



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETÀ INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

UIBM

DOMANDA NUMERO	101995900451301
Data Deposito	29/06/1995
Data Pubblicazione	29/12/1996

Priorità	9413050.7
Nazione Priorità	GB
Data Deposito Priorità	

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
G	01	N		
Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	12	Q		

Titolo

METODO PER LA DIAGNOSI DI INFEZIONI HELYCOBACTER PYLORI E RELATIVO CORREDO DIAGNOSTICO.

Descrizione dell'invenzione industriale dal titolo:

"Vaccino/composizione terapeutica di Helicobacter pylori,
loro preparazione ed impiego"

di: RECKITT & COLMAN PRODUCTS LIMITED, nazionalità
britannica, One Burlington Lane, Londra W4 2RW, Gran
Bretagna.

Inventori designati: Peter William DETTMAR; Andrew William
SMITH.

Depositata il : 29 GIU. 1995 79 95600543

VACCINI/COMPOSIZIONI TERAPEUTICHE DI HELICOBACTER PYLORI.

La presente invenzione si riferisca a
vaccini/composizioni terapeutiche di Helicobacter pylori
(H.pylori) e, in particolare a vaccini/composizioni
terapeutiche contro l'infezione da H. pylori comprendenti la
proteina di H. pylori emagglutinina/proteasi (HAP) o un suo
frammento.

H. pylori (in precedenza Campylobacter pyloridis o C.
pyloridis) è un patogeno gastrico umano Gram negativo
spiraliforme. H. pylori è ben documentato nella sua
associazione con la patologia dell'ulcera gastrica e
duodenale, così come del tumore gastrico. Il microrganismo è
stato descritto come il più comune agente infettivo cronico
dell'uomo.

Un numero di diversi determinanti posseduti da H. pylori
sono stati proposti come possibili fattori patogenici del

JACOBACCI & PERANI S.p.A.

microorganismo, inclusi le proteine ureasi, emagglutinina e proteine di shock termico, così come suoi flagelli e citotossine. Tuttavia, i ruoli precisi di questi determinanti nella patogenicità del microorganismo e quindi la loro utilità nella prevenzione e/o nel trattamento dell'infezione da H. pylori sono ancora da risolvere.

Abbiamo sorprendentemente trovato che il genoma di H. pylori include un gene e che è quasi identico al gene per la zinco metalloproteasi di Vibrio cholerae (noto come gene emagglutinina/proteasi (hap)). Il gene hap di H. pylori che abbiamo identificato è risultato essere simile per più del 99% al gene hap di V. cholerae. In V. cholerae, è stato trovato che il gene hap è importante nell'attacco e nel distacco del microorganismo durante l'infezione del colera.

L'enzima codificato dal gene hap di H. pylori è stato identificato come enzima zinco metalloproteasi secreto solubile. Gli enzimi zinco metalloproteasi sono ben noti come importanti marcatori di patogenicità in batteri che provocano malattie nei mammiferi. Inoltre e in maniera importante, questa proteina è stata collegata alla patogenicità del microorganismo con l'identificazione che pazienti affetti da infezione da H. pylori hanno elevati titoli anticorpali contro la proteina HAP di H. pylori.

Gli enzimi zinco metalloproteasi sono noti per avere un rapido turn over di substrato e ampi spettri di substrato. Riviste sullo stato dell'arte sono quelle di Frausto da Sila

J.J.R. e Williams R.J.P. in *The Biological Chemistry of the Elements*, 1993, Clarendon Press, Oxford, Capitolo 11 e di Vallee B. L. e Auld D.S., *Biochemistry*, 29, 5647-5659.

L'enzima zinco metalloproteasi di Pseudomonas aeruginosa (noto anche come enzima elastasi) è risultato essere importante nei processi distruttivi del tessuto polmonare provocati da questo organismo nei pazienti affetti da fibrosi cistica (Bever R.A. e Iglewsky B.H., *J. Bacteriol.*, 1988, 170:4309-4314). Analogamente, l'enzima zinco metalloproteasi di Vibrio cholerae (V. cholerae) (anche noto come enzima mucinasi o enzima emagglutinina/proteasi (hap)) è risultato essere importante nell'attacco e nel distacco di questi organismi durante la malattia del colera. Riferimenti bibliografici sullo stato dell'arte includono : Hase C.C. e Finkelstein R.A., *J. Bacteriol.* 1991, 173:3311-3317 e Finkelstein R. A. *et al.*, *Infect. Immunol.*, 1992, 60:472-478.

Le caratteristiche precedenti e l'importanza nota dell'enzima HAP di V. cholerae nella sua patogenicità nell'uomo rendono la proteina HAP di H. pylori un soggetto altamente appropriato per un peptide o proteina vaccino/composizione terapeutica contro l'infezione da H. pylori.

Analogamente, la presente invenzione fornisce un vaccino/composizione terapeutica comprendente la proteina HAP di H. pylori o un suo frammento, in cui la proteina HAP di

Helicobacter pylori include la sequenza amminoacidica come mostrato nella Figura 1 delle figure di accompagnamento.

Con il termine "proteina" si intende l'intera o sostanzialmente l'intera proteina HAP di H. pylori.

Con il termine "frammento" si intende una qualsiasi porzione di proteina di H. pylori che determina una risposta anticorpale in un paziente.

Deve essere compreso che i termini "proteina" e "frammento" come utilizzati nella presente invenzione includono una qualsiasi proteina o un qualsiasi frammento proteico, rispettivamente, con una sequenza amminoacidica corrispondente alla sequenza amminoacidica naturalmente presente o a un suo derivato. Il termine "derivato" include una qualsiasi proteina, polipeptide o peptide con variazioni amminoacidiche dalla sequenza amminoacidica naturalmente presente, ma che mostra la stessa funzionalità della sequenza amminoacidica naturalmente presente e/o determina una risposta immunitaria protettiva negli esseri umani. Tali derivati includono spesso sostituzioni amminoacidiche conservative che avvengono in un gruppo di amminoacidi.

La proteina HAP di H. pylori o un suo frammento nel vaccino/composizione terapeutica può essere una sequenza amminoacidica naturalmente presente sostanzialmente purificata o una sequenza amminoacidica sintetica. Un vantaggio dei vaccini sintetici/composizioni terapeutiche è che essi possono essere preparati privi di qualsiasi agente

competitivo e di qualsiasi contaminante e prodotto parzialmente dannoso. Preferibilmente la proteina HAP di H. pylori o un suo frammento è una proteina, polipeptide o peptide ricombinante. La tecnologia del DNA e delle proteine ricombinanti è ora in grado di fornire una proteina e prodotti polipeptidici di elevate quantità e qualità.

Solo alcune regioni di proteine e polipetidi costituiscono siti antigenici che determinano una risposta anticorpale nel paziente. E' perciò vantaggioso che il vaccino/composizione terapeutica comprendano uno o più frammenti di proteina HAP di H. pylori che corrispondono a siti antigenici identificati della proteina HAP di H. pylori. Siti antigenici noti della proteina HAP di H. pylori includono la regione di legame con lo zinco e il sito attivo della proteasi. Queste regioni funzionali sono state identificate mediante cristallografia a raggi X in zinco metalloproteasi purificate, simili nella sequenza amminoacidica alla proteina HAP di H. pylori, ad esempio l'elastasi di P. aeruginosa descritta da Valle B.L. e Auld D.S., (1990) in Zinc Coordination, Function and Structure of Zinc Enzymes and Other Proteins, Biochemistry 29:5647-5659.

Il vaccino/composizione terapeutica secondo l'invenzione può comprendere due o più componenti selezionati dalla proteina HAP di H. pylori o suoi frammenti. Ad esempio il vaccino può comprendere due frammenti della proteina HAP di

H. pylori, quali la regione di legame con lo zinco della proteina HAP di H. pylori e il sito attivo di proteasi.

Il vaccino/composizione terapeutica è preferibilmente formulato per comprendere la proteina HAP selezionata di H. pylori o suoi frammenti insieme ad un veicolante farmacologicamente accettabile. Tale veicolante include una qualsiasi sostanza che non induce essa stessa la produzione di anticorpi dannosi all'individuo che riceve il vaccino/composizione terapeutica. Veicolanti appropriati sono tipicamente grandi molecole lentamente metabolizzate, quali proteine, polisaccaridi, acidi polilattici, acidi poliglicolici, copolimeri di amminoacidi, aggregati lipidici (quali goccioline di olio o liposomi) e particelle virali inattive. Inoltre questi veicolanti possono funzionare come agenti immunostimolanti o adiuvanti. Inoltre l'antigene può essere collegato ad un adiuvante toxoide batterico, quale il toxoide di difterite, tetano, colera o H. pylori.

Adiuvanti preferiti per aumentare l'efficacia del vaccino/composizione terapeutica includono: sali di alluminio (alum), quali idrossido di alluminio, fosfato di alluminio, o solfato di alluminio; formulazioni emulsioni di olio in acqua (con o senza altri agenti immunostimolanti specifici quali muramil peptidi o componenti cellulari batterici), ad es. MF59, SAF e RibiTM; adiuvante completo di Freund (CFA), adiuvante incompleto di Freund (IFA); citochine, quali interleuchine; fattori stimolanti la colonia di macrofagi (M-

CSF); fattori di necrosi tumorale (NTF); e altre sostanze che agiscono come agenti immunostimolanti per aumentare l'efficacia della composizione. L'adiuvante noto preferito è alum.

Il vaccino/composizione terapeutica può anche comprendere uno o più antigeni addizionali derivati da una fonte alternativa. Tali antigeni possono comprendere altre proteine di H.pylori o loro frammenti, ad esempio la proteina immunodominante associata ad immunotossina (CAI), proteine da shock termico (HSP), o proteine ureasi. Altri antigeni appropriati includono le subunità A e/o B della tossina di V. cholerae.

La presente invenzione comprende inoltre un vaccino composizione terapeutica come qui prima descritto per la prevenzione o il trattamento di infezione di H. pylori. E' fornito anche l'impiego della proteina HAP di H. pylori o suo frammento nella preparazione di un vaccino/composizione terapeutica per il trattamento di infezione da H. pylori.

La presente invenzione sarà ora descritta in maggiore dettaglio con riferimento al disegno di accompagnamento Fig. 1 che mostra la sequenza nucleotidica e la corrispondente sequenza amminoacidica del frammento clonato del gene hap di H. pylori che mostra circa 1 kb di sequenza codificante e circa 500 bp di sequenza 3' adiacente. La numerazione è dalla prima base di adenosina dal sito EcoRI. Una delezione di tre basi in fase (denominata delta H) dal gene hap di V. cholerae

alla sua posizione 222 e la regione identica al gene hap di V. cholerae si estende dalla posizione 1 oltre la regione codificante (sottolineata in doppio) eccetto una singola aggiunta alla posizione 798 e una singola delezione (di una T) alla posizione 843. Il codone STO è indicato con ***.

Con l'identificazione della sequenza di acidi nucleici di hap di H. pylori sono state identificate due regioni come comprendenti regioni codificanti per il componente del sito attivo della proteina. Le due regioni sono intorno agli acidi nucleici 16-18 (inclusi), codificanti per un residuo di tirosina e agli acidi nucleici numerati 220-222 (inclusi), codificanti per un residuo di istidina.

La regione intorno agli acidi nucleici numerati 43-45 (inclusi) codificante per un residuo di acido glutammico è stata identificata come potenziale regione codificante per il legame con lo zinco.

La sequenza amminoacidica mostrata nella Fig. 1 o un suo qualsiasi frammento possono essere costruite con un qualsiasi procedimento di sintesi polipeptidica noto in letteratura. L'incorporazione della sequenza nucleotidica in un vettore di espressione noto quale lambda gt11 o Bluescript in condizioni appropriate risulterà nella proteina HAP o in un suo frammento di H. pylori ricombinante.

Il vaccino/composizione terapeutica secondo la presente invenzione contiene tipicamente diluenti quali acqua, soluzione salina, glicerolo o etanolo. Inoltre possono essere

presenti nel vaccino/composizione terapeutica sostanze ausiliarie, quali agenti umettanti o emulsionanti, sostanze tamponanti il pH e simili.

Il vaccino/composizione terapeutica può essere preparato in forma iniettabile, sia come soluzione liquida o sospensione o in forma solida che può anche essere idonea per la preparazione di una soluzione per iniezione. Il vaccino/composizione terapeutica può anche essere emulsionato o incapsulato in liposomi per un effetto adiuvante aumentato.

La somministrazione del vaccino/composizione terapeutica può essere profilattica o terapeutica e può comprendere un procedimento di trattamento del paziente.

Il vaccino/composizione terapeutica dell'invenzione è somministrato in quantità sufficiente a determinare una risposta protettiva nell'ospite. Questa quantità dipende da, tra altri fattori, le dimensioni e la salute del paziente, la capacità del sistema immunitario del paziente di fornire una risposta immunitaria, il livello e la velocità di protezione desiderata e la formulazione del vaccino/composizione terapeutica.

Il vaccino/composizione terapeutica è per convenzione somministrato per via parenterale, ad es. mediante iniezione, sia per via sottocutanea che intramuscolare. Formulazioni addizionali appropriate per altri modi di somministrazione includono formulazioni orali e polmonari, supposte e applicazioni transdermiche. Le formulazioni orali sono le più

preferite per i vaccini di H. pylori o le composizioni terapeutiche della presente invenzione per la quasi totalità dell'infezione di H. pylori nello stomaco. Il trattamento dosato può essere in programma a singola dose o in programma a dosi multiple. Il vaccino/composizione terapeutica può essere somministrato in unione con altri agenti immunoregolatori.

La presente invenzione verrà ora descritta in maggiore dettaglio con riferimento ai seguenti esempi:

Esempio 1

Crescita di ceppi di H. pylori e estrazione del DNA e di proteine.

I ceppi di H. pylori NCTC (National Collection of Type Cultures, Londra) 11637, 11638, 11916 e HP34 (isolato clinico da una biopsia prelevata durante una endoscopia da un paziente presso il Queen's Medical Center, The University Hospital, Nottingham) sono stati fatti crescere su agar sangue Columbia con il 5% di sangue di cavallo (Oxoid) in strato per l'estrazione di DNA, per 2 giorni in condizioni microaerofile (Campypac, BBL) a 37 C: La crescita risultante è stata recuperata da quattro piastre ed è stata dapprima colorata con il Gram per identificare la morfologia caratteristica. Le cellule sono state lavate in 1 ml di tampone di lisi (50 mM EDTA, 100 mM NaCl) e risospese in 400 ul di tampone di lisi, a cui sono stati aggiunti 30 ul di tampone di lisi contenente 20% N-lauroil-sarcosina (Sigma).

Dopo 5 minuti di incubazione a temperatura ambiente, la sospensione è stata ripetutamente estratta con fenolo saturo con TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA) fino a che non era più evidente l'interfaccia. Gli acidi nucleici sono stati quindi precipitati con etanolo durante la notte e recuperati mediante centrifugazione, lavati in 70% etanolo e il pellet seccato all'aria per 10 minuti. Il DNA è stato quindi trattato con proteinasi-K e purificato utilizzando una minicolonna Quiagen, secondo le istruzioni del produttore. Il ceppo NCTC 11638 di H.pylori è stato fatto crescere in coltura liquida aggiungendo una piastra di coltura raccolta a 100 ml di brodo Brucella (Difco), contenente 2% beta-ciclodestrina (Sigma) e 0.2 ml di supplemento selettivo per H. pylori ricostituito (Oxoid) in beute coniche da 500 ml. La beuta è stata incubata con blanda agitazione (100 r.p.m.) in un contenitore anaerobico per 3 giorni in condizioni microaerofile (Campypac, BBL) a 37 C. Le cellule di H. pylori sono state raccolte per centrifugazione e le proteine nel supernatante precipitate come precedentemente descritto in Milton D.L., Norqvist A. e Wolf Watz H., (1992), J.Bacteriol. 174:7235-7244. Le proteine cellulari sono state estratte risospendendo due piastre di crescita in 1.5 ml di tampone per estrazione di proteine (120 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM MgCl₂, 0.15 mM EDTA, 1mM DTT, 1mM PMFS, 2 ug/ml pepstatina A (sigma), 0.5 ug/ml leupeptina (Sigma)) aggiungendo 200 ul di 10% SDS e bollendo per 5 minuti. La sospensione è stata a

quindi raffreddata in ghiaccio per 5 minuti e il supernatante raccolto mediante centrifugazione a 12500 r.p.m. per cinque minuti. La concentrazione di proteine è stata determinata secondo Bradford, M., (1976), Anal. Biochem, 72, 248-2532, (1976).

Esempio 2

Identificazione di un enzima proteasi di H. pylori

40 ug di cellule totali e di proteine di supernatante di H. pylori NCTC 11638 e di un isolato clinico di P. aeruginosa sono state separate su minigel verticale Hoefer Scientific), comprendente un gel di impaccamento di 5% acrilammide e un gel separatore di 13% acrilammide, secondo il procedimento di Laemli U.K, (1970) Nature, 227:608-685. L'elettroforesi è stata effettuata a 20 mA. Metà del gel è stata colorata direttamente, mentre l'altra metà è stata incubata prima della colorazione per rivelare l'attività proteasica. La porzione di gel che è stata colorata direttamente è stata posta in una soluzione di 0.1% Coomassie Brilliant Blue R-250 in soluzione per decolorazione (40% metanolo, 10% acido acetico, 50% acqua), per 1 ora e quindi posta in diversi cambi di soluzione per decolorazione. Il gel non colorato è stato incubato e l'attività proteasica di questo gel è stata determinata con il procedimento descritto in Milano et al., (19932), J. Bacteriol., 174:7235-7244., eccetto il fatto che il gel è stato infine colorato con Coomassie Brilliant Blue R-250 come sopra, anzichè con nero amido. L'attività

proteasica è stata identificata nel gel con bande schiarite (digestione della gelatina e di altre proteine). L'attività proteasica era chiaramente presente nelle cellule di H. pylori, nel supernatante e nelle corsie di P. aeruginosa. Nelle corsie di H. pylori erano presenti diverse bande proteolitiche. Un gel stratificato (100 ug di proteine totali di H. pylori) secondo la procedura precedente ha mostrato una chiara banda di attività proteasica a circa 35 kDa.

La separazione elettroforetica è stata trasferita su una membrana di nitrocellulosa mediante trasferimento semi secco utilizzando tampone per trasferimento (48 mM Tris pH 8, 30 mM glicina, 20% metanolo, 1.3 mM SDS) e una unità di trasferimento Horizoblot ATTO AE-6675 (Genetic Research International), secondo le istruzioni del produttore. La membrana di nitrocellulosa è stata quindi seccata e posta in soluzione di bloccaggio (1% sieralbumina bovina, in tampone di lavaggio (10 mM Tris pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1% Tween 20) per 1 ora a temperatura ambiente con agitazione costante. La membrana è stata ibridata sia con anti-elastasi di P. aeruginosa di coniglio, Bever e Iglewski (1988), J. Bacteriol. 170:4309-4314, sia con siero umano riunito assorbito con E. coli, secondo tecniche ben note nell'arte. Gli anticorpi primari sono stati aggiunti alla soluzione di bloccaggio alla diluizione di 1:1000 e l'incubazione è stata proseguita per da 1 a 4 ore. La membrana è stata quindi brevemente lavata due volte con tampone di lavaggio, una

volta per 15 minuti e una volta per 5 minuti con agitazione. L'anticorpo marcato con HRP (anti-coniglio o anti-umano) è stato aggiunto alla membrana alla concentrazione di 1:1000 in tampone di lavaggio ed incubato per 1 ora come sopra. La membrana è stata quindi lavata una volta per 15 minuti e quattro volte per 5 minuti con tampone di lavaggio come sopra. La membrana è stata quindi sviluppata utilizzando reagenti per substrato ECL (Amersham) e esposta a pellicole per raggi X Fuji RX e sviluppata secondo le istruzioni del produttore. La reibridazione delle membrane è stata effettuata dopo deibridazione, incubando in 20 mM glicina, pH 2.5, 0.055% Tween 20, durante la notte a temperatura ambiente con agitazione costante.

Dopo ibridazione con anticorpi anti-coniglio marcati con HRP, era visibile una forte banda nella corsia di P. aeruginosa e una banda di peso molecolare simile alla elastasi di P. aeruginosa era visibile nella traccia degli estratti proteici totali di H. pylori. Dopo ibridazione con i sieri riuniti di cinque pazienti con elevati titoli anticorpali contro H. pylori, è stato osservato un elevato numero di bande, inclusa una forte risposta nella banda (35 kDa) precedentemente identificata dall'anticorpo anti-elastasi di P. aeruginosa. Dopo ibridazione con i sieri di cinque pazienti non infetti da H. pylori, non era visibile nessuna banda. Perciò è stato mostrato che una proteina di simili dimensioni e reattività immunologica contro la

proteina elastasi di P. aeruginosa era presente in estratti proteici cellulari e del supernatante di H. pylori NCTC 11638.

Esempio 3

Clonaggio del gene hap di H. pylori

5 ug di DNA genomico di H. pylori NCTC 11638 digerito con HindIII o con BamHI sono stati separati e trasferiti su membrana Hybond N (Amersham) come descritto in Smith et al., (1992) Gene 114: 211-216. I blot genomici sono stati ibridati durante la notte con 200 ng di un frammento HindIII di 3.2 kb di DNA del gene hap di V. cholerae, e 5 ng di DNA di fago lambda digerito con HindIII, marcato direttamente con HRP (corredo Amersham ECL), lavati, sviluppati ed esposti a pellicole per raggi X Fuji RX secondo le istruzioni del produttore. I frammenti HindIII di 4 kb e BamHI di 1.5 kb del DNA di H. pylori si sono fortemente ibridati con la sonda del gene hap di V. cholerae.

Entrambi i frammenti di 4 kb (HindIII) e di 1.5 kb (BamHI) sono stati clonati dal DNA genomico di H. pylori NCTC 11638 con il seguente procedimento:

Due aliquote di 10ug di DNA genomico sono state digerite con HindIII o con BamHI e separate in base alle dimensioni su minigel in 0.5X TBE. Il frammento HindIII di 4 kb e il frammento BamHI di 1.5 kb sono stati estratti dal gel e separatamente ligati in pUC18, pUC19, pAT153 digeriti con HindIII o BamHI e trattati con fosfatasi alcalina di

intestino di vitello, come descritto da Smith A.W., (1990), Tesi di Dottorato, Università di Nottingham, Nottingham, Regno Unito. I plasmidi risultanti sono stati trasformati in E. coli DH5-alfa e piastrati su piastre di brodo LB contenenti 100 ug/ml di ampicillina ed incubati durante la notte a 37°C. I ricombinanti desiderati sono stati identificati mediante trasferimento delle colonie su Hybond N e selezionati mediante ibridazione su colonia utilizzando la sonda del frammento HindIII di 3.2 kb di V. cholerae (ECL) di cui sopra, secondo le istruzioni del produttore. Il frammento BamHI di 1.5 kb è stato sequenziato in entrambe le direzioni utilizzando primers per sequenziamento appositamente ordinati, universali e inversi e Sequenasi Versione 2 (United States Biochemical) secondo le istruzioni del produttore.

Il sequenziamento del frammento di 1.5 kb non ha rivelato il codone di inizio, ma ha rivelato una regione di circa 1 kb che era per oltre il 99% identica alla mappa del gene hap di V. cholerae, con soltanto una delezione di tre basi in fase di un residuo di istidina nella regione codificante (delta H nella Figura 1). La sequenza diverge completamente circa 50 basi a valle del codone stop e le altre basi differiscono prima della completa divergenza. La sequenza clonata è quindi piuttosto differente dalla regione 3' adiacente del locus hap di V. cholerae. Tale conservazione della sequenza codificante è altamente insolita e difficile da spiegare sia con un gene precursore comune che con un

trasferimento genico intragenerico. Il contenuto %G+C per H. pylori è 34-37%, mentre per V. cholerae è 46-48%, la successiva differenza nell'uso dei codoni tra i due generi dovrebbe aver permesso alle sequenze di DNA di divergere anche se le sequenze amminoacidiche erano ancora conservate.

RIVENDICAZIONI

1. Vaccino/composizione terapeutica comprendente la proteina HAP di Helicobacter pylori o un suo frammento, in cui la proteina HAP di Helicobacter pylori include la sequenza amminoacidica come mostrato nella Figura 1 delle figure di accompagnamento.

2. Vaccino/composizione terapeutica come rivendicato nella Rivendicazione 1, in cui la proteina HAP di Helicobacter pylori o un suo frammento è una proteina, un polipeptide o un peptide ricombinante.

3. Vaccino/composizione terapeutica come rivendicato nella Rivendicazione 1 o 2, in cui la proteina HAP di Helicobacter pylori comprende la regione della proteina che lega zinco.

4. Vaccino/composizione terapeutica come rivendicato nella Rivendicazione 1 o 2, in cui la proteina HAP di Helicobacter pylori comprende il sito attivo proteasico della proteina.

5. Vaccino/composizione terapeutica come rivendicato in una qualsiasi delle Rivendicazioni da 1 a 4, comprendente una combinazione di uno o più componenti selezionati dalla proteina HAP di Helicobacter pylori o suo frammento.

6. Vaccino/composizione terapeutica come rivendicato in una qualsiasi delle Rivendicazioni da 1 a 5, comprendente ulteriormente un veicolante farmacologicamente accettabile.

7. Vaccino/composizione terapeutica come rivendicato nelle Rivendicazioni da 1 a 6, comprendente ulteriormente uno o più antigeni ulteriori derivati da una fonte alternativa.

8. Procedimento per la preparazione di un vaccino/composizione terapeutica come rivendicato nella Rivendicazione 6 comprendente la combinazione della proteina HAP di Helycobacter pylori o un suo frammento in accordo con una qualsiasi delle Rivendicazioni da 1 a 5 insieme ad un veicolante farmacologicamente accettabile.

9. Vaccino/composizione terapeutica come rivendicato in una qualsiasi delle Rivendicazioni da 1 a 7 per il trattamento preventivo dell'infezione da Helycobacter pylori.

10. Impiego di proteina HAP di Helycobacter pylori o suo frammento nella preparazione di un vaccino/composizione terapeutica per il trattamento o la prevenzione di infezione da Helycobacter pylori.

11. Vaccino/composizione terapeutica per la prevenzione e il trattamento di infezione da Helycobacter pylori, sostanzialmente come qui in precedenza descritto.

PER INCARICO
Dott. Francesco SERRA
N. Iscriz. ALBO 90
(In proprio e per gli altri)

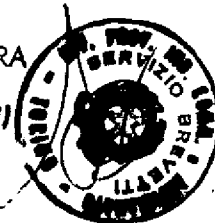
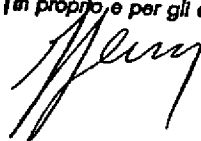
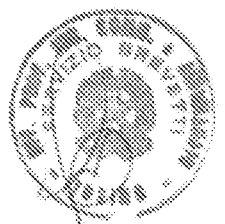


FIG. 1 //

EcoRI 60
GAATTCCAGGCCTCGTTTACCGAGATATGTCCGGTGGTATTAAACGAAGCATTCTCGGATATC
 AsnSerGlyLeuValTyrArgAspMetSerGlyGlyIleAsnGluAlaPheSerAspIle
 Sall 120
 GCAGGGGAAGCGCCAGAGTACTTTATGCGGTGCCAATGTCCGACTGGATTGTGCGGCGCGGAT
 AlaGlyGluAlaAlaGluTyrPheMetArgGlyAsnValAspTrpIleValGlyAlaAsp
 180
 ATTTTAAATCCTCCGGTGGTCTACGTTATTTTCGATCAGCCCTCACGTGATGGCCGCTCG
 IlePheLysSerSerGlyGlyLeuArgTyrPheAspGlnProSerArgAspGlyArgSer
 240
 ATAGATCATGCTTCACAGTATTACAGCGCTATTGATGTTTCATTGAGTGGCGTGTGTTAAC
 IleAspHisAlaSerGlnTyrTyrSerGlyIleAspValHisSerSerGlyValPheAsn
 300
 CGCGCGTTTACCTACTCGCCAAATAATCGGGTTGCAACGTACGTAAAGGTTTGAAGTG
 ArgAlaPheTyrLeuLeuAlaAsnLysSerGlyTrpAsnValArgLysGlyPheGlnVal
 360
 TTTGCCGTGGCTAACCAAGTTGTACTGGACACCGAACAGCACGTTTGATCAAGGTGGCTGT
 PheAlaValAlaAsnGlnLeuTyrTrpThrProAsnSerThrPheAspGlnGlyGlyCys
 420
 GGGGTACTGAAAGCGGCGCAGGATCTCAACTACAACACCGCAGAGCTTGTGGCAGCCTTT
 GlyValValLysAlaAlaGlnAspLeuAsnTyrAsnThrAlaAspValValAlaAlaPhe
 480
 AATACCGTGGGTGTCAATGCTTCTTGTGGCACCACGCCACCACTGTTCGGCAAAGTGCTT
 AsnThrValGlyValAsnAlaSerCysGlyThrThrProProProValGlyLysValLeu
 540
 GAGAAAGGTAAACCGATCACAGGACTCAGCGGCTCAGTGGAGGAGAAGATTTCTATACC
 GluLysGlyLysProIleThrGlyLeuSerGlySerArgGlyGlyGluAspPheTyrThr
 600
 TTTACCGTGACCAATTCAGGCAGTGTGTGTGTCTCCATCAGTGGTGGCAACGGCGGATGCC
 PheThrValThrAsnSerGlySerValValValSerIleSerGlyGlyThrGlyAspAla
 660
 GATCTGTATGTCAAAGCGGGCAGCAAACCCACCACCTCTTCTTGGGATTTGTGCTCCATC
 AspLeuTyrValLysAlaGlySerLysProThrThrSerSerTrpAspCysArgProTyr
 720
 CGTTACGGCAATGGCGAGCAGTGTTCATCTCTGCGGTCGTGGGTACGACATACCATGTC
 ArgSerGlyAsnAlaGluGluCysPheIleSerAlaValValGlyThrThrTyrHisVal
 780
 ATGTTACGCGGTTACAGTAATACTTCTGGTGTGACGTTACGCTTGGACTAAGTTCTCTGC
 MetLeuArgGlyTyrSerAsnTyrSerGlyValThrLeuArgLeuAsp***
 840
CACCTACCTGCAACGCCCTCAGCAAAGTCTCAGGGCGTTGTTTTTGAAGGGCAGTTCTCA
 900
GGATGTATCAACTATTTGAGTTGGCTGACCGCCGAAGAAACATTTTCTGCACCTTGGTAA
 960
 ATCTGTTCCATGATGGTTGACACTTCCACAATGCGGCCATTGGTTTCATTGGCAATGTGA
 1020
 GAGACTTCAGAAATAGAGCTGGTTACCGCTTCAGTTAAGGAGAGGTTTTTATTCACCACT
 1080
 TGATTGATCTCTTCTGTGGCTTTTGGAGTCCGAGAACCGCAGTTGACCGACTTCATCCGCA
 1140
 AACCAACGGCAAAACCGGCTCTTGCATCAACCGCTGCGACGCTCTATCGCTGCATTAATGC
 1200
 GGAGCAGATGGTTTGGTCAGCSATACACTGATGGTTTTGACAATTTACAGAGACATCTTTC
 1260
 GAGAGAACCACGAGCTGCTCAATCTGTGTAGTGAATTGTTGATATTGCCCCACCATTTTT
 1320
 TCTGCTAACGACTGAATCTTTCAGTACATGTTCCGCTTGTGCTACTTGGCAGGTTCTAC
 PstII 1380
 TGAGGTGCTATAGCGGATATTTGCCAGCGTCTGTACTTGGTGTTCACGTAATACCTCTGC
 1440
 AGTGATGTCTCAGGCGAACTTGACAATTTTATATACCTTATTTGATCTTTGACCGG
 1460
 ACTGTAGGAGGCTTGGATCC
 BamHI



Dott. Francesco SERRA
 (in copia e per gli atti)