

(51) Classificação Internacional:

C12N 15/31 (2006.01) **C07K 14/205** (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01) **C12N 15/70** (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01) **A61K 47/42** (2006.01)
A61K 33/00 (2006.01) **A61K 38/16** (2006.01)
A61K 39/106 (2006.01) **A61K 39/40** (2006.01)
C07K 16/12 (2006.01)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **1997.01.03**

(30) Prioridade(s): **1996.01.04 IE 960004**
1996.01.12 IE 960019

(43) Data de publicação do pedido: **1999.04.21**

(45) Data e BPI da concessão: **2007.02.28**
007/2007

(73) Titular(es):

**THE PROVOST FELLOWS AND SCHOLARS OF
THE COLLEGE OF THE HOLY AND UNDIVIDED
TRINITY OF QUEEN ELIZABETH NEAR DUBLIN
COLLEGE GREEN DUBLIN 2 IE**

(72) Inventor(es):

WILLIAM BYRNE IE
DERMOT KELLEHER IE
HENRY WINDLE IE
ROSS MCMANUS IE

(74) Mandatário:

**FRANCISCO NOVAES CUNHA BRITO SOTO MAIOR DE
ATAYDE**
AV. DUQUE D'AVILA, N.º 32, 1º ANDAR 1000-141 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **"BACTERIOFERRITINA DE HELICOBACTER PILORI"**

(57) Resumo:

DESCRIÇÃO

EPÍGRAFE:	"BACTERIOFERRITINA DE <i>HELICOBACTER PYLORI</i>"
-----------	--

Campo da Invenção

Esta invenção refere-se a uma proteína de 18-19 kDa ou derivado ou fragmento da mesma, obtido a partir de *Helicobacter pylori*, uma bacterioferritina definida pelas sequências existentes nos Pedidos de Patente anteriores da requerente PCT IE95/00036 e PCT IE95/00037, uma forma recombinante desta proteína, métodos para utilizar esta proteína como uma vacina para fornecer protecção imunológica contra a infecção por *H. pylori* e métodos para utilizar esta proteína nos ensaios de diagnóstico relativos a *H. pylori*.

Antecedentes da Invenção

O *Helicobacter pylori* é um organismo largamente prevalente encontrado na biopsia gástrica em, aproximadamente, 30% da população com idade inferior a 40 anos com incidência crescente com a faixa etária. O organismo é um agente causador das gastrites crónicas em seres humanos (e.g. Marshall & Warren, 1984*; Blaser, 1990*). Os estudos epidemiológicos demonstraram que a *H. pylori* é principalmente encontrada associada à gastrite. Investigações serológicas demonstraram que essa evidência pode ser encontrada numa infecção corrente ou anterior em 30-50% numa população escolhida ao acaso de dadores de sangue. Não se provou conclusivamente haver uma relação de causa directa com a patologia de úlcera duodenal. Contudo, o organismo foi encontrado em 95% dos pacientes com úlcera duodenal. Além disso, a erradicação do organismo

resulta na rápida cura da úlcera (por exemplo, Rauws & Tygat, 1990*). Estes dados fornecem forte evidência que a H. pylori é um factor dominante no desenvolvimento da úlcera duodenal. Foi fornecida uma prova adicional do envolvimento patogénico do H. pylori nestas condições, através de estudos com porquinhos gnotobióticos (Lambert et al., 1987*) e o cumprimento dos postulados de Koch com voluntários humanos (Marshall et al., 1985*; Morris & Nicholson, 1987*).

Além disso, existe agora uma forte prova circunstancial implicando H. pylori na patogénese do carcinoma gástrico (e.g. Jiang et al., 1987*; Lambert et al., 1986*; Crabtree et al., 1992; 1993; Forman et al., 1990, 1991; Nomura et al., 1991; Parsonnet et al., 1991; Correa et al., 1990). Mais recentemente, o Eurogast Study Group, orientado por Forman (1993), demonstrou uma relação significativa entre a seropositividade do H. pylori e a incidência e mortalidade por cancro gástrico. De facto existe actualmente uma grande parte da literatura implicando a infecção com H. pylori numa proporção considerável de morbilidade gastrointestinal superior. Foram sugeridas várias hipóteses para os mecanismos patogénicos de doença gastroduodenal induzidos por H. pylori, incluindo a produção de citotoxinas e disrupção mecânica do epitélio (e.g. Blaser, 1992*). Interessantemente, contudo, muitas pessoas infectadas mostram-se assintomáticas apesar da presença persistente do patógeno (Taylor & Blaser, 1991*).

O diagnóstico das infecções com H. pylori baseia-se principalmente na histologia e cultura de amostras de biopsia gástrica e nos métodos indirectos baseados na actividade da urease. Vários ensaios serológicos têm sido desenvolvidos para a detecção de anticorpos anti-H.pylori em estudos epidemiológicos além de tentativas moleculares mais orientadas tais como a clonagem de antígenos específicos da espécie de H. pylori, para uso, por exemplo, em investigações serológicas

baseadas em PCR (e.g. Clayton e tal., 1989). Contudo, o uso de antígenos específicos para a espécie recombinante ainda não foi largamente usado e, conseqüentemente, a maioria dos ensaios baseados em imunoadsorventes, correntemente em uso, utilizam várias fracções sub-celulares de H. pylori, como uma fonte de antígeno. As fracções de proteínas usadas nestes ensaios são frequentemente heterogêneas na sua composição, como o são os seus métodos de preparação. Interessantemente vários grupos compararam a sensibilidade inter-ensaio e a especificidade de vários kits ELISA comercialmente disponíveis, fabricados especificamente para estudos serológicos. Não surpreendentemente, foi observada uma variação inter-ensaio considerável. Contudo, deve ter-se cuidado antes de utilizar uma preparação particular de proteína para uso em tais ensaios imunoadsorventes, particularmente com vista da heterogeneidade genética significativa de diferentes estirpes de H. pylori (por exemplo, Xia et al., 1994; Owen et al., 1991).

A Patente WO93/18150 descreve a proteína citotóxica (CT) da Helicobacter pylori. Os antígenos imunodominantes associados com a citotoxina (CAI) e a proteína de choque ao calor (hsp60), para uso como candidatos de vacinas contra o Helicobacter pylori.

Os Requerentes estudaram a imuno-reatividade à H. pylori tanto em indivíduos infectados e não infectados, e descobriram que os indivíduos não infectados têm uma elevada resposta a H. pylori quer em células B como em sistemas celulares T. Nesta tentativa, utilizaram o Western Blotting para investigar a especificidade do antígeno de respostas sistémicas a H. pylori tanto em indivíduos infectados por H. pylori, como nos saudáveis, e mostram que a incidência de seropositividade em indivíduos H. pylori negativos é muito maior do a que foi previamente demonstrada. Além disso, demonstraram que os

anticorpos para uma proteína de 25 kDa são detectáveis na maioria dos indivíduos H. pylori. Estes foram detectados utilizando uma técnica que modificaram denominada *Enhanced Chemiluminescence* (Quimioluminescência Aumentada). A *Enhanced Chemiluminescence* (Quimioluminescência Aumentada). A *Enhanced Chemiluminescence* (Quimioluminescência Aumentada) na análise por Western Blot revela que a maioria dos indivíduos não infectados têm anticorpos que são específicos para o H. pylori e reconhecem antígenos que não estão presentes em outros microrganismos. Desses antígenos, o mais comumente reconhecido é a proteína de 18-19 kDa que parece ser específica para a H. pylori. Consequentemente, estes dados sugerem que a imunização com a proteína de 18-19 kDa ou uma sub-unidade da mesma, pode ter o potencial para conferir a imunidade protectora em indivíduos que não estão infectados com o organismo ou indivíduos nos quais o organismo foi eliminado por tratamento anti-bacteriano. Fizemos derivar sequências N-terminal e de aminoácidos internas desta proteína.

Constatações da Invenção

A invenção está definida nas Reivindicações.

A vacina produzida por um processo da invenção pode incluir um transportador farmacêuticamente aceitável.

A vacina pode ser combinada com um adjuvante adequado, tal como interleucina 12 ou uma proteína de choque ao calor, ou ambas.

A vacina pode incluir pelo menos um outro produto farmacêutico tal como um antibiótico e/ou um agente anti-bacteriano, tal como sais de bismuto. Tipicamente, o antibiótico é seleccionado de entre um ou mais de metronidazol, amoxicilina, tetraciclina, eritromicina, claritromicina ou tinidazol.

A vacina pode existir sob a forma de administração oral, intranasal, intravenosa ou intramuscular.

A vacina pode incluir um sistema de libertação de péptidos.

Descrição Detalhada da Invenção

Os requerentes criaram uma informação de sequência de DNA identificando a proteína de 18-19 kDa, tal como bacterioferritina. Também geraram uma proteína de 18 kDa e expressaram esta E. coli. Descobriu-se que esta proteína recombinante foi reconhecida imunologicamente por antisoros de indivíduos positivos quanto aos anticorpos da bacterioferritina de 18 kDa de Helicobacter. Esta proteína recombinante formará a base de uma vacina putativa para o H. pylori. A Figura 1 representa a análise por Western Blot da proteína recombinante de 18 kDa. Expressa em E. coli.

Método Utilizado

Clonagem e expressão do gene de 18 kDa de *Helicobacter pylori*.

O ácido desoxirribonucleico (DNA) foi extraído do *Helicobacter pylori* como descrito por silhavy et al.* (1984).

Foram gerados oligonucleótidos (ou "primers") específicos para os terminais 5' e 3', do gene de 18 kDa. O oligonucleótido 5' dianteiro (designado HP 18CF) foi modificado para incorporar um local de restrição da endonuclease *Nde 1*. Foram feitas modificações adicionais para aumentar a estabilidade da ligação do oligonucleótido à sua sequência alvo, e para evitar a estrutura secundária intramolecular. A sequência do oligonucleótido HP18CF é (de 5' até 3'):

GAAGGACTTCATATGAAGACATTTG (Id Sequência N°. 1)

O inverso do oligonucleótido 3' (designado por HP18CR) foi extensivamente modificado para incorporar um local de restrição da endonuclease *Bam*H1, na cauda 5'. Os 15 nucleótidos 3' deste nucleótido correspondem à sequência do gene do *Helicobacter pylori* de 18 kDa. A sequência do oligonucleótido HP18CR é (de 5' até 3'):

CGTGAATGGATCCTCATGCTGACTTCT (Id Sequência N°. 2)

Estes nucleótidos foram usados numa reacção de cadeia de polimerase (PCR) para amplificar a sequência do gene do *Helicobacter pylori* de 18 kDa. As condições de reacção são como se seguem: Entre 50 e 100 ng de DNA de *Helicobacter pylori* foram adicionados a 75 pmol de cada primer, 0,4 mM de cada desoxirribonucleico trifosfatado (dNTP), uma concentração final de 4 mM de MgSO₄, uma vez com "ThermoPol" (New England Biolabs) tampão de reacção (composição: KCl 10 mM, (NH₄)₂SO₄ 10 mM, Triton X-100 a 0,1%), e foi adicionada água desionizada para elevar o volume de reacção para 50µl. A mistura de reacção foi revestida com 50 µl de óleo de parafina e colocada num termociclo Perki-Elmer a 90°C. Foi então adicionada 1 unidade de DNA polimerase Vent_R (New England's Biolabs). Foi utilizado um procedimento de "touchdown" de PCR (impacto de PCR) (Don et al. 1989)*. As condições dos ciclos foram como se segue: o DNA foi desnaturado a 94°C durante 2,5 minutos. Este foi seguido por 2 ciclos de 94° durante 30 segundos (passo de desnaturação), 65°C durante 50 segundos (passo de hibridação), e 72°C durante 20 segundos (passo de extensão). Isto foi seguido por 2 ciclos nas mesmas condições, com a excepção de que a temperatura de hibridação desceu para 64°C. Depois de 2 ciclos a 64°C, a temperatura de hibridação foi reduzida para 63°C durante mais 2 ciclos, e este padrão foi seguido até que a temperatura de hibridação foi reduzida para 60°C durante 28 ciclos.

Os produtos de reacção foram purificados em gel de agarose com um ponto de fusão baixo, a 4% (NuSieve GTG; FMC BioProducts). O fragmento de DNA foi excisado a partir do gel e a agarose foi digerida utilizando β -Agarase 1 (New England Biolabs) e o DNA recuperado utilizando a precipitação com isopropanol, de acordo com o protocolo fornecido pelos fabricantes.

O fragmento de DNA purificado correspondente ao gene de codificação da proteína de 18 kDa foi então digerido com as enzimas de restrição *Nde* 1 e *Bam*H1, (Boeringher Mannheim), cada um dos quais ocorre apenas uma vez no fragmento amplificado. As 10 unidades de cada enzima foram adicionadas a, aproximadamente, 3 μ g de DNA numa concentração final do tampão B de restrição fornecido pelos fabricantes, num volume de reacção de 40 μ l. A mistura de reacção foi incubada a 37°C durante 3,5 horas.

O vector de expressão utilizado foi o pET16b (Novagen). Os 1,6 μ g do vector foram digeridos utilizando Nde1 e BamH1 sob as mesmas condições que as descritas para o fragmento amplificado. Os grupos fosfato 5' resultantes foram removidos utilizando fosfatase alcalina intestinal de vitela (CIAP: New England Biolabs), de acordo com as instruções dos fabricantes. A enzima foi inactivada por incubação da mistura de reacção na presença de EDTA 5mM a 65°C durante 1 hora, seguido por uma extracção fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1), seguida por uma extracção clorofórmio/álcool isoamílico (24:1).

Tanto o fragmento digerido como o vector foram purificados em gel de agarose de ponto de fusão reduzido a 3% (NuSieve GTG; FMC BioProducts), e a agarose foi digerida utilizando β -Agarase 1 (New England Biolabs), de acordo com as instruções dos fabricantes. Os fragmentos de DNA foram deixados na mistura de reacção resultante sem purificação adicional.

O fragmento adicional foi então ligado ao vector de DNA como se segue. Aproximadamente 200 ng do vector foram ligados a aproximadamente 100 ng da inserção de DNA no tampão de reacção de ligação 1x, e 3 unidades da ligase de DNA T4 (Boeringher Manheim) num volume de reacção de 30 µl a 20°C durante 16 horas.

Os produtos desta reacção foram usados para transformar as células *E. coli* XL 1-blue competentes (Bullock et al. 1987) utilizando um processo de transformação padrão CaCl₂ (Sambrook, e tal., 1989). As células transformada XL-1-blue foram seleccionadas num meio LB (Sambrook et al., 1989), suplementado com 50 µg por ml de ampicilina e desenvolvido a 37°C. As colónias adequadas foram colhidas e utilizadas para inocular 10 ml de soro LB suplementado com 50 µg por ml de ampicilina e desenvolvidas com agitação a 37°C. Os plasmídeos foram purificados a partir destas culturas utilizando um processo de preparação de plasmídeo com lise alcalina padrão (Sambrook et al., 1989), e uma alíquota digerida com *Nde* I e *Hind*III, de acordo com as instruções dos fabricantes (Boeringher Manheim), para verificar a presença da inserção quando comparada com um tamanho padrão e pET16b sem uma inserção.

Dois plasmídeos que mostraram ter a inserção apropriada (designada por pET16b-18.1 e pET16b-18.2) foram então utilizados para transformar os hospedeiros de expressão BL21DE3 (Studier and Moffat, 1986) e NovablueDE3 (Novagen) de *E.coli* utilizando um processo de transformação standard CaCl₂ (Sambrook et al., 1989*) suplementado com 50 µg por ml de ampicilina e 34 µg por ml de cloramfenicol (BL21de3) e desenvolvidos a 37°C. As células transformadas foram seleccionadas por plaqueamento num meio LB. Uma colónia de cada hospedeiro representando cada isolado de plasmídeo foi recolhida depois de 16 horas de incubação e usada para

inocular 50 ml de meio LB suplementado com antibióticos, como acima descrito, e desenvolvidos até que a densidade óptica a 600 nm fosse de, aproximadamente, 0,6. A expressão da proteína de 18 kDa, a partir do vector de expressão, foi então induzida pela adição de isopropil b-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) a uma concentração final de 1 mM e a incubação continuou durante mais um período de 2,5 horas a 37°C com agitação. As células foram então colhidas por centrifugação a 4000 x g durante 10 minutos e ressuspensas em 12 ml de 50 mM de Tris-Cl (pH 8.0 a 25°C) seguido por uma centrifugação adicional a 4000 x g durante 10 minutos.

Sequenciação da Sequência de DNA purificada

O fragmento de DNA purificado, correspondente à proteína de 18 kDa, foi sequenciado utilizando os primers de sequenciação universal frente e traseiro. O DNA foi sequenciado nas orientações frente e traseira. A sequenciação foi realizada utilizando um sequenciador automatizado ABI e um kit de sequenciação de terminais terminadores da cadeia de didesoxi fluorescentes baseados em PCR, Genpak.

A sequência das bases entre os terminais do primer PCR é:

GATCGTGTTATTTATGAAAGTGCAT

AACTTCCATTGGAATGTGAAAG

GCACCGATTTTTTCAAT

Esta sequência de bases é listada na Sequência Id N°.3.

Análise por Western Blot do produto clonado (proteína de 18 kDa).

Dois hospedeiros transformados de expressão de *E. coli* (BL21DE3 e Novablue DE3) foram sujeitos a SDS-PAGE (12,5% T), seguido por análise de Western Blotting. As Western Blot foram sondadas com soro obtido a partir de crianças não

infectadas com H. pylori e desenvolvidas por quimioluminiscência aumentada. Como ilustrado na Figura 1, dois dos três soros reconheceram a proteína recombinante de 18 kDa depois da indução da expressão da proteína com IPTG. Além disso, os três soros reconheceram várias proteínas de *E. coli*.

Deve compreender-se que o material proteico recombinante da aplicação é utilizado como uma vacina contra a infecção com H. Pylori, e, em particular, como imunogénico terapêutico para a erradicação da infecção com H. pylori.

A vacina pode incluir o material proteico do Pedido em combinação com os outros componentes, tal como um transportador farmacologicamente aceitável, um adjuvante adequado tal como a interleucina 12, ou uma proteína de choque ao calor, um antibiótico e/ou um agente antibacteriano tal como sais de bismuto. A vacina pode ser administrada de várias formas, nomeadamente oral, intranasal, intravenosa ou intramuscularmente.

A invenção não está limitada às modalidades descritas acima que podem variar nos seus detalhes.

REFERÊNCIAS

Marshall, B.J. and Warren, J.R. (1984). Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration, *Lancet* 1, 1311-1314.

Blaser M.J. (1990). *Helicobacter pylori* and the pathogenesis of gastroduodenal inflammation. *J. Infect. Dis.* 161, 626-633.

Rauws, E.A.J and Tytgat, G.N.J (1990). *Eradication of Helicobacter pylori* cures duodenal ulcer: *Lancet* 1, 1233-1235.

Lambert, J.R., Borromeo, M., Pinkard, K.J., Turner, H., Chapman, C.B., and Smith, M.L. (1987). Colonisation of gnotobiotic pigs with *Campylobacter pylori* - an animal model? *J. Infect. Dis.* 155, 1344.

Marshall, B.J. Amstrong, J.A. McGeachie, D.B., and Glancy, R.J. (1985). Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*. *Med. J. Aust.* 142, 436-439.

Morris, A. and Nicholson, G. (1987). Ingestion of *Campylobacter pylori* causes gastritis and raises fasting gastric pH *Am. J. Gastroenterol.* 82, 192-199.

Jiang, S.J., Liu, W.Z. Zhang, D.Z., Shi, Y., Xiao, S.D., Zhang, Z.N., and Liu, D.Y. (1987). *Campylobacter*-like organisms in chronic gastritis, peptic ulcer and gastric carcinoma. *Scand. J. Gastroenterol.* 22, 553-558.

Lambert, J.R., Dunn, K.A., Eaves, E.R., Korman, M.G., and Hansky, J. (1986). *Campylobacter pyloridis* in diseases of the human upper gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 90, 1509.

Crabtree, J.E., Figura, N., Taylor, J.D., Bugnoli, M., Armellini, D., and Tompkins, D.S. (1992). Expression of 120 kDa protein and cytotoxicity in *Helicobacter pylori* *J. Clin. Pathol.* 45, 733-734.

Crabtree, J.E., Wyatt, J.I., Sobala, G.M., Miller, G., Tompkins, D.S., Primrose, J.N., and Morgan, A.G. (1993). Systemic and mucosal humoral responses to *Helicobacter pylori* in gastric cancer. *Gut* 34, 1339-1243.

Forman, D., Sitas, F., and Newell, D.G. (1990). Geographic association of *Helicobacter pylori* antibody prevalence and gastric cancer mortality in rural china, *Int. J. Cancer* 46, 608-611.

Forman, D., Newell, D.G., Fullerton, F., Yarnell, J.W.G., Stacey, A.R., Wald, N., and sitas, F. (1991). Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation. *BMJ* 302, 1302-1305.

Nomura, A., Stemmermann, G.N., Chyou, P-H., Perez-Perez, G.I., and Blaser, M.J. (1991). *Helicobacter pylori* infection

and gastric carcinoma amongst Japanese Americans in Hawaii, *N.Engl.J.Med.* 325, 1132-1136.

Parsonnet, J., Friedman, G.D., Vandersteen, D.P., Chang, Y., Vogelman, J.H., Orentreich, N., and Sibley, R.K. (1991). *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N.Engl.J.Med.* 325, 1127-1131.

Forman, D. (1993). An international association between *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. The EUROGAST Study Group. *Lancet* 341, 1359-1362.

Blaser, M.J. (1992). Hypothesis of the pathogenesis and natural history of *Helicobacter pylori*-induced inflammation. *Gastroenterology* 102, 720-727.

Taylor, D.N. and Blaser, M.J. (1991). Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Epidemiol. Rev.* 13, 42-59.

Bullock, W.O., Fernandez, J.M. and Short, J.M. 1987. A high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Bio Techniques* 5:376.

Don, R.H., Cox, P.T., Wainwright, B.J., Baker, K. and Mattick, J.S: 1989. "Touchdown" PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.* 19:4008.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Second edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press.

Silhavy, T.J., Berman, M.L. and Enquist, L.W. 1984. Experiments with gene fusions. Cold Spring Harbour Laboratory Press.

Studier, F.W. and Moffat, B.A. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes, *J. Mol. Biol.* 189:113.

APÊNDICE

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

(1) INFORMAÇÃO GERAL

(I) REQUERENTE

- (A) NOME: RICAN LIMITED
- (B) RUA: 1 STOKES PLACE,
- (C) CIDADE: DUBLIN 2
- (D) PAÍS: IRLANDA
- (E) CÓDIGO POSTAL:
- (F) TELEFONE: 353-1-2881230
- (G) TELEFAX: 353-1-2883439

(II) TÍTULO DA INVENÇÃO: A Protein

(III) NÚMERO DE SEQUÊNCIAS: 3

(IV)

- (A) TIPO DE AMBIENTE: DISQUETE
- (B) COMPUTADOR: IBM PC COMPATÍVEL
- (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: FILE ASCII

(V) DADOS DO PEDIDO ACTUAL:

PEDIDO N°.:

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ. ID. N°. 1

(I) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA

- (A) COMPRIMENTO: 25 ÁCIDOS NUCLEICOS
- (B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO
- (C) TOPOLOGIA: LINEAR
- (D) CADEIA: SIMPLES

(II) TIPO DE MOLÉCULA: OLIGONUCLEÓTIDO

(XI) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. NO. 1

GAAGGACTTC ATATGAAGAC ATTTG

(3) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID N°.2:

(I) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA

- (A) COMPRIMENTO: 27 ÁCIDOS NUCLEICOS

(B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO
(C) TOPOLOGIA: LINEAR
(D) CADEIA: SIMPLES
(II) TIPO DE MOLÉCULA: OLIGONUCLEÓTIDO
(XI) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. N°. 2
CGTGAATGGA TCCTCATTGCT GACTTCT

(4) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID. N°. 3:

(I) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA
(A) COMPRIMENTO: 64 ÁCIDOS NUCLEICOS
(B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO
(C) TOPOLOGIA: LINEAR
(D) CADEIA: SIMPLES

(II) TIPO DE MOLÉCULA: DNA GENÓMICO

(III) FONTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: HELICOBACTER PYLORI

(XI) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. N°. 3

GATCGTGTTA TTTATGAAAG TGCATAACTT
CCATTGGAAT GTGAAGGCA CCGATTTTTT
CAAT

Lisboa, 24 de Maio de 2007

REIVINDICAÇÕES

1- Um processo para a produção de uma vacina para o tratamento da profilaxia das doenças associadas à infecção por *Helicobacter pylori*, o referido processo incluindo uma proteína recombinante de *Helicobacter pylori* ou um fragmento da mesma, caracterizado por o referido processo compreender o passo de expressão da referida proteína recombinante de *Helicobacter pylori* a partir de um vector compreendendo uma sequência recombinante de ácido nucleico, codificando toda a proteína ou parte da proteína de *Helicobacter pylori* na qual é detectada a imunoreactividade em indivíduos *Helicobacter pylori* negativos, compreendendo a seguinte sequência de nucleótidos:

5'-GATCGTGTTATTTATGAAAGTGCATAACTTCCATTGGAATGTG
AAAGGCACCGATTTTTTCAAT-3'

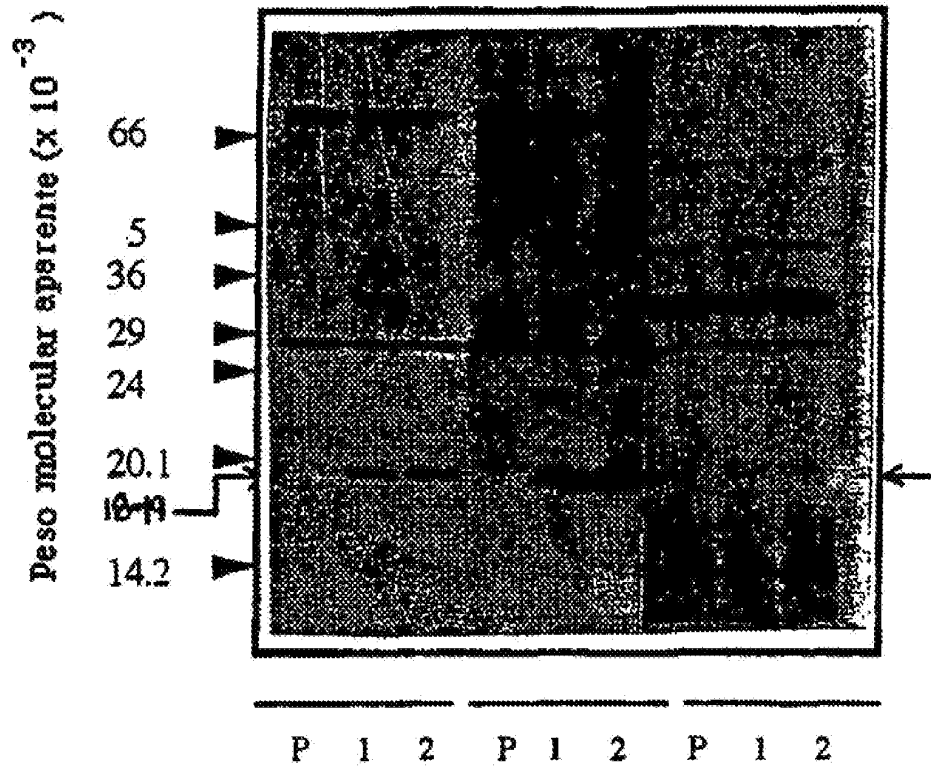
2- O processo, de acordo com a reivindicação N°.1, caracterizado por a vacina incluir um transportador farmacêuticamente aceitável.

3- O processo, de acordo com a reivindicação N°.1 ou N°.2, caracterizado por a vacina se encontrar em combinação com um adjuvante farmacêuticamente aceitável, preferivelmente interleucina 12 ou uma proteína de choque térmico.

4- O processo, de acordo com as reivindicações N°.1 ou N°.3, caracterizado por a vacina incluir, pelo menos, outro produto farmacêutico, sendo o produto farmacêutico, pelo menos, um antibiótico, sendo o antibiótico seleccionado de um ou mais de entre metronidazol, amoxicilina, tetraciclina ou eritromicina, claritromicina ou tinidazol, alternativamente ou adicionalmente, incluindo o produto farmacêutico um agente antibacteriano tal como sais de bismuto.

5- O processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações N°.1 a N°.4, caracterizado por a vacina incluir um sistema de libertação de péptido.

Lisboa, 24 de Maio de 2007



Hospedeiro de Expressão: Novablue DE3 BL21(DE3) Novablue (DE3)

P = Pré-indução com IPTG
 1 = isolado 1 pós-indução
 2 = isolado 2 pós-indução