

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 474**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/106** (2006.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

**C12N 9/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.10.2007 E 07819171 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.10.2014 EP 2081594**

54 Título: **Nuevo método para tratar infecciones de H. pylori**

30 Prioridad:

**19.10.2006 EP 06021936**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**26.01.2015**

73 Titular/es:

**IMEVAX GMBH (100.0%)  
Grillparzerstrasse 18  
81675 München, DE**

72 Inventor/es:

**GERHARD, MARKUS;  
SCHMEES, CHRISTIAN y  
PRINZ, CHRISTIAN**

74 Agente/Representante:

**LAZCANO GAINZA, Jesús**

**ES 2 527 474 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

Nuevo método para tratar infecciones de *H. pylori*.

La presente invención se relaciona con polipéptidos que son fragmentos de gamma glutamil transpeptidasa de *Helicobacter pylori* (HPGGT); una composición inmunogénica que lo comprende, una composición inmunogénica que comprende una forma inactivada de HPGGT; el uso de tales polipéptidos y fragmento inactivo de HPGGT; anticuerpos, aptámeros, y espiegémeros dirigidos contra y que se une específicamente a tales polipéptidos y forma inactiva de HPGGT; un método para identificar un candidato a fármaco, un método para desarrollar una vacuna; y el uso de un ligando de HPGGT.

*Helicobacter pylori* es un patógeno gram-negativo que selectivamente coloniza la mucosa gástrica humana y es prevalente en más del 50 % de la población mundial. La infección en la mayoría de los casos persiste toda la vida y ha estado implicada en la patogénesis de úlceras gástricas y duodenales, linfoma de tejido de tipo linfoide asociado a la mucosa gástrica, y cáncer gástrico. Un sello característico de la infección de *Hpylori* es la gastritis activa crónica, caracterizada por la infiltración densa del mucosa por los granulocitos neutrofilicos, linfocitos, y monocitos/macrófagos. Varios estudios han proporcionado evidencias que las células T-auxiliadoras de tipo 1 se aumentan y activan durante la gastritis asociada a *H pylori*- mostrando sobre-regulación in vivo de CD25 y CD69. Además se obtiene una respuesta humoral fuerte para una variedad de antígenos de *H pylori*. A pesar de esta respuesta inflamatoria, la infección no se aclara por el sistema inmunológico del huésped. Por lo tanto, parece que *H. pylori* interfiere con el sistema inmune, pero el mecanismo claro permanece poco conocido hasta ahora.

Algunos estudios se han encargado de este asunto y descrito las forma pasivas y activas de escape de *H. pylori* de la respuesta inmune. La resistencia de *H pylori* a la fagocitosis se ha reportado y depende de los genes de virulencia, tales como *virB7* y *virB11*, que codifican componentes del aparato de secreción de tipo IV. Zabaleta y otros reportaron inhibir la proliferación de la célula T y reducir la expresión de la cadena  $\zeta$  del receptor de la célula T por la arginasa de *H pylori*. Un péptido proinflamatorio de *H pylori* ha mostrado que induce la disfunción linfocítica activando los monocitos para producir radicales de oxígeno reactivo. Estos datos enfatizan la interacción de la bacteria con la respuesta inmune no específica; sin embargo, una respuesta específica de la célula T parece ser decisiva para la eliminación de la bacteria porque las pruebas de vacunación han fracasado en ratones deficientes de células T o interferón-gamma (IFN-gamma).

A pesar de estos esfuerzos, las razones para la persistencia crónica del patógeno gástrico permanecen poco conocidas.<sup>1</sup> Se ha demostrado que las células T CD4 positivas son cruciales para la eliminación bacteriana<sup>2</sup> pero se inhiben en su proliferación por *H. pylori*.<sup>3</sup> En este contexto varios grupos han investigado los efectos inmunosupresivos de las proteínas de *H. pylori*. Knipp y colaboradores parcialmente purificaron una llamada "proteína de inhibición de la proliferación (PIP)", que redujo la proliferación de linfocitos y monocitos independientemente de la factores de virulencia CagA (gen A asociado a citotoxina) y VacA (citotoxina vacuolizante).<sup>4</sup>

En contraste, dos grupos recientemente reportaron que la proliferación de linfocitos se suprimió en presencia de concentraciones altas de VacA purificada.<sup>5,6</sup> Paradójicamente sin embargo, mutantes de *H. pylori* deficientes de Vac no tuvieron defecto en sus propiedades de inhibición de la proliferación.<sup>5</sup> Adicionalmente pronto se ha reconocido que esa inflamación gástrica no se altera o aun aumenta en los pacientes infectados con cepas de *Helicobacter* que expresan VacA.<sup>7,8</sup>

Se demostró anteriormente, que los productos secretados de *H. pylori* inhibieron la proliferación de linfocito T induciendo una detención del ciclo celular en la fase G1.<sup>3</sup> Este efecto fue independiente de los factores de virulencia conocidos que incluyen las proteínas VacA y CagA.

A pesar de este creciente trabajo acerca de los posibles mecanismos de *H. pylori* para escapar de la eliminación por el huésped, aún no se obtiene un éxito sustancial en el desarrollo de medios clínicos para tratar o prevenir específicamente la infección de *H. pylori*.

La solicitud de patente europea EP 1 508 572 A1 describe que la proteína inductora de apoptosis de *Helicobacter pylori* es un complejo de proteína compuesto por asociación de dos tipos de proteínas, que comprende una parte de la secuencia de aminoácido codificada por el gen de g-glutamyl transferasa (HP1118).

La solicitud de patente internacional WO 98/17804 describe la gamma-glutamyltransferasa como un antígeno de *Helicobacter* y las secuencias de ácidos nucleicos que codifican para tal antígeno.

La patente de Estados Unidos 6,380,217 se relaciona con los métodos y composiciones útiles para controlar la bacteria GGT positiva.

El problema subyacente de la presente invención es proporcionar polipéptidos que son adecuados para provocar una

respuesta inmune en un ser animal o humano, en donde tal respuesta inmune confiere protección en contra de la infección de *H. pylori* y cualquier enfermedad asociada con o causada por *H. pylori*.

5 Es un problema además subyacente de la presente invención proporcionar una composición inmunogénica que es adecuada para provocar tal respuesta inmune.

Otro problema subyacente de la presente invención es proporcionar medios para identificar candidatos a fármacos nuevos para tratar y/o prevenir una infección de *H. pylori* así como métodos para tratar y prevenir esta infección.

10 Estos y otros problemas se solucionan por la materia de las reivindicaciones independientes. Las modalidades preferidas se pueden tomar de las reivindicaciones dependientes.

15 El problema subyacente de la presente invención se soluciona en un primer aspecto por un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos, en donde la secuencia de aminoácido del polipéptido es al menos 80 % idéntica a una extensión de aminoácidos consecutivos de la región de HPGGT que consiste en una secuencia de aminoácidos correspondiente a la sec. con núm. de ident.: 1, en donde tal región se define por las posiciones de aminoácidos 410 a 480 de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 1, en donde el polipéptido es adecuado para provocar una respuesta inmune que es capaz de inhibir la actividad catalítica de HPGGT, y  
20 en donde el polipéptido consiste de 10 a 50 aminoácidos.

En una modalidad del primer aspecto el polipéptido consiste de 15 a 30 aminoácidos.

25 En una modalidad del primer aspecto el polipéptido comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en

FDIKPGNPNLYGLVGGDANAI (sec. con núm. de ident.: 3),  
DFSIKPGNPNLYGLVGGDANAIEANKRPL (sec. con núm. de ident.:4) y  
SSMSPTIVLKNKVFLLWGSP (sec. con núm. de ident.:5).

30 El problema subyacente de la presente invención se soluciona en un segundo aspecto por una composición inmunogénica que comprende uno o varios de los polipéptidos de acuerdo con el primer aspecto de la invención, preferentemente para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad causada por o asociada con *H. pylori*.

35 El problema subyacente de la presente invención se soluciona en un tercer aspecto por una composición inmunogénica que comprende una forma enzimáticamente inactiva de HPGGT o un fragmento enzimáticamente inactivo de HPGGT, en donde el fragmento y HPGGT inducen una respuesta de anticuerpo, en donde HPGGT tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 1, en donde tal fragmento consiste de una extensión de aminoácidos contiguos que comprende los aminoácidos 451 y 452 de HPGGT, en donde la respuesta de anticuerpo comprende anticuerpos con un efecto anulador en la supresión dependiente de HPGGT de la proliferación de linfocitos, para el uso en un método para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad causada por o asociada con *H. pylori*.  
40

En una modalidad del segundo y tercer aspecto la respuesta de anticuerpo comprende anticuerpos con un efector inhibidor en HPGGT, con mayor preferencia en la actividad específica de HPGGT.

45 En una modalidad del segundo y tercer aspecto la composición es para promover la activación y proliferación de linfocitos en un paciente que sufre de una infección de *H. pylori* o que está en riesgo de desarrollar una infección con *H. pylori*.

50 En una modalidad del segundo y tercer aspecto la composición comprende uno o varios adyuvantes.

En una modalidad del segundo y tercer aspecto la composición comprende uno o varios antígenos de *H. pylori*.

En una modalidad del segundo y tercer aspecto el antígeno se selecciona del grupo que comprende HpaA, Omp18 y combinaciones de los mismos.  
55

En una modalidad del segundo y tercer aspecto la enfermedad es una enfermedad causada por o asociada con la infección de *H. pylori*.

60 El problema subyacente de la presente invención se soluciona en un cuarto aspecto por el uso de un polipéptido de acuerdo con el primer aspecto para la fabricación de un medicamento.

El problema subyacente de la presente invención se soluciona en un quinto aspecto por el uso de una composición inmunogénica que comprende uno o varios de los polipéptidos de acuerdo con el primer aspecto, o de una composición

- 5 inmunogénica que comprende una forma enzimáticamente inactiva de HPGGT o un fragmento enzimáticamente inactivo de HPGGT, en donde el fragmento y HPGGT inducen una respuesta de anticuerpo, en donde HPGGT tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 1, en donde tal fragmento consiste de una extensión de aminoácidos contiguos que comprende los aminoácidos 451 y 452 de HPGGT, para la fabricación de un medicamento.
- En una modalidad del cuarto y quinto aspecto el medicamento es una vacuna.
- 10 En una modalidad del cuarto y quinto aspecto el medicamento es para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad causada por o asociada con *H. pylori*, con mayor preferencia una enfermedad causada por o asociada con infección de *H. pylori*.
- 15 El problema subyacente de la presente invención se soluciona en un sexto aspecto por el uso de un polipéptido de acuerdo con el primer aspecto para la detección de un anticuerpo en una muestra, en donde el anticuerpo se dirige a HPGGT.
- En una modalidad del sexto aspecto el anticuerpo es capaz de inhibir la actividad enzimática de HPGGT y/o la actividad inhibitora de HPGGT en la proliferación de linfocitos.
- 20 El problema subyacente de la presente invención se soluciona en un séptimo aspecto por un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido de acuerdo con el primer aspecto, de manera que el anticuerpo tiene un efecto inhibitor en la actividad enzimática de HPGGT y un efecto anulador en la supresión dependiente de HPGGT de la supresión de linfocitos de la proliferación de linfocitos.
- 25 El problema subyacente de la presente invención se soluciona en un octavo aspecto por un ácido nucleico que codifica para el anticuerpo de acuerdo con el séptimo aspecto.
- El problema subyacente de la presente invención se soluciona en un noveno aspecto por una molécula de ácido nucleico que se une específicamente a un polipéptido de acuerdo con el primer aspecto o que se une a un fragmento de HPGGT que comprende las posiciones de aminoácidos 410 a 480 de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 1, en donde tal fragmento consiste de una extensión de aminoácidos contiguos que comprende los aminoácidos 451 y 452 de HPGGT, en donde la molécula de ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en aptámeros y espejémeros, en donde el ácido nucleico tiene un efecto inhibitor en la actividad enzimática de HPGGT y un efecto anulador en la supresión dependiente de HPGGT de la proliferación de linfocitos.
- 30
- 35 El problema subyacente de la presente invención se soluciona en un décimo aspecto por el uso de un anticuerpo de acuerdo con el séptimo aspecto para la fabricación de un medicamento.
- 40 El problema subyacente de la presente invención se soluciona en un onceno aspecto por el uso de un ácido nucleico de acuerdo con el noveno aspecto para la fabricación de un medicamento.
- El problema subyacente de la presente invención se soluciona en el 12<sup>o</sup> aspecto por un método para identificar un candidato a fármaco para el tratamiento de una enfermedad que comprende las etapas de evaluar los candidatos a fármacos.
- 45
- a. efector inhibitor en la actividad específica de la gamma-glutamil transpeptidasa de *H. pylori* y  
b. efecto anulador en la supresión dependiente de HPGGT de la proliferación de linfocitos.
- 50 El problema subyacente de la presente invención se soluciona en el 13<sup>o</sup> aspecto por un método para desarrollar una vacuna que comprende las etapas de
- a) proporcionar composiciones inmunogénicas que comprende HPGGT o al menos un fragmento de la misma;  
b) inmunizar animales con las composiciones inmunogénicas y con esto generar anticuerpos;  
55 c) evaluar los anticuerpos por su efecto inhibitor en la actividad específica de la gamma-glutamil transpeptidasa de *H. pylori* y su efecto anulador en la supresión dependiente de HPGGT de la proliferación de linfocitos y  
d) seleccionar una composición inmunogénica capaz de inducir una respuesta de anticuerpo que comprende anticuerpos con un efecto anulador en la supresión dependiente de HPGGT de la proliferación de linfocitos.
- 60 El problema subyacente de la presente invención se soluciona en el 14<sup>o</sup> aspecto por el uso de un ligando de HPGGT para la fabricación de un fármaco para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad, en donde el ligando inhibe significativamente la actividad de HPGGT y anula la supresión dependiente de HPGGT de la proliferación de linfocitos,

en donde el ligando es un anticuerpo de acuerdo con el séptimo aspecto, o un ácido nucleico de acuerdo con el noveno aspecto, en donde la enfermedad se causa por o asocia con *H. pylori*.

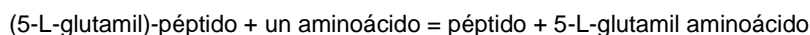
En una modalidad del 14<sup>o</sup> aspecto la enfermedad se causa por o asocia con infección de *H. pylori*.

En una modalidad del 14<sup>o</sup> aspecto la proliferación de linfocitos se evalúa en un ensayo de proliferación de linfocitos.

Sin deseos de estar limitado a ninguna teoría el presente inventor ha encontrado sorprendentemente que un ligando para la gamma glutamil transpeptidasa de *Helicobacter pylori* (HPGGT) (E.C. 2.3.2.2.) se puede usar para el tratamiento y/o prevención de las infecciones de *H. pylori*, particularmente trastornos gastro duodenales, en donde el ligando es un inhibidor de la actividad catalítica de la HPGGT y restaura la proliferación de linfocitos en comparación con un control que se suprime en presencia de esta enzima. Además, el presente inventor ha encontrado que cuando se incubaba conjuntamente con HPGGT la proliferación de linfocitos se bloquea por la actividad específica de HPGGT conduciendo a la detención del ciclo celular en G1 en los linfocitos y con esto inhibiendo la proliferación de linfocitos. Consecuentemente, la inhibición de la actividad específica de HPGGT anula la inhibición de la proliferación de linfocitos y en consecuencia hace que sea imposible para *H. pylori* escapar del sistema inmune del huésped. Así, el uso de los ligandos como se sugiere por la presente invención previene o al menos reduce sustancialmente la colonización de *H. pylori* dentro del huésped/paciente. Por último, el presente inventor ha encontrado que la actividad catalítica de la gamma glutamil transpeptidasa (GGT) de *H. pylori* es necesaria para la supresión de la proliferación de linfocitos, particularmente la proliferación de células T dentro del huésped. Esto se evidenció claramente mostrando que la bacteria mutante deficiente en la actividad GGT pierde la habilidad de anular la proliferación de linfocitos, y al mismo tiempo fueron incapaces de colonizar ratones. El efecto inhibidor en los linfocitos estaba completamente presente con HPGGT recombinante. El análisis de sus efectos en la transducción de señales en células T sugiere una alteración de la vía de señalización Ras conduciendo a la inducción de una detención del ciclo celular en G1. Es importante notar que cada cepa de *H. pylori* posee HPGGT, y orientación de esta enzima por ligandos inhibidores proporcionará una terapia nueva aplicable a cada infección de *H. Pylori*, evitando de ese modo los problemas asociados con la terapia de antibiótico (resistencia, efectos secundarios, selección de mutaciones etc). De acuerdo con la presente invención, preferentemente la protección contra la infección de *H. pylori* se confiere inhibiendo la actividad catalítica de HPGGT y rompiendo de ese modo la supresión inmune que de cualquier otra forma impide una respuesta inmune eficaz contra *H.pylori*.

HPGGT se distribuye ampliamente entre los animales, plantas y bacterias. Representa una proteína heterodimérica, la cual se traduce como una cadena sencilla de polipéptido y escinde post transduccionalmente en dos subunidades con diferentes pesos moleculares. La forma de la enzima en mamífero es una proteína unida a membrana, que se expresa principalmente en la superficie luminal de las glándulas y túbulos del cuerpo entero. La localización celular de algunas GGTs bacterianas que incluyen el homólogo de *Helicobacter pylori* es diferente de la enzima de mamífero. La HPGGT se ha demostrado anteriormente que se secreta en el medio extracelular (Bumann y otros 2002). Además, una alineación de las secuencias de aminoácidos de diferentes homólogos de GGT reveló baja homología de 22 % entre HPGGT y GGTs humano y de otros mamíferos pero la homología más alta hacia los homólogos bacterianos. Otra diferencia importante entre HPGGT y homólogos de otras especies es la falta de residuos GY en el extremo C-terminal de la HPGGT (Chevalier y otros 1999). Así, son evidentes las diferencias sustanciales con respecto a la localización celular y estructura de la proteína entre el HPGGT y sus homólogos de mamíferos.

La gamma-glutamilttransferasa se conoce además como glutamil transpeptidasa; a-glutamilt transferasa; g-glutamilt peptidilttransferasa; g-glutamilt transferasa; g-GPT; g-GT; g-GTP; L-g-glutamilt transferasa; L-g-glutamilt transferasa; L-glutamilt transferasa; GGT; g-glutamilt transferasa. La actividad específica (catalítica) es la transferencia del residuo glutamil como se indica más abajo:



Esta reacción o la capacidad para realizar tal reacción se denomina además en la presente descripción como la actividad enzimática de HPGGT o la actividad específica de HPGGT.

La actividad GGT se puede evaluar con métodos conocidos por aquellos con experiencia en la técnica (por ejemplo, usando L-gamma-glutamilt-p-nitroanilida como sustrato donador; ver más abajo). El ensayo de proliferación de linfocitos en presencia o ausencia de HPGGT y/o el ligando se puede conducir como se describe en detalle en la presente descripción.

GGT se ha descrito anteriormente por otros grupos como un factor de *H. pylori* importante para la colonización *in vivo*.<sup>11,13</sup> Sin embargo, la causa subyacente de esta observación permanece poco conocida. La presente invención proporciona clara evidencia de una inhibición de la proliferación de linfocitos T humanos dependiente de GGT y la inducción de la detención en G1 por *H. pylori*. Esto fue demostrado por una parte por el uso de mutantes isogénicos GGT knock out de las bacterias, que fracasaron para suprimir la proliferación de las células T humanas primarias

estimuladas por el antígeno, así como de PBMC. Por otra parte un HPGGT recombinante expresado en *E. coli* inhibió la proliferación de células T en ausencia de otras proteínas secretadas por *H. pylori*. Curiosamente, los datos descritos muestran que los GGT de mamífero carecieron de este efecto inhibitor. Como se mencionó anteriormente, se han reportado diferencias en la estructura y localización de mamífero y HPGGT. Los resultados apuntan hacia distinciones adicionales en los mecanismos catalíticos y/o la especificidad de sustrato de mamífero y HPGGT siendo responsable de la incapacidad de GGT de mamífero para inhibir la proliferación de linfocitos.

Estudios estructurales y experimentos de mutagénesis se han usado para identificar residuos de serina 451 y 452 como esenciales para la actividad catalítica de la GGT.<sup>21</sup> Se demuestra en la presente descripción que la mutagénesis sitio-dirigida de la serina 451/452 de HPGGT a alanina resulta en una anulación completa de su actividad catalítica y particularmente inhibitoria hacia los linfocitos lo que está en contraste con la enseñanza profesional de la técnica anterior donde la posición de aminoácido 380 (T380) se reporta que es crucial para la actividad catalítica de HPGGT<sup>31</sup>. Como consecuencia, la incubación de la HPGGT con el inhibidor de GGT acivicina suprime completamente la actividad catalítica, así como el efecto inhibitor de la enzima. Así, los datos demuestran que la integridad estructural del dominio catalítico de HPGGT es un requisito previo necesario para su efecto inmunosupresor. En consonancia con un papel importante de la GGT de *H. pylori* durante la colonización *in vivo*<sup>11,13</sup>, encontramos que esta enzima es catalíticamente activa aun en los valores de pH bajos presentes en la mucosa gástrica de huésped.

Está bien establecido que las células epiteliales en el estómago humano forman una barrera continua que restringe el movimiento de las moléculas entre los compartimentos internos y externos. Adicionalmente la difusión pasiva de las macromoléculas a través del espacio paracelular de esta barrera se previene por varios mecanismos, que incluyen uniones apretadas y adherentes. Así, se plantea la cuestión de cómo la proteína GGT secretada por *Helicobacter pylori* puede interactuar con el sistema inmune del huésped en el otro lado de la barrera epitelial para suprimir la proliferación de células T. En este contexto se ha demostrado anteriormente que HP es capaz de debilitar la función de barrera del epitelio gástrico por varios mecanismos. Adicionalmente, se ha demostrado antes la alteración de los complejos de unión epiteliales de proteínas VacA y CagA de HP, así como el transporte aumentado de la proteína transcitótica a través de la barrera epitelial inducida por *H. pylori* ureasa. Estos mecanismos finalmente conducen a la presencia aumentada de proteínas de HP en la lámina propia y su interacción con las células del sistema inmunológico que infiltran la mucosa gástrica como resultado de la infección por *H. pylori*. En favor de una afección de células T en la mucosa gástrica por la HPGGT los resultados muestran una respuesta de anticuerpo sérico pronunciada hacia este factor de virulencia en pacientes infectados con HP pero no en los de control no infectados. Esto apoya la idea de un procesamiento antigénico de los componentes proteicos GGT y la presentación de estos antígenos a los componentes del sistema inmune que incluyen los linfocitos T en la mucosa gástrica. Así, la supresión de la proliferación de linfocitos T en la mucosa gástrica a través de HPGGT puede contribuir a los mecanismos de evasión inmune de *Helicobacter pylori* facilitando su persistencia crónica en el estómago humano.

Los resultados de la investigación subyacente a la presente invención revelan que los mecanismos importantes de la activación de células T están intactos durante la incubación con sobrenadantes de *H. pylori* silvestre y además con HPGGT recombinante. Esto está en consonancia con un estudio previo del presente inventor que muestra que la expresión de los antígenos de superficie celular CD69 y CD25 (cadena  $\alpha$  del receptor de IL-2) no se redujeron en presencia de sobrenadantes de *H. pylori*.<sup>3</sup> Adicionalmente, se demuestra que la influencia supresora de HPGGT en los linfocitos se media por un mecanismo independiente de la apoptosis como la exposición de fosfatidilserina, medida por tinción con Anexina V-FITC, no se aumentó en presencia de sobrenadantes de *H. pylori* y HPGGT recombinante. Se ha descrito anteriormente que HPGGT induce el estrés oxidativo y la apoptosis en las células epiteliales gástricas.<sup>12,16</sup> El efecto de la enzima en las células del sistema inmunológico, sin embargo, no se determinó anteriormente, y las diferencias observadas pueden reflejar diferencias entre las células objetivo.

El presente inventor analizó la interferencia de HPGGT con la progresión del ciclo celular en las células T y encontró que HPGGT inhibe la proliferación de los linfocitos provocando una detención en la fase G1 del ciclo celular. La detención en G1 se caracterizó por cantidades aumentadas de inhibidor p27 de Cdk, así como niveles celulares reducidos de las proteínas ciclinas. Las vías dependientes de Ras y PI3K son de vital importancia durante la inducción, síntesis y ensamblaje de las ciclinas tipo D con su pareja catalítica.<sup>22-23</sup> La activación de la señalización de Ras induce la transcripción de Ciclina D a través de una cascada de proteína que implica c-Raf y otras quinasas.<sup>24</sup> Adicionalmente, se establece que la inducción de la señalización de Ras conduce a una síntesis aumentada de la proteína c-Myc<sup>25</sup> que juega un papel importante durante la regulación del ciclo celular, crecimiento celular y transformación.<sup>26</sup> Estudios anteriores demostraron que la señalización de PI3K procede independiente de la señalización Ras en las células T.<sup>17</sup> Mientras que el estado de activación de mediadores importantes de señalización de PI3K (AKT, p70S6K y FoxO3) no se cambió en presencia de HPGGT, encontramos niveles reducidos de fosforilación de c-Raf y proteína c-Myc en las células incubadas con HPGGT. Así, los datos sugieren que la alteración de la señalización dependiente de Ras, pero no de PI3K por GGT de *H. pylori* juega un papel durante la inducción de una detención del ciclo celular en las células T conduciendo a anular la proliferación celular.

Otra cuestión importante es cómo una enzima como la HPGGT puede influir en los eventos de señalización intracelular

que conducen a la detención del ciclo celular y la inhibición de la proliferación. Durante la reacción de transpeptidación, GGT cataliza la transferencia de una porción de  $\gamma$ -glutamil de un donante a un sustrato aceptor.<sup>27</sup> Por el análisis de la reducción sistemática de aminoácidos el presente inventor encontró que el efecto inhibitor de la HPGGT se abolió completamente en ausencia del aminoácido glutamina del medio, sugiriendo que el efecto inhibitor de GGT a partir de *H. pylori* se media indirectamente por la formación de metabolitos durante la transpeptidación. Esto se apoya por la observación de los presentes inventores que la preincubación del medio de cultivo con HPGGT y posterior inactivación de la enzima antes de la adición a las células es suficiente para la inhibición de la proliferación de linfocitos.

Estudios anteriores describieron varios factores de *H. pylori* distintos de GGT, que inhibieron la proliferación de los linfocitos T humanos. Wang y colaboradores mostraron que *H. pylori* en una MOI de 300 (300 bacterias por célula T) inhibió la proliferación de T células por inducción de apoptosis. Sin embargo, podría ser cuestionable si tales altas cantidades de bacterias entran en contacto con las células T en la lámina propia del estómago humano. En una publicación anterior (*Gastroenterology* 2005;128(5):1327-39) el presente inventor demostró que aun una MOI de 1 más baja 300 veces (1 bacteria por célula T) fue suficiente para inhibir la proliferación de linfocitos en el sistema. Cuando la concentración de los sobrenadantes de cultivo HP incubados con linfocitos se elevó por encima de 100  $\mu\text{g/ml}$  se observó apoptosis en cantidades comparables como Wang y otros. Esto sugiere que el efecto inhibitor de HP hacia los linfocitos descritos en la presente descripción es más pronunciado que y diferente de los mecanismos descritos por los presentes inventores. Otro estudio por Zabaleta y otros describieron la inhibición de la proliferación de células T por la proteína arginasa citoplasmática de HP<sup>30</sup>. Los autores usaron lisados de células enteras de HP que contienen proteínas citoplasmáticas y unidas a membrana de las bacterias. En contraste el presente inventor usó sobrenadantes de cultivo de HP que contienen sus proteínas secretadas. Ya que la arginasa no se secreta por HP los posibles efectos inhibidores de esta enzima hacia las células T no se pudieron detectar en el sistema usado aquí y es poco probable que se produzca in vivo.

Un trabajo de Gebert y otros sugirió que la citotoxina vacuolizante A (VacA) secretada por *H. pylori* inhibió la proliferación de las células T. Los autores usaron los sobrenadantes bacterianos en una concentración 25 veces más alta (250  $\mu\text{g/ml}$ ) que la que se usó en el presente trabajo (10  $\mu\text{g/ml}$ ). En un estudio anterior el presente inventor demostró que altas concentraciones de sobrenadante de cultivo de HP ( $\geq 100$   $\mu\text{g/ml}$ ) indujeron cantidad significativa de apoptosis en los linfocitos. Adicionalmente, la presencia o ausencia de VacA no tuvo influencia en el efecto inhibitor de HP hacia el sistema de los linfocitos de los presentes inventores en el sistema de los presentes inventores (*Gastro* 2005).

Así, a pesar de otras formas de inhibición de las células T por *H. pylori* descritas anteriormente, GGT secretada por la bacteria es necesaria y suficiente para inhibir la proliferación de células T en el sistema que se usó aquí.

En sumario, los datos subyacentes de la presente solicitud proporcionan un nuevo mecanismo para la evasión inmune aplicada por *H. pylori*, haciendo uso de una proteína secretada para inhibir la progresión del ciclo celular de las células inmunes efectoras. Se muestra que la enzima GGT es responsable de la inhibición de la proliferación de células T por *H. pylori*, como el efecto inhibitor se suprimió completamente en mutantes deficientes de GGT de las bacterias. Este efecto depende claramente de la actividad catalítica de GGT, como los mutantes enzimáticamente inactivos de la proteína recombinante HPGGT carecieron de la capacidad para suprimir la proliferación de células T. Adicionalmente, se demuestra que una detención del ciclo celular en la fase G1 de las células T se indujo sólo en la presencia de GGT de *H. pylori*. De nuevo sin deseos de estar limitado a ninguna teoría, los resultados adicionales apuntan hacia la alteración de la señalización dependiente de Ras, pero no de PI3K por HPGGT como la causa de la detención en G1 y proliferación suprimida de células T. La identificación de HPGGT como un factor inhibitor de los linfocitos forma la base biológica para las observaciones en los modelos animales, mostrando un papel importante de HPGGT para la colonización de *H. pylori*. El HPGGT y su posible papel en la colonización del huésped se discuten dentro de la WO 00/01825 y WO98/17804. Ambos documentos, sin embargo, no presentan evidencia de que la actividad HPGGT es la responsable de la supresión del sistema inmune del huésped y ellos no dicen nada sobre el impacto de la HPGGT en la proliferación de célula T y la supresión inmune dentro del huésped.

El presente inventor ha encontrado que no sólo HPGGT como tal, de preferencia la HPGGT silvestre que tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 1, puede usarse como un antígeno para la generación de anticuerpos, aptámeros y espiegélmeros, donde preferentemente cada uno se une específicamente a la misma, y son adecuados para inhibir la actividad específica de HPGGT y/o un efecto anulador en la supresión dependiente de HPGGT de la supresión de linfocitos de la proliferación de linfocitos, sino además fragmentos distintos de los mismos.

En consecuencia, en un aspecto, la presente invención se relaciona con polipéptidos específicos tal como se define en las reivindicaciones. Tales polipéptidos comprenden una secuencia de aminoácidos que es idéntica a o corresponde a una parte o extensión de aminoácidos de regiones distintas de HPGGT. Preferentemente la secuencia de aminoácidos de HPGGT comprende la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la sec. con núm. de ident.:1.

5 Como se usa en la presente descripción preferentemente una secuencia de aminoácidos es idéntica a otra secuencia de aminoácidos si la secuencia o el orden de los aminoácidos es el mismo tanto en términos de la naturaleza de los aminoácidos como su posicionamiento relativo con respecto al otro. En otra modalidad, la secuencia amino primaria de la secuencia que son idénticas, es la misma.

10 Como se usa en la presente descripción preferentemente una secuencia de aminoácidos es idéntica a otra secuencia de aminoácidos si la secuencia o el orden de los aminoácidos es el mismo tanto en términos de la naturaleza de los aminoácidos como su posicionamiento con respecto al otro. En otra modalidad, la secuencia primaria de aminoácidos de las secuencias que se corresponden mutuamente es la misma, por la cual el contexto general de ambas secuencias de aminoácidos correspondientes es ya sea la misma o es diferente El contexto general de un aminoácido se define por el (los) aminoácido(s) que flanquea(n) uno o ambos extremos de la secuencia de aminoácidos.

15 Se reconoció por la persona experta en la técnica que las secuencias que son idénticas o que se corresponden mutuamente tienen una homología de secuencia de al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 %.

20 En una modalidad el polipéptido de acuerdo con la presente invención comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es idéntica o corresponde a una extensión de aminoácidos consecutivos de HPGGT. Preferentemente, y aplicable a cualquier modalidad y aspecto de la presente invención, HPGGT tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la sec. con núm. de ident.:1. Será reconocido por la persona con experiencia en la técnica que pueden existir variantes y mutaciones de HPGGT que se podrán comprender por el término HPGGT. Está además dentro de la presente invención que si la secuencia de HPGGT es diferente de la de HPGGT como se especifica en la sec. con núm. de ident.: 1, que se describe en la presente descripción en relación con HPGGT que tiene la secuencia de aminoácidos como se especifica en sec. con núm. de ident.: 1 es también aplicable a tal forma diferente de HPGGT. Más específicamente, la persona con experiencia en la técnica identificará el (los) aminoácido(s) en tales formas diferentes, que corresponde(n) en su posición, naturaleza química y/o función a uno que se identifica y dirige, respectivamente, en HPGGT que tiene la secuencia de aminoácidos como se especifica en la sec. con núm. de ident.: 1.

30 Como se describe en la presente descripción, el polipéptido de acuerdo con la presente solicitud es idéntico a o corresponde a la secuencia de aminoácidos de regiones distintas de HPGGT. Se describe que tal región es la región definida por las posiciones de aminoácidos 150 a 200 de la secuencia de aminoácido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.:1. En otra modalidad, tal región es la región definida por las posiciones de aminoácidos 410 a 480 de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la sec. con núm. de ident.:1.

35 El presente inventor ha encontrado sorprendentemente que la parte de HPGGT definida por los aminoácidos 150 a 200, y la parte de HPGGT definida por los aminoácidos 410 a 480 es particularmente ventajosa para ser usada como un antígeno o una vacuna para la generación de anticuerpos que son capaces de inhibir la actividad catalítica de HPGGT proporcionando así el requisito previo para que una respuesta inmune se provoque contra *H. pylori*, o al menos HPGGT, en un organismo que se infecta o está en riesgo de ser infectado por *H. pylori*.

40 Sin deseos de estar limitado por ninguna teoría, el presente inventor supone tanto que la región como se define por las posiciones de aminoácidos 150 a 200 y las posiciones de aminoácidos 410 a 480 tienen una relación particular con la actividad enzimática de HPGGT. Más específicamente, la región de HPGGT como se define por las posiciones de aminoácidos 410 a 480 se dice que se relaciona o está cerca del centro activo de HPGGT. Más específicamente, esta región de HPGGT comprende la región bucle en contacto directo con el centro activo y parte del propio centro activo. Así el bloqueo de esta parte de HPGGT es un medio adecuado para inhibir la actividad enzimática de HPGGT, presumiblemente por el bloqueo de la entrada del (de los) sustrato(s) de la actividad catalítica de HPGGT. El mismo es, en principio, además cierto para la región de HPGGT como se define por las posiciones de aminoácidos 150 a 200. Esta región de posiciones de aminoácidos 150 a 200 de HPGGT de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 1 se relaciona con o forma (parte de) el bucle fuera del centro activo de HPGGT, sin embargo, está en proximidad espacial cercana al bolsillo de unión del sustrato. Teniendo en cuenta esto, cualquier molécula que específicamente interfiere con estas regiones es un agente que se puede usar como se expone en la presente descripción en más detalle en relación con un anticuerpo que tiene este tipo de características de unión. Aparte de los anticuerpos, se pueden generar y usar aptámeros péptidos, anticualinas, aptámeros y espiegélmero como se describe en la técnica anterior, respectivamente, para varios propósitos descritos en la presente descripción para los anticuerpos.

55 La presente solicitud proporciona así polipéptidos cuya secuencia corresponde o es idéntica a las siguientes posiciones de aminoácidos:

60 (a)  $(150 + n)$  a  $(150 + n + m)$ , por lo cual  $n$  es cualquier número entero de 0 a 35 y  $m$  es cualquier número entero de 15 a 30. Se entenderá que la posición definida así es la que resulta de cualquier combinación de  $n$  y  $m$ . Se entenderá además que tal combinación es preferentemente limitada en la medida en que la posición superior que está así definida es de aproximadamente 200; la posición definida por  $(150 + n)$  además se



conoce como la posición inferior; y la posición definida por  $(150 + n + m)$  se conoce además como la posición superior.

(b)  $(410 + n)$  a  $(410 + n + m)$ , por lo cual  $n$  es cualquier número entero de 0 a 55 y  $m$  es cualquier número entero de 15 a 30. Se entenderá que las posiciones definidas así son aquellas que resultan de cualquier combinación de  $n$  y  $m$ . Se entenderá además que tal combinación es preferentemente limitada en la medida en que la posición superior que se define así es aproximadamente 200; la posición definida por  $(410 + n)$  se conoce además como la posición inferior; y la posición definida por  $(410 + n + m)$  se conoce como la posición superior.

En una modalidad adicional, los polipéptidos de acuerdo con la presente invención son fragmentos de HPGGT, preferentemente fragmentos inmunogénicos de HPGGT y con mayor preferencia fragmentos inmunogénicos de HPGGT que son adecuados para provocar una respuesta inmune en los organismos huésped, preferentemente una respuesta de anticuerpos, por lo cual el anticuerpo tiene un efecto inhibitor en HPGGT, con mayor preferencia en la actividad específica de HPGGT y/o un efecto anulador en la supresión dependiente de HPGGT de la proliferación de linfocitos. Preferentemente el fragmento inmunogénico de acuerdo con la invención comprende los aminoácidos 451 y 452 o de la HPGGT. El fragmento puede ser de cualquier longitud. Sin embargo, se usan los péptidos de 10 a aproximadamente 50 residuos de aminoácidos, con mayor preferencia de 10 a 40, 10 a 30, o con máxima preferencia de 10 a 20. Los algoritmos de predicción de epítipo para el diseño de vacunas basada en péptidos se aplican aquí. Como se usa preferentemente en la presente descripción un organismo huésped es un animal, preferentemente un mamífero, o un ser humano que, preferentemente son capaces de desarrollar una respuesta inmune contra un antígeno.

Como se usa en la presente descripción preferentemente, un aminoácido es un alfa-aminoácido. Como se usa preferentemente en la presente descripción, un aminoácido es ya sea un D- o un L-aminoácido, preferentemente un L-aminoácido. Todavía preferentemente un aminoácido es ya sea un aminoácido de origen natural.

El presente inventor encontró sorprendentemente además que la mutagénesis de los residuos de serina 451 y/o 452 a alanina de la HPGGT suprimió completamente la actividad enzimática de HPGGT recombinante y anuló su inhibición de la proliferación de células T. Sin embargo, la sustitución del residuo serina 385 (S385A) no redujo el efecto inhibitor dependiente de HPGGT en la proliferación de células T, aunque la actividad catalítica de esta HPGGT mutante fue significativamente reducida (es decir, aproximadamente 50 %). En consecuencia, una sustancia fármaco adecuada para el tratamiento de la infección de *H. pylori* tiene que cumplir dos requisitos, es decir: (i) que tiene que exhibir un efecto inhibitor en la actividad catalítica de HPGGT y, además, tiene que restablecer la proliferación de las células T cuando se incuba con HPGGT. El método eficaz de acuerdo con la invención para la identificación de candidatos a fármacos adecuados comprende en consecuencia, ambas evaluaciones.

A la luz de este hallazgo otro aspecto de la presente invención se relaciona con el uso de una forma inactivada de HPGGT tal como se define en las reivindicaciones.

Una forma inactivada de HPGGT es en una modalidad una HPGGT que está desprovista de la actividad enzimática de HPGGT como se indica en la presente descripción. Será reconocido por las personas con experiencia en la técnica que existen varias formas de proporcionar tal forma inactivada de HPGGT, incluyendo delecciones de uno o de varios aminoácidos, alteración de uno o más aminoácidos, siempre en comparación con la HPGGT enzimáticamente activa. Una modalidad de una forma inactivada de HPGGT es una que está desprovista de los aminoácidos serina en las posiciones 451 y 452 de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la sec. con núm. de ident.:1. En una modalidad la forma inactivada de HPGGT todavía es capaz de provocar una respuesta inmune como se describe en la presente descripción, preferentemente una respuesta de anticuerpo en un animal y/o un ser humano, que comprende anticuerpos con un efecto inhibitor en HPGGT silvestre, con mayor preferencia en la actividad específica de HPGGT y/o un efecto anulador en la supresión dependiente de HPGGT de la proliferación de linfocitos. Como se usa preferentemente en la presente descripción el término actividad específica de HPGGT se usa de manera sinónima a la actividad enzimática y más específicamente la actividad enzimática de HPGGT como se describe en la presente descripción. Una modalidad adicional de una forma inactiva de HPGGT es una HPGGT que tiene la secuencia de aminoácidos silvestre pero el efecto enzimático se suprime por la adición de un inhibidor de la actividad enzimática de HPGGT. Tal inhibidor puede ser un anticuerpo, espiegélmero, aptámero o cualquier molécula que priva la HPGGT de factores, que incluyen los iones necesarios para la actividad enzimática de HPGGT.

Se entenderá que los polipéptidos, las formas inactivadas de HPGGT y HPGGT se denominan además en la presente descripción como moléculas objetivo, particularmente en relación con la generación de anticuerpos, aptámeros y espiegélmeros que se unen específicamente a ellas.

Un aspecto adicional de la presente invención se relaciona con los anticuerpos dirigidos contra los polipéptidos de acuerdo con la presente invención como se define en las reivindicaciones, las formas inactivas de HPGGT o HPGGT,

preferentemente HPGGT como la silvestre que típicamente tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 1.

5 Los anticuerpos que se usan preferentemente en la presente descripción comprenden tanto anticuerpos monoclonales como anticuerpos policlonales, la fabricación y generación, respectivamente, que es bien conocido por una persona con experiencia en la técnica.

10 La fabricación de un anticuerpo específico para el objetivo se conoce por la persona con experiencia en la técnica y, por ejemplo, se describe en Harlow, E., y Lane, D., "Antibodies: A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, (1988). Preferentemente, los anticuerpos monoclonales se pueden usar en relación con la presente invención, los que se pueden fabricar de acuerdo con el protocolo de Köhler y Milstein y desarrollos adicionales basados en estos.

15 Los anticuerpos como se usan en la presente descripción, incluyen, pero sin limitarse a, anticuerpos completos, fragmentos de anticuerpo o derivados tales como fragmentos Fab, fragmentos Fc y anticuerpos de cadena sencilla, o anticalinas, siempre y cuando sean adecuados y capaces de unir al objetivo. Aparte de los anticuerpos monoclonales además se pueden usar y/o generar los anticuerpos policlonales. La generación de anticuerpos policlonales se conoce además por una persona con experiencia en la técnica y, por ejemplo, se describe en Harlow, E., y Lane, D., "Antibodies: A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, (1988).  
20 Preferentemente, los anticuerpos usados para propósitos terapéuticos son anticuerpos humanizados o humanos.

25 Los anticuerpos, que se pueden usar de acuerdo con la presente invención, pueden tener uno o varios marcadores o etiquetas. Tales marcadores o etiquetas pueden ser útiles para detectar el anticuerpo ya sea en su aplicación diagnóstica o en su aplicación terapéutica. Preferentemente los marcadores y etiquetas se seleccionan del grupo que comprende avidina, estreptavidina, biotina, oro y fluoresceína y se usan, por ejemplo, en los métodos ELISA. Estos y otros marcadores, así como los métodos son por ejemplo descritos en Harlow, E., y Lane, D., "Antibodies: A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, (1988). Adicionalmente o alternativamente, los anticuerpos, así como cualquier otra pareja antagonista o interacción al objetivo descritos en la presente descripción puede ser un antagonista etiquetado como se describe más generalmente en la presente descripción.  
30

35 Está además dentro de la presente invención que la etiqueta o marcador exhibe una función adicional aparte de la detección, tal como la interacción con otras moléculas. Tal interacción puede ser, por ejemplo, la interacción específica con otros compuestos. Estos otros compuestos pueden ser ya sea los inherentes al sistema donde se usa el anticuerpo tal como el cuerpo humano o animal o para la muestra que se analiza usando el anticuerpo respectivo. Los marcadores adecuados pueden ser, por ejemplo, biotina o fluoresceína con las parejas de interacción específicas de los mismos tales como avidina y estreptavidina y el tipo que está presente en el compuesto o estructura respectiva para interactuar con el anticuerpo así marcado o etiquetado. De nuevo esto aplica además a otras parejas de interacción al objetivo descritas en la presente descripción como aptámeros y espieglómeros.

40 En una modalidad el anticuerpo es un anticuerpo, preferentemente un anticuerpo monoclonal, con una actividad específica contra un epítipo de HPGGT que comprende los aminoácidos 451 y/o 452 de la HPGGT recombinante. En otra modalidad, el anticuerpo se estará dirigiendo a un epítipo espacialmente cerca a estas posiciones de aminoácidos, preferentemente dirigiéndose y uniéndose específicamente a un bucle adyacente a dichas posiciones, con mayor preferencia los epítipos se definen por o contienen en la extensión de HPGGT definida por las posiciones de los aminoácidos 150 a 200 de HPGGT de la sec. con núm. de ident.:1, con mayor preferencia las posiciones 174 - 190, o por posiciones de aminoácidos 410 a 480 de HPGGT de la sec. con núm. de ident.:1, con mayor preferencia las posiciones 423 a 443, y derivados de los mismos bajo la condición que se demuestran prácticamente reactividad inmune idéntica.  
45

50 Preferentemente, los anticuerpos de la invención inhiben la actividad específica de HPGGT y suprimen la inhibición dependiente de HPGGT de la proliferación de linfocitos dentro del huésped por al menos 50 %, con mayor preferencia por al menos 70 %, con máxima preferencia al menos 80 o 90 %. Preferentemente además, los anticuerpos de acuerdo con la presente invención exhiben, además, un efecto inhibitor en la actividad específica de HPGGT y anulan la supresión dependiente de HPGGT de la proliferación de células T tal como se evaluó *in vitro*.  
55

Se describe además otra clase de parejas de interacción que se pueden usar de acuerdo con la presente invención de una manera idéntica a los anticuerpos, y así para los mismos propósitos, son las llamadas "anticalinas", que son una forma particular de polipéptidos de unión a objetivo. Las anticalinas y su método de fabricación son, entre otros, descritas en Solicitud de patente alemana DE 197 42 706.  
60

Se describe además otra clase de moléculas que se pueden usar de una manera idéntica a los anticuerpos, y así para los mismos propósitos, son los llamados aptámeros de péptidos. Usando un objetivo, los aptámeros de péptidos se pueden generar usando un proceso de tamizaje haciendo uso de una genoteca de polipéptidos como se describe con

más detalle en la presente descripción. El criterio de selección es que el polipéptido seleccionado está en realidad y, específicamente, unido al objetivo.

5 Más específicamente, tales aptámeros de péptidos se pueden generar usando métodos de acuerdo con el estado de la técnica, tal como la presentación en fagos. Básicamente, se genera una genoteca de péptidos, tal como en forma de fagos, y este tipo de genoteca se pone en contacto con la molécula objetivo. Los péptidos de unión a la molécula objetivo se eliminan posteriormente de la reacción respectiva, preferentemente como un complejo con la molécula objetivo. Se conoce por una persona con experiencia en la técnica que las características de unión, al menos en cierta medida, dependen del diseño experimental realizado particularmente tal como concentración de la sal y similares.

10 Después de separar los polipéptidos de unión a la molécula objetivo con una afinidad más alta o una fuerza mayor, de los miembros de la genoteca que no se unen, y opcionalmente además después de la eliminación de la molécula objetivo del complejo de molécula objetivo y polipéptido, el (los) polipéptido(s) respectivo(s) posteriormente se pueden caracterizar. Antes de la caracterización opcionalmente una etapa de amplificación se realiza tal como, por ejemplo, propagando los fagos que codifican el polipéptido. La caracterización preferentemente comprende la secuenciación de los polipéptidos de unión al objetivo y en última instancia de los polipéptidos que actúan como antagonistas o parejas de interacción del objetivo como se define en la presente descripción. Básicamente, los polipéptidos no se limitan en su longitud, sin embargo, preferentemente los polipéptidos que tienen una longitud de aproximadamente 8 a 20 aminoácidos se obtienen preferentemente con los métodos respectivos. El tamaño de las genotecas puede ser aproximadamente de  $10^2$  a  $10^{18}$ , preferentemente  $10^8$  a  $10^{15}$  polipéptidos diferentes, sin embargo, no se limita a ellos.

20 Un aspecto adicional de la presente invención se relaciona con los aptámeros dirigidos contra los polipéptidos de acuerdo con la presente invención, las formas inactivas de HPGGT o HPGGT, preferentemente HPGGT como la silvestre que típicamente tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 1.

25 Los aptámeros son D- ácidos nucleicos que son ya sea de cadena sencilla o de cadena doble y que interactúan específicamente con la molécula objetivo. La fabricación o selección de aptámeros es, por ejemplo, descrito en la patente europea EP 0 533 838. Básicamente se realizan las siguientes etapas. En primer lugar, una mezcla de ácidos nucleicos, es decir los aptámeros potenciales, se proporciona por lo cual cada ácido nucleico comprende típicamente un segmento de varios, preferentemente al menos ocho nucleótidos aleatorios posteriores. Esta mezcla se pone en contacto posteriormente con la molécula objetivo, por la cual el (los) ácido(s) nucleico(s) se une(n) a la molécula objetivo, tal como en base a una afinidad aumentada hacia el objetivo o con una fuerza mayor a ella, en comparación con la mezcla de candidatos. La unión de ácido(s) nucleico(s) se separa(n) posteriormente del resto de la mezcla. Opcionalmente, el (los) ácido(s) nucleico(s) así obtenido(s) se amplifica usando, por ejemplo la reacción en cadena de la polimerasa. Estas etapas se pueden repetir varias veces dando al final una mezcla de ácidos nucleicos que tienen una relación aumentada de ácidos nucleicos que se unen específicamente al objetivo a partir de lo que se selecciona opcionalmente después el ácido nucleico de unión definitivo. Estos ácidos nucleicos de unión específica(s) se denominan aptámeros. Es obvio que en cualquier etapa del método para la generación o identificación de las muestras de aptámeros de la mezcla de ácidos nucleicos individuales se pueden tomar para determinar la secuencia de la misma usando técnicas estándar. Está dentro de la presente invención que los aptámeros se pueden estabilizar tal como, por ejemplo por la introducción de los grupos químicos definidos que se conocen por una persona con experiencia en la técnica de la generación de aptámeros. Tal modificación puede, por ejemplo, residir en la introducción de un grupo amino en la posición 2' de la porción de azúcar de los nucleótidos. Los aptámeros se usan actualmente tanto como agentes terapéuticos o de diagnóstico. Sin embargo, está además dentro de la presente invención que los aptámeros así seleccionados o generados se pueden usar para la validación del objetivo y/o como sustancia guía para el desarrollo de medicamentos, preferentemente de medicamentos basados en moléculas pequeñas. Esto es realmente realizado por un ensayo de competencia por el cual la interacción específica entre la molécula objetivo y el aptámero se inhibe por un candidato a fármaco por lo que después de la sustitución del aptámero del complejo del objetivo y aptámero se puede suponer que el respectivo candidato a fármaco permite una inhibición específica de la interacción entre el objetivo y el aptámero, y si la interacción es específica, dicho fármaco candidato será, al menos en principio, adecuado para bloquear el objetivo y así disminuir su disponibilidad o actividad biológica en un sistema respectivo que comprende tal objetivo. La molécula pequeña así obtenida puede después estar sujeta a la derivatización y modificación adicional para optimizar sus características físicas, químicas, biológicas y/o médicas, tales como toxicidad, especificidad, biodegradabilidad y biodisponibilidad.

55 Un aspecto adicional de la presente invención se relaciona con espejémeros dirigidos contra los polipéptidos de acuerdo con la presente invención, las formas de inactivas de HPGGT o HPGGT, preferentemente HPGGT como la silvestre que típicamente tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 1.

60 Los espejémeros son una forma especial de aptámeros. La generación o fabricación de espejémeros que se pueden usar o generar de acuerdo con la presente invención usando el objetivo se basa en un principio similar. La fabricación de espejémeros se describe en la solicitud de patente internacional WO 98/08856. Los espejémeros son L-ácidos nucleicos, lo que significa que se componen de L-nucleótidos en lugar de los aptámeros que se componen de D-nucleótidos. Los espejémeros se caracterizan por el hecho de que tienen una estabilidad muy alta en el sistema

biológico y, comparable con los aptámeros, interactúan específicamente con la molécula objetivo contra la que se dirigen. Con el propósito de generar espejélmeros, se crea una población heterogénea de D-ácidos nucleicos y esta población se pone en contacto con el antípoda óptico de la molécula objetivo, en el presente caso por ejemplo con el D-enantiómero de los L-enantiómero del objetivo. Posteriormente, se separan los D-ácidos nucleicos que no interactúan con el antípoda óptico de la molécula objetivo. Sin embargo, los D-ácidos nucleicos que interactúan con el antípoda óptico de la molécula objetivo se separan, determinan y/o secuencian opcionalmente y, posteriormente, los L-ácidos nucleicos correspondientes se sintetizan basado en la información de la secuencia de ácido nucleico obtenida de los D-ácidos nucleicos. Estos L-ácidos nucleicos que son idénticos en términos de secuencia con los D-ácidos nucleicos mencionados anteriormente que interactúan con el antípoda óptico de la molécula objetivo, interactuarán específicamente con la molécula objetivo de origen natural en lugar de con el antípoda óptico del mismo. Similar al método para la generación de aptámeros es posible además repetir las diversas etapas varias veces y así enriquecer los ácidos nucleicos que interactúan específicamente con el antípoda óptico de la molécula objetivo.

En un aspecto adicional, la presente invención se relaciona con una composición inmunogénica como se define en las reivindicaciones. La composición inmunogénica comprende al menos uno de los polipéptidos de acuerdo con la presente invención y/o una forma inactiva de HPGGT, particularmente una forma inactiva de HPGGT como se describe en la presente descripción, y/o HPGGT silvestre. Se entenderá que dichos polipéptidos de acuerdo con la presente invención y/o dicha forma inactiva de HPGGT, particularmente una forma inactiva de HPGGT como se describe en la presente descripción, y/o dicho HPGGT silvestre están, en una modalidad, conjugado a un material portador tal como KLH o hemocianina de lapa californiana, BSA, ovoalbúmina, etc para presentar el antígeno respectivo al sistema inmune del huésped de manera que permite o promueve la obtención de una respuesta inmune y se obtienen anticuerpos de alto título.

Se entenderá que, en relación con la presente invención, la composición inmunogénica se puede usar in vitro o in vivo. En el último caso, tal composición inmunogénica es típicamente una vacuna y preferentemente formulada como tal vacuna. La composición inmunogénica, y medicamento y vacuna, respectivamente, que comprende la misma se puede usar para la prevención de la infección de *H. pylori*, preferentemente en niños, o para el tratamiento y/o prevención de los animales y los seres humanos que sufren o están en riesgo de sufrir de infección de *H. pylori* y cualquier enfermedad causada por o asociada con tal organismo.

En una modalidad, la composición inmunogénica de la presente invención comprende uno o varios adyuvantes. Los adyuvantes preferentemente son agentes que proporcionan una estimulación generalizada del sistema inmune. Los adyuvantes son conocidos en la técnica e incluyen, pero sin limitarse a, polímeros policatiónicos, desoxinucleótidos inmunoestimuladores (ODNs), péptidos sintéticos KLK, compuestos neuroactivos, alúmina, adyuvantes completos o incompletos de Freund, toxina del cólera. Preferentemente, el polímero policatiónico es un péptido policatiónico y/o en donde el compuesto neuroactivo es la hormona de crecimiento humano.

En una modalidad adicional, la composición inmunogénica comprende proteínas de la membrana externa de *H. pylori* tales como BabA, HpaA, Omp 18 y una combinación de las mismas. HpaA y Omp18 son, por ejemplo, descritas en Volland p. y otros, *Infection and Immunity*, julio de 2003, p. 3837-3843. Está dentro de la presente invención que los términos Bab A, Hpa A y Omp 18 comprende no sólo el polipéptido completo, sino además cualquier fragmento o péptido inmunogénico del mismo. HpaA es una hemaglutinina N-acetil neuraminil lactosa de unión putativa, Bab A es una proteína de adhesión que se une a antígenos de grupo sanguíneo Lewis. Se entenderá que otros antígenos y, preferentemente, proteínas y polipéptidos, y respectivos fragmentos de los mismos, se pueden usar para aumentar la respuesta inmune contra *H. pylori*. Las proteínas y polipéptidos preferidos, respectivamente, que se pueden usar en una modalidad de la presente invención son proteínas de la membrana externa que se incorporan típicamente en la membrana plasmática externa de *H. pylori* y son importantes para, por ejemplo, el transporte de iones, adherencia, estabilidad estructural y osmótica y la virulencia bacteriana.

Los antígenos adicionales que se pueden tomar de *H. pylori* y que puede formar parte de la composición inmunogénica de acuerdo con la presente invención, son los descritos en la solicitud de patente de Estados Unidos 20070042448 publicada.

Se reconocerá que los polipéptidos y proteínas de la presente invención, incluyendo las formas inactivas de HPGGT y la HPGGT tipo silvestre, así como cualquier otro compuesto descrito en la presente se formulan preferentemente para la administración al cuerpo humano o animal. Tal formulación se conoce por la persona experta en la técnica. En una modalidad la formulación es una que se describe en la patente de Estados Unidos 6,838,089. La formulación descrita en esta patente de Estados Unidos es un sistema de entrega que comprende una pluralidad de partículas de polímeros, en donde un antígeno de proteína insoluble en agua se incorpora con partículas de polímeros, las partículas de polímeros que comprende una matriz de polímero que comprende uno o más homo- y/o copolímeros, en donde el método comprende: (a) mezclar una fase acuosa (W) que comprende el agente insoluble en agua tal como una proteína y uno o más surfactantes hidrófilos a una concentración de 0.1 a 100 veces la concentración crítica de micela de los mismos con una fase orgánica (O) que comprende la matriz de polímero en un solvente orgánico, cuyo solvente no desnaturaliza el

antígeno proteico y en donde O es inmiscible con W, para producir una emulsión W/O, en donde ya sea W u O o ambas comprenden además uno o más agentes estabilizantes adicionados antes de que se mezcle para estabilizar la emulsión W/O en presencia de los agente(s) de solubilización y promover la incorporación de la proteína insoluble en agua dentro de las partículas de polímero durante la etapa (b); y (b) formar gotas de dicha emulsión W/O mediante la dispersión de la emulsión en un medio fluido, y eliminar dicho solvente de la fase O de las gotas de emulsión W/O para formar de ese modo las partículas de polímero que incorporan el antígeno de proteína insoluble en agua.

En una modalidad adicional la formulación y el agente de entrega de los agentes y compuestos descritos en la presente, es un sistema de microesfera tal como los descritos en la patente de Estados Unidos 6,372260.

En un aspecto de la presente invención los polipéptidos, la forma inactiva de HPGGT, los anticuerpos, espiegémeros y aptámeros de acuerdo con la invención, la composición inmunogénica, las composiciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de éstos de acuerdo con la invención se usan preferentemente en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad que es causada por o se asocia con *H. pylori*, con mayor preferencia causada por la infección de *H. pylori*. En una modalidad la enfermedad son trastornos gastroduodenales, causados por la infección de *H. pylori*. En una modalidad adicional la enfermedad es gastritis, sobre todo gastritis crónica. Debido a que una gastritis crónica está implicada en la patogénesis de la úlcera gástrica o duodenal, o incluso el cáncer de estómago y linfoma de MALT, el método y los agentes anteriores de la invención se pueden usar para prevenir esas enfermedades. Se pueden usar además para tratar por ejemplo, la enfermedad de úlcera gástrica y duodenal y linfoma de (MALT). De acuerdo con la invención, el término general de "tratamiento" se usa - a menos que se defina explícitamente de cualquier otra forma - como modo de curar, mitigar, diagnosticar o prevenir un trastorno patológico.

En un aspecto adicional, la presente invención y con relación a su efecto supresor sobre la proliferación de linfocitos, en particular, la proliferación de células T, la HPGGT induce la supresión inmune en el huésped y puede aplicarse así como un novedoso supresor inmunológico. Supresores inmunes se pueden usar por ejemplo, para la reducción del riesgo de rechazo de trasplante de órgano después del trasplante o para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, tales como artritis reumática, enfermedad de Chron o eczema atópico. La actividad catalítica de HPGGT requiere de la presencia de glutamina para servir como un donador/aceptor para glutamil gamma. Así, una composición inmunosupresor que comprende HPGGT preferentemente comprende además glutamina.

Además, los inventores demostraron que una preincubación del medio de cultivo celular aplicado para el ensayo de proliferación de linfocitos con glutamina, leucina e histidina y el HPGGT activo exhibió un efecto anti-proliferativo sobre las células T incluso cuando el HPGGT se inactivó posteriormente. Por lo tanto, se concluyó que el efecto de inmunosupresión es dependiente de HPPGT; sin embargo, un producto directo o indirecto aún no identificado de la reacción enzimática está implicado en el modo de acción. En consecuencia, se describe además una composición de inmunosupresión obtenible mediante la incubación de HPGGT y glutamina, leucina e histidina, preferentemente dentro de un medio de incubación farmacéuticamente aceptable y permitiendo la reacción específica de HPGGT. El sobrenadante de esta reacción se puede aplicar después como una composición adecuada de inmunosupresión. Preferentemente, esta composición comprende un péptido-glutamil, por ejemplo, poli-glutamil-glutamato o glutamil-derivados generado mediante la transferencia de glutamil a tales sustratos.

Está dentro de la presente invención que el HPGGT tal como se usa en relación con este aspecto, es cualquier HPGGT que tiene la actividad enzimática específica descrita en la presente. En lo posible, el término HPGGT comprende tanto el HPGGT de tipo silvestre, como el HPGGT completo y cualquier derivado y más específicamente cualquier fragmento del mismo que tiene este tipo de actividad enzimática. Tales derivados y fragmentos se pueden producir por el experto en la técnica mediante el uso de métodos bien conocidos en la técnica.

Como se utiliza preferentemente en la presente, el término promover la proliferación de linfocitos significa en una modalidad preferida promover la activación y proliferación de linfocitos.

También se describe un método para producir HPGGT, más específicamente HPGGT recombinante que carece de la secuencia de secreción (péptido señal) o con una secuencia de secreción que es no funcional. Tal HPGGT que carece de una secuencia de secreción funcional, es decir, aminoácidos 1- 26, sitio de escisión entre pos. 26 y 27: LSA-AS, es ventajoso en cuanto a que tal HPGGT no es secretado a partir de una célula huésped durante la producción en la célula huésped de ese tipo. En relación con este aspecto, el organismo huésped es preferentemente un procariota tal como *E. coli*, sin embargo, no se limita a él.

El experto en la técnica está consciente de los métodos para preparar tal HPGGT que carece de una secuencia de secreción funcional. Por ejemplo, esto se puede lograr mediante la expresión de un gen que codifica una proteína sin secuencia líder secretora. Tal proteína HPGGT modificada permanecerá en su célula huésped y por lo tanto se puede purificar de ahí.

En un aspecto adicional, la presente invención se relaciona con el uso de los polipéptidos de acuerdo con la presente

invención y el HPGGT inactivo de acuerdo con la presente invención para la preparación de anticuerpos. En un aspecto estrechamente relacionado, se usan en animales de inmunización para la generación de anticuerpos y para proporcionar las células iniciales y líneas celulares, respectivamente, para la generación de líneas celulares de hibridoma como es conocido por el experto en la técnica. Se reconocerá por el experto en la técnica que tales hibridomas pueden adicionalmente cultivarse y más aun seleccionarse. Como consecuencia además es, dentro de la presente invención que los polipéptidos de acuerdo con la presente invención y el HPGGT activo e inactivo de acuerdo con la presente invención se usan en un ensayo de tamizaje para identificar las líneas celulares de hibridoma que producen los anticuerpos dirigidos a y/o de unión específica con los polipéptidos de acuerdo con la presente invención y el HPGGT inactivo de acuerdo con la presente invención. Específicamente, los hibridomas se pueden seleccionar mediante la aplicación del ensayo de actividad de HPGGT para el tamizaje que identifica los hibridomas productores de anticuerpos que anulan la función catalítica e inhibidora de HPGGT.

En un aspecto adicional, la presente invención se relaciona con un ácido nucleico que codifica los polipéptidos de acuerdo con la presente invención y el HPGGT inactivo de acuerdo con la presente invención. Se reconocerá por el experto en la técnica que conociendo el código genético y, opcionalmente el uso de codones en un organismo huésped que expresa tal ácido nucleico, dicho experto en la técnica puede preparar tal ácido nucleico. En un aspecto adicional, el ácido nucleico está contenido en un vector, preferentemente un vector de expresión. En una modalidad, el vector de expresión comprende plásmidos, cósmidos, virus, bacteriófagos y otros vectores usados habitualmente en el campo de la ingeniería genética. En un aspecto aun adicional, la presente invención se relaciona con un organismo huésped que contiene tal vector. En una modalidad, el organismo huésped y, particularmente, la célula huésped es una célula huésped recombinante que contiene de forma transitoria o estable las moléculas de ácidos nucleicos o vectores de la invención. Una célula huésped u organismo huésped se entiende que es un organismo capaz de adoptar in vitro el ADN recombinante y, si es el caso, sintetizar las proteínas codificadas por las moléculas de ácido nucleico de la invención. Preferentemente, estas células son células procariotas o eucariotas, por ejemplo células de mamífero, células bacterianas, células de insecto o células de levadura. Las células huésped de la invención se caracterizan preferentemente por el hecho de que la molécula de ácido nucleico introducida de la invención es ya sea heteróloga con respecto a la célula transformada, es decir, que no es de origen natural en estas células, o está localizada en un lugar en el genoma diferente de la secuencia de origen natural correspondiente.

Una modalidad adicional de la invención se refiere a proteínas aisladas que presentan propiedades biológicas de HPgGT, preferentemente HPgGT en donde la secuencia de secreción que normalmente se produce se ha eliminado o no es funcional, y que se codifican por las moléculas de ácido nucleico de la invención, así como a los métodos para su producción, por la cual, por ejemplo, una célula huésped de la invención se cultiva bajo condiciones que permitan la síntesis de la proteína y, posteriormente, la proteína se aísla de las células cultivadas y/o el medio de cultivo. El aislamiento y purificación de las proteínas producidas de forma recombinante puede llevarse a cabo con instrumentos convencionales incluyendo cromatografía preparativa y separaciones inmunológicas y por afinidad que implican la cromatografía de afinidad con anticuerpos monoclonales o policlonales. Como se utiliza en la presente, el término "proteína aislada" incluye proteínas sustancialmente libres de otras proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos u otros materiales con los que se asocia naturalmente. Tales proteínas sin embargo, no sólo comprenden proteínas producidas de forma recombinante sino incluyen proteínas aisladas de origen natural, proteínas sintéticamente producidas, o proteínas producidas por una combinación de estos métodos. Instrumentos para preparar tales proteínas se conocen bien en la técnica. Las proteínas de la invención están preferentemente en una forma sustancialmente purificada.

Así, se describe además un método general para preparar una proteína en células huésped procariotas o eucariotas, que es perjudicial para dichas células cuando se aplica externamente, que comprende: (a) cultivar una célula huésped transfectada con una secuencia de ácido nucleico que codifica dicha proteína con una secuencia señal secretora suprimida o no funcional bajo condiciones tales que se exprese dicha proteína; y (b) recuperar dicha proteína de las células. Lo mismo se aplica además a una célula huésped transfectada con un ácido nucleico que codifica los polipéptidos de acuerdo con la presente invención que se puede recuperar a partir de dichas células.

Se entenderá que los anticuerpos, anticlinales, aptámeros peptídicos, aptaméros y espiegémeros de acuerdo con la presente invención pueden considerarse preferentemente como ligandos de la gamma glutamil transpeptidasa de *Helicobacter pylori* (HPGGT).

Dentro de la presente invención, el término HPGGT silvestre o expresiones similares se refieren preferentemente al HPGGT silvestre que carece de la secuencia de secreción, pero es catalíticamente activo, más específicamente cataliza la reacción enzimática descrita en la presente para HPGGT.

A continuación la presente invención se ilustrará más aun con las figuras y ejemplos a partir de los que pueden tomarse características, modalidades y ventajas adicionales.

Fig. 1A es una tabla que indica las proteínas secretadas a partir de *H. pylori* con un peso molecular entre 30 y 66 kDa de acuerdo con Kim y otros y Bumann y otros<sup>9,10</sup>

Fig. 1B es un SDS-PAGE después de tinción con plata que indica proteínas en las fracciones eluidas de la cromatografía de exclusión por tamaño, por el cual sólo las fracciones b-f inhibieron la proliferación de las células T humanas, mientras que todas las otras fracciones no; las bandas de proteínas correspondientes al perfil inhibitorio de las fracciones están marcadas con flechas.

Fig. 1C es un diagrama de barras que representa la actividad enzimática GGT de las fracciones de filtración en gel que se determinó mediante un ensayo espectrofotométrico tal como se describe en el ejemplo 1. (HP = *H. pylori*)

Figs. 2A son diagramas de barras que muestran la proliferación de células de PBMC estimulada (A) y linfocitos T humanos primarios aislados (C) en presencia o ausencia de HPSN indicado que se determinó por el ensayo de incorporación de <sup>3</sup>H-timidina; el fenotipo GGT de las cepas knock-out construidas se confirmó mediante el ensayo de actividad enzimática e inmunotransferencia usando un anticuerpo policlonal contra la subunidad mayor de GGT (B). Para inmunotransferencia se usaron 30 µg de proteína de HPSN. La inmunotransferencia con el anticuerpo anti-VacA sirvió como control de carga (ver inserto). Los datos representan la media ± SD de 3 experimentos independientes. Valores de \*P <.001 como determinado por la prueba de t-Student se consideraron significativos. (HP = *H. pylori*, SN = sobrenadante, WT = silvestre).

Fig. 3A y B representa un gel después de la tinción de plata (A) e inmunoelectrotransferencia (B) de las fracciones HPGGT recombinantes purificadas con el anticuerpo anti-GGT dirigido contra su subunidad mayor lo que muestra procesamiento de GGT. Asteriscos indican: \*\*\* pro-forma, subunidad \*\* mayor y \* menor.

Figs. 3C a 3E son diagramas de barras que muestran la actividad enzimática (C) e inhibición de la proliferación de PBMC humana (D) por HPGGT recombinante (rHPGGT) expresada en *E. coli*. El LPS de *E. coli* usado como un control no inhibió la proliferación de PBMC. HPGGT recombinante mostró actividad catalítica en pH 2-10 (E). Los datos representan la media ± SD de 3 experimentos independientes. Valor de \*P <.001 como determinado por la prueba de t-Student se consideró significativo. (FT = flujo continuo, HP = *H. pylori*).

Figs 4A a D son diagramas de barras que indican que la GGT purificada a partir de riñón equino mostró actividad catalítica de GGT (A), pero careció de efecto inhibitorio de la proliferación de linfocitos (B). La mutagénesis sitio-dirigida del HPGGT recombinante en Ser 451/452 (S451/452A) suprimió la actividad enzimática (A) y el efecto inhibitorio (B) de GGT. La preincubación de HPWTSN con acivicina (50 µM) durante 2 horas a 37 °C anuló la actividad de GGT (C) y la inhibición de la proliferación de PBMC (D). Los datos representan la media ± SD de 3 experimentos independientes. Valores de \*P <.05 como determinados por la prueba de t-Student se consideraron significativos. (HP = *H. pylori*, SN = sobrenadante, WT = silvestre).

Figs 5A y B son diagramas que indican la producción de citocinas IL-2 (A) e IFN-γ (B) por PBMC que se midió después de 24 horas mediante ELISA como se describe en el ejemplo. Los datos representan la media ± SD de 3 experimentos independientes. Valores de P como determinados por la prueba de t-Student se indican.

Fig. 5C representa el resultado de un análisis-FACS de células T Jurkat que se trataron durante 24 horas como se indica (curvas grises) y se tiñeron con Anexina V-FITC y yoduro de propidio. La tasa de células T Jurkat apoptóticas se determinó mediante la adquisición de 10000 eventos de análisis-FACS. El fármaco anti-cáncer estaurosporina (curva en blanco), usado como control positivo, indujo fuertemente apoptosis a una concentración de 1 µM. (HP = *H. pylori*, WT = silvestre).

Fig 6A muestra el resultado de un análisis del ciclo celular de las células T Jurkat tratadas con o sin el HPSN indicado durante 24h. El porcentaje de células en la fase G1- (inferior izquierda), S temprana y tardía- (superior izquierda y derecha) y G2- (inferior derecha) se representa (eje-y: BrdU-FITC; eje-x: PI). Los niveles celulares de proteínas reguladoras del ciclo celular se determinaron en las mismas células por inmunoelectrotransferencia.

Fig. 6B un SDS PAGE de proteínas obtenidas a partir de 10<sup>7</sup> PBMC que se incubaron con diferentes concentraciones de HPWT y HPΔGGTSN o rHPGGT durante 24h y 48h y posteriormente se lisaron. 35 µg de proteína total se separaron mediante SDS-PAGE y analizaron por inmunoelectrotransferencia. Los niveles de proteínas indicados se determinaron utilizando los anticuerpos correspondientes. Los datos se reprodujeron 2 veces con resultados similares. (HP = *H. pylori*, SN = sobrenadante, WT = silvestre).

Fig. 7 es una inmunoelectrotransferencia de sueros de *H. pylori* positivos (carriles 1-9) y negativos (carriles 10-14), por la cual los pacientes se probaron para la presencia de anticuerpos dirigidos contra HPGGT mediante

inmunoelctrotransferencia como se describe en el Ejemplo 1. El anticuerpo anti-GGT ( $\alpha$ GGT) de conejo se usó como control positivo. Los asteriscos indican: \*\*\* pro-forma y \*\* subunidad mayor de la proteína HPGGT.

Fig. 8 es un diagrama de barras indicando que la inhibición de la proliferación de linfocitos por HPGGT depende de glutamina, pero no está mediada por glutamato o g-glutamilglutamina, ni por la reducción de glutamina. Las PBMC se estimularon con PMA/ionomicina (todo excepto basal) y se trataron como se indica. Rek. HPGGT como se usa a 2  $\mu$ g/ml se inactivó después de 24 horas. A continuación, el medio se cambió y el medio tratado con HPGGT se añadió a las PBMC después de la estimulación. La glutamina se añadió a 2 mM al mismo tiempo (no se muestra) o también después de 24 horas para investigar posible reducción de glutamina. El glutamato o g-glutamilglutamina se añadieron después de la estimulación de PBMC para investigar posibles efectos inhibidores. Aminoácidos sin (w/o) glutamina se usaron para mostrar la dependencia del efecto inhibidor sobre la glutamina.

Fig. 9 es un diagrama que indica el efecto inhibidor de los sueros de ratones inmunizados o infectados sobre la actividad enzimática de HPGGT. Los ratones se inmunizaron con las formulaciones indicadas o recibieron PBS como control o se infectaron con *H. pylori* vivo. Los sueros se tomaron de las venas de la cola, 6 semanas después de la inmunización o infección y se ensayaron para la actividad inhibidora en la actividad catalítica de GGT. Proteína CT\_GGT, CT soluble y GGT inactivo, proteína [CT\_GGT]enc, CT y GGT inactivo se encapsularon en microesferas.

#### Ejemplo 1: Materiales y métodos.

**Cultivo bacteriano.** La cepa de *H. pylori* silvestre G27 WT (*vacA*<sup>+</sup> *cagA*<sup>+</sup>) usada en este estudio se obtuvo a partir de A. Covacci (IRIS, Siena, Italia). Las bacterias se cultivaron en placas de Wilkins-Chalgren o Infusión cerebro-corazón (BHI) suplementada con mezcla de antibióticos suplemento Dent (Oxoid, Wesel, Alemania) como se describió anteriormente.<sup>29</sup> El cultivo líquido de HP se realizó en caldo de BHI suplementado con 10 % de FCS (Sigma, Munich, Alemania) y 1 % de suplemento Dent. Para la producción de sobrenadantes de HP, las bacterias se cultivaron en placas durante 48 h, se lavaron 3 veces en tampón fosfato salino (PBS) y se ajustaron a OD<sub>600nm</sub> de 1 (que corresponde a aproximadamente 2x10<sup>9</sup> bacterias/ml). Las bacterias se incubaron en PBS durante 2h bajo condiciones microaerófilas con agitación vigorosa y se sedimentaron en etapas de centrifugación posteriores a 3000 xg y 10000xg para eliminar bacterias y membranas. Posteriormente, los sobrenadantes se concentraron usando ultrafiltración (Amicon Ultra MWCO 10 kDa, Millipore, Schwalbach, Alemania). El contenido total de proteínas de los sobrenadantes se midió mediante el ensayo de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Virginia) con albúmina sérica bovina como estándar y se almacenó a -80 °C. *E. coli* se cultivaron en placas de agar caldo Luria (LB) (USB, Cleveland, Ohio) y para cultivo líquido en caldo LB (USB) con antibióticos pertinentes.

**Cromatografía de filtración en gel de sobrenadantes de *H. pylori*.** Los sobrenadantes de la cepa de *H. pylori* silvestre G27 se prepararon como se describió anteriormente. La cromatografía de exclusión por tamaño se realizó como se describió antes.<sup>3</sup> En resumen, 500  $\mu$ g de proteína se cargaron en una columna de Superdex 200 10/300 (GE Healthcare, Munich, Alemania) y eluyeron con PBS desgasado a 4 °C. Proteínas estándares  $\alpha$ -amilasa (200 kDa), alcohol deshidrogenasa (150 kDa), albúmina sérica bovina (66 kDa), y anhidrasa carbónica (29 kDa) se usaron para la estimación del peso molecular de las proteínas eluidas. Cada fracción se probó para la inhibición de la proliferación y actividad de GGT como se describe más abajo.

**Generación de cepas mutantes de GGT.** El plásmido k.o. GGT se transformó en la cepa de *H. pylori* G27 por transformación natural. Los transformantes se incubaron en placas de agar que contienen 25  $\mu$ g/ml de kanamicina (Sigma). Después de 3 días los clones se recogieron y extendieron en placas de agar fresco con kanamicina. La inserción del plásmido se verificó por PCR (iniciador: sentido 5'-AAACGATTGGCTTGGGTGTGATAG-3' (sec. con núm. de ident.:6); antisentido 5'-GACCGGCTTAGTAACGATTTGATAG-3' (sec. con núm. de ident.:7)) del ADN bacteriano e inmunoelctrotransferencia de proteínas  $\Delta$ GGT de sobrenadantes de *H. pylori*.

**Cultivo celular:** El aislamiento de linfocitos de sangre periférica (PBMC) se realizó como se describió anteriormente.<sup>3</sup> Todas las células se incubaron a 37 °C con 5 % CO<sub>2</sub>. Las células T Jurkat y PBMC se cultivaron en medio RPMI 1640 (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) con 10 % FCS. Las células T EL-4 se cultivaron en DMEM (Invitrogen) suplementado con 10 % suero de caballo (Cambrex, Verviers, Bélgica).

**Aislamiento de linfocitos T humanos primarios.** Las células T humanas primarias se aislaron de las capas leucoplaquetarias o sangre venosa periférica heparinizada de voluntarios sanos no infectados con *H. pylori* mediante selección negativa usando el kit de aislamiento de células T Pan II (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

**Ensayos de proliferación celular:** Células (10<sup>5</sup> PBMC, células T primarias purificadas o 10<sup>4</sup> células Jurkat/EL-4 /pocillo) se cultivaron en placas de 96-pocillos de fondo plano con medio completo. PBMC se estimularon por triplicado



con PMA (20 ng/ml; Sigma) e Ionomicina (100 ng/ml; Sigma) y todas las células se cultivaron con o sin las concentraciones indicadas de proteína total de sobrenadantes o proteínas recombinantes de *H. pylori*. Células T humanas primarias se estimularon ya sea con PMA/Ionomicina como se describió anteriormente o con perlas anti-CD3/CD28 (Invitrogen) a 1 perla por célula T. La proliferación celular se determinó después de 48h por la incorporación de metil-<sup>3</sup>H]-timidina (GE Healthcare) usando una matriz 9600 de contador beta dirigido Packard (Packard Instruments Co, Downer's Grove, Illinois).

**Preparación de proteínas recombinantes.** La proteína GGT de *H. pylori* se expresó como proteína con etiqueta 6xHis de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Qiagen, Hilden, Alemania). La región codificante de la proteína GGT de *H. pylori* se amplificó por PCR (iniciador sentido: 5'-TGAAAGGAAAACCCATGGGACGGAG-3' (sec. con núm. de ident.:8); antisentido: 5'-CAAAGGTACCAAATTCCTTGG-3' (sec. con núm. de ident.:9)). El producto de PCR se separó por electroforesis en gel de agarosa y purificó mediante extracción del gel (Qiagen). Se restringió después con NcoI y KpnI (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts) seguido por la ligación dentro del vector sistema tri-pQE (Qiagen) después de la re-purificación. El vector resultante se transformó en la cepa M15 de *E. coli*. El caldo LB suplementado con 100 µg/ml de ampicilina (Sigma) y 25 µg/ml de kanamicina se inoculó con un cultivo de bacterias transformadas y creció toda la noche a 37 °C con agitación vigorosa hasta que la OD<sub>600</sub> alcanzó 0.6. La expresión de HPGGT recombinante se indujo mediante la adición de isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG; AppliChem, Darmstadt, Alemania) a una concentración final de 1 mM y se realizó durante 4 horas a 25 °C para minimizar la cantidad de cuerpos de inclusión. Después todo el cultivo se centrifugó (5000xg) durante 10 min a 4 °C. Durante la lisis bajo condiciones nativas, los sedimentos se solubilizaron en tampón de unión frío (20 mM de Tris/HCl, 500 mM de NaCl, 20 mM de imidazol (Sigma), pH 7.4) que contiene inhibidores de la proteasa (cóctel inhibidor de proteasa para proteínas con etiqueta His, Sigma). Las células se lisaron después con dos ciclos de congelación & descongelación en N<sub>2</sub> líquido y posterior sonicación (sonicación de 2x1min con descanso de 5 min en hielo entre ciclo) en hielo. Después de la centrifugación (17500xg a 4 °C) durante 10 min, el sobrenadante se sometió a digestión de ADN y ARN. Después de una etapa de centrifugación adicional (22000xg durante 10 min a 4 °C) los sobrenadantes se prepararon para la purificación. En la primera etapa de la purificación se usaron columnas HisTrapHP de 5 ml. La purificación se llevó a cabo a temperatura ambiente y las muestras se mantuvieron en hielo todo el tiempo. El lisado de *E. coli* se cargó en la columna de Ni-sefarosa a 1 ml/min y se recogió en flujo continuo. Después de cargar la muestra, la columna se lavó con diez volúmenes de columna (cv) de tampón de unión, diez cv de tampón de lavado (20 mM de Tris/HCl, 900 mM de NaCl, 20 mM de imidazol, pH 7.4) y otro tampón de unión diez cv. La proteína unida se eluyó con tampón de elución (20mM de Tris/HCl, 500 mM de NaCl, 100-1000 mM de imidazol, pH 7.4) usando un gradiente gradual de imidazol (etapas de 100 mM). Los eluatos se recogieron en una fracción por etapa de gradiente. Cada fracción se probó después para la actividad enzimática de GGT y procesó para análisis de SDS-PAGE e inmunoelectrotransferencia. Para la purificación adicional de HPGGT recombinante, se agruparon las fracciones enzimáticamente activas a partir de la cromatografía de afinidad Ni-sefarosa, dializaron durante 1 h contra 20 mM de Tris/HCl pH 7.5 a 4 °C y se procesaron en la segunda etapa de purificación. La muestra dializada se cargó en una columna azul Affi-Gel® (BioRad) (cv: 12.3 ml). La columna se lavó con dos cv de tampón de unión y la proteína unida se eluyó con tampón de elución (20 mM de Tris/HCl, 50-1000 mM de NaCl, pH 7.5) usando un gradiente gradual de NaCl (etapas de 50 mM). Todas las fracciones recogidas se analizaron mediante inmunoelectrotransferencia usando el anticuerpo anti-GGT (ver más abajo) y mediante el ensayo de actividad enzimática de GGT (ver más abajo) para la presencia de HPGGT recombinante. Las fracciones activas se agruparon, dializaron contra 20 mM de Tris/HCl pH 7.5 durante 90 min a 4 °C, alicuotaron y almacenaron a -80 °C hasta su uso posterior.

**Mutagénesis sitio dirigida.** La mutagénesis sitio-dirigida de HPGGT se realizó con un kit de mutagénesis sitio-dirigida QuikChange (Stratagene, Amsterdam, Países Bajos) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las secuencias iniciadoras fueron como sigue: S451/452A sentido: 5'-CCAATAAGCGCCCTTAGCCGCCATGTGCGCTACGATTGTG-3' (sec. con núm. de ident.: 10); S451/452A antisentido: 5'-CACAATCGTAGGCGACATGGCGGCTAAAGGGCGCTTATTGG-3' (sec. con núm. de ident.: 11). El éxito de la mutagénesis se confirmó por secuenciación.

**Inmunoelectrotransferencia.** Para el análisis de inmunoelectrotransferencia 10<sup>7</sup> células T Jurkat o PBMC se usaron. Antes del experimento, las células Jurkat se privaron de suero durante 18 h en medio que contiene 0.2 % de FCS. Después, las células se liberaron con 10 % de FCS y se trataron como se describe. En los intervalos de tiempo indicados, se recogieron las células, lavaron una vez con PBS frío, resuspendieron en tampón de lisis 1x (Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts) que contienen inhibidores de proteasa (2.5 mM de pirofosfato sódico, 1 mM de β-glicerofosfato, 1 mM de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 µg/ml de leupeptina, 1 mM de PMSF; Sigma) y se sonicó con un sonicador de punta micro en hielo durante 30 segundos. Los lisados se centrifugaron a 10000xg durante 10 min a 4 °C y los sobrenadantes se usaron para inmunoelectrotransferencia. Cantidades iguales de proteína (determinado por el ensayo de Bradford, BioRad) se separaron por Tricina-SDS-PAGE y se electrotransferieron a membranas de nitrocelulosa (BioRad). Para la detección, las membranas se probaron con anticuerpos primarios anti-p27, anti-ciclina D3, anti-ciclina E, anti-c-Myc (Dianova, Hamburg, Alemania), anti-Cdk2 (Santa-Cruz Biotechnology, Heidelberg, Alemania), anti-fosfo-AKT (Ser 473), anti-fosfo-c-Raf (Ser 338), anti-fosfo-p70S6K (Thr 389; Cell Signaling), anti-fosfo-FKHRL1/Foxo3 (Thr 32; Upstate, Lake Placid, Nueva York), anti-actina (Sigma) y anti-VacA (Austral Biologicals, San Ramon, California). La unión de

anticuerpos primarios se reveló usando anticuerpos secundarios adecuados conjugados a peroxidasa (Dianova) y reactivos de quimioluminiscencia (Perbio Science, Bonn, Alemania). Para la detección de la subunidad mayor de la proteína HPGGT, se usó un anticuerpo policlonal de conejo anti-GGT generado contra un péptido sintetizado IQPDTVTPSSQIKPGM incluyendo los residuos de aminoácidos 356 a 371 del producto génico HP 1118 (Charles River, Kisslegg, Alemania).

**Transferencia del suero.** Para la detección de anticuerpos específicos HPGGT en sueros humanos, 0.1 µg de proteína recombinante HPGGT purificada se separó por SDS-PAGE y transfirió a membranas de nitrocelulosa como se describió anteriormente. La membrana se tiñó con solución de Ponceau S (0,2 % Ponceaus S, 3 % de ácido tricloroacético en H<sub>2</sub>O) y se cortó en tiras. Después de bloquear (1xTBS + 5 % de leche en polvo baja en grasa) cada tira se incubó con suero (diluido 1:20000 en tampón de bloqueo) de pacientes infectados y no-infectados con *H. pylori*, respectivamente, a 4 °C con agitación durante la noche. Después del lavado, las tiras de membrana se incubaron con anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a HRP (Dianova; dilución 1:10000) y finalmente, después de otra etapa de lavado, la unión de anticuerpos séricos a la proteína HPGGT se reveló mediante la reacción de quimioluminiscencia como se describió anteriormente. El estado de los pacientes con infección por *H. pylori* se evaluó usando el ELISA convencional para IgG de *H. pylori*.

**Análisis del ciclo celular.** Antes del análisis, las células T Jurkat (5x10<sup>6</sup> células / análisis) se privaron de suero durante 18 h en medio que contiene 0.2 % de FCS. Después de la liberación con 10 % de FCS y el tratamiento de las células con sobrenadantes indicados de las cepas de *H. pylori* durante 24h, el análisis del ciclo celular se realizó con la tinción de BrdU-FITC / PI (Sigma) de acuerdo con el protocolo del fabricante usando un anticuerpo anti-BrdU conjugado con FITC (BD Bioscience, Heidelberg, Alemania). Durante el análisis posterior de separación celular activada por fluorescencia (FACS), usando un citómetro de flujo FACScan Becton-Dickinson, se adquirieron 10000 eventos. Los datos se analizaron usando el paquete de software Cell Quest (BD Biosciences).

**Ensayo de actividad γ-glutamil transpeptidasa (GGT).** El ensayo para la actividad GGT se adaptó a partir del método de Meister y otros<sup>27</sup>. En resumen, se preparó el tampón de reacción que consiste en 20 mM de glicil-glicina (Sigma) como aceptor, 2.5 mM de L-γ-glutamil-p nitroanilida (Calbiochem, Schwalbach, Alemania) como sustrato donador y 100 mM de Tris-HCl (pH 8.0). En algunos experimentos el pH del tampón de ensayo se varió entre 2 y 10. Sobrenadantes de diferentes cepas de *H. pylori*, HPGGT recombinante purificada o GGT de riñón equino (Sigma) se añadieron, y la reacción procedió a 37 °C durante 30 min. La liberación de p-nitroanilida se controló por espectrofotometría a 405 nm. Una unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima que liberó 1 µmol de p-nitroanilida por min y por mg de proteína a 37 °C.

**ELISA.** Las PBMC (5x10<sup>5</sup> cada) se trataron durante 24 h como se representa. A intervalos de tiempo indicados las células se retiraron mediante centrifugación y los sobrenadantes se analizaron para cantidades de IL-2 (eBioscience, San Diego, CA) y IFN-γ (Biosource, Solingen, Alemania) por ELISA de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los límites inferiores de detección fueron 4 pg/ml.

**Análisis de apoptosis.** 5x10<sup>5</sup> células T Jurkat se trataron como se indica. Después de 24h las células se cosecharon por centrifugación, lavaron, resuspendieron en tampón de unión AnexinaV-500 µl (10 mM de HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mM de NaCl, 2.5 mM de CaCl<sub>2</sub>) y se tiñeron durante 10 min cada una con 5 µl de Anexina V-FITC recombinante (Caltag, Burlingame, California) y 0.5 µg/ml de PI a temperatura ambiente en lo oscuro. Las células apoptóticas se midieron mediante análisis de FACS (ver más abajo). Los datos se analizaron usando el software Cell Quest.

**Estadísticas.** Los datos se presentan como media ± desviación estándar (SD). Para análisis estadístico la prueba de *t*-Student se usó. Los valores de *p* <0.05 se consideraron significativos.

Ejemplo 2: Identificación de GGT como una proteína putativa de *H. Pylori* que inhibe la proliferación de células T

Se demostró previamente que una proteína de bajo peso molecular secretada por *H. pylori* inhibe la proliferación de los linfocitos T.<sup>3</sup> Para identificar el factor inmunosupresor, se realizó la cromatografía de exclusión por tamaño con sobrenadantes de la cepa de *H. pylori* G27. En línea con el trabajo anterior sólo las fracciones que eluyen con un peso molecular entre 30-66 kDa inhibieron la proliferación de linfocitos, mientras que todas las otras fracciones no (datos no mostrados).

Dos grupos independientes realizaron previamente un análisis sistemático de proteínas secretadas de *H. pylori* mediante diferentes técnicas de proteómica.<sup>9,10</sup> Usando estos datos todas las proteínas secretadas de *H. pylori* con un peso molecular entre 30 y 66 kDa se enumeraron (Fig. 1A). Las proteínas obtenidas de las fracciones cromatográficas se analizaron por SDS-PAGE y tinción con plata (Fig. 1A). Cuatro posibles candidatos con un tamaño entre 30 y 66 kDa se encontraron, que mostraron un perfil de elución que coincide con el perfil de la actividad inhibidora de las fracciones (Fig. 1B; indicado por flechas). Todas las otras bandas de proteína en las fracciones inhibidoras estaban también presentes en las fracciones no-inhibidoras y por lo tanto no podrían ser responsables de la inhibición de la proliferación

de células T. Los pesos moleculares de dos de las cuatro proteínas candidatas (Fig. 1B) correspondieron a los fragmentos de la proteína secretada de *H. pylori*  $\gamma$ -glutamyl transpeptidasa (GGT, HP1118). La primera banda en 60 kDa puede representar la pro-forma GGT (PM 61 kDa) y la otra en 38 kDa la subunidad mayor de GGT.<sup>11</sup> Para investigar la presencia de HPGGT catalíticamente activo en estas fracciones de sobrenadante, se realizó un ensayo fotométrico de actividad GGT. La Figura 1C muestra que sólo las fracciones que inhiben la proliferación de linfocitos (b-f) muestran también actividad de GGT.

Ejemplo 3: Mutantes de *H. pylori* deficientes de GGT carecen de capacidad para eliminar la proliferación de células T.

Para determinar si GGT era responsable de la inhibición observada de la proliferación de linfocitos, se generaron mutantes isogénicos knock-out GGT de *H. pylori*. Los mutantes crecieron normalmente *in vitro* como descrito por otros grupos, lo que indica que la GGT no es esencial para la supervivencia de *H. pylori*.<sup>11,12,13</sup> Los sobrenadantes de estos mutantes se probaron para su actividad inhibitoria de la proliferación con células T y PBMC humanas aisladas, estimuladas con anti-CD3/CD28 o PMA/ionomicina, en comparación con la cepa de silvestre correspondiente (Fig. 2A, C). A diferencia de la cepa silvestre el potencial inhibitorio de bacterias  $\Delta$ GGT frente las células T y PBMC humanas primarias se anuló completamente. Para excluir la recombinación espontánea y la reactivación de GGT, los sobrenadantes de bacterias deficientes de GGT se verificaron midiendo la actividad enzimática y mediante inmunoelectrotransferencia usando un anticuerpo policlonal que produjimos contra la subunidad mayor de HPGGT. El control de carga muestra la presencia de la proteína secretada VacA en los sobrenadantes de las bacterias silvestre y deficientes de GGT (Fig. 2B). Así, GGT es responsable de la inhibición de la proliferación de células T por *Helicobacter pylori*.

Ejemplo 4: HPGGT recombinante inhibe la proliferación de linfocitos.

Para demostrar además que la inhibición observada fue mediada únicamente por el HPGGT, una proteína HPGGT recombinante con etiqueta His se expresó en *E. coli*. La proteína se purificó hasta la homogeneidad por cromatografía como se describió en la sección de "Materiales y Métodos". SDS-PAGE y tinción de plata, así como inmunoelectrotransferencia indicaron que HPGGT recombinante se sintetizó como un pro-forma y posteriormente se procesó en una subunidad mayor y menor, con pesos moleculares de ~38 y ~20 kDa, respectivamente (Fig. 3A, B). La proteína recombinante mostró una fuerte actividad GGT (Fig. 3C) e inhibió eficazmente la proliferación de PBMC (Fig. 3D). Adicionalmente, experimentos adicionales mostraron la actividad catalítica de la HPGGT en un intervalo de pH de 2-10 (Fig. 3E) que soporta la presencia de la enzima funcional en el sitio de la infección.

Ejemplo 5: El efecto inhibitorio de HPGGT depende de la actividad catalítica de GGT.

Como la GGT se expresa también por células de mamífero incluyendo las células T humanas nos inclinamos a determinar si un GGT de mamífero inhibía también la proliferación de linfocitos. GGT purificada de riñón equino mostró actividad catalítica (Fig. 4A). Sin embargo, incluso una cantidad cuatro veces mayor de GGT equina en comparación con HPGGT falló para inhibir la proliferación de PBMC (Fig. 4B). Para explorar si era requerida la actividad transpeptidasa catalítica de GGT para la inhibición de la proliferación de células T, se generó un mutante de la proteína recombinante. Encontramos que la mutagénesis de los residuos de serina 451 y 452 en alanina (S451/452A) suprimió completamente la actividad enzimática de HPGGT recombinante (Fig. 4A) y anuló además la inhibición de la proliferación de linfocitos (Fig. 4B).

Para confirmar estos resultados, la HPGGT recombinante y sobrenadantes de la cepa de *H. pylori* silvestre G27 se preincubaron con el inhibidor acivicina de GGT. Este compuesto actúa como un inhibidor irreversible y competitivo de GGT. La inhibición de GGT por acivicina mostró involucrarse en su transformación después de unirse a la enzima en una especie inhibitoria unida a un grupo hidroxilo específico de GGT.<sup>14,15</sup> La medición de la actividad GGT enzimática y determinación de la proliferación de linfocitos mostró que el pretratamiento con acivicina reprimió completamente la actividad de GGT (Fig. 4C) y la inhibición de la proliferación de PBMC (Fig. 4D) con sobrenadantes de *H. pylori* silvestre. Resultados similares se obtuvieron para HPGGT recombinante (datos no mostrados).

Ejemplo 6: HPGGT inhibe la proliferación de linfocitos sin reducir la secreción de IL-2 e IFN $\gamma$  y sin inducir apoptosis.

Hasta ahora no se sabía nada sobre el papel de HPGGT en la supresión de la respuesta inmune del huésped. La inhibición de la proliferación de linfocitos por HPGGT informada en la presente puede resultar de la interferencia con la secreción de citocinas de PBMCs humanos. Para probar esta hipótesis, las células se estimularon con PMA e ionomicina y se incubaron con o sin *H. pylori* silvestre y sobrenadantes de  $\Delta$ GGT o HPGGT recombinante a diferentes concentraciones durante 24 h. En comparación con el control estimulado, ninguno de estos tratamientos condujeron a la reducción de la secreción de IL-2 (Fig. 5A), la cual se sabe que es esencial para la proliferación de los linfocitos. Adicionalmente la secreción de IFN- $\gamma$  no se redujo (Fig. 5B). Así, mostramos que la inhibición de la proliferación de

células T por HPGGT no es causada con la disminución de la activación de estas células. Informes anteriores sugirieron la inducción de estrés oxidativo y apoptosis por HPGGT en las células epiteliales gástricas.<sup>12,16</sup> Sin embargo, nada se sabe sobre el efecto de GGT de *H. pylori* frente a los linfocitos.

5 Informes adicionales sugieren la inducción de la apoptosis en las células T por *H. pylori* como un mecanismo para la inhibición de la proliferación de células T por la bacteria (Wang y otros J Immunol 2001). Para examinar la posibilidad de que la apoptosis es responsable de la reducción de la proliferación de linfocitos por la HPGGT descrita en la presente, se realizó la tinción con Anexina V-FITC/PI y posterior análisis FACS usando células T Jurkat (Fig. 5C). Ni los sobrenadantes de la cepa de *H. pylori* silvestre ni  $\Delta$ GGT ni HPGGT recombinante usados en concentraciones, que  
10 causaron una fuerte inhibición de la proliferación de linfocitos, indujeron un aumento en la apoptosis. Por lo tanto, la anulación de la proliferación de células T por el HPGGT está mediada por un mecanismo independiente de apoptosis.

Ejemplo 7: Efecto de HPGGT sobre la progresión del ciclo celular en las células T.

A continuación tratamos de caracterizar más aun el efecto de HPGGT sobre los procesos celulares implicados en la proliferación de células T. El análisis usando la tinción con BrdU/PI mostró una detención del ciclo celular G1 en las  
15 células T Jurkat inducido por los sobrenadantes silvestre, pero no por los deficientes de GGT de *H. pylori* (Fig. 6A). Esta detención se caracterizó por un aumento de células en la fase G1 (Fig. 6A; cuadrante inferior izquierdo) en presencia de GGT de *H. pylori* de 35 a 46 %. Como consecuencia, la cantidad de células en la fase S (cuadrantes superior izquierdo y derecho) se redujo a 38 % en comparación con el control (Basal, 55 %) durante el tratamiento con los sobrenadantes silvestre, pero no con los deficientes de GGT de *H. pylori*. En línea con esto, el análisis de inmunoelectrotransferencia de las mismas muestras revelaron una reducción pronunciada de los niveles de proteína celular ciclina D3, así como E1.  
20 Adicionalmente, la cantidad del inhibidor Cdk p27Kip1 se elevó de una de manera GGT-dependiente (Fig. 6A). La diferencia en los niveles de proteína ciclina entre las células tratadas con 10 y 5  $\mu$ /ml de sobrenadante de HP WT indica que un umbral de la actividad de GGT ha de superarse para antagonizar la proliferación de linfocitos. Este es, obviamente, el caso en una concentración de 10  $\mu$ g/ml de proteína total en el sobrenadante. A concentraciones inferiores de 5  $\mu$ g/ml se necesita más tiempo para que la GGT inhiba la progresión del ciclo celular en los linfocitos. Usando la proteína recombinante HPGGT, se observó una reducción completa de los niveles de ciclina a una concentración tan baja como 2  $\mu$ g/ml

30 Estos resultados se confirmaron en PBMCs humanos, que exhiben una reducción aún más fuerte de las mismas proteínas que regulan el ciclo celular (Fig. 6 B) cuando se trata con HPGGT recombinante o diferentes concentraciones de sobrenadantes de *H. pylori* silvestre pero no con cepas  $\Delta$ GGT. Nuestros resultados apuntan claramente a GGT siendo el factor responsable de la inducción de una detención del ciclo celular G1 en los linfocitos T por *H. pylori*.

Ejemplo 8: Interferencia de HPGGT con la señalización dependiente de Ras en células T.

35 Las vías dependientes de Ras y PI3K son los principales reguladores de la progresión del ciclo celular. Como estas vías demostraron que proceden independientemente una de otra en las células T<sup>17</sup>, investigamos la influencia de los sobrenadantes de *H. pylori* así como HPGGT recombinante sobre el estado de activación de miembros importantes de ambas vías. El análisis por inmunoelectrotransferencia de lisados celulares a partir de células T Jurkat y PBMC mostró que los niveles celulares y la fosforilación de AKT, p70S6k y Foxo 3, importantes mediadores de la señalización de PI3K  
40 no se redujeron en presencia de HPGGT (Fig. 6A). A diferencia, los niveles celulares de c-Myc, así como la fosforilación de la proteína c-Raf, mediadores centrales de la vía dependiente de Ras, se redujeron en presencia de HPGGT en las mismas células (Figura 6A, B).

Ejemplo 9: Respuesta de anticuerpos frente a HPGGT en sueros de pacientes HP-positivo

45 Aunque se demostró que la GGT de *H. pylori* se secreta al medio extracelular por la bacteria (Bumann y otros) no está claro si la proteína alcanza las células T en la lámina propia para ejercer sus efectos inmunosupresores. Para dirigir esta pregunta probamos el suero de 14 pacientes (9 infectado y 5 no-infectados con *H. pylori*) para detectar la presencia de anticuerpos específicos a HPGGT. Los resultados mostraron una fuerte respuesta de anticuerpos frente a la pro-forma y la subunidad mayor de la HPGGT en pacientes *H.pylori-positivo* (Figura 7, 1-9) pero no en los no-infectados (Figura 7, 10-14) lo que sugiere una interacción de HPGGT con el sistema inmunológico humano.

50 Ejemplo 10: Respuesta inmune inhibidora frente a HPGGT después de la inmunización, sin infección

Los animales se inmunizaron ya sea con el péptido 356 IQPDTVTPSSQIKPGM 371 ubicado a una distancia separada del centro catalítico de la gammaglutamiltranspeptidasa (HPGGT) de *Helicobacter pylori* o con la proteína recombinante HPGGT inactiva en combinación con CT como adyuvante. Sólo en los animales inmunizados con la forma inactiva de  
55 HPGGT, se detectaron anticuerpos inhibidores en el suero, usando el ensayo de activación estándar de HPgGT.

Ninguna respuesta inmune inhibitoria se detectó en los animales control que recibieron sólo el tampón, en los animales infectados o en los animales inmunizados con el péptido 356-371. Estos resultados demuestran que una respuesta inmune inhibitoria contra HPGGT se puede lograr, y depende altamente de la selección del antígeno. Más aun, la infección con *H. pylori* no induce dicha respuesta inhibitoria.

5

Los resultados se muestran en la Fig. 9.

## REFERENCIAS

Los documentos de la técnica anterior a los que se hace referencia en la presente utilizan los siguientes números.

- 10 1. Blaser, M.J, Atherton, J.C. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J Clin Invest.* 2004; 113: 321-333.
2. Ermak TH, Giannasca PJ, Nichols R, Myers GA, Nedrud J, Weltzin R, Lee CK, Kleanthous H, Monath TP. Immunization of mice with urease vaccine affords protection against *Helicobacter pylori* infection in the absence of antibodies and is mediated by MHC class II-restricted responses. *J Exp Med.* 1998; 188: 2277-2288.
- 15 3. Gerhard M, Schmees C, Volland P, Endres N, Sander M, Reindl W, Rad R, Oelsner M, Decker T, Mempel M, Hengst L, Prinz C. A secreted low-molecular-weight protein from *Helicobacter pylori* induces cell-cycle arrest of T cells. *Gastroenterology.* 2005; 128:1327-1339.
4. Knipp, U., Birkholz, S., Kaup, W., Opferkuch, W. Partial characterization of a cell proliferation-inhibiting protein produced by *Helicobacter pylori*. *Infect Immun.* 1996; 64: 3491-3496.
- 20 5. Gebert, B., Fischer, W., Weiss, E., Hoffmann, R., Haas, R. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. *Science.* 2003; 301: 1099-1102.
6. Sundrud, M.S., Torres, V.J., Unutmaz, D., Cover, T.L. Inhibition of primary human T cell proliferation by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA) is independent of VacA effects on IL-2 secretion. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101: 7727-7732.
- 25 7. Atherton, J.C., Peek, R.M. Jr., Tham, K.T., Cover, T.L., Blaser, M.J. Clinical and pathological importance of heterogeneity in vacA, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology.* 1997; 112: 92-99.
8. Rad R, Gerhard M, Lang R, Schoniger M, Rosch T, Schepp W, Becker I, Wagner H, Prinz C. The *Helicobacter pylori* blood group antigen-binding adhesin facilitates bacterial colonization and augments a nonspecific immune response. *J Immunol.* 2002; 168: 3033-3041.
- 30 9. Kim N, Weeks DL, Shin JM, Scott DR, Young MK, Sachs G. Proteins released by *Helicobacter pylori* in vitro. *J Bacteriol.* 2002; 184: 6155-6162.
10. Bumann D, Aksu S, Wendland M, Janek K, Zimny-Arndt U, Sabarth N, Meyer TF, Jungblut PR. Proteome analysis of secreted proteins of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect Immun.* 2002; 70: 3396-3403.
- 35 11. Chevalier, C., Thiberge, J.M., Ferrero, R.L., Labigne, A. Essential role of *Helicobacter pylori* gamma-glutamyltranspeptidase for the colonization of the gastric mucosa of mice. *Mol Microbiol.* 1999; 31: 1359-1372.
12. Shibayama K, Kamachi K, Nagata N, Yagi T, Nada T, Doi Y, Shibata N, Yokoyama K, Yamane K, Kato H, Iinuma Y, Arakawa Y. A novel apoptosis-inducing protein from *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol.* 2003; 47: 443-451.
- 40 13. McGovern KJ, Blanchard TG, Gutierrez JA, Czinn SJ, Krakowka S, Youngman P. Gamma-Glutamyltransferase is a *Helicobacter pylori* virulence factor but is not essential for colonization. *Infect Immun.* 2001; 69: 4168-4173.
14. Stole, E., Smith, T.K., Manning, J.M., Meister, A. Interaction of gamma-glutamyl transpeptidase with acivicin. *J Biol Chem.* 1994; 269: 21435-21439.
- 45 15. Smith, T.K., Ikeda, Y., Fujii, J., Taniguchi, N., Meister, A. Different sites of acivicin binding and inactivation of gamma-glutamyl transpeptidases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; 92: 2360-2364.
16. Busiello I, Acquaviva R, Di Popolo A, Blanchard TG, Ricci V, Romano M, Zarrilli R. *Helicobacter pylori* gamma-glutamyltranspeptidase upregulates COX-2 and EGF-related peptide expression in human gastric cells. *Cell Microbiol.* 2004; 6: 255-267.
- 50 17. Genot E, Reif K, Beach S, Kramer I, Cantrell D. p21ras initiates Rac-1 but not phosphatidylinositol 3 kinase/PKB, mediated signaling pathways in T lymphocytes. *Oncogene.* 1998; 17:1731-1738.
18. Riou, J.Y., Buissiere, J., Richard, C., Guibourdenche, M. gamma-Glutamyltransferase activity in the family "Neisseriaceae". *Ann Microbiol (Paris).* 1982; 133: 387-392.
- 55 19. Suzuki, H., Kumagai, H., Tochikura, T. Isolation, genetic mapping, and characterization of *Escherichia coli* K-12 mutants lacking gamma-glutamyltranspeptidase. *J Bacteriol.* 1987; 169: 3926-3931.
20. Xu, K., Strauch, M.A.. Identification, sequence, and expression of the gene encoding gamma-glutamyltranspeptidase in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 1996; 178: 4319-4322.
21. Ikeda, Y., Fujii, J., Anderson, M.E., Taniguchi, N., Meister, A. Involvement of Ser-451 and Ser-452 in the catalysis of human gamma-glutamyl transpeptidase. *J Biol Chem.* 1995; 270: 22223-22228 .
- 60 22. Sherr CJ. G1 phase progression: cycling on cue. *Cell.* 1994; 79: 551-555.

23. Takuwa N, Takuwa Y. Regulation of cell cycle molecules by the Ras effector system. *Mol Cell Endocrinol.* 2001; 177: 25-33.
24. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 1999; 13: 1501-1512.
- 5 25. Kerkhoff E, Houben R, Loffler S, Troppmair J, Lee JE, Rapp UR. Regulation of c-myc expression by Ras/Raf signaling. *Oncogene.* 1998; 16: 211-216.
26. Oster SK, Ho CS, Soucie EL, Penn LZ. The myc oncogene: Marvelously Complex. *Adv Cancer Res.* 2002; 84: 81-154.
- 10 27. Meister, A., Tate, S.S., Griffith, O.W. Gamma-glutamyl transpeptidase. *Methods Enzymol.* 1981; 77: 237-253.
28. Glupczynski, Y., Megraud, F., Lopez-Brea, M., Anderson, L.P. European multicenter survey of in vitro antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2001; 20: 820-823.
- 15 29. Gerhard M, Lehn N, Neumayer N, Boren T, Rad R, Schepp W, Miehle S, Classen M, Prinz C., Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96: 12778-12783.
30. Zabaleta J, McGee DJ, Zea AH, Hernandez CP, Rodriguez PC, Sierra RA, Correa P, Ochoa AC. *Helicobacter pylori* arginase inhibits T cell proliferation and reduces the expression of the TCR zeta-chain (CD3zeta). *J Immunol.* 2004 Jul 1;173(1):586-93.
- 20 31. Boanca G., Sand A., Barycki J.J., Uncoupling the Enzymatic and Autoprocessing Activities of *Helicobacter pylori* gamma-Glutamyltranspeptidase *The Journal of Biological Chemistry*, July 14, 2006, Vol. 281, No. 28 Schmees C, Prinz C, Treptau T, Rad R, Hengst L, Volland P, Bauer S, Brenner L, Schmid RM, Gerhard M Inhibition of T cell proliferation by *Helicobacter pylori*  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase *Gastroenterology* 2007 May;132(5):1820-33

LISTADO DE SECUENCIAS

- 25 <110> Gerhard, Markus
- <120> Nuevo método para tratar infecciones por H.pylori
- 30 <130> G 10010 PCT
- <140> -
- <141> 2007-10-19
- 35 <160> 11
- <170> PatentIn versión 3.3
- 40 <210> 1
- <211> 567
- <212> PRT
- <213> *Helicobacter pylori*
- 45 <400> 1

ES 2 527 474 T3

5

Met	Arg	Arg	Ser	Phe	Leu	Lys	Thr	Ile	Gly	Leu	Gly	Val	Ile	Ala	Leu	1	5	10	15
Phe	Leu	Gly	Leu	Leu	Asn	Pro	Leu	Ser	Ala	Ala	Ser	Tyr	Pro	Pro	Ile	20	25	30	
Lys	Asn	Thr	Lys	Val	Gly	Leu	Ala	Leu	Ser	Ser	His	Pro	Leu	Ala	Ser	35	40	45	
Glu	Ile	Gly	Gln	Lys	Val	Leu	Glu	Glu	Gly	Gly	Asn	Ala	Ile	Asp	Ala	50	55	60	
Ala	Val	Ala	Ile	Gly	Phe	Ala	Leu	Ala	Val	Val	His	Pro	Ala	Ala	Gly	65	70	75	80
Asn	Ile	Gly	Gly	Gly	Gly	Phe	Ala	Val	Ile	His	Leu	Ala	Asn	Gly	Glu	85	90	95	
Asn	Val	Ala	Leu	Asp	Phe	Arg	Glu	Lys	Ala	Pro	Leu	Lys	Ala	Thr	Lys	100	105	110	
Asn	Met	Phe	Leu	Asp	Lys	Gln	Gly	Asn	Val	Val	Pro	Lys	Leu	Ser	Glu	115	120	125	
Asp	Gly	Tyr	Leu	Ala	Ala	Gly	Val	Pro	Gly	Thr	Val	Ala	Gly	Met	Glu	130	135	140	

ES 2 527 474 T3

5 Ala Met Leu Lys Lys Tyr Gly Thr Lys Lys Leu Ser Gln Leu Ile Asp  
145 150 155 160

Pro Ala Ile Lys Leu Ala Glu Asn Gly Tyr Ala Ile Ser Gln Arg Gln  
165 170 175

10 Ala Glu Thr Leu Lys Glu Ala Arg Glu Arg Phe Leu Lys Tyr Ser Ser  
180 185 190

15 Ser Lys Lys Tyr Phe Phe Lys Lys Gly His Leu Asp Tyr Gln Glu Gly  
195 200 205

20 Asp Leu Phe Val Gln Lys Asp Leu Ala Lys Thr Leu Asn Gln Ile Lys  
210 215 220

Thr Leu Gly Ala Lys Gly Phe Tyr Gln Gly Gln Val Ala Glu Leu Ile  
225 230 235 240

25 Glu Lys Asp Met Lys Lys Asn Gly Gly Ile Ile Thr Lys Glu Asp Leu  
245 250 255

Ala Ser Tyr Asn Val Lys Trp Arg Lys Pro Val Val Gly Ser Tyr Arg  
260 265 270

30 Gly Tyr Lys Ile Ile Ser Met Ser Pro Pro Ser Ser Gly Gly Thr His  
275 280 285

35 Leu Ile Gln Ile Leu Asn Val Met Glu Asn Ala Asp Leu Ser Ala Leu  
290 295 300

40 Gly Tyr Gly Ala Ser Lys Asn Ile His Ile Ala Ala Glu Ala Met Arg  
305 310 315 320

Gln Ala Tyr Ala Asp Arg Ser Val Tyr Met Gly Asp Ala Asp Phe Val  
325 330 335

45 Ser Val Pro Val Asp Lys Leu Ile Asn Lys Ala Tyr Ala Lys Lys Ile  
340 345 350

50 Phe Asp Thr Ile Gln Pro Asp Thr Val Thr Pro Ser Ser Gln Ile Lys  
355 360 365

55



ES 2 527 474 T3

5 Pro Gly Met Gly Gln Leu His Glu Gly Ser Asn Thr Thr His Tyr Ser  
 370 375 380

Val Ala Asp Arg Trp Gly Asn Ala Val Ser Val Thr Tyr Thr Ile Asn  
 385 390 400

Ala Ser Tyr Gly Ser Ala Ala Ser Ile Asp Gly Ala Gly Phe Leu Leu  
 405 410 415

10 Asn Asn Glu Met Asp Asp Phe Ser Ile Lys Pro Gly Asn Pro Asn Leu  
 420 425 430

Tyr Gly Leu Val Gly Gly Asp Ala Asn Ala Ile Glu Ala Asn Lys Arg  
 435 440 445

15 Pro Leu Ser Ser Met Ser Pro Thr Ile Val Leu Lys Asn Asn Lys Val  
 450 455 460

Phe Leu Val Val Gly Ser Pro Gly Gly Ser Arg Ile Ile Thr Thr Val  
 465 470 475 480

20 Leu Gln Val Ile Ser Asn Val Ile Asp Tyr Asn Met Asn Ile Ser Glu  
 485 490 495

Ala Val Ser Ala Pro Arg Phe His Met Gln Trp Leu Pro Asp Glu Leu  
 500 505 510

Arg Ile Glu Lys Phe Gly Met Pro Ala Asp Val Lys Asp Asn Leu Thr  
 515 520 525

30 Lys Met Gly Tyr Gln Ile Val Thr Lys Pro Val Met Gly Asp Val Asn  
 530 535 540

Ala Ile Gln Val Leu Pro Lys Thr Lys Gly Ser Val Phe Tyr Gly Ser  
 545 550 555 560

35 Thr Asp Pro Arg Lys Glu Phe  
 565

40 <210> 2  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Sintetizados químicamente

50 <400> 2

55 Gln Arg Gln Ala Glu Thr Leu Lys Glu Ala Arg Glu Arg Phe Leu Lys  
 1 5 10 15

Tyr

60

<210> 3  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Sintetizados químicamente  
 10  
 <400> 3  
 Phe Asp Ile Lys Pro Gly Asn Pro Asn Leu Tyr Gly Leu Val Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Ala Asn Ala Ile  
 20  
 <210> 4  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 20  
 <220>  
 <223> Sintetizados químicamente  
 25  
 <400> 4  
 30  
 Asp Phe Ser Ile Lys Pro Gly Asn Pro Asn Leu Tyr Gly Leu Val Gly  
 1 5 10 15  
 Gly Asp Ala Asn Ala Ile Glu Ala Asn Lys Arg Pro Leu  
 20 25  
 35  
 40  
 <210> 5  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 45  
 <220>  
 <223> Sintetizados químicamente  
 <400> 5  
 50  
 Ser Ser Met Ser Pro Thr Ile Val Leu Lys Asn Asn Lys Val Phe Leu  
 1 5 10 15  
 Val Val Gly Ser Pro  
 20  
 55  
 <210> 6  
 <211> 24  
 <212> ADN.  
 <213> Secuencia artificial  
 60  
 <220>  
 <223> Sintetizados químicamente

<400> 6  
 aaacgattgg cttgggtgtg atag 24  
 5  
 <210> 7  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 10  
 <220>  
 <223> Sintetizados químicamente  
 <400> 7  
 gaccggctta gtaacgatt gatag 25  
 15  
 <210> 8  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 20  
 <220>  
 <223> Sintetizados químicamente  
 <400> 8  
 tgaaaggaaa acccatggga cggag 25  
 25  
 <210> 9  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 30  
 <220>  
 <223> Sintetizados químicamente  
 <400> 9  
 caaaggtacc aaattcttc ctgg 25  
 35  
 <210> 10  
 <211> 41  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Sintetizados químicamente  
 <400> 10  
 ccaataagcg ccttagcc gccatgtcgc ctacgattgt g 41  
 45  
 <210> 11  
 <211> 41  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 50  
 <220>  
 <223> Sintetizados químicamente  
 <400> 11  
 cacaatcgtg ggcgacatgg cggctaaagg gcgcttattg g 41  
 55  
 60

## REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos, en el cual la secuencia de aminoácidos del polipéptido es al menos 80 % idéntica a una extensión de aminoácidos consecutivos de la región de HPGGT que consiste en una secuencia de aminoácidos correspondiente a la sec. con núm. de ident.: 1, en donde dicha región está definida por las posiciones de aminoácidos 410-480 de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la sec. con núm. de ident.:1  
 5 en donde el polipéptido es adecuado para inducir una respuesta inmune que es capaz de inhibir la actividad catalítica de HPGGT, y  
 10 en donde el polipéptido consiste de 10 a 50 aminoácidos
2. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el polipéptido consiste de 15 a 30 aminoácidos.
- 15 3. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde el polipéptido comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en  
 FDIKPGNPPLYGLVGGDANAI(sec. con núm. de ident.:3),  
 DFSIKPGNPPLYGLVGGDANAIEANKRPL(sec. con núm. de ident.:4) y  
 20 SSMSPTIVLKNKVFLWGSP(sec. con núm. de ident.:5).
4. Una composición inmunogénica que comprende uno o varios de los polipéptidos, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, preferentemente para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad causada por o asociada con H. pylori.
- 25 5. Una composición inmunogénica que comprende una forma enzimáticamente inactiva de HPGGT o un fragmento enzimáticamente inactivo de HPGGT, en donde el fragmento y la HPGGT inducen una respuesta de anticuerpos, donde la HPGGT tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 1, y donde dicho fragmento consiste en una extensión de aminoácidos contiguos que comprenden los aminoácidos 451 y 452 de HPGGT, donde la respuesta de anticuerpos comprende anticuerpos con un efecto de anulación en la supresión dependiente HPGGT de la proliferación de linfocitos, para usar en un método para la prevención y/o  
 30 tratamiento de una enfermedad causada por o asociada con H. pylori.
6. La composición inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 5, en donde la respuesta de anticuerpos comprende anticuerpos con un efecto inhibitor sobre HPGGT, con mayor preferencia en la actividad específica de HPGGT.
- 35 7. La composición inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en donde la composición es para promover la activación y proliferación de linfocitos en un paciente que sufre de infección por H. pylori o que está en riesgo de desarrollar una infección con H. pylori.
- 40 8. La composición inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en donde la composición comprende uno o varios adyuvantes.
9. La composición inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, en donde la composición comprende uno o varios antígenos de H. pylori.
- 45 10. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el antígeno se selecciona del grupo que comprende HpaA, Omp18 y combinaciones de los mismos.
- 50 11. La composición inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 10, en donde la enfermedad es una enfermedad causada por o asociada con la infección por H. pylori.
12. Uso de un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la fabricación de un medicamento.
- 55 13. Uso de una composición inmunogénica que comprende uno o varios de los polipéptidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o de una composición inmunogénica que comprende una forma enzimáticamente inactiva de HPGGT o un fragmento enzimáticamente inactivo de HPGGT, donde el fragmento y la HPGGT inducen una respuesta de anticuerpos, donde la HPGGT tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con sec. con núm. de ident.: 1, donde dicho fragmento consiste en una extensión de aminoácidos contiguos que comprenden los aminoácidos 451 y 452 de HPGGT, para la fabricación de un medicamento.
- 60 14. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12 a 13, en donde el medicamento es una vacuna.

- 5
15. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en donde el medicamento es para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad causada por o asociada con *H. pylori*, con mayor preferencia una enfermedad causada por o asociada con la infección por *H. pylori*.
- 10
16. Uso de un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la detección de un anticuerpo en una muestra, por el cual el anticuerpo está dirigido a HPGGT.
- 15
17. Uso de acuerdo con la reivindicación 16, en donde el anticuerpo es capaz de inhibir la actividad enzimática de HPGGT y/o actividad inhibidora de HPGGT en la proliferación de linfocitos.
18. Un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el anticuerpo tiene un efecto inhibidor sobre la actividad enzimática de HPGGT y un efecto anulador en la supresión dependiente de HPGGT de la proliferación de linfocitos.
- 20
19. Un ácido nucleico que codifica el anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 18.
- 25
20. Una molécula de ácido nucleico que se une específicamente a un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o la unión a un fragmento de HPGGT que comprende las posiciones de aminoácidos 410-480 de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con sec. con núm. de ident.: 1, en donde dicho fragmento consiste en una extensión de aminoácidos contiguos que comprenden los aminoácidos 451 y 452 de HPGGT, en donde la molécula de ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en aptámeros y espejélmeros, en donde la molécula de ácido nucleico tiene un efecto inhibidor sobre la actividad enzimática de HPGGT y un efecto anulador en la supresión dependiente de HPGGT de la proliferación de linfocitos.
- 30
21. Uso de un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 18 para la fabricación de un medicamento.
22. Uso de un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 20 para la fabricación de un medicamento.
- 35
23. Un método para identificar un candidato a fármaco para el tratamiento de una enfermedad que comprende las etapas para evaluar el candidato a fármaco
- a. efecto inhibidor sobre la actividad específica de la gamma-glutamil transpeptidasa de *H. pylori* y
- b. efecto anulador sobre la supresión dependiente de HPGGT de la proliferación de linfocitos.
- 40
24. Un método para desarrollar una vacuna que comprende las etapas de
- a) proporcionar composiciones inmunogénicas que comprenden HPGGT o al menos un fragmento del mismo;
- b) inmunizar animales no humanos con las composiciones inmunogénicas y con ello generar anticuerpos;
- c) evaluar los anticuerpos por su efecto inhibidor sobre la actividad específica de la gamma-glutamil transpeptidasa de *H. pylori* y su efecto anulador en la supresión dependiente de HPGGT de la proliferación de linfocitos y
- d) seleccionar una composición inmunogénica capaz de inducir una respuesta de anticuerpos que comprende anticuerpos con un efecto anulador sobre la supresión dependiente de HPGGT de la proliferación de linfocitos.
- 45
25. Uso de un ligando de HPGGT para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad, en donde el ligando inhibe significativamente la actividad HPGGT y anula la supresión dependiente de HPGGT de la proliferación de linfocitos, en donde el ligando es un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 18, o una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 20, en donde la enfermedad es causada por o asociada con *H. pylori*. molécula.
- 50
26. Uso de acuerdo con la reivindicación 25, en donde la enfermedad es causada por o asociada con la infección por *H. pylori*.
- 55
27. Uso de acuerdo con la reivindicación 25, en donde la proliferación de linfocitos se evalúa con un ensayo de proliferación de linfocitos.

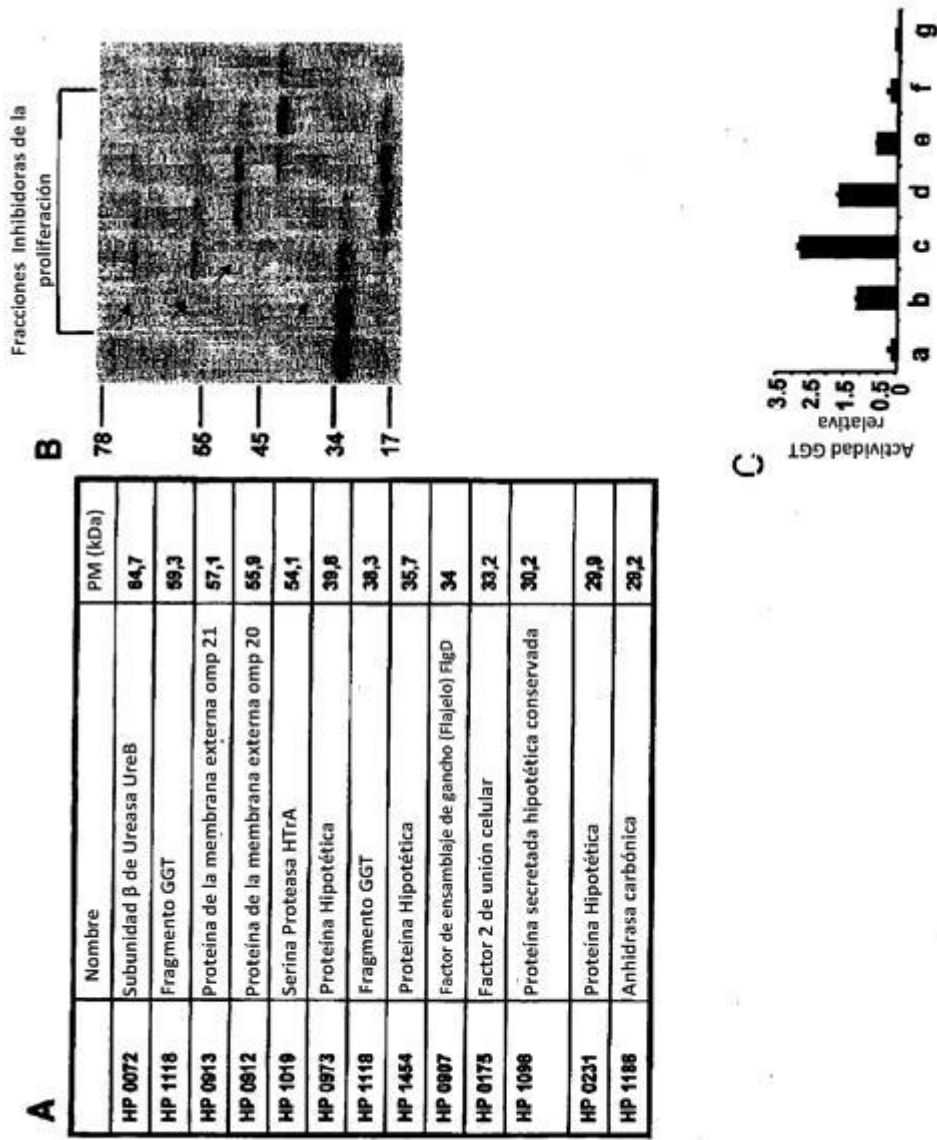


Figura 1 A-C

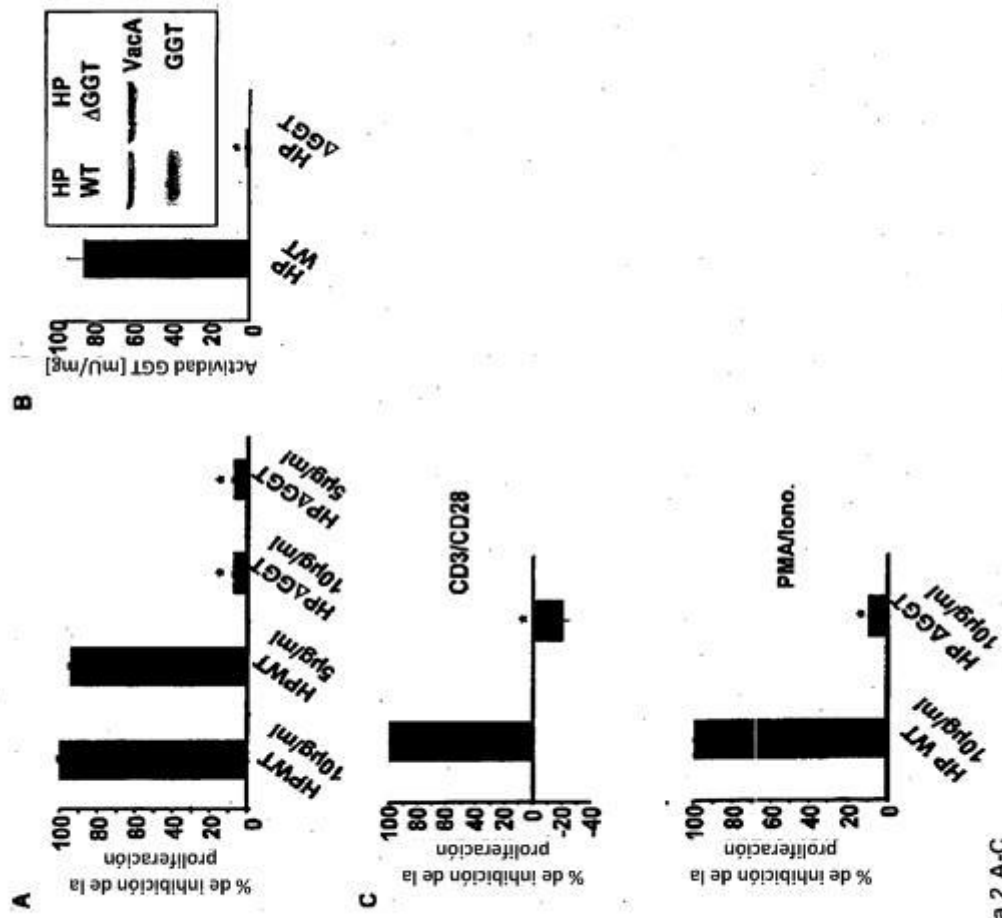


Figura 2 A-C

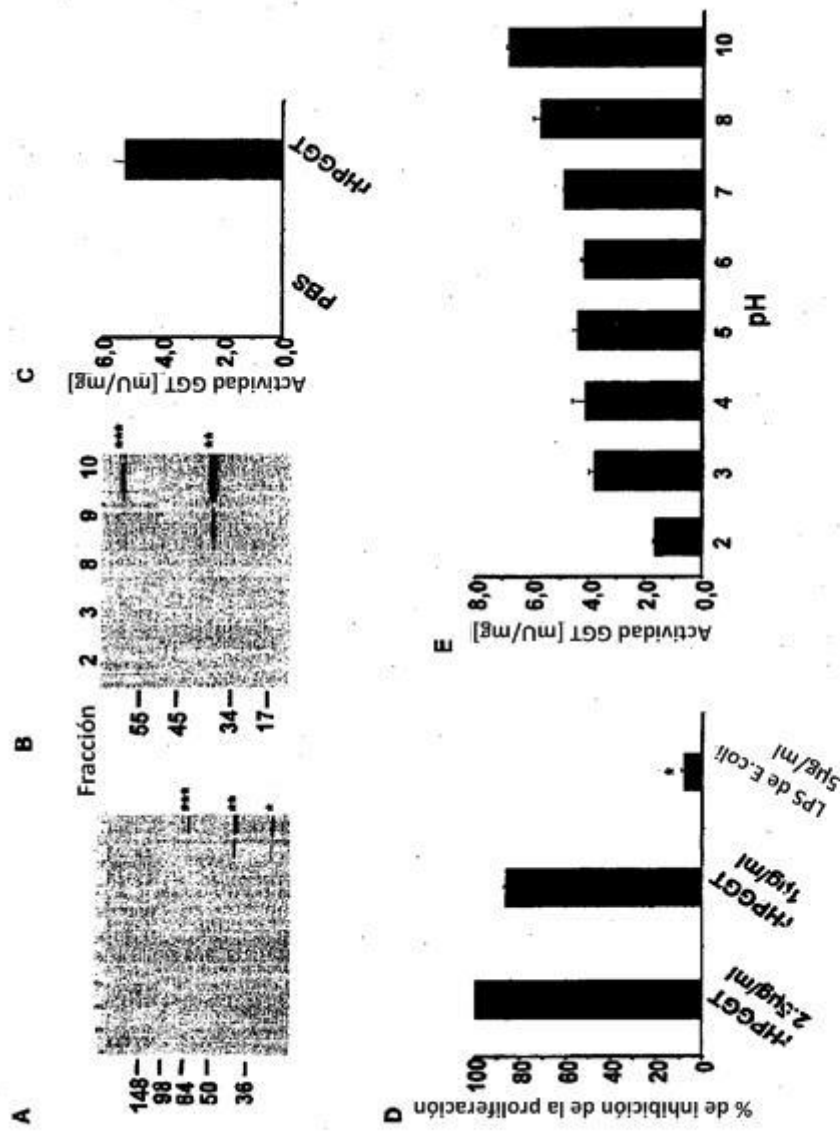


Figura 3 A-E



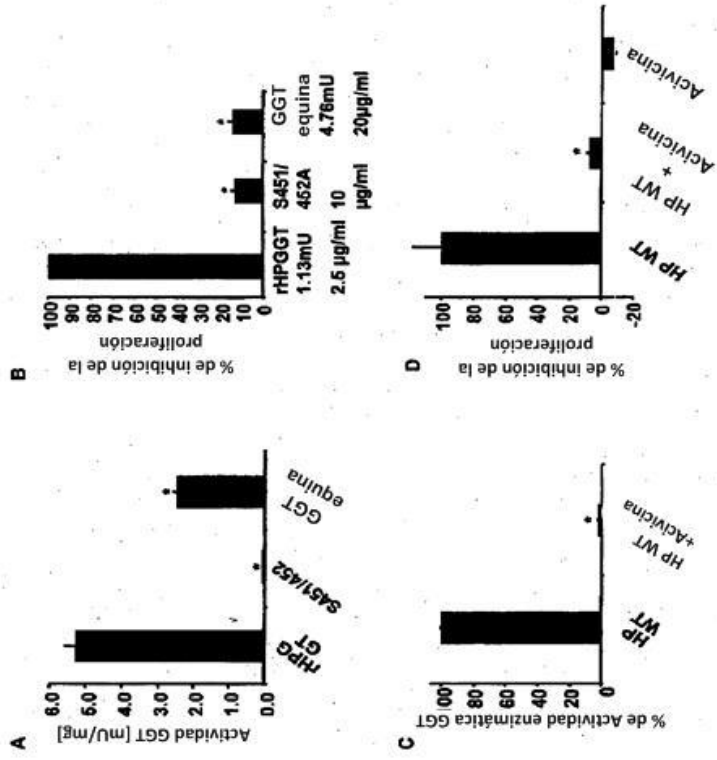


Figura 4 A-D

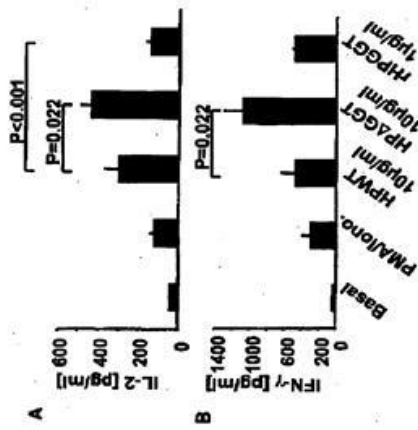


Figura 5 A-B

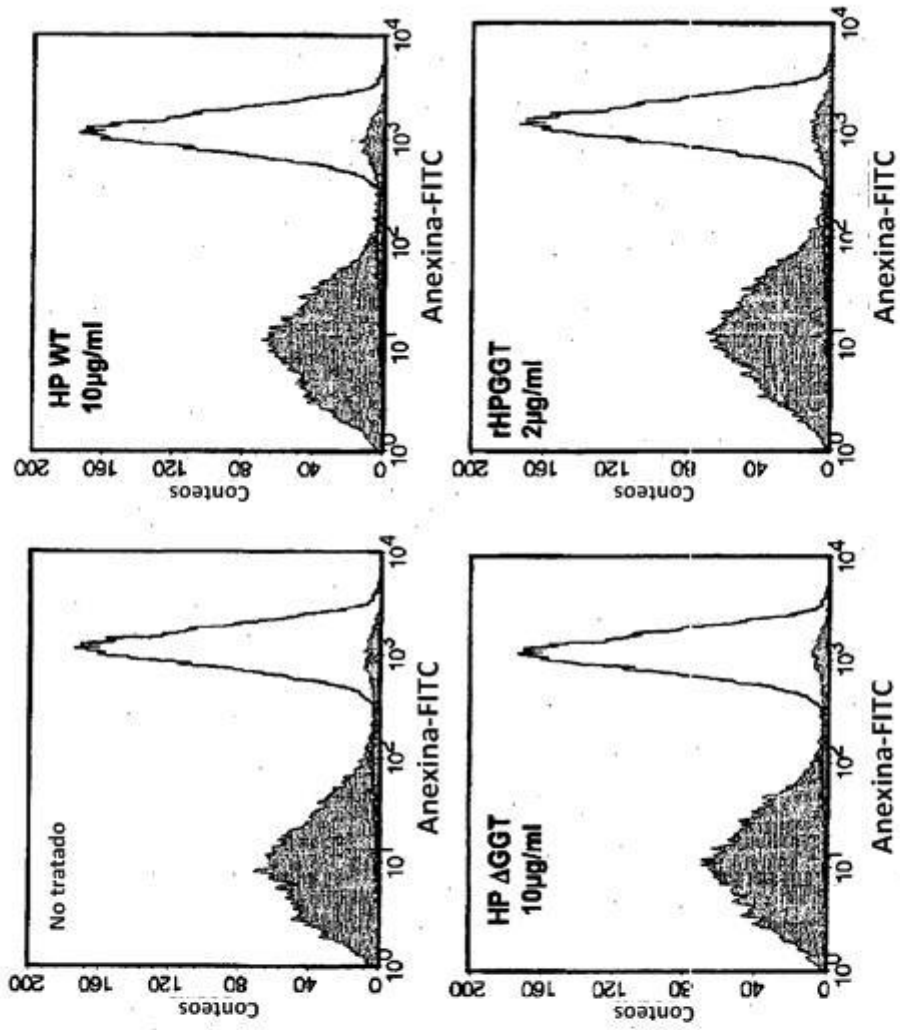


Figura 5 C

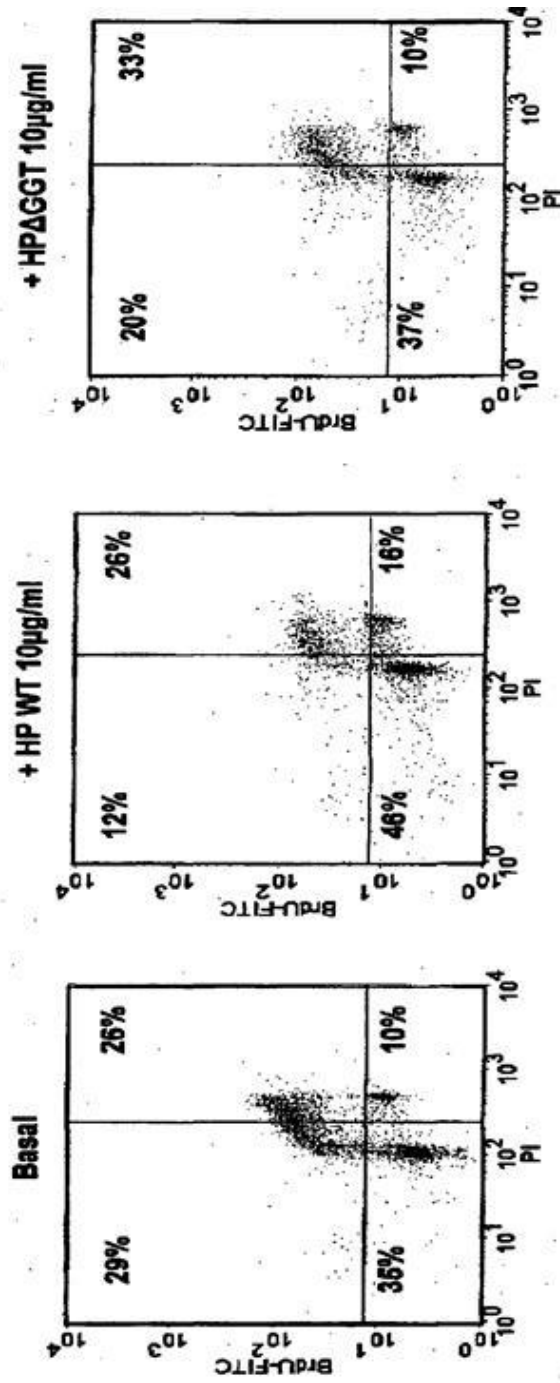


Figura 6 A

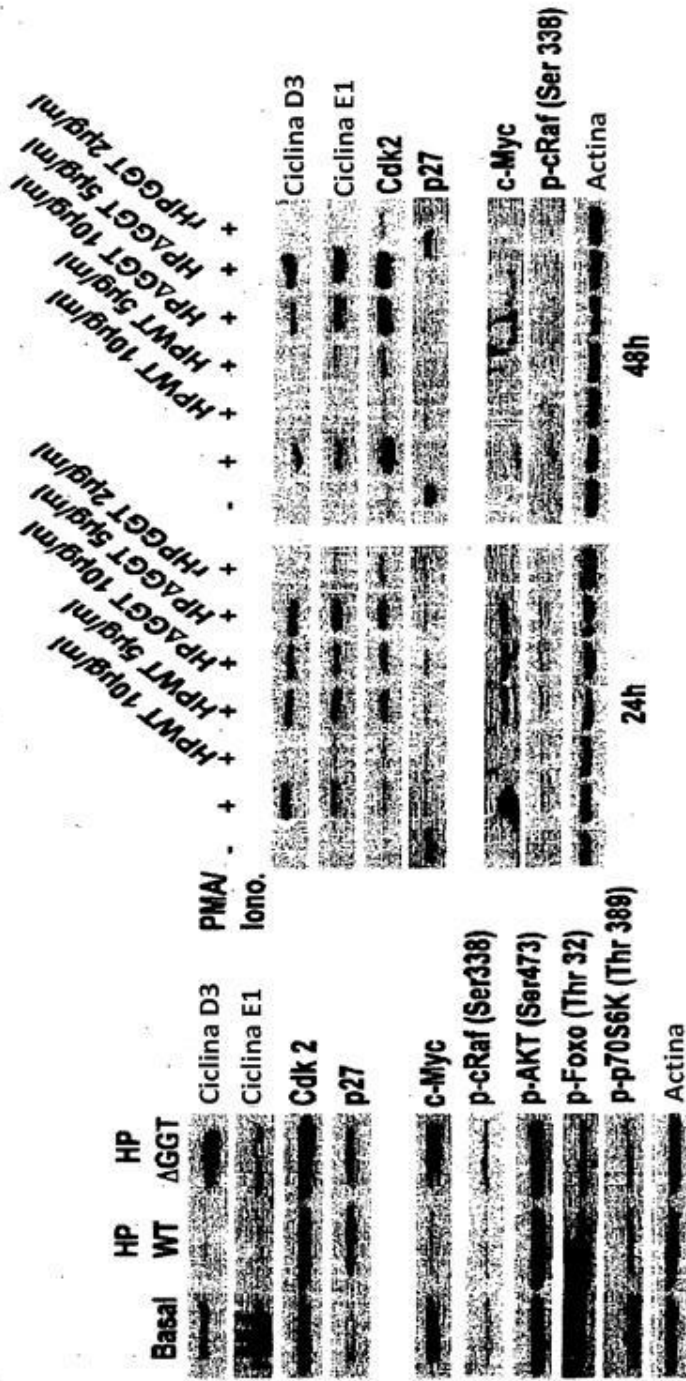


Figura 6 B

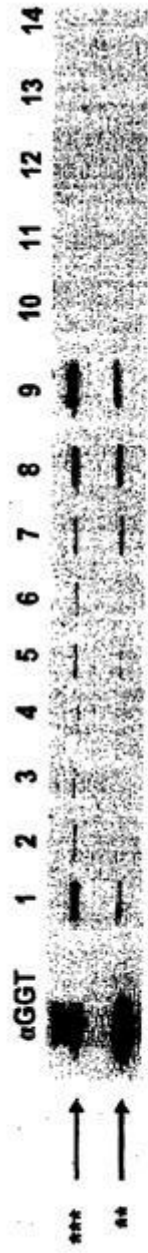


Figura 7

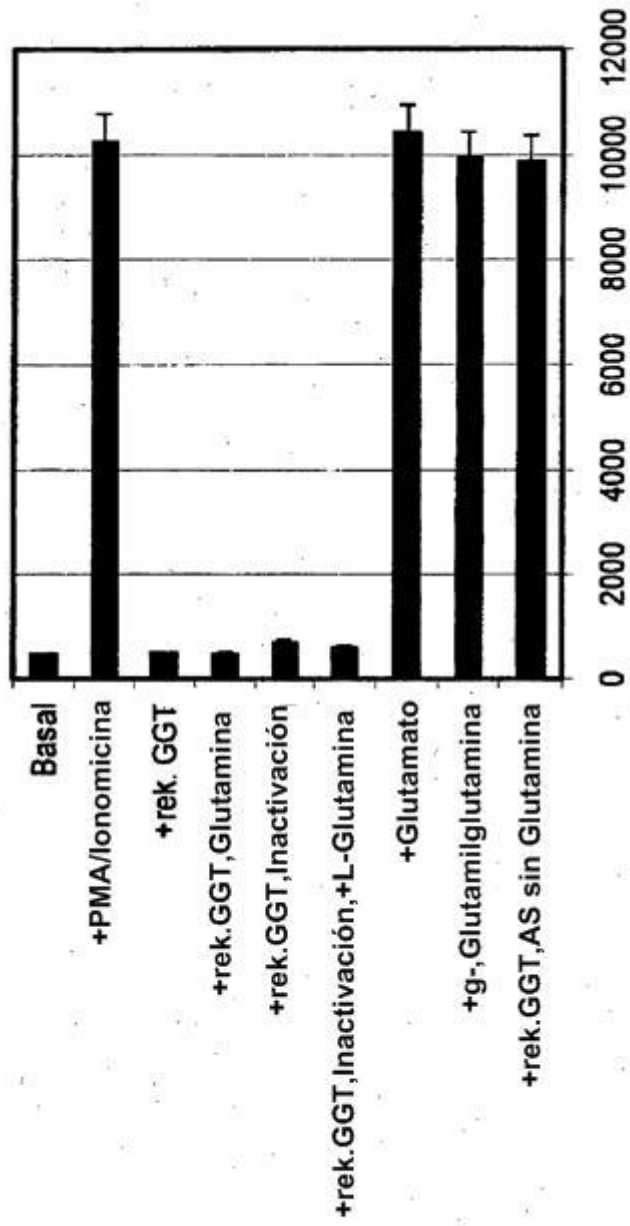


Figura 8

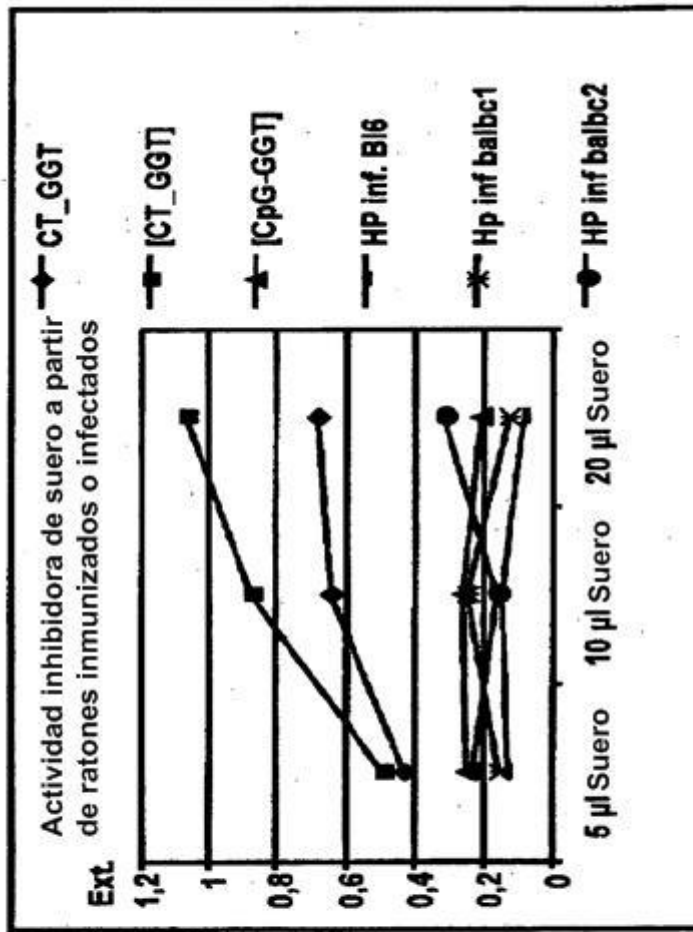


Figura 9