



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 875**

51 Int. Cl.:

A61K 39/106 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 9/19 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

A61P 1/04 (2006.01)

C12N 15/31 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07800872 .9**

96 Fecha de presentación : **05.09.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2082750**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.07.2009**

54

Título: **Vacuna oral de *Helicobacter pylori* recombinante y método de preparación de la misma.**

30

Prioridad: **05.09.2006 CN 2006 1 0095094**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.08.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.08.2011

73

Titular/es: **CHONGQING KANG WEI
BIOTECHNOLOGY Co., Ltd.
Yan Yu Yuan B-7-5 du shi Hua Yuan
Gaotanyan Street, Shapingba District
Chongqing City Sichuan Provence 400038, CN**

72

Inventor/es: **Zou, Quanming;
Tong, Wende;
Mao, Xuhu;
Guo, Gang;
Lu, Dongshui;
Wu, Chao;
Zeng, Hao;
Wang, Yichao;
Yang, Jun;
Zhang, Weijun;
Liu, Kaiyun y
Luo, Ping**

74

Agente: **Miltenyi Null, Peter**

ES 2 363 875 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vacuna oral de *Helicobacter pylori* recombinante y método de preparación de la misma

CAMPO TÉCNICO

5 La invención se refiere al campo de los compuestos biofarmacéuticos, se refiere especialmente a una proteína recombinante usada para la inmunoprofilaxis de la infección humana por *Helicobacter pylori* y a una preparación de vacuna oral de liberación lenta encapsulada en microesferas degradables preparada a partir de la proteína recombinante, y al método de preparación de la misma.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 En 2005 se otorgó el Premio Nobel en medicina/fisiología a dos científicos que descubrieron *Helicobacter pylori* (Hp). Se cree que *Helicobacter pylori* es una bacteria patógena importante para las enfermedades del tracto digestivo superior en el ser humano y la principal causa patógena de gastritis crónica, úlcera gástrica y úlcera duodenal. La Organización Mundial de la Salud (OMS) en su estudio sobre *Helicobacter pylori* también ha confirmado que Hp es una bacteria patógena estrechamente relacionada con el cáncer gástrico, clasificándola como el factor carcinogénico principal. Hp es una de las bacterias con la tasa de infección más alta en el mundo, alcanzando una tasa de
15 infección del 50% en la población global e incluso mayor en países en vías de desarrollo. En China, existen nada menos que seiscientos millones de personas infectadas por Hp, y cada año mueren doscientas mil personas de cáncer gástrico. Por tanto, Hp constituye una gran amenaza para la salud humana. A pesar de la importancia clínica positiva, la terapia con antibióticos actual de la infección por Hp todavía tiene algunas desventajas obvias: 1) efectos secundarios tóxicos y adversos; 2) generación de cepas resistentes a fármacos; 3) alto coste; 4) ciclo de tratamiento prolongado y escaso cumplimiento del paciente; y 5) efecto terapéutico inestable. Por otra parte, la vacuna se considera el medio más rentable para controlar enfermedades infecciosas. Mediante la inducción de una respuesta inmunitaria específica en el organismo, puede usarse la vacunación para prevenir o tratar una infección por Hp. Aunque el progreso en la investigación en vacunas de células completas está limitado por la dificultad en el cultivo a gran escala de Hp y la existencia de un potencial carcinógeno en el antígeno bruto, el desarrollo de vacunas obtenidas mediante ingeniería genética se ha convertido en la principal dirección debido a su seguridad, eficacia, bajo coste, y facilidad en su generación y uso. Aunque se han investigado exhaustivamente tanto de manera interna como en el exterior, las vacunas de Hp todavía no son satisfactorias.

La ureasa, una enzima dependiente de níquel, cataliza la hidrólisis de la urea en amoníaco y ácido carbónico, y es la proteína más abundante expresada en *Helicobacter pylori* tanto dentro de las células como en la membrana celular, representando el 5%-10% de la proteína de Hp total. La ureasa descompone la urea para producir amoníaco, lo que ayuda a las bacterias a colonizar el estómago neutralizando el ácido gástrico así como suministrando amoníaco para la síntesis proteica bacteriana. Por tanto, los tejidos del huésped de Hp pueden sufrir lesiones directamente por el amoníaco o indirectamente por la estimulación de la reacción inflamatoria inducida por la ureasa. El bloqueo de la expresión génica de la ureasa puede inhibir la colonización de *Helicobacter pylori* en el huésped, reducir la síntesis proteica bacteriana, y disminuir la reacción inflamatoria relacionada con *Helicobacter pylori*. El anticuerpo frente a la ureasa B puede detectarse en todos los pacientes infectados por Hp, especialmente en aquéllos con síntomas marcados, y el nivel de anticuerpos es, hasta cierto punto, importante para la gravedad de los estados de la enfermedad. La inyección oral de la ureasa de *Helicobacter pylori* o la subunidad B de la ureasa recombinante (UreBr) puede proteger a los ratones frente a la infección por *Helicobacter pylori* y eliminar la infección preexistente (Michetti *et al.*, Gastroenterol.1994). La actividad de la ureasa parece desempeñar un papel importante en la infección por Hp, ya que Hp con pérdida de la actividad de la ureasa no da como resultado la infección en el modelo animal. Por tanto, un anticuerpo que neutraliza la actividad de la ureasa puede desempeñar un papel crucial en la resistencia contra la colonización por Hp. Los hallazgos anteriores indican que los anticuerpos de la ureasa, especialmente el que puede neutralizar la actividad de la ureasa, podrían ejercer el papel principal en la resistencia
45 contra la infección por Hp.

El sistema inmunitario de la mucosa es una parte importante del sistema inmunitario del organismo, incluyendo principalmente tejido linfático asociado a la mucosa intestinal y tejido linfático asociado a bronquios, etc., y ejerce una acción única con respecto a la función de defensa del organismo. Los ganglios linfáticos mesentéricos y la gran cantidad de linfocitos dispersados en la lámina propia de la mucosa y los epitelios intestinales constituyen los sitios de inducción inmunitaria y los sitios de efecto inmunitario. A través de la captación, el procesamiento y la extracción de antígenos, diversos inmunocitos en la superficie de la mucosa gastrointestinal, etc. producen y secretan anticuerpos específicos frente a antígenos (principalmente sIgA) que se unen específicamente con vectores bacterianos o virales que portan antígenos para impedirles que colonicen la superficie de la mucosa o invadan el organismo, ejerciendo así una determinada función de defensa inmunológica.

55 Sin embargo; el defecto más grave del sistema inmunitario de la mucosa es que es probable que desarrolle tolerancia inmunológica a los antígenos. Incluso con un nivel de antígeno aumentado, el nivel de sIgA específico frente a antígenos producido por el organismo o la mucosa sigue siendo bastante bajo, y la capacidad de defensa inmunitaria frente a la infección de los microorganismos que portan antígenos es pésima.

La toxina termolábil (LT) es una enterotoxina termolábil producida por *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) y puede inducir diarrea grave en el ser humano y en algunos animales domésticos. La LT está compuesta por una subunidad A (LTA) y cinco subunidades B (LTB). De manera espacial, cinco LTB completamente idénticas forman un pentámero circular, cuyo centro se encuentra en la LTA con su extremo C-terminal unido a la LTB mediante enlaces no covalentes. La subunidad A está compuesta por dos subunidades A1 y A2, unidas mediante un puente disulfuro, en la que A1 es la parte tóxica de la toxina mientras que A2 se une con la subunidad B. Las subunidades A y B en el citoplasma existen en la forma de precursor que porta péptidos señal, y sólo se ensamblan para dar LT intacta tras pasar a través de la membrana celular. La subunidad B sirve para unirse específicamente con el receptor de gangliósido GM1 en la superficie de la célula eucariota para realizar la transición conformacional de la molécula de LT; la subunidad A se disocia de la subunidad B y entra en la membrana celular, seguido por la degradación del puente disulfuro y la activación de la cadena peptídica de A1; y la subunidad A1 tiene la actividad de una ADP-ribosilación transferasa independiente de GTP, que destruye la degradación y el equilibrio del AMPc intracelular a través de la reacción de ADP-ribosilación mediada por proteína G y desencadena el aumento del nivel de AMPc, induciendo así el efecto de la toxina.

En los últimos años, la LT se considera un prometedor adyuvante inmunitario de la mucosa. La investigación realizada por Rollwagen etc. mostró que la LT puede reforzar la respuesta inmunitaria de la mucosa frente a campilobacterias y acelerar la eliminación de las bacterias en el tracto intestinal; y además, los animales inmunizados inicialmente con LT y un antígeno no desarrollan tolerancia inmunológica al antígeno incluso tras una observación a largo plazo.

Generalmente se ha aceptado el punto de vista de que la LT puede usarse como adyuvante inmunitario de la mucosa (Lycke N, *et al.* Immunology, 1986, 59(2):301-308; Clements JD, *et al.* Vaccine, 1988, 6(3):269-277; Giuliani MM, *et al.* J. Exp. Med., 1998, 187(7):1123-1132). Puesto que la LT tiene una toxicidad intestinal muy fuerte, se usó en consecuencia principalmente como adyuvante su subunidad B o mutante de LT de baja toxicidad o no tóxico construido (Yamamoto M, *et al.* J. Immunol., 1999, 162:7015-7021; Martin M, *et al.* J. Immunol., 2002, 169(4):1744-1752; Tamura SI, *et al.* Vaccine, 1994, 12:1238-1240). Sin embargo, la subunidad A de la LT, además de su actividad de la enzima ADP-ribosil, también está relacionada con una actividad adyuvante (Giuliani MM, *et al.* J. Exp. Med., 1998). La cadena de LTA estimula el cambio de isotipo de las células B asociadas con la mucosa y mientras la LTA participa en la fase inicial de la respuesta inmunitaria de la mucosa, haciendo que las células B con IgA de tipo fijo migren desde el sitio de producción hasta el sitio de efecto distal (DeHaan L, *et al.* Vaccine, 1996;(4):260-266). De Haan etc. descubrieron que el mutante de LT carente de la actividad de la enzima ADP-ribosil todavía tiene actividad adyuvante, lo que sugiere que la actividad adyuvante de la LT es independiente de la subunidad A1 con actividad de enzima ADP-ribosil, mientras que la subunidad A2 puede contribuir a la actividad adyuvante de la LT. Los experimentos de De Haan también demostraron que, mediante la inmunización de ratones a través de la mucosa de la cavidad nasal, el mutante de LT sin actividad toxica todavía mantiene las propiedades inmunitarias de la toxina de tipo natural. El uso individual de la LTB recombinante muestra una inmunogenicidad más débil que la de la LT mutante sin actividad tóxica (De Haan L, *et al.* Infect Immun, 1996), lo que sugiere que la actividad de la enzima ADP-ribosil de LTA no está relacionada directamente con la inmunidad de la toxina. Adicionalmente, la toxina completa de LT produce un alto nivel de respuesta de S-IgA de mucosa e IgG sistémica mientras que igual cantidad de LTB produce solamente un bajo nivel de respuesta de IgG. Que esta inmunogenicidad de LT sea más fuerte que la de LTB indica que la LTA desempeña un papel importante en la respuesta inmunitaria de la toxina. Aunque la actividad de la ADP-ribosil transferasa dependiente de GTP que posee la subunidad A1 está relacionada con el efecto de la toxina, se sugiere que el efecto adyuvante de la LTA está ejercido principalmente por la subunidad LTA2.

En la actualidad se ha usado la LTB como un adyuvante inmunológico. Por ejemplo, se fusiona LTB con UreB para formar la proteína recombinante LTB-UreB (Wuchao, Zou quanming etc. Research on fusion and expression of *Helicobacter pylori* UreB and *Escherichia coli* LTB genes. Chinese Journal of Microbiology and Immunology, 2002, 22(2):175-179, Jie Yan, *et al.* World J. Gastroenterol., 2004, 10(18):2675-2679), y puede prepararse para dar una vacuna con adyuvante intramolecul. Sin embargo, la tasa de inmunoprotección de la proteína recombinante aún tiene que alcanzar el nivel deseado.

Basándose en lo mencionado anteriormente, en el campo se requiere especialmente una vacuna con adyuvante intramolecul de subunidad de Hp recombinante con potencia mejorada y protección completa contra infección por *Helicobacter pylori*, que también puede administrarse convenientemente.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Uno de los objetivos de la invención es proporcionar una proteína recombinante usada para la inmunoprolifaxis y el tratamiento de la infección humana por *Helicobacter pylori*, y puede prepararse la proteína recombinante para dar una vacuna de *Helicobacter pylori* recombinante usada para la inmunoprolifaxis en la infección humana por *Helicobacter pylori*.

Otro objetivo de la invención es proporcionar un método para preparar la proteína recombinante mencionada usada para la inmunoprolifaxis y el tratamiento de la infección humana por *Helicobacter pylori*.

Un objetivo adicional de la invención es proporcionar una vacuna de *Helicobacter pylori* recombinante usada para la inmunoprofilaxis y el tratamiento de la infección humana por *Helicobacter pylori*, que comprende la proteína recombinante mencionada anteriormente usada para la inmunoprofilaxis y el tratamiento de la infección humana por *Helicobacter pylori*.

- 5 Otro objetivo de la invención es proporcionar un método para preparar la vacuna de *Helicobacter pylori* recombinante mencionada anteriormente usada para la inmunoprofilaxis y el tratamiento de la infección humana por *Helicobacter pylori*.

10 Con el fin de obtener los objetivos anteriores, la invención proporciona una proteína recombinante usada para la profilaxis y el tratamiento de la infección humana por *Helicobacter pylori*, y se obtiene la proteína recombinante (LTA2B-UreB, LU para abreviar) mediante la fusión de la subunidad A2 y la subunidad B de la LT de *Escherichia coli* enterotoxigénica y la subunidad B de la ureasa de *Helicobacter pylori*. En la proteína recombinante, se usa LTA2B como un adyuvante inmunológico intramolecular de la mucosa y se usa UreB como inmunógeno. LTA2B carece de la parte A1 que tiene actividad de la enzima ADP-ribosil de una molécula de LT, por tanto supera los efectos secundarios tóxicos y adversos de un adyuvante de LT. Mientras tanto, en comparación con la LTB adyuvante usada comúnmente, por primera vez se añade LTA2B en la parte de A2 de la LT, potenciando de ese modo su actividad adyuvante y su inmunogenicidad.

15 En una realización de la invención, se demuestra que la proteína de fusión LTA2B-UreB tiene una actividad biológica, inmunogenicidad y reactogenicidad similares a las de UreB de longitud completa, y tiene la función de potenciar la actividad adyuvante de la mucosa.

20 La invención también proporciona una preparación oral encapsulada en microesferas de liberación lenta usada para la inmunoprofilaxis y el tratamiento de la infección humana por *Helicobacter pylori*, encapsulando la preparación la proteína recombinante mencionada anteriormente usada para la profilaxis y el tratamiento de la infección humana por *Helicobacter pylori*.

25 La invención adopta microesferas (MS) de liberación lenta degradables para encapsular la proteína de fusión recombinante mencionada anteriormente. En primer lugar, las microesferas de liberación lenta pueden impedir de manera eficaz que el ácido gástrico y las enzimas en el tracto digestivo descompongan y destruyan el antígeno de modo que se conserve la actividad y la estabilidad completa del antígeno; en segundo lugar, puesto que el tamaño del diámetro de partícula de la MS determina su distribución *in vivo* en diversos órganos, la manipulación del procedimiento de preparación de la MS puede controlar el diámetro de partícula dentro de un determinado intervalo, dirigiendo deliberadamente de ese modo las partículas a los órganos seleccionados de modo que se maximice la eficacia inmunológica. Cuando se encapsula el antígeno, puede modificarse el diámetro de partícula de la MS y la acción adhesiva entre la sustancia antigénica y la MS mediante la alteración de la razón de proporción del portador y el antígeno así como el material portador biodegradable, logrando así el efecto de liberación lenta y de larga duración del antígeno.

30 En una realización preferida, dichas sustancias de encapsulación incluyen alginato, aceite vegetal, cloruro de calcio y quitosano. En una realización preferida, el diámetro de la partícula de dicha preparación encapsulada en microesferas es de 3,33 μm .

35 En una realización preferida, dicha preparación encapsulada en microesferas de liberación lenta se desarrolla al final para dar una preparación liofilizada para la inmunización oral, en la que el excipiente de la preparación liofilizada es manitol al 8%, el agente estabilizante es EDTA- Na_2 al 0,05%, y el valor de pH óptimo es de 10,0. La administración oral tiene las siguientes ventajas: en primer lugar, los componente antigénicos de la vacuna estimulan directamente los linfocitos asociados a la mucosa gastrointestinal y producen una respuesta inmunitaria relevante de la mucosa mediante el reconocimiento y la presentación del antígeno intestinal y el efecto inmunitario, logrando así el objetivo de la prevención eficaz de enfermedades relacionadas que se producirían por la infección por *Helicobacter pylori*; en segundo lugar, la inmunización oral es una terapia indolora y no invasiva, y es conveniente, de bajo coste, y presenta fácil cumplimiento entre los examinados.

40 La invención proporciona además una secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína recombinante, en la que la secuencia de nucleótidos es lTA2B-ureB (lu para abreviar) formada por la fusión del gen codificante de la subunidad A2 y el gen codificante de la subunidad B de la enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* enterotoxigénica, y el gen codificante de la subunidad B de la ureasa de *Helicobacter pylori*.

45 La invención también proporciona un plásmido recombinante, en el que dicho plásmido se formó uniendo dicha secuencia de nucleótidos de la reivindicación 8 y el plásmido pET-11c.

50 La presente invención proporciona además un método para preparar la proteína recombinante de la reivindicación 1, que comprende las siguientes etapas:

- 55 (1) clonar respectivamente las secuencias de nucleótidos codificantes de la subunidad B de la ureasa UreB de *Helicobacter pylori* y la subunidad de enterotoxina termolábil LTA2B de *Escherichia coli* enterotoxigénica, o clonar

las secuencias de nucleótidos codificantes de las secuencias de aminoácidos que tienen una homología superior al 95% con las mismas y que también tienen la actividad de sus proteínas;

(2) unir las secuencias de nucleótidos obtenidas mediante la clonación en la etapa (1) mediante el método de PCR solapante para formar el gen de fusión ItA2B-ureB;

5 (3) construir el gen de fusión ItA2B-ureB en un vector, transformar un huésped y expresar la proteína recombinante LTA2B-UreB; y

(4) separar y purificar la proteína recombinante obtenida de la etapa (3).

10 En una realización preferible, se construye el gen de fusión ItA2B-ureB en el vector pET-11c, se transforma *Escherichia coli* BL21(DE3), y se construye la bacteria recombinante modificada por ingeniería genética pET-11c-LU/BL21(DE3). El plásmido recombinante obtenido comprende al menos una secuencia de nucleótidos codificante de la secuencia de aminoácidos de LU o la secuencia de aminoácidos que tiene una homología superior al 95% con la misma y que también tienen su actividad de proteína.

En una realización preferida, se expresa la proteína recombinante LTA2B-UreB de dicha bacteria recombinante modificada por ingeniería genética fermentando en un fermentador de 80 l.

15 La invención también proporciona un método para preparar una vacuna oral de *Helicobacter pylori* recombinante, que comprende las siguientes etapas:

(1) proporcionar a la proteína recombinante obtenida en la reivindicación 9 con alginato de sodio, aceite vegetal, cloruro de calcio, y quitosano, y preparar para dar una preparación encapsulada en microesferas de liberación lenta degradables; y

20 (2) preparar opcionalmente la preparación encapsulada en microesferas de liberación lenta para dar un producto liofilizado.

25 En una realización preferida, se mezcla la proteína recombinante obtenida de forma uniforme con disolución de alginato de sodio, seguido por la adición de aceite vegetal, tras la emulsificación, adición gota a gota a la disolución de cloruro de calcio mediante valoración inversa, y preparación para dar una preparación de microesferas de proteína encapsuladas con alginato de sodio; entonces, se inmoviliza la preparación de microesferas obtenida, seguido por lavado y centrifugación para recoger los sedimentos, y resuspensión; se añade a una disolución de quitosano para su reencapsulación para obtener microesferas de proteína encapsuladas doblemente por quitosano y alginato de sodio; se vierte lentamente la suspensión de microesferas en los viales con el nivel de líquido inferior a 1 cm, seguido por la congelación previa en un refrigerador a -40°C durante 12 h, la colocación directa en una secadora de vacío enfriada para secar, la elevación lenta de la temperatura para sublimar rápidamente el agua, y la extracción del producto liofilizado para someterlo a prueba cuando un indicador de presión de gas muestre que no se está generando gas.

En una realización de la invención, se realizan experimentos con animales de la vacuna obtenida para detectar la seguridad y la inmunogenicidad de la vacuna de *Helicobacter pylori* recombinante.

35 En otra realización de la invención, se realizan experimentos clínicos de la vacuna en el organismo humano para verificar los efectos inmunológicos de la vacuna de *Helicobacter pylori* recombinante.

40 A partir de lo que se ha mencionado anteriormente, la invención usa LTA2B fusionada a partir de la subunidad A2 y la subunidad B de la LT de *Escherichia coli* enterotoxigénica como un adyuvante intramolecular inmunitario de la mucosa y usa la subunidad B de la ureasa como un inmunógeno para construir una vacuna de *Helicobacter pylori* recombinante que se usa de manera conveniente y segura para la inmunoprolifaxis eficaz de la infección humana por *Helicobacter pylori*.

Para ilustrar adicionalmente los objetivos, las características y las ventajas de la presente invención, se facilitan los siguientes ejemplos en combinación con las figuras.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

45 La figura 1 representa un patrón de electroforesis en gel de agarosa del gen de fusión lu (ItA2B-ureB) obtenido por el método de extensión por solapamiento, en la que el carril 1 es el producto de amplificación por PCR del gen ureB; el carril 2 es el marcador de peso molecular de ácido nucleico (ADN); y el carril 3 es el producto de amplificación por PCR del gen de fusión ItA2B.

50 La figura 2 representa la identificación mediante digestión enzimática del plásmido recombinante pET-11c-lu, en la que el carril M1 es el marcador de PCR; el carril 1 es el producto de PCR de It A2B (aproximadamente 0,4 kb); el carril 2 es el producto de PCR de ureB (1,7 kb); el carril 3 es el producto de PCR de lu (aproximadamente 2,1 kb); el carril 4 es la digestión con NdeI de pET-11c (5,7kb); el carril 5 es la digestión con NdeI de pET-11c-lu (5,7 kb + 2,0

kb); el carril 6 es la digestión con la enzima BamHI del recombinante sentido de pET-11c-lu (6,0 kb + 1,0 kb + 0,7 kb); el carril 7 es la digestión con la enzima BamHI del recombinante antisentido de pET-11c-lu (6,4 kb + 1,0 kb + 0,3 kb); y el carril M2 es el marcador λ ADN/HindIII.

5 La figura 3 representa el patrón de electroforesis de PAGE del gen de fusión lu en bacterias recombinantes, en la que el carril 1: marcador de peso molecular de proteína; carril 2: 1 hora de inducción de bacterias libres de plásmidos; carril 3: cinco horas de inducción de bacterias genéticamente recombinantes; carril 4: cuatro horas de inducción de bacterias genéticamente recombinantes; carril 5: tres horas de inducción de bacterias genéticamente recombinantes; carril 6: dos horas de inducción de bacterias genéticamente recombinantes; carril 7: una hora de inducción de bacterias genéticamente recombinantes. A partir del resultado, se puede observar que las bacterias modificadas por ingeniería genética tras la inducción tienen una banda de expresión de proteína adicional a un peso molecular de 72 kDa, lo que coincide con el peso molecular de la proteína diana. La razón de expresión de la proteína diana tras cinco horas de inducción es de aproximadamente el 26% tal como se muestra en el análisis por exploración de imagen con UVP.

10 La figura 4 representa el patrón de electroforesis de PAGE del efecto de purificación de la proteína diana LU, en la que el carril 1: líquido de cuerpos de inclusión lisados (muestra antes de la purificación); carriles 2 y 3: muestra de pico de elución de proteínas con impurezas; carril 4: muestra de pico de elución de la proteína diana; y carril 5: marcador de peso molecular de proteína. Los resultados muestran que la pureza de la proteína diana se mejora de manera obvia tras la etapa de purificación y que la pureza del pico de la proteína diana recogida analizada mediante exploración con UVP es superior al 85%.

15 La figura 5 representa la curva de liofilización de Hpr (vacuna de *Helicobacter pylori* recombinante).

EJEMPLOS

Ejemplo 1 Construcción del gen de fusión lu (ltA2B-ureB)

(1) Clonación de genes codificantes de UreB de *Helicobacter pylori* y LTA2B de *Escherichia coli* enterotoxigénica

25 Se usaron respectivamente como moldes el ADN genómico de *Escherichia coli* enterotoxigénica de tipo natural H44815 (adquirida del Instituto Nacional para el Control de Productos Farmacéuticos y Biológicos) y el ADN genómico de *Helicobacter pylori* NCTC11637 (adquirido de la Colección Americana de Cultivos Tipo, ATCC); se usaron respectivamente P1 y P2, y P3 y P4 para amplificar los genes ureB y ltA2B; y se realizó la extracción de los genomas bacterianos según un método convencional (Yan ziyin, traducido por Wang Hailin. Short Protocols in Molecular Biology. Science Press, 1998, P39). El sistema de amplificación por PCR fue: 10 μ l de disolución de tampón de amplificación sin ión magnesio 10x, 10 μ l de MgCl₂ (25 mmol/l), 8 μ l de dNTP (2,5 mmol/l cada uno), 2 μ l de cebadores en el sentido de 3' y en el sentido de 5' (P1 y P2 o P3 y P4) respectivamente, 2 μ l de los genomas bacterianos anteriores, 1 μ l de Ex-Taq ADN polimerasa (3 U/ μ l), y se añadió agua esterilizada hasta 100 μ l.

30 Reacción de amplificación por PCR: desnaturalización previa a 94°C durante 5 min., desnaturalización a 94°C durante 50 s, apareamiento a 60°C durante 50 s, extensión a 72°C durante 50 s, durante 35 ciclos mediante una etapa de extensión final a 72°C durante 10 minutos. Se recuperaron los fragmentos de la proteína diana tras la electroforesis en gel de agarosa. (La parte subrayada eran las secuencias de reconocimiento de las enzimas correspondientes).

P1: cat atg gct cct cag tct att aca gaa cta tgt tc

NdeI

P2: tga tat cgg atc ctg agg gta gtt ttc cat act gat tgc c

40 *BamHI*

P3: tac cct cag gat ccg ata tca atg aaa aag att agc ag

BamHI

P4: cat atg cta gaa aat gct aaa gag ttg tgc caa gc

NdeI

45 Se extrajo el ADN de plásmido de la cepa de bacterias clonadas y transformadas de TA según un método convencional (J. Sambrook, *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989 Polyacrylamide Gel Electrophoresis 1,21-1,32), y se llevó a cabo la secuenciación de los fragmentos de inserción mediante el método dideoxi de terminación de cadena.

(2) Construcción del gen de fusión ItA2B-ureB

Se recuperaron respectivamente los productos de PCR de ureB y ItA2B. Se realizó la PCR de extensión por solapamiento usando los genes ureB e ItA2B recuperados como moldes y P1 y P4 como cebadores. El sistema de amplificación por PCR fue: 5 µl de disolución de tampón de amplificación sin ión magnesio 10x, 4 µl de MgCl₂ (25 mmol/l), 4 µl de dNTP (25 mmol/l), 1 µl de cebadores en el sentido de 3' y en el sentido de 5' (P1 y P4) respectivamente, 2 µl de genes ureB y ItA2B anteriores, respectivamente, 0,5 µl de Ex-Taq ADN polimerasa (5 U/µl), y se añadió agua esterilizada hasta 50 µl.

Reacción de amplificación por PCR de extensión por solapamiento: desnaturalización previa a 94°C durante 5 min., desnaturalización a 94°C durante 60 s, apareamiento a 60°C durante 60 s, extensión a 72°C durante 60 s, durante 35 ciclos mediante una etapa de extensión final a 72°C durante 10 minutos. Se recuperaron los fragmentos diana tras la electroforesis en gel de agarosa.

La clonación y la secuenciación de los productos de PCR son las mismas que las descritas anteriormente.

Sistema de reacción de PCR de extensión por solapamiento

15	Fragmento de ADN de ureB recuperado	1 µl
	Fragmento de ADN de ItA2B recuperado	1 µl
	P1 (5 pmol/µl)	2 µl
	P4 (5 pmol/µl)	2 µl
	Disolución de tampón de PCR 10x	10 µl
20	dNTP (5 mmol/l)	4 µl
	Taq plus ADN polimerasa (3 U/µl)	1 µl
	H ₂ Odd	79 µl
	Volumen total	100 µl

Se hizo oscilar el sistema de reacción y se mezcló de forma uniforme, y se añadieron 20 µl de aceite de parafina tras la centrifugación; seguido por desnaturalización previa a 94°C durante 10 min., desnaturalización a 94°C durante 30 s, apareamiento a 58°C durante 45 s, extensión a 72°C durante 1 min., durante 35 ciclos mediante una etapa de extensión final a 72°C durante 10 minutos. Se tomaron 3 µl del producto de reacción tras completarse la reacción; y se detectó el producto de amplificación por PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y se recuperó el fragmento del gen diana ItA2B-ureB. Se obtuvo el fragmento del gen de fusión ItA2B-ureB usando la técnica de PCR de extensión por solapamiento. Análisis de electroforesis en gel de agarosa al 1% (véase la figura 1), el tamaño del fragmento tal como se mostró en el patrón coincidió con el previsto (aproximadamente 2,1 kb) y se consideró principalmente como el fragmento del gen diana y se denominó ItA2B-ureB tal como se representa por la SEQ ID NO:1. La figura 2 mostró que el tamaño del fragmento del gen de fusión coincidió con el previsto, lo que indicó que se obtuvo el gen de fusión mediante extensión por solapamiento.

Ejemplo 2 Construcción de bacterias recombinantes modificadas por ingeniería genética pET-11c-LU/BL21(DE3)

1 Construcción de bacterias recombinantes modificadas por ingeniería genética pET-11c-LU/BL21(DE3)

Se sometió el producto de amplificación (PCR) del gen de fusión lu (ItA2B-ureB) a electroforesis en agarosa al 1,0%, recuperación del gel, y purificación, seguido por ligación con el vector pMD-18T (adquirido de TaKaRa company), transformación de *Escherichia coli* DH5α, extracción de plásmidos, digestión con NdeI, e identificación mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,0%.

Se extrajo el ADN de plásmido de bacterias recombinantes positivas de pMD-18-lu/DH5α, entonces se realizó la digestión con NdeI, se recuperó del fragmento del ADN de lu de 2,0 kb, se ligó con el vector pET-11c defosforilado digerido con NdeI (adquirido de America Novagen Co.), se transformó *Escherichia coli* DH5α, se detectó con placa de LB positiva para ampicilina, se seleccionaron las posibles colonias para la extracción de plásmidos, se identificó el recombinante positivo mediante digestión con NdeI, y se digirió con BamHI para la identificación de las direcciones directa e inversa. Los resultados de la identificación de la digestión se mostraron en la figura 2. El ADN de plásmido recombinante positivo generó tanto 5,7 kb del fragmento del vector como 2,1 kb del fragmento del gen lu (el quinto carril) tras la digestión con NdeI; el recombinante antisentido produjo tres fragmentos de 6,4 kb +1,0 kb

+ 0,3 kb (el séptimo carril) tras la digestión con BamHI; y el recombinante sentido produjo tres fragmentos de 6,0 kb + 1,0 kb + 0,7 kb (el sexto carril).

Las etapas de operación específicas relevantes se mostraron de la siguiente forma:

- 5 1) Se usó un kit de extracción de plásmido proporcionado por Omega corporation para extraer el ADN de plásmido mediante el método recomendado según la descripción del kit.
- 2) Se separó el ADN de plásmido mediante un método convencional de electroforesis en gel de agarosa (gel de agarosa al 1,0%, disolución de tampón TAE 1x, se realizó la electroforesis a 120-150 mA durante 20-40 min. Formulación de la disolución de almacenamiento de TAE 50x: Tris base 2,0 mol/l, NaAc 1,0 mol/l, y Na₂EDTA 0,1 mol/l; y se reguló el pH de la disolución hasta 8,3 usando ácido acético glacial).
- 10 3) Identificación de la digestión del ADN de plásmido: la mezcla de reacción incluye: 1 µg de ADN de plásmido; 1 µl de disolución de tampón 10x (véase la descripción del producto de Shanghai shenggong Co.); 1 µl de enzima de restricción NdeI (10 u/µl); se añadió agua destilada dos veces hasta 10 µl. Incubación a 37°C durante 1-2 h tras mezclado.
- 4) Recuperación y purificación del ADN diana del gel de electroforesis de agarosa:
- 15 Se observaron las bandas de electroforesis del ADN diana bajo lámpara ultravioleta y se cortaron del gel de agarosa, y se transfirieron a un tubo EP de 1,5 ml.
- Se añadió una disolución de tampón de unión de ADN del kit de recuperación del gel de Omega corporation, entonces se llevó a cabo el baño de agua a 65°C hasta disolver completamente el gel, manteniendo el pH de la disolución dentro de 5,0-6,0; se transfirió la disolución de gel disuelta a un tubo separador, se centrifugó a 12000g durante 1 min., y se desechó el líquido del tubo de recogida.
- 20 Se añadió una disolución de tampón de lavado correspondiente, entonces se centrifugó a 12000 g durante 1 min., y se desechó el líquido del tubo de recogida, y se lavó repetidamente una vez.
- Se centrifugó a 12000 g durante 1 min., seguido por la transferencia del tubo de separación a otro tubo EP de 1,5 ml limpio, se añadió un determinado volumen de disolución de tampón TE, se incubó a 65°C durante 10 min., se centrifugó a 12000 g durante 1 min., se extrajo una determinada cantidad para la electroforesis, y se detectaron los efectos de la recuperación y purificación con un escáner ultravioleta de UVP.
- 25 5) Reacción de ligación (usando el kit de ligación de Shanghai Shenggong Co.)
- Se determinaron las concentraciones de los fragmentos de ADN diana y los fragmentos de vector usando un espectrofotómetro ultravioleta, y según el principio de que la razón molar de los fragmentos exógenos con respecto al vector fue generalmente de 1:(2-10), se diseñó el sistema de reacción de ligación de la siguiente forma:
- 30 1 µl de ADN diana; 1-2 µl de vector de plásmido; 5 µl de disolución de ligación; 2-3 µl de H₂O; y 10 µl de volumen total. Reacción de ligación durante 12-16 h a 22°C.
- 6) Preparación de bacterias competentes (método con CaCl₂)
- Usando un asa de inoculación aséptica se sumergió en un líquido de conservación bacteriano almacenado en frío a -70°C, se realizó la inoculación por estrías en placa de LB mediante el método de las tres líneas, y se cultivó a 37°C durante 12-16 h; se eligió una única colonia y se inoculó en 2 ml de líquido de cultivo LB, y se cultivó con agitación a 37°C durante 12-16 h; se transfirió inoculando durante la noche DH5α cultivado a una razón del 1% con respecto a líquido de cultivo de LB, se agitó el cultivo a 37°C durante 0,2-0,4 h hasta DO₆₀₀, se centrifugó a 8000 g durante 5 min., y se recogieron las bacterias, se añadió 1 ml de CaCl₂ 0,1 M enfriado previamente para resuspender los sedimentos, y se introdujo en un baño de agua durante 3 h; se centrifugó a 8000 g a 4°C durante 5 min. y se desechó el sobrenadante; y se añadieron 100 µl de CaCl₂ 0,1 M enfriado previamente para resuspender los sedimentos, y se introdujo rápido en un baño de agua helada durante 1 h para su uso posterior.
- 40 7) Transformación de células huésped de *Escherichia coli* usando el producto de ligación
- Se tomaron 100 µl de suspensión de bacterias competentes y se añadió el producto de reacción de ligación; se sometió a baño de agua helada durante 60 min., baño de agua a 42°C, choque térmico durante 100 s, y se introdujo en baño de agua helada durante 1-2 min.; se añadieron 100 µl de líquido de cultivo LB, se cultivó con agitación a 37°C durante 1 h; se centrifugó a 8000 g durante 10 min., se aspiró para desechar 100 µl del sobrenadante, se mezclaron los sedimentos, se tomaron respectivamente 50 µl para extenderlos sobre la placa, y se cultivó a 37°C durante la noche en un incubador.

50

2. Construcción y selección de bacterias modificadas por ingeniería genética que expresan altamente la proteína de fusión

Se transformó el plásmido de expresión recombinante que contenía el gen de fusión LU para dar *Escherichia coli* BL21, y se extrajo, se digirió e identificó el plásmido. La figura 2 es el patrón de electroforesis en gel de agarosa para la identificación de la digestión del plásmido de expresión recombinante pET-11c-LU/BL21(DE3), en la que el carril 5 es producto de digestión con NdeI del plásmido recombinante pET-11c-LU/BL21(DE3); los carriles M1 y M2 son marcador de peso molecular de ácido nucleico (ADN); el carril 4 es el único producto de digestión enzimática con NdeI (5700 pb) de plásmido vector vacío. El tamaño del fragmento de digestión concordó con el diseño experimental, lo que sugiere que la construcción del plásmido recombinante fue satisfactoria. La preparación y transformación de bacterias competentes de *Escherichia coli* BL21 modificadas por ingeniería genética, y la extracción y la identificación de la digestión de los plásmidos de bacterias recombinantes fueron los mismos que los descritos anteriormente.

Se inocularon bacterias recombinantes identificadas de manera precisa en 3 ml de líquido de cultivo LB que contenía kanamicina, y se agitaron a 37°C durante la noche. Al día siguiente, se inocularon por transferencia las bacterias recombinantes cultivadas durante la noche a una razón del 1% en 20 ml de líquido de cultivo LB que contenía kanamicina, y se agitaron a 37°C durante 2,5 h, se indujeron con IPTG durante 5 h, y se detectaron el patrón de expresión y la cantidad de expresión de la proteína de fusión mediante SDS-PAGE, y se detectaron las cepas altamente expresadas, tal como se muestra en la figura 3.

La invención también verificó la estabilidad de UreB y LTA2B y si podrían sustituir a la proteína de longitud completa de ureasa B mediante los experimentos. Se adoptó el método de la PCR para amplificar los genes de fragmentos de LTA2B, y UreB y LTA2B diana, seguido por la construcción del vector de expresión procarionta pET-11c(+), transformación para dar bacterias huésped *Escherichia coli* BL21(DE3), y expresión de manera estable de la proteína de fusión LTA2B-UreB induciendo con IPTG. En primer lugar, el ELISA y el ensayo de inmunotransferencia verificaron que LTA2B-UreB recombinante tuvo buena inmunogenicidad y reactogenicidad; en segundo lugar, el anticuerpo producido en conejo inmunizado con LTA2B-UreB purificada neutralizó la actividad de la ureasa *in vitro* y mostró la actividad biológica similar a UreB de HP natural; además, la inmunización oral de LTA2B-UreB recombinante en ratones BALB/c pudo estimular el organismo de manera eficaz para producir una respuesta inmunitaria equilibrada de Th1/Th2, que concordó con UreB recombinante (Wuchao, Zou quanming etc. Research on fusion and expression of *Helicobacter pylori* UreB and *Escherichia coli* LTB genes. Chinese Journal of Microbiology and Immunology, 2002, 22(2):175-179); finalmente, la prueba de protección por exposición mostró que la tasa de protección de LTA2B-UreB fue del 91,6%, lo que era significativamente superior a la tasa de protección del 68% de UreB de longitud completa. La prueba de GM1-ELISA indicó que la LTA2B-UreB fusionada no tenía ninguna actividad de la enzima ADP ribosil mientras que mantenía la propiedad biológica de la unión con gangliósido GM1. La prueba de protección por exposición en ratones también mostró que la tasa de protección de LTA2B-UreB era significativamente mayor que la tasa de protección del 74,1% de UreB-LTB y la tasa de protección del 78,6% de la combinación mezclada de manera física de UreB y LTB. Por primera vez, se ha demostrado que LTA2B-UreB tiene actividad biológica, inmunogenicidad y reactogenicidad similares a las de UreB de longitud completa, y tiene la función de fortalecer la actividad del adyuvante de mucosa.

Ejemplo 3 Fermentación de bacterias recombinantes modificadas por ingeniería genética pET-11c-LU/BL21(DE3)

El proceso de fermentación es el siguiente: se adoptó un fermentador de 80 l B.Bron, Alemania; la tasa de inoculación de cepa de siembra para el proceso de fermentación fue del 10%; la temperatura fue de 37°C; y el pH fue de 7,0. Se mantuvo constante el valor de pH añadiendo automáticamente agua amoniacal al 30%; se fijó inicialmente la revolución a 500 rpm, y se cambió la revolución para controlar la cascada de oxígeno disuelto junto con el aumento de las células bacterianas y el aumento del consumo de oxígeno, es decir, se usó un controlador de PO₂ como controlador principal y se usó un controlador de agitación como servocontrolador; se controló la concentración de oxígeno disuelto mediante el control de la cascada y el control de derivativización de oxígeno negativo y se controló su concentración final dentro del 45%-50%; los materiales en serie no se alimentaron cuando la A₆₀₀ fue de menos de 2 h, seguido por la adición en flujo de los materiales en serie una vez cada 0,5 h para hacer que las concentraciones finales de glucosa, triptona, y extracto de levadura al 8% fueran del 0,5%, el 0,2% y el 0,2%, respectivamente. Tras la cuarta adición de los materiales en serie y cuando la concentración de la glucosa se redujo hasta el 0,1%, se añadió IPTG 500 μmol/l para inducir durante 4 h y se recogieron las bacterias; y la adición en flujo de los materiales en serie se basó en el cultivo en serie controlado por el control de la cascada de oxígeno disuelto durante el proceso de fermentación.

El medio de cultivo usado para el proceso de fermentación fue medio de cultivo M9-CAA modificado, que se basó en M9-CAA y se complementó con líquido de extracto de levadura al 0,6% y ZnCl₂·4H₂O 2 mg/l, CoCl₂·4H₂O 2 mg/l, FeSO₄·16H₂O 4 mg/l, H₃BO₃ 5 mg/l, MnCl₂·4H₂O 1,6 mg/l, y CuSO₄ 4 mg/l.

Se recuperó la suspensión bacteriana una vez completa la fermentación y se centrifugó a 8000 g durante 15 min. Se aspiró el sobrenadante y se desechó, y se recogieron las bacterias, se pesaron y se almacenaron mediante

congelación para su uso posterior.

Resultados: los resultados mostraron que los rendimientos de las bacterias fueron todos superiores a 75 g/l; y se estabilizaron todas las cantidades de expresión de las proteínas diana a aproximadamente el 30%, lo que demostró que el proceso de fermentación a media escala estaba avanzado y que tenía niveles superiores tanto en reproducibilidad como en estabilidad.

Ejemplo 4 Purificación de proteína recombinante LU (LTA2B-UreB)

1. Extracción de cuerpos de inclusión: se suspendieron 5000 g de bacterias altamente expresadas en disolución de tampón TE en una razón de 1:10(p/v), y entonces se mezclaron de forma uniforme con un homogeneizador de células tras enfriar previamente a 4°C. Se adoptó un homogeneizador de alta presión para romper las células bacterianas en condiciones presurizadas de 40-70 Mpa (en total 4-6 veces). Una vez finalizado, se tomó una pequeña cantidad de caldo de bacterias, se extendió, se tiñó, para observar la integridad de las células en un microscopio para garantizar que las células estuvieran completamente rotas. Entonces, se centrifugó el caldo de bacterias a 500 g durante 25 min.; tras desechar los sedimentos, se centrifugó de nuevo a 15.000 g durante 40 min. Entonces se desechó el sobrenadante y se recogieron los sedimentos; se lavó secuencialmente con líquidos de lavado A y B a una razón de 1:10 (p/v) 2 veces, respectivamente bajo tales condiciones de lavado: se agitó a 4°C durante 20 min., se centrifugó a 15.000 g durante 40 min., y se recogieron los sedimentos de los cuerpos de inclusión; finalmente, se mezclaron los cuerpos de inclusión con un líquido de lisado de cuerpos de inclusión a una razón de 1:10 (p/v), se agitó a 4°C durante 3 h, se centrifugó a 15.000 g durante 45 min., y se tomó el sobrenadante como el material de partida para la siguiente etapa de purificación.

Disolución de tampón usada para la extracción de cuerpos de inclusión: 1) disolución de tampón TE: Tris 20 mmol/l, EDTA 5 mmol/l, pH 8,0; 2) disolución de lavado de cuerpos de inclusión A: EDTA 5 mmol/l, Tris 20 mmol/l, Triton X-100 al 1%, pH 8,0; 3) disolución de lavado de cuerpos de inclusión B: Tris 20 mmol/l, urea 2 mol/l, pH 8,0; 4) líquido de lisado de cuerpos de inclusión: EDTA 1 mmol/l, Tris 20 mmol/l, urea 8 mol/l (pH 8,0).

2. Purificación por cromatografía: se determinó la etapa de purificación como purificación por cromatografía en columna de intercambio de aniones Q Sepharose HP y en columna de Sephadex G-25, y se realizó la purificación a escala media usando la columna XK50/30 en un sistema ÄKTA explorer¹⁰⁰. Dado que el sistema ÄKTA explorer¹⁰⁰ tiene las características de automatización precisa, se adoptaron dos grupos de sistemas de ÄKTA explorer¹⁰⁰ para realizar la operación de cromatografía automática continua mediante programación y el rendimiento a escala media de cada serie de vacuna de Hpr puede alcanzar 40 g. Se purificó la proteína diana usando Tris 20 mmol/l y EDTA 5 mmol/l con pH de 8,0 y se adoptó elución en gradiente de NaCl.

3. Aunque la pureza de la proteína recombinante purificada mediante cromatografía de alta resolución en Q Sepharose alcanzó más del 80%, existió gran cantidad de sal y urea, por tanto se adoptó un método de cromatografía de filtración en gel para desalinizar y eliminar la urea según las diferencias en el peso molecular usando medio de Sephadex G-25 de carga de tamiz molecular convencional.

4. Se sometió a SDS-PAGE la proteína diana purificada para determinar su pureza. La pureza y el rendimiento de la proteína diana finalmente obtenida fueron superiores al 80% y 79%, respectivamente.

5. Determinación de la concentración de proteínas mediante el método de Lowry

En la que, la tasa de ruptura celular de la técnica de ruptura celular a alta presión usada en la producción de la etapa 1 o la purificación a escala media fue superior al 98%, y se obtuvieron los sedimentos de los cuerpos de inclusión mediante centrifugación diferencial.

Se seleccionó la carga de purificación de cromatografía de afinidad en la etapa 2 de Chelating Sepharose Fast Flow.

Se seleccionó la carga de purificación de aniones en la etapa 3 de Q Sepharose HP, Q Sepharose FF y Q Sepharose XL.

Ejemplo 5 Preparación de vacuna oral de HP recombinante

1. Preparación de microesferas de proteína LU recombinante

Se mezcló de forma uniforme la proteína recombinante preparada en el ejemplo 4 con disolución de alginato de sodio al 2% a temperatura ambiente, seguido por la adición de un aceite vegetal, en la que la razón del aceite vegetal con respecto a la emulsión de alginato de sodio AGS fue de 2:8, se emulsionó a 8000 r/min. durante 10 min., se añadió gota a gota a la disolución de CaCl₂, se agitó a 800 r/min. durante 30 min. para formar una emulsión de aceite en agua, se centrifugó para recoger los sedimentos, se lavó y se resuspendió; se añadió la suspensión a una concentración del 1% de disolución de quitosano, se agitó a 800 rpm durante 30 min. para completar la reencapsulación para dar microesferas de proteína de LU recombinante encapsuladas doblemente de quitosano-alginato de sodio preparadas, se centrifugaron y se lavaron tres veces, y se recogieron.

Se vertió lentamente la suspensión de microesferas anterior en una placa de vidrio en una altura de nivel de líquido inferior a 1 cm, entonces se congeló previamente en un refrigerador a -40°C durante 12 h, se colocó directamente en una secadora de vacío enfriada previamente para secar, se elevó lentamente la temperatura para sublimar rápidamente el agua, y se extrajo el producto liofilizado para someterlo a prueba cuando el indicador de la presión de gas muestra que no se estaba generando gas.

Se tomaron respectivamente pequeñas cantidades de MS centrifugadas y lavadas, polvo liofilizado y polvo liofilizado redisueltos, se las extendió sobre placas de vidrio, se observó bajo un microscopio óptico el cambio morfológico de las microesferas antes y tras la liofilización; en el microscopio óptico se observó que los tamaños y las formas de las microesferas tras la centrifugación y el lavado eran regulares, las microesferas tras la liofilización tenían distribución irregular incluyendo muchas formas irregulares tales como forma de varilla, forma de huso y forma achatada, aunque el número y las formas de las microesferas redisueltas con igual cantidad de agua destilada se restablecieron sustancialmente a las características originales antes de la liofilización. Las MS preparadas tienen una superficie turbulenta, un tamaño homogéneo y un diámetro de partícula promedio de $3,33\ \mu\text{m}$.

2. Liofilización de disolución de microesferas de proteína LU recombinante

Se diluyó apropiadamente la proteína LU recombinante altamente purificada, se preparó y se cargó en viales de liofilización para su liofilización. Se obtuvo una curva de liofilización de la vacuna de Hpr estable y madura mediante estudios: la temperatura de congelación previa del producto fue de -45°C y el tiempo de congelación previa fue de 4 h; la temperatura de la primera sublimación fue de 20°C y el tiempo de sublimación fue de 30 h; la temperatura de la segunda sublimación fue de 30°C y el tiempo de sublimación fue de 8 h; la duración total del proceso de liofilización completo fue de 42 h; el contenido en agua fue inferior al 3%, lo que cumple con los requisitos de detección con respecto al contenido en agua de los productos liofilizados tal como se registra en la segunda parte de la "Farmacopea de la República Popular China" (edición de 2000).

Mediante una investigación sistémica en el procedimiento piloto de liofilización, se determinó el excipiente de la preparación de la vacuna de Hpr liofilizada como manitol al 8%, el agente estabilizante fue EDTA- Na_2 al 0,05%, y el valor de pH óptimo fue de 10,0; y se obtuvieron los parámetros de maduración tales como la curva de liofilización. Más de 20 series de verificaciones repetidas manifestaron que el procedimiento piloto de liofilización era estable en su rendimiento y cumplía con los requisitos para la producción a escala. Pueden dispensarse cuarenta gramos de proteína de vacuna en aproximadamente 2600 viales calculados como 15 mg de cantidad envasada por cada vial de liofilización. Los 5 m^2 adoptados de la máquina de liofilización pueden liofilizar y preparar aproximadamente 5000 viales de liofilización con diámetro de 32 mm de una sola vez, cumpliendo los requisitos para la liofilización de una gran cantidad de productos.

La invención ha revelado adicionalmente la influencia del fluido gástrico artificial en la estabilidad de la vacuna de Hpr. Dado que la vacuna de Hpr es una preparación liofilizada para la inmunización oral, durante el proceso de alcanzar los órganos diana a través del tracto digestivo inevitablemente tiene que pasar a través del medio de pH ácido en el estómago. Una sustancia de naturaleza proteica, la vacuna de Hpr, es probable que se desnaturalice por la acción del ácido o que se degrade por las enzimas, reduciendo así su actividad inmunológica. La investigación descubrió que la reactividad antigénica de la proteína de vacuna de Hpr se redujo de manera obvia y que la degradación de la proteína fue notable en un fluido gástrico artificial con valores de pH de 1 y 2, mientras que se mantenía una reactividad antigénica superior y la estabilidad proteica en un medio con pH de 3-7. El resultado de la investigación indicó que durante el procedimiento de aplicación, puede adoptarse un método de neutralización de ácido gástrico para elevar apropiadamente el valor de pH del medio en el estómago, de modo que se mantenga la actividad biológica de la proteína de vacuna de Hpr y se adquieran de ese modo efectos inmunitarios favorables. Con respecto a la forma farmacéutica para una vacuna oral recombinante, se estableció un procedimiento avanzado y práctico para la preparación polimicroencapsulada resistente al ácido gástrico y a la pepsina, que superaba la destrucción por el ácido gástrico y la pepsina. Como resultado, se mejoraron la eficacia y la estabilidad de la vacuna.

Ejemplo 6 Experimentos con animales de la vacuna oral de HP recombinante

1. Evaluación de la seguridad en animales

No se calculó la DL_{50} dado que no se observó ninguna reacción anómala, síntoma tóxico ni muerte en ninguno de los ratones sometidos a prueba en el grupo de DL_{50} , mientras que la dosis máxima tolerada (MTD) de la vacuna de Hpr para la ingestión oral fue superior a 150 mg/kg (igual a 600 veces la dosis normal recomendada para el organismo humano) tal como se detectó mediante la prueba dosis máxima tolerada. Durante el periodo de observación tras la inyección intraperitoneal de tres series de vacuna de Hpr, las tres series de cobayas sobrevivieron sin reacción tóxica anómala y todos los cobayas ganaron peso normalmente hasta el séptimo día. Se llevaron a cabo los siguientes experimentos respectivamente y los resultados indicaron que la vacuna de Hpr tuvo un buen perfil de seguridad.

2. Investigación sobre la inmunogenicidad

Se observó la inmunogenicidad de la vacuna de Hpr usando respectivamente conejo, ratones BALB/c y mono

Rhesus.

(1). Investigación sobre la inmunogenicidad de la vacuna de Hpr mediante la inmunización de conejos

5 Se realizaron la prueba de inmunodifusión doble y la detección con ELISA tras inmunizar conejos con la vacuna de Hpr, y los resultados mostraron que la vacuna indujo que los conejos produjeran un alto título de antisuero frente a UreB, lo que demostró que la proteína de vacuna de Hpr tiene una buena inmunogenicidad.

(2). Investigación sobre la inmunogenicidad de la vacuna de Hpr mediante la inmunización de ratones BALB/c

10 Se alimentó simultáneamente cada grupo de ratones BALB/c con una suspensión bacteriana de Hp preparada en el día 10 tras la última inmunización. Se sometieron todos los animales de experimentación a una dieta de ayuno y agua 24 h antes, y se alimentó cada ratón BALB/c con 0,3 ml de suspensión bacteriana de aproximadamente 10^8 ufc/ml (unidades formadoras de colonia por ml) respectivamente por la mañana y por la tarde con un intervalo de tiempo de 6 h, y se les proporcionó dieta y agua 2 h tras la última alimentación. Se sacrificaron todos los animales de experimentación 4 semanas tras la exposición y se recogieron las muestras, en los que la dieta de ayuno y agua se realizó 24 h antes del sacrificio; seguido por la disección de los ratones BALB/c, en la que se extrajo el estómago, se dividió a lo largo de la curvatura mayor del estómago, se aclararon ligeramente los residuos del estómago con solución salina normal, se extendió la mitad del tejido de la mucosa gástrica sobre un medio de cultivo para Hp, se realizó la inoculación por estrías en tres líneas, y se llevó a cabo el cultivo microaerófilo. En la tabla 1 se muestra la colonización de Hp en ratones tras la inmunización.

Tabla 1. Efectos de la inmunoprotección tras exposición en ratones tras la inmunización oral de la proteína de fusión

	Grupo	Número de supervivencia tras la exposición	Número sin infección	Tasa de protección (%)
1	Grupo de PBS (disolución de tampón de fosfato, pH 7,0)	28	27	-
2	Grupo de UreB	30	20	66,7
3	Grupo de UreB + LTB	29	19	65,5
4	Grupo de UreB + LTA2B	27	21	71,3
5	Grupo de UreB - LTB	30	24	72,8
6	Grupo de LTA2B-UreB	29	27	91,6

20 "UreB-LTB" y "LTA2B-UreB" representan la proteína de fusión, y "UreB+LTB" y "UreB+LTA2B" representan la mezcla física de dos clases de proteínas recombinantes.

Los resultados indicaron que la tasa de protección de los ratones en el grupo inmunizado con LU (el sexto grupo) alcanza más del 90%.

25 Conclusión: la inmunización del antígeno LU de la vacuna de fusión a ratones puede producir una protección eficaz frente a la exposición de Hp de célula completa en comparación con un grupo no inmunizado.

30 Se inmunizaron los ratones BALB/c con infección por Hp confirmada mediante inyección intramuscular de, respectivamente, proteína de fusión LU, mezcla *in vitro* de las dos subunidades, y controles, mezclados todos con igual volumen de adyuvante de aluminio. Se realizaron las inyecciones a una dosis de 100 µg (100 µl) por ratón en la semana 0, la 2ª y la 4ª, respectivamente. Entonces se sacrificaron los ratones 4 semanas tras la última inmunización y se recogieron las muestras; y se observó el estado de portador de bacterias de los ratones tras el tratamiento a través de diferentes métodos experimentales.

Tabla 2. Observación de ratones infectados por Hp tratados con vacuna proteica de múltiples subunidades

Grupo	Número de ratones tras el tratamiento sin Hp detectada	Número de ratones tras el tratamiento con número reducido en gran medida de Hp colonizada
Grupo de tratamiento con LU (30 ratones)	21	9
Grupo de mezcla de dos subunidades (30 ratones)	23	7
Grupo control (30 ratones)	0	1

5 El valor p fue inferior a 0,001 tal como se mostró mediante el análisis estadístico de los resultados de los dos grupos, lo que ilustró que la inmunoterapia en ratones infectados con el antígeno LU de la vacuna o dos subunidades mezcladas *in vitro* redujo de manera eficaz el número de ratones portadores de bacterias o eliminó la infección de los ratones. El antígeno de la vacuna de múltiples subunidades que incluye el antígeno de fusión LU tuvo determinados efectos terapéuticos en la infección por Hp.

3. Investigación experimental sobre la inmunización oral de la vacuna de Hpr en mono Rhesus

10 La investigación descubrió que los niveles tanto del anticuerpo IgG anti-UreB en suero como del anticuerpo sIgA en saliva se elevaron significativamente tras someter a los monos Rhesus a la inmunización oral de la vacuna de Hpr, y que se mantuvieron hasta la semana 15ª tras la inmunización, lo que demostró que esta vacuna puede inducir que el mono Rhesus produzca una respuesta inmunitaria sistémica y una respuesta inmunitaria de la mucosa significativas.

15 Con el fin de investigar la relación entre la dosis de la vacuna y el nivel de respuesta inmunitaria, se adoptaron tres dosis diferentes para la inmunización oral; y los resultados mostraron que los niveles de respuesta inmunitaria sistémica y de la mucosa inducidos en ambos grupos con dosis de 0,5 y 2,0 mg/kg fueron significativamente superiores a los del grupo con una dosis de 0,2 mg/kg. No se observó ninguna diferencia obvia entre los dos grupos con las dosis superiores, lo que sugiere que la dosis óptima de la vacuna para la inmunización oral del mono Rhesus era de 0,5 mg por kg de peso corporal.

20 Los experimentos con animales anteriores en conejos, ratones BALB/c, y monos Rhesus han confirmado que la vacuna de Hpr puede inducir de manera eficaz la respuesta inmunitaria de la mucosa de los organismos y tiene una inmunogenicidad favorable.

Ejemplo 7 El efecto de vacuna oral de HP recombinante en ser humano

Con el fin de demostrar los efectos terapéuticos de la invención, se realizaron estudios clínicos en la invención. Los datos de la investigación clínica de la invención se muestran de la siguiente forma:

25 1. Criterios de selección:

(1) Participación voluntaria.

(2) Gozar de buena salud, determinada mediante la consulta de la historia de enfermedades, examen físico y examen clínico.

(3) Sin historia de infección reciente por *Helicobacter pylori*.

30 (4) Sin historia de inoculación de vacunas similares.

(5) Sin contraindicación para la inoculación de vacunas.

2. Evaluación de los efectos terapéuticos y la seguridad

(1) Evaluación de la seguridad

35 Se llevó a cabo una observación en tiempo real de 30 minutos después de que el sujeto tomara por vía oral la vacuna, y se observaron específicamente las reacciones sistémicas (temperatura corporal) y locales (tracto gastrointestinal) y otros casos de reacciones anómalas (que incluyen fiebre, frecuencia y aspectos anómalos de deposiciones, diarrea y vómitos, etc.) a las 6 h, 24 h, 48 h y 72 h tras tomar la vacuna por vía oral:

1) Reacción sistémica (temperatura corporal):

Sin reacción: la temperatura corporal fue de 37°C o inferior;

Reacción leve: la temperatura corporal estuvo en el intervalo de 37,1-37,5°C;

Reacción moderada: la temperatura corporal estuvo en el intervalo de 37,6-38,5°C;

5 Reacción grave: la reacción fue de 38,6°C o superior;

2) Reacción local (tracto gastrointestinal):

Sin reacción: sin reacción en el tracto gastrointestinal;

Reacción leve: síntomas gastrointestinales minoritarios que se eliminaron tras un tratamiento común;

Reacciones graves y moderadas: se requirió tratamiento repetido o tratamiento de hospitalización;

10 (2) Investigación de la inmunogenicidad

Se evaluó la inmunogenicidad según el estado del anticuerpo 14 días tras la inmunización de ciclo completo y se observó el aumento y la disminución del anticuerpo 60 días tras la inmunización de ciclo completo. Se definió la conversión positiva cuando la IgG específica de suero era inferior a 1:100 antes de la inmunización mientras que era igual o superior a 1:100 tras la inmunización; y se definieron las conversiones positivas del anticuerpo sIgA específico de saliva y anticuerpo Ig total específico de suero cuando sus razones de título antes de la inmunización con respecto a tras la inmunización eran iguales o superiores a 4 veces.

15

3. Método de investigación

Se llevó a cabo la investigación en dos etapas. El estudio clínico de fase I fue una investigación no comparativa, en la que 30 niños sanos tomaron por vía oral la vacuna oral de *Helicobacter pylori* recombinante según un procedimiento de inmunización en una dosis de 45 mg cada vez, y se observaron las reacciones sistémicas (temperatura corporal) y locales (tracto gastrointestinal) tras la administración oral. Se llevó a cabo adicionalmente el estudio clínico de fase II si no se observaba ninguna reacción anómala grave. El estudio clínico de fase II incluyó investigación aleatoria, investigación doble ciego e investigación comparativa. Se dividió la investigación en cuatro grupos (véase la tabla 4). Procedimiento de inmunización: se realizó la inmunización oral tres veces, una vez cada dos semanas, es decir, en los días 0, 14 y 28, respectivamente.

20

25

4. Sujetos de investigación

La información básica y la reacción clínica de los sujetos para el estudio clínico de fase I de la vacuna oral de *Helicobacter pylori* recombinante se especificaron como las tablas 3-5

Tabla 3 Información básica de los sujetos para el estudio clínico de fase I

Edad (años)	Varón (número de personas)	Hembra (número de personas)	Total
10	0	1	1
11	6	6	12
12	6	7	13
13	4	0	4
Total	16	14	30

Tabla 4 Información básica de los sujetos para el estudio clínico de fase II

Grupo	Número de sujetos	Composición de sexos		Edad promedio (años)
		Masculino	Femenino	
Placebo	151	77	74	10,1
15 mg/cada vez	148	69	79	10,3
30 mg/cada vez	171	82	89	10,4
45 mg/cada vez	153	74	79	10,8
Total	623	317	306	10,2

5. Resultados

1. La seguridad de la vacuna

- 5 En el estudio clínico de fase I, 30 sujetos recibieron la inmunización de la vacuna oral de *Helicobacter pylori* recombinante en una dosis de 45 mg/cada vez. No se observó ninguna reacción inmediata, ni reacciones sistémicas o locales, ni reacciones retardadas, ni otra reacción anómala, complicación ni ningún trastorno o acontecimiento clínicamente significativo en ninguno de los 30 sujetos durante la inmunización de ciclo completo de tres veces (tablas 5 y 6), lo que indicó que la dosis de 45 mg/cada vez de la vacuna oral de *Helicobacter pylori* recombinante era segura para el organismo humano. Según los resultados del estudio clínico de fase I, se llevó a cabo el estudio clínico de fase II de la vacuna de modo que se aumentó la población para la investigación de su seguridad y se hizo hincapié en la investigación de sus efectos de inmunización.

Tabla 5 Reacción gastrointestinal en sujetos para el estudio clínico de fase I de la vacuna oral de *Helicobacter pylori* recombinante

Veces de ingestión de la vacuna	Número de personas observadas	Sin reacción Sin necesidad de tratamiento		Reacción leve Tratamiento común		Reacciones moderadas y graves Tratamiento repetido y hospitalización	
		Número de personas	%	Número de personas	%	Número de personas	%
La primera vez	30	30	100,00	0	0,00	0	0,00
La segunda vez	30	30	100,00	0	0,00	0	0,00
La tercera vez	30	30	100,00	0	0,00	0	0,00

Tabla 6 Reacción sistémica en sujetos para el estudio clínico de fase I de la vacuna oral de *Helicobacter pylori* recombinante

Veces de ingestión de la vacuna	Número de personas observadas	Sin reacción (<37,0)		Reacción leve (37,1-37,5)		Reacción moderada (37,6-38,5)		Reacción grave (>=38,6)	
		Número de personas	%	Número de personas	%	Número de personas	%	Número de personas	%
La primera vez	30	30	100	0	0,00	0	0,00	0	0,00
La segunda vez	30	30	100	0	0,00	0	0,00	0	0,00
La tercera vez	30	30	100	0	0,00	0	0,00	0	0,00

2. Inmunogenicidad de la vacuna

Los resultados del estudio clínico de fase II mostraron que: todas las dosis de 15 mg/cada vez, 30 mg/cada vez y 45 mg/cada vez de vacuna oral de *Helicobacter pylori* recombinante pueden estimular al organismo humano para que produzca respuestas favorables del anticuerpo IgG específico de suero, anticuerpo Ig total específico de suero y anticuerpo sIgA específico de saliva, y las respuestas del anticuerpo duraron mucho tiempo y se ubicaron todavía en niveles superiores (tablas 7-9) dos meses tras la inmunización de ciclo completo.

5

Tabla 7 Conversión positiva del anticuerpo IgG específico de suero en sujetos para el estudio clínico de fase II de la vacuna oral de *Helicobacter pylori* recombinante

Grupo	Número de muestras de detección	14 días tras la inmunización de ciclo completo		60 días tras la inmunización de ciclo completo	
		Número de conversiones positivas	Tasa de conversión positiva (%)	Número de conversiones positivas	Tasa de conversión positiva (%)
Placebo	80	4	5,0	3	3,8
15 mg/cada vez	90	84	93,3	86	95,6
30 mg/cada vez	90	87	96,7	88	97,8
45 mg/cada vez	91	84	92,3	84	92,3

10 **Tabla 8 Nivel de anticuerpo IgG específico de suero en sujetos para el estudio clínico de fase II de la vacuna oral de *Helicobacter pylori* recombinante**

Grupo	Número de muestras de detección	GMT (1:) antes de la inmunización	GMT (1:) 14 días tras la inmunización de ciclo completo	GMT (1:) 60 días tras la inmunización de ciclo completo
Placebo	101	50	54	54
15 mg/cada vez	116	50	844	1140
30 mg/cada vez	124	50	1097	1251
45 mg/cada vez	114	50	619	859

GMT: media geométrica del título

Tabla 9 Nivel de anticuerpo sIgA específico de saliva en sujetos para el estudio clínico de fase II de la vacuna oral de *Helicobacter pylori* recombinante

Grupo	Número de muestras de detección	GMT (1:) antes de la inmunización	GMT (1:) 14 días tras la inmunización de ciclo completo	GMT (1:) 60 días tras la inmunización de ciclo completo
Placebo	101	2,74	3,35	3,32
15 mg/cada vez	116	2,56	21,83	24,16
30 mg/cada vez	124	2,25	25,30	27,52
45 mg/cada vez	114	2,41	20,91	21,95

15

GMT: media geométrica del título

Lista de secuencias

<110> CHONGQING KANG WEI BIOTECHNOLOGY CO., LTD

<120> VACUNA ORAL DE HELICOBACTER PYLORI RECOMBINANTE Y MÉTODO DE PREPARACIÓN DE LA MISMA

<130> EP64235FZapu

5 <140> Aún no asignado
<141> en este documento

<150> PCT/CN2006/002655
<151> 05-09-2007

10 <150> 200610095094.0
<151> 05-09-2006

<160> 6

<170> PatentIn versión 3.3

15 <210> 1
<211> 2165
<212> ADN
<213> *E. coli* BL21(DE3)LU

<220>
<221> gen
<222> (1)..(2165)

20 <400> 1

```

gctccccagt ctattacaga actatgttcg gaatatcgca acacacaaat atatacgata      60
aatgacaaga tactatcata tacggaatcg atggcaggta aaagagaaat ggttatcatt      120
acatttaaga gcggcgcaac atttcagggtc gaagtcccgg gcagtaaca tatagactcc      180
caaaaaaaaaag ccattgaaag gatgaaggac acattaagaa tcacatatct gaccgagacc      240
aaaattgata aattatgtgt atggaataat aaaacccccca attcaattgc ggcaatcagt      300
atggaaaact agacaattac agatgatact tgtaatgagg agaccagaa tctgagcaca      360
atatatctca ggaaatatca atcaaaagtt aagaggcaga tattttcaga ctatcagtca      420
gaggttgaca tatataacag aattcgggat gaattatgaa aaagattagc agaaaagaat      480
atgtttctat gtatggccct actacaggcg ataaagtgag attgggcgat acagatttga      540
tcgctgaagt agaacatgac tacaccattt atggcgaaga gctaaaattt ggtggcggta      600
aaactttaag agaaggcatg agccaatcca gcaaccccag caaagaagaa ctggatttaa      660
tcatcactaa cgctttaatc gtggattaca ccggtattta taaagcggat attggtatta      720
aagatggcaa aatcgctggc attggcaaag gcggtaacaa agacatgcaa gatggcgtta      780
aaaacaatct tagcgtgggt cctgctactg aagccttagc tggggaaggt ttgatcgtaa      840
ctgctggcgg tattgacaca cacatccact tcatctcccc ccaacaaatc cctacagctt      900
ttgcaagcgg tgtaacaact atgattggtg gcggaactgg ccctgctgat ggcactaacg      960
caaccactat cactccaggc agaagaaatt taaatggat gctcagagcg gctgaagaat     1020
attctatgaa cttaggtttc ttagctaaag gtaacacttc taacgatgcg agcttagccg     1080
    
```

atcaaattga agccggtgcg attggtttta aaatccacga agactgggga acaactcctt 1140
ctgcaatcaa ccatgcgta gatgttgcg acaaatacga tgtgcaagtc gctatccaca 1200
cagacacttt gaatgaagcc ggttggtgtag aagacactat ggcagccatt gccgggcgca 1260
ctatgcacac tttccacact gaaggtgctg gtggtggaca cgctcctgat attattaaag 1320
tggccggcga acacaacatt ctgcccgtt cactaacc cactatcctt ttcaccgtga 1380
atacagaagc agaacacatg gacatgctta tgggtgcca ccacttggat aaaagcatta 1440
aagaagatgt tcagttcgct gattcaagga tccgccctca aaccattgcy gctgaagaca 1500
ctttgcatga catggggatt ttctcaatca ccagttctga ctctcaagct atgggtcgtg 1560
tgggtgaagt tatcaccaga acttggcaaa cagctgacaa aaacaaaaa gaatttggcc 1620
gcttgaaaga agaaaaaggc gataacgaca acttcaggat caaacgctac ttgtctaaat 1680
acaccattaa cccagcgatc gctcatggga ttagcgagta ttaggttct gtagaagtgg 1740
gcaaagtggc tgacttgga ttgtggagtc ccgcattctt tggcgtgaaa cccaacatga 1800
tcatcaaagg cgggttcatt gcattaagtc aaatgggcga tgcgaacgct tctatcccta 1860
ccccacaacc ggtttattac agagaaatgt tcgctcatca tggtaaagcc aaatacgatg 1920
caaacatcac ttttgtatcc caagcggctt atgacaaagg cattaagaa gaattagggc 1980
ttgaaagaca agtgttgccg gtaaaaaatt gcagaaacat cactaaaaa gacatgcaat 2040
tcaacgacac taccgctcac attgaagtca atcctgaaac ttaccatgtg ttcgtggatg 2100
gcaaagaagt aacttctaaa ccagccacta aagtgagctt ggcacaactc ttagcattt 2160
tctag 2165

<210> 2

<211> 728

<212> PRT

5 <213> *E.coli* BL21(DE3)LU

<400> 2

Met Ala Pro Gln Ser Ile Thr Glu Leu Cys Ser Glu Tyr Arg Asn Thr
1 5 10 15

Gln Ile Tyr Thr Ile Asn Asp Lys Ile Leu Ser Tyr Thr Glu Ser Met
20 25 30

Ala Gly Lys Arg Glu Met Val Ile Ile Thr Phe Lys Ser Gly Ala Thr
35 40 45

Phe Gln Val Glu Val Pro Gly Ser Gln His Ile Asp Ser Gln Lys Lys
50 55 60

Ala Ile Glu Arg Met Lys Asp Thr Leu Arg Ile Thr Tyr Leu Thr Glu
65 70 75 80

Thr Lys Ile Asp Lys Leu Cys Val Trp Asn Asn Lys Thr Pro Asn Ser
85 90 95

Ile Ala Ala Ile Ser Met Glu Asn Thr Ile Thr Gly Asp Thr Cys Asn
 100 105 110

Glu Glu Thr Gln Asn Leu Ser Thr Ile Tyr Leu Arg Lys Tyr Gln Ser
 115 120 125

Lys Val Lys Arg Gln Ile Phe Ser Asp Tyr Gln Ser Glu Val Asp Ile
 130 135 140

Tyr Asn Arg Ile Arg Asp Glu Leu Tyr Pro Gln Asp Pro Ile Ser Met
 145 150 155 160

Lys Lys Ile Ser Arg Lys Glu Tyr Val Ser Met Tyr Gly Pro Thr Thr
 165 170 175

Gly Asp Lys Val Arg Leu Gly Asp Thr Asp Leu Ile Ala Glu Val Glu
 180 185 190

His Asp Tyr Thr Ile Tyr Gly Glu Glu Leu Lys Phe Gly Gly Gly Lys
 195 200 205

Thr Leu Arg Glu Gly Met Ser Gln Ser Ser Asn Pro Ser Lys Glu Glu
 210 215 220

Leu Asp Leu Ile Ile Thr Asn Ala Leu Ile Val Asp Tyr Thr Gly Ile
 225 230 235 240

Tyr Lys Ala Asp Ile Gly Ile Lys Asp Gly Lys Ile Ala Gly Ile Gly
 245 250 255

Lys Gly Gly Asn Lys Asp Met Gln Asp Gly Val Lys Asn Asn Leu Ser
 260 265 270

Val Gly Pro Ala Thr Glu Ala Leu Ala Gly Glu Gly Leu Ile Val Thr
 275 280 285

Ala Gly Gly Ile Asp Thr His Ile His Phe Ile Ser Pro Gln Gln Ile
 290 295 300

Pro Thr Ala Phe Ala Ser Gly Val Thr Thr Met Ile Gly Gly Gly Thr
 305 310 315 320

Gly Pro Ala Asp Gly Thr Asn Ala Thr Thr Ile Thr Pro Gly Arg Arg
 325 330 335

Asn Leu Lys Trp Met Leu Arg Ala Ala Glu Glu Tyr Ser Met Asn Leu
 340 345 350

Gly Phe Leu Ala Lys Gly Asn Thr Ser Asn Asp Ala Ser Leu Ala Asp
 355 360 365

Gln Ile Glu Ala Gly Ala Ile Gly Phe Lys Ile His Glu Asp Trp Gly
 370 375 380
 Thr Thr Pro Ser Ala Ile Asn His Ala Leu Asp Val Ala Asp Lys Tyr
 385 390 395 400
 Asp Val Gln Val Ala Ile His Thr Asp Thr Leu Asn Glu Ala Gly Cys
 405 410 415
 Val Glu Asp Thr Met Ala Ala Ile Ala Gly Arg Thr Met His Thr Phe
 420 425 430
 His Thr Glu Gly Ala Gly Gly Gly His Ala Pro Asp Ile Ile Lys Val
 435 440 445
 Ala Gly Glu His Asn Ile Leu Pro Ala Ser Thr Asn Pro Thr Ile Pro
 450 455 460
 Phe Thr Val Asn Thr Glu Ala Glu His Met Asp Met Leu Met Val Cys
 465 470 475 480
 His His Leu Asp Lys Ser Ile Lys Glu Asp Val Gln Phe Ala Asp Ser
 485 490 495
 Arg Ile Arg Pro Gln Thr Ile Ala Ala Glu Asp Thr Leu His Asp Met
 500 505 510
 Gly Ile Phe Ser Ile Thr Ser Ser Asp Ser Gln Ala Met Gly Arg Val
 515 520 525
 Gly Glu Val Ile Thr Arg Thr Trp Gln Thr Ala Asp Lys Asn Lys Lys
 530 535 540
 Glu Phe Gly Arg Leu Lys Glu Glu Lys Gly Asp Asn Asp Asn Phe Arg
 545 550 555 560
 Ile Lys Arg Tyr Leu Ser Lys Tyr Thr Ile Asn Pro Ala Ile Ala His
 565 570 575
 Gly Ile Ser Glu Tyr Val Gly Ser Val Glu Val Gly Lys Val Ala Asp
 580 585 590
 Leu Val Leu Trp Ser Pro Ala Phe Phe Gly Val Lys Pro Asn Met Ile
 595 600 605
 Ile Lys Gly Gly Phe Ile Ala Leu Ser Gln Met Gly Asp Ala Asn Ala
 610 615 620
 Ser Ile Pro Thr Pro Gln Pro Val Tyr Tyr Arg Glu Met Phe Ala His
 625 630 635 640

His Gly Lys Ala Lys Tyr Asp Ala Asn Ile Thr Phe Val Ser Gln Ala
 645 650 655

Ala Tyr Asp Lys Gly Ile Lys Glu Glu Leu Gly Leu Glu Arg Gln Val
 660 665 670

Leu Pro Val Lys Asn Cys Arg Asn Ile Thr Lys Lys Asp Met Gln Phe
 675 680 685

Asn Asp Thr Thr Ala His Ile Glu Val Asn Pro Glu Thr Tyr His Val
 690 695 700

Phe Val Asp Gly Lys Glu Val Thr Ser Lys Pro Ala Thr Lys Val Ser
 705 710 715 720

Leu Ala Gln Leu Phe Ser Ile Phe
 725

<210> 3
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de cebador artificial P1
 <400> 3

catatggctc ctcagtctat tacagaacta tgttc

35

<210> 4
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> Secuencia de cebador artificial P2
 <400> 4

tgatatcgga tcctgagggt agttttccat actgattgcc

40

<210> 5
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> Secuencia de cebador artificial P3
 <400> 5

taccctcagg atccgatatc aatgaaaaag attagcag

38

25

<210> 6
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de cebador artificial P4

<400> 6

5

catatgctag aaaatgctaa agagttgtgc caagc

35

REIVINDICACIONES

1. Proteína recombinante, en la que dicha proteína recombinante se forma por la fusión de la subunidad A2 y la subunidad B de la enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* enterotoxigénica y la subunidad B de la ureasa de *Helicobacter pylori*.
- 5 2. Preparación oral encapsulada en microesferas de liberación lenta, en la que dicha preparación encapsula la proteína recombinante de la reivindicación 1.
3. Preparación oral encapsulada en microesferas de la reivindicación 2, en la que dichas sustancias de encapsulación incluyen alginato de sodio, aceite vegetal, cloruro de calcio y quitosano.
4. Preparación oral encapsulada en microesferas de la reivindicación 2 ó 3, en la que el diámetro de la partícula de dicha preparación encapsulada en microesferas es de 3,33 μm .
- 10 5. Preparación oral encapsulada en microesferas de la reivindicación 2 ó 3, en la que dicha preparación encapsulada es una preparación liofilizada.
6. Preparación liofilizada de la reivindicación 5, en la que el excipiente de la preparación liofilizada es manitol al 8%, el agente estabilizante es EDTA- Na_2 al 0,05%, y el valor de pH óptimo es de 10,0.
- 15 7. Secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína recombinante de la reivindicación 1, en la que dicha secuencia de nucleótidos es ItA2B-ureB formada por la fusión del gen codificante de la subunidad A2 y el gen codificante de la subunidad B de la enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* enterotoxigénica, y el gen codificante de la subunidad B de la ureasa de *Helicobacter pylori*.
8. Plásmido recombinante, en el que dicho plásmido está formado mediante ligación de la secuencia de nucleótidos de la reivindicación 7 y el plásmido pET-11c.
- 20 9. Método para preparar la proteína recombinante de la reivindicación 1, en el que dicho método comprende las siguientes etapas:
 - (1) clonar respectivamente las secuencias de nucleótidos codificantes de la subunidad B de la ureasa UreB de *Helicobacter pylori* y la subunidad de enterotoxina termolábil LTA2B de *Escherichia coli* enterotoxigénica, o clonar las secuencias de nucleótidos codificantes de las secuencias de aminoácidos que tienen una homología superior al 95% con las mismas y que tienen también sus actividades de proteína;
 - 25 (2) unir las secuencias de nucleótidos obtenidas mediante la clonación en la etapa (1) mediante el método de PCR solapante para formar el gen de fusión ItA2B-ureB;
 - (3) construir el gen de fusión ItA2B-ureB en un vector, transformar un huésped, y expresar la proteína recombinante LTA2B-UreB;
 - 30 (4) separar y purificar la proteína recombinante obtenida de la etapa (3).
10. Método para preparar vacuna oral de *Helicobacter pylori* recombinante, que comprende las siguientes etapas:
 - 35 (1) proporcionar a la proteína recombinante obtenida en la reivindicación 9 con alginato de sodio, aceite vegetal, cloruro de calcio, y quitosano, y preparar para dar una preparación encapsulada en microesferas de liberación lenta degradables; y
 - (2) preparar opcionalmente la preparación encapsulada en microesferas de liberación lenta para dar un producto liofilizado.

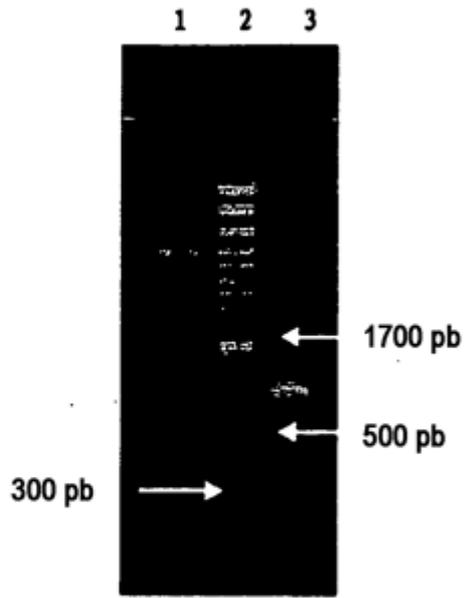


Figura 1

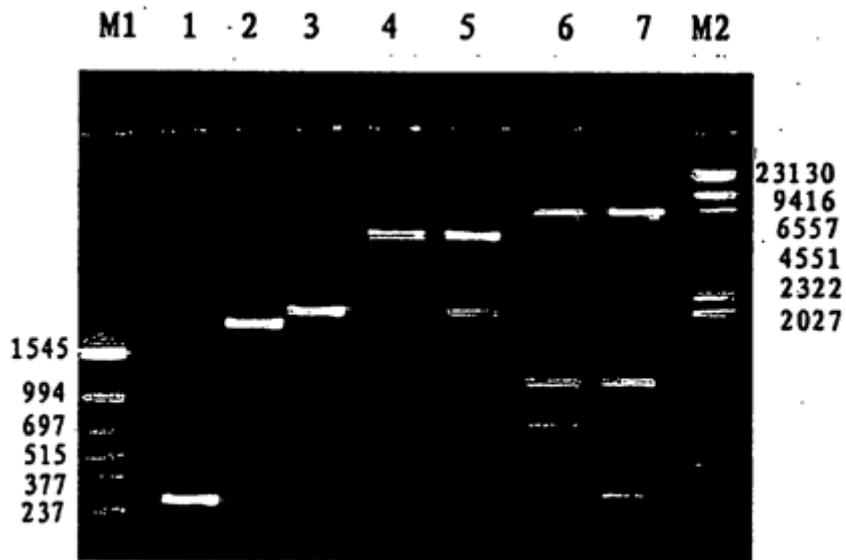


Figura 2

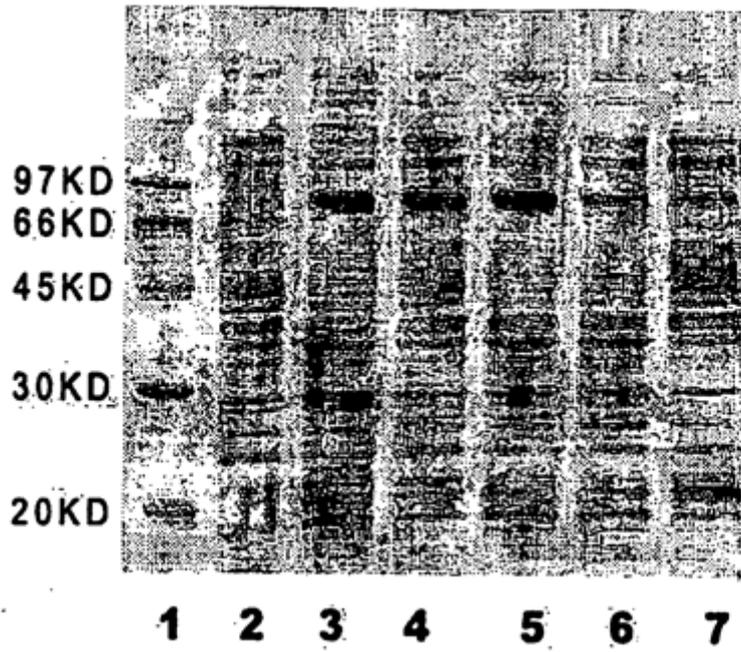


Figura 3

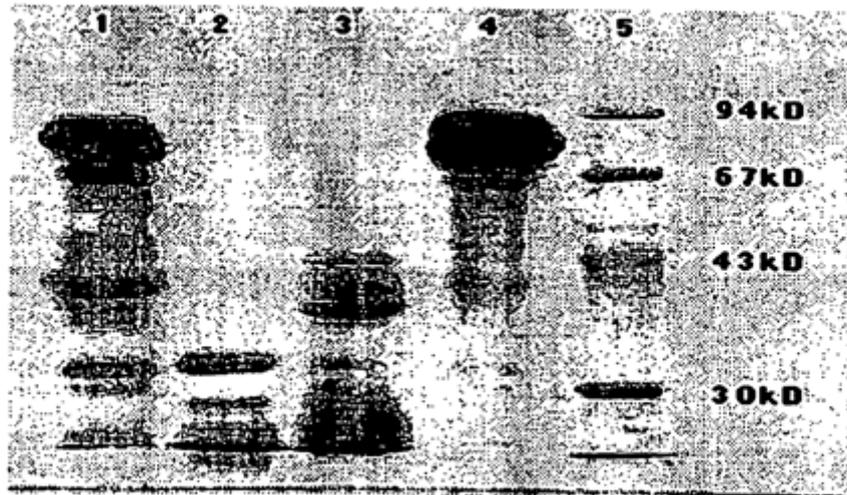


Figura 4

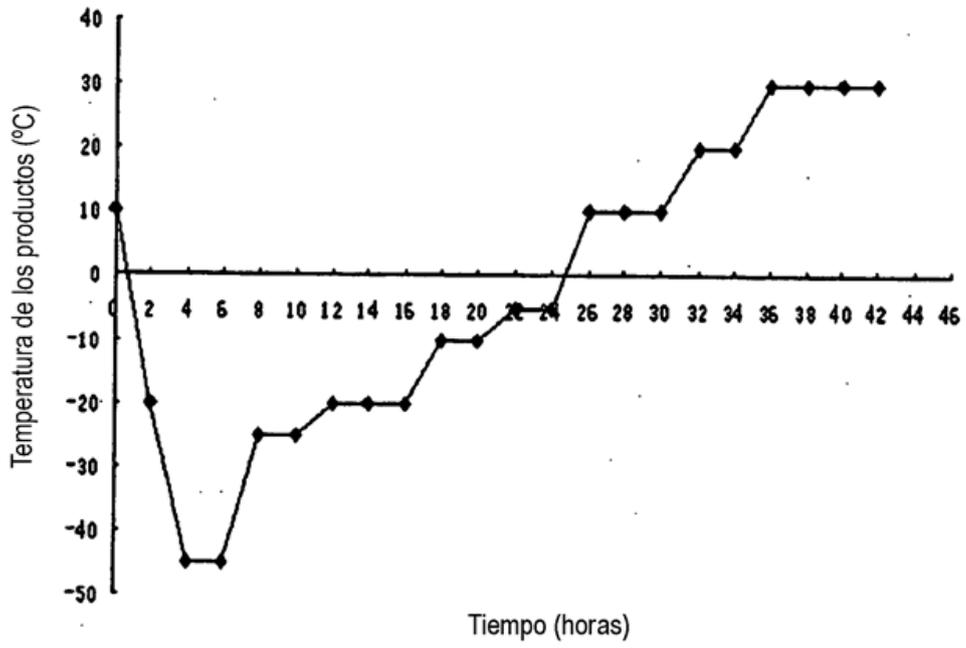


Figura 5