(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 682 925**

(51) Int. CI.:

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 14003585 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.06.2018 EP 2902038**

(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:
24.09.2018

(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:

SÁEZ MAESO, Ana

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 composiciones inmunogénicas que comprenden una forma enzimáticamente inactiva o un fragmento enzimáticamente inactivo de gamma glutamil transpeptidasa de *Helicobacter pylori* (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 de la mucosa por los granulocitos neutrofílicos, 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 ζ 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.[1] Se ha demostrado que las células T CD4 positivas son cruciales para la eliminación bacteriana[2] pero se inhiben en su proliferación por *H. pylori.*[3] 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 los factores de virulencia CagA (gen A asociado a citotoxina) y VacA (citotoxina vacuolizante).[4]

En contraste, dos grupos recientemente reportaron que la proliferación de linfocitos se suprimió en presencia de concentraciones altas de VacA purificada. [5,6] Paradójicamente sin embargo, mutantes de *H. pylori* deficientes de VacA no tuvieron defecto en sus propiedades de inhibición de la proliferación.[5] 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.[7,8]

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.[3] 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*.

El documento EP 1 508 572 A1 divulga que la proteína inductora de apoptosis de H. pylori es un complejo de proteína compuesto por asociación de dos tipos de proteínas, que comprende una parte de la secuencia de aminoácidos encerrada por el gen de la gamma glutamil transpeptidasa (HP1118).

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.

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

Estos problemas se solucionan por la materia de las reivindicaciones independientes. Las realizaciones preferidas se pueden tomar de las reivindicaciones dependientes.

En una realización, la respuesta de anticuerpo comprende anticuerpos con un efector inhibidor en HPGGT, con mayor preferencia en la actividad específica de HPGGT.

En una realización, los linfocitos son células B o T.

En una realización, la composición comprende uno o varios adyuvantes.

En una realización, la composición comprende uno o varios antígenos de H. pylori.

En una realización, el antígeno se selecciona del grupo que comprende HpaA, Omp18 y combinaciones de los mismos.

En una realización, la composición es para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad causada por o asociada con H. pylori, más preferiblemente una enfermedad causada por o asociada con la infección de H. pylori.

En una realización, la enfermedad se selecciona del grupo que comprende infección con H. pylori, trastornos gastro duodenales causados por H. pylori, gastritis, gastritis crónica, úlcera gástrica o duodenal, cáncer de estómago y linfoma (MALT).

En una realización, la composición inmunogénica es una vacuna.

También se divulga aquí el uso de una composición inmunogénica de acuerdo con la presente invención para la fabricación de un medicamento.

En una realización, el medicamento es una vacuna.

En una realización, 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.

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 incuba 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 celar 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, preferiblemente 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-glutamiltransferasa se conoce además como glutamil transpeptidasa; a-glutamil transpeptidasa; g-glutamil peptidiltransferasa; g-glutamil transpeptidasa; g-GPT; g-GT; g-GTP; L-g-glutamil transpeptidasa; L-g-glutamiltransferasa; L-glutamiltransferasa; GGT; g-glutamiltranspeptidasa. La actividad específica (catalítica) es la transferencia del residuo glutamil como se indica más abajo:

(5-L-glutamil)-péptido + un aminoácido = péptido + 5-L-glutamil aminoácido

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 GTT se puede evaluar con métodos conocidos por aquellos con experiencia en la técnica (por ejemplo, usando L-gamma-glutamil-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*.[11,13] 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, nuestros datos muestran que los GGT de mamífero carecieron de este efecto inhibidor. Como se mencionó anteriormente, se han reportado diferencias en la estructura y localización de mamífero y HPGGT. Nuestros 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.[21] 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 [31]. Como consecuencia, la incubación de la HPGGT con el inhibidor de GGT acivicina suprime completamente la actividad catalítica, así como el efecto inhibidor de la enzima. Así, nuestros 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*[11,13], 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 α del receptor de IL-2) no se redujeron en presencia de sobrenadantes de *H. pylori*.[3] 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.[12,16] 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 sus parejas catalíticas.[22-23] 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. [24] Adicionalmente, se establece que la inducción de la señalización de Ras conduce a una síntesis aumentada de la proteína c-Myc [25] que juega un papel importante durante la regulación del ciclo celular, crecimiento celular y transformación.[26] Estudios anteriores demostraron que la señalización de PI3K procede independiente de la señalización Ras en las células T.[17] 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, nuestros 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 γ-glutamil de un donante a un sustrato aceptor .[27] Por el análisis de la reducción sistemática de aminoácidos el presente inventor encontró que el efecto inhibidor de la HPGGT se abolió completamente en ausencia del aminoácido glutamina del medio, sugiriendo que el efecto inhibidor de GGT a partir de *H. pylori* se media indirectamente por la formación de metabolitos durante la transpeptidación. Esto se apoya por nuestra observación 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 nuestra publicación anterior (Gastroenterology 2005 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 nuestro sistema. Cuando la concentración de los sobrenadantes de cultivo HP incubados con linfocitos se elevó por encima de 100 µg/ml se observó apoptosis en cantidades comparables como Wang y otros. Esto sugiere que el efecto inhibidor de HP hacia los linfocitos descritos en la presente descripción es más pronunciado que y diferente de los mecanismos descritos por este grupo.

Otro estudio por Zabaleta y otros describieron la inhibición de la proliferación de células T por la proteína arginasa citoplasmática de HP[30]. 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 µg/ml) que la que hicimos en nuestro presente trabajo (10 µg/ml). En un estudio anterior el presente inventor demostró que altas concentraciones de sobrenadante de cultivo de HP (≥100 µg/ml) indujeron cantidad significativa de apoptosis en los linfocitos. Adicionalmente, la presencia o ausencia de VacA no tuvo influencia en el efecto inhibidor de HP hacia linfocitos en nuestro sistema (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 inhibidor 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 inhibidor 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 preferiblemente 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.

El alcance de la presente invención está definido en las reivindicaciones adjuntas.

También se divulgan aquí polipéptidos específicos. 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. Preferiblemente la secuencia de aminoácidos de HPGGT comprende la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ. ID. NO:1.

Como se usa preferiblemente en el presente documento, una secuencia de aminoácidos es idéntica a otra secuencia de aminoácidos si la secuencia o el orden de los aminoácidos es el mismo en términos tanto de la naturaleza de los aminoácidos como de su posición relativa entre sí. En otra realización, la secuencia de aminoácidos primaria de la secuencia con la que son idénticas, es la misma.

Como se usa en la presente descripción preferiblemente 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 realización, 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.

Se reconocerá 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 90 %, 95 % o 100 %.

En una realización el polipéptido divulgado aquí comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es idéntica o corresponde a una extensión de aminoácidos consecutivos de HPGGT. Preferiblemente, y aplicable a cualquier realización y aspecto de la presente invención, HPGGT tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ. ID. NO: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 SEQ. ID. NO: 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 SEQ. ID. NO: 1.

En una realización adicional, los polipéptidos divulgados aquí son fragmentos de HPGGT, preferiblemente fragmentos inmunogénicos de HPGGT y con mayor preferencia fragmentos inmunogénicos de HPGGT que son adecuados para provocar una respuesta inmune en los organismos huésped, preferiblemente una respuesta de anticuerpos, por lo cual el anticuerpo tiene un efecto inhibidor 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. El fragmento inmunogénico divulgado aquí 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 epítopo para el diseño de vacunas basada en péptidos se aplican aquí. Como se usa preferiblemente en la presente descripción un organismo huésped es un animal, preferiblemente un mamífero, o un ser humano que, preferiblemente son capaces de desarrollar una respuesta inmune contra un antígeno.

Como se usa en la presente descripción preferiblemente, un aminoácido es un alfa-aminoácido. Como se usa preferiblemente en la presente descripción, un aminoácido es ya sea un D- o un L-aminoácido, preferiblemente un L-aminoácido. Todavía preferiblemente 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 inhibidor 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 inhibidor en la actividad catalítica de HPGGT y, además, tiene que restablecer la proliferación de las células T cuando se incuba con HPGGT.

A la luces de este hallazgo la presente invención se relaciona con el uso de una forma inactivada de HPGGT.

Una forma inactivada de HPGGT es 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 deleciones de uno o de varios aminoácidos, alteración de uno o más aminoácidos, siempre en comparación con la HPGGT enzimáticamente activa. De acuerdo con la presente invención, la 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 SEQ. ID. NO:1. De acuerdo con la presente invención, la forma inactivada de HPGGT todavía es capaz de provocar una respuesta de anticuerpo en un animal y/o un ser humano, que comprende anticuerpos con un efecto anulador en la supresión dependiente de HPGGT de la proliferación de linfocitos. Como se usa preferiblemente 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.

Se entenderá que una forma inactiva de HPGGT como se describe aquí, en una realización, 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 preferiblemente 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, preferiblemente 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 realización, la composición inmunogénica de la presente invención comprende uno o varios adyuvantes. Los adyuvantes preferiblemente 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. Preferiblemente, el polímero policatiónico es un péptido policatiónico y/o en donde el compuesto neuroactivo es la hormona de crecimiento humano.

En una realización 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 Voland p. y otros, Infection y 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, preferiblemente, 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 realización 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 las formas inactivas de HPGGT destinadas para la administración al cuerpo animal o humano se formulan preferiblemente. Tales formulaciones se conocen por la persona experta en la técnica. En una realización 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 realización 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, la composición inmunogénica se usa preferiblemente 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 realización la enfermedad son trastornos gastroduodenales, causados por la infección de H. pylori. En una realización 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, 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.

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

También se divulga aquí 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 preferiblemente 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.

También se divulga en la presente memoria un ácido nucleico que codifica la HPGGT inactiva divulgada en este documento. 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, preferiblemente un vector de expresión. En una realización, el vector de expresión comprende plásmidos, cósmidos, virus, bacteriófagos y otros vectores usados habitualmente en el campo de la ingeniería genética. Se divulga además un organismo huésped que contiene tal vector. En una realización, 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 divulgados aquí. 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 divulgadas aquí. Preferiblemente, estas células son células procariotas o eucariotas, por ejemplo células de mamífero, células bacterianas, células de insecto o células de levadura. Las células huésped divulgadas aquí se caracterizan preferiblemente por el hecho de que la molécula de ácido nucleico introducida divulgada aquí 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.

También se divulgan aquí proteínas aisladas que presentan propiedades biológicas de HPgGT, preferiblemente 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 divulgadas aquí, así como a métodos para su producción, por la cual, por ejemplo, una célula huésped divulgada aquí 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 divulgadas aquí están preferiblemente en una forma sustancialmente purificada.

Así, se divulga además aquí 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 divulgados aquí que se puede recuperar a partir de dichas células.

Dentro de la presente invención, el término HPGGT silvestre o expresiones similares se refieren preferiblemente 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, realizaciones y ventajas adicionales.

La 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[9,10]

La 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 inhibidor de las fracciones están marcadas con flechas.

La 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)*

Las Figs. 2A a C 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 ^{3}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).

La 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.

Las 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*).

Las 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 inhibidor 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 inhibidor (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).

Las 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.

La 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).

La 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 GI- (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.

La Fig. 6B un SDS PAGE de proteínas obtenidas a partir de 10^{7} 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).

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

La 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 µg/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 BPMC para investigar posibles efectos inhibidores. Aminoácidos sin (w/o) glutamina se usaron para mostrar la dependencia del efecto inhibidor sobre la glutamina.

La 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 ($vacA^+$ $cagA^+$) 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 .[29] 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_{600nm} de 1 (que corresponde a aproximadamente. $2x10^8$ bacterias/ml). Las bacterias se incubaron en PBS durante 2h bajo condiciones microaerofílicas 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[3]. En resumen, 500 µg de proteína se cargaron en una columna de Superdex 200 10/300 (GE Healthcare, Munich, Alemania) y eluyeron con PBS desgaseado a 4 °C. Proteínas estándares α-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 µg/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' (SEQ. ID. NO:6); antisentido 5'-GACCGGCTTAGTAACGATTTGATAG-3' (SEQ. ID. NO:7)) del ADN bacteriano e inmunoelectrotransferencia de proteínas ΔGGT de sobrenadantes *de H. pylori*.

Cultivo celular: El aislamiento de linfocitos de sangre periférica (PBMC) se realizó como se describió anteriormente[3]. Todas las células se incubaron a 37 °C con 5 % CO_2. 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 Biotech, Bergisch Gladbach, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Ensayos de proliferación celular: Células (10^5 PBMC, células T primarias purificadas o 10^4 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-[^{3}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' (SEQ. ID. NO:8); antisentido: 5'-CAAAGGTACCAAATTCTTTCCTTGG-3' (SEQ. ID. NO: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_{600} alcanzó 0.6. La expresión de HPGGT recombinante se indujo mediante la adición de isopropil β-D-1-tiogalactopiranósido (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_2 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 durante10 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'-CCAATAAGCGCCCTTTAGCCGCCATGTCGCCTACGATTGTG-3' (SEQ. ID. NO: 10); *S451/452A* antisentido: 5'-CACAATCGTAGGCGACATGGCGGCTAAAGGGCGCTTATTGG-3' (SEQ. ID. NO: 11). El éxito de la mutagénesis se confirmó por secuenciación.

Inmunoelectrotransferencia. Para el análisis de inmunoelectrotransferencia 10^7 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_3VO_4, 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 electrotransfirieron 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_2O) 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 ($5x10^6$ 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[27]. 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 ($5x10^5$ 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. $5x10^5$ 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 $CaCl_2$) 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.[3] 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.[9,10] 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* γ-glutamil 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.[11] 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*.[11,12,13] Los sobrenadantes de estos mutantes se probaron para su actividad inhibidora 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 inhibidor de bacterias ΔGGT 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 inhibidor 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 inhibidora unida a un grupo hidroxilo específico de GGT.[14,15] 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 IFNγ 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 ΔGGT 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-γ 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.[12,16] Sin embargo, nada se sabe sobre el efecto de GGT de *H. pylori* frente a los linfocitos.

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 ΔGGT ni HPGGT recombinante usados en concentraciones, que 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 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. 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 µ/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 µg/ml de proteína total en el sobrenadante. A concentraciones inferiores de 5 µg/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 µg/ml

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 ΔGGT. 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.

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[17], 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 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

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.

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 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 inhibidora contra HPGGT se puede lograr, y depende altamente de la selección del antígeno. Más aun, la infección con H. pylori no induce dicha respuesta inhibidora.

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.

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 Helicobader pylori infection in the absence of antibodies and is mediated by MHC class II-restricted responses. J Exp Med. 1998; 188: 2277-2288.

3. Gerhard M, Schmees C, Voland 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.

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.

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.

9. Kim N, Weeks DL, Shin JM, Scott DR, Young MK, Sachs G. Proteins released by Helicobader 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.

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.

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.

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.

17. Genot E, Reif K, Beach S, Kramer I, Cantrell D. p21ras initiates Rac-1 but not phosphatidyl inositol 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.

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., Taniguch,i 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 .

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.

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.

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.

29. Gerhard M, Lehn N, Neumayer N, Boren T, Rad R, Schepp W, Miehlke 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.

31. Boanca G., Sand A., Barycki J.J., Uncoupling the Enzymatic and Autoprocessing Activities of Helicobacter pylori gamma-Glutamyltranspeptidas The Journal of Biological Chemistry, July 14, 2006, Vol. 281, No. 28

Schmees C, Prinz C, Treptau T, Rad R, Hengst L, Voland P, Bauer S, Brenner L, Schmid RM, Gerhard M Inhibition of T cell proliferation by Helicobacter pylori γ-glutamyl transpeptidase Gastroenterology 2007 May;132(5):1820-33

Listado de secuencias

<110> ImevaX GmbH

<120> Nuevo método para tratar infecciones de H. pylori

<130> G 10010 PCT-EP-D-I

<150> EP 06 021 936.7

<151> 2006-10-19

<160> 11

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 567

<212> PRT

<213> Helicobacter pylori

<400> 1

```
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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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                 395                 400

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

```
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

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

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

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

Thr Asp Pro Arg Lys Glu Phe
                565
```

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado químicamente

<400> 2

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

Tyr
```

<210> 3

<211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado químicamente

<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> 29

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado químicamente

<400> 4

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

<210> 5

<211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado químicamente

<400> 5

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

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado químicamente

<400> 6

aaacgattgg cttgggtgtg atag 24

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado químicamente

<400> 7

gaccggctta gtaacgattt gatag 25

<210> 8

<211> 25

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado químicamente

<400> 8

tgaaaggaaa acccatggga cggag 25

<210> 9

<211> 25

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado químicamente

<400> 9

caaaggtacc aaattctttc cttgg 25

<210> 10

<211> 41

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado químicamente

<400> 10

ccaataagcg ccctttagcc gccatgtcgc ctacgattgt g 41

<210> 11

<211> 41

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado químicamente

<400> 11

cacaatcgta ggcgacatgg cggctaaagg gcgcttattg g 41

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica que comprende una forma enzimáticamente inactiva de H. pylori gamma-glutamil transpeptidasa (HPGGT) para uso como un medicamento,

en la que HPGGT tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 o una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% o al menos 95% idéntica a la SEQ ID NO: 1,

en la que la forma enzimáticamente inactiva de HPGGT carece de los residuos de serina en las posiciones 451 y 452 de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, y

en la que la forma enzimáticamente inactiva de HPGGT induce una respuesta de anticuerpos que comprende anticuerpos con un efecto anulador sobre la supresión dependiente de HPGGT de la proliferación de linfocitos.

2. Una composición inmunogénica que comprende un fragmento enzimáticamente inactivo de H. pylori gamma-glutamil transpeptidasa (HPGGT) para uso como un medicamento,

en la que HPGGT tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 o una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% o al menos 95% idéntica a SEQ ID NO: 1,

en la que el fragmento enzimáticamente inactivo de HPGGT consiste en un tramo de aminoácidos contiguos que comprende los aminoácidos 451 y 452 de HPGGT,

en la que el fragmento enzimáticamente inactivo de HPGGT carece de los residuos de serina en las posiciones 451 y 452 de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, y

en la que el fragmento enzimáticamente inactivo de HPGGT induce una respuesta de anticuerpos que comprende anticuerpos con un efecto anulador sobre la supresión dependiente de HPGGT de la proliferación de linfocitos.

3. La composición inmunogénica para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que los residuos de serina en las posiciones 451 y 452 de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID NO: 1 son reemplazados por residuos de alanina.

4. La composición inmunogénica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la respuesta de anticuerpos comprende anticuerpos con un efecto inhibidor sobre HPGGT, más preferiblemente sobre la actividad enzimática de HPGGT.

5. La composición inmunogénica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la composición comprende uno o varios adyuvantes.

6. La composición inmunogénica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la composición comprende uno o varios antígenos de H. pylori.

7. La composición inmunogénica para uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el antígeno se selecciona del grupo que comprende proteínas de membrana externa.

8. La composición inmunogénica para uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que el antígeno se selecciona del grupo que comprende HpaA, Omp18 y combinaciones de los mismos.

9. La composición inmunogénica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que el medicamento es una vacuna.

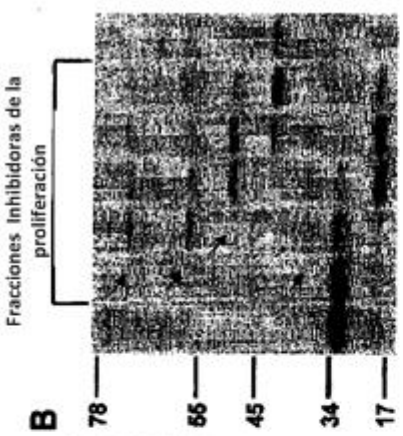
10. La composición inmunogénica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que el medicamento o la vacuna es para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad, en la que la enfermedad es causada por o está asociada con H. pylori, más preferiblemente una enfermedad causada por o asociada con la infección de H. pylori.

11. La composición inmunogénica para uso de acuerdo con la reivindicación 10, en la que la enfermedad se selecciona del grupo que comprende infección con H. pylori, trastornos gastro duodenales causados por H. pylori, gastritis, gastritis crónica, úlcera gástrica o duodenal, cáncer de estómago y linfoma (MALT).

A

	Nombre	PM (kDa)
HP 0072	Subunidad β de Ureasa UreB	64,7
HP 1118	Fragmento GGT	59,3
HP 0913	Proteína de la membrana externa omp 21	57,1
HP 0912	Proteína de la membrana externa omp 20	55,9
HP 1019	Serina Proteasa HTrA	54,1
HP 0973	Proteína Hipotética	39,8
HP 1118	Fragmento GGT	38,3
HP 1454	Proteína Hipotética	35,7
HP 0807	Factor de ensamblaje de gancho (Flajelo) FlgD	34
HP 0175	Factor 2 de unión celular	33,2
HP 1098	Proteína secretada hipotética conservada	30,2
HP 0231	Proteína Hipotética	29,9
HP 1186	Anhidrasa carbónica	28,2

B



C

Figura 1 A-C

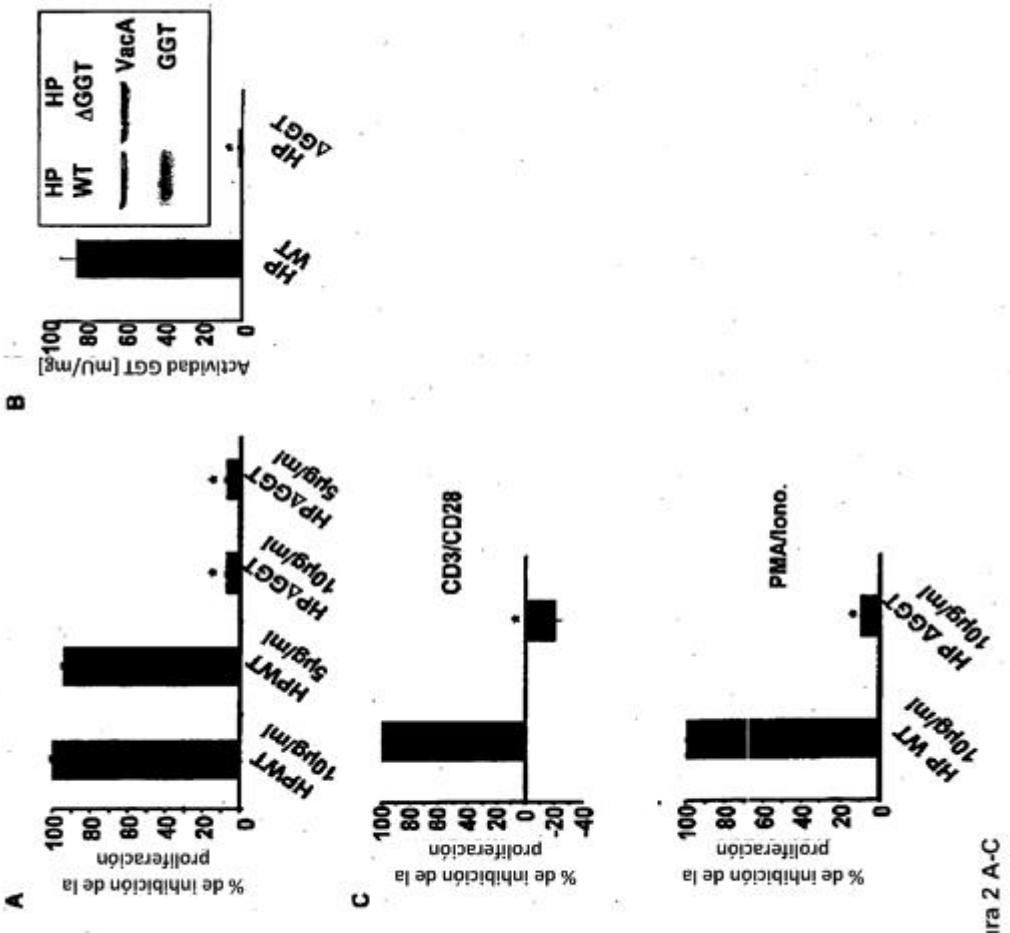

A
% de inhibición de la proliferación
100
80
60
40
20
0
HPWT 10µg/ml
HPWT 5µg/ml
HPΔGGT 10µg/ml
HPΔGGT 5µg/ml
*
B
Actividad GGT [mU/mg]
HP WT
HP ΔGGT
*
HP WT
HP ΔGGT
VacA
GGT
C
CD3/CD28
% de inhibición de la proliferación
100
80
60
40
20
0
-20
-40
*
PMA/Iono.
% de inhibición de la proliferación
HP WT 10µg/ml
HP ΔGGT 10µg/ml
*

Figura 2 A-C

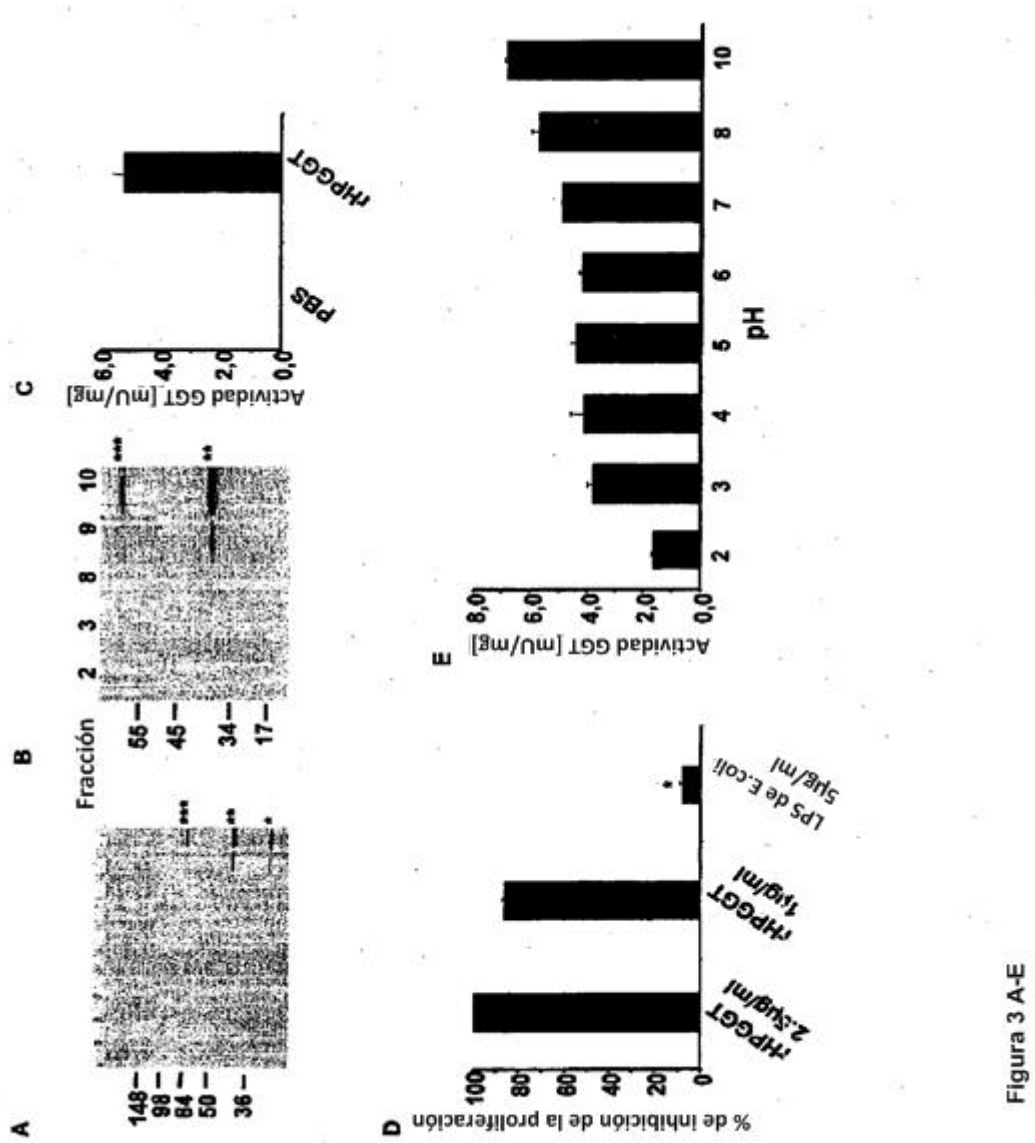

A
148
98
84
50
36
B
Fracción
2
3
8
9
10
55
45
34
17
C
Actividad GGT [mU/mg]
6,0
4,0
2,0
0,0
rHpGGT
PBS
D
% de inhibición de la proliferación
100
80
60
40
20
0
rHpGGT 2,5µg/ml
rHpGGT 1µg/ml
LPS de E.coli 5µg/ml
E
Actividad GGT [mU/mg]
8,0
6,0
4,0
2,0
0,0
2
3
4
5
6
7
8
10
pH

Figura 3 A-E

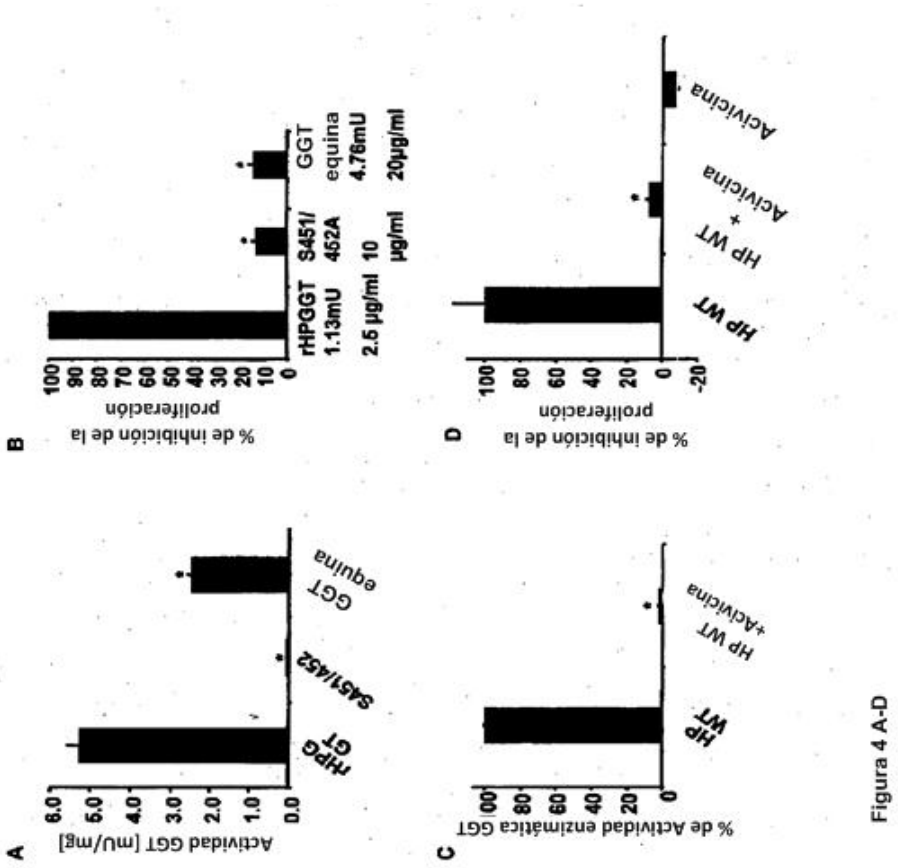

A
Actividad GGT [mU/mg]
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
rHPG GT
S451/452
GGT equina
B
% de inhibición de la proliferación
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
rHPGGT 1.13mU
S451/ 452A 2.5 µg/ml
GGT equina 4.76mU 10 µg/ml
20µg/ml
C
% de Actividad enzimática GGT
100
80
60
40
20
0
HP WT
HP WT +Activina
D
% de inhibición de la proliferación
100
80
60
40
20
0
-20
HP WT
HP WT + Activina
Activina

Figura 4 A-D

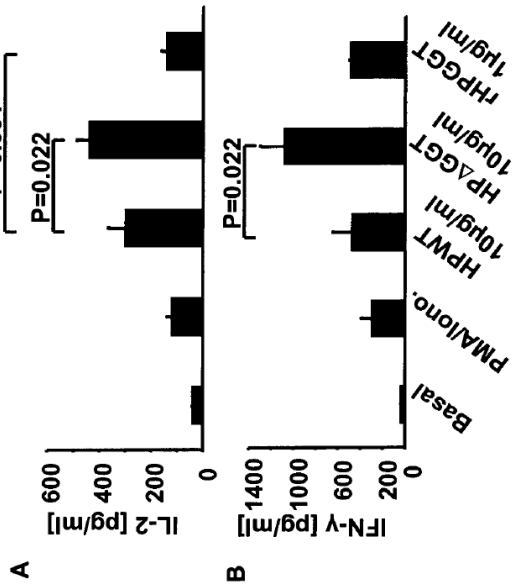

A
IL-2 [pg/ml]
600
400
200
0
P<0.001
P=0.022
B
IFN-γ [pg/ml]
1400
1000
600
200
0
P=0.022
Basal
PMA/iono.
HPWT 10µg/ml
HPΔGGT 10µg/ml
rHPGGT 1µg/ml

Figura 5A-B

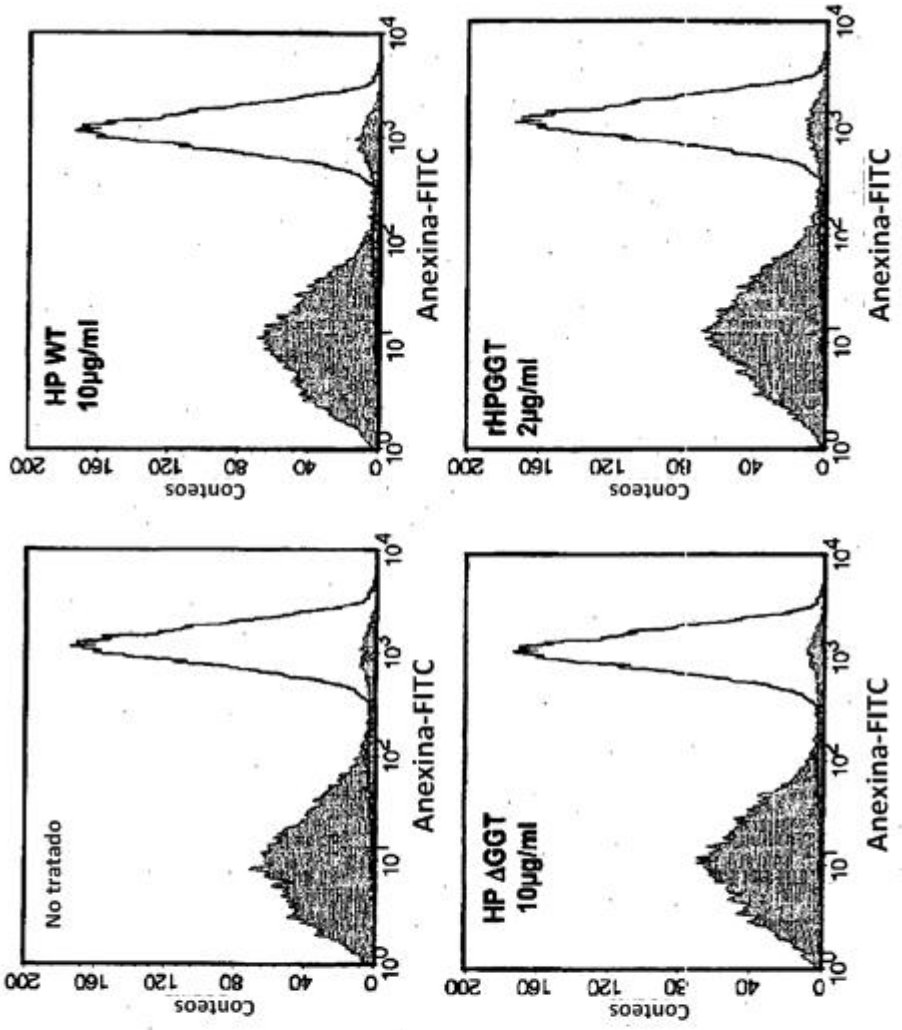

HP WT
10µg/ml
rHPGGT
2µg/ml
No tratado
HP ΔGGT
10µg/ml
Conteos
Anexina-FITC

Figura 5 C

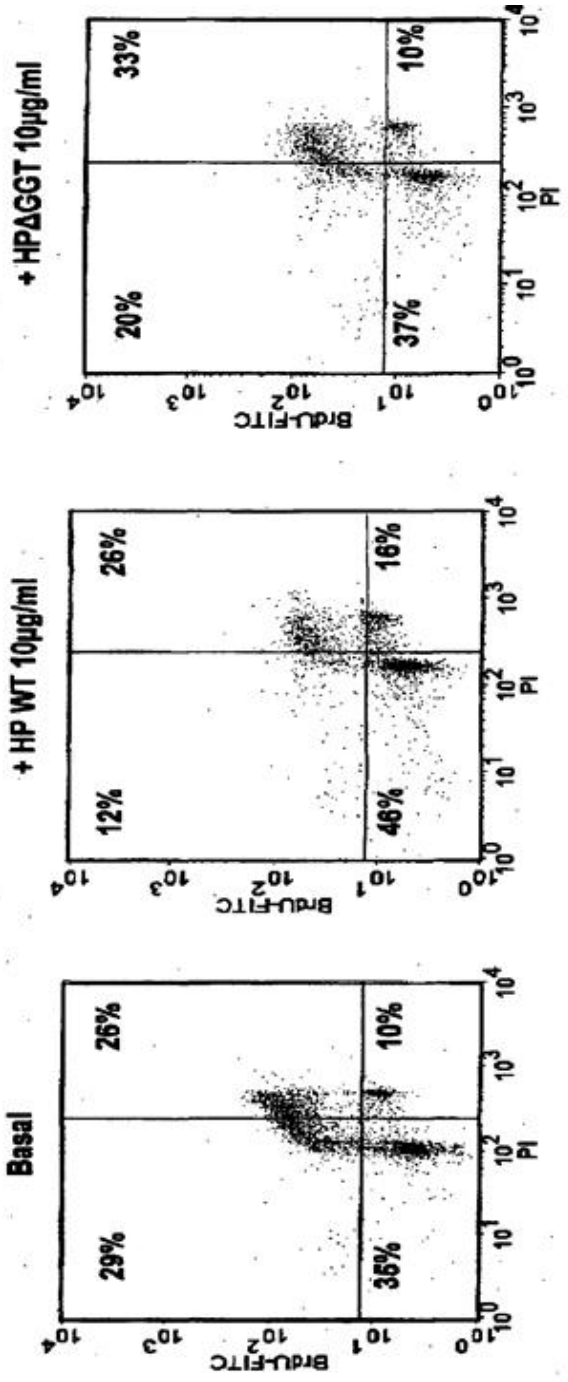

Basal
26%
10%
29%
35%
+ HP WT 10µg/ml
26%
16%
12%
46%
+ HPΔGGT 10µg/ml
33%
10%
20%
37%
BrdU-FITC
PI

Figura 6 A

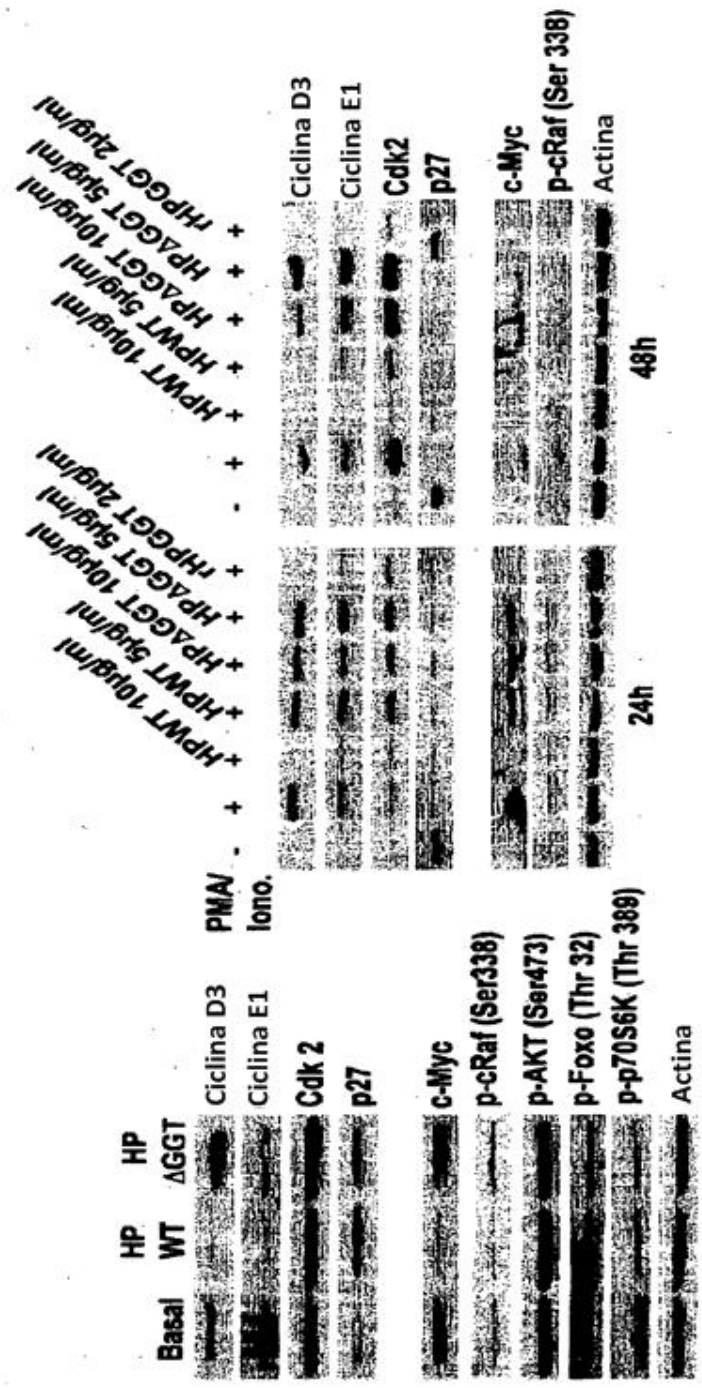

Basal
HP WT
HP ΔGGT
Ciclina D3
Ciclina E1
Cdk 2
p27
c-Myc
p-cRaf (Ser338)
p-AKT (Ser473)
p-Foxo (Thr 32)
p-p70S6K (Thr 389)
Actina
PMA/ Iono.
- + + + + + + + + + +
HPWT 10µg/ml
HPWT 5µg/ml
HPΔGGT 10µg/ml
HPΔGGT 5µg/ml
rHPGGT 2µg/ml
24h
48h
Ciclina D3
Ciclina E1
Cdk2
p27
c-Myc
p-cRaf (Ser 338)
Actina

Figura 6 B

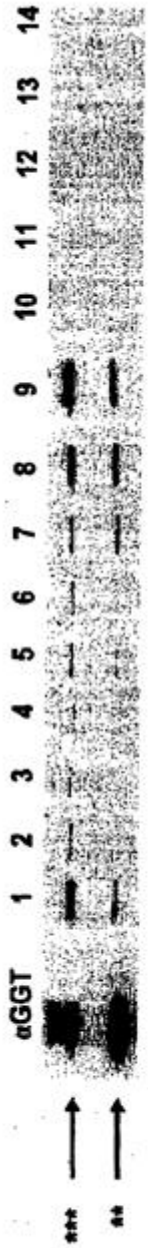


Figura 7

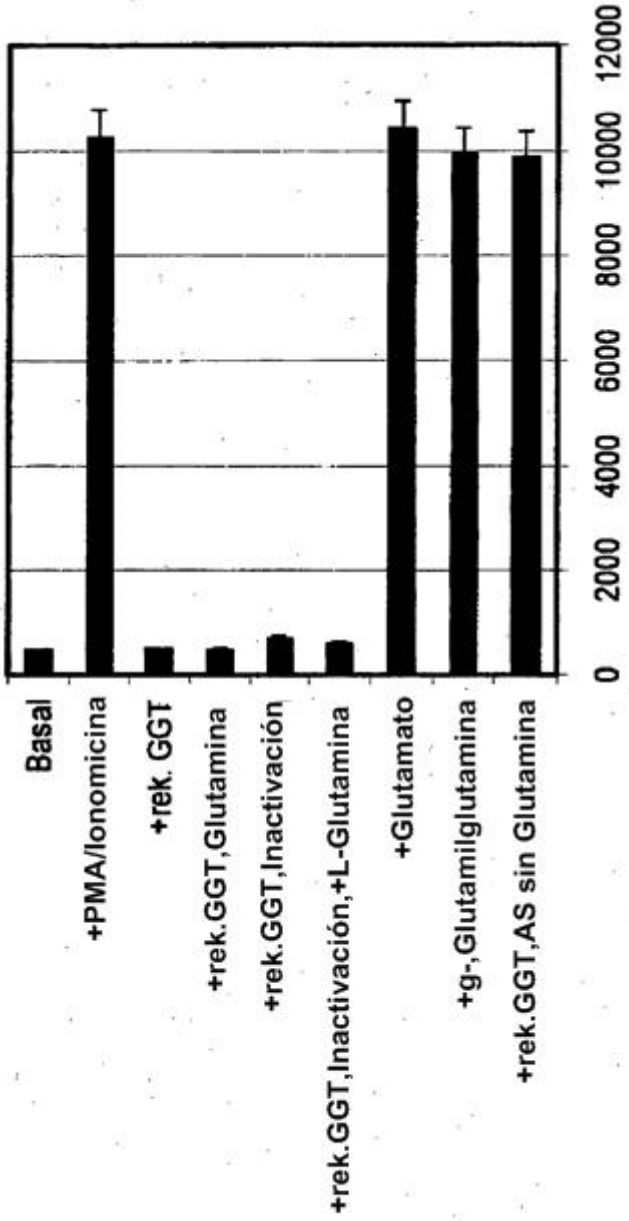

Basal
+PMA/Ionomicina
+rek. GGT
+rek.GGT,Glutamina
+rek.GGT,Inactivación
+rek.GGT,Inactivación,+L-Glutamina
+Glutamato
+g-,Glutamilglutamina
+rek.GGT,AS sin Glutamina
0
2000
4000
6000
8000
10000
12000

Figura 8

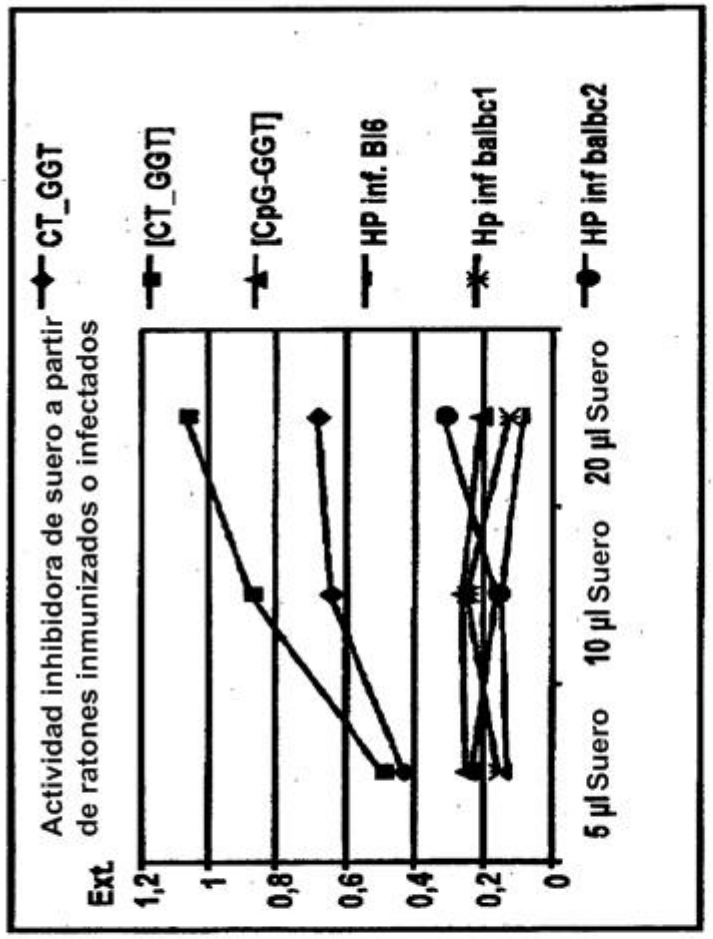

Actividad inhibidora de suero a partir de ratones inmunizados o infectados
Ext.
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
5 µl Suero
10 µl Suero
20 µl Suero
CT_GGT
[CT_GGT]
[CpG-GGT]
HP inf. Bl6
Hp inf balbc1
HP inf balbc2

Figura 9