

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-536791

(P2004-536791A)

(43) 公表日 平成16年12月9日(2004.12.9)

|                                   |                |                 |
|-----------------------------------|----------------|-----------------|
| (51) Int.Cl. <sup>7</sup>         | F I            | テーマコード (参考)     |
| <b>C 0 7 K 14/195</b>             | C 0 7 K 14/195 | Z N A 4 B 0 6 4 |
| <b>A 6 1 K 39/00</b>              | A 6 1 K 39/00  | H 4 C 0 8 5     |
| <b>A 6 1 P 31/04</b>              | A 6 1 P 31/04  | 4 H 0 4 5       |
| <b>C 1 2 P 21/00</b>              | C 1 2 P 21/00  | B               |
| <b>G 0 1 N 33/53</b>              | G 0 1 N 33/53  | D               |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 48 頁) 最終頁に続く |                |                 |

|               |                              |          |                       |
|---------------|------------------------------|----------|-----------------------|
| (21) 出願番号     | 特願2002-576280 (P2002-576280) | (71) 出願人 | 503345190             |
| (86) (22) 出願日 | 平成14年3月20日 (2002.3.20)       |          | ノルディック・バイオ・アクチボラゲット   |
| (85) 翻訳文提出日   | 平成15年9月22日 (2003.9.22)       |          | N O R D I C B I O A B |
| (86) 国際出願番号   | PCT/SE2002/000535            |          | スウェーデン、エスー224 67ルンド   |
| (87) 国際公開番号   | W02002/077022                |          | 、レクトッシュヴェーゲン7番        |
| (87) 国際公開日    | 平成14年10月3日 (2002.10.3)       | (74) 代理人 | 100068526             |
| (31) 優先権主張番号  | 0101030-5                    |          | 弁理士 田村 恭生             |
| (32) 優先日      | 平成13年3月23日 (2001.3.23)       | (74) 代理人 | 100096079             |
| (33) 優先権主張国   | スウェーデン (SE)                  |          | 弁理士 大角 美佐子            |
|               |                              | (74) 代理人 | 100126778             |
|               |                              |          | 弁理士 品川 永敏             |
|               |                              | (72) 発明者 | オーサ・ユーンダ              |
|               |                              |          | スウェーデン、エスー224 67ルンド   |
|               |                              |          | 、レクトッシュヴェーゲン7番        |
|               |                              | 最終頁に続く   |                       |

(54) 【発明の名称】 ヘリコバクテル・ピロリの免疫原性細胞表面タンパク質

## (57) 【要約】

ポリ硫酸化分子に特異的に結合する免疫原性ヘリコバクテル・ピロリ(Helicobacter pylori)ー特異的タンパク質の同定方法が記載されている。さらに、ポリ硫酸化分子に特異的に結合するヘリコバクテル・ピロリー特異的タンパク質生産物およびそれに含まれるタンパク質が記載されている。そのようなタンパク質の例は、1；分子量(MW)30(31.3)kDa、等電点(pI)9.3(9.1)を有し、配列番号1および／または配列番号2のアミノ酸配列を含むタンパク質；MW26(27.7)、pI9.1ー9.3(9.0)を有し、配列番号4のアミノ酸配列を含むタンパク質；MW25(28.7)、pI9.0(8.8)を有し、配列番号5のアミノ酸配列を含むタンパク質である。さらに、H.ピロリ(H. pylori)感染に対するワクチンにおける診断用抗原としておよび成分としての本発明のタンパク質またはタンパク質生産物の使用、およびイムノアッセイおよびH.ピロリ感染に対するワクチン組成物が記載されている。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ポリ硫酸化分子に特異的に結合する免疫原性ヘリコバクテル・ピロリ (*Helicobacter pylori*)—特異的表面タンパク質の同定方法であって、  
H. ピロリ (*H. pylori*) 細菌をインビトロで培養し、  
培養した細菌を分離し、  
酸性グリシン (acid glycine) 抽出により塩基性表面タンパク質を遊離させ、  
細菌を除去し、  
グリシン抽出物を精製してヘリコバクテル・ピロリ—特異的表面タンパク質生産物を調製し、  
タンパク質生産物を 2 次元イムノブロットに付して免疫原性タンパク質を同定する  
段階を含むことを特徴とする方法。

10

## 【請求項 2】

インビトロ培養を寒天培地またはブロスで実施し、  
細菌の分離を、増殖した細胞を燐酸緩衝食塩水 (PBS) 中に収集し遠心してペレットを調製することにより実施し、  
酸性グリシン抽出により塩基性表面タンパク質をペレットから遊離させ、  
遠心により細菌を除去し、  
遠心上清を PBS で希釈し、pH を 6.5 に調節し、混合物をヘパリン親和性クロマトグラフィーに付すことによりグリシン抽出物を精製してヘリコバクテル・ピロリ—特異的表面タンパク質生産物を調製する、請求項 1 記載の方法。

20

## 【請求項 3】

H. ピロリ (*H. pylori*) 細菌をインビトロで培養し、  
培養した細菌を分離し、  
酸性グリシン抽出により塩基性表面タンパク質を遊離させ、  
細菌を除去し、  
グリシン抽出物を精製してヘリコバクテル・ピロリ—特異的表面タンパク質生産物を調製する、  
ことにより得られる、ポリ硫酸化分子に特異的に結合するヘリコバクテル・ピロリ—特異的表面タンパク質生産物。

30

## 【請求項 4】

インビトロ培養を寒天培地またはブロスで実施し、  
細菌の分離を、増殖した細胞を燐酸緩衝食塩水 (PBS) 中に収集し遠心してペレットを調製することにより実施し、  
酸性グリシン抽出により塩基性表面タンパク質をペレットから遊離させ、  
遠心により細菌を除去し、  
遠心上清を PBS で希釈し、pH を 6.5 に調節し、混合物をヘパリン親和性クロマトグラフィーに付すことによりグリシン抽出物を精製してヘリコバクテル・ピロリ—特異的表面タンパク質生産物を調製する、請求項 3 記載のタンパク質生産物。

## 【請求項 5】

生産物が、  
a) 分子量 (MW) 30 (31.3) kDa、等電点 (pI) 9.3 (9.1) を有し、配列番号 1 および／または配列番号 2 のアミノ酸配列を含むタンパク質、  
b) MW 26 (27.7)、pI 9.1 – 9.3 (9.0) を有し、配列番号 4 のアミノ酸配列を含むタンパク質、  
c) MW 25 (28.7)、pI 9.0 (8.8) を有し、配列番号 5 のアミノ酸配列を含むタンパク質  
からなる群から選択される少なくとも 1 種のタンパク質を含む、請求項 3 または 4 記載のタンパク質生産物。

40

## 【請求項 6】

50

ポリ硫酸化分子に特異的に結合し、MW 30 (31.3) kDa、(pI) 9.3 (9.1) を有し、配列番号 1 および／または配列番号 2 のアミノ酸配列を含む、ヘリコバクテル・ピロリー特異的表面タンパク質。

【請求項 7】

ポリ硫酸化分子に特異的に結合し、MW 26 (27.7)、pI 9.1 - 9.3 (9.0) を有し、配列番号 4 のアミノ酸配列を含む、ヘリコバクテル・ピロリー特異的表面タンパク質。

【請求項 8】

ポリ硫酸化分子に特異的に結合し、MW 25 (28.7)、pI 9.0 (8.8) を有し、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む、ヘリコバクテル・ピロリー特異的表面タンパク質。

【請求項 9】

イムノアッセイにおける診断用抗原としての、請求項 3 - 5 のいずれか 1 項に記載のタンパク質生産物または請求項 6 - 8 のいずれか 1 項に記載のタンパク質の使用。

【請求項 10】

H.ピロリ(H. pylori)感染に対するワクチンにおける免疫化成分としての、請求項 3 - 5 のいずれか 1 項に記載のタンパク質生産物または請求項 6 - 8 のいずれか 1 項に記載のタンパク質の使用。

【請求項 11】

請求項 3 - 5 のいずれか 1 項に記載のタンパク質生産物または請求項 6 - 8 のいずれか 1 項に記載のタンパク質を診断用抗原として使用する、ヒト患者からの生物学的試料中における H.ピロリ(H. pylori)細菌の存在を決定するためのイムノアッセイ。

【請求項 12】

免疫化成分として請求項 3 - 5 のいずれか 1 項に記載の少なくとも 1 種のタンパク質生産物または請求項 6 - 8 のいずれか 1 項に記載の 1 種のタンパク質を、医薬的に許容される媒質とともに含む、ヒト患者における H.ピロリ(H. pylori)感染に対するワクチン組成物。

タンパク質生産物を 2 次元イムノブロットに付して免疫原性タンパク質を同定する。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

この発明は、ヘリコバクテル・ピロリ(Helicobacter pylori)の免疫原性細胞表面タンパク質、そのタンパク質の応用およびそれらの生産方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

ヘリコバクテル・ピロリ(Helicobacter pylori)は、ヒトの胃にコロニーを作って B 型胃炎および消化性潰瘍を誘導するらせん形の微生物である(Marshall, 1994)。この感染を検出する診断試験は、信頼性があり、費用効率がよく、実施が容易で、好ましくは非侵しゅう的でなければならない。個人に感染したほとんどの H.ピロリ(H. pylori)において、数々の抗原に対する強いが多形性が高い体液性免疫反応があり、種々の抗原に対する抗体の検出が血清学的診断のために広く使用されてきた(Bazillou et al., 1994; De Boer, 1997; Aucher et al., 1998)。このような血清診断学的アッセイは、主として種々の抗原製剤を用いる酵素イムノアッセイ(EIA)およびイムノブロットアッセイに基づくものであった。EIA 類の性能がこのようなアッセイに使用されるタンパク質組成物に依存しているにもかかわらず、数種の入手可能な市販キットは使用者に組成が知られていない抗原製剤を使用している(Feldman et al., 1995; Meijer et al., 1997)。ヒートショックタンパク質(Hsps)、鞭毛およびウレアーゼのようなある種の H.ピロリ(H. pylori)抗原は、他の細菌種の抗原と交差反応し、このことが抗原抽出物または抽出法の合理的な選択を困難にしている。

【0003】

以前の研究において、一組の低分子質量(Mr)細胞表面遊離タンパク質(25 ないし 35 kDa)に対する抗体の反応性が H.ピロリ(H. pylori)の感染に強く相関することが見出され

10

20

30

40

50

た(Nilsson et al., 1997)。しかし、これらのタンパク質の数種は1次元電気泳動(1-D E)において充分分離せずまたは共泳動した。しかしながら、2次元電気泳動(2-D E)技術の使用によりタンパク質の高度分離が可能になり、そこでは適切なpH勾配がきわめて重要であった(Kimmel et al., 2000)。最近の2-D E研究(Nilsson et al., 2000)において、Mr 25-30 kDaのH.ピロリ(H. pylori)タンパク質に対する強い免疫反応が注目された。しかし、これらのタンパク質は、pH範囲3-10における2-D Eによっても非分離のままであった。

【発明の開示】

【0004】

この発明は、存在量が低いH.ピロリ(H. pylori)タンパク質のクロマトグラフィー的濃厚化と狭いpH勾配を使用する2-D Eを、共泳動するポリペプチドの分離のために結合し、その後質量分析によるタンパク質の同定を行うものである。さらに、免疫原性および交差反応性タンパク質の同定のための2次元(2-D)イムノプロットの有用性を論証するものである。

【0005】

一つの特徴として、この発明は、  
H.ピロリ(H. pylori)細菌をインビトロで培養し、  
培養した細菌を分離し、  
酸性グリシン(acid glycine)抽出により塩基性表面タンパク質を遊離させ、  
細菌を除去し、  
グリシン抽出物を精製してヘリコバクテル・ピロリー特異的表面タンパク質生産物を調製し、  
タンパク質生産物を2次元イムノプロットに付して免疫原性タンパク質を同定する段階を含む、ポリ硫酸化分子、例えばグルコサミノグリカン類および／またはムチン類のような他の硫酸化グリココンジュゲート類に特異的に結合する免疫原性ヘリコバクテル・ピロリー特異的表面タンパク質の同定方法に関する。

【0006】

発明のこの特徴による方法の一つの実施態様において、  
インビトロ培養を寒天培地またはブロスで実施し、  
細菌の分離を、増殖した細胞を磷酸緩衝食塩水(PBS)中に収集し遠心してペレットを調製することにより実施し、  
酸性グリシン抽出により塩基性表面タンパク質をペレットから遊離させ、  
遠心により細菌を除去し、  
遠心上清をPBSで希釈し、pHを6.5に調節し、混合物をヘパリン親和性クロマトグラフィーに付すことによりグリシン抽出物を精製してヘリコバクテル・ピロリー特異的表面タンパク質生産物を調製する。

【0007】

この発明の別の特徴は、  
H.ピロリ(H. pylori)細菌をインビトロで培養し、  
培養した細菌を分離し、  
酸性グリシン抽出により塩基性表面タンパク質を遊離させ、  
細菌を除去し、  
グリシン抽出物を精製してヘリコバクテル・ピロリー特異的表面タンパク質生産物を調製することにより生産物が入手しうる、ポリ硫酸化分子、例えばグルコサミノグリカン類および／またはムチン類のような他の硫酸化グリココンジュゲート類に特異的に結合するヘリコバクテル・ピロリー特異的表面タンパク質生産物に関する。

【0008】

発明のこの特徴の一つの実施態様において、タンパク質生産物は、  
インビトロ培養を寒天培地またはブロスで実施し、  
細菌の分離を、増殖した細胞を磷酸緩衝食塩水(PBS)中に収集し遠心してペレットを調

製することにより実施し、  
酸性グリシン抽出により塩基性表面タンパク質をペレットから遊離させ、  
遠心により細菌を除去し、  
遠心上清をPBSで希釈し、pHを6.5に調節し、混合物をヘパリン親和性クロマトグラフィーに付すことによりグリシン抽出物を精製してヘリコバクテル・ピロリー特異的表面タンパク質生産物を調製することにより得ることができる。

#### 【0009】

目下のところ好ましい実施態様において、生産物は、

a)分子量(MW)30(31.3)kDa、等電点(pI)9.3(9.1)を有し、配列番号1および／または配列番号2のアミノ酸配列を含むタンパク質、

b)MW26(27.7)、pI9.1-9.3(9.0)を有し、配列番号4のアミノ酸配列を含むタンパク質、

c)MW25(28.7)、pI9.0(8.8)を有し、配列番号5のアミノ酸配列を含むタンパク質

からなる群から選択される少なくとも1種のタンパク質を含む。

#### 【0010】

この発明のさらに別の特徴は、ポリ硫酸化分子に特異的に結合し、MW30(31.3)kDa、(pI)9.3(9.1)を有し、配列番号1および／または配列番号2のアミノ酸配列を含む、ヘリコバクテル・ピロリー特異的表面タンパク質；ポリ硫酸化分子に特異的に結合し、MW26(27.7)、pI9.1-9.3(9.0)を有し、配列番号4のアミノ酸配列を含む、ヘリコバクテル・ピロリー特異的表面タンパク質；またはポリ硫酸化分子に特異的に結合し、MW25(28.7)、pI9.0(8.8)を有し、配列番号5のアミノ酸配列を含む、ヘリコバクテル・ピロリー特異的表面タンパク質に関する。

#### 【0011】

この発明のさらに別の特徴は、イムノアッセイにおける診断用抗原としての、この発明によるタンパク質生産物またはこの発明によるタンパク質の使用に関する。

#### 【0012】

この発明のさらなる特徴は、H.ピロリ感染に対するワクチンにおける免疫化成分としての、この発明によるタンパク質生産物またはこの発明によるタンパク質の使用に関する。

#### 【0013】

この発明の追加的な特徴は、この発明によるタンパク質生産物またはこの発明によるタンパク質を診断用抗原として使用する、ヒト患者からの生物学的試料中におけるH.ピロリ細菌の存在を決定するためのイムノアッセイに関する。固相酵素免疫検定法(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)などのような、抗原-抗体相互作用に基づく任意のイムノアッセイを使用しうる。

#### 【0014】

この発明の最後の特徴は、免疫化成分として少なくとも1種のこの発明によるタンパク質生産物または1種のこの発明によるタンパク質を、医薬的に許容される媒質とともに含む、ヒト患者におけるH.ピロリ感染に対するワクチン組成物に関する。医薬的に許容される媒質は、例えば米国またはヨーロッパ薬局方の手引きによって製造者により選択される。

#### 【0015】

この発明を、実験および図の記載により説明するが、この発明はいずれの具体的開示例によっても限定されないことを理解すべきである。

#### 【0016】

実験

材料および方法

A.細菌株および培養条件

H.ピロリCCUG17874株を、凍結ストック(-115℃)からGAB-CAMP寒天平板(Soltesz et al., 1992)にとり、37℃において3日間微好気性大気(5%O<sub>2</sub>, 1

10

20

30

40

50

0% CO<sub>2</sub>, 85% N<sub>2</sub>) 中で培養した。細胞を採取し、pH 7.2 の燐酸緩衝食塩水 (PBS, 0.02 M 燐酸ナトリウム, 0.15 M NaCl) 中で一度洗浄し、次のタンパク質抽出のために保存した。

#### 【0017】

##### B. 細胞表面タンパク質の抽出

3日齢細胞からの細胞表面タンパク質酸性グリシン抽出 (acid glycine extraction) は、前に報告されたように実施した (Lelwala-Guruge et al., 1990)。略述すると、採取し洗浄した細胞を pH 2.2 の 0.2 M グリシン塩酸塩中に再けんだく (4 g 細胞 / 100 ml) し、プロテアーゼ阻害剤 (Complete<sup>TM</sup> Roche Diagnostics AB, Bromma, Sweden) を補充して 15 分間 20 °C で磁気攪拌した。遠心 (15 分間 8 °C で 12000 × g) により細胞を除き、上清を NaOH で中和し、PBS に対して 18 時間 8 °C で透析した。バイオラドタンパク質アッセイ (BioRad, Richmond, CA, USA) および標準としてのウシ血清アルブミンを使用して、タンパク質をブラッドフォード法で 210 μg / ml に定量化した。このタンパク質画分を以後 AGE タンパク質と称する。

#### 【0018】

##### C. ヘパリン親和性クロマトグラフィー

ハイトラップ (HiTrap) ヘパリンカラム (1 ml, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) を pH 6.5 の 5 mM 燐酸ナトリウム緩衝液と 75 mM NaCl で平衡化した。AGE タンパク質を同じ緩衝液で 1 : 3 に希釈し、pH を 6.5 に調整し、親和性カラムにかけた。結合しないタンパク質を平衡化緩衝液で洗去し、一方結合したタンパク質は 2 M NaCl を用いて単一ピークとして溶離し、2.5 ml のタンパク質画分中に 656 μg / ml を得、以下これを AGE-HepBP (酸性グリシン抽出-ヘパリン結合タンパク質) と称する。AGE-HepBP 画分をファストデソルティング (Fast Desalting<sup>TM</sup>) カラム HR10 / 10 (Amersham Pharmacia Biotech) 上において流速 1 ml / 分で脱塩し、水中において 8 M 尿素 (Merck Eurolab AB, Stockholm, Sweden) で平衡化し、一部をとり -20 °C で凍結保存した。

#### 【0019】

##### D. 1次元ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (1-DE) およびイムノブロット (1D-イムノブロット)

1-DE は、還元条件 (Laemmli, 1970) 下、クリテリオン (Criterion<sup>TM</sup>) 細胞電気泳動装置 (BioRad, Richmond, CA, USA) と、8-16% 分離用勾配ゲルおよび 4% スタックゲル (Criterion Precast Gel, Bio-Rad) を用いて実施した。タンパク質を標準試料緩衝液で希釈し、ゲルに付加し (75 μg / ゲル)、200 V で 80 分間分離した。分離した AGE-HepBP の Mr を精密マーカータンパク質 (BioRad) を用いて確定した。電気泳動後、ゲルを固定し、銀染色 (Heukeshoven et al., 1988) した。別法として、タンパク質を抗体検出のために半乾燥電気プロッター装置 (Ancos, Vig, Denmark) を使用してポリビニリデン・ジフルオリド膜 (PVDF) (Micron Separations Inc. Westborough, MA, USA) に転移させた。転移時間は 1 mA / cm<sup>2</sup> の一定電流下で 80 分であった。イムノブロットアッセイは前に報告されたように実施した (Nilsson et al., 1997)。略述すると、水解ゼラチン、ポリビニルピロリドン、ツイーン 20、エタノールアミンおよびグリシンを含有する緩衝液中で膜を 2 × 15 分間ブロックし、切断してストリップにし、TRIS、ゼラチン水解化物、塩化ナトリウム、pH 8.7 のツイーン 20 を含有する pH 8.7 の緩衝液中に 1 / 100 に希釈した血清のパネルでプローブした (Nilsson et al., 1997)。血清は、i) 内視鏡によるバイオプシー試料の陽性培養および血清学で確定した H.ピロリ感染 (n = 10)、ii) H.ピロリ培養陰性患者からの血清プール、iii) Waaler-Rose 試験により高いリウマトイド因子価を示すリウマチ様関節炎 (n = 8)、iv) 高い抗体価を示すカンピロバクテリウム・ジェジュニ (Campylobacter jejuni) 感染 (n = 5)、v) 肺におけるシェードモナス・エルギノーザ (Pseudomonas aeruginosa) のコロニー形成をもつもの胞性線維症、vi) TPHA 試験で陽性のトレポネマ・パリズム (Treponema pallidum) 感染 (n = 3) および vii) 培養において陽性のヘモフィルス・インフルエンゼ (Haemophilus influenzae) 感染 (n = 3) を含む

種々の疾患をもつ患者から得た。すべての血清試料はランドのランド大学病院臨床微生物部門(Department of Clinical Microbiology, Lund University Hospital, Lund)から集め、試験するまで $-20^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。

#### 【0020】

##### E. 等電点電気泳動(IEF)

AGE-HepBPを、 $\text{pH } 6-11, 11\text{ cm}$ の直線 $\text{pH}$ 勾配を用いてプレキャストイモビライズドストリップ(Immobiline<sup>TM</sup> Dry strips)とIPGストリップ(IPG strips, Amersham Pharmacia Biotech)上でIEFにより分離した。IPGストリップを、製造者の指示書にしたがって、8M尿素、3-(3-クロロアミドプロピル)ジメチルアンモニオ-1-プロパンスルホネート(CHAPS)( $20\text{ g/l}$ )、 $\text{pH } 6-11$ のIPG試料緩衝液(Amersham Pharmacia Biotech)、ジチオトレイトール(DTT)( $10\text{ g/l}$ )およびブロムフェノールブルー( $0.5\% \text{ w/v}$ ) $25\text{ }\mu\text{l}$ を含有する溶液 $200\text{ }\mu\text{l}$ 中でAGE-HepBP(ストリップあたり約 $25\text{ }\mu\text{g}$ )とともに12時間 $20^{\circ}\text{C}$ で再水和した。IEFは、IPGフォール(IPGphor)フォーカシング装置(Amersham Pharmacia Biotech)中で合計80kVh実施した。

#### 【0021】

##### F. 2次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動(2-DE)

2-DEを開始する前に、IPGストリップをそれぞれ $\text{pH } 8.8$ の $50\text{ mM Tris-HCl}$ 、6M尿素、30%( $\text{v/v}$ )グリセリンおよび1%( $\text{w/v}$ )ドデシル硫酸ナトリウムを含有する溶液中で20分間2回平衡化した。DTT( $1\%, \text{w/v}$ )を最初の平衡化溶液に加え、ヨードアセトアミド( $4.8\%, \text{w/v}$ )を第2の平衡化溶液に加えた。ついでIPGストリップを8-16%勾配SDS-PAGEクリテリオンプレキャストゲル(Criterion Precast Gels)(BioRad)の上端に適用し、タンパク質の分離を1-DS-SDS-PAGEについて記載したのと同じ条件で行った。ついで、ゲルを銀染色、クーマシーR-350(PHastGel Blue R, Amersham Pharmacia Biotech)およびPVD膜へのタンパク質転移の加工をした。IEFおよび2-DE実験は3ないし4回反復した。

#### 【0022】

##### G. 2-Dイムノプロットアッセイ

2-DEで分離したポリペプチドをDの部に記載しようにPVD膜に電気泳動で転移し、残留結合能を前に記載されたようにブロックした。膜をポリエチレンバッグに入れ、i)腹痛のため胃鏡検査を受け、胃のバイオペシー培養でH.ピロリ陽性の患者から得たプール血清試料( $n=10$ )、ii)H.ピロリ培養し血清陰性者からのプール血清試料( $n=10$ )、iii)胃のバイオペシー培養で陽性のH.ピロリ感染小児からの血清、およびiv)C.ジェジュニ(C. jejuni)感染患者からの血清を積層した。血清を $10\text{ ml}$ インキュベーション緩衝液(Dの部参照)中で $1/100$ または $1/1000$ 倍に希釈し、インキュベーション時間は一定の振とう下16時間 $8^{\circ}\text{C}$ とした。反復洗浄後、西洋わさびペルオキシダーゼでラベルした $1/1500$ 希釈抗ヒトIgG抗体(Dako A/S, Glostrup, Denmark)を加え、ついで膜を2時間 $20^{\circ}\text{C}$ でインキュベートした。結合した抗体は、 $0.04\%$ 3-アミノ-9-エチルカルバゾール(Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO)および $0.015\% \text{ H}_2\text{O}_2$ 含有 $50\text{ mM}$ 酢酸ナトリウム緩衝液( $\text{pH } 5.0$ )を加えることにより検出した。

#### 【0023】

##### H. 画像分析

ゲルとイムノプロットをGS-710イメージングデンシトメーター(BioRad)でスキャンした。1-DEゲルの画像を分析し、タンパク質のMr類をクオンティティワン(Quantity One)ソフトウェアパッケージ(BioRad)を用いて推定した。2-DEゲルの画像を、pIおよびMr類の推定、スポットの定量を含めて分析し、ゲルと2-Dイムノプロットのマッチングはメラニー(Melanie)バージョン3ソフトウェア(BioRad)で達成した。

#### 【0024】

##### I. スポットの同定

H.ピロリ陽性血清プールに明確な抗体反応性を示す6個のスポットを、MS/MS配列

決定のために選択し、クリーン条件下にゲルから切り出し、トリプシンで断片化した。ペプチド混合物を抽出し、MALDI-TOF-MS/MSで分析した。得られた内部ペプチド配列はTIGRデータベース(<http://www.tigr.org/>)でH.ピロリゲノムタンパク質の同定に使用した。

#### 【0025】

結果

1-DEおよび1-DイムノブロットにおけるAGE-HepBPタンパク質のプロファイル

1-DE(8-16%勾配ゲル)で分離しクーマッシーR-350で染色したAGE-HepBPのタンパク質プロファイルを図1に示す。3個のバンドがMr25、26および29kDaで同定された。4個のバンド(Mr25、26、29、30)に対する抗体反応性をH.ピロリ感染患者および小児患者の血清で検出した。これらのバンドの強度差はおそらく患者間の個人の免疫反応に依存する(図2、レーン1,3-9)。H.ピロリ血清陰性の血清プールは25kDaおよび26kDaタンパク質に弱い反応性を示した(図2、レーン2)。他の潜在的交差反応性血清は25kDaタンパク質に反応性を確認した(図2、レーン10-17、枠内)。Mr>37kDaのタンパク質に対する反応性は本研究では推定されなかった。

#### 【0026】

2-DEおよび2-DイムノブロットにおけるAGE-HepBP画分のプロファイル  
クーマッシーR-350染色ゲル上で検出された71個のスポットに対して、合計141個のスポットが銀染色ゲル上で検出された(図3A)。2-Dイムノブロットを使用すると、186個のスポットが希釈率1/1000のH.ピロリ陽性血清プールに抗体反応性を示した(図3C)。イムノブロットにおいてより多数のスポットが検出されたことは、スポットの銀およびクーマッシー染色に比較して抗体検出の感度が増加したことを確認する。2-DE実験の反復では、推定pI値の差の変化が0.0ないし0.05の間で、高い再現性を確認した。Mrの推定値で変化は見られなかった。銀およびクーマッシー染色を用いて強く染色される若干のスポット(図3AおよびB、丸印)は免疫原性がなかった(図3C)。メラニー(Meranie)3ソフトウエアを用いて得られるpIおよびMr値を表1に挙げる。

#### 【0027】

スポット(タンパク質)の同定

6個のスポット(図3A-C、スポット番号1-6、表1)の内部ペプチド配列を、細胞結合因子2(スポット番号1および2)、ウレアーゼAサブユニット(スポット番号3および4)、ハイポセチカルタンパク質(スポット番号5)および外膜タンパク質(スポット番号6)のペプチドと同定した。

#### 【0028】

細胞結合因子2(HP0175)はC.ジェジュニ(C.jejuni)の細胞結合因子2(抗原PEB4A)に類似しており、エシェリキア・コリ(Escherichia coli)サバイバルタンパク質surAの同族体である。ここでは2個が同定されたが、さらに2-3個の低いpIをもつアイソフォームが同じMr値で提案されうる。C.ジェジュニ(C.jejuni)感染患者の血清との交差反応性は観察されなかった。

#### 【0029】

スポット番号5(HP0231)は、機能が未知のハイポセチカルタンパク質として同定された。このタンパク質は、1-DEにおいてウレアーゼサブユニットおよび外膜タンパク質HP1564と共泳動するが、2-DEで分離された。これは1-Dイムノブロットにより希釈率1/1000のH.ピロリ陽性血清プールで認識されたが、H.ピロリ陰性血清プール(図4)またはC.ジェジュニ(C.jejuni)血清では反応性が見られなかった(図5)。

#### 【0030】

同定された外膜タンパク質(HP1564)は、リポタンパク質スーパーファミリーに属し、パストレラ・ヘモリチカ(Pasturella haemolytica)リポタンパク質1に類似性を示し(おそらくリピッドアンカーにより外膜に付着する)、またE.コリ(E.coli)のハイポセチカル29.4kDaリポたんぱく質および28kDaヘモフィルス・インフルエンゼ(Haemophilus) 50



us influenzae)リポタンパク質(hlpA、外膜タンパク質HI0620、BLASTソフトウェアにより相同性38.5%)の両者とも類似する。このタンパク質(図3A-C、スポット番号6、図1の25kDaバンド)はこの研究で使用した潜在的交差反応血清およびH.ピロリ陰性血清プールと反応性を示した(図2)。

#### 【0031】

結果の利用性

これらのタンパク質の数種が免疫診断試験を最適化するためおよびワクチンをデザインするための候補であるので、ヒト胃病原体H.ピロリの表面タンパク質明確化は極めて興味が深い。明確さが少ないH.ピロリ抗原に基づいて多数の抗体スクリーニング試験が開発されてきた(Glupezyński, 1998)。2-D E技術は、複合抗原中のタンパク質の同定を1-D Eより高度に助長し、1-D E使用時のタンパク質共泳動問題の克服を容易にする。この研究で示すように、1-D Eバンドとして分離されたタンパク質は、狭いpH勾配を使用することにより2-D E技術で数種の異なるタンパク質スポットに分離された。

10

#### 【0032】

イムノブロットと組み合わせた2-D EはH.ピロリ抗原の同定に関して前に報告されている(McAtee et al., 1998b; Jungblut et al., 2000)。Jungblutと共同研究者は2-D イムノブロットに単一患者血清を使用し、そこで総細胞タンパク質を分離し比較的少数の免疫原性タンパク質に対する抗体反応性を発見した。これらの結果は、数種の抗原が総細胞溶解物中でマイナーな成分であり、したがってイムノブロットで測定するのが困難でありうることを示唆する。個々の宿主の応答も役割をもつかもしいない。

20

#### 【0033】

クロマトグラフィーによる画分化および濃厚化はこの問題克服の助けになる。2-D Eの前にヘパリン親和性クロマトグラフィーを使用することにより、ある種の低含量タンパク質を高濃度にすることが可能になり、われわれは初めてハイポセチカルタンパク質HP0231がヘパリンに結合することおよびその免疫原的性質を示すことができた。クロマトグラフィーは2-D Eと組み合わせてH.インフルエンゼ(H. influenzae)マイナータンパク質の濃厚化に使用され、ヘパリン親和性クロマトグラフィーの使用により、110個の新規タンパク質が同定された(Fountoulakis et al., 1997)。別の研究において、低含量ヒト脳タンパク質の濃厚化がこの技術を使用して実施された(Karlsson et al., 1999)。別のクロマトグラフィーマトリックスであるヒドロキシアパタイトが、E.コリ(E.coli)の低含量タンパク質濃厚化に使用された(Fountoulakis et al., 1999)。

30

#### 【0034】

幅広いpH勾配が早期のH.ピロリタンパク質の分離に使用された(McAtee et al., 1998b; Jungblut et al., 2000; Nilsson et al., 2000)。これらの研究において、塩基性タンパク質が低い度合いで分離された。しかし、本研究では、われわれはIEFにおいて狭いpH6-11勾配を使用することにより塩基性タンパク質の高度分解を得た。コード化前駆体の70%超が7より高い理論的pI値を有する(Tomb et al., 1997)ので、このpH勾配はH.ピロリタンパク質の研究に重要である。

#### 【0035】

Mrが低い抗原に対して生じた抗体は、33-35kDa抗原に対する抗体反応性が胃または十二指腸潰瘍患者の97.5%にあるが慢性B型胃炎患者では頻度が少ない(Yamaoka et al., 1998)、H.ピロリ感染に対して予後上の価値を有することが判明した。26kDaタンパク質(HP1563、アルキルヒドロペルオキシイドレダクターゼtsaA)に対する抗体応答が胃がん患者血清に見られたが、がんでないH.ピロリ感染患者の血清では見られなかった(Wang et al., 1998)。先のイムノブロット研究において、低Mr(26ないし33kDa)表面タンパク質セットに対する抗体反応性がH.ピロリ感染に高い相関性をもつことが発見された(Nilsson et al., 1997)。この範囲のタンパク質に対する抗体反応性もまたこの研究において見出され、3個の新規抗原が同定された。

40

#### 【0036】

H.ピロリの免疫原性タンパク質としての細胞結合因子2は最近報告された(McAtee et al

50

., 1998a ; Jungblut et al., 2000)が、交差反応性に関するデータは報告されなかった。このタンパク質はC.ジェジュニ(C.jejuni)細胞結合因子2と類似しているので、われわれはこのたんぱく質に対する潜在的交差反応性をC.ジェジュニ(C.jejuni)感染患者血清および他の潜在的交差反応性血清で試験した。低い血清希釈率(1 / 100)においてさえ抗体反応性が見られなかった。H.ピロリ陽性血清プールは10倍高い希釈率(1 / 1000)において明確な染色を示した(それぞれ図5および4)。すなわち、このタンパク質は強い免疫原性と高い特異性を確証した。前駆体配列におけるシグナルペプチドが予想され、主として表面露出タンパク質が遊離する緩和なタンパク質抽出法を使用したのも、このタンパク質は細胞表面に位置すると考えるのが合理的である。強い免疫原性、低い交差反応性および細胞表面露出を示すことは、このタンパク質(細胞結合因子2)を診断目的およびワクチン開発用の候補として適切なものにする。

10

#### 【0037】

ハイポセチカルタンパク質HP0231は、ヘパリン結合機能を確認し、他の表面露出ヘパリン結合タンパク質とともに細胞表面およびマトリックス付随グリコサミノグリカン類(GAG)に対するH.ピロリの結合に関与しているかもしれない。このことは次に宿主タンパク質に対する結合につながるかも知れず(Duensing et al., 1999)、宿主タンパク質で被覆されたH.ピロリ細胞は宿主防衛システムの攻撃を逃れるかもしれない。また、ムチンの酸性画分、細胞表面露出グリコサミノグリカン類および硫酸ヘパリンのような細胞外マトリックス成分に対する細菌の付着能力を、この病原体の持続的コロニー形成を維持するためのそれら自身の特異的受容体なしに、増加するかもしれない。

20

#### 【0038】

外膜タンパク質HP1564(リポタンパク質28)およびウレアーゼAサブユニットは1-D Eにおいて共泳動するが、2-D Eで分離された。両タンパク質とも免疫原性であるが、しかしHP1564は交差反応性血清のセットおよびH.ピロリ陰性血清プールでも認識された。H.ピロリのウレアーゼは他の種のウレアーゼと類似性を有することが知られており、1-D イムノブロットによる25-26 kDaタンパク質の染色が薄いことが擬陽性の結果を導くことができる。すなわち、明確な抗体反応性のみがH.ピロリ陽性シグナルと解釈されることができる。

#### 【0039】

ウレアーゼAを除外して、われわれは、<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>のシグナルPソフトウェアを使用して3個の同定タンパク質すべてについてシグナル配列を予言した。これは、これらのタンパク質がH.ピロリの表面に露出しておりしたがって診断およびワクチン開発に有用だろうとのわれわれの以前の観察と矛盾しない。

30

#### 【0040】

興味あることに、われわれのタンパク質混合物中数種の豊富なタンパク質は免疫原性でなかった(図3A-C、丸印)。このことは、複合抗原が患者血清によって認識されないタンパク質を含有するかもしれないこと、およびこれらのタンパク質が免疫原性タンパク質濃度に対して減少効果をもちELISA平板の効率的な被覆およびイムノブロット様タンパク質付着の減少を招くかもしれないことを示す。

#### 【0041】

結論として、2-D Eの前にクロマトグラフィー工程を使用することによる試料の分画およびタンパク質の濃厚化は、低濃度で存在するタンパク質の同定可能性を改善する。また、抗原製剤中における免疫原性対非免疫原性タンパク質の比率を改善しうる。2-D イムノブロットを使用して、われわれは2種の新規免疫原性H.ピロリタンパク質、すなわち血清診断試験およびワクチン開発に使用しうる細胞結合因子2(HP0175)およびヘパリン結合タンパク質(HP0231)を同定した。われわれは、また、2-D Eが診断試験に使用する複合抗原中における交差反応性タンパク質の同定を促進ことを見出した。ポストゲノム時代において、数百の微生物ゲノムを入手できるようになったとき、古典的N末端微小配列決定またはさらに進んだMS/MS配列決定を使用して、免疫原性タンパク質の詳細な同定が必要になるであろう。

40

50

## 【0042】

本方法は、血清学的試験における特異性をさらに改善するための抗原性タンパク質の同定を可能とするであろう。

## 【0043】

## 引用文献

- Aucher, P., Petit, M. L., Mannant, P. R., Pezenec, L., Babin, P., Fauchere, J. L., 1998. Use of immunoblot assay to define serum antibody patterns associated with *Helicobacter pylori* infection and with *H. pylori*-related ulcers. *J. Clin. Microbiol.* 36, 931-936.
- Bazillou, M., Fendri, C., Castel, O., Ingrand, P., Fauchere, J. L. 1994. Serum antibody response to the superficial and released components of *Helicobacter pylori*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1,310-307. 10
- De Boer, W. A., 1997. *Helicobacter pylori* and non-ulcer dyspepsia. *Scand. J. Gastroenterol.* 32,1183-1184.
- Duensing, T. D., Wing, J. S., van Putten, J. P., 1999. Sulfated polysaccharide-directed recruitment of mammalian host proteins: a novel strategy in microbial pathogenesis. *Infect. Immun.* 67,4463-4446.
- Feldman, R. A., Deeks, J. J., Evans, S. J., 1995. Multi-laboratory comparison of eight commercially available *Helicobacter pylori* serology kits. *Helicobacter pylori Serology Study Group. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 14,428-433. 20
- Fountoulakis, M., Langen, H., Evers, S., Gray, C., Takacs, B., 1997. Two-dimensional map of *Haemophilus influenzae* following protein enrichment by heparin chromatography. *Electrophoresis* 18,1193-1202.
- Fountoulakis, M., Takacs, M. F., Berndt, P., Langen, H., Takacs, B., 1999. Enrichment of low abundance proteins of *Escherichia coli* by hydroxyapatite chromatography. *Electrophoresis* 20,2181-2195.
- Glupczynski, Y., 1998. Microbiological and serological diagnostic tests for *Helicobacter pylori*: an overview. *British Medical Bulletin* (Eds Farthing, M. J. G., Patchett, S. E.) 54,175-186.
- Heukeshoven, J., Dernick, R., 1988. Improved silver, staining procedure for fast staining in PHastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* 9, 28-32. 30
- Jungblut, P. R., Bumann, D., Haas, G., Zimny-Arndt, U., Holland, P., Lamer, S., Siejak, F., Aebischer, A., Meyer, T. F., 2000. Comparative proteome analysis of *Helicobacter pylori*. *Mol. Microbiol.* 36,710-725.
- Karlsson, K., Cairns, N., Lubec, G., Fountoulakis, M., 1999. Enrichment of human brain proteins by heparin chromatography. *Electrophoresis* 20,2970-2976.
- Kimmel, B., Bosserhoff, A., Prank, R., Gross, R., Goebel, W., Beier, D., 2000. Identification of immunodominant antigens from *Helicobacter pylori* and evaluation of their reactivities with sera from patients with different gastroduodenal pathologies. *Infect. Immun.* 68,915-920. 40
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227,680-685.
- Lelwala-Guruge, J., Schalen, C., Nilsson, I., Ljungh, A., Tyszkiewicz, T., Wikander, M., Wadstrom, T., 1990. Detection of antibodies to *Helicobacter pylori* cell surface antigens. *Scand. J. Infect. Dis.* 22,457-465.
- Marshall, B., 1994. *Helicobacter pylori*. *Am. J. Gastroenterol.* 89 [suppl], S 116-5128.
- McAttee, C. P., Lim, M. Y., Fung, K., Velligan, M., Fry, K., Chow, T. P., Berg, D. E., 1998 a. Characterization of a *Helicobacter pylori* vaccine candidate by pro 50

- teome techniques. J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl. 714,325–33.
- McAtee, C. P., Lim, M. Y., Fung, K., Velligan, M., Fry, K., Chow, T., Berg, D. E., 1998 b. Identification of potential diagnostic and vaccine candidates of *Helicobacter pylori* by two-dimensional gel-electrophoresis, sequence analysis, and serum profiling. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 5,537–542.
- Meijer, B. C., Thijs, J. C., Kleibeuker, J. H., van Zwet, A. A., Berrelkamp, R. J., 1997. Evaluation of eight enzyme immunoassays for detection of immunoglobulin G against *Helicobacter pylori*. J. Clin. Microbiol. 35,292–294.
- Nilsson, I., Ljungh, A., Aleljung, P., Wadstrom, T., 1997. Immunoblot assay for serodiagnosis of *Helicobacter pylori* infections. J. Clin. Microbiol. 35,427–432 10
- Nilsson, I., Utt, M., Nilsson, H. O., Ljungh, A., Wadstrom, T., 2000. Two-dimensional electrophoretic and immunoblot analysis of cell surface proteins of spiral-shaped and coccoid forms of *Helicobacter pylori*. Electrophoresis 21,2670–2677.
- Soltész, V., Zeeberg, B., Wadstrom, T., 1992. Optimal survival of *Helicobacter pylori* under various transport conditions. J. Clin. Microbiol. 30,1453–1456.
- Tomb, J-F, White, O., Kerlavage, A. R., Clayton, R. A., Sutton, G. G., Fleischmann, R. D., Ketchum, K. A., Klenk, H. P., Gill, S., Dougherty, B. A., Nelson, K., Quackenbush, J., Zhou, L., Kirkness, E. F., Peterson, S., Loftus, B., Richardson, D., Dodson, R., Khalak, H. G., Glodek, A., McKenney, K., Fitzgerald, L. M., Lee, N., Adams, M. D., Hickey, E. K., Berg, D. E., Gocayne, J. D., Utterback, T. R., Peterson, J. D., Kelley, J. M., Cotton, M. D., Weidman, J. M., Fujii, C., Bowman, C., Watthey, L., Wallin, E., Hayes, W. S., Borodovsky, M., Karp, P. D., Smith, H. O., Fraser, C. M., Venter J. C., 1997. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Nature, 388,539–547.
- Wang, J-T., Chang, C-S., Lee, C-Z., Yang, J-C., Lin, J-T., Wang, T-H., 1998. Antibody to a *Helicobacter pylori* species specific antigen in patients with adenocarcinoma of the stomach. Biochem. Biophys. Res. Commun. 244,360–363.
- Yamaoka, Y., Kodama, T., Graham, D. Y., Kashima, K., 1998. Search for putative virulence factors of *Helicobacter pylori*: the low-molecular-weight (33–35 K) antigen. Dig. Dis. Sci. 43,1482–1487. 30

#### 【0044】

Table 1. MS/MS 配列決定により 2-D E から同定された H.ピロリ 17874 株の免疫原性 AGE-Hep B P タンパク質

#### 【表 1】

| スポット<br>番号 <sup>a)</sup> | 分子量 (kDa)<br>(実験) | pI<br>(実験) | MS/MS配列<br>(内部ペプチド) | タンパク質名<br>(TIGR)              |
|--------------------------|-------------------|------------|---------------------|-------------------------------|
| 1                        | 30                | 9.34       | TTDSSAGVLATVDGR     | 細胞結合因子 2 HP0175               |
| 2                        | 30                | 9.24       | DSPVTTYEQAK         | 細胞結合因子 2 HP0175               |
| 3                        | 26                | 8.67       | LFGFNALVDR          | Urease A HP0073               |
| 4                        | 26                | 8.01       | LFGFNALVDR          | Urease A HP0073               |
| 5                        | 26                | 9.11-9.33  | MVVVGWLGVNSAK       | Hypothetical protein HP0231   |
| 6                        | 25                | 9.04       | DPSNLYATEFDLVK      | Outer membrane protein HP1564 |

a) 図3A、B、Cの番号に対応

【図面の簡単な説明】

【0045】

【図1】1-D E (8-16%勾配ゲル)で分離しクーマシーR-350で染色したH.

10

20

30

40

50

ピロリ A G E - H e p B P 類のタンパク質バンドパターン。タンパク質の標準は左側に示す。

【図 2】A G E - H e p B P 画分の抗体反応性。ストリップは H .ピロリ感染および非感染患者血清をプローブした。 レーン 1 : H .ピロリ陽性血清プール、レーン 2 : H .ピロリ陰性血清プール、レーン 3 - 9 : H .ピロリ培養陽性患者、レーン 1 0 - 1 1 : P .エルギノーザ (P.aeruginosa) 感染患者、レーン 1 2 - 1 3 : C .ジェジュニ (C.jejuni) 感染患者、レーン 1 4 - 1 5 : リウマチ様関節炎患者、レーン 1 6 - 1 7 : T .パリズム (P.pallidum) 感染患者。血清希釈率 1 / 1 0 0 。タンパク質の標準は左側に示す。

【図 3 A】pH 範囲 6 - 1 1 で、クリテリオン 8 - 1 6 % 勾配ゲルを用いて I E F により分離し銀染色した H .ピロリの A G E - H e p B P 。番号 1 - 6 は表 1 に同定したタンパク質に対応する。丸印は H .ピロリ陽性血清プールで認識されなかったスポットを示す (図 3 C 参照)。タンパク質の標準は右側に示す。 10

【図 3 B】pH 範囲 6 - 1 1 で、クリテリオン 8 - 1 6 % 勾配ゲルを用いて I E F により分離した H .ピロリ A G E - H e p B P のクーマッシー R - 3 5 0 染色。番号 1 - 6 は表 1 に同定したタンパク質に対応する。タンパク質の標準は右側に示す。

【図 3 C】pH 範囲 6 - 1 1 で、クリテリオン 8 - 1 6 % 勾配ゲルを用いて I E F により分離した H .ピロリ A G E - H e p B P 画分の 2 - D イムノブロット。膜は H .ピロリ感染患者の 1 0 血清プールでプローブした (希釈率 1 / 1 0 0 0 ) 。番号 1 - 6 は表 1 に同定したタンパク質に対応する。タンパク質の標準は右側に示す。

【図 4】pH 範囲 6 - 1 1 で、クリテリオン 8 - 1 6 % 勾配ゲルを用いて I E F により分離した H .ピロリ A G E - H e p B P 画分の 2 - D イムノブロット。膜は H .ピロリ陰性患者の 1 0 血清プールでプローブした (希釈率 1 / 1 0 0 0 ) 。番号 6 は表 1 に同定したタンパク質に対応する。タンパク質の標準は右側に示す。 20

【図 5】pH 範囲 6 - 1 1 で、クリテリオン 8 - 1 6 % 勾配ゲルを用いて I E F により分離した H .ピロリ A G E - H e p B P 画分の 2 - D イムノブロット。膜は C .ジェジュニ (C.jejuni) 感染患者の血清プールでプローブした (希釈率 1 / 1 0 0 ) 。番号 6 は表 1 に同定したタンパク質に対応する。タンパク質の標準は右側に示す。

## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
3 October 2002 (03.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/077022 A1(51) International Patent Classification: C07K 14/205, (74) Agent: STOCKHOLMS PATENTBYRÅ ZACCO AB;  
G01N 33/569, A61K 39/106 P.O. Box 23101, Sveavägen 170, S-104 35 Stockholm (SE).

(21) International Application Number: PCT/SE02/00535

(22) International Filing Date: 20 March 2002 (20.03.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 0101030-5 23 March 2001 (23.03.2001) SE

(71) Applicant (for all designated States except US): NORDIC  
BIO AB [SE/SE]; Rektorsvägen 7, S-224 67 Lund (SE).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GR, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PG, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): LJUNGH, Åsa [SE/SE]; Rektorsvägen 7, S-224 67 Lund (SE). NILSSON, Ingrid [SE/SE]; Qvarneshovsvägen 9, S-227 38 Lund (SE). UTT, Neme [SE/SE]; Viklandsvägen 8, R. 105, S-227 34 Lund (SE). WADSTRÖM, Torkel [SE/SE]; Rektorsvägen 7, S-224 67 Lund (SE).

Published:

with international search report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/077022 A1

(54) Title: IMMUNOGENIC CELL SURFACE PROTEINS OF HELICOBACTER PYLORI

(57) Abstract: A method of identifying immunogenic Helicobacter pylori-specific surface proteins binding specifically to polysulphated molecules, is described. Further, a Helicobacter pylori-specific surface protein product, and a protein contained therein, binding specifically to polysulphated molecules are disclosed. Examples of such proteins are a protein having a MW of 30 (31.3) kDa, a (pI) of 9.3 (9.1) and comprising SEQ ID NO: 1 and/or SEQ ID NO: 2; a protein having a MW of 26 (27.7), a pI of 9.1-9.3 (9.0) and comprising SEQ ID NO: 4; or a protein having a MW of 25 (28.7), a pI of 9.0 (8.8) and comprising SEQ ID NO: 5. Additionally, use of a protein or protein product of the invention as a diagnostic antigen and as a component in a vaccine against H. pylori infection, as well as an immunoassay and a vaccine composition against a H. pylori infection, are described.

WO 02/077022

PCT/SE02/00535

1

**Immunogenic cell surface proteins of *Helicobacter pylori***

The present invention relates to immunogenic cell surface proteins of *Helicobacter pylori*, applications of the proteins and a method of producing them.

**Background**

5 *Helicobacter pylori* is a spiral shaped microorganism colonising the human gastric epithelium inducing type B gastritis and peptic ulcerations (Marshall, 1994). A diagnostic test for detecting this infection should be reliable, cost-effective, easy to perform and preferably non-invasive. In most *H. pylori* infected individuals there is a strong but highly polymorphic humoral immune response to a number of antigens, and detection of antibodies  
10 to various antigens has widely been used for serodiagnosis (Bazillou et al., 1994; De Boer, 1997; Aucher et al. 1998). Such serological assays have been based mainly on enzyme immuno assays (EIA) and immunoblot assays using various antigen preparations. Several available commercial kits use antigen preparations whose compositions are unknown to the user, even though the performance of EIAs depends on the protein composition used in such  
15 an assay (Feldman et al., 1995; Meijer et al., 1997). Some antigens of *H. pylori* such as heat shock proteins (Hsps), flagella and urease cross-react with antigens from other bacterial species, which makes it difficult to choose rationally the antigenic extract or extraction method.

In a previous study it was found (Nilsson et al., 1997) that antibody reactivity  
20 to a set of low molecular mass ( $M_r$ ) cell surface released proteins (25 to 35 kDa) correlated strongly with *H. pylori* infection. However, several of these proteins were not satisfactorily resolved or co-migrated in the one-dimensional electrophoresis (1-DE). However, the use of two dimensional electrophoresis (2-DE) techniques allows a higher resolution of proteins, in which the appropriate pH gradient is of great importance (Kimmel et al., 2000). In a recent 2-  
25 DE study (Nilsson et al., 2000) a strong immune response to *H. pylori* proteins of  $M_r$ s 25-30 kDa was noted. However, these proteins remained unresolved by 2-DE in the pH range of 3-10.

**Description of the invention**

The present invention combines chromatographic enrichment of low abundant  
30 proteins of *H. pylori* with 2-DE using a narrow pH gradient for separation of co-migrating polypeptides, followed by mass spectroscopic identification of proteins. Further, the usefulness of two-dimensional (2-D) immunoblot for identification of immunogenic and cross-reactive proteins is demonstrated.



WO 02/077022

PCT/SE02/00535

2

The invention is in one aspect directed to a method of identifying immunogenic *Helicobacter pylori*-specific surface proteins binding specifically to polysulphated molecules, e.g. glucosaminoglycans and/or other sulphated glycoconjugates such as mucins, comprising the steps of

5 cultivating *H. pylori* bacteria *in vitro*,  
isolating the cultivated bacteria,  
releasing the basic surface proteins by acid glycine extraction,  
removing the bacteria, and  
purifying the glycine extract to produce a *Helicobacter pylori*-specific surface  
10 protein product, and  
subjecting the protein product to a two-dimensional immunoblot to identify immunogenic proteins.

In an embodiment of the method according to this aspect of the invention, the cultivating *in vitro* is performed in an agar medium or broth,

15 the isolation of the bacteria is performed by collecting the grown cells into phosphate a buffered saline (PBS) and centrifugation to produce a pellet,  
releasing the basic surface proteins from the pellet by acid glycine extraction,  
removing the bacteria by centrifugation, and  
purifying the glycine extract by diluting the supernatant from the centrifugation with  
20 PBS, adjusting the pH to 6.5 and subjecting the mixture to heparin affinity chromatography to produce the *Helicobacter pylori*-specific surface protein product.

Another aspect of the invention is directed to a *Helicobacter pylori*-specific surface protein product binding specifically to polysulphated molecules, e.g. glucosaminoglycans and/or other sulphated glycoconjugates such as mucins, which  
25 product is obtainable by  
cultivating *H. pylori* bacteria *in vitro*,  
isolating the cultivated bacteria,  
releasing the basic surface proteins by acid glycine extraction,  
removing the bacteria, and  
30 purifying the glycine extract to produce the *Helicobacter pylori*-specific surface protein product.

In an embodiment of this aspect of the invention the protein product is obtainable by that

WO 02/077022

PCT/SE02/00535

3

the cultivating *in vitro* is performed in an agar medium or broth,  
the isolation of the bacteria is performed by collecting the grown cells into a  
phosphate buffered saline (PBS) and centrifugation to produce a pellet,  
releasing the basic surface proteins from the pellet by acid glycine extraction,

- 5 removing the bacteria by centrifugation, and  
purifying the glycine extract by diluting the supernatant from the centrifugation with  
PBS, adjusting the pH to 6.5 and subjecting the mixture to heparin affinity  
chromatography to produce the *Helicobacter pylori*-specific surface protein product.

In a presently preferred embodiment the product comprises

- 10 at least one protein selected from the group consisting of
- a) a protein having a molecular weight (MW) of 30 (31.3) kDa, an isoelectric point (pI) of 9.3 (9.1) and comprising the amino acid sequence SEQ ID NO: 1 and/or SEQ ID NO: 2,
  - 15 b) a protein having a MW of 26 (27.7), a pI of 9.1-9.3 (9.0), and comprising the amino acid sequence SEQ ID NO: 4, and
  - c) a protein having a MW of 25 (28.7), a pI of 9.0 (8.8) and comprising the amino acid sequence SEQ ID NO: 5.

- Yet another aspect of the invention is directed to a *Helicobacter pylori*-specific surface protein binding specifically to polysulphated molecules and having a MW of 30
- 20 (31.3) kDa, a (pI) of 9.3 (9.1) and comprising the amino acid sequence SEQ ID NO: 1 and/or SEQ ID NO: 2; a *Helicobacter pylori*-specific surface protein binding specifically to polysulphated molecules and having a MW of 26 (27.7), a pI of 9.1-9.3 (9.0) and comprising the amino acid sequence SEQ ID NO: 4; or a *Helicobacter pylori*-specific surface protein binding specifically to polysulphated molecules and having a MW of 25 (28.7), a pI of 9.0
- 25 (8.8) and comprising the amino acid sequence SEQ ID NO: 5.

Still another aspect of the invention is directed to the use of a protein product according to the invention or a protein according to the invention as a diagnostic antigen in an immunoassay.

- A further aspect of the invention is directed to the use of a protein product
- 30 according to the invention or a protein according to the invention as an immunizing component in a vaccine against *H. pylori* infection.

An additional aspect of the invention is directed to an immunoassay for the determination of the presence of *H. pylori* bacteria in a biological sample from a human patient, wherein a protein product according to the invention or a protein according is used as

WO 02/077022

PCT/SE02/00535

4

a diagnostic antigen. Any immunoassay based on antigen-antibody interaction may be used, such as enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), radioimmunoassay (RIA) etc.

A final aspect of the invention is directed to a vaccine composition against a *H. pylori* infection in a human patient comprising as an immunizing component at least one protein product according to the invention or a protein according to the invention, together with a pharmaceutically acceptable vehicle. The pharmaceutically acceptable vehicle will be selected by the manufacturer, e.g. with the guidance of the US or European pharmacopoeia.

The invention will now be illustrated by description of experiments and the drawings, but it should be understood the invention is not limited to any specifically disclosed example.

## Experiments

### Material and methods

#### A. Bacterial strain and culture conditions

*H. pylori* strain CCUG 17874 was cultured from a frozen stock (-115°C) on GAB-CAMP agar plates (Soltész et al., 1992) for three days at 37°C in a microaerophilic atmosphere (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 85% N<sub>2</sub>). Cells were harvested, washed once in phosphate buffered saline pH 7.2 (PBS, 0.02 M sodium phosphate, 0.15 M NaCl) and kept for subsequent protein extraction.

#### B. Extraction of cell surface proteins

Acid glycine extraction of cell surface proteins from 3-day old cells was performed as previously described (Lelwala-Guruge et al., 1990). In brief, harvested and washed cells were re-suspended in 0.2 M glycine hydrochloride, pH 2.2 (4 g cells/100ml) and stirred magnetically for 15 min at 20°C supplemented with protease inhibitors (Complete™, Roche Diagnostics AB, Bromma, Sweden). Cells were removed by centrifugation (12 000 × g for 15 min at 8°C) and the supernatant neutralised with NaOH and dialysed for 18 h at 8°C against PBS. Protein was quantified to 210 µg/ml by the Bradford method using the BioRad protein assay (BioRad, Richmond, CA, USA) and bovine serum albumin as a standard. This protein fraction is further referred to as AGE-proteins.

#### C. Heparin affinity chromatography

A HiTrap heparin column (one ml, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) was equilibrated with 5 mM sodium phosphate buffer and 75 mM NaCl, pH 6.5. AGE- proteins were diluted with the same buffer 1:3, pH adjusted to 6.5 and applied to the affinity column. Unbound proteins were washed out with the equilibration buffer, whereas bound proteins eluted in a single peak using 2 M NaCl, yielding 656 µg/ml in a 2.5 ml protein

WO 02/077022

PCT/SE02/00535

5

fraction, hereafter referred to as AGE-HepBP (acid glycine extracted-heparin binding proteins). The AGE-HepBP fraction was desalted on a Fast Desalting ® column HR 10/10 (Amersham Pharmacia Biotech) at a flow rate of 1 ml/min, equilibrated with 8 M urea (Merck Eurolab AB, Stockholm, Sweden) in water, aliquoted and kept frozen at -20°C.

5 D. *One-dimensional sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (1-DE) and immunoblot (1-D immunoblot)*

1-DE was performed under reducing conditions (Laemmli, 1970) using Criterion™ Cell electrophoresis equipment (BioRad, Richmond, CA, USA) with an 8-16% separating gradient gel and a 4% stacking gel (Criterion Precast Gel, Bio-Rad). Proteins were diluted in a standard sample buffer, loaded to the gel (75 µg/gel) and separated at 200 V for 80 min. *M<sub>s</sub>* of the separated AGE-HepBP were established using Precision marker proteins (BioRad). Following electrophoresis, gels were fixed and silver stained (Heukeshoven et al., 1988). Alternatively, proteins were transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (PVDF) (Micron Separations Inc. Westborough, MA, USA) for antibody detection, using a semi-dry electro-blotter equipment (Ancos, Vig, Denmark). Transfer time was 80 min at a constant current of 1 mA/cm<sup>2</sup>. The immunoblot assay was performed as previously described (Nilsson et al., 1997). Briefly, the membranes were blocked for 2 × 15 min in buffers containing hydrolysed gelatine, polyvinyl-pyrrolidone, Tween 20, ethanolamine and glycine, cut into strips and probed with a panel of sera diluted 1/100 in a buffer containing TRIS, gelatin hydrolysate, sodium chloride, Tween 20, pH 8.7 (Nilsson et al., 1997). Sera were obtained from patients with various diseases including; i) *H. pylori* infection (n=10) established by positive culture of endoscopic biopsy specimen and serology; ii) a pool of sera from *H. pylori* culture negative patients; iii) rheumatoid arthritis (n=8) presenting with high rheumatoid factor titres by the Waaler-Rose test; iv) *Campylobacter jejuni* infection (n=5) presenting with high antibody titres, v) cystic fibrosis (n=3) with *Pseudomonas aeruginosa* colonisation in the lungs; vi) *Treponema pallidum* infection (n=3) positive by the TPHA test; and vii) *Haemophilus influenzae* infection (n=3) positive by culture. All serum samples were collected at the Department of Clinical Microbiology, Lund University Hospital, Lund and kept frozen at -20°C until tested.

30 E. *Isoelectric focusing (IEF)*

The AGE-HepBP were resolved by IEF on precast Immobiline® Dry strips with a linear pH gradient, pH 6-11, 11 cm (IPG strips, Amersham Pharmacia Biotech). The IPG strips were re-hydrated, according to the manufacturer's instructions, for 12 h at 20°C together with the AGE-HepBP (approx. 25 µg per strip) in a 200 µL solution containing 8 M

WO 02/077022

PCT/SE02/00535

6

urea, 3-(3-chloroamidopropyl)dimethylammonio-1-propane sulphonate (CHAPS) (20g/L), IPG sample buffer pH 6-11 (Amersham Pharmacia Biotech), dithiotreitol (DTT) (10g/L) and 25µL bromphenol blue (0.5% w/v). IEF was performed in an IPGphor focusing apparatus (Amersham Pharmacia Biotech) for a total of 80 kVh.

5 F. *Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-DE)*

Before a 2-DE was started, IPG-strips were equilibrated for two intervals of 20 min each in a solution containing 50 mM Tris-HCl, pH 8.8, 6 M urea, 30% (v/v) glycerol, and 1% (wt/v) sodium dodecylsulphate (SDS). DTT (1%, w/v) was added to the first equilibration solution and iodoacetamide (4.8%, w/v) was added to the second equilibration solution. IPG-strips were then applied on the top of 8-16% gradient SDS-PAGE Criterion Precast Gels (BioRad) and separation of proteins carried out under the same conditions as described for 1-D SDS-PAGE. Gels were then processed for silver staining, Coomassie R-350 (PhastGel® Blue R, Amersham Pharmacia Biotech) and for transfer of proteins to PVDF membranes. The IEF and the 2-DE experiments were repeated three to four times.

15 G. *2-D immunoblot assay*

Polypeptides resolved by 2-DE were electrophoretically transferred to PVDF membranes as described in section D. and residual binding capacity was blocked as described before. Membranes were placed in polyethylene bags and overlaid with; *i)* pooled serum samples (n=10) obtained from patients, referred for gastroscopy due to abdominal pains, and positive for *H. pylori* by culture of gastric biopsy; *ii)* pooled serum samples (n=10) from *H. pylori* culture and sero-negative persons; *iii)* serum from a *H. pylori* infected child, positive by culture of gastric biopsy; and *iv)* serum from a *C. jejuni* infected patient. Sera were diluted 1/100 or 1/1000 in 10 ml incubation buffer (see section D.) and incubation time was 16 h at 8°C under constant shaking. After repeated washings, horseradish peroxidase-labelled anti-human IgG antibodies (Dako A/S, Glostrup, Denmark) diluted 1/500 were added and the membrane was then incubated for 2 h at 20°C. Bound antibodies were detected by adding a 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) containing 0.04% 3-amino-9-ethylcarbazole (Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO) and 0.015% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

H. *Image analysis*

30 Gels and immunoblots were scanned with a GS-710 Imaging Densitometer (BioRad). 1-DE gel images were analysed and *M<sub>s</sub>* of proteins were estimated using the Quantity One software package (BioRad). The 2-DE gel image analysis, including estimation of pI and *M<sub>s</sub>*, spot quantification, and matching between gels and 2-D immunoblots was achieved with the Melanie version 3 software (BioRad).

WO 02/077022

PCT/SE02/00535

7

## I. Spot identification

Six spots, showing distinct antibody reactivity with the *H. pylori* positive serum pool, were selected for MS/MS sequencing, cut out from the gel under clean conditions and fragmented with trypsin. The peptide mixture was extracted and analysed by MALDI-TOF

5 MS/MS. Obtained internal peptide sequences were used to identify proteins of the *H. pylori* genome at TIGR database (<http://www.tigr.org/>).

## Description of the drawings

**Figure 1.** Protein band pattern of the AGE-HepBP of *H. pylori* separated by 1 DE (8-16 % gradient gel) and stained by Coomassie R-350. Protein standards are shown on  
10 left side.

**Figure 2.** Antibody reactivity to the AGE-HepBP fraction. Strips were probed with sera from *H. pylori* infected and non-infected patients.

Lane 1: *H. pylori* positive serum pool; lane 2: *H. pylori* negative serum pool; lanes 3-9: *H. pylori* culture positive patients; lanes 10-11: *P. aeruginosa* infected patients; lanes 12-13 *C. jejuni* infected patients; lanes 14-15 sera from rheumatoid arthritis patients; lanes 16-17: *T. pallidum* infected patients. Serum dilution 1/100. Protein standards are shown on left side.  
15

**Figure 3A.** AGE-HepBP of *H. pylori* resolved by IEF in the pH range 6-11 and with a Criterion 8-16 % gradient gel stained by silver. Numbers 1-6 corresponds to the identified proteins in Table 1. Circle shows spots not recognised with the *H. pylori* positive  
20 serum pool (see circle Figure 3C). Protein standards are shown on the right side.

**Figure 3B.** Coomassie R-350 staining of AGE-HepBP of *H. pylori* resolved by IEF in the pH range 6-11 and with a Criterion 8-16 % gradient gel. Numbers 1-6 corresponds to the identified proteins in Table 1. Protein standards are shown on the right side.

**Figure 3C.** 2-D immunoblot with the AGE-HepBP fraction of *H. pylori* resolved by IEF in the pH range 6-11 and with a Criterion 8-16 % gradient gel. The membrane was probed with a pool of 10 sera from *H. pylori* infected patients (dilution 1/1000). Numbers 1-6 corresponds to the identified proteins in Table 1. Protein standards are shown on the right side.  
25

**Figure 4.** 2-D immunoblot with the AGE-HepBP fraction of *H. pylori* resolved by IEF in the pH range 6-11 and with a Criterion 8-16 % gradient gel. The membrane was probed with a pool of 10 sera from *H. pylori* negative patients (dilution of 1/100). Number 6 corresponds to protein in Table 1. Protein standards are shown on the right side.  
30

WO 02/077022

PCT/SE02/00535

8

**Figure 5.** 2-D immunoblot with the AGE-HepBP fraction of *H. pylori* resolved by IEF in the pH range 6-11 and with a Criterion 8-16 % gradient gel. The membrane was probed with a serum from a *C. jejuni* infected patient (dilution of 1/100). Number 6 corresponds to protein in Table 1. Protein standards are shown on the right side.

## 5 Results

### *AGE-HepBP protein profile in 1-DE and 1-D immunoblot*

The protein profile of the AGE-HepBP, separated by 1-DE and stained by Coomassie R-350 is shown in **Figure 1**. Three bands were identified with  $M_s$  of 25, 26 and 29 kDa. Antibody reactivity to four bands ( $M_s$  25, 26, 29 30 kDa) was detected with sera of *H. pylori* infected patients and also by the child patient. Differences in intensity of these bands probably depend from an individual immune response among the patients (**Figure 2**, lanes 1, 3-9). The *H. pylori* seronegative serum pool showed weak reactivity to a 25 kDa and 26 kDa protein (**Figure 2**, lane 2). Other potentially cross-reactive sera demonstrated reactivity to a 25 kDa protein (**Figure 2**, lanes 10-17, in frame). Reactivity to proteins of  $M_s > 37$  kDa were not estimated in the present study.

### *AGE-HepBP protein profiles in 2-DE and 2-D immunoblot*

A total of 141 spots were detected on silver stained gels (**Figure 3A**) in comparison to 71 spots detected on Coomassie R-350 stained gels (**Figure 3B**). Using 2-D immunoblot, 186 spots showed antibody reactivity with the *H. pylori* positive serum pool with a dilution 1/1000 (**Figure 3C**). A higher number of spots were detected by immunoblot demonstrating the increased sensitivity of antibody detection compared with silver and Coomassie staining of spots. Repeated 2-DE experiments demonstrated a high reproducibility with the difference of estimated  $pI$  values varying between 0.0 to 0.05 units. No variability in estimation of  $M_s$  was observed. Some spots that stained strongly using silver and Coomassie stains (**Figure 3 A and B**, circle) were not immunogenic (**Figure 3C**). The  $pI$  and  $M_r$  values obtained using the Melanie 3 software are listed in **Table 1**.

### *Identification of spots (proteins)*

Internal peptide sequences of six spots (**Figure 3A-C**, spots no 1-6, **Table 1**) were identified as peptides of cell binding factor 2 (spots no 1 and 2), the urease A subunit (spots no 3 and 4), a hypothetical protein (spot no 5) and an outer membrane protein (spot no 6).

WO 02/077022

PCT/SE02/00535

9

Cell binding factor 2 (HP0175) has a similarity to cell-binding factor 2 of *C. jejuni* (antigen PEB4A) and is a homologue to *Escherichia coli* survival protein surA. Here two were identified, but a further two-three isoforms with lower pI's could be proposed with the same M.s. Cross reactivity with serum from a *C. jejuni* infected patient was not observed.

5 Spot number 5 (HP0231) was identified as a hypothetical protein with unknown function. This protein co-migrates in 1-DE with the urease A subunit and outer membrane protein HP 1564, but was separated by 2-DE. It was recognised by the *H. pylori* positive serum pool with a dilution 1/1000 by 1-D immunoblot, whereas no reactivity with the *H. pylori* negative serum pool (Figure 4) or *C. jejuni* serum was observed (Figure 5).

10 The outer membrane protein identified (HP1564) belongs to the lipoprotein-28 super family and shows similarity to a *Pasturella haemolytica* lipoprotein 1, (probably attached to the outer membrane by a lipid anchor) and is also similar to both an *E. coli* hypothetical 29.4 kDa lipoprotein and to a 28 kDa *Haemophilus influenzae* lipoprotein (hlpA, outer membrane protein HI0620, 38.5 % identity by BLAST software). This protein (Figure 3A-C, spot no 6, the 25 kDa band in Figure 1) showed reactivity with all potentially cross reactive sera used in this study and with the *H. pylori* negative serum pool (Figure 2).

#### Utilization of results

Defining surface proteins of the human gastric pathogen *H. pylori* is of great interest as several of these proteins are candidates to optimise immunodiagnostic tests and for vaccine design. A large number of antibody screening tests have been developed based on poorly defined *H. pylori* antigens (Glupeczynski, 1998). The 2-DE technique facilitates identification of proteins in a complex antigen to a higher degree than does 1-DE and to overcome the problem of co-migrating proteins when 1-DE is used. As shown in this study, proteins separated as a 1-DE band were separated by the 2-DE technique into several distinct protein spots by using narrow pH gradients.

25 The 2-DE in combination with immunoblot has previously been described for identification of *H. pylori* antigens (McAtee et al., 1998b; Jungblut et al., 2000). Jungblut with co-workers used a single patient serum on 2-D immunoblot, where whole cell proteins were resolved and antibody reactivity to a relatively small number of immunogenic proteins was found. These results suggest that several antigens might be minor components in whole cell lysates and therefore difficult to determine by immunoblot. The individual host response may also play a role.



WO 02/077022

PCT/SE02/00535

10

Chromatographic fractionation and enrichment helps overcome this problem. Using a heparin affinity chromatography fractionation before 2-DE, it was possible to enrich certain low abundant proteins and we were able to show for the first time the binding of hypothetical protein HP0231 to heparin and its immunogenic property. Chromatography has been used in combination with 2-DE for enrichment of minor proteins of *H. influenzae* and using heparin affinity chromatography, 110 new proteins were identified (Fountoulakis et al., 1997). In another study enrichment of low abundant human brain proteins was performed with this technique (Karlsson et al., 1999). Hydroxyapatite, another chromatographic matrix was used to enrich low abundant proteins of *E. coli* (Fountoulakis et al., 1999).

Broad pH gradients have earlier been used to separate *H. pylori* proteins (McAtee et al., 1998b; Jungblut et al., 2000; Nilsson et al., 2000). In these studies basic proteins were resolved to a minor degree. However, in the present study we obtained a higher resolution of basic proteins by using a narrow pH 6-11 gradient in the IEF. This pH gradient is important in studies of *H. pylori* proteins since more than 70 % of the coded precursor proteins have a theoretical pI higher than 7 (Tomb et al., 1997).

Antibodies raised against antigens of low  $M_r$  were found to be of prognostic value for *H. pylori* infection where, antibody reactivity to a 33-35 kDa antigen was present in 97.5% of patients with gastric or duodenal ulcer but less often in patients with chronic type B gastritis (Yamaoka et al., 1998). An antibody response to a 26 kDa protein (HP1563, alkyl hydroperoxide reductase tsaA) was found in sera from gastric cancer patients but not in sera from non-cancer *H. pylori* infected patients (Wang et al., 1998). In a previous immunoblot study, antibody reactivity to a set of low  $M_r$  surface proteins (26 to 33 kDa) was found to strongly correlate with *H. pylori* infection (Nilsson et al., 1997). Antibody reactivity to the proteins in this range were also found in this study and three novel antigens were identified.

Cell binding factor 2 as an immunogenic protein of *H. pylori* was recently described (McAtee et al., 1998a; Jungblut et al., 2000) but no data concerning cross reactivity was reported. Since this protein is similar to the *C. jejuni* cell binding protein 2, we examined potential cross reactivity to this protein with serum of a *C. jejuni* infected patient and with other potentially cross reactive sera. No antibody reactivity was found even at a low dilution of sera (1/100). The *H. pylori*-positive serum pool gave a distinct staining at a tenfold higher dilution (1/1000) (Figure 5 and 4, respectively). Thus, this protein demonstrated a strong immunogenicity and high specificity. Since the signal peptide in precursor sequence could be predicted and a mild protein extraction method releasing mainly surface exposed proteins was used, it is reasonable to believe that this protein is located on the cell surface. Showing a

WO 02/077022

PCT/SE02/00535

11

strong immunogenicity, low cross reactivity and cell surface exposure makes this protein a (cell binding factor 2) appropriate as candidate for diagnostic purpose and vaccine development.

The hypothetical protein HP0231 demonstrated a heparin binding function and together with other surface exposed heparin binding proteins it may be involved in binding of *H. pylori* to cell surface and matrix associated glycosaminoglycans (GAG). This may lead subsequently to the binding of host proteins (Duensing et al., 1999) and *H. pylori* cells coated with host proteins may escape from the attack of host defence system. It may also increase the ability of bacteria to adhere to the acidic fraction of mucin, cell surface exposed glycosaminoglycans and extracellular matrix components such as heparan sulphate without their own specific receptors to maintaining continuous colonisation of this pathogen.

The outer membrane protein HP1564 (lipoprotein 28) and urease A subunit co-migrate in 1-DE, but were resolved with 2-DE. Both proteins are immunogenic, however the HP1564 was also recognised by a set of cross reactive sera and the *H. pylori* negative serum pool. The urease of *H. pylori* is known to have similarity with ureases from other species and the weak staining of the 25-26 kDa protein by 1 D immunoblot could lead to a false positive result. Thus, only a distinct antibody reactivity could be interpreted as a *H. pylori* positive signal.

Except for the urease A, we predicted a signal sequence for all three identified proteins using the signal P software at <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>. This is consistent with our earlier observation, that these proteins are surface exposed on *H. pylori* and therefore would be useful for diagnostics and vaccine development.

Interestingly, several abundant proteins in our protein mixture were not immunogenic. (Figure 3 A-C, circle). This demonstrates that a complex antigen may contain proteins not recognised by patient sera and these proteins may have a reducing effect on the concentration of the immunogenic proteins causing a reduction of effective coating of ELISA plates or protein load for immunoblots.

In conclusion, sample fractionation and enrichment of proteins using a chromatographic step prior to 2-DE improves the possibility to identify proteins present at low concentration. It also may improve the ratio of immunogenic vs non-immunogenic proteins in antigen preparation. Using the 2-D immunoblot, we identified two new immunogenic *H. pylori* proteins, i.e. cell binding factor 2 (HP0175) and a heparin binding protein (HP0231) which may be used in serodiagnostic tests and for vaccine development. We found that 2-D immunoblot also helps to identify cross reactive proteins in complex antigens used in

WO 02/077022

PCT/SE02/00535

12

diagnostic tests. In the post-genomic era, when hundreds of microbial genomes will be available, more precise identification of immunogenic proteins will be necessary, either using classical N-terminal microsequencing or more advanced MS/MS sequencing.

5 The present method will allow characterisation of antigenic proteins for further improvement of specificity in serological tests.

10

WO 02/077022

PCT/SE02/00535

13

## References

- 5 Aucher, P., Petit, M.L., Mannant, P.R., Pezenec, L., Babin, P., Fauchere, J.L., 1998.  
Use of immunoblot assay to define serum antibody patterns associated with  
*Helicobacter pylori* infection and with *H. pylori*-related ulcers. J. Clin. Microbiol. 36,  
931-936.
- 10 Bazillou, M., Fendri, C., Castel, O., Ingrand, P., Fauchere, J.L. 1994.  
Serum antibody response to the superficial and released components of *Helicobacter*  
*pylori*. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1, 310-307.
- 10 De Boer, W.A., 1997. *Helicobacter pylori* and non-ulcer dyspepsia.  
Scand. J. Gastroenterol. 32, 1183-1184.
- 15 Duensing, T.D., Wing, J.S., van Putten, J.P., 1999. Sulfated polysaccharide-directed  
recruitment of mammalian host proteins: a novel strategy in microbial pathogenesis.  
Infect. Immun. 67, 4463-4446.
- 20 Feldman, R.A., Deeks, J.J., Evans, S.J., 1995. Multi-laboratory comparison of eight  
commercially available *Helicobacter pylori* serology kits. *Helicobacter pylori*  
Serology Study Group. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 14, 428-433.
- 20 Fountoulakis, M., Langen, H., Evers, S., Gray, C., Takacs, B., 1997.  
Two-dimensional map of *Haemophilus influenzae* following protein enrichment by  
heparin chromatography. Electrophoresis 18, 1193-1202.
- 25 Fountoulakis, M., Takacs, M.F., Berndt, P., Langen, H., Takacs, B., 1999.  
Enrichment of low abundance proteins of *Escherichia coli* by hydroxyapatite  
chromatography. Electrophoresis 20, 2181-2195.
- 30 Glupczynski, Y., 1998. Microbiological and serological diagnostic tests for  
*Helicobacter pylori*: an overview. British Medical Bulletin (Eds Farthing, M. J. G.,  
Patchett, S. E.) 54, 175-186.

WO 02/077022

PCT/SE02/00535

14

- Heukeshoven, J., Dernick, R., 1988. Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* 9, 28-32.
- 5 Jungblut, P.R., Bumann, D., Haas, G., Zimny-Arndt, U., Holland, P., Lamer, S., Siejak, F., Aebischer, A., Meyer, T.F., 2000. Comparative proteome analysis of *Helicobacter pylori*. *Mol. Microbiol.* 36, 710-725.
- 10 Karlsson, K., Cairns, N., Lubec, G., Fountoulakis, M., 1999. Enrichment of human brain proteins by heparin chromatography. *Electrophoresis* 20, 2970-2976.
- 15 Kimmel, B., Bosserhoff, A., Frank, R., Gross, R., Goebel, W., Beier, D., 2000. Identification of immunodominant antigens from *Helicobacter pylori* and evaluation of their reactivities with sera from patients with different gastroduodenal pathologies. *Infect. Immun.* 68, 915-920.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680-685.
- 20 Lelwala-Guruge, J., Schalén, C., Nilsson, I., Ljungh, Å., Tyszkiewicz, T., Wikander, M., Wadström, T., 1990. Detection of antibodies to *Helicobacter pylori* cell surface antigens. *Scand. J. Infect. Dis.* 22, 457-465.
- 25 Marshall, B., 1994. *Helicobacter pylori*. *Am. J. Gastroenterol.* 89 [suppl], S116-S128.
- McAtee, C.P., Lim, M.Y., Fung, K., Velligan, M., Fry, K., Chow, T.P., Berg, D.E., 1998 a. Characterization of a *Helicobacter pylori* vaccine candidate by proteome techniques. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 714, 325-33.
- 30 McAtee, C.P., Lim, M.Y., Fung, K., Velligan, M., Fry, K., Chow, T., Berg, D.E., 1998 b. Identification of potential diagnostic and vaccine candidates of *Helicobacter pylori* by two-dimensional gel-electrophoresis, sequence analysis, and serum profiling. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5, 537-542.

WO 02/077022

PCT/SE02/00535

15

- Meijer, B.C., Thijs, J.C., Kleibeuker, J.H., van Zwet, A.A., Berrelkamp, R.J., 1997. Evaluation of eight enzyme immunoassays for detection of immunoglobulin G against *Helicobacter pylori*. J. Clin. Microbiol. 35, 292-294.
- 5 Nilsson, I., Ljungh, A., Aleljung, P., Wadstrom, T., 1997. Immunoblot assay for serodiagnosis of *Helicobacter pylori* infections. J. Clin. Microbiol. 35, 427-432.
- Nilsson, I., Utt, M., Nilsson, H.O., Ljungh, A., Wadstrom, T., 2000. Two-dimensional electrophoretic and immunoblot analysis of cell surface proteins of spiral-shaped and
- 10 coccoid forms of *Helicobacter pylori*. Electrophoresis 21, 2670-2677.
- Soltész, V., Zeeberg, B., Wadström, T., 1992. Optimal survival of *Helicobacter pylori* under various transport conditions. J. Clin. Microbiol. 30, 1453-1456.
- 15 Tomb, J-F, White, O., Kerlavage, A. R., Clayton, R. A., Sutton, G. G., Fleischmann, R.D., Ketchum, K. A., Klenk, H. P., Gill, S., Dougherty, B. A., Nelson, K., Quackenbush, J., Zhou, L., Kirkness, E. F., Peterson, S., Loftus, B., Richardson, D., Dodson, R., Khalak, H. G., Glödek, A., McKenney, K., Fitzgerald, L. M., Lee, N., Adams, M. D., Hickey, E. K., Berg, D. E., Gocayne, J. D., Utterback, T. R., Peterson, J. D., Kelley, J. M., Cotton, M. D., Weidman, J. M., Fujii, C., Bowman, C., Watthey, L., Wallin, E., Hayes, W. S., Borodovsky, M., Karp, P. D., Smith, H. O., Fraser, C. M., Venter J. C., 1997. The complete genome sequence of the gastric pathogen
- 20 *Helicobacter pylori*. Nature, 388, 539-547.
- 25 Wang, J-T., Chang, C-S., Lee, C-Z., Yang, J-C., Lin, J-T., Wang, T-H., 1998. Antibody to a *Helicobacter pylori* species specific antigen in patients with adenocarcinoma of the stomach. Biochem. Biophys. Res. Commun. 244, 360-363.
- 30 Yamaoka, Y., Kodama, T., Graham, D. Y., Kashima, K., 1998. Search for putative virulence factors of *Helicobacter pylori*: the low-molecular-weight (33-35 K) antigen. Dig. Dis. Sci. 43, 1482-1487.

Table 1. Immunogenic AGE-HepBP proteins of *H. pylori* strain 17874 identified from 2-DE gel by MS/MS sequencing

| Spot number <sup>a)</sup> | <i>M<sub>s</sub></i> in kDa (experimental) | pI (experimental) | MS/MS sequence (internal peptide) | Protein name (TIGR)           |
|---------------------------|--------------------------------------------|-------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| 1                         | 30                                         | 9.34              | TTDSSAGVLAIVDGR                   | Cell binding factor 2 HP0175  |
| 2                         | 30                                         | 9.24              | DSPVTYTYEQAK                      | Cell binding factor 2 HP0175  |
| 3                         | 26                                         | 8.67              | LFGFNALVDR                        | Urease A HP0073               |
| 4                         | 26                                         | 8.01              | LFGFNALVDR                        | Urease A HP0073               |
| 5                         | 26                                         | 9.11-9.33         | MVVVGWLGVNSAK                     | Hypothetical protein HP0231   |
| 6                         | 25                                         | 9.04              | DPSNLYATEFDLVK                    | Outer membrane protein HP1564 |

<sup>a)</sup> Corresponds to the numbers in Figure 3A, B, C

WO 02/077022

PCT/SE02/00535

17

## Claims

1. A method of identifying immunogenic *Helicobacter pylori*-specific surface proteins binding specifically to polysulphated molecules, comprising the steps of cultivating *H. pylori* bacteria *in vitro*,  
5 isolating the cultivated bacteria,  
releasing the basic surface proteins by acid glycine extraction,  
removing the bacteria,  
purifying the glycine extract to produce a *Helicobacter pylori*-specific surface protein product, and  
10 subjecting the protein product to a two-dimensional immunoblot to identify immunogenic proteins.
2. The method according to claim 1, wherein  
the cultivating *in vitro* is performed in an agar medium or broth,  
the isolation of the bacteria is performed by collecting the grown cells into a phosphate  
15 buffered saline (PBS) and centrifugation to produce a pellet,  
releasing the basic surface proteins from the pellet by acid glycine extraction,  
removing the bacteria by centrifugation, and  
purifying the glycine extract by diluting the supernatant from the centrifugation with  
PBS, adjusting the pH to 6.5 and subjecting the mixture to heparin affinity  
20 chromatography to produce the *Helicobacter pylori*-specific surface protein product.
3. A *Helicobacter pylori*-specific surface protein product binding specifically to polysulphated molecules, which is obtainable by  
cultivating *H. pylori* bacteria *in vitro*,  
25 isolating the cultivated bacteria,  
releasing the basic surface proteins by acid glycine extraction,  
removing the bacteria, and  
purifying the glycine extract to produce the *Helicobacter pylori*-specific surface protein product.
- 30 4. The protein product according to claim 3, wherein  
the cultivating *in vitro* is performed in an agar medium or broth,  
the isolation of the bacteria is performed by collecting the grown cells into a phosphate buffered saline (PBS) and centrifugation to produce a pellet,  
releasing the basic surface proteins from the pellet by acid glycine extraction,



WO 02/077022

PCT/SE02/00535

removing the bacteria by centrifugation, and  
 purifying the glycine extract by diluting the supernatant from the centrifugation with  
 PBS, adjusting the pH to 6.5 and subjecting the mixture to heparin affinity  
 chromatography to produce the *Helicobacter pylori*-specific surface  
 protein product.

5        5. The protein product according to claim 3 or 4, wherein the product comprises  
 at least one protein selected from the group consisting of

- a) a protein having a molecular weight (MW) of 30 (31.3) kDa, an isoelectric point  
 (pI) of 9.3 (9.1) and comprising the amino acid sequence SEQ ID NO: 1 and/or  
 10        SEQ ID NO: 2,  
 b) a protein having a MW of 26 (27.7), a pI of 9.1-9.3 (9.0), and comprising the amino  
 acid sequence SEQ ID NO: 4, and  
 c) a protein having a MW of 25 (28.7), a pI of 9.0 (8.8) and comprising the amino acid  
 sequence SEQ ID NO: 5.

15        6. A *Helicobacter pylori*-specific surface protein binding specifically to  
 polysulphated molecules and having a MW of 30 (31.3) kDa, a (pI) of 9.3 (9.1) and  
 comprising the amino acid sequence SEQ ID NO: 1 and/or SEQ ID NO: 2.

7. A *Helicobacter pylori*-specific surface protein binding specifically to  
 polysulphated molecules and having a MW of 26 (27.7), a pI of 9.1-9.3 (9.0) and  
 20        comprising the amino acid sequence SEQ ID NO: 4.

8. A *Helicobacter pylori*-specific surface protein binding specifically to  
 polysulphated molecules and having a MW of 25 (28.7), a pI of 9.0 (8.8) and comprising  
 the amino acid sequence SEQ ID NO: 5.

9. Use of a protein product according to any one of claims 3 – 5 or a protein  
 25        according to any one of claims 6 – 8 as a diagnostic antigen in an immunoassay.

10. Use of a protein product according to any one of claims 3 – 5 or a protein  
 according to any one of claims 6 – 8 as an immunizing component in a vaccine against  
*H. pylori* infection.

11. An immunoassay for the determination of the presence of *H. pylori* bacteria  
 30        in a biological sample from a human patient, wherein a protein product according to any  
 one of claims 3 – 5 or a protein according to any one of claims 6 – 8 is used as a  
 diagnostic antigen.

WO 02/077022

PCT/SE02/00535

19

12. A vaccine composition against a *H. pylori* infection in a human patient comprising as an immunizing component at least one protein product according to any one of claims 3 – 5 or a protein according to any one of claims 6 – 8, together with a pharmaceutically acceptable vehicle.

- 5     subjecting the protein product to a two-dimensional immunoblot to identify immunogenic proteins.

WO 02/077022

1/7

PCT/SE02/00535

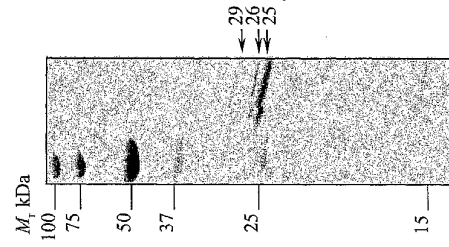
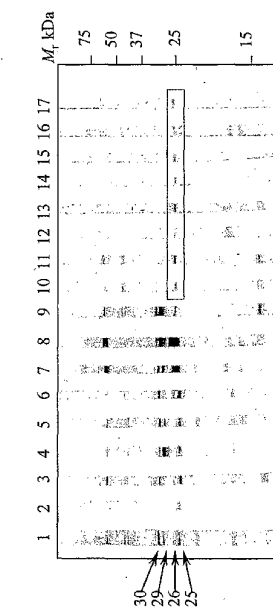


Figure 1



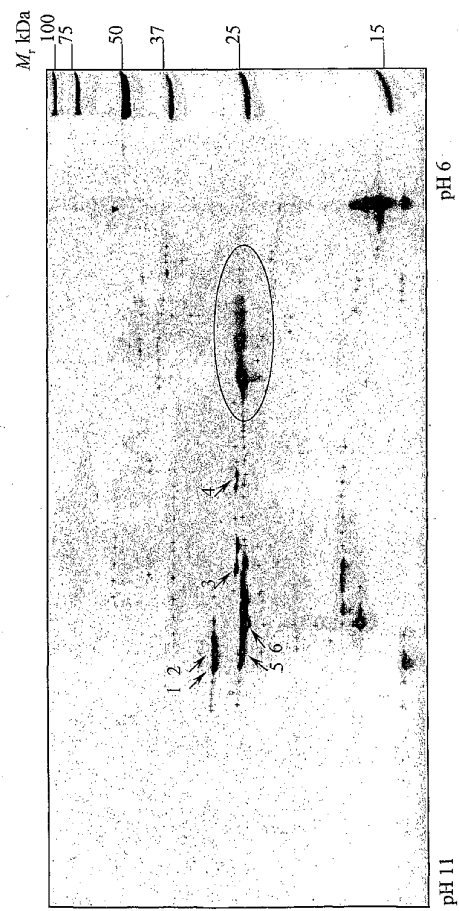


Figure 3A

WO 02/077022

4/7

PCT/SE02/00535

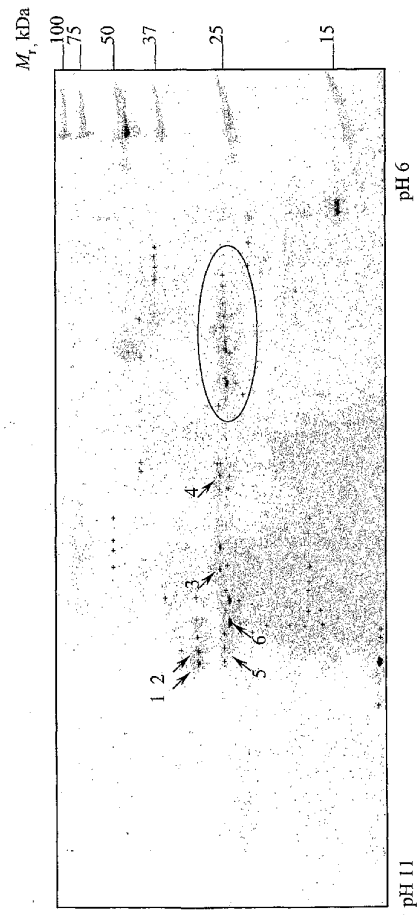


Figure 3B

WO 02/077022

5/7

PCT/SE02/00535

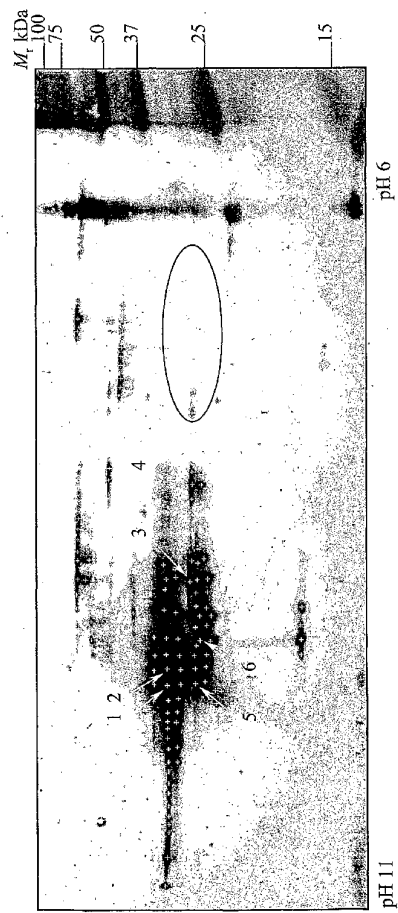


Figure 3C

WO 02/077022

6/7

PCT/SE02/00535

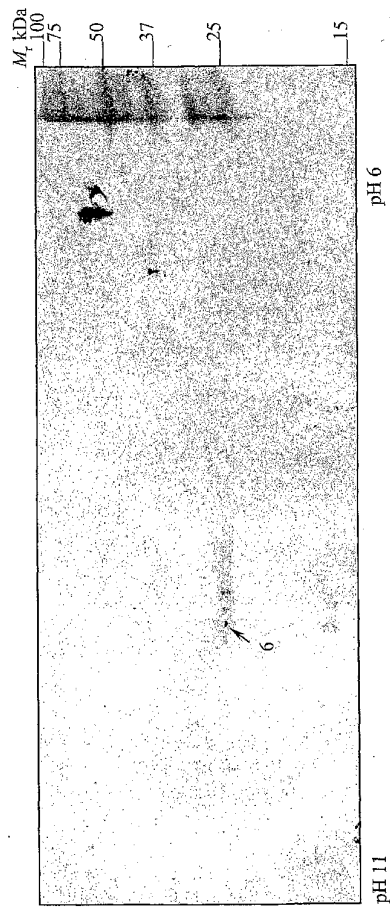


Figure 4



WO 02/077022

7/7

PCT/SE02/00535

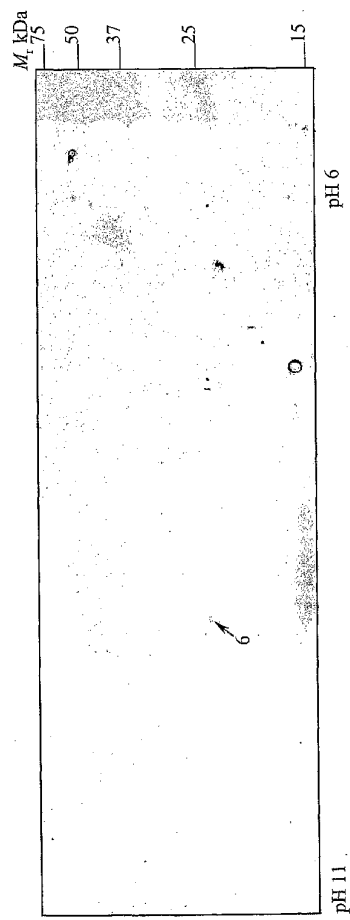


Figure 5

WO 02/077022

PCT/SE02/00535

1  
SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; NORDIC BIO AB

<120> Immunogenic cell surface proteins of Helicobacter  
pylori

&lt;130&gt; 110059401

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;150&gt; SE 0101030-5

&lt;151&gt; 2001-03-23

&lt;160&gt; 5

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Helicobacter pylori

&lt;400&gt; 1

Thr Thr Asp Ser Ser Ala Gly Val Leu Ala Thr Val Asp Gly Arg  
1 5 10 15

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Helicobacter pylori

&lt;400&gt; 2

Asp Ser Pro Val Thr Tyr Thr Tyr Glu Gln Ala Lys  
1 5 10

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Helicobacter pylori

&lt;400&gt; 3

Leu Phe Gly Phe Asn Ala Leu Val Asp Arg  
1 5 10

WO 02/077022

PCT/SE02/00535

2  
<210> 4  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Helicobacter pylori  
<400> 4  
Met Val Val Val Gly Trp Leu Gly Val Asn Ser Ala Lys  
1 5 10

<210> 5  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Helicobacter pylori  
<400> 5  
Asp Pro Ser Asn Leu Tyr Ala Thr Glu Phe Asp Leu Val Lys  
1 5 10

## 【国際調査報告】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                         | International application No.<br>PCT/SE 02/00535                        |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                         |
| IPC7: C07K 14/205, G01N 33/569, A61K 39/106<br>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                         |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                         |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                         |
| IPC7: C07K, C12N, G01N, A61K, A61P                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                         |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                         |
| SE,DK,FI,NO classes as above                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                         |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                         |
| EPO-INTERNAL, WPI DATA, PAJ, FULLTEXT, BIOSIS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                         |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                         |
| Category*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                      | Relevant to claim No.                                                   |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Electrophoresis, Volume 21, 2000, Ingrid Nilsson et al: "Two-dimensional electrophoretic and immunoblot analysis of cell surface proteins of spiral-shaped and coccoid forms of <i>Helicobacter pylori</i> ", pages 2670-2677, see specially Discussion | 1-12                                                                    |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Electrophoresis, Volume 18, 1997, Michael Fountoulak Fountoulakis et al: "Two-dimensional map of <i>Haemophilus influenzae</i> following protein enrichment by heparin chromatography", pages 1193-1202                                                 | 1-12                                                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                         |
| * Special categories of cited documents:<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date<br>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention<br>"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone<br>"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art<br>"&" document member of the same patent family |                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                         |
| Date of the actual completion of the international search                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                         | Date of mailing of the international search report                      |
| 26 June 2002                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                         | 04-07-2002                                                              |
| Name and mailing address of the ISA/<br>Swedish Patent Office<br>Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM<br>Facsimile No. +46 8 666 02 86                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                         | Authorized officer<br>MICHAEL OWALD/BS<br>Telephone No. +46 8 782 25 00 |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/SE 02/00535

| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                       |
|-------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Category*                                             | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                   | Relevant to claim No. |
| X                                                     | Database SWALL/EBI, Accession no. P56112,<br>1 November 1997, "Hypothetical protein HP0175",<br>100% identity in 13 aa overlap with SEQ ID NO 2<br>& Nature, 388: 539-547 (1997), Jean-F. Tomb et al:<br>"The complete genome sequence of the gastric<br>pathogen <i>Helicobacter pylori</i> "<br>-- | 5-6                   |
| X                                                     | Database SWALL/EBI, Accession no. 025017,<br>1 January 1998, "Hypothetical protein"<br>100% identity in 13 aa overlap with SEQ ID NO 4<br>& Nature, 388: 539-547 (1997), Jean-F. Tomb et al:<br>"The complete genome sequence of the gastric<br>pathogen <i>Helicobacter pylori</i> "<br>--          | 5,7                   |
| X                                                     | Database SWALL/EBI, Accession no. 026084,<br>1 January 1998, "Outer membrane protein",<br>100% identity in 14 aa overlap with SEQ ID NO 5<br>& Nature, 388: 539-547 (1997), Jean-F. Tomb et al:<br>"The complete genome sequence of the gastric<br>pathogen <i>Helicobacter pylori</i> ",<br>--      | 5,8                   |
| X                                                     | WO 9625430 A1 (CORTECS LIMITED), 22 August 1996<br>(22.08.96), see specially the claims<br>--                                                                                                                                                                                                        | 9-12                  |
| A                                                     | Nature, Volume 388, August 1997, Jean-F. Tomb et al:<br>"The complete genome sequence of the gastric<br>pathogen <i>Helicobacter pylori</i> ", pages 539-547<br>--                                                                                                                                   | 1-12                  |
| A                                                     | WO 9849314 A2 (GENELABS TECHNOLOGIES, INC.),<br>5 November 1998 (05.11.98)<br>--                                                                                                                                                                                                                     | 1-12                  |
| A                                                     | WO 0029432 A1 (CORTECS LIMITED), 25 May 2000<br>(25.05.00)<br>--                                                                                                                                                                                                                                     | 1-12                  |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/SE 02/00535

| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                                                                  |                       |
|-------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Category*                                             | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                               | Relevant to claim No. |
| A                                                     | <p>Infection and Immunity, Volume 67, No. 9,<br/>Sept 1999, Thomas D. Duensing et al: "Sulfated<br/>Polysaccharide-Directed Recruitment of Mammalian<br/>Host Proteins: a Novel Strategy in Microbial<br/>Pathogenesis", pages 4463-4468</p> <p>--<br/>-----</p> | 1-12                  |

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT<br>Information on patent family members |                     |                            |                     | International application No.<br>PCT/SE 02/00535 |  |
|---------------------------------------------------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|--------------------------------------------------|--|
| 10/06/02                                                            |                     |                            |                     |                                                  |  |
| Patent document<br>cited in search report                           | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |                                                  |  |
| WO 9625430 A1                                                       | 22/08/96            | AT 206138 T                | 15/10/01            |                                                  |  |
|                                                                     |                     | AU 714222 B                | 23/12/99            |                                                  |  |
|                                                                     |                     | AU 4672896 A               | 04/09/96            |                                                  |  |
|                                                                     |                     | CA 2212952 A               | 22/08/96            |                                                  |  |
|                                                                     |                     | CN 1175955 A               | 11/03/98            |                                                  |  |
|                                                                     |                     | DE 69523944 D              | 00/00/00            |                                                  |  |
|                                                                     |                     | DE 69615537 D,T            | 18/04/02            |                                                  |  |
|                                                                     |                     | DK 809653 T                | 19/11/01            |                                                  |  |
|                                                                     |                     | EP 0799471 A,B             | 08/10/97            |                                                  |  |
|                                                                     |                     | SE 0799471 T3              |                     |                                                  |  |
|                                                                     |                     | EP 0809653 A,B             | 03/12/97            |                                                  |  |
|                                                                     |                     | SE 0809653 T3              |                     |                                                  |  |
|                                                                     |                     | ES 2164231 T               | 16/02/02            |                                                  |  |
|                                                                     |                     | FI 973335 A                | 14/08/97            |                                                  |  |
|                                                                     |                     | GB 2309563 A,B             | 30/07/97            |                                                  |  |
|                                                                     |                     | GB 9502899 D               | 00/00/00            |                                                  |  |
|                                                                     |                     | GB 9709854 D               | 00/00/00            |                                                  |  |
|                                                                     |                     | IL 117151 D                | 00/00/00            |                                                  |  |
|                                                                     |                     | JP 10511196 T              | 27/10/98            |                                                  |  |
|                                                                     |                     | JP 11503999 T              | 06/04/99            |                                                  |  |
|                                                                     |                     | NZ 973753 A                | 14/08/97            |                                                  |  |
|                                                                     |                     | NZ 301334 A                | 30/08/99            |                                                  |  |
|                                                                     |                     | US 5974385 A               | 26/10/99            |                                                  |  |
|                                                                     |                     | ZA 9601216 D               | 15/09/97            |                                                  |  |
| WO 9849314 A2                                                       | 05/11/98            | AU 7166098 A               | 24/11/98            |                                                  |  |
|                                                                     |                     | EP 0977864 A               | 09/02/00            |                                                  |  |
|                                                                     |                     | JP 2001517091 T            | 02/10/01            |                                                  |  |
| WO 0029432 A1                                                       | 25/05/00            | CN 1330662 T               | 09/01/02            |                                                  |  |
|                                                                     |                     | EP 1131346 A               | 12/09/01            |                                                  |  |
|                                                                     |                     | GB 9825184 D               | 00/00/00            |                                                  |  |

フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>7</sup> F I テーマコード (参考)  
G O 1 N 33/569 G O 1 N 33/569 F

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE, GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,P L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 イングリド・ニルソン  
スウェーデン、エスー２２７ ３８ルンド、クヴァンテンボリィスヴェーゲン９番

(72)発明者 メーメ・ウット  
スウェーデン、エスー２２７ ３４ルンド、ヴィルダズヴェーゲン８番、アル１０３

(72)発明者 トルケル・ヴァドストレーム  
スウェーデン、エスー２２４ ６７ルンド、レクトッシュヴェーゲン７番

Fターム(参考) 4B064 AG01 CA02 CC01 CE08 CE12 DA01 DA14  
4C085 AA03 BB11 CC01 CC07 CC21 EE01  
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 CA11 DA50 EA22 EA52 GA01 GA15  
GA26



|                |                                                                                                                                                                                                                                                                         |         |            |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | <无法获取翻译>                                                                                                                                                                                                                                                                |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP2004536791A5</a>                                                                                                                                                                                                                                          | 公开(公告)日 | 2005-12-22 |
| 申请号            | JP2002576280                                                                                                                                                                                                                                                            | 申请日     | 2002-03-20 |
| [标]申请(专利权)人(译) | NORDIC BIO                                                                                                                                                                                                                                                              |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | Norudiku生物激活宝来获得                                                                                                                                                                                                                                                        |         |            |
| [标]发明人         | オーサユーング<br>イングリドニルソン<br>メーメウット<br>トルケルヴァドストレーム                                                                                                                                                                                                                          |         |            |
| 发明人            | オーサ・ユーング<br>イングリド・ニルソン<br>メーメ・ウット<br>トルケル・ヴァドストレーム                                                                                                                                                                                                                      |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/53 A61K39/00 A61P31/04 C07K14/195 C07K14/205 C12P21/00 G01N33/569                                                                                                                                                                                                |         |            |
| CPC分类号         | C07K14/205 A61K39/00                                                                                                                                                                                                                                                    |         |            |
| FI分类号          | C07K14/195.ZNA A61K39/00.H A61P31/04 C12P21/00.B G01N33/53.D G01N33/569.F                                                                                                                                                                                               |         |            |
| F-TERM分类号      | 4B064/AG01 4B064/CA02 4B064/CC01 4B064/CE08 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA14 4C085/AA03 4C085/BB11 4C085/CC01 4C085/CC07 4C085/CC21 4C085/EE01 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA11 4H045/DA50 4H045/EA22 4H045/EA52 4H045/GA01 4H045/GA15 4H045/GA26 |         |            |
| 代理人(译)         | 品川EiSatoshi                                                                                                                                                                                                                                                             |         |            |
| 优先权            | 0101030 2001-03-23 SE                                                                                                                                                                                                                                                   |         |            |
| 其他公开文献         | JP2004536791A                                                                                                                                                                                                                                                           |         |            |

#### 摘要(译)

描述了鉴定特异性结合多硫酸化分子的免疫原性幽门螺杆菌特异性表面蛋白的方法。另外，描述了特异性结合多硫酸化分子和其中包含的蛋白质的幽门螺杆菌特异性表面蛋白产物。这种蛋白质的实例是1;具有分子量 ( MW ) 30 ( 31.3 ) kDa , 等电点 ( pI ) 9.3 ( 9.1 ) 并包含SEQ ID NO : 1和/或SEQ ID NO : 2的氨基酸序列的蛋白质; MW 26 ( 27.7 ) , pI 9.1-9.3 ( 9.0 ) , 包含SEQ ID NO : 4的氨基酸序列的蛋白质; 7 ) , pI 9.0 ( 8.8 ) , 并含有SEQ ID NO : 5的氨基酸序列。此外，作为针对幽门螺杆菌感染的疫苗中的诊断抗原和使用本发明的蛋白质或蛋白质产物作为组分，以及免疫测定和幽门螺杆菌感染。描述了用于幽门螺杆菌感染的疫苗组合物。