id. Nr. 20.

Tabelle 3

R = A, G	N = A, T, C, nicht G
Y = C, C	B = G, T, C, nicht A
M = A, C	V = G, A, C, nicht T
K = G, T	D = G, A, T, nicht C
S = G, C	N = G, A, T, C

[0064] Die in den degenerierten Primern verwendeten Symbole sind in Tabelle 3 angegeben.

[0065] Die degenerierten Oligonukleotid-Primer wurden auf einem DNA-Synthesizer anhand der herkömmlichen Phosphoramidit-Chemie synthetisiert. Diese degenerierten Oligonukleotide (Sequenz Id. Nr. 18 und 20) wurden als Primer in einer Polymerasekettenreaktion eingesetzt, die so entworfen wurde, dass die intervenierenden Sequenzen des Toxin-Gens amplifiziert wurden. H. pylori 60190-Zellen wurden aus Blutagarplatten in destilliertes Wasser geerntet, fünf Zyklen bei 100°C gekocht und zentrifugiert, um die Trümmer zu entfernen; sodann wurde der Überstand als DNA-Matrize für die PCR eingesetzt.

[0066] Die PCR wurde unter Verwendung eines Perkin Elmer DNA-Thermozyklers gemäß den Anweisungen der Hersteller durchgeführt. Die PCR wurde fünf Zyklen bei Temperaturen von 94°C, 1,5 Minuten, 37°C, zwei Minuten, und 72°C, zwei Minuten, durchgeführt, worauf 45 Zyklen mit den Temperaturen 94°C, 1,5 Minuten, 41°C, zwei Minuten, und 72°C, zwei Minuten, folgten. Die Analyse der amplifizierten DNA durch Agarose-Gel-Elektrophorese zeigte eine dominante Bande, die bei 0,5 kb wanderte.

[0067] Das 0,5 kb große amplifizierte DNA-Fragment wurde aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten, gereinigt und in NOVABLUE-Zellen (Novagen) cloniert, wobei ein pT7blue-T-Vektor-Kit (Novagen) verwendet wurde. Die Plasmid-DNA wurde aus der Transformante gereinigt, und die Spaltung mit PstI und BamHI bestätigte das Vorliegen des 0,5-kb-Inserts. Eine Didesoxynukleotid-Sequenzierung des Inserts unter Verwendung von Lambda-ZAP-Vektor-Primern erfolgte anhand von herkömmlichen Verfahren. Sanger et al., (1977), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71: 1342–1346; und Maniatis et al., (1989), „Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold

Spring Harbor, NY. Die Nukleinsäuresequenz des Amplifikationsprodukts ist in Sequenz Id. Nr. 1 angegeben (in 5'-zu-3'-Richtung, Basen 24 bis 495). Teile dieser Sequenz codierten korrekt die Aminosäuresequenzen Id. Nr. 2, 15 und 17, dies zeigt, dass ein Teil des Toxin-Gens erfolgreich cloniert worden war. Insbesondere die Sequenz Id. Nr. 15 wurde durch die Basen 400 bis 450 der Sequenz Id. Nr. 1 codiert.

[0068] Um das gesamte Toxin-Gen zu clonieren, wurde die Chromosomen-DNA von H. pylori 60190 durch Beschallen geschert und die resultierenden Fragmente einer Elektrophorese auf einem 0,7% Agarose-Gel unterworfen. Die Fragmente im Größenbereich von 2 bis 10 kb wurden ausgeschnitten und mit T4-DNA-Polymerase behandelt, um glatte Enden zu erzeugen, und danach wurden sie mit phosphorylierten EcoRI-Oktamer-Linkern (New England Biolabs) ligiert. Die DNA wurde mit EcoRI gespalten und mit den EcoRI-Armen des Lambda-ZAP-Vektors (Stratagene) verknüpft. Die Ligierungsgemische wurden zu dem Gigapack II Packaging Mix (Stratagene) zugegeben und auf XL1-Blue-Zellen titriert. Das clonierte 0,5-kb-Fragment des Toxin-Gens wie vorstehend beschrieben wurde durch Primer-Verlängerung unter Verwendung von Zufalls-Hexameren radiomarkiert und sodann zum Screenen der genomischen Bank eingesetzt. Aus acht reaktiven Clonen wurden die rekombinanten Phagemide ausgeschnitten und in XL1-Blue-Zellen transformiert. Die Plasmid-DNA aus diesen Clonen zeigte DNA-Inserte von 1,2, 1,1 oder 2,2 kb. Drei repräsentative Clone, die Inserte dieser Größe enthielten, wurden in weiteren Untersuchungen eingesetzt (p1A1, p3A1 bzw. p3C). Die Behandlung dieser drei rekombinanten Plasmide mit Restriktionsendonuklease machte deutlich, dass keine Überlappung zwischen p1A1 und p3A1 vorlag.

[0069] Partielle Sequenzen von p1A1 und p3A1 wurden bestimmt, indem sowohl Vorwärts- als auch Rückwärts-Vektor-Primer eingesetzt wurden. Die DNA-Sequenz, welche der N-terminalen Aminosäuresequenz des Toxins entsprach, wurde in p3A1 identifiziert, und Sequenzen, welche der inneren Aminosäuresequenz entsprachen, angegeben in den Sequenzen Id. Nr. 15 und 17, wurden in p1A1 identifiziert. Das 1,1-kb-Insert in p3A1 enthielt eine Sequenz, die den Basen 1 bis 177 der Sequenz Id. Nr. 1 entsprach, und außerdem etwa 0,9 kb einer stromaufwärts liegenden Sequenz. Das 1,2-kb-Insert in p1A1 enthielt eine Sequenz, die den Basen 178 bis 1412 der Sequenz entsprach, die in Sequenz Id. Nr. 1 angegeben ist.

Expression eines rekombinanten Toxins in E. coli

[0070] Clon 3A1 enthält 177 Basen des Toxin-Gens (einschließlich der N-terminalen Aminosequenz), eine Leader-Sequenz, einen wahrscheinlichen Promotor und etwa 0,8 kb der stromaufwärts liegenden Sequenz. Clon 1A1 enthält 1,2 kb des inneren Toxin-Gens (Sequenzen 177 bis 1412) und flankiert die EcoRI-Stelle, die am stromabwärts liegenden Ende von 3A1 liegt. Eine Vorgehensweise zum rekombinanten Exprimieren des Toxins besteht darin, das 1412-Basenpaar-Fragment des Toxin-Gens zu amplifizieren, indem als Primer die Basen 1 bis 20 und die Basen 1392–1412 der Sequenz Id. Nr. 1 verwendet werden. Danach kann diese Sequenz in pBluescript in E. coli XL1-Blue subcloniert werden, und anschließend kann das rekombinante Toxin exprimiert werden. Andererseits können die DNA-Inserte in 3A1 und 1A1 aus dem pBluescript-Plasmid ausgeschnitten und Gel-gereinigt werden. Das Insert 3A1 kann an einer inneren Restriktionsstelle gespalten und die Fragmente von 3A1 sodann Gel-gereinigt werden. Das Fragment von 3A1, das den gewünschten Teil des Toxin-Gens enthält (Promotor, Leader-Sequenz und die Basen 1 bis 177), kann mit dem Insert 1A1 ligiert und in pBluescript subcloniert werden. In diesen beiden Fällen kann die Produktion des rekombinanten Toxins durch pBluescript durch IPTG induzierbar sein. Wenn das rekombinante Toxin nicht in pBluescript exprimiert wird, können andere Expressionsvektoren eingesetzt werden, welche die Produktion von Fusionsproteinen umfassen, z. B. pGEX2T.

[0071] Wie in diesem Beispiel beschrieben, wurden etwa 55% des Toxin-Gens cloniert und sequenziert; jedoch kann die Lambda-ZAP-II-Bank unter Verwendung eines stromabwärts liegenden Teils der bekannten Sequenz als Sonde erneut gescreent werden, um den Rest des Toxin-Gens zu clonieren und zu sequenzieren. Sodann kann die Konstruktion einer Sequenz, die das gesamte Gen codiert, unter Verwendung ähnlicher Verfahren wie vorstehend beschrieben durchgeführt werden, und danach kann das gesamte rekombinante Toxin in E. coli exprimiert werden.

Beispiel 4

Nachweisen des Toxin-Gens von H. pylori durch Polymerasekettenreaktion oder Sonden-Hybridisierung

[0072] Diagnostische Tests auf eine H. pylori-Infektion können entwickelt werden, die auf einer Primer-gesteuerten Amplifikation von Proben basieren. Insbesondere können synthetische Oligonukleotide, ausgewählt aus den in Sequenz Id. Nr. 1 dargestellten Nukleotiden, in einer Polymerasekettenreaktion verwendet werden,

um das H. pylori-Toxin auf nachweisbare Spiegel zu amplifizieren. In diesem Test werden nicht-degenerierte Primersequenzen für die PCR eingesetzt. Diese nicht-degenerierten Primersequenzen sind aus den in Sequenz Id. Nr. 1 dargestellten Nukleinsäuren ausgewählt. Insbesondere können sie umfassen:
5'TTTTTTACAACCGTGATCAT3' Sequenz Id. Nr. 21;
3'CTATTAAAAAATCTTTAGTTATT5' Sequenz Id. Nr. 22.

[0073] Bei Verwendung dieser Primer wird ein 0,5 kb großes Amplifikationsprodukt erzeugt, wie in Beispiel 3 angegeben. Andererseits kann das Toxin-Gen durch Hybridisierung von klinischen Proben mit der radiomarkierten Sequenz Id. Nr. 1 oder einem Teil davon nachgewiesen werden.

Beispiel 5

Verwendung eines spezifischen Antiserums gegen das Toxin zum Nachweisen und Neutralisieren des CB-Antigens

[0074] Antiserum gegen die Proteinuntereinheit mit Mr = 87000 wurde in einem weiblichen White New Zealand-Kaninchen gemäß der früher beschriebenen Vorschrift induziert (Cover, T. L., Dooley, C. P., und Blaser, M. J., (1990), Infect. Immun. 58: 603–610). Anfangs wurde das Kaninchen mit Coomassie-Blue-gefärbten Acrylamidgel-Fragmenten immunisiert, welche die denaturierte Proteinuntereinheit mit Mr = 87000 enthielten. Anschließend wurde das Kaninchen mit der denaturierten Proteinuntereinheit mit Mr = 87000 immunisiert, die in destilliertem Wasser aus ungefärbten SDS-PAGE-Gelen eluiert und durch hydrophobe interaktive Chromatographie wie vorstehend beschrieben eingeengt worden war.

[0075] Präimmun- und Immunserum wurden durch eine Western-Blot-Analyse getestet. Nach der Trennung durch SDS-PAGE wurden die Proteine im Kulturüberstand von H. pylori durch Elektroblotting eine Stunde bei 1 A auf ein Nitrocellulose-Papier übertragen. Nitrocellulose-Streifen wurden mit Seren inkubiert, gewaschen, mit einem an alkalische Phosphatase konjugierten Anti-Mensch-IgG (Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN) oder Anti-Kaninchen-IgG (Tago, Burlingame, CA) inkubiert und entwickelt, wie von Blake et al. beschrieben (Blake, M. S., Johnston, K. H., Russel-Jones, G. I., und Gotschlich, E. C., (1984), Anal. Biochem. 136: 175–179). Antiserum, das gegen die gereinigte Proteinuntereinheit mit Mr = 87000 hervorgebracht worden war, erkannte die Proteinbande mit Mr = 87000 und keine anderen H. pylori-Bestandteile (**Fig. 3**).

[0076] Außerdem wurden Präimmun- und Immun-Kaninchenseren durch ELISA getestet. Der ELISA wurde mit 15 ng gereinigtem CB-Antigen pro Mikrotitervertiefung durchgeführt, wobei das Verfahren wie früher beschrieben erfolgte (Perez-Perez, G. I., Dworkin, B. M., Chodos, J. E., und Blaser, M. J., (1988), Ann. Intern. Med. 109: 465–471, hier durch Bezugnahme eingeschlossen). Peroxidase-konjugiertes Anti-Mensch-IgG (Tago) oder Anti-Kaninchen-IgG (Boehringer Mannheim) wurde als Konjugat eingesetzt. Der Titer des Kaninchenserums wurde als reziproker Wert der höchsten Verdünnung definiert, welche eine optische Dichte von mehr als 0,2 erzeugte. Bei Verwendung dieses Verfahrens war der Titer des Antiserums 1 : 512000, während der des Präimmunserums < 1 : 200 betrug.

Neutralisieren der Aktivität des vakuolisierenden Toxins

[0077] Das in den Neutralisierungstests verwendete Toxinpräparat wurde hergestellt, indem H. pylori 60190 in Brucella-Brühe, die 5% fetales Rinderserum enthielt, 48 Stunden gezüchtet wurde, die Kultur sodann zentrifugiert und der Überstand durch Ultrafiltration eingeengt wurde, wie früher beschrieben (Cover, T. L., Puryear, W., Perez-Perez, G. I., und Blaser, M. J., (1991), Infect. Immun. 59: 1264–1270). Die Seren wurden 30 Minuten bei 56°C erhitzt, in Gewebekulturmedium verdünnt und eine Stunde mit einem gleichen Volumen des eingeengten H. pylori Überstands inkubiert, wie früher beschreiben (Cover, T. L., Cao, P., Murthy, U. K., Sipple, M. S., und Blaser, M. J., (1992), J. Clin. Invest. 90: 913–918). Die neutralisierenden Effekte von Seren auf die Aktivität des vakuolisierenden Toxins wurden quantitativ bestimmt, indem der Neutralrot-Aufnahme-Test verwendet wurde (Cover, T. L., Puryear, W., Perez-Perez, G. I., und Blaser, M. J., (1991), Infect. Immun. 59: 1264–1270). Unter den verwendeten Testbedingungen, bei einer Verdünnung von 1 : 64, neutralisierte das Antiserum vollständig die Aktivität des vakuolisierenden Toxins im Überstand von H. pylori 60190, wohingegen das Präimmunserum keine neutralisierende Aktivität aufwies (**Fig. 4**). Das Antiserum neutralisierte auch vollständig die Toxinaktivität, die in Kulturüberständen von zwei anderen Toxin-produzierenden H. pylori-Stämmen vorlag, dies zeigt, dass die durch verschiedene H. pylori-Isolate produzierten vakuolisierenden Toxine antigen verwandt sind.

Tabelle 4
H. pylori-Isolate aus Menschen, die in dieser Studie verwendet wurden

Stamm	Herkunft	Toxin-Produktion	Reziproker Toxin-Titer [a]
60190	ATCC 49503	+	320
85-456	NTCC 11638	+	40
87-29	Colorado	+	160
87-199	Colorado	+	80
87-81	Colorado	+	40
87-90	Colorado	+	40
86-86	New York	+	80
88-43	Thailand	+	20
Tx30a	Texas	-	<10
87-141	Colorado	-	<10
87-75	Colorado	-	<10
86-385	Colorado	-	<10
86-313	Colorado	-	<10
87-6	Colorado	-	<10
87-225	Colorado	-	<10
87-203	Colorado	-	<10

[a]Der reziproke Toxin-Titer war als die größte Verdünnung definiert, welche eine Neutralrot-Aufnahme der HeLa-Zellen von mehr als 3 SD über dem Wert induzierte, der durch Medium alleine induziert wurde, wie beschrieben (Cover, T. L., Puryear, W., Perez-Perez, G. I., und Blaser, M. J., (1991), Infect. Immun. 59: 1264–1270).

Nachweisen des vakuolisierenden Toxins in Kulturüberständen von H. pylori

[0078] Das nächste Experiment wurde entworfen, um zu bestimmen, ob es einen Zusammenhang zwischen der Aktivität des vakuolisierenden Toxins und dem Vorliegen des CB-Antigens in Kulturüberständen von H. pylori gab. Aus einer Sammlung von eingeengten H. pylori-Kulturüberständen wählten wir Überstände von acht tox^+ und acht tox^- Stämmen aus (Cover, T. L., Dooley, C. P., und Blaser, M. J., (1990), Infect. Immun. 58: 603–610).

[0079] Diese H. pylori-Stämme (Tabelle 4) wurden in Brucella-Brühe gezüchtet, die 5% fetales Rinderserum enthielt, und die Kulturüberstände wurden durch Ultrafiltration eingeengt, wie früher beschrieben (Cover, T. L., Dooley, C. P., und Blaser, M. J., (1990), Infect. Immun. 58: 603–610).

[0080] Um die Aktivität des vakuolisierenden Toxins quantitativ zu bestimmen, wurden Verdünnungen von jedem dieser Überstände anhand des Neutralrot-Tests getestet (Cover, T. L., Puryear, W., Perez-Perez, G. I., und Blaser, M. J., (1991), Infect. Immun. 59: 1264–1270). In einer Verdünnung von mehr als 1 : 20 induzierte jeder der tox^+ Überstände eine mehr als zweifach höhere Netto-Neutralrot-Aufnahme durch die Zellen als das Medium alleine, wohingegen jeder der tox^- Überstände keine signifikante Neutralrot-Aufnahme induzierte, wenn er 1 : 10 verdünnt war. Um das CB-Antigen nachzuweisen, wurden 16 Überstände durch ELISA mit einer Verdünnung von 1 : 10000 des Antiserums gegen die Proteinuntereinheit mit Mr = 87000 getestet (Fig. 5). Die Überstände der tox^+ Stämme erzeugten signifikant höhere optische-Dichte-Werte als Überstände von tox^- Stämmen (0,614 ± 0,105 gegenüber 0,046 ± 0,009, ± < 0,0001). Western-Blotting-Studien bestätigten das Vorliegen der Bande mit Mr = 87000 in jedem der tox^+ Überstände, dies zeigt, dass es sich hierbei um die Form des CB-Antigens unter denaturierten Bedingungen handelt. Das Fehlen einer Überlappung zwischen diesen

zwei Gruppen von Überständen zeigt, dass das CB-Antigen der Hauptbestandteil in H. pylori-Überständen ist, der die vakuolisierende Toxin-Aktivität vermittelt.

Beispiel 6

Nachweisen von Anti-Toxin-Antikörpern in Körperflüssigkeiten von H. pylori-infizierten Menschen

[0081] Frühere Studien haben gezeigt, dass Seren von einigen, jedoch nicht von allen H. pylori-infizierten Personen Toxin-neutralisierende Antikörper enthalten (Leunk, R. D., Ferguson, M. A., Morgan, D. R., Low, D. E., und Simor, A. E., (1990), J. Clin. Microbiol. 28: 1181–1184, Cover, T. L., Cao, P., Murthy, U. K., Sipple, M. S., und Blaser, M. J., (1992), J. Clin. Invest. 90: 913–918). Deshalb untersuchten wir, inwieweit Antikörper gegen das gereinigte CB-Antigenprotein in den Seren von H. pylori-infizierten und von nicht-infizierten Menschen vorherrschten.

[0082] Menschliche Seren wurden von 40 ausgewählten symptomatischen Patienten erhalten, bei denen vorher eine gastroduodenale Endoskopie am Universitätskrankenhaus und am Veterans Administration Medical Center, Syracuse, NY, durchgeführt worden war. Die Analyse der Magenbiopsieproben und die serologische Auswertung dieser Patienten ergaben, dass 20 mit H. pylori infiziert waren und 20 nicht infiziert waren. Die Merkmale dieser Patienten und die Toxin-neutralisierenden Aktivitäten dieser Seren wurden schon früher beschrieben (Cover, T. L., Cao, P., Murthy, U. K., Sipple, M. S., und Blaser, M. J., (1992), J. Clin. Invest. 90: 913–918). Diese 40 Seren wurden mit dem gereinigten CB-Antigen in einem ELISA auf IgG-Reaktivität getestet (**Fig. 6**).

[0083] Der ELISA wurde mit 15 ng des gereinigten CB-Antigens pro Mikrotiter-Vertiefung nach dem Verfahren durchgeführt, wie früher beschrieben (Perez-Perez, G. I., Dworkin, B. M., Chodos, J. E., und Blaser, M. J., (1988), Ann. Intern. Med. 109: 465–471, hier durch Bezugnahme eingeschlossen). Peroxidase-konjugiertes Anti-Mensch-IgG (Tago) oder Anti-Kaninchen-IgG (Boehringer Mannheim) wurde als Konjugat eingesetzt. Die durchschnittliche Erkennung des CB-Antigens durch Seren von H. pylori-infizierten Personen war signifikant stärker als durch Seren von nicht-infizierten Personen ($p = 0{,}0009$). Seren von etwa der Hälfte der H. pylori-infizierten Personen erzeugten optische-Dichte-Werte, die sich mit denen von nicht-infizierten Personen überlappten, wohingegen Seren von den anderen H. pylori-infizierten Personen optische-Dichte-Werte erzeugten, die sich nicht überlappten. Dies legt nahe, dass möglicherweise zwei Populationen vorliegen; und dies stimmt mit der Feststellung überein, dass 50 bis 60% der H. pylori-Stämme in vitro toxigen sind. Danach bestimmten wir, ob ein Zusammenhang zwischen der Erkennung des CB-Antigens durch ELISA und der Toxin-neutralisierenden Aktivität bestand, wie früher im Zellkulturtest bestimmt (Cover, T. L., Cao, P., Murthy, U. K., Sipple, M. S., und Blaser, M. J., (1992), J. Clin. Invest. 90: 913–918). Bei Seren von H. pylori-infizierten Personen war die ELISA-Erkennung des CB-Antigens signifikant mit der Toxin-neutralisierenden Aktivität assoziiert ($p = 0{,}019$, $r = 0{,}518$, durch lineare Regressionsanalyse). Im Gegensatz dazu waren diese Variablen bei Seren von nicht-infizierten Personen nicht signifikant assoziiert ($p = 0{,}973$, $r = 0{,}008$).

Beispiel 7

Herstellen eines oralen Impfstoffs zum Verabreichen an Säuger einschließlich Menschen

[0084] Wir haben die mögliche Verwendung des CB-Proteins zum Entwickeln eines Impfstoffs gegen H. pylori-Infektionen in Erwägung gezogen. Um die Effekte von Magensäure und proteolytischen Enzymen auf das Impfstoffpräparat zu begrenzen, kann das ganze CB-Protein oder ein Teil davon entweder in einer magensaftresistenten Gelatinekapsel verpackt oder zusammen mit Natriumbicarbonat verabreicht werden (Black et al., (1983), „Immunogenicity of Ty21a attenuated Salmonella typhi given with sodium bicarbonate or in eteric-coated capsules", Dev. Biol. Stand. 53: 0). Es sollte beachtet werden, dass das in diesem Impfstoff eingesetzte Antigen auch rekombinant hergestellt werden kann. Die Dosierung für erwachsene Menschen variiert vorzugsweise von 5,0 bis 50,0 mg des Antigens der Erfindung.

[0085] Um die Freisetzung des CB-Proteins an das gastrointestinale Immunsystem zu erhöhen, kann das Protein [oder ein Fragment (Fragmente) des Proteins] ohne chemische Kopplung in biologisch abbaubare Mikrokügelchen eingebaut werden, die eine Größe von 5–10 230 µm aufweisen und die oral eingenommen werden (Eldridge et al., (1989), „Biodegradable microsphere: Vaccine delivery systems for oral immunization", Curr. Top. Microbiol. Immunol. 146: 59). Die Mikrokügelchen bestehen aus Copolymeren aus Glykol- und Milchsäuren, die durch Hydrolyse zu den ursprünglichen Komponenten abgebaut werden. Durch Einstellen des Verhältnisses von Glykol- zu Milchsäuren innerhalb der Copolymeren kann die Rate der Hydrolyse von

mehreren Stunden bis zu mehreren Monaten variiert werden. Somit können sowohl schnell- als auch langsamfreisetzende Mikrokügelchen erzeugt werden. Sodann kann die Verwendung eines Gemisches aus sowohl schnell- als auch langsam-freisetzenden Mikrokügelchen dazu genutzt werden, dass durch eine einzige orale Immunisierung eine primäre und außerdem eine sekundäre Immunantwort induziert werden können.

Beispiel 8

Herstellen eines parenteralen Impfstoffs zum Verabreichen an Säuger einschließlich Menschen

[0086] Obwohl sich oral verabreichte Impfstoffe für gastrointestinale Krankheitserreger bevorzugt eignen, kann für verschiedene andere infektiöse Agenzien ein parenteraler Impfstoff wirksam sein. Eine Komponente des Bacteriums Salmonella typhi, des Verursachers von Typus, wurde gereinigt und als parenteral verabreichter Impfstoff eingesetzt. Diese Komponente, das Vi-Kapsel-Polysaccharid, ist hochwirksam (Klugman, K. P., et al., (1987), „Protective activity of Vi capsular polysaccharide vaccine against typhoid fever", Lancet 2: 165–169). Der Salk-Impfstoff für Polio wird parenteral verabreicht und verhindert die Krankheit Polio, obwohl er nur eine geringe oder keine Wirkung darauf hat, dass eine Infektion mit den Polioviren zustande kommt. Auch zeigen parenterale Impfstoffe beim Verhindern von Cholera eine Wirksamkeit, die jedoch begrenzt ist.

[0087] Ein parenteraler Impfstoff für H. pylori könnte das CB-Protein oder Fragmente davon umfassen. Außerdem könnte ein Toxoid-Präparat hergestellt werden, analog zur Verwendung von Diphtherie- oder Tetanus-Toxoiden. Das Protein (die Proteine) oder das Fragment (die Fragmente) könnte(n) zusammen mit einem Adjuvans oder alleine in einem geeigneten Puffer verabreicht werden. Adjuvantien umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf Muramyldipeptid, Concanavalin A, DEAE-Dextran, mehrwertige Lipid-Kationen oder Kohlenwasserstoffe, z. B. Hexadecan.

[0088] Der H. pylori-Impfstoff könnte an Menschen als 1,0 mg (Bereich 0,5 bis 5,0 mg) des Antigens (CB-Proteins) in 1 ml Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (pH 7,4) verabreicht werden. Bei einem geeigneten Antigen ist möglicherweise nur eine Einzeldosis erforderlich, wobei jedoch auch mehrere Dosen mit oder ohne Adjuvantien möglich sind.

Beispiel 9

Testkits zum Nachweisen von Antikörpern gegen das H. pylori-Toxin und zum Nachweisen des H. pylori-Toxins

[0089] Spezifische Testkits zum Nachweisen von Antikörpern unter Verwendung mehrere verschiedener Nachweistechniken werden konstruiert. Ein Testkit zum Nachweisen von Antikörpern besteht aus einem unterteilten Behälter, der mehrere Vertiefungen enthält, Platten, die vor Verwendung mit dem CB-Protein oder einem antigenen Fragment davon beschichtet werden, und ELISA-Material zum Enzymnachweis, bestehend aus Peroxidase-markiertem Ziegen-Anti-Mensch-IgG, und einem Farbänderungs-Indikator, bestehend aus ABTS in McIlvains Puffer mit 0,005% Wasserstoffperoxid. Es sollte beachtet werden, dass das in einem Test verwendete Antigen auch ein rekombinant hergestelltes Antigen sein kann. Natürlich können auch andere Enzyme und Entwickler eingesetzt werden. Z. B. kann ein mit alkalischer Phosphatase markiertes Ziegen-Anti-Mensch-IgG in Verbindung mit p-Nitrophenylphosphat in Diethanolamin und Magnesiumchloridpuffer verwendet werden.

[0090] Ein zweiter Testkit zum Nachweisen von Antikörpern unter Verwendung der Western-Blot-Technik besteht aus einem Behälter, einer Abdeckung, einem Nitrocellulose-Bogen und einem Polyacrylamid-Plattengel in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat, oberflächenaktiven Mitteln, pH-Modifikatoren, getrockneter Magermilch und Stoffen zum Enzymnachweis, umfassend einen Farbänderungs-Indikator, der aus DAB in Tris mit Wasserstoffperoxid besteht. Dieser Western-Blot-Analysekit enthält außerdem Peroxidase-markiertes Ziegen- oder Kaninchen-Anti-Mensch-Immunglobulin und eine Quelle des CB-Proteins oder eines antigenen Fragments davon.

[0091] Ein weiterer H. pylori-spezifischer Testkit zum Nachweisen von Antikörpern unter Verwendung des indirekten Immunfluoreszenz-Tests kann einen unterteilten Behälter und das CB-Protein oder antigene Fragmente davon als Antigene, menschliches Testserum, Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung und Fluorescein-konjugiertes Ziegen-Anti-Mensch-IgG umfassen.

[0092] Schließlich werden in einem anderen H. pylori-spezifischen Testkit zum Nachweisen von Antikörpern Liposomen eingesetzt, wobei dieser Kit einen Behälter, menschliches Testserum, mit einem fluoreszierenden

Marker (oder Enzym oder Substrat) gefüllte Liposomen mit Antigenen auf ihrer Oberfläche und ein oberflächenaktives Mittel umfasst. In diesem Test kann der Behälter ein mit Ziegen-Anti-Mensch-IgG vorbeschichtetes Röhrchen oder Vertiefung sein.

[0093] H. pylori-spezifische Testkits werden zum Nachweisen des H. pylori-Toxins unter Verwendung mehrerer verschiedener Nachweistechniken konstruiert. Ein Testkit zum Nachweisen des H. pylori-Toxins besteht aus einem unterteilten Behälter, der mehrere Vertiefungen enthält, Platten, die vor Verwendung mit der zu testenden Probe beschichtet werden können, und einem Hyperimmun-Antiserum (oder monoclonalen Antikörpern) gegen das CB-Protein oder antigene Fragmente davon, Anti-Kaninchen-Immunglobulin und geeignetem ELISA-Material, wie schon vorstehend in diesem Beispiel angegeben.

[0094] Ein zweiter Testkit zum Nachweisen des H. pylori-Toxins unter Verwendung der Western-Blot-Technik besteht aus einem Behälter, einer Abdeckung, einem Nitrocellulose-Bogen und einem Polyacrylamid-Plattengel in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat, oberflächenaktiven Mitteln, pH-Modifikatoren, getrockneter Magermilch und Stoffen zum Enzymnachweis, umfassend einen Farbänderungs-Indikator, der aus DAB in Tris mit Wasserstoffperoxid besteht. Dieser Western-Blot-Analysekit enthält außerdem Ziegen-Anti-Kaninchen-Immunglobulin und eine Quelle von Hyperimmmun-Antiserum gegen das CB-Protein oder ein antigenes Fragment davon.

[0095] Ein weiterer H. pylori-spezifischer Testkit zum Nachweisen des Toxins unter Verwendung des Latex-Agglutinations-Tests kann einen unterteilten Behälter, Hyperimmun-Serum gegen das CB-Protein oder ein antigenes Fragment davon, konjugiert an Latex-Perlen, und Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung oder Wasser umfassen.

Beispiel 10

Hemmung der Aktivität des vakuolisierenden Toxins von H. pylori durch Bafilomycin A1

[0096] Die zellulären Vakuolen, die sich als Antwort auf das vakuolisierende Toxin von H. pylori bilden, weisen einen sauren pH-Wert auf (Cover, T. L., Halter, S. A., Blaser, M. J., (1992), „Characterization of HeLa cell vacuoles induced by H. pylori broth culture supernatant", Human Pathol. 23: 1004–1010). Das Aufrechterhalten von pH-Gradienten innerhalb der Kompartimente eukaryotischer Zellen ist typischerweise abhängig von der Aktivität einer Protonen-transportierenden ATPase vom vakuolären Typ (Mellman, I., Fuchs, R., und A. Helenius, (1986), „Acidification of the endocytic and exocytic pathways", Annu. Rev. Biochem. 55: 663–700). Wir stellten die Hypothese auf, dass die vakuoläre ATPase von eukaryotischen Zellen beim Bilden und Aufrechterhalten von H. pylori-Toxin-induzierten Vakuolen wichtig sein könnte. Deshalb testeten wir die Effekte von Inhibitoren der vakuolären ATPase auf die durch H. pylori-Toxin induzierte Vakuolisierung von Zellen.

[0097] HeLa-Zellen wurden mit dem H. pylori-Toxin in Gegenwart von neun verschiedenen Inhibitoren von Ionen-transprotierenden ATPasen inkubiert (Bafilomycin A1, N-Ethylmaleinimid (NEM), 7-Chlor-4-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol (NBD-Chlorid), N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid-Pentachlorphenol-Komplex (DCCD), Natriumnitrat, Ouabain, Digoxin, Natriumorthovanadat, Omeprazol und Oligomycin).

[0098] Insbesondere wurde H. pylori 60190, ein gut charakterisierter Stamm, der das vakuolisierende Toxin produziert, 48 Stunden bei 37°C in Brucella-Brühe, die mit 5% fetalem Rinderserum angereichert war, in einer Atmosphäre mit 5% CO_2 gezüchtet. Nach Zentrifugieren der Kultur wurde der Überstand durch Ultrafiltration 30-fach eingeengt und durch ein 0,2-µm-Filter passiert. Die Überstände wurden bei –70,0°C gelagert, bevor sie in Gewebekulturtests getestet wurden. Gereinigtes Toxin wurde aus H. pylori 60190 wie früher beschrieben hergestellt, jedoch mit der Ausnahme, dass die Gelfiltrations-Chromatographie mit einer SUPEROSE 6 HR 10/50-Säule (Pharmacia) anstelle einer SUPEROSE 12 HR 10/50-Säule (Pharmacia) durchgeführt wurde.

[0099] Die HeLa-Zellen wurden in Eagles modifiziertem essentiellem Minimalmedium mit Earls Salzen, enthaltend 10% fetales Rinderserum und 25 mM HEPES-Puffer (pH 7,2), in einer Atmosphäre mit 5% CO_2 gezüchtet. In Experimenten, die gereinigtes H. pylori-Toxin umfassten, war das Medium mit 10 mM Ammoniumchlorid angereichert, um die Aktivität möglich zu machen. Nach einem einstündigen Vorinkubieren der Zellen mit ATPase-Inhibitoren wurde ein eingeengter Kulturüberstand oder das gereinigte Toxin von H. pylori 60190 zugegeben und die Zellen weitere 18 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Vakuolsierung wurde visuell durch ein umgekehrtes Lichtmikroskop festgestellt oder unter Verwendung eines Neutralrot-Aufnahme-Tests quantitativ bestimmt (Cover et al., (1991), Infect. Immun. 59: 1264–1270). Beim mikroskopischen Test wurde die Hemmung der Aktivität des vakuolisierenden Toxins von H. pylori durch das eindeutige Kriterium definiert, dass Va-

kuolen in weniger als 10% der Zellen sichtbar sind.

[0100] Inhibitoren von ATPasen vorwiegend des vakuolären Typs hemmten die Bildung von Vakuolen als Antwort auf das H. pylori-Toxin und machten die durch das Toxin induzierte Vakuolisierung rückgängig. Von den getesteten Inhibitoren der vakuolären ATPase war Bafilomycin A1 der wirksamste Inhibitor einer Toxin-induzierten Vakuolisierung (minimale Hemmkonzentration = 25 nM). Die Aktivität des vakuolisienden Toxins wurde durch höhere Konzentrationen anderer Inhibitoren der vakuolären ATPase gehemmt, einschließlich N-Ethylmaleinimid, 7-Chlor-4-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol, N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid und Natriumnitrat. Im Gegensatz dazu hemmten Inhibitoren von ATPasen des F_1F_0-Typs oder P-Typs die Toxin-Aktivität nicht (vgl. Tabelle 5).

Tabelle 5: Hemmung der durch H. pylori-Toxin induzierten Vakuolisierung durch ATPase-Inhibitoren

Inhibitor	Minimale Hemmkonzentrat. (MIC) für H. pylori-Toxin[a]	Überwiegend gehemmte ATPase-Klasse	IC_{50} für eukaryotische vakuol. ATPase[b]
Bafilomycin	25 nM	V-Typ	2-10 nM
N-Ethylmaleinimid (NEM)	25 uM	V-Typ	1-13 uM
NBD-Cl[c]	50 uM	V-Typ	2.5 uM
DCCD[d]	25 uM	V-Typ , F_1F_0	5-20 uM
Natriumnitrat	100 mM	V-Typ	30-100 mM
Ouabain	>100 uM	P-Typ	>2000 uM
Vanadat	>100 uM	P-Typ	>100 uM
Omeprazol	200 uM	Magen	≥100 uM
Oligomycin	> 50 uM	F_1F_0	50 uM

a Minimale Konzentration, die zur Hemmung der Vakuolenbildung in >90% von HeLa-Zellen erforderlich ist, die mit einer 1:10-Verdünnung eines konzentr. Überstands von H.pylori-Stamm 60190 inkub. wurden; das dargestellte Ergebnis ist ein Mittelwert aus drei Experimenten.

b Die Konzentration eines Mittels, die für eine halbmaximale Hemmung des vakuol. Protonentransports in zellfreien Systemen erforderl. ist.

c 7-Chlor-4-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol

d N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid

[0101] Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Inhibitoren der ATPase vom vakuolären Typ, z. B. Bafilomycin A1, Inhibitoren einer durch das vakuolisierende Toxin von H. pylori induzierten zellulären Schädigung sind und möglicherweise als Therapeutika zum Behandeln einer mit H. pylori im Zusammenhang stehenden gastroduodenalen Krankheit eingesetzt werden können.

[0102] Obwohl die Erfindung hauptsächlich in Verbindung mit spezifischen und bevorzugten Ausführungsfor-

men beschrieben wurde, ist es so zu verstehen, dass Modifikationen durchgeführt werden können, ohne dass vom Umfang der Erfindung abgewichen wird. Die folgenden Patentansprüche sollen alle Variationen, Anwendungen oder Adaptionen der Erfindung abdecken, wobei im Allgemeinen die Grundlagen davon befolgt werden und solche Abweichungen von der vorliegenden Beschreibung enthalten sind, die in der bekannten und üblichen Praxis des Fachgebiets vorkommen, auf das sich die Erfindung bezieht, oder wie sie für den Fachmann des Fachgebiets ersichtlich sind.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER: Cover, Timothy L.
Blaser, Martin J.

(ii) TITEL DER ERFINDUNG: Gereinigtes vakuolisierendes Toxin aus Helicobacter pylori und Verfahren zu dessen Verwendung

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 22

(iv) KORRESPONDENZADRESSE:

(A) ADRESSAT: Tilton, Fallon, Lungmus & Chestnut

(B) STRASSE: 100 South Wacker Drive, Suite 960

(C) STADT: Chicago

(D) BUNDESSTAAT: Illinois

(E) LAND: USA

(F) POSTLEITZAHL: 60606-4002

(v) COMPUTERLESBARE FORM:

(A) ART DES MEDIUMS: Diskette

(B) COMPUTER: IBM-PC-kompatibel

(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25

(vi) DERZEITIGE ANMELDUNGSDATEN:

(A) ANMELDUNGSNUMMER: US

(B) TAG DER ANMELDUNG:

(C) KLASSIFIZIERUNG:

(viii) ANGABEN ZU ANWALT/VERTRETER:

(A) NAME: Fentress, Susan B.

(B) REGISTRIERUNGSNUMMER: 31,327

(C) REFERENZ/DOCKET-NUMMER: 92104 CIP

(ix) ANGABEN ZU TELEKOMMUNIKATION:

(A) TELEFON: (312)-456-8000

(B) TELEFAX: (312)-456-7776

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) EIGENSCHAFTEN DER SEQUENZ:

(A) LÄNGE: 1412 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: unbekannt

(D) TOPOLOGIE: unbekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO: 1:

GCCTTTTTTA CAACCGTGAT CATTCCAGCC ATTGTTGGGG GCATCGCTAC
AGGCACCGCT 60

GTAGGAACGG TCTCAGGGCT TCTTGGCTGG GGGCTCAAAC AAGCCGAAGA
AGCCAATAAA 120

ACCCCAGATA AACCCGATAA AGTTTGGCGC ATTCAAGCAG GAAAAGGCTT
TAATGAATTC 180

CCTAACAAGG AATACGACTT ATACAAATCC CTTTTATCCA GTAAGATTGA
TGGAGGTTGG 240

GATTGGGGGA ATGCCGCTAC GCATTATTGG ATCAAAGGCG GGCAATGGAA
TAAGCTTGAA 300

GTGGATATGA AAGACGCTGT AGGGACTTAT AAACTCTCAG GGCTAAGGAA
CTTTACTGGT 360

GGGGATTTAG ATGTCAATAT GCAAAAAGCC ACCTTGCGCT TGGGCCAATT
CAATGGCAAT 420

TCTTTCACAA GCTATAAGGA TAGTGCTGAT CGCACCACAA GAGTGGATTT
CAACGCTAAA 480

AATATCTTAA TTGATAATTT TTTAGAAATC AATAATCGTG TGGGTTCTGG
AGCCGGGAGG 540

AAAGCCAGCT CTACGGTTTT GACTTTGCAA GCTTCAGAAG GGATTACTAG
CAGTAAAAAT 600

GCTGAAATTT CTCTTTATGA TGGCGCTACG CTCAATTTGG CTTCAAACAG
CGTTAAATTA 660

AATGGCAATG TGTGGATGGG CCGTTTGCAA TACGTGGGAG CGTATTTGGC
CCCTTCATAC 720

AGCACGATAA ACACTTCAAA AGTGACAGGG GAAGTGAATT TTAACCATCT
CACTGTGGGC 780

GATCACAACG CCGCTCAAGC AGGCATTATC GCTAGTAACA AGACTCATAT
TGGCACACTG 840

GATTTGTGGC AAAGCGCGGG GTTAAATATC ATTGCCCCTC CCGAAGGTGG
CTACAAGGAT 900

AAACCTAATA ATACCCCTTC TCAAAGTGGT GCTAAAAACG ACAAACAAGA
GAGCAGTCAA 960

AATAATAGTA ACACTCAGGT CATTAACCCA CCCAATAGCA CGCAAAAAAC
AGAAGTTCAA 1020

CCCACGCAAG TCATTGATGG GCCTTTTGCG GGTGGCAAAG ACACGGTTGT
CAATATTGAT 1080

CGCATCAACA CTAAAGCCGA TGGCACGATT AAAGTGGGAG GGTTTAAAGC
TTCTCTTACC 1140

ACCAACGCGG CTCATTTGAA TATCGGCAAA GGCGGTGTCA ATCTGTCCAA
TCAAGCGAGC 1200

GGGCGCACCC TTTTAGTGGA AAATCTAACC GGGAATATCA CCGTTGATGG
GCCTTTAAGA 1260

GTGAATAATC AAGTGGGTGG CTATGCTTTG GCAGGATCAA GCGCGAATTT
TGAATTTAAG 1320

GCTGGTGTGG ATACTAAAAA CGGCACAGCC ACTTTCAATA ACGATATTAG
TCTGGGAAGA 1380

TTTGTGAATT TAAAGGTGGA TGCTCATACA GG 1412

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) EIGENSCHAFTEN DER SEQUENZ:

(A) LÄNGE: 23 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: unbekannt

(D) TOPOLOGIE: unbekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO: 2:

Ala Phe Phe Thr Thr Val Ile Ile Pro Ala Ile Val
1 5 10

Gly Gly Ile Ala Thr Gly Thr Ala Val Gly Thr
15 20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) EIGENSCHAFTEN DER SEQUENZ:

(A) LÄNGE: 24 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: unbekannt

(D) TOPOLOGIE: unbekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO: 3:

Ala Phe Phe Thr Thr Val Phe Gly Leu Glu Ala Ile
1 5 10

Val Lys Ile Val Gly Leu Arg Tyr His Tyr Phe Thr
15 20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) EIGENSCHAFTEN DER SEQUENZ:

(A) LÄNGE: 24 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: unbekannt

(D) TOPOLOGIE: unbekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO: 4:

Leu Phe Phe Thr Thr Tyr Ile Ile Ile Ser Phe Leu
1 5 10

Ile Val Val Asn Met Tyr Ile Ala Ile Ile Leu Glu
15 20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) EIGENSCHAFTEN DER SEQUENZ:

(A) LÄNGE: 23 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: unbekannt

(D) TOPOLOGIE: unbekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO: 5:

Ala Phe Phe Ser Thr Asn Cys Val Glu Gly Thr Ala
1 5 10

Val Gly Ile Val Ile Ser Thr Gly Asp Arg Thr
15 20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) EIGENSCHAFTEN DER SEQUENZ:

(A) LÄNGE: 23 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: unbekannt

(D) TOPOLOGIE: unbekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO: 6:

Val Ala Leu Leu Val Cys Leu Ile Pro Thr Thr Ile
1 5 10

Gly Gly Leu Leu Ser Ala Ser Ala Val Ala Gly
15 20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) EIGENSCHAFTEN DER SEQUENZ:

(A) LÄNGE: 23 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: unbekannt

(D) TOPOLOGIE: unbekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO: 7:

Glu Met Ile Met Lys Ser Ile Ile Pro Val Val Met
1 5 10

Ala Gly Ile Ile Ala Ile Tyr Gly Leu Val Val
15 20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) EIGENSCHAFTEN DER SEQUENZ:

(A) LÄNGE: 23 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: unbekannt

(D) TOPOLOGIE: unbekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO: 8:

Ala Phe Leu Leu Ala Val Ile Ile Gly Val Ser Ala
1 5 10

Gly Val Ile Ala Ala Leu Lys Gln Asn Thr Arg
15 20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) EIGENSCHAFTEN DER SEQUENZ:

(A) LÄNGE: 23 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: unbekannt

(D) TOPOLOGIE: unbekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO: 9:

Ala Phe Phe Thr Pro Phe Ile Thr Ser Ala Ile Asn
1 5 10

Phe Tyr Tyr Gly Tyr Val Phe Met Gly Cys Leu
15 20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) EIGENSCHAFTEN DER SEQUENZ:

(A) LÄNGE: 23 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: unbekannt

(D) TOPOLOGIE: unbekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO: 10:

Phe Phe Phe Ala Ser Leu Met Ile Leu Ser Ile Val
1 5 10

Phe Val Phe Phe Leu Ile Pro Glu Thr Lys Gly
15 20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

(i) EIGENSCHAFTEN DER SEQUENZ:

(A) LÄNGE: 23 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: unbekannt

(D) TOPOLOGIE: unbekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO: 11:

Gln Phe Leu Ala Ser Val Gln Thr Met Glu Ile Val
1 5 10

Pro Ser Phe Ala Val Gly Ser Ala Val Gly Leu
15 20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

(i) EIGENSCHAFTEN DER SEQUENZ:

(A) LÄNGE: 23 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: unbekannt

(D) TOPOLOGIE: unbekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO: 12:

```
Ala Phe Phe Ser Thr Met Cys Leu Glu Gly Thr Ala
1               5                  10

Gln Gly Leu Val Val Asn Thr Gly Asp Arg Thr
            15                  20
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

(i) EIGENSCHAFTEN DER SEQUENZ:

(A) LÄNGE: 23 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: unbekannt

(D) TOPOLOGIE: unbekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO: 13:

```
Leu Phe Ser Gly Thr Asn Ile Ala Ala Gly Lys Ala
1               5                  10

Leu Gly Ile Val Ala Thr Thr Gly Val Ser Thr
        15                  20
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

(i) EIGENSCHAFTEN DER SEQUENZ:

(A) LÄNGE: 23 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: unbekannt

(D) TOPOLOGIE: unbekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO: 14:

```
Glu Met Ile Met Lys Ser Ile Ile Pro Val Val Met
1               5                  10

Ala Gly Ile Ile Ala Ile Tyr Gly Leu Val Val
        15                  20
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

(i) EIGENSCHAFTEN DER SEQUENZ:

(A) LÄNGE: 17 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: unbekannt

(D) TOPOLOGIE: unbekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO: 15:

Leu Gly Gln Phe Asn Gly Asn Ser Phe Thr Ser Tyr
1 5 10

Lys Asp Xaa Ala Asp
15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:

(i) EIGENSCHAFTEN DER SEQUENZ:

(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: unbekannt

(D) TOPOLOGIE: unbekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO: 16:

Asn Ile Lys Asn Val Glu Ile Thr Arg
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:

(i) EIGENSCHAFTEN DER SEQUENZ:

(A) LÄNGE: 21 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: unbekannt

(D) TOPOLOGIE: unbekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modifizierte Stelle

(B) POSITION: 3

(C) ANDERE ANGABEN: Anmerkung = „ENTWEDER VALIN ODER ISOLEUCIN KANN HIER VERWENDET WERDEN“

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO: 17:

Thr Arg Val Asp Phe Asn Ala Lys Asn Ile Leu Ile
1 5 10

Asp Asn Phe Leu Glu Ile Asn Asn Arg
15 20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18:

(i) EIGENSCHAFTEN DER SEQUENZ:

(A) LÄNGE: 20 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: unbekannt

(D) TOPOLOGIE: unbekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO: 18:

TTYTTYACNA CNGTNATHAT
20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 19:

(i) EIGENSCHAFTEN DER SEQUENZ:

(A) LÄNGE: 23 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: unbekannt

(D) TOPOLOGIE: unbekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO: 19:

GAYAAYTTYY TNGARATHAA YAA
23

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 20:

(i) EIGENSCHAFTEN DER SEQUENZ:

(A) LÄNGE: 23 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: unbekannt

(D) TOPOLOGIE: unbekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO: 20:

CTRTTRAARR ANCTYTADTT RTT
23

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 21:

(i) EIGENSCHAFTEN DER SEQUENZ:

(A) LÄNGE: 20 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: unbekannt

(D) TOPOLOGIE: unbekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO: 21:

TTTTTTACAA CCGTGATCAT
20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 22:

(i) EIGENSCHAFTEN DER SEQUENZ:

(A) LÄNGE: 23 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: unbekannt

(D) TOPOLOGIE: unbekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO: 22:

TTATTGATTT CTAAAAAATT ATC
23

Patentansprüche

1. Ein gereinigtes Antigen, das spezifisch die Vakuolisierung eukaryotischer Zellen induziert, wobei das Antigen durch ein Molekulargewicht, das größer als 972000 ist (mittels Gelfiltrationschromatographie unter nicht-denaturierenden Bedingungen bestimmt), charakterisiert ist, und wobei das Antigen in denaturierter Form durch ein Molekulargewicht von ungefähr 87000 (mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen bestimmt) charakterisiert ist, und wobei das Antigen einen isoelektrischen Punkt von ungefähr 6,1 aufweist und Fragmente und Analoga davon, die fähig sind, spezifisch die Vakuolisierung eukaryotischer Zellen zu induzieren.

2. Das gereinigte Antigen gemäß Anspruch 1, wobei das Antigen die aminoterminale Sequenz, die in Sequenz ID Nr. 2 gezeigt ist, einschließt.

3. Das gereinigte Antigen gemäß Anspruch 1 oder 2, wobei das Antigen die aminoterminale Sequenz, die in Sequenz ID Nr. 2 gezeigt ist, und eine innere Aminosäuresequenz, ausgewählt aus der Gruppe der Aminosäuresequenzen, die in Sequenz ID Nr. 16 oder 17 gezeigt sind, einschließt.

4. Das gereinigte Antigen gemäß Anspruch 1, das spezifisch die Vakuolisierung eukaryotischer Zellen induziert, wobei das Antigen mehr als 5000-fach reiner als in Kulturbrühe-Überstand vorliegt.

5. Das gereinigte Antigen gemäß Anspruch 1, wobei das Antigen eine Aminosäuresequenz einschließt, die durch eine Nukleotidsequenz nach Sequenz ID NO. 1 kodiert ist.

6. Eine isolierte Nukleinsäure, die für das gereinigte Antigen gemäß Anspruch 1 oder ein Fragment davon kodiert.

7. Ein Antikörper, der spezifisch an H. pylori-Toxin bindet und durch ein Verfahren hergestellt ist, das das Herstellen von Antiserum gegen das gereinigte Antigen gemäß Anspruch 1 und Isolieren des Antikörpers aus dem Antiserum umfasst.

8. Ein Antikörper, der spezifisch an H. pylori-Toxin bindet und durch ein Verfahren hergestellt ist, das das Herstellen von monoklonalen Antikörpern gegen das gereinigte Antigen gemäß Anspruch 1 und Isolieren des Antikörpers umfasst.

9. Ein Impfstoff gegen eine H. pylori-Infektion, wobei der Impfstoff eine Menge des gereinigten Antigens gemäß Anspruch 1 mit einem pharmazeutisch akzeptablen Träger umfasst, die wirksam die Produktion von protektiven Antikörpern gegen eine H. pylori-Infektion induziert.

10. Ein diagnostischer Test-Kit zum Nachweis von einer H. pylori-Infektion, wobei der Test-Kit umfasst:
a) ein immobilisiertes gereinigtes Antigen gemäß Anspruch 1;
b) Mittel, die erlauben, dass Körperflüssigkeiten, die von einem Menschen oder Tier stammen und untersucht werden sollen, das immobilisierte Antigen passieren können; und
c) Mittel, die einen Nachweis von an das immobilisierte Antigen gebundenem Immunoglobulin aus der Flüssigkeit erlauben.

11. Ein diagnostischer Test-Kit zum Nachweis von H. pylori-Toxin in einer menschlichen oder tierischen Probe, wobei der Testkit umfasst:
a) den Antikörper gemäß Anspruch 7, der spezifisch an ein Toxin bindet, das die Vakuolisierung von Zellen induziert;
b) Mittel, die einen Kontakt der Probe mit dem Antikörper erlauben; und
c) Mittel, die einen Nachweis des an den Antikörper gebundenen Toxins aus der Flüssigkeit erlauben.

12. Der Kit gemäß Anspruch 11, wobei die Probe Körperflüssigkeiten, Gewebe, H. pylori-Kulturüberstand oder andere H. pylori-Präparationen sind.

13. Ein diagnostischer Test-Kit zum Nachweis von für H. pylori-Toxin kodierenden Nukleinsäuren in einer Probe, wobei der Test-Kit umfasst:
a) zwei einzelsträngige PCR-Primer-Oligonukleotide, die Teil der Nukleinsäuresequenz gemäß der Sequenz ID NO. 1 sind;
b) Mittel, die es erlauben, die PCR-Reaktion durchzuführen; und
c) Mittel, die den Nachweis von für H. pylori-Toxin kodierenden Nukleinsäuren erlauben.

14. Synthetische Oligonukleotide, die durch die DNA-Sequenzen nach den Sequenz ID Nummern 21 und 22 repräsentiert sind und für den Nachweis von Nukleinsäuren aus H. pylori, die für vakuolisierendes Toxin kodieren, nützlich sind.

15. Ein Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren aus H. pylori, die für vakuolisierendes Toxin kodieren, in einer vom Menschen stammenden Probe durch Primer-vermittelte Amplifikation, wobei die Probe mit zwei Primern amplifiziert wird, die aus zwei einzelsträngigen PCR-Primer-Oligonukleotiden bestehen und Teil der isolierten Nukleinsäure gemäß Anspruch 6 sind, und Hybridisieren einer einzelsträngigen Oligonukleotidsonde mit dem Amplifikationsprodukt auf die Amplifikation folgend und Nachweisen der hybridisierten Sonde.

16. Ein Verfahren zum Nachweis von Anti-Toxin-Antikörpern in einer Körperflüssigkeitprobe, die aus einem Menschen oder Tier stammt, umfassend:
a) Kontaktieren des gereinigten Antigens gemäß Anspruch 1, das an eine Festphase gebunden ist, mit der Probe;
b) Inkubieren der miteinander in Kontakt stehenden Agenzien aus Schritt a), um die Antikörper an das gereinigte Antigen zu binden; und
c) Nachweisen der gebundenen Anti-Toxin-Antikörper.

17. Ein Verfahren zum Nachweis eines Toxins in einer gebundenen Probe, das die Vakuolisierung eukaryotischer Zellen induziert, umfassend:
a) Kontaktieren des Antikörpers gemäß Anspruch 7 mit der gebundenen Probe;

b) Inkubieren der miteinander in Kontakt stehenden Agenzien aus Schritt a), um Antigen-Antikörper-Komplexe zu bilden;
c) Nachweisen der Antigen-Antikörper-Komplexe.

18. Das Verfahren gemäß Anspruch 15, wobei die Probe aus einer Gruppe ausgewählt wird, die aus Körperflüssigkeiten, H. pylori-Kulturüberstand oder anderen H. pylori-Präparationen besteht.

19. Ein Verfahren zum Nachweis einer Infektion, die durch ein Toxin-bildenden H. pylori-Stamm in einem Patienten verursacht ist, umfassend:
a) Kontaktieren des gereinigten Antigens aus Anspruch 1, das an eine Festphase gebunden ist, mit einer Körperflüssigkeitprobe aus dem Patienten;
b) Inkubieren der miteinander in Kontakt stehenden Agenzien aus Schritt a), um die Antikörper an das gebundene Antigen zu binden;
c) Nachweisen der gebundenen Anti-Toxin-Antikörper;
d) Vergleichen der Menge an nachgewiesenem Anti-Toxin-Antikörper mit einem Standard, um eine Infektion, die durch einen Toxin bildenden H. pylori-Stamm verursacht ist, nachzuweisen.

20. Ein Verfahren zum Nachweis von Anti-Toxin-Antikörpern in einem Patienten zur Bestimmung der Empfänglichkeit eines Patienten, Magengeschwüre, Magenkarzinome oder andere klinische Konsequenzen aus eine H. pylori-Infektion zu entwickeln, umfassend:
a) Kontaktieren des gereinigten Antigens gemäß Anspruch 1, das an eine Festphase gebunden ist, mit einer Körperflüssigkeitprobe aus dem Patienten;
b) Inkubieren der miteinander in Kontakt stehenden Agenzien aus Schritt a), um die Antikörper an das Antigen zu binden;
c) Nachweisen der gebundenen Anti-Toxin-Antikörper;
d) Vergleichen der Menge an nachgewiesenem Anti-Toxin-Antikörper mit einem Standard zur Bestimmung der Empfänglichkeit eines Patienten, Magengeschwüre, Magenkarzinome oder andere klinische Konsequenzen aus eine H. pylori-Infektion zu entwickeln.

21. Verwendung des Antigens gemäß irgendeinem der Ansprüche 1 bis 5 zur Herstellung eines Impfstoffs zur Immunisierung von Tieren, einschließlich Menschen, gegen H. pylori.

22. Verwendung gemäß Anspruch 21, wobei der Impfstoff enteral verabreicht wird.

23. Verwendung gemäß Anspruch 21, wobei der Impfstoff parenteral verabreicht wird.

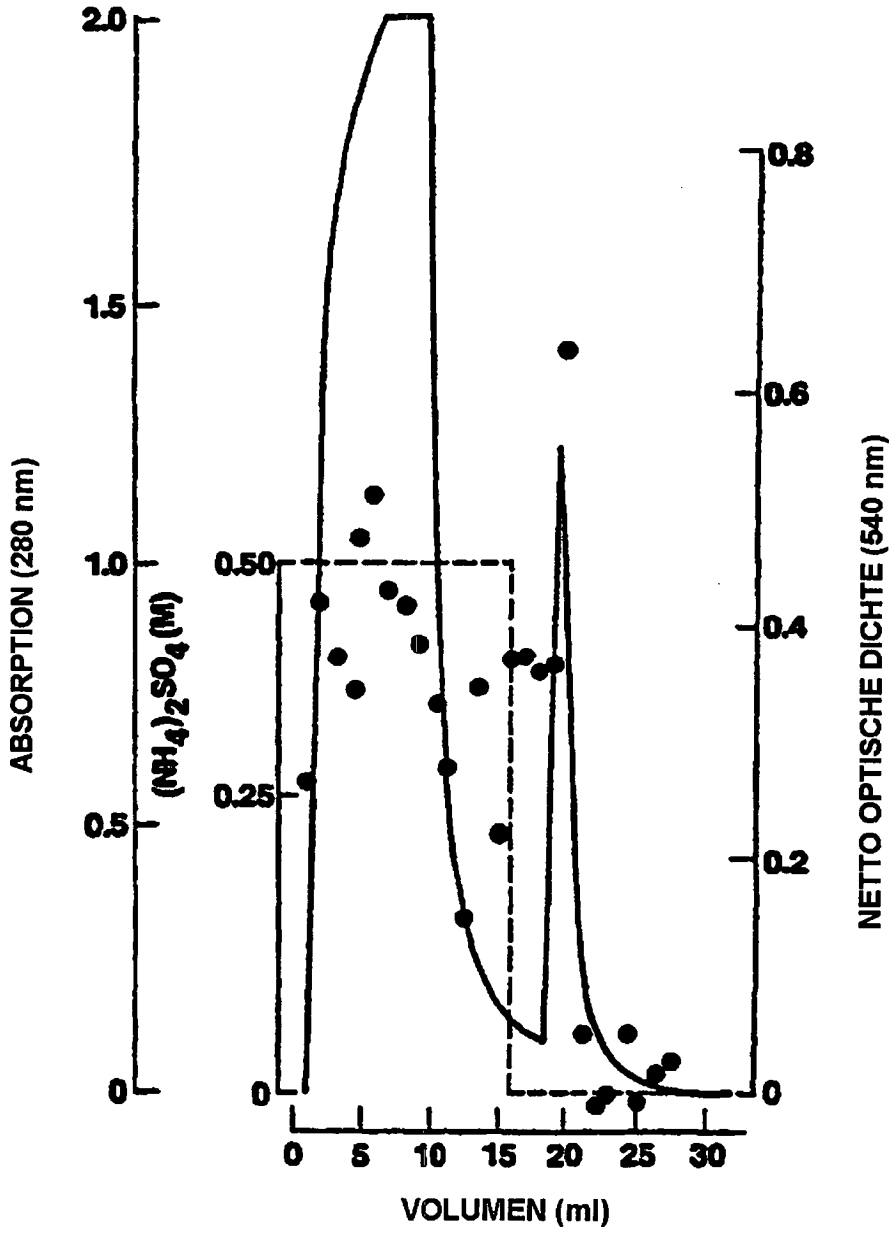
24. Verwendung eines Antikörpers gemäß irgendeinem der Ansprüche 7 oder 8 zur Herstellung eines Medikaments zur Neutralisierung eines Toxins, das die Vakuolisierung von eukaryotischen Zellen induziert.

25. Ein Verfahren zur rekombinanten Herstellung des Antigens gemäß Anspruch 1 oder Fragmenten davon, durch Expression der gesamten oder von Teilen der DNA nach Sequenz ID NO. 1 in einem geeigneten Expressionssystem.

Es folgen 8 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Fig. 1A



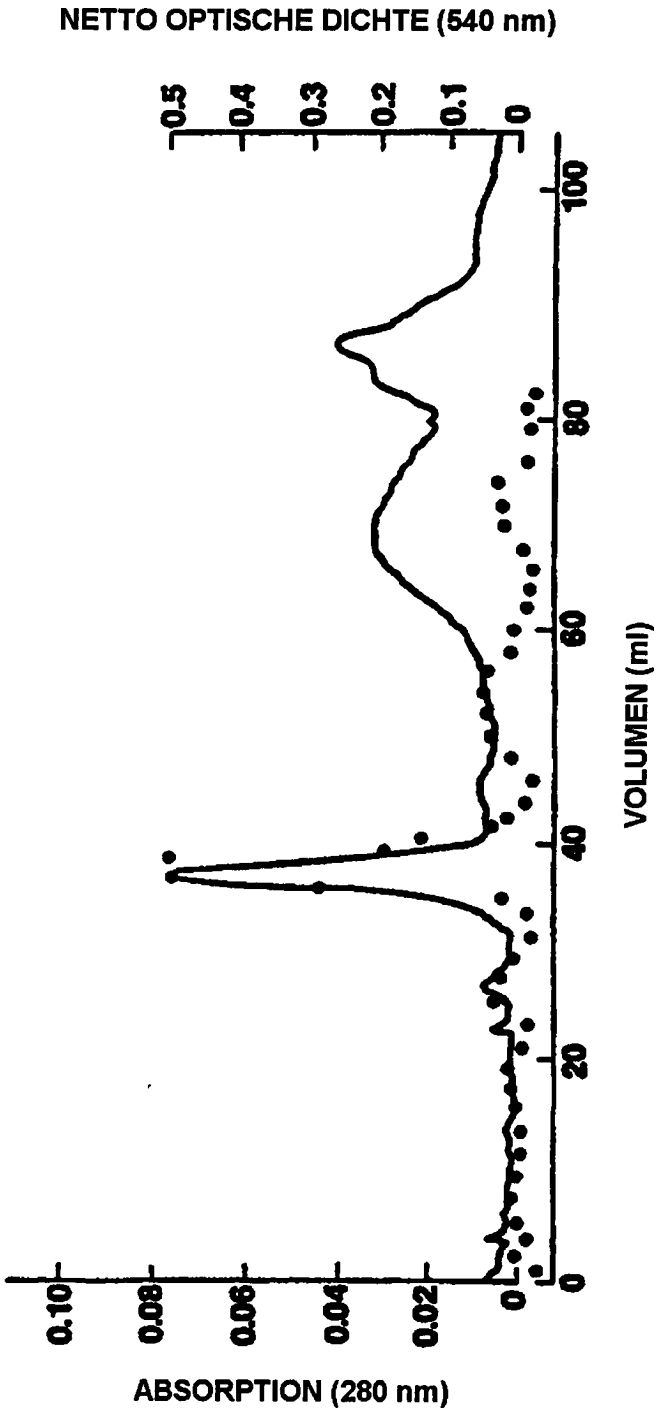

NETTO OPTISCHE DICHTE (540 nm)
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
100
80
60
40
20
0
VOLUMEN (ml)
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0
ABSORPTION (280 nm)

Fig. 1B

Fig. 1C

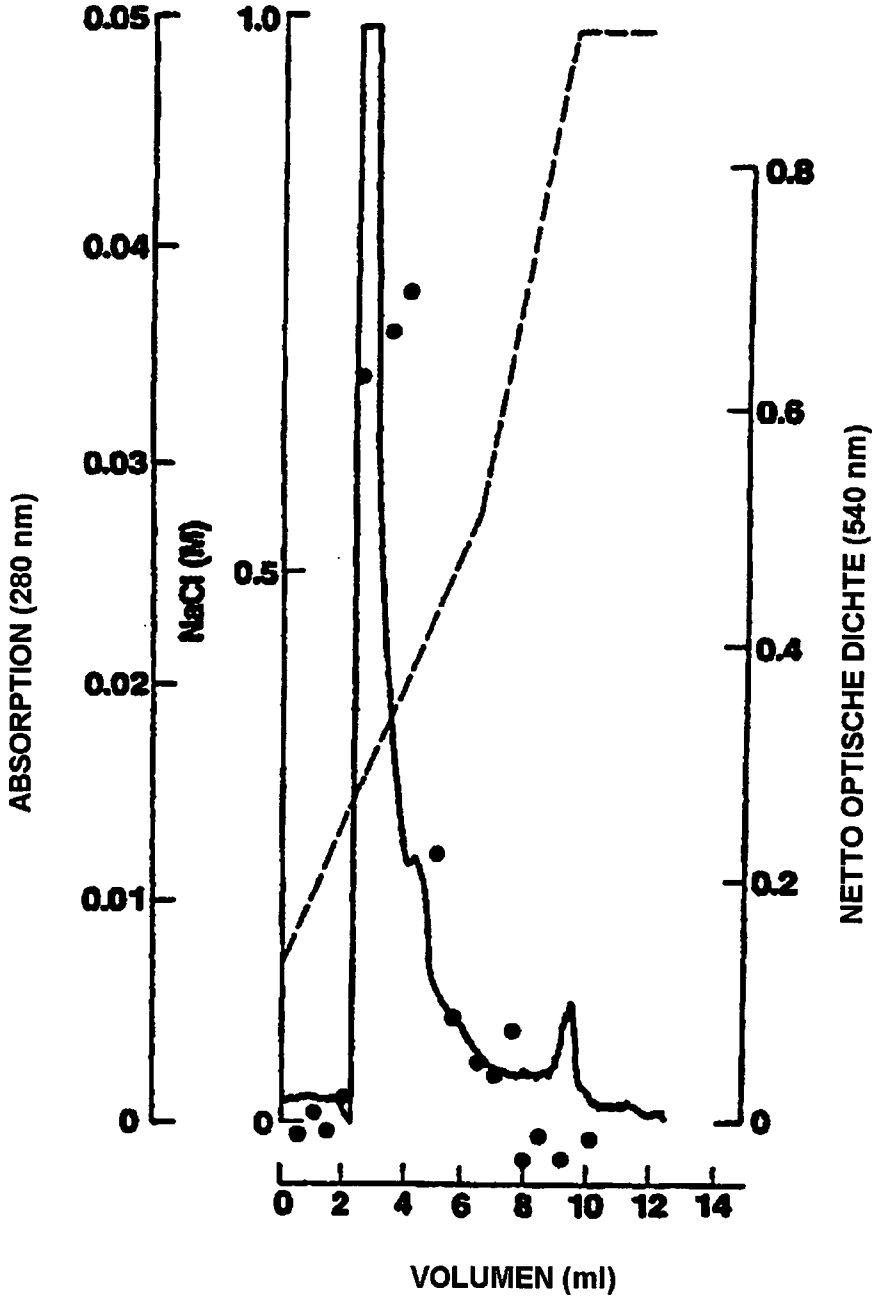

ABSORPTION (280 nm)
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0
NaCl (M)
1.0
0.5
0
NETTO OPTISCHE DICHTE (540 nm)
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0 2 4 6 8 10 12 14
VOLUMEN (ml)

FIG. 2

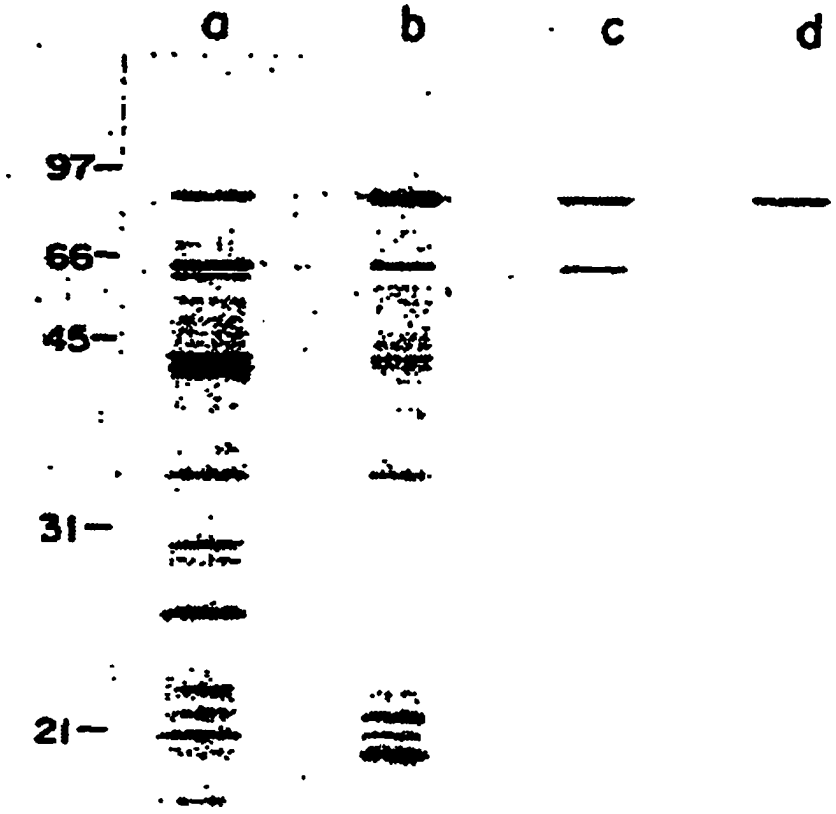


FIG. 3

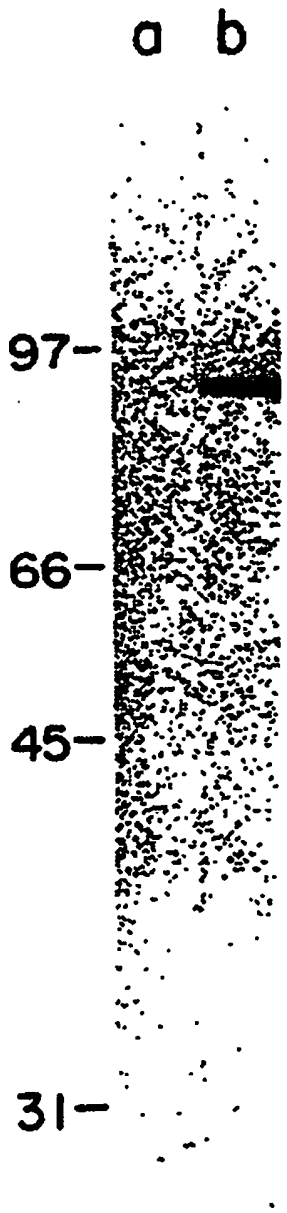


Fig. 4

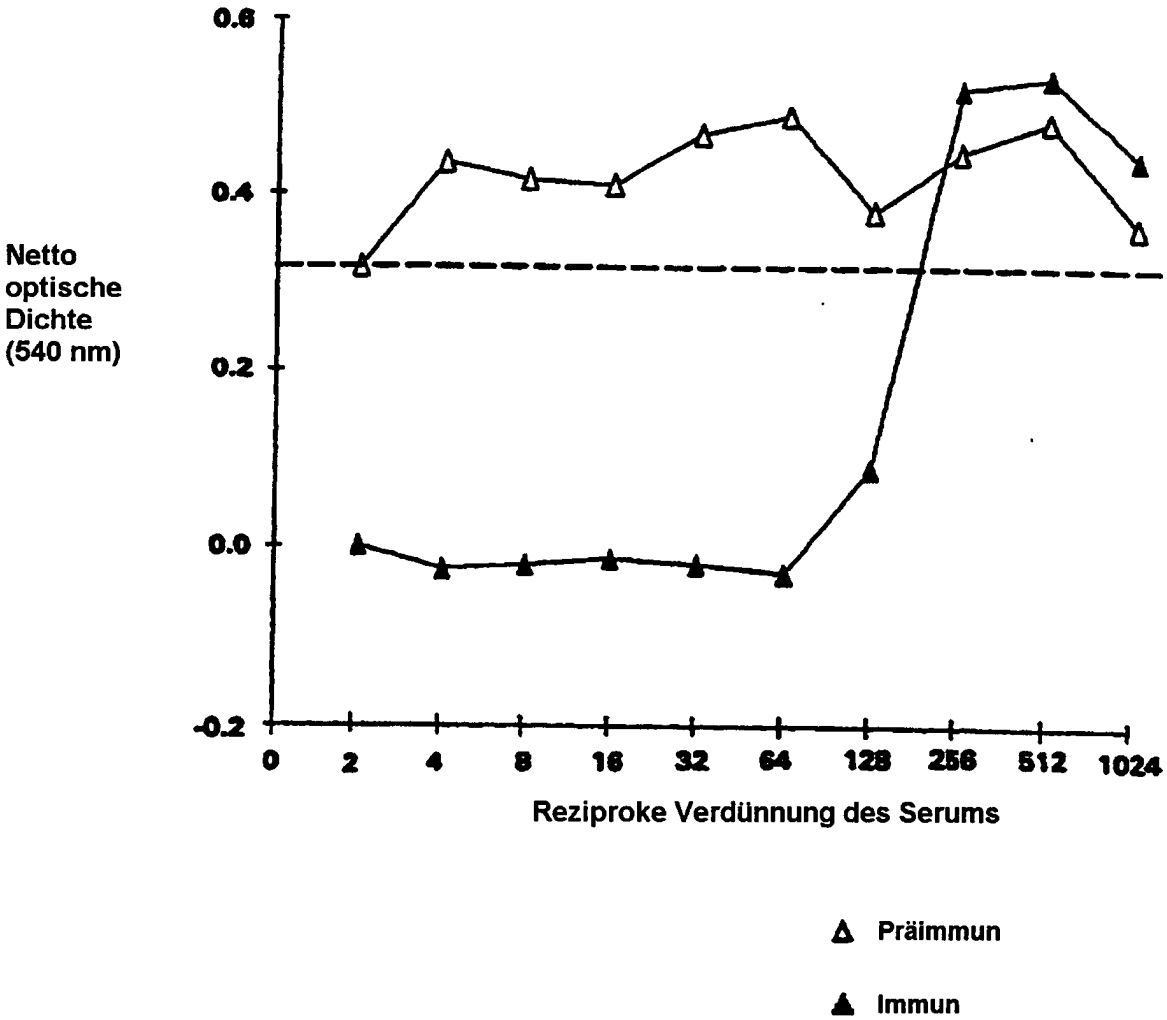

0.6
0.4
0.2
0.0
-0.2
Netto optische Dichte (540 nm)
0
2
4
8
16
32
64
128
256
512
1024
Reziproke Verdünnung des Serums
Präimmun
Immun

Fig. 5

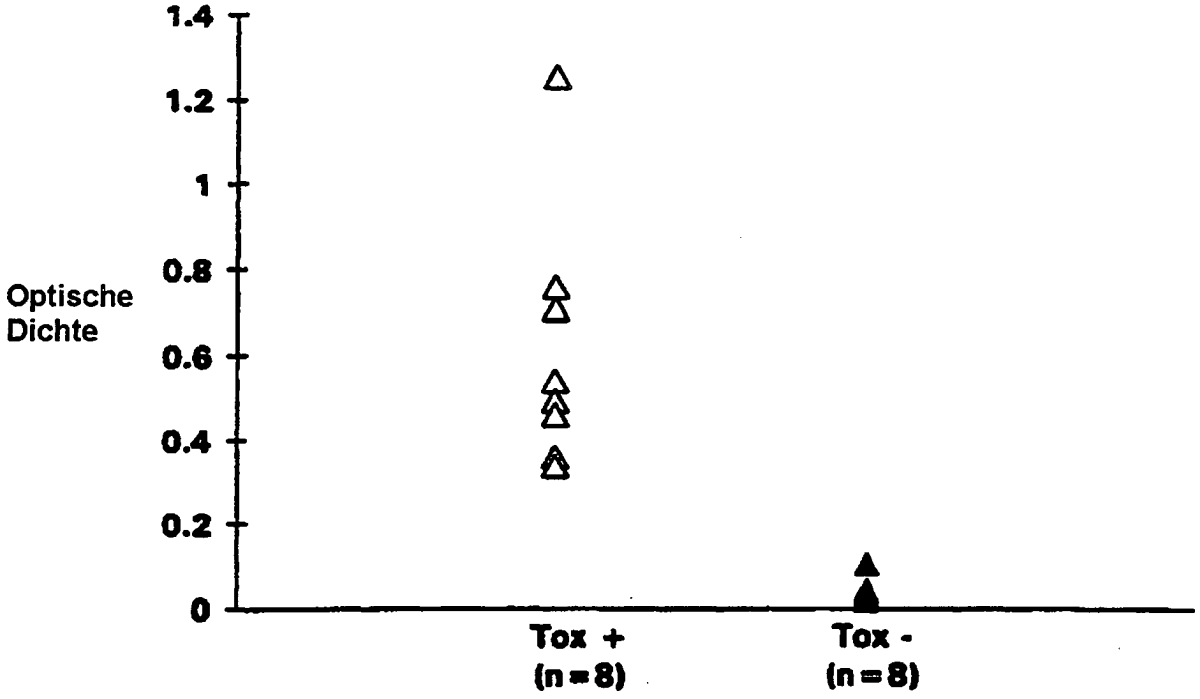
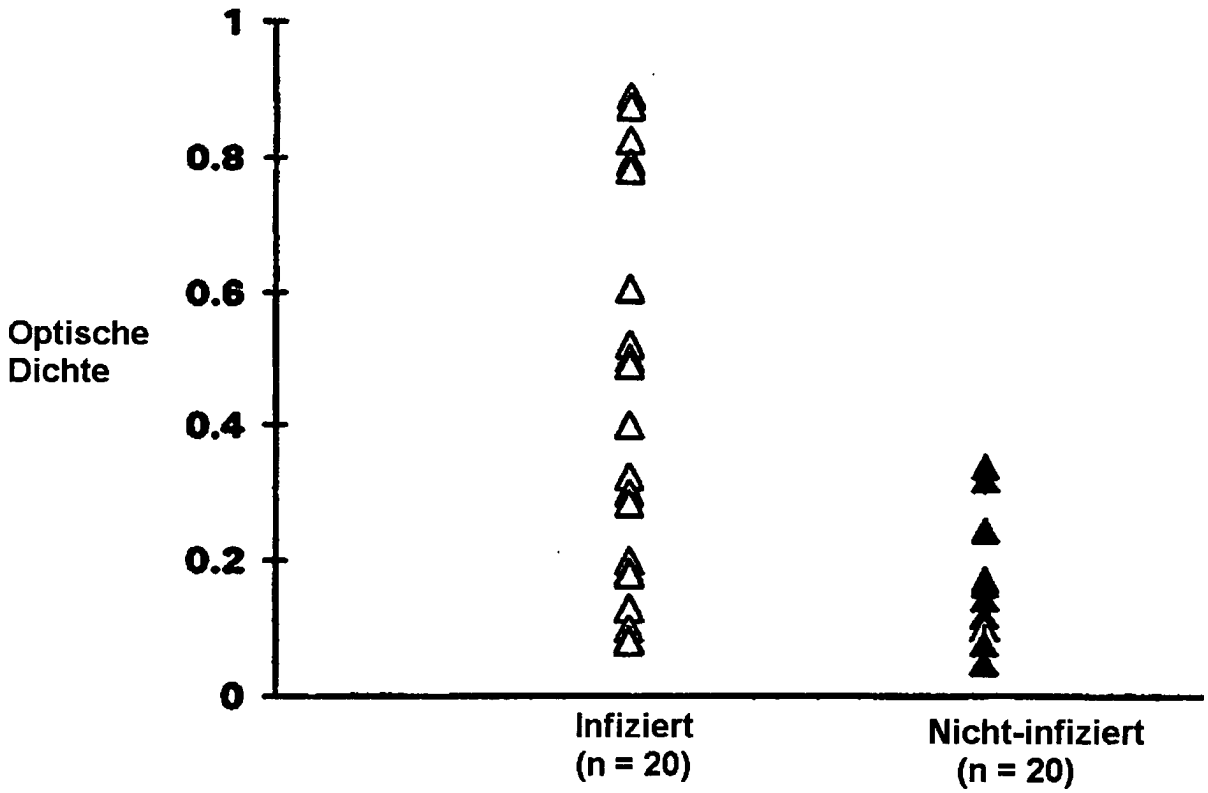


Fig. 6


1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Optische Dichte
Infiziert (n = 20)
Nicht-infiziert (n = 20)