

63.766/SZE

77 876

K I V O N A T

Eljárás fokozott antigénaktivitású bélbaktériumok és azokat tartalmazó vakcinák előállítására

ANTEX BIOLOGICS INC.

MICROCARB, INC., GAITHERSBURG, US

A bejelentés napja: 1995. 10. 04.

Elsőbbségei: 1994. 10. 05. (08/318,409), US
 1995. 10. 03. (08/538,543), US
 1995. 10. 03. (08/538,545), US

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/(S95/13196

A nemzetközi közzététel száma: WO 96/11258

A találmány tárgya eljárás fokozott antigénaktivitású bélbaktériumok, nevezetesen *Campylobacter* sp., *Yersinia* sp., *Bacteroides* sp., *Klebsiella* sp., *Gastrospirillum* sp., *Enterobacter* sp., *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Aeromonas* sp., *Vibrio* sp., *Clostridium* sp., *Enterococcus* sp. és *Escherichia coli* előállítására, mely abból áll, hogy a bélbaktérium tenyésztét a korai log fázis, a korai log fázis és a stacioner fázis közti vagy a stacioner fázis állapotának eléréséig szükséges időt in vitro növesztik a környezeti tényezők alábbi kombinációja mellett:

a) 0,05-3 % epe vagy 0,025-0,6 % egy vagy több epesav vagy sói jelenlétében;

b) 30-42°C hőmérsékleten;

c) levegő alatt mikroaerofill körülmények között, ahol a mikroaerofill körülmény (i) 5-20 % CO₂, 80-95 % levegő, vagy (ii) 5-10 % O₂, 10-20 % CO₂, 70-85 % N₂ összetételű gázelegyet jelent; és

d) kétértékű kation-kelátképző jelenlétében, amit 0-100 µM BAPTA/AM, 1-10 mM EGTA vagy 0-100 µM EGTA/AM közül választják ki.

A találmány tárgya továbbá eljárás a fokozott antigénaktivitású nevezett bélbaktériumok valamelyikét vagy immunogén frakcióját tartalmazó vakcina előállítására, továbbá maga a vakcina.

25043

P 9702303

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**

250435043

63.766/SZE

S.B.G. & K.
Nemzetközi
Szabadalmi Iroda
H-1062 Budapest, Andrásy ut 11.
Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-323

Eljárás fokozott antigénaktivitású bélbaktériumok és azokat tartalmazó vakcinák előállítására

MICROCARB, INC., GAITHERSBURG, US

Feltalálók:

PACE John, L. GERMANTOWN, MD, US

WALKER Richard, I. GAITHERSBURG, MD, US

FREY Steven, M. GERMANTOWN, MD, US

A bejelentés napja: 1995. 10. 04.

Elsőbbségei: 1994. 10. 05. (08/318,409), US
 1995. 10. 03. (08/538,543), US
 1995. 10. 03. (08/538,545), US

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/(S95/13196

A nemzetközi közzététel száma: WO 96/11258

A találmány olyan in vitro módszerekkel foglalkozik, melyekkel a bélbaktériumok antigénjeinek és/vagy virulenciafaktorainak a kifejeződését indukálhatjuk vagy fokozhatjuk, miáltal fokozott antigenitású bélbaktériumokat termelhetünk. Foglalkozik továbbá a találmány a fokozott antigenitású bélbaktériumok felhasználási eljárásaival és fokozott antigenaktivitású bélbaktériumokat tartalmazó vakcinákkal.

Általánosan ismert, hogy a szokásos táptalajon és körülmények között in vitro tenyésztett baktériumok tulajdonságai különböznek a természetes környezetükben növekvő - ideértve a normál mikroflóra vagy a kórokozók gazdaszervezetben in vivo történő - baktériumokétól. Ezért az in vitro tenyésztett kórokozó baktériumok alkalmatlanok lehetnek arra, hogy oltóanyagkomponensként alkalmazzuk őket. Ha azonban lehetővé válna, hogy meghatározzuk azokat a környezeti tényezőket, melyek a virulenciafaktorok vagy antigének - beleértve a külső felületi antigéneket - kifejeződését elindítják vagy fokozzák és megfelelő fiziológiai állapotot hoznak létre, akkor fontos termékek és terápiák (például a vakcinákhoz felhasználható új antigének, anti-biotikumok új célpontjai, a diagnosztikában felhasználható új bakteriális tulajdonságok) gyors felismerése történhetne meg.

Már azonosítottak néhány olyan környezeti tényezőt, amely hatással van a baktériumvirulencia meghatározóinak kifejeződésére [Mekalanos, J. J., J. Bacteriol., 174:1-7 (1992)]. Például régóta kutatják már a baktériumok virulenciájának a vassal való összefüggését, különösen a Shigella [Payne, Mol. Microbiol., 3:1301-1306 (1989), a Neisseria [Payne és Finkelstein, J. Clin.

Microbiol., 6:293-297 (1977)] és a Pasteurella [Gilmour és munkatársai, Vaccine, 9:137-140 (1991)] esetében.

A növényekben és az állatokban élő baktériumok széles körénél kimutattak olyan más környezeti tényezőket is, amelyek befolyásolják a koordinatíven szabályozott virulencia determinánsok kifejeződését. Ilyen tényezők a fenolos vegyületek, monoszacharidok, aminosavak, a hőmérséklet, az ozmotikus körülmények és más ionok [Mekalanos, J. Bacterial., 174:1-7 (1992)].

A gyomron át (azaz szájon keresztül) a gazdaszervezetbe bejutó kórokozó baktérium a szervezetben őt körülvevő környezetben számos olyan komponenssel és állapottal találkozik, melyek befolyásolhatják a fiziológiáját és a virulenciafaktorok kifejeződését. Ezekhez a komponensekhez és állapotokhoz tartozik az epe, epesavak vagy sóik, a gyomor kémhatása (pH értéke), a mikroaerofill állapotok (a gyomorban magas a szén-dioxid- alacsony az oxigénkoncentráció), az ozmotikus körülmények és sok más, még nem meghatározott tényező. A behatoló (invazív) bélbaktériumoknak de novo fehérjeszintézisre van szükségük, hogy végrehajtsák a behatolást (internalizációt) [Headley és Payne, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 87:4179-4187 (1990)]. A baktériumok ezért csak bizonyos környezeti szignálokra reagálva képesek optimálisan termelni ezeket az invazív faktorokat. Ezekkel a szignálokkal in vitro rendszerint nem találkoznak. Ezt a hipotézist támasztja alá egy mostani beszámoló, mely szerint a szokásos módon nőtt C.jejunival szembeni antiszérum csak csekély hatással van az in vitro behatolás blokkolására [Konkel és munkatársai, J. Infect. Dis., 168:948-954 (1993)]. Ha azonban a Campylobacter sejteket egyrétegű epithelsejtek jelenlétében növesztjük, vagyis

olyan körülmények között, melyek fokozzák a behatolóképesseget, a nyulak ilyen *Campylobacter* kivonatával szembeni immunizálásával olyan antiszérumot nyerünk, mely kifejezetten gátolja a baktérium behatolását.

A kutatók vizsgálták a baktériumok intesztinális körülmények közötti növekedését, hogy felismerjék a virulenciafaktorokat. Így például a nyúl csípőbélkacsában növekvő *Campylobacter* 81-176 törzs olyan fehérjéket expresszál, melyeket a szokásos laboratóriumi in vitro körülmények kötött nem termel [Panigrahi és munkatársai, *Infect. Immun.*, 60:4938-4944 (1992)]. Új vagy megnövekedett fehérjeszintézis figyelhető meg az egyrétegű INT 407 sejtekkel együtt tenyésztett *Campylobacter*nél, összehasonlítva olyan tenyészetével, amit nem hámsejtek jelenlétében növesztettek [Konkel és munkatársai, *J. Infect. Dis.*, 168:948-954 (1993)]. Továbbá, ezek a változások időben összeestek a *C.jejuni* megnövekedett behatolóképessegével. Egy avirulens *C.jejuni* törzset intravénásan és chorioallantoisba adva, csirkeembriókon keresztül passzáltak, és ekkor más változások is megfigyelhetők voltak, nevezetesen megváltozott a sejt morfológiája, eltűntek a flagellák, új külső membránfehérje expresszáldott és módosultak a sejtfelszíni szénhidrátok [Field és munkatársai, *J. Med. Microbiol.*, 38:293-300 (1993)].

Más intesztinális komponensekről, például az epesavakról vagy sóikról ismert, hogy bizonyos baktériumokat gátolnak, de az epesavaknak más szerepük is lehet a baktériumok virulenciájának befolyásolásán keresztül.

Pope és Payne [93rd Am. Soc. Microbiol., B-147 (1993)] leírták, hogy a nátrium-kenodeoxikolátot tartalmazó közegben te-

nyésztett *Shigella flexneri* esetében az egyrétegű HeLa sejtek fertőzőettsége 3-5-szörösére nőtt. Arról is beszámolnak, hogy más epesavas sók és detergenssek, ideértve a kolátot, glikolátot, taurodeoxiklólátot, CHAPS sorozatot, digitonint és a Triton X100-at, valamint ezek nátriumsóját, viszont nem voltak hatással az *S. flexneri* behatolókéességére. Sőt a kenodeoxikolát tápközegben való jelenléte sem volt hatással az *E. coli* és más avirulens *Shigella* törzs behatolókéességére.

Az *S. flexneri* új proteineket szintetizáló tevékenysége a pH érték, a hőmérséklet és a tenyészközeg ionösszetételeinek megváltoztatásával is kiváltható [Mekalanos, J. Bacteriol., 174:1-7 (1992)].

A WO 93/22423 közzétételi számú (PCT) szabadalom (1993. november 11.) eljárásokkal szolgál baktériumok lipideken - például foszfatidil-szerin - vagy nyálkaanyagon történő tenyésztésére és a foszfatidil-szerin jelenlétében fokozottan expresszáldó fehérjék kinyerésére. Az említett szabadalom azonban nem tartalmaz vagy javasol fokozott virulenciájú vagy antigén tulajdonságú bélbaktériumok előállítására szolgáló, jelen találmány szerinti módszereket.

Sok bélpatógén - például a *Campylobacter* és a *Shigella* - ellen nincs még oltóanyag, és a járványtannak fontos célja e betegségek elleni vakcina kidolgozása. A shigellózis az egész földre kiterjedő endémiás betegség, és a fejlődő államokban az évente 5 millió gyermekhalál 10 %-át a hasmenés okozza. A *Campylobacter*ről ismert - noha csak mostanában azonosították, mint bélpatógént -, hogy úgy a fejlett, mint a fejletlen államokban a hasmenéses betegségek fő oka. Évente 400-500 millió

Campylobacter által okozott hasmenéses megbetegedés fordul elő, az Egyesült Államokban 2 millió felett van az esetek száma.

A shigellózis annak következménye, hogy a baktérium behatol a vastagbél nyálkahártyájába. A behatolás egy plazmid jelenlétével kapcsolatos, ami megtalálható valamennyi invazív izolátumban [Sansonetti és munkatársai, Infect. Immun., 35:852-860 (1982)]. A plazmid egy fragmense tartalmazza az inváziós plazmid antigén (Ipa) géneket, az Ipa A, B, C és D géneket. Az Ipa A, C és D fehérjék alapvető szerepet játszanak a behatolási folyamatokban [Baudry és munkatársai, J. Gen. Microbiol., 133:3403-3413 (1987)].

Az Ipa fehérjék logikusan vakcina jelölteknek számíthatnak, bár védőhatásuk még tökéletesen nem megállapított. Az Ipa B és Ipa C fehérjék immundomináns proteinek [Hale és munkatársai, Infect. Immun., 50:620-629 (1985)]. A 62 kDa nagyságú Ipa B fehérje (az invazin, ami megkezdí a sejtbe való belépést, és közreműködik a membránhoz kötött fagocita vakuolom lízisében) [High és munkatársai, EMBO J., 11:1991-1999 (1992)] nagyon konzervatív fehérje a Shigella fajokban. Az alultáplált gyermekeknél - akiknél nincs lényeges mennyiségű antitest a nyálkahártyában a Shigella Ipa-val szemben - megfigyelt elhúzódó megbetegedés arra utal, hogy az Ipa-val szembeni nyálkahártya antitest megakadályozhatja a fertőzés elterjedését és súlyosbodását.

Noha számos vakcinajelöltet kipróbáltak már a Shigellával szemben emberben és állatban, sikereset még nem találtak. Az Ipa fehérjék virulenciában játszott potenciális jelentőségük ellenére, a shigellózis ellen kifejlesztett legtöbb eddigi vakcinajelölt a lipopoliszacharid antigéne alapult, mely a szérumtí-

pus-specifikus determinánsokat hordozza. Ugyancsak kifejlesztettek egy parenterálisan beadott poliszacharid-fehérje konjugált vakcinát, de állatoknál ez még nem mutatott lényeges védelmet [Robbins és munkatársai, Rev. Inf. Dis., 13:S362-365 (1991)]. Egy hasonló módon bevitt riboszómális vakcina nyálkahártya immunitást idéz elő, de védőhatása még bizonyításra vár [Levenson és munkatársai, Arch. Allergy Appl. Immunol., 87:25-31 (1983)].

A *Campylobacter* fertőzés patogenezeise nem annyira jólismert, mint *Shigella* fertőzéseké in vitro vizsgált sejtbehatolási kísérletek [Konkel és munkatársai, J. Infect. Dis., 168:948-954 (1993)], és a hisztopatológiai vizsgálatok [Russel és munkatársai, J. Infect. Dis., 168:210-215 (1993)] arra vallanak, hogy a vastagbélben történő behatolás szintén jelentős. Ez a megállapítás összhangban van azzal a megfigyeléssel, hogy a *Campylobacter* okozta hasmenés lehet súlyos, és kapcsolatban lehet a székletben megjelenő vérrel. Ezek az aktivitások kapcsolatban lehetnek az immundomináns 62 kDa nagyságú flagellin fehérjével. Egy jelenlegi beszámoló azt jelzi, hogy a flagellumok jelenléte lényeges a *Campylobacter* számára, hogy átjusson a polarizált epithelsejtek egysejtes rétegek [Grant és munkatársai, Infect. Immun., 61:1764-1771 (1993)].

A védettségben szereplő specifikus *Campylobacter* antigéneket még nem határozták meg, azonban alacsony molekulásúlyú (28-31 kDa) fehérjékről vagy PEB fehérjékről és az immundomináns flagellum-fehérjéről feltételezik, hogy ilyen vonatkozásban reménykeltőek lehetnek [Pavlovskis és munkatársai, Infect. Immun., 59:2259-2264 (1992); Blaser és Gotschilch, J. Biol. Chem., 265:14529-14535 (1990)]. A flagellum-fehérje fontosságát jelzi a



bélben történő megtelepedésnél és a Lior alcsoportoknál tapasztalt törzsek közötti keresztvédelemben játszott szerepe [Pavlovskis és munkatársai, Infect. Immun., 59:2259-2264 (1992)]. Azonban a flagellum-fehérjén alapuló Campylobacter elleni oltóanyagnak lehet, hogy 8-10 klinikailag legfontosabb Lior szérumcsoportból származó flagellum-fehérje antigént kellene tartalmaznia.

A jelen találmány tárgya tehát, 1) olyan in vitro tenyésztési körülmények bélbaktériumok tenyésztésére vagy kezelésére, melyek optimálisan indukálják vagy fokozzák a behatolási aktivitást és/vagy a sejtfelszínre vonatkozó bizonyos jellegzetességek kialakulását; 2) a behatolóképeség és a sejtfelszínre vonatkozó jellegzetességek megváltoztatása, összefüggésben az antigén profilban bekövetkező változásokkal; 3) a nevezett mikroorganizmusok fokozott virulenciája kisállat modellekben; és 4) a fokozott behatolóképeségű vagy megváltozott sejtfelszíni jellegzetességekkel rendelkező mikroorganizmusokkal szembeni vakcina, ami sokkal hatásosabb az élő mikroorganizmusok in vitro és in vivo semlegesítésében, mint a szokásosan növesztett baktériumokkal szemben létrejövő antiszérum. A találmány eleget tesz ezeknek és más céloknak.

A fenti referenciák egyike sem tartalmaz kitanítást vagy ajánlást a jelen találmány in vitro módszereire, sem a jelen találmány szerinti, fokozott antigénaktivitású bélbaktériumokat tartalmazó vakcinákra.

A találmány meghatározott tenyésztési körülményeket és a bélbaktériumok tápközegéhez adandó komponenseket nyújt azzal a céllal, hogy indukálja vagy fokozza a virulenciafaktorok és más

antigének megjelenését. Előnyösen az ilyen antigének immunizálók. Még előnyösebben az ilyen immunizáló antigének korrelációban vannak a virulencia mutatókkal.

A bélbaktériumokat olyan körülmények között és olyan komponensek jelenlétében tenyésztjük, melyek szimulálnak bizonyos in vivo állapotokat, melyeknek a mikroorganizmusok a természetes viszonyok között ki vannak téve. A jelen találmány módszereivel fokozott antigénaktivitású bélbaktériumok állíthatók elő, melyek az alábbi fenotípusos változásokat mutatják: megnövekedett sejtenkénti összfehérje, új vagy megnövekedett mennyiségű egyedi fehérjék, megnövekedett mennyiségű vagy megváltozott felületi szénhidrátok, megváltozott felületi lipopoliszacharidok, megnövekedett adhézív képesség, megnövekedett behatolási képesség és/vagy megnövekedett sejten belüli szaporodás. Emellett a jelen találmány szerinti módszerek alkalmasak ipari célt szolgáló, megnövelt méretű fermentációk elvégzésére.

A fokozott antigenicitású nevezett bélbaktériumokat felhasználhatjuk inaktivált teljes sejteket vagy töredékeket tartalmazó védő vakcinák előállítására, alkalmazhatjuk diagnosztikai célra, például antitest-termelődéssel vizsgálatára vagy kórokozó bélbaktériumok kimutatására vagy felhasználhatjuk antibiotikumok termelésére. Továbbá a jelen találmány szerinti fokozott aktivitású baktériumokkal indukált antitestek felhasználhatók, mint passzív vakcinák.

Ezek szerint a jelen találmány egyik tárgya eljárás fokozott antigénaktivitású *Campylobacter* sp., *Yersinia* sp., *Helicobacter* sp., *Gastrospirillum* sp., *Bacteroides* sp., *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp., *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Aeromonas* sp.,

Vibrio sp., Clostridium sp., Enterococcus sp. vagy Escherichia coli bélbaktérium előállítására, ami abból áll, hogy a bélbaktériumot in vitro az alábbi körülmények között növesztjük: (a) 0,05-3 % epe vagy 0,025-0,6 % egy vagy több epesav vagy sója jelenlétében 30°C vagy 42°C közötti hőmérsékleten növesztünk, amíg a növekedési fázis eléri a korai log fázist, a korai log fázis és a stacioner fázis közötti fázist vagy a stacioner fázist, levegőn vagy mikroaerofill körülmények között, ami lehet például 5-20 % szén-dioxid és 80-95 % levegő; 5-20 % szén-dioxid és 80-95 % nitrogéngáz vagy 5-10 % oxigéngáz, 10-20 % szén-dioxid és 70-85 % nitrogéngáz összetételű gázelegy; adott esetben kétértékű kation-kelátképző jelenlétében, ami lehet például - bár nemcsak ezekre korlátozva - 0-100 μM , előnyösen 25 μM BAPTA/AM, 0-10 μM EGTA vagy 0-100 μM EGTA/AM; vagy (b) azonos az (a) pontban ismertetett körülményekkel, eltekintve a jelenlevő kétértékű kation-kelátképzőtől, ami ez esetben 1,0-100 μM , előnyösen 25 μM BAPTA/AM, 0,5-10 mM EGTA vagy 1-100 μM EGTA/AM, és nincs a közegben epe, epesav vagy sója.

A találmány szerinti bármelyik egyedi epesavnak vagy sójának a koncentrációja 0,025-0,6 %, előnyösen 0,05-0,5 %, még előnyösebben 0,05-0,2 %, de legelőnyösebb, ha 0,05-0,1 %. Előnyös, ha a nevezett epesav vagy sója a deoxikolát vagy a glükokolát.

A találmány további tárgya a Campylobacter sp., Yersinia sp., Helicobacter sp., Gastrospirillum sp., Bacteroides sp., Klebsiella sp., Enterobacter sp., Salmonella sp., Shigella sp., Aeromonas sp., Vibrio sp., Clostridium sp., Enterococcus sp. és Escherichia coli bélbaktérium, mely nevezett bélbaktériumokat in

vitro olyan körülmények között növesztjük, melyek fokozzák az antigenecitási tulajdonságaikat; a nevezett körülmények: (a) 0,05-3 % epe vagy 0,025-0,6 % egy vagy több epesav vagy sója jelenlétében 32-42°C hőmérsékleten növesztünk, amíg a növekedési fázis el nem éri a korai log fázist, a korai log fázis és a stationer fázis közötti fázist vagy a stationer fázist, levegőn vagy mikroaerofill körülmények között, ami lehet 5-20 % szén-dioxid és 80-95 % levegő vagy 5-20 % szén-dioxid és 80-85 % nitrogén vagy 5-10 oxigén, 10-20 % szén-dioxid és 70-85 % nitrogén összetételű gázelegy, adott esetben kétértékű kation-kelátképző jelenlétében, ami lehet - noha nemcsak az említettekre korlátozva - 0-100 μM , előnyösen 25 μM BAPTA/AM, 0-10 mM EGTA vagy 0-100 μM EGTA/AM; vagy (b) azonos az (a) pontban ismertetett körülményekkel, eltekintve a jelenlevő kétértékű kation-kelátképzőtől, ami ez esetben 1,0-100 μM , előnyösen 25 μM BAPTA/AM, 0,5-10 mM EGTA vagy 1,0-100 μM EGTA/AM, és nincs a közegben epe, epesav vagy sója.

A találmány egy további tárgya vakcina, ami *Campylobacter* sp., *Yersinia* sp., *Helicobacter* sp., *Gastrospirillum* sp., *Bacteroides* sp., *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp., *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Aeromonas* sp., *Vibrio* sp., *Clostridium* sp., *Enterococcus* sp. vagy *Escherichia coli* teljes bélbaktériumot vagy komponensét vagy fokozott antigénaktivitású immunizáló fragmensét vagy származékát tartalmazza, adott esetben gyógyászati szempontból alkalmazható vívőanyag vagy hígító kíséretében.

Előnyös az a vakcina, mely inaktivált, fokozott antigén-

aktivitású, teljes bélbaktériumokat tartalmaz. A találmány egy további tárgyát képezi az a vakcina, amely hatásfokozó anyagot is tartalmaz.

A találmány egy további tárgyát képezik azok az antitestek (ideértve - bár nem korlátozva csak ezekre - az antiszérumot, a tisztított IgG vagy IgA antitesteket, a Fab fragmenst, stb.), melyek képesek specifikusan kötődni a jelen találmányban felsorolt bélbaktériumok legalább egy antigén-determinánsához. Az ilyen poliklonális vagy monoklonális antitestek felhasználhatók immunvizsgálati reagensekként a bélbaktériumok élőlényből vagy az élőlényből nyert biológiai mintából történő kimutatásánál. A jelen találmány szerinti poliklonális vagy monoklonális antitestek bélbaktériumok okozta fertőzések vagy betegségek ellen is alkalmazhatók, mint passzív vakcinák.

A találmány egy további tárgya in vitro eljárás potenciális antimikrobiális hatóanyagok vizsgálatára, ami abból áll, hogy a fokozott antigénaktivitású *Campylobacter* sp., *Yersinia* sp., *Helicobacter* sp., *Gastrosphilum* sp., *Bacteroides* sp., *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp., *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Aeromonas* sp., *Vibrio* sp., *Clostridium* sp., *Enterococcus* sp. vagy *Escherichia coli* bélbaktériumot érintkezésbe hozunk a kérdéses vizsgálandó anyaggal és meghatározzuk a baktericid vagy bakteriosztatikus hatását.

A találmány egy további tárgya in vitro módszer gazdaszervezet antitest termelésének detektálására vagy a gazdaszervezetben vagy belőle származó mintákban lévő bélbaktériumok kimutatására, ami abból áll, hogy a gazdából nyert biológiai mintát érintkezésbe hozzuk a találmány szerinti, fokozott antigénaktivitású

Campylobacter sp., Yersinia sp., Helicobacter sp., Gastrospirillum sp., Bacteroides sp., Klebsiella sp., Enterobacter sp., Salmonella sp., Shigella sp., Aeromonas sp., Vibrio sp., Clostridium sp., Enterococcus sp. vagy Escherichia coli bélbaktériummal, ezek antigénjeivel vagy azokkal szembeni antitestekkel és vizsgáljuk az antitest/antigén kölcsönhatást.

A találmány tárgya egy diagnosztikai készlet gazdaszervezetek bélbaktériumok elleni antitest termelésének vagy bélbaktériumoknak kimutatására, ahol a készlet fokozott antigéngaktivitású Campylobacter sp., Yersinia sp., Helicobacter sp., Gastrospirillum sp., Bacteroides sp., Klebsiella sp., Enterobacter sp., Salmonella sp., Aeromonas sp., Vibrio sp., Clostridium sp., Enterococcus sp. vagy Escherichia coli baktériumot vagy adott baktériummal szembeni antitestet és minden más lényeges alkotórészt tartalmaz.

A találmány különböző szempontjaiból előnyös bélbaktérium a Campylobacter jejuni, Campylobacter coli, Yersinia enterocolitica, Yersinia pestis, Yersinia pseudotuberculosis, Escherichia coli, Shigella flexneri, Shigella sonnei, Shigella dysenteriae, Shigella boydii, Helicobacter pylori, Helicobacter felis, Gastrospirillum hominus, Vibrio cholerae, Vibrio parahaemolyticus, Vibrio vulnificus, Bacteroides fragilis, Clostridium difficile, Salmonella typhimurium, Salmonella typhi, Salmonella pullorum, Salmonella choleraesuis, Salmonella enteritidis, Klebsiella pneumoniae, Enterobacter cloacae, és Enterococcus faecalis.

Az Escherichia coli törzsek közül előnyösek - de nem kizárólagosan - az enterotoxikus, entero-haemorrhagiás, entero-

-invazív, entero-pathogen vagy más törzsek.

A jelen találmány részben azon a meglepő felfedezésen alapszik, hogy a találmány szerinti fokozott antigénaktivitású bélbaktérium olyan immunválaszt vált ki, mely az immunválaszt kiváltó baktérium törzseivel vagy szerotípusaival szemben szélesebb spektrumú immunológiai keresztvédelmet nyújt, mint a szokásos körülmények között tenyésztett ugyanazon bélbaktériummal történő indukció. Legalább egy esetben, a találmány szerinti fokozott antigén aktivitású bélbaktérium által kiváltott immunválasz keresztvédelme eltérő fajú bélbaktériummal szemben is meg nyilvánul.

Az ábrák rövid leírása

1A, 1B és 1C ábra: a C.jejuni 81-76 törzs felületi extraktum hidrolizátumában lévő monoszacharidok HPLC kromatogramjai. 1A ábra - standardok: fukóz „Fuc”, N-acetil-galaktózamin „GalNac”, N-acetil-glükózamin „GlcNac”, galaktóz „Gal”, glükóz „Glc”, mannóz „Man”. 1B ábra - a szokásosan növesztett baktérium („BHI”) felületi extraktumának kromatogramja. 1C ábra - a jelen találmány szerint növesztett baktérium („DOC”) felületi extraktumának kromatogramja.

2. ábra: a szokásos módon növesztett („BHI”), illetve a jelen találmány szerint növesztett (0,8 % Oxgall epesavak, „OX”, vagy 0,1 % deoxikolát jelenlétében, „DOC”) C. jejuni 81-176 törzs teljes sejtjeinek (1., 2. és 3. oszlop) és felületi extraktumának (5. és 6. oszlop) nátrium-dodecil-szulfát/poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) szétválasztott fehérjeinek

képe.

3. ábra: „1” - a szokásos módon tenyésztett C.jejuni 81-176 teljes sejtjében; „2” - a jelen találmány szerint 0,8 % Ovgall epesavak vagy „3” - 0,1 % deoxikolát jelenlétében tenyésztett C.jejuni 81-176 teljes sejtjében; „4” - a hagyományos módon tenyésztett C.jejuni 81-176 felületi extraktumában; és „5” - a jelen találmány szerint 0,1 % deoxikolát jelenlétében tenyésztett C.jejuni 81-176 felületi extraktumában lévő, a C.jejuni 81-176 teljes sejttel fertőzött vadászmenyeit IgA-t tartalmazó nyálkájának komponenseihez kötődő fehérjék összehasonlító Western Blot analízise.

4. ábra: „3” - a jelen találmány szerint tenyésztett C.jejuni 81-176 teljes sejtjéből; „2” - a szokásos módon tenyésztett C.jejuni 81-176 teljes sejtjéből; és „3” - a jelen találmány szerint fermentorban növesztett C.jejuni 81-176 teljes sejtjéből származó, a flagellire specifikus monoklonális 72c antitesthez kötődő fehérjék összehasonlító Western Blot analízise.

5. ábra: S.flexneri 2457T teljes sejt lipopoliszacharidjainak SDS-PAGE képe. „1” - S.flexneri 2457T a szokásos módon, illetve „2” - a jelen találmány szerint 0,1 deoxikolát jelenlétében növesztve.

6. ábra: a jelen találmány szerint növesztett C.jejuni meg-növekedett immunológiai keresztaktivitása. Az antitestek indukálására a szokásos módon növesztett vagy a találmány szerint - például az 5. példában leírt körülmények között - növesztett C.jejuni 81-176 sejteket használtuk. Az antitestek két típusának (például BHI növesztett C.jejuni 81-176 anti-C és DOC növesztett C.jejuni 81-176 anti-C) agglutinációs aktivitását különféle

C.jejuni típusokkal szemben mutatjuk be (részletesebben lásd a 32. példában).

7A, 7B és 7C ábra: inaktivált C.jejuni 81-176 teljes sejteket tartalmazó vakcina hatásossága élő C.jejuni 81-176 sejtekkel szemben orron keresztül megfertőzött egereknél. Az egereket az alábbi készítményekkel oltottuk be: foszfátpufferes sóoldat (PBS, folytonos vonal); LT adjuvánst tartalmazó PBS (Adjuvans, szaggatott vonal); az 5. példában leírtak szerint növesztett és összegyűjtött, formalinnal inaktivált C.jejuni 81-176 teljes sejtek adjuváns nélkül (CWC, folytonos vonal üres körrel); és CWC LT adjuvánssal CWC + adjuváns, folytonos vonal telt körrel). A vakcina hatékonyságát intesztinális megtelepedés módszerével állapítottuk meg. 7A - a védettség mértéke azoknál az állatoknál, melyeknél a vakcinálás szájon át történt három dózissal, dózisonként 10^5 inaktivált baktériummal (felső ábra); 7B - a védettség mértéke azoknál az állatoknál, melyeknél a vakcinálás szájon át történt három dózissal, dózisonként 10^7 inaktivált baktériummal (középső ábra); 7C - a védettség mértéke azoknál az állatoknál, melyeknél a vakcinálás szájon át történt három dózissal, dózisonként 10^9 inaktivált baktériummal (alsó ábra) (részletesebben lásd a 34. példában leírtakat).

8A, 8B és 8C ábra: inaktivált C.jejuni 81-176 teljes sejteket tartalmazó vakcina hatásossága élő C.jejuni 81-176 baktériummal szemben szájon át megfertőzött egereknél. Az egereket a 7A, 7B és 7C ábránál leírt módon vakcináltuk. A vakcina hatásosságát az intesztinális megtelepedés módszerével állapítottuk meg; 8A - a védettség mértéke dózisonként 10^5 inaktivált baktériumot tartalmazó, három orális dózis esetében (felső ábra); 8B

- a védettség mértéke dózisonként 10^7 inaktivált baktériumot tartalmazó, három orális dózis esetében (középső ábra); 8C - a védettség mértéke dózisonként 10^9 inaktivált baktériumot tartalmazó, három orális dózis esetében (alsó ábra) (részletesebben lásd a 34. példában).

9. ábra: a tenyészet növekedési fázisának hatása a *Shigella flexneri* 2457T sejtek behatolási képességére. A *Shigella flexneri* 2457T sejteket a szokásos módon (BHI) vagy a jelen találmány szerinti, például a 9. példában leírt módon növesztettük, és a sejteket a korai log fázisban gyűjtöttük össze (DOC-EL), vagy a növesztés a 9. példában leírtak szerint történt, de az összegyűjtés előtt hagytuk, hogy a tenyészet érje el a késői log fázist (DOC-LL). Az ábrán ezeknek a különböző sejt-preparátumoknak a behatolókéességét mutatjuk be (részletesebben lásd a 35. példát).

10. ábra: a jelen találmány eljárása szerint tenyésztett *Shigella* sejtek megnövekedett behatolókéességének a bemutatása. A *Shigella sonnei* és az *S.dysenteriae* 3818 sejteket a szokásos módon (BHI) vagy a jelen találmány szerint, a 9. példában bemutatott módon növesztettük. A *Shigella* sejtek ezen különböző preparátumainak behatolókéességét INT-407 sejtekkel szemben mutatjuk be (részletesebben lásd a 35. példát).

11. ábra: a jelen találmány szerint növesztett *Shigella* megnövekedett immunológiai keresztreaktivitásának bemutatása. Az antitestek indukálására a jelen találmány szerinti, a 9. példában bemutatott módon növesztett *S.flexneri* 2457T sejteket használtuk. Bemutatjuk az indukált antitestek agglutinációs aktivitását a szokásos módon (BHI) és a jelen példa szerint (9. példa)

növesztett *S.flexneri*, *S.sonnei*, *S.dysenteriae* és az *S.bodyii* baktériumokkal szemben (részletesebben lásd a 36. példát).

12. ábra: az epekoncentráció és a növekedési fázis hatása a *Helicobacter pylori* NB3-2 sejtek megtapadási képességére. A *H.Pylori* NB3-2 sejteket 0 %, 0,025 %, 0,05 % vagy 0,1 % epét tartalmazó tápközegben tenyésztettük, és a sejteket a beoltás utáni 8., 10., 12. és 18. órában gyűjtöttük össze. Bemutatjuk ezen különböző *H.pylori* NB3-2 preparátumok INT-407 sejtekkel szembeni behatolókéességét (részletesebben lásd a 38. példát).

13. ábra: az epekoncentráció és a növekedési fázis hatása a *Helicobacter pylori* G1-4 sejtek megtapadási képességére. A *H.pylori* G1-4 sejteket 0 %, 0,1 % vagy 0,2 % epét tartalmazó tápközegben növesztettük és a sejteket a beoltás utáni 6., 8., 10., 12., 14. és 16. napon gyűjtöttük össze. Bemutatjuk ezen különböző *H.pylori* G1-4 sejtek INT-407 sejtekkel szembeni behatolókéességét (részletesebben lásd a 38. ábrát).

A jelen találmány a bélbaktériumok in vitro tenyésztésének olyan módjával foglalkozik, ahol a bizonyos körülményeket bizonyos komponensekkel úgy kombinálunk össze, hogy ezzel indukáljuk vagy fokozzuk az antigének és/vagy a virulencia faktorok expresszálasát.

Az itt és az igénypontokban használt „bélbaktérium” („enterális”) kifejezésen értjük azokat a baktériumokat, melyek normális körülmények között egy élőlény gasztrointesztinális rendszerének bármelyik részében található vagy bármelyik olyan baktériumot, mely egy élőlény gasztrointesztinális rendszerének bármelyik részében fertőzést okoz. A bélbaktériumok közé gram pozitív és gram negatív baktériumok is tartoznak.

Az itt és az igénypontokban használt „komponensek” és „körülmények” kifejezésen értjük azt a számos tényezőt, mellyel természetes in vivo körülmények között a bélbaktérium kapcsolatba kerül és további faktorokat. Ilyen komponensek és körülmények - bár nemcsak ezekre korlátozva -: az epe, epesavak és sóik, biológiai előanyagaik, például koleszterin, pH, mikroaerophil körülmények ozmotikus körülmények és a baktériumok kívánt növekedési fázisában történő összegyűjtése.

Az itt és az igénypontokban használt „antigén” és a vele kapcsolatos „antigeniális” kifejezés olyan antigéneket és antigeniális jellegzetességet jelent, mint a sejtek morgológiaiájában vagy mozgásában résztvevő makromolekulák, a fehérjék; közelebbről a felületi fehérjék, lipopoliszacharidok és szénhidrátok - noha a kifejezés nemcsak a felsoroltakra vonatkozik. A nevezett antigének előnyösen immunizálhatók (immunogének).

Az itt és az igénypontokban használt „immunizáló” („immunogén”) kifejezés olyan képességre utal, mely egy élőlényben antitest termelődést indukál, miután a nevezett élőlényt a jelen találmány szerint növesztett teljes baktériumot vagy a teljes baktérium fragmensét tartalmazó készítmény hatásának tesszük ki.

Az itt és az igénypontokban használt „fokozott antigenitású”, „fokozott antigenicitású” kifejezés a jelen találmány szerint növesztett bélbaktérium antigenitási állapotára utal. Ezek a baktériumok bizonyos immunogén antigének magasabb szintjével vagy új immunogén antigénekkal rendelkeznek a szokásos körülmények között növesztett baktériumokhoz képest.

Az itt és az igénypontokban használt „szokásos” kifejezés olyasmire utal, ami a technika mai állása szerint ismert.

Az itt és az igénypontokban használt „mikroaerofill körülmények” kifejezés anaerob körülményeket vagy megemelt szén-dioxid koncentrációt jelent, például 5-20 % CO₂ és 80-85 % levegő; 5-20 % CO₂ és 80-95 % N₂; vagy 5-10 % O₂, 10-20 % CO₂ és 75-85 % N₂ összetételű légteret.

Az itt és az igénypontokban használt „virulencia” kifejezés a bélbaktérium azon tényezőire vonatkozik, melyek a megtapadási képességgel és/vagy a behatolással és/vagy a gazdaszervezetekben való túléléssel és/vagy a patogén állapot kiváltásával kapcsolatosak.

Az itt és az igénypontokban használt „immunológiai keresztvédelem” kifejezés egy baktérium törzs vagy szérumtípus - legyen az teljes sejt vagy más - olyan immunválaszt kiváltó képességre utal, ami ugyanazt a gazdaszervezetet részben vagy teljesen megvédi ugyanezen baktérium genus más törzseivel, szérumtípusával vagy speciesével szemben is.

Az itt és az igénypontokban használt „immunológiai keresztreaktivitás” kifejezés egy baktérium törzs vagy szérumtípus - legyen az teljes sejt vagy más - olyan humorális immunválaszt (például antitestek) kiváltó képességét jelenti, mely immunválasz keresztreakcióba lép (például antitest megkötés) ugyanezen baktérium genus más törzsével, szérumtípusával vagy speciesével szemben is. Az immunológiai keresztreaktivitás indikatív a baktérium immunológiai keresztvédelmére vonatkozóan és fordítva.

Az itt és az igénypontokban használt „gazda” kifejezés in vivo esetben egy élőlényt, in vitro esetben egy élőlény sejtte-

nyészetét jelenti. Az itt és az igénypontokban szereplő „élőlény” kifejezésbe beletartozik valamennyi melegvérű teremtmény, mint amilyenek az emlősök és a madarak (például csirke, pulyka, kacska, stb.), noha nem korlátozódik a kifejezés csak az említettekre.

A találmány szerint a vakcina fokozott antigén aktivitású bélbaktériumot vagy annak immunogén fragmensét vagy származékát tartalmazza. A bélbaktérium lehet élő vagy inaktivált. A vakcina továbbá adjuvánsokat is tartalmazhat, például - bár nemcsak ezekre korlátozva - timsót, olaj/víz emulziót, entero-toxigén E.coliból származó hőlabilis toxint (LT), ennek nem toxigén formáit (például mLT) és/vagy alegységeit, Bacille Calmette-Guerin (BCG) vagy Freund-féle adjuvánst tartalmazhat, továbbá az oltóanyag gyógyászati szempontból alkalmazható vivőanyagot, ideértve - de nemcsak ezekre korlátozva - a sóoldatot, dextróz vagy más komponens vizes oldatát. A gyógyászati szempontból alkalmazható vivőanyagokat a Remingtons' s Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company) írja le. Az itt és az igénypontokban használt „vakcina” („oltóanyag”) - beleértve a „passzív vakcinákat” is - kifejezés olyan antitesteket tartalmazó készítményt jelent, amelyek specifikusan kötődnek azokhoz a kórokozókhoz, melyek fertőzések és általuk okozott betegségek ellen védelmet kívánunk nyújtani.

Az itt és az igénypontokban használt „inaktivált baktérium” kifejezés olyan bélbaktériumokra utal, melyek képtelenek a fertőzésre és/vagy a megtelepedésre, a fogalomba beletartoznak a legyengített vagy elölt baktériumok. A legyengített baktériumok szaporodhatnak, de fertőzést vagy betegséget nem tudnak okozni.

A nevezett baktériumok inaktiválására bármelyik, a szakterületen ismert módszert felhasználhatjuk, inaktiválhatjuk a baktériumot kémiaiailag, például formalinos fixálással vagy fizikai úton, például hővel, ultrahanggal vagy besugárzással, mely kezelések a baktériumokat képtelenné teszik a szaporodásra és/vagy fertőzésre és/vagy betegségek előidézésére.

A vakcinák hatásos mennyiségét kell a szervezetbe juttatni, a „hatásos mennyiség” a bélbaktériumoknak vagy immunogén fragmenseinek vagy származékainak olyan mennyiségét jelenti, mely a szervezetben immunválaszt képes létrehozni. Az ehhez szükséges mennyiség változóan függ az alkalmazott baktérium, fragmens vagy származék antigénaktivitásától, a védendő lény fajától és tömegétől, de mindez ismert módon megállapítható. Előnyös - bár ez nem jelenti a találmány korlátozását -, ha a vakcina hatásos mennyiségét úgy választjuk meg, hogy az antibakteriális antitest tittere a vakcinálás előtt értéknek legalább kétszeresére nőjön. Továbbá sem korlátozva a találmányt, előnyös a gazdaszervezetbe 10^7 - 10^{11} , még előnyösebben 10^8 - 10^{10} baktériumot bejuttatni. Előnyösek azok a vakcinák, melyek inaktivált teljes baktériumokat tartalmaznak.

A passzív vakcinákkal kapcsolatban a „hatásos mennyiség” kifejezés az antitesteknek azt a mennyiségét jelenti, ami képes enyhíteni egy bakteriális fertőzést vagy betegséget vagy megelőzni azt.

A szükséges mennyiség változóan függ az antitest típusától, az antitest tittertől, a védendő szervezet fajától és tömegétől. A mennyiséget ismert módszerekkel meg tudjuk állapítani.

A találmány szerinti vakcinát ismert módszerekkel alkalmaz-

hatjuk lokálisan és/vagy az egész szervezetre kiterjedően, például beadhatjuk intravénásan, szubkután, intramuszkulárisan, intravaginálisan, intraperitoneálisan, orron vagy szájon keresztül vagy más nyálkahártyán át, stb.

A vakcinát bevihetjük megfelelő, nem-toxikus, gyógyászati szempontból alkalmazható vivőanyagokkal, mikrokapszulákban és/vagy elnyújtott felszabadulást biztosító eszközzel.

Kívánatos lehet a vakcinát időközönkre elosztva beadni, hogy fenntartsuk a kívánt antitest-szintet.

A találmány szerinti vakcinát alkalmazhatjuk más baktericid vagy bakteriosztatikus módszerrel együtt.

A találmány szerinti antitesteket bármelyik, a szakterületen jól ismert módszerrel megkaphatjuk, ilyen módszereket ismertet például az „Antibodies-A Laboratory Manual (E. Harlow, D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) kézikönyv. Ez általában úgy történik, hogy egy állatot (sok gerinces felhasználható erre, leginkább egeret, patkányt, tengerimalacot, hörcsögöt és nyulat alkalmaznak) a jelen találmány szerinti fokozott antigén-aktivitású bélbaktérium teljes sejtjeivel, fragmensével vagy származékával immunizálunk egy adjuváns vagy bármilyen ágens jelenlétében vagy távollétében, mely ágens fokozza az immunizáló hatékonyságot és szabályos intervallumokban erősítést ad. Az állat szérumában a szokásos módon megvizsgáljuk a kívánt antitest jelenlétét. A nevezett állat szérumát vagy vérért felhasználhatjuk a poliklonális antitestek forrásaként.

Monoklonális antitestek előállításánál az állatokat a fentiek szerint kezeljük. Amikor elfogadható antitest-titert észlelünk, az állatot kíméletesen elöljük és a lépet aszeptikus kö-

rülmények között eltávolítjuk. A lépsejteket specifikusan kiválasztott, immortális mieloma sejtvonallal keverjük össze, a sejtkeveréket egy olyan ágensnek, általában polietilén-glikolnak vagy hasonlónak tesszük ki, ami elősegíti a sejtek fúzióját. Ezek között a körülmények között a sejtek összeolvadása véletlenszerű kiválasztással történik, és a keletkezett termék a fuzionált és a nem-fuzionált sejtek keverékéből áll. A fuzionáláshoz használ mieloma sejtvonalat specifikusan úgy választjuk meg - a szelekciós közeg felhasználásával, mint amilyen például a hipoxantint, aminopterint és timidint tartalmazó „HAT” -, hogy a fúziós keverék tenyészetéből csak azok a sejtek maradnak meg, melyek az immunizált donorból származó sejtek és a mieloma sejtek hibridjei. A fúzió után a sejteket kihígítjuk és a szelektív táptalajon tenyésztjük. A tenyészközeget szűrővizsgálatnak vetjük alá abból a szempontból, hogy tartalmazza-e a kiválasztott antigénre specifikus antitestet. A kívánt antitestet tartalmazó tenyészeteket hígítási módszerrel klónozzuk, amíg egysejt-tenyészethez nem jutunk. A jelen találmány szerinti antitestek passzív vakcinaként alkalmazhatók bélbaktériumok okozta fertőzések és betegségek ellen.

A gazdában lévő antitesek vagy nevezett baktériumok kimutatására használt módszerek közé tartoznak az immunológiai kimutatáson alapuló eljárások, melyek ismertek a szakterületen,. Ilyen eljárás lehet a radioimmunológiai vizsgálat (RIA), az enzimkötött immunszorbens vizsgálat (ELISA), a fluoreszcens immunológiai vizsgálat és a fluoreszcenciás polarizációs immunológiai vizsgálat (FPIA), bár a módszerek nem korlátozódnak csak a felsoroltakra.

A találmány egy másik kivitelezési módját jelentik a diagnosztikai készletek, melyek a jelen találmány szerinti kívánt immunológiai vizsgálat elvégzéséhez szükséges valamennyi lényeges reagenst tartalmazzák. A diagnosztikai készlet kereskedelmi csomagolásban lehet, ami a szükséges reagenseket tartalmazó egy vagy több tartóedényt jelent. Az ilyen készlet a jelen találmány szerinti bélbaktériumot és/vagy a jelen találmány szerinti monoklonális vagy poliklonális antitestet tartalmazza néhány szokásos komponenssel együtt. A szokásos komponensek nyilvánvalóak a szakemberek előtt, és számos közleményben szerepelnek, például az Antibodies A Laboratory Manual (E. Harlow, D. Lane; Cold. Spring Harbor Laboratory Press, 1989) kézikönyvben. A készletek a szokásos módon tartalmazhatnak például: mikrotitter lemezeket, a vizsgálati elegy kémhatását beállító puffereket (Tris, HEPES, stb), konjugált másod antitesteket, például peroxidáz konjugált egér anti-IgG-t (vagy bármilyen más anti-IgG-t abból az állatból, melyből az első antitest származik), stb. és más standard reagenseket.

A jelen találmány szerinti eljárás szerint a bélbaktériumokat megfelelő alap-táptalajon tenyésztjük, melyek tartalmazzák a nélkülözhetetlen alkotórészeket. Ilyen táptalaj például a kereskedelmi forgalomban lévő agy/szív kivonat (BHI), a Luria táptalaj (LB), birkavéres agar (SBA), a Brucella táptalaj, a Mueller-Hinton táptalaj, a marhahús kivonat, stb. Az alkalmazott körülmények - bár nem korlátozva csak ezekre -: 0,05-3 % epe, vagy 0,025-0,6 % egy vagy több epesav vagy sója vagy előanyaga, például koleszterin jelenlétében 30-42°C hőmérsékleten addig növesztjük a tenyészetet, amíg a növekedési fázis el nem éri a ko-

rai log fázist, a korai log és a stacioner fázis közötti állapotot vagy a stacioner fázist. A tenyésztést levegőn vagy mikroaerofill körülmények között végezzük, ami például 5-20 % CO₂ és 80-95 % levegő; 5-20 % CO₂ és 80-95 % N₂; vagy 5-10 % O₂, 10-20 % CO₂ és 70-85 % N₂ összetételű gázelegy. A tenyésztést adott esetben kétértékű kation-kelátképző jelenlétében végezzük, ami lehet - bár nemcsak a felsoroltakra korlátozva -: 0-100 µM, előnyösen 25 µM BAPTA/AM [2'-(etilén-dioxi)-dianilin-N,N,N',N'-tetraecetsav/acetoxi-metil-észter; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) 0-10 µM EGTA (etilén-bisz(oxi-etilén-nitrilo)-tetraecetsav; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), 0-100 µM EGTA/AM etilén-bisz(oxi-etilén-nitrilo)-tetraecetsav/acetoxi-metil-észter; Molecular Probes, Eugene, OR, USA). A fenti tenyésztési körülmények és komponensek megválasztásával fokozott antigénaktivitású bélbaktériumokat állítunk elő.

A találmány egy további megvalósítási módjánál a bélbaktériumokat az előzőekben ismertetett körülmények között növesztjük kétértékű kation-kelátképző jelenlétében - ami lehet például 1,0-100 µM, előnyösen 25 µM BAPTA/AM, 0,5-10 mM EGTA vagy 1,0-100 µM EGTA/AM - nem korlátozva csak a felsoroltakra -, de epe, epe-sav vagy sója nincs a tenyészközegben.

A jelen találmány által használt epe vagy epesav, illetve só, lehet bármilyen, a máj által kiválasztott és az epehólyagban természetes körülmények között összegyűjtött természetes epekomponens, illetve a szakterületen ismert szintetikus epesav, mint amilyen például az „Oxgall” (Difco Laboratories, Detroit, Michigan), szarvasmarha epe (Sigma Chemicals, St. Louis,

Missuori) vagy más, a kereskedelmi forgalomból beszerezhető készítmény, kolsav, deoxikolsav, taurokolsav vagy glikokolsav. Előnyös a deoxikolát (DOC), az in vivo a disztális vékonybélben és vastagbélben lévő, egy kevés bélbaktériumot tartalmazó kereskedelmi forgalomból beszerezhető epe. Ugyancsak előnyös a glikokolát (GC).

A találmány szerinti bélbaktérium tenyészetek, nevezetesen a *Campylobacter* sp., *Yersinia* sp., *Helicobacter* sp., *Gastrospirillum* sp., *Bacteroides* sp., *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp., *Salmonella* sp., *Aeromonas* sp., *Vibrio* sp., *Shigella* sp., *Clostridium* sp., *Enterococcus* sp. és *Escherichia coli* tenyészet fagyasztott állománya, a szokásos módon elkészíthető és a felhasználásig -80°C hőmérsékleten tárolható. Például a *Campylobacter jejuni* tárolt törzsanyag elkészíthető oly módon, hogy a mikroorganizmust 5 % fibrinmentes birka eritrocitákat (SBA) tartalmazó triptikáz-szója-agar táptalajon 20 órán át növesztjük 37°C hőmérsékleten és 5 % O_2 , 10 % CO_2 és 85 % N_2 összetételű gáztérben (mikroaerofill körülmények, „MC”). Az *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Helicobacter pylori* és *Shigella flexneri* tárolt törzsanyagának elkészítéséhez mikroorganizmusokat agy/szív kivonaton („BHI”) tenyésztjük. A baktériumokat a lefagyasztáshoz bármelyik ismert módszerrel összegyűjthetjük, például a letörölt tenyészet 30 % glicerint tartalmazó BHI-ben való szuszpendálásával. Az analitikai vizsgálatokhoz vagy a termelő fermentálásokhoz a tenyészeteket bármelyik általánosan ismert módszerrel előállíthatjuk, például a mikroorganizmust 1,5 % agart tartalmazó BHI táptalajon növesztjük 37°C hőmérsékleten és MC vagy légköri körülmények között, majd egy

különálló telepet átviszünk a tápközegbe és a jelen találmányban leírtak szerint tenyésztjük. A baktériumsejteket bármelyik ismert módszerrel, például centrifugálással, összegyűjthetjük.

Előnyös kivitelezési módnál a fokozott antigénaktivitású *Campylobacter* sp-t, előnyösen a jejuni vagy coli fajokat, legelőnyösebben a jejuni 81-176 törzset 0,1 % DOC-t vagy 0,8 % epét tartalmazó alaptáptalajon, előnyösen BHI tápközegben tenyésztjük 37°C hőmérsékleten, 10-20 % CO₂-t és 80-90 % levegőt tartalmazó gáztérben. Amikor a növekedési faktor eléri a késői log fázis és a stacioner fázis közötti állapotot, általában 20 órával a beoltás után, a baktériumsejteket összegyűjtjük.

Egy másik előnyös eljárásnál a fokozott antigénaktivitású *Shigella* sp.-t előnyösen flexneri vagy dysenteriae fajokat, legelőnyösebben a flexneri 3457T törzset alaptáptalajon, előnyösen BHI táptalajon, melyet 0,1 % DOC-cal vagy 0,8 % epével kiegészítettünk, növesztjük 37°C hőmérsékleten. A sejteket a tenyészet korai log fázisában, általában a 30 perccel a beoltás után összegyűjtjük. Az említett beoltás korai és közép log fázis közötti állapotban lévő tenyészettel történik.

Egy másik előnyös eljárásnál a fokozott antigénaktivitású *Helicobacter pylori*t, előnyösen az ATCC 495003, NB3-2 vagy G1-4 törzset alaptáptalajon, előnyösen BHI tápközegben tenyésztjük 0,05-0,2 % epe vagy 0,05 % glikolát (GC) jelenlétében 37°C hőmérsékleten, 5-20 % CO₂ és 80-95 % levegő vagy 10 % CO₂, 5 % O₂ és 85 % N₂ összetételű gáztérben. Amikor a tenyészet eléri a log fázist vagy a stacioner fázist, a sejteket összegyűjtjük. Előnyösebb, ha a tenyészet a log fázisban van.

A kizárólag csak az alaptáptalajon növekvő sejtekhez képest,

a találmány szerint tenyésztett bélbaktériumoknak megváltozik a morfológiája, és/vagy sejtmozgékonyága és/vagy bizonyos új fehérjéket, lipopoliszacharidokat és/vagy szénhidrogéneket termelnek és/vagy az említett makromolekulák koncentrációja nő. Optimális az a tenyésztési körülmény, ahol nő a sejthozam és a patogenocitási index. Ezeket a tenyésztési körülményeket használva, kimutatható a virulenciával kapcsolatos antigének kiváltása vagy mennyiségük növekedése.

A mobilitási vagy a feltűnő morfológiai változásokat a kezeletlen vagy a festett baktériumok mikroszkópiai vizsgálatával figyelhetjük meg. A jelen találmány szerinti eljárások más morfológiai változásokat is okozhatnak, melyek elektronmikroszkóppal vagy fluoreszcencia-mikroszkóppal láthatók.

A jelen találmány szerint tenyésztett bélbaktériumok morfológiája és a nyálkászerű jellegzetessége arra utal, hogy tok és/vagy felületi réteg expressziója indukálódhatott. A tok kialakításának vizsgálatához elkészíthető a felületi komponensek - fehérjék, szénhidrátok és lipopoliszacharidok - fenolos extraktuma. A HPLC vizsgálatok arra utalnak, hogy megnőtt a szénhidrátok mennyisége.

A jelen találmány virulenciát fokozó körülményei között tenyésztett baktériumok külső membránjainak fehérjeösszetételét nátrium-dodecil-szulfát/poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) vizsgálhatjuk, és az eredményeket összehasonlítjuk a szokásos táptalajon növesztett baktériumok gélelektroforetikus képével. Az SDS-PAGE analízis arra utal, hogy az antigénaktivitást fokozó vagy megváltoztató körülmények következményeként változások történnek a baktériumsejt extrahált fehérjeiben. Ezek az

adatok mennyiségi és minőségi adatokat szolgáltatnak a megnövekedett behatolóképesseggel és a megváltozott antigenicitással összefüggő felületi változásokról.

Az indukált vagy megváltozott fehérje antigének immunizáló képességét Western Blotting analízissel állapíthatjuk meg. Az indukált vagy megváltoztatott és az SDS-PAGE módszerrel azonosított baktérium fehérjék immunogenicitását a Western Blotting eljárás alábbiakban leírásra kerülő, általánosan alkalmazott technikáival értékelhetjük. A bakteriális antigének vizsgálatához az antitesteknek bármilyen forrását használhatjuk, ez lehet például reconvaleseens nyúl- vagy vadászmenyét-savó (az antitest forrása olyan állat, amit orálisan megfertőztünk a szokásos körülmények vagy a találmány szerinti körülmények között tenyésztett élő mikroorganizmusokkal), bélnyálka (IgA antitest forrása), poliklonális antiszérum vagy monoklonális antitest, például olyan, ami kereszt-reaktív a *C.jejuni* flagellinjével.

A bakteriális antigének némelyikének megnövekedett termelése együtt jár a virulenciával kapcsolatos tulajdonságok erősödésével. Ezek közé a tulajdonságok közé tartozik a tenyésztett humán bélhámsejteken való megtapadási és behatolóképeség és Congo-vörössel való festődés. A virulencia megállapításának egy általánosan elfogadott módja a Congo-vörös festék megkötésének vizsgálata. A módszert Andrews és munkatársai [Infect. Immun., 60:3287-3295, (1992)] valamint Yoder [Avian Dis., 33:502-505 (1989)] írják le, és az eljárást az alábbiakban ismertetjük. A baktérium Congo-vöröset megkötő képessége összhangban van a hemint megkötő képességével, ez pedig a baktérium virulenciájával. A Congo-vöröst megkötő képesség a baktériumoknak a hámsej-



gedésénél. Újabb, a Bagar-féle [Infection and Immunity, 63:3731-3735 (1995)] egér kolonizációs modell. Immunizált egeret orron vagy szájon át élő *Campylobacter*rel fertőznek meg, és vizsgálják a bélben való megtelepedést, nyomon követve a fekáliában a *Campylobacter* jelenlétét.

Egerek *Shigella*val orron keresztüli fertőzését Malett és munkatársai (lásd 37. példa) írják le. Ezzel a módszerrel állítják meg a fertőzőképességet és az oltóanyag védőképességét. A találmány szerinti eljárással előállított *Helicobacter pylori* vakcina hatékonyságát Chen és munkatársai [Lancet, 339:1120-1121 (1992)] módszerével állapítjuk meg. A módszer a *Helicobacter felis* gyomorban történő megtelepedésének modelljét használja.

A bélbaktériumok inváziójára és fertőzésére más állatmodellek is vannak, melyek felhasználhatók a jelen találmány szerint előállított, fokozott aktivitású bélbaktériumokkal készített vakcinák hatékonyságának vizsgálatára.

A jelen találmány szerint előállított fokozott antigénaktivitású bélbaktériumok felhasználhatók az elölt teljes sejtet vagy alegységet tartalmazó vakcina prototípusának elkészítésére. Ezeket az oltóanyagokat állatokba juttatva, kimutatható az antitestek keletkezésének indukálása és a vakcina védőhatása. A baktérium antigének indukálása vagy fokozása olyan baktériumot eredményez, melyek a vakcinát még hatásosabbá teszik.

A találmány szerint előállított vakcinajelölt készítményeket különféle, a nyálkahártyán át immunizáló módszerrel felhasználhatjuk az intesztinális immunválasz kiváltására. A sikeres immunizációs eljárás felhasználható aztán az élőlényeknek a fokozott vagy nem-fokozott antigenecitású kórokozókkal szembeni védelmé-

re. Az oltóanyagot elkészíthetjük és vizsgálhatjuk összetett vakcina alakjában is, például egyetlen vakcina tartalmazhatja a Shigella és a Campylobacter sejteket vagy sejtalkotó részeket.

Az ismertetésre kerülő kísérleti megközelítések alkalmasak arra, hogy kimutassuk a felületi antigénekben vagy más, a fokozott behatolóképesseggel kapcsolatos tulajdonságokban bekövetkező változásokat. Ezek a változások lehetnek mennyiségi vagy minőségi jellegűek. A legfontosabb, hogy ezek a kísérletek bizonyítják, hogy a jelen találmány szerinti eljárások fokozzák a behatolóképesseget és immunológiailag fontos antigéneket indukálnak. Az ilyen fokozott antigénaktivitású bélbaktérium immuni-
záló választ vált ki, mely védelmet nyújt a baktérium törzsek, szérumtípusok és/vagy fajok széles tartományával szemben, és ezért hatékonyabb oltóanyagként alkalmazható, mint a szokásosan növesztett baktérium.

Néhány, jól meghatározott modell általánosan ismert a szakterületen, és amint a későbbiekben leírjuk, alkalmasak a baktériumok fokozott antigénaktivitási tulajdonságainak, fertőzőképességének megállapítására.

Az elmondottak szemléltetésére az alábbiakban példákat adunk meg. A példák kizárólag szemléltető célzatúak, és a találmány oltalmi körét nem korlátozzák.



Példák

Eljárások fokozott antigénaktivitású baktériumok előállítására

1. példa

Campylobacter jejuni 81-176 törzset kenünk fel véres agar lemezre (triptikáz-szója-agar, ami 5 % fibrinmentes birka vörösvértestet tartalmaz), és mikroaerofill GasPak edényben (BBL, Cockeysville, MD, USA) inkubáljuk 37°C hőmérsékleten 20 órán át. A baktériumréteget letörölve összegyűjtjük, és 1 liter BHI tápközeget oltunk be vele, ami 0,8 % OXGALL-t (Difco, Detroit, MI, USA) tartalmaz. A táptalajt előzőleg ekvilibrálnak 10 % CO₂ és 90 % levegő összetételű gázeleggyel. A lezárt edényt 10 % CO₂ és 80 % levegő összetételű légtérben 20 órán át rázatjuk 37°C hőmérsékleten, majd a sejteket a fentiekben leírt módon összegyűjtjük.

2. példa

Campylobacter jejuni 81-176 törzset kenünk fel véres agar lemezre (triptikáz-szója-agar, ami 5 % fibrinmentes birka vörösvértestet tartalmaz), és 20 órán át inkubáljuk 37°C hőmérsékleten egy mikroaerofill GasPak edényben (BBL, Cockeysville, MD, USA). A baktériumréteget letöröljük, és ezzel oltunk be 1 liter BHI tápközeget, ami 0,01-0,1 % nátrium-deoxikolátot (DOC) tartalmaz. A tápközeget előzőleg 10 % CO₂ és 90 % levegő összetételű gázeleggyel ekvilibrálnak. (Fontos, hogy a DOC-ot a BHI tápközegtől külön, mint törzsoldatot készítsük el és autoklávozzuk,

majd közvetlenül a baktériummal való beoltás előtt adjuk aszeptikus körülmények között a BHI táptalajhoz). A tenyészetet különböző ideig, leghosszabban 20 órán át inkubáljuk 37°C hőmérsékleten 5 % O₂, 10 % CO₂ és 85 % N₂ összetételű gáztérben, majd a sejteket a fentiekben leírt módon összegyűjtjük.

3. példa

Campylobacter jejuni 81-176 törzset felkenünk véres agar lemezre (triptikáz-szója-agar, ami 5 % fibrinmentes birka vörösvértestet tartalmaz), és 20 órán át inkubáljuk 37°C hőmérsékleten egy mikroaerofill GasPak edényben (BBL, Cockeysville, MD, USA). A baktériumréteget letöröljük, és ezzel oltunk be 1 liter Brucella tápközeget, ami 0,01-0,1 % nátrium-deoxikolátot tartalmaz. A tápközeget előzőleg 10 % CO₂-t tartalmazó gázeleggyel ekvilibráljuk. A tenyészetet 37°C hőmérsékleten rázatjuk 20 órán át 5 % O₂, 10 % CO₂ és 85 % N₂ összetételű gázeleggyben, majd a sejteket a fentiekben leírt módon összegyűjtjük.

4. példa

Campylobacter jejuni 81-176 törzset felkenünk véres agar lemezre (triptikáz-szója-agar, ami 5 % fibrinmentes birka vörösvértestet tartalmaz), és egy mikroaerofill GasPak edényben (BBL, Cockeysville, MD, USA) inkubáljuk 20 órán át 37°C hőmérsékleten. A baktériumréteget lemoszuk, és ezzel oltunk be 1 liter Mueller-Hinton táptalajt, ami 0,01-0,1 % nátrium-deoxikolátot tartalmaz. A tápközeget előzetesen 10 % CO₂-t tartalmazó gázeleggyel ekvilibráltuk. A tenyészetet 37°C hőmérsékleten rázatjuk 20 órán

át 5 % O₂, 10 % CO₂ és 85 % N₂ összetételű gázelegyen, majd a fentiekben leírt módon a sejteket összegyűjtjük.

5. példa

Campylobacter jejuni 81-176 törzset felkenünk véres agar lemezre (triptikáz-szója-agar, ami 5 % fibrinmentes birka vörösvértestet tartalmaz), és egy mikroaerofill GasPak edényben (BBL, Cockeysville, MD, USA) 37°C hőmérsékleten inkubáljuk 20 órán át. A baktériumréteget lemoszuk és ezzel oltunk be 1 liter BHI tápközeget, ami 0,1 % nátrium-deoxikolátot tartalmaz. A tápközeget előzőleg 10 % CO₂-t tartalmazó gázeleggyel ekvilibrálnjuk. A tenyészetet lassan kevertetve 20 órán át inkubáljuk 37°C hőmérsékleten, 10 % CO₂, 90 % levegő összetételű légtérben, majd a sejteket a fentiekben leírt módon összegyűjtjük.

6. példa

Vibrio cholerae baktériumot kenünk fel BHI agarlemezre (triptikáz-szója-agar, ami 5 % fibrinmentes birka vörösvértestet tartalmaz), és 37°C hőmérsékleten levegőn inkubáljuk 20 órán át. A baktériumréteget lemoszuk, és ezzel oltunk be 1 liter BHI tápközeget, ami 0,1 % nátrium-deoxikolátot tartalmaz. A tenyészetet 37°C hőmérsékleten, levegő alatt rázatjuk 20 órán át, majd a sejteket a fentiekben leírt módon összegyűjtjük.

7. példa

Salmonella choleraesuis baktériumot kenünk fel BHI agarlemezre, és 37°C hőmérsékleten inkubálunk 20 órán át. A

baktériumréteget lemoszuk, és ezzel oltunk be 1 liter BHI tápközeget, ami 0,1 % nátrium-deoxikolátot tartalmaz. A tenyészeteket 37°C hőmérsékleten, levegő alatt rázatjuk 20 órán át, majd a sejteket a fentiekben leírt módon összegyűjtjük.

8. példa

Salmonella typhimurium baktériumot kenünk fel Luria tápagarlemezekre és a lemezeket 37°C hőmérsékleten, levegőn inkubáljuk 20 órán át. A baktériumréteggel 1 liter BHI tápközeget oltunk be, mely tápközeg 0,1 % nátrium-deoxikolátot tartalmaz. A tenyészetet 37°C hőmérsékleten, 10 % CO₂, 90 % levegő összetételű gáztérben rázatjuk 20 órán át. Egy telepet átviszünk 0,1 % DOC-ot tartalmazó 1 liter LB tápközegbe, és egy lezárt edényben inkubáljuk 37°C hőmérsékleten lassú kevertetés mellett. 12 óra múlva 60 ml tenyészetet átviszünk 1 liter friss, előmelegített, ugyanilyen tápközegbe, és további 30 percen át inkubálunk, majd a sejteket a fentiekben leírt módon összegyűjtjük.

9. példa

Shigella flexneri 2457T törzset felkenünk Congo-vöröset tartalmazó agarlemezekre és a lemezt 37°C hőmérsékleten, levegőn inkubáljuk. Egyetlen vörös teleppel beoltunk 1 liter BHI tápközeget, és 12 órán át rázatjuk a tenyészetet. 50 ml nyert tenyészetel beoltunk 250 ml előmelegített, 0,1 % nátrium-deoxikolátot tartalmazó BHI tápközeget. A tenyészetet 37°C hőmérsékleten, levegőn rázatjuk 4 órán át. Ezt a tenyészetet 0,17 OD₆₀₀

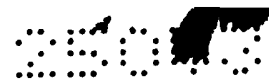
értékre hígítjuk előmelegített BHI táptalajjal, ami 0,1 % DOC-ot tartalmaz, és 30 percen át rázatjuk a tenyészetet 37°C hőmérsékleten és levegőn, majd a sejteket a fentiekben leírt módon összegyűjtjük.

10. példa

Campylobacter jejuni 81-176, 81-116 vagy HC törzsek preparátumát (BHI közegben 30 % glicerinnel) gyorsan felolvasztjuk és birkavéres agarra (SBA) lemezeljük (0,1 ml lemezenként). A beoltott lemezeket GasPak edényben 37°C hőmérsékleten inkubáljuk CampyPak Plusz mikroaerofill környezeti generátor (BBL, Cockeysville, MD, USA) segítségével 20 órán át. A baktériumréteget letöröljük a lemezről és 10 ml BHI közegben szuszpendáljuk. A baktérium-szuszpenzióval beoltunk egy kétliteres edényben lévő 1 liter BHI tápközeget vagy 0,1 % DOC-ot tartalmazó BHI tápközeget. A tápközeget előzetesen 10 % CO₂, 90 % levegő összetételű gázeleggyel ekvilibrálnak. Az inokulumot addig adjuk az előekvilibrált tápközeghez, amíg el nem érjük a 0,05 OD₆₀₀ értéket. A beoltott edényt visszahelyezzük a 10 % CO₂, 90 % levegő összetételű gáztérbe, és 37°C hőmérsékleten lassan kevertetjük 20 órán át. Ekkor a sejteket a fentiekben leírt módon összegyűjtjük.

11. példa

Helicobacter pylori baktériumot adunk 4 % borjúsérummal kiegészített BHI tápközegbe. Beoltás után az edényeket 5 % O₂, 10 % CO₂, 85 % N₂ összetételű gázeleggyel öblítjük át, és 37°C hőmér-



sékleten rázatjuk 22 órán át. Az inkubálás után 2,5 ml tenyészetet átviszünk 4 % borjúsérumot tartalmazó BHI tápközegbe, illetve ugyanilyen tápközegbe, ami 0,05 % nátrium-glikolátot is tartalmaz. Ezeket a tenyészeteket ismét átöblítjük a mikroaerofill gázeleggyel. (5 % O₂, 10 % CO₂, 85 % N₂), lezárjuk és 12 órán át 37°C hőmérsékleten rázatjuk. A baktériumtenyészetet ezután ugyanilyen tápközeggel hígítjuk 0,17 OD₆₀₀ értékre, majd ugyanolyan körülmények között inkubálunk, amíg a tenyészet el nem éri a korai log fázist. Ez általában a hígítás utáni 30. percben érhető el. A sejteket a fentiekben leírt módon összegyűjtjük.

13. példa

Salmonella typhimurium baktériumot kenünk fel LB agarlemezre, és a tenyésztést 37°C hőmérsékleten, levegőn végezzük 18-20 órán át. Felveszünk egy telepet és átvisszük 1 liter LB tápközegbe vagy 0,1 % DOC-ot tartalmazó LB tápközegbe, és 37°C hőmérsékleten levegőn tartjuk 12 órán át. A tenyészetet ugyanolyan friss tápközeggel meghígítjuk (1/5), és a fenti körülmények között inkubáljuk 4 órán át. A tenyészetet ezután ugyanolyan friss tápközeggel hígítjuk 0,17 OD₆₀₀ értékre és a fentiekkel azonos körülmények között növesztjük, amíg el nem éri a log fázist. Ehhez általában a hígítás után 30 percre van szükség. A sejteket a fentiekben leírt módon összegyűjtjük.

14. példa

Klebsiella pneumoniae baktériumot kenünk fel BHI agar lemez-

re, és a lemezt 37°C hőmérsékleten, levegőn tartjuk 18-20 órán át. Felveszünk egy telepet és beoltunk vele 1 liter BHI tápközeget vagy 0,1 % DOC-ot tartalmazó BHI tápközeget. A tenyészetet 37°C hőmérsékleten, levegőn rázatjuk 12 órán át. A tenyészetet ugyanolyan friss tápközzel hígítjuk 0,17 OD₆₀₀ értékre, és tovább növesztjük 30 percen át, majd a sejteket a fentiekben leírt módon összegyűjtjük.

15. példa

Enterobacter cloacae baktériumot kenünk fel BHI agarlemezre, és a lemezt 18-20 órán át 37°C hőmérsékleten, levegőn tartjuk. Egy teleppel beoltunk 1 liter BHI tápközeget vagy 0,1 % DOC-ot tartalmazó BHI tápközeget, és a tenyészetet 37°C hőmérsékleten rázatjuk 12 órán át. A baktériumokat ugyanolyan friss tápközzel hígítjuk 0,17 OD₆₀₀ értékre, 30 percen át tovább növesztjük, majd a sejteket a fentiekben leírt módon összegyűjtjük.

16. példa

Escherichia coli 0157:H7 törzset kenünk fel birkavéres agarlemezre, és a lemezt 37°C hőmérsékleten, levegőn tartjuk 17-20 órán át. Egy teleppel beoltunk 1 liter BHI tápközeget vagy 0,1-0,2 % DOC-ot tartalmazó BHI tápközeget, és a tenyészetet 37°C hőmérsékleten rázatjuk 12 órán át. A tenyészetet 0,17 OD₆₀₀ értékre hígítjuk és tovább növesztünk 30 percen át, majd a sejteket a fentiekben leírt módon összegyűjtjük.

17. példa

Enterococcus faecalis baktériumot kenünk fel birkavéres

agarlemezre, és a lemezt 37°C hőmérsékleten, levegőn tartjuk 18-20 órán át. Egy teleppel beoltunk 1 liter BHI tápközeget vagy 0,1 % DOC-ot tartalmazó BHI tápközeget, és a tenyészetet 37°C hőmérsékleten rázatjuk 12 órán át. A baktériumokat 0,17 OD₆₀₀ értékre hígítjuk, és tovább növesztünk 30 percen át, majd a sejteket a fentiekben leírt módon összegyűjtjük.

18. példa

Clostridium difficile baktériumot (darabolt hús módosított kivonatában 30 % glicerinnel) kenünk fel az anaerob vizsgálatokhoz használt szarvasmarha májkivonatot és 1,5 % agart tartalmazó lemezre, és a lemezeket 37°C hőmérsékleten tartjuk mikroaerofill körülmények között (5 % CO₂ és 95 % N₂). Egy teleppel beoltunk 1 liter darabolt hús módosított kivonatát tartalmazó táptalajt vagy ugyanilyen táptalajt, mely 0,1 % DOC-ot tartalmaz. A baktériumot mikroaerofill körülmények között tenyésztjük 37°C hőmérsékleten 12 órán át, majd a fentiekben leírt módon a sejteket összegyűjtjük.

19. példa

Bacteroides fragilis baktériumot (darabolt hús módosított kivonatában 30 % glicerinnel) kenünk fel darabolt hús módosított kivonatot tartalmazó agarlemezre, és a lemezeket 37°C hőmérsékleten tartjuk mikroaerofill körülmények között (5 % CO₂ és 95 % N₂). Egy teleppel beoltunk 1 liter darabolt hús módosított kivonatát tartalmazó táptalajt vagy ugyanilyen táptalajt, mely 0,1 % DOC-ot tartalmaz, és mikroaerofill körülmények között tenyészt-

jük 37°C hőmérsékleten 12 órán át, majd a fentiekben leírt módon a sejteket összegyűjtjük.

20. példa

Yersinia pseudotuberculosis baktériumot (30 % glicerint tartalmazó Luria tápközegben) kenünk fel Luria táptalajt tartalmazó agarlemezre, és a lemezt 30°C hőmérsékleten tartjuk. Egy teleppel beoltunk 1 liter LB tápközeget, és a tenyészetet 30°C hőmérsékleten tartjuk 12 órán át. Ezt a tenyészetet LB vagy 0,1 % DOC-ot tartalmazó LB tápközeggel hígítjuk meg (1/5) és 4 órán át inkubáljuk 37°C hőmérsékleten. A tenyészetet ugyanolyan tápközeggel 0,17 OD₆₀₀ értékre hígítjuk, tovább növesztünk 30 percen át, majd a sejteket a fentiekben leírt módon összegyűjtjük.

21. példa

Helicobacter pylori baktériummal oltunk be 4 % borjúsérumot tartalmazó BHI tápközeget. A beoltás után az edényeket átöblítjük 5 % O₂, 10 % CO₂ és 85 % N₂ összetételű gázeleggyel, majd a tenyészetet 37°C hőmérsékleten rázatjuk 22 órán át. 2,5 ml ilyen tenyészettel beoltunk 4 % borjúsérumot tartalmazó BHI tápközeget vagy ugyanilyen tápközeget, ami 0,1-0,2 % szarvasmarha-epét tartalmaz. Az edényeket ismét átöblítjük a mikroaerofill gázeleggyel (5 % O₂, 10 % CO₂, 85 % N₂), és a tenyészeteket 37°C hőmérsékleten tartjuk 20-24 órán át. A sejteket a fentiekben leírt módon összegyűjtjük.

Az alábbi példák a fokozott antigénaktivitású baktériumokkal foglalkozik.

22. példa

A natív (nedvesen kiemelt) baktériumok mikroszkópiai vizsgálatát használjuk a baktériumok mozgékonyságának és szemmel látható morfológiájának megfigyelésére. A felületi rétegek tanulmányozásához a tokot tusban festjük. Levegőn való szárítás után a sejteken kristály-ibolyával ellenfestést végzünk. Valamennyi megfigyeléshez 1000-szeres nagyítást használunk.

A jelen találmány szerint tenyésztett baktériumok (a továbbiakban „fokozott aktivitású” baktériumok) morfológiája eltérő a csak alaptáptalajon nőtt (a szokásos körülmények között nőtt) baktériumok morfológiájától. Például a fokozott aktivitású *C. jejuni* aggregálódik és nagy sejtcsomókat képez, míg a szokásos körülmények között növekvő jobbra magányosak. A tok festésének adataiból (az adatok nem bemutatottak) nyilvánvaló, hogy a jelen találmány szerinti tenyész körülmények hatással vannak a baktérium felületére. A felület változása azt eredményezi, hogy a fokozott aktivitású sejtek felülete jobban megköti a nigrozin festékszempcséket. A fokozott aktivitású baktérium megőrzi nagyfokú mozgékonyságát.

23. példa

A *C. jejuni* felületi alkotórészeit fenolos extrahálással analizáljuk. Az extraktumot a szokásos, illetve a 2. példában leírt módon tenyésztett *C. jejuni* 81-176 törzsből készítjük. A *C. jejuni* sejteket centrifugálással gyűjtjük össze és a fermentléből, amint azt a fentiekben leírtuk. A sejttöledéket szobahőmérsékle-

ten 2 órán át extraháljuk 1 %-os fenollal. Az inakt sejteket 45 perces centrifuálással választjuk el az extrahált anyagtól. A baktérium felületi komponenseit tartalmazó felülúszót egy éjszakan át dializáljuk desztillált vízzel szemben. A visszamaradt folyadékot 4°C hőmérsékleten és 105.000 g értéken centrifugáljuk 3 órán keresztül. Az extraktum üledékét 10 % nátrium-klorid oldatban ismét feloldjuk, és kétszeres térfogatú 95 %-os etanollal lecsapjuk. A lecsapást megismételjük, és a mintát fagyasztva szárítjuk. További analízishez a mintát 1 mg/ml koncentrációban oldjuk vízzel.

A kivonat szénhidrát tartalmát az általánosan használt fenolos/kénsavas módszerrel vizsgáljuk, standardként glükózt használva. A kivonat uronsav tartalmát Dische-féle módszerrel mérjük, karbazol reagenst használva. A fenolos kivonat összfehérje-tartalmát készlettel (Pierce Chem. Co., Rockford, IL, USA) határozzuk meg.

Érdemes megjegyezni, hogy az uronsav hiányzott a kivonatból. Sok baktérium tokjának tipikus összetevői az uronsavpolimerek. Meglepő módon a C.jejuni 81-176 felületi kivonata elsősorban fehérjét tartalmaz. A fokozott aktivitású sejtek kivonata viszont több össz-szénhidrát-tartalommal rendelkezik, mint a szokásos módon növesztetté.

A kivonat szénhidrát:fehérje arányát az I. táblázat mutatja.

I. T Á B L Á Z A T

A szokásos módon (BHI) és a 2. példa szerint („fokozott”) növesztett C.jejuni sejtfelület kivonatának szénhidrát:fehérje aránya

<u>beoltás utáni</u>	<u>BHI</u>	<u>„fokozott”</u>
<u>idő (óra)</u>		
1	0,02	0,02
2	0,02	0,10
4	0,02	0,15
6	0,03	0,29

Közvetlen összefüggés van a tenyészközeg DOC tartalma és a baktérium felületi kivonatának szénhidrát-tartalma között (I. táblázat). A találmány szerint tenyésztett baktériumok felületi kivonatában több, mint nyolcszorosára nő a szénhidráttartalom; a szokásos módon tenyésztett baktériumnál növekedés nem tapasztalható. Rehidratációnál a kivonat vízben erősen gélesedő kapacitást mutat, egy sűrűnfolyós, nyálkaszerű oldatot eredményezve, ami hasonlít az aggregálódott baktériumot állagához. A kivonat funkcionálissága hasonlít a nyálkaszerű glikoproteinekre.

Az egyes szénhidrogének analizálásához a kivonatot lezárt edényben 1 normál trifluor-ecetsavval hidrolizáljuk. A mintát 2 órán át szárítjuk nitrogéngáz alatt, majd ismételten szuszpendáljuk vízben. A cukrozott HPLC módszerrel választjuk szét Dionex Corp kromatográfiás mátrixon, az eluens összetétele: 3 % 0,5 normál nátrium-hidroxid oldat, 97 % víz. Az elválasztott monoszacharidok mérésénél amperometrikus detektálást alkalma-

zunk. Összehasonlító anyagként fukózból, galaktózaminból, glükózaminból, galaktózból, glükózból és mannózból álló standard elegyet használunk.

A felületi kivonat HPLC analízise néhány monoszacharid jelenlétére utal (1. ábra). Nics minőségi különbség a szénhidrátösszetétel tekintetében a szokásos módon és a 2. példában leírtak szerint tenyésztett baktériumok extraktuma között, de kis mennyiségi különbségesség megfigyelhető.

24. példa

A baktériumok fehérjeit SDS-PAGE és Western Blotting módszerrel analizáljuk. Az elektroforézishez Lugtenberg és munkatársai gélrendszerét használjuk [FEBS Letters, 58:254-258 (1975)]. A folytonos gélrendszer alacsony akrilamid tartalmú (általában 4 %) gélből, pH = 6,8 és magasabb akrilamid tartalmú elválasztó gélből, pH = 8,8, áll. Mindkét gél tartalmaz SDS-t (0,1 %) és puffert. A fehérjék elválasztása a molekula mérete alapján történik, az elválasztáshoz 8 % vagy 12 % akrilamidot tartalmazó gél használunk. A fehérjéket a fixált gélen ezüsfestéssel tesszük láthatóvá. A molekulaméret meghatározását standardként szolgáló ismert fehérjék M_r értékeinek alapján végezzük.

A C.jejuni sejt fehérjeit SDS-PAGE módszerrel választjuk el, és ezüsfestéssel tesszük láthatóvá. A DOC jelenlétében tenyésztett baktériumokban négy protein, beleértve a 62 kDa nagyságot, indukálódott vagy ezek mennyisége nőtt (2. ábra).

25. példa

Az *S.flexneri* baktérium LPS összetételét fenolos extrahálással analizáljuk. Az *S.flexneri* sejteket a szokásos módon vagy a 9. példában leírtak szerint tenyésztjük és a fentiekben leírt módon, centrifugálással gyűjtjük össze. A lipopoliszacharidokat (LPS) Westphal és Jann [R. Whistler szerk., Methods in Carbohydrate Chemistry, 5. kötet, 83. oldal (1965)] módszerével extraháljuk. Röviden: a BHI tápközegben vagy a 9. példában leírtak szerint tenyésztett baktériumot centrifugálással összegyűjtjük és egyszer mossuk PBS-sel. A sejteket 68°C hőmérsékleten extraháljuk 45 % fenolt tartalmazó vizes oldattal 15 percen át. A kivonatot 10°C hőmérsékletűre hűtjük és centrifugáljuk. Az LPS-t tartalmazó felső vizes fázist leszívjuk és desztillált vízzel szemben dializáljuk. A visszamaradt folyadékot 7 órán át centrifugáljuk 4°C hőmérsékletre 80.000 g értéknél, majd háromszor centrifugáljuk 105.000 g értéken, minden centrifugálást 3 órán át végezve. A végső üledéket fagyasztva szárítjuk. Analízis előtt az LPS-t vízben szuszpendáljuk (1 mg/ml). A tisztított LPS szénhidrát tartalmát a fentiekben leírt módon, az LPS összetételt a fentiekben ismertetett SDS-PAGE módszerrel analizáljuk (5. ábra).

Az adott SDS-PAGE rendszerben nincs nagy különbség a szokásos módon növesztett és a fokozott aktivitású *S.flexneri* sejtek fehérjeösszetétele között. Az LPS száraz-tömegéhez viszonyított szénhidrátarány a fokozott aktivitású sejteknél kisebb, mint a BHI tápközegben nőtt sejtek extraktumában. Az *S.flexneri* LPS oxidálását és ezüstfestést követő SDS-PAGE kép azonban nagy el-

térést mutat az LPS összetételben (5. ábra). Amint a „2” sávban látható, a fokozott aktivitású *S.flexneri*ből származó LPS O-antigén frakciójánál a hosszúság csökken. Ez az eredmény összhangban van azzal a megállapítással, hogy a fokozott aktivitású baktériumból származó LPS-nél csökken a szénhidrát/LPS száraz tömeg arány.

Ezek az eredmények a „fokozott aktivitású” sejteken rövidebb O-antigén oldallánc jelenlétére utalnak, ami a baktériumot potenciónalisán hidrofóbbá teheti. A hidrofóbbá vált baktérium és a bél hidrofób felülete között szorosabb kölcsönhatás alakulhat ki.

26. példa

A fehérjék immunogén aktivitását Western Blot eljárással állapítjuk meg. A hagyományos módon vagy a jelen találmány szerint, a fenti 1. vagy 5. példában leírtak alapján tenyésztett baktériumokból nyert fehérjéket SDS-PAGE módszerrel választjuk szét, majd elektroforetikus úton nitrocellulóz vagy PVDF membránra visszük át, és a szokásos blokkoló ágenssel [3 % BSA, 50 mM Trisz (pH = 8,5), 50 mM NaCl, 0,2 % Tween 20] rögzítjük a fehérjéket. Primer antitestet alkalmazunk blokkoló pufferben, a „blot”-ot kimossuk és a membránt egy jelző szekunder antitesttel reagáltatjuk. Mosás után a foltokat színt vagy kromofort képező reagenssel tesszük láthatóvá. Jelző ágensként torma peroxidázt vagy bázikus foszfátázt alkalmazunk.

A 3. ábra a fehérjéknek az immunizált nyúl IgA-t tartalmazó nyálkájával végzett Western Blot analízisének eredményét mutat-

ja. Amint látható, a 60 kDa nagyságú fehérje az immundomináns antigén. A 62 kDa nagyságú fehérje antigenicitása erősen megnövekszik a DOC vagy az epe jelenlétében tenyésztett sejteknél. Ez a fehérje a DOC jelenlétében tenyésztett sejtek felületi kivonataiban is a túlsúlyban lévő antigén.

A *Campylobacter* flagellinjével keresztreaktív egér monoklonális antitest felhasználásával kimutatható, hogy a megnövekedett mennyiségű fehérje a *C.jejuni* flagellinje (4. ábra). Ez lényeges felfedezés volt, mert több kutató kimutatta, hogy a *C.jejuni* flagellinje szerepet játszik a patogenezisben és kapcsolatban van a baktérium behatolóképeségével.

27. példa

A fertőzőképesség mérését a Congo-vörös festék megkötésével végezzük. A bélbaktériumot a szokásos körülmények között (BHI) vagy a találmány szerinti körülmények között („fokozott aktivitású”) növesztjük 0,025 % Congo-vörös festéket tartalmazó BHI agarlemezen. A baktériumokat desztillált vízben szuszpendáljuk és 10 percen át extraháljuk acetonnal. A sejttörmelékét centrifugálással ülepitjük, és a festék OD₄₆₈ értékét 40 % acetont és 60 % vizet tartalmazó vakkal szemben mérjük. A festék fényelnyelését a sejtek 660 nm-en mért fényelnyeléséhez viszonyítjuk, és megállapítjuk az OD₄₈₈/OD₆₀₀ arányt. Az adatokat a II. táblázatban foglaltuk össze.

II. T Á B L Á Z A T

A szokásos módon (BHI) és a jelen találmány szerint („fokozott aktivitású”) növesztett kórokozó bélbaktériumok Congo-vörös festékmegkötése

törzs	a festék abszorbanciája	
	BHI	„fokozott aktivitású”)
C.jejuni 81-176	0,07	0,49
C.jejuni 81-116	0,06	0,49
S.typhimurium SR11	0,05	0,30
S.flexneri 2457T	0,02	0,13
V.cholera 569b	0,70	2,00

Amint a II. táblázat adatai mutatják, a jelen találmány szerint tenyésztett néhány bélbaktérium Congo-vörös festéket megkötő képessége fokozódott. Ez arra vall, hogy a jelen találmány szerinti in vitro módszerek alkalmasak a virulencia és egyéb olyan tulajdonságok indukálására, melyekről ismert más baktériumoknál, hogy az in vivo patogenezissel kapcsolatban vannak.

28. példa

A baktériumok tenyésztett hámsejtekhez való hozzákötődését Galan és Curtiss [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:6383-6387 (1989)] módszerével vizsgáljuk. A szöveti sejteket [INT-407 vagy Henle sejtek (ATCC-CCL6) és CaCo-2 (ATCC-HTB37) humán bélsejtvonal] 24-lyukú szövettenyésztő lemezen növesztjük (37°C, 5 % CO₂), amíg a tenyészet be nem növi a felület 60-68 %-át. A közeg az alkalmazott sejtvonaltól függ. A Henle sejtekhez Dulbecco által módosított Eagle közeget használunk, amit 10 % szarvasmarhaembrió-szérummal, 50 mg/ml penicillin G-vel és 50

mg/ml sztreptomicinnel egészítünk ki. A CaCo-2 sejteket RPMI 1640 tápközegben tenyésztjük, melyet 10 % szarvamarhaembrió-szérummal, 50 mg/ml penicillin G-vel és 50 mg/ml sztreptomicinnel egészítünk ki. Legalább három órával a vizsgálat előtt, eltávolítjuk a tenyészközeget, a sejteket magnézium- és kalciumionokat tartalmazó Hank-féle kiegyensúlyozó sóoldattal (HBSS) kétszer mossuk. Az egyrétegű sejttenyészetet antibiotikumot nem tartalmazó növesztő közeggel fedjük le.

Az adhéziós vizsgálatokhoz a sejtpreparátumot az alábbiak szerint készítjük el. A lassan növekvő bélbaktériumoknál, mint amilyen a *Campylobacter* és a *Helicobacter*, a tenyészetet friss, előekvilibrált közeggel 0,1 OD₆₂₅ értékre hígítjuk és ezután használjuk a vizsgálathoz. A *Shigella* és más gyorsan növekvő bélbaktériumnál a tenyészetet friss, előekvilibrált tápközeggel 0,17 OD₆₂₅ értékre hígítjuk és így használjuk a vizsgálatokhoz. A baktériumtenyészetet hozzáadjuk a hámsejtekhez, hogy elkerüljük a telítettséget 10 baktériumot számítva egy sejtre. A szövettenyészetbe beoltott baktériumok számát lemezen történő számlálással állapítjuk meg. 5 % CO₂-t tartalmazó légtérben a *Campylobacter* esetében a fertőzés után 2 órával, a *Shigella* esetében 30 perccel HBSS oldattal kimossuk a nem megkötött baktériumokat, majd a sejtréteget 0,1 % deoxikoláttal lizáljuk, és a lizátumot lemezeljük az adhézió megállapításához.

A szokásos módon vagy a jelen találmány szerinti körülmények között, például az 5. példában leírtak alapján tenyésztett *C.jejuni* 81-176 baktériumnak az INT-407 törzsekhez való kötődését a hőmérséklet a III. táblázatban bemutatott mértékben befolyásolta.

A szokásos módon és a jelen találmány szerint tenyésztett néhány *C.jejuni* törzs eltérő kötődését a IV. táblázatban mutatjuk be.

A kötődés százalékos értékének kifejezéséhez a sejtrétegről eltávolított közegben lévő telepkepző egység (CFU) számát elosztjuk a rétegre vitt inokulum CFU értékével és szorozzuk százal (adhézió %).

III. T Á B L Á Z A T

A hőmérséklet hatása a szokásos módon (BHI), illetve a találmány szerint tenyésztett („fokozott aktivitású”) *C.jejuni* baktériumoknak az INT-407 sejtekhez való kötődésére

hőmérséklet	BH (adhézió, %)	fokozott aktivitású (adhézió, %)
37°C	5,5	62,3
42°C	5,5	11,2

IV. T Á B L Á Z A T

A szokásos módon (BHI), illetve a találmány szerint tenyésztett („fokozott aktivitású”) *C.jejuni* törzsek kötődése az INT-407 sejtekhez (BHI-hoz viszonyított növekedés)

törzs	BHI	fokozott aktivitású
81-176	1,0	8,4
81-116	1,0	12,5
HC	1,0	28,2

A behatolási vizsgálatnál a hámsejteket az adhéziós vizsgálatok-

nál fent ismertetett módon tenyésztjük és készítjük elő. A szokásos módon vagy a találmány szerint növesztett baktériumokat a telítettséget elkerülendő, olyan mennyiségben adjuk a hámsejtekhez, hogy 10 baktérium jusson egy hámsejtre. A sejtenyészethez adott baktériumtenyészetben a baktériumok számát kilemezeléssel állapítjuk meg. A *Campylobacter* baktériumokat 2 órán át, a *Shigella* baktériumokat 30 percen keresztül tartjuk az 5 % CO₂-t tartalmazó légtérben tartott hámsejteken, majd a baktériumos közeget leszívjuk, és az egyrétegű tenyészetet növekedési tápközzeggel borítjuk le, ami gentamicint tartalmaz, hogy a sejten kívüli baktériumokat elpusztítsuk. Ezek után csak a hámsejteken belül marad tenyészthető baktérium. A szén-dioxidos légtérben történő inkubálást tovább folytatjuk, *C.jejuni* baktériummal fertőzött sejtek esetében 3 órán át, a *Shigella* baktérium esetében 1,5 órán keresztül. Az egyrétegű tenyészetből HBSS-sel kimossuk a gentamicint, és a sejteket 0,1 %-os deoxikoláttal lizáljuk. A lizátumban lévő baktériumok számát lemezen meghatározzuk, és a glutamicines kezelést túlélő baktériumok és a fertőzéshez használt baktérium szuszpenzióban lévő baktériumok számának ismeretében kiszámoljuk a behatolási százalékot. A gentamicines kezelés után az egyrétegű tenyészettről visszanyert telepképző egységek számát (CFU) elosztjuk a telepre vitt fertőző anyag CFU számával, és a kapott értéket megszorozzuk százszal.

A hőmérsékletnek a hagyományos módon vagy a jelen találmány szerint, például a 5. példában leírtak alapján tenyésztett *C.jejuni* 81-176 INT-407 sejtekbe történő behatolására gyakorolt hatását az V. táblázatban mutatjuk be.

A hagyományosan, illetve a találmány szerint tenyésztett né-

hány C.jejuni törzs INT-407 sejtekbe való eltérő behatolását a VI. táblázatban mutatjuk be.

A DOC hatását az INT-407 sejteken való megtapadásra és a sejtekbe való behatolásra a VII. táblázatban mutatjuk be a szokásosan és a jelen találmány 5. példája szerint növesztett C.jejuni 81-176 baktériumos összehasonlításával.

A DOC hatását az INT-407 sejteken való megtapadásra és a sejtekbe való behatolásra a VIII. táblázatban mutatjuk be a szokásosan és az 5. példa szerint növesztett Shigella baktériumok összehasonlításával.

V. T Á B L Á Z A T

A hőmérséklet hatása a szokásosan (BHI), illetve a találmány szerint tenyésztett C.jejuni 81-176 („fokozott aktivitású”) baktériumok INT-407 sejtekbe való behatolására

hőmérséklet	BHI (behatolási %)	fokozott aktivitású (behatolási %)
-------------	--------------------	---------------------------------------

37°C	2,5	49,5
42°C	4,0	7,1

VI. T Á B L Á Z A T

A szokásosan (BHI), illetve a jelen találmány szerint tenyésztett („fokozott aktivitású”) C.jejuni törzsek behatolása az INT-407 sejtekbe

törzs	BHI	fokozott aktivitású*
81-176	1,0	9,2
81-116	1,0	10,0
HC	1,0	26,7

* A BHI értékekhez viszonyított érték

VII. T Á B L Á Z A T

A DOC koncentrációjának hatása a C.jejuni 81-176 baktériumnak az INT-407 sejteken valómegtapadására és a sejtekbe való behatolására, összehasonlítva a szokásosan (BHI) és a jelen találmány szerint tenyésztett („fokozott aktivitású”) baktériumokat

tenyésztés	megtapadás (%)	behatolás (%)
BHI	9,3	6,3
fokozott aktivitású, 0,025 % DOC	18,3	17,4
fokozott aktivitású, 0,1 % DOC	52,6	37,0

VIII. T Á B L Á Z A T

A DOC hatása az *S.flexneri* baktériumnak az INT-407 sejten való megtapadására és a sejtekbe való behatolásra, összehasonlítva a szokásosan (BHI) és a jelen találmány szerint („fokozott aktivitású”) tenyésztett baktériumokat

tulajdonság	HBI	fokozott aktivitású
megtapadás (%)	1,0	140,0*
behatolás (%)	1,0	94,4

* Több, mint az eredetileg a sejtekhez adott baktérium, mert a vizsgálat alatt a baktériumok szaporodtak.

Az emberből izolált néhány *C.jejuni* törzs (például 81-116, 81-176 és HC) INT-407 sejteken való adhéziója és a sejtekbe való behatolása erősen fokozható azáltal, hogy a baktérium tenyészközegében epét vagy deoxikolátot adunk (IV. és VI. táblázat). A DOC leghatékonyabb koncentrációja a 0,1 % volt (VII. táblázat). A legerősebb reakciót 37°C hőmérsékleten és nem 42°C-nál kapjuk (a *Campylobacter*t szokás szerint ezen a hőmérsékleten tenyésztik) (III. és V. táblázat).

Hasonló eredményeket kapunk a *Shigella flexneri* esetében is (VIII. táblázat). A jelen találmány szerinti módszerrel tenyésztett *Shigella* baktériumnak erősen megnőtt a megtapadó és behatoló képessége.

Ezek az adatok azt mutatják, hogy a jelen találmány szerinti eljárások fokozzák a bélbaktériumok behatolását és megtapadását.

29. példa

Az immunológiai keresztaktivitás kimutatására a tárgylemezen végzett gyors agglutinációs eljárást használjuk. A szokásos módon, illetve a találmány például az 5. példában leírt módszere szerint növesztett *C.jejuni* törzseket olyan állatokból származó szérum IgG-nek tesszük ki, melyeket a szokásos módon vagy a jelen találmány szerint (például 5. példa) tenyésztett *C.jejuni* 81-176 (Lior 5) baktériummal immunizáltunk. Az IgG antitesteket protein A-val bevont latexgyöngyökön rögzítettük. Ha a vizsgálati szérumtípus és a Lior 5 szérumtípussal szemben termelődő antitestek között vannak keresztreaktív epitopok, akkor a sejtek csaknem azonnali összezsapódása (agglutináció) figyelhető meg. Az összezsapódás mértékét egy 0-3 értékű skálán adjuk meg, miután egy rövid ideig hagytuk, hogy a reakció megtörténjen. A 0 értéknél nincs látható összezsapódás, a 3 értéknél a legnagyobb fokú az agglutináció. Négy törzzsel kapott adatokat a IX. táblázatban foglaltuk össze.

IX. T Á B L Á Z A T

A hagyományosan (BHI) és a jelen találmány eljárása szerint („fokozott aktivitású”) tenyésztett Lior szérumtípusok keresztreaktivitása

tenyészet	tenyésztési körülmények	a gyöngyön lévő antitest	reaktivitás mértéke
81-176 (L5)	BHI	anti-BHI ^a	1
81-176 (L5)	BHI	anti-ENH ^b	2
81-176 (L5)	fokozott aktivitású	anti-BHI	2
81-176 (L5)	fokozott aktivitású	anti-ENH	2,5
L2	BHI	anti-BHI	1
L2	BHI	anti-ENH	1,5
L2	fokozott aktivitású	anti-BHI	0
L2	fokozott aktivitású	anti-ENH	1,5
L8	BHI	anti-BHI	2
L8	BHI	anti-ENH	1
L8	fokozott aktivitású	anti-BHI	1
L8	fokozott aktivitású	anti-ENH	2,5
L21	BHI	anti-HBI	0
L21	BHI	anti-ENH	2
L21	DOC	anti-BHI	0
L21	DOC	anti-ENH	2
media	BHI	anti-BHI	0
	BHI	anti-ENH	0

^a a szokásos módon tenyésztett 81-176 törzs indukálta antitestek

^b a jelen találmány, például az 5. példában leírtak szerint tenyésztett 81-176 törzs indukálta antitestek

A IX. táblázat bemutatja, hogy mind a 4 vizsgált Lior szé-

rumtípus (L5, L2, L8, L21) keresztreakciót adott a fokozott aktivitású C.jejuni 81-176 L5 szérumtípusú törzsszel immunizált állatokban termelődő antitestekkel szemben. A C.jejuni 81-176 törzsszel fertőzött nyulak beléből kiöblített, IgA-t tartalmazó nyálka a jelen találmány szerint tenyésztett C.jejuni 10 fő klinikai szérumtípusából (a humán kórokozók) nyolccal reagált (lásd XVI. táblázat). Az eredmények azt mutatják, hogy a jelen találmány szerinti eljárás lényegesen kibővíti azoknak a Lior szérumtípusoknak a számát, melyek keresztreakciót mutatnak a Lior 5 szérumtípusú C.jejunival immunizált állatokból származó antiszérummal.

A jelen találmány szerint növesztett néhány Shigella faj ugyancsak keresztreakciót mutat a DOC jelenlétében növesztett Shigella flexneri 2457T törzsszel immunizált állatokból származó IgG antitestekkel, de ez a keresztreakció nem jelentkezik a hagyományos módon növesztett Shigella fajoknál.

A következő példákkal a vakcina hatékonyságát szemléltetjük.

30. példa

A Campylobacter baktérium esetében a vakcinának a baktérium megtelepedésével és/vagy kórokozásával szembeni védőhatását vadászmenyéten tanulmányozhatjuk, minthogy a vadászmenyét megfertőzésével a baktérium okozta három humán megbetegedés közül kettő ezeken az állatokon is reprodukálhatóan kiváltható.

24 7-9 hetes hím vadászmenyétet PBS-sel (kontroll) vagy a szokásosan (BHI), illetve az 5. példában leírt módon („fokozott aktivitású”) tenyésztett és formalinnal fixált C.jejuni 81-176

törzsszel orálisan immunizálunk. Szérumot veszünk az IgG alaptitter meghatározásához. Valamennyi vakcinát és a PBS-t LT adjuváns jelenlétében adjuk be két alkalommal, a 0. és 7. napon („vakcinálás”). Egy héttel az utolsó kezelés után (14. nap) („vakcinálás utáni állapot”) szérumot gyűjtünk az IgG antitest titterének meghatározásához. 4 hetes vakcinálás utáni állapot elteltével az állatokat ACE promazin-Ketamine-nal érzéstelenítjük, és 10 ml élő *C.jejuni* 81-176 baktériumot tartalmazó (1×10^{10} CFU) PBS oldattal megfertőzzük (fertőzés). Ezt követően naponta vizsgáljuk az állatokat, mucoid diarrheat, bacteraemiát, *Campylobacteres* bélsárürítést, testsúlyváltozást, fejtett vérzést és a bélsárban lévő fehérvérsejteket figyelve. A bacteraemia kimutatásához az érzéstelenített vadászmenyét nyaki vénájából 1-2 ml vért veszünk, és a mintát levegőztetett tiptikáz-szójás tápközegben inkubáljuk. 2, 5 és 7 nappal a beoltás után másodlagos tenyészeteket készítünk véres agarlemezeken. Az IgG titter meghatározásához szérummintákat az immunizálás előtt (alapérték), a második immunizációs kezelés után egy héttel, a fertőzés idején és a fertőzés után egy héttel gyűjtjük.

A rejtett vérzés kimutatásához a bélsarat Hemacult kártyán vizsgáljuk. A bélsarat lemezre kenjük, és metilén-kék festéssel detektáljuk a fehérvérsejteket. A *Campylobacter* bélsárból való kimutatásához a végbélből vett kenetet *Campylobacter* baktériumra specifikus tápközegű lemezre visszük (tiptikáz-szójás agar, 5 % birkavér, trimetoprim, vankomicin, polimixin B, cefalotin és amfotericin B; Remel, Lenaxa, KS, USA). A vizsgálatokkal kapott eredményeket a X. és a XI. táblázatban foglaljuk össze.

X. T Á B L Á Z A T

Vadánymenyének vakcinálással való védelme C.jejuni 81-176 baktériummal szemben

vakcina	pozitív megtelepedés a fertőzés után 5. napon ^a	betegség ^b
---------	---	-----------------------

PBS	6/6	1/6
BHI	0/6	2/6
„fokozott aktivitású”	0/5 ^c	0/6

^a pozitív megtelepedés száma/vizsgált esetek száma

^b megjelenése: zöld, nyálkás/formátlan/vizenyős széklet

^c a csoport egyik állata elpusztult, amikor a betegséget már megállapítottuk, de a megtelepedés még nem volt kiértékelve

XI. T Á B L Á Z A T

A vadászmenyét szérumának IgG tittere (geometriai átlag)

csoport	alapérték	egy héttel a fertőzéskor vakcinálás után	egy héttel a fertőzés után
---------	-----------	---	----------------------------

PBS	6,4	4,9	6,4	1380,4
BHI	6,4	94,0	94,0	26505,3
„fokozott aktivitású”	6,8	234,4	1621,8	56234,1 ^a

^a öt túlélő állatnál kapott átlagos titter

A X. táblázat adatai mutatják, hogy a jelen találmány szerinti vakcina megóvta az állatokat az élő baktériumokkal való

fertőzéstől, a megtelepedéstől és a betegség kialakulásától. A XI. táblázat adatai azt mutatják, mennyivel nagyobb IgG antitest titer érhető el a jelen találmány szerinti vakcinával („fokozott aktivitású”), mint a hagyományosan növesztett bélbaktériumból készített (HBI).

Ezek az eredmények szemléltetik a jelen találmány szerinti vakcinával elért immunitást (XI. táblázat) és a fertőzés elleni védettséget (X. táblázat), melyek hatékonyabbak, mint a szokásos módon tenyésztett baktériumokkal vakcinált állatok esetében.

31. példa

Ellentétben a vadászmenyéttel, az egereknél természetes körülmények között nem alakul ki *Campylobacter* vagy *Shigella* fertőzöttség, de a vizsgálatoknál felhasználják őket szájon át fertőzött immunizált állatok intesztinális megtelepedéssel szembeni ellenállásának és a tüdőn át megfertőzött immunizált állatok betegséggel szembeni rezisztenciájának kimutatására. Az orron keresztül megfertőzött egerek modellje felhasználható más állatok vagy az ember esetében is a vakcinálás várható hatékonyságának megállapítására. A vizsgálati módszert Mallet és munkatársai írták le [Vaccine, 11:190-196 (1993)].

A vizsgálatokhoz 16 hetes nőstény Balb/c egereket használunk; egy csoportban 10 állat van. Az állatokat szájon át immunizáljuk foszfátpufferes sóoldattal (PBS), a szokásos módon növesztett *C.jejunival* (BHI) vagy az 5. példában leírt módon tenyésztett *C.jejunival* („fokozott aktivitású”). A baktériumokból 10^7 CFU vagy 10^9 CFU dózist használunk. Immunizálás után provo-

káljuk a megbetegedést. A bélnyálka IgA titterét ELISA módszerrel állapítjuk meg. A kapott eredményeket a XII. táblázatban foglaltuk össze.

XII. T Á B L Á Z A T

Campylobacter teljes sejtekkel (10^7 vagy 10^9) szájon át immunizált egerek IgA titterválasza

immunizálás	bélfürdő IgA tittere ^b	reagálók %-a ^b
PBS	23	14
fokozott aktivitású		
(10^7)	114	75
(10^9)	78	75
BHI (10^7)	40	25
(10^9)	32	12

^a az egyes vizsgálati csoportoknál kapott anti-C.jejuni IgA titter átlaga

^b reagálónak tekintjük azokat az állatokat, melyek végpont-tittere a csak PBS-sel kezelt állatok átlagát 2 standard deviációs értékkel meghaladja.

A XII. táblázat adatai mutatják, hogy a szokásos módon tenyésztett baktériumokkal immunizált állatokhoz képest a találmány szerint tenyésztett baktériumokkal immunizált állatoknál magasabb az intesztinális IgA antitest titter.

Az alábbi példában az antigénaktivitás deoxikoláttal történő

megváltoztatásának vagy fokozásának a mechanizmusát szemléltetjük.

32. példa

Noha nincs szándékunkban a jelen találmányt egyik adott akciómechanizmusra sem korlátozni, úgy találtuk, hogy a deoxikolát (DOC) a bélbaktériumok immunizáló hatását mintegy kétszeres mértékben megváltoztatja vagy fokozza. Bizonyítékok jelzik, hogy a DOC hatásának egyik összetevője kalciumfüggő, minthogy a DOC megköti a kalciumot, és ezáltal csökkenti a közeg kalciumkoncentrációját. Ennek bizonyítékát az alábbiakban ismertetjük. Ha a *C.jejuni* 81-176 baktériumot a membránon átjutni képes BAPTA/AM kalcium-kelátképző jelenlétében, de DOC távollétében tenyésztjük, az INT-407 sejtekbe való behatolókéességük kb. tízszeresére fokozódik (XIII. táblázat). A csak BAPTA/AM kezelés azonban nem szélesíti a *C.jejuni* 81-176 baktérium immunológiai keresztreaktivitását.

A XIII. táblázat adatait olyan *C.jejuni* 81-176 baktériumokkal kaptuk, melyeket az 5. példában leírtak szerint növesztünk azzal a különbséggel, hogy a 0,1 % DOC-t 25 μ M BAPTA/AM-mel helyettesítettük. A behatolási vizsgálatokat és értékelésüket a 28. példában leírtak szerint hajtottuk végre.

XIII. T Á B L Á Z A T

A szokásos módon (BHI) vagy BAPTA/AM jelenlétében növesztett C.jejuni INT-407 sejtekbe való behatolása

törzs	<u>tenyésztési körülmények</u>	
	BHI	BAPTA/AM
C.jejuni 81-176	3,0	36,9

Noha olyan baktérium genus, melynek antigénaktivitása epével vagy epesavsókkal, mint amilyen a DOC, fokozható vagy megváltoztatható (például Campylobacter, Shigella, Helicobacter) génhomológiát mutat a Yersinia alacsony kalcium reaktivitási (low calcium response, lcr) génjeivel. Ismert, hogy az lcr lókus szabályozza a Yersinia fertőzőképességét az alacsony kalciumkoncentrációnál. A Campylobacter flagellin expresszállásában és elkészítésében résztvevő két gént, melyek a behatoláshoz szükségesek (flaA és flbA) részben a lcr terméke szabályoz. A szokásos módon a találmány szerinti, a virulenciát fokozó körülmények között növesztett Campylobacter flaA és flbA mutánsok viselkedésének analízise azt mutatja, hogy a behatolókéesség kalciumfüggő, de a Congo-vörös festék megkötése vagy a keresztreakció növekedése nem.

XIV. T Á B L Á Z A T

A szokásos körülmények kötött (BHI), illetve a jelen találmány szerint tenyésztett („fokozott aktivitású”) C.jejuni mutánsok INT-407 sejtekbe való behatolása

törzs	<u>tenyésztési körülmények</u>	
	BHI	fokozott aktivitású
C.jejuni 81-176	3,5	40,8
C.jejuni flaA	0,05	0,05
C.jejuni flbA	0,01	0,04

A C.jejuni flaA és flbA mutánsok szignifikáns növekedést mutattak a Congo-vörös festék megkötését és az immunológiai keresztreakciókat illetően, ha DOC jelenlétében tenyésztjük őket (XV. táblázat, 6. ábra). A XV. táblázat és a 6. ábra adatait a szokásos módon, illetőleg az 5. példában leírtak szerint tenyésztett C.jejuni baktériummal kaptuk. A Congo-vörös festék megkötését (XV. táblázat) a 26. példában leírtak szerint vizsgáltuk. A 6. ábrán bemutatott immunológiai keresztreakciók vizsgálatát a 29. példában leírtak szerint végeztük.

XV. T Á B L Á Z A T

A szokásos módon (BHI), illetve a találmány szerint („fokozott aktivitású”) tenyésztett C.jejuni mutánsok Congo-vörös festékmegkötése

<u>törzs</u>	<u>tenyésztési körülmények</u>	
	<u>BHI</u>	<u>fokozott aktivitású</u>
C.jejuni 81-176	0,07	1,68
C.jejuni flaA	0,10	1,60
C.jejuni flbA	0,12	0,80

Az flaA mutáns nem képes flagellint expresszálni. Az flaA mutáns és az flaA-flaB kettős mutáns (C.Grantól, NIH) még deoxikoláttal való kezelés után sem képes a behatolásra, jelezvén, hogy a flagellin szükséges a behatoláshoz. Érdekes módon az említett fla mutánsok izogén szülőtörzsei és bizonyos más Lior szérumtípusú C.jejuni törzsek között a normális körülmények között (azaz nem DOC kezelt) meglepő immunológiai keresztreakció a mutánsoknál hiányzik. A DOC kezeléssel azonban a flagellin hiányos mutánsokat indukálhatjuk, hogy fokozott immunológiai keresztreakciót és Congo-vörös festékmegkötést mutassanak.

Ezek a megfigyelések azt jelzik, hogy a bélbaktériumok virulenciáját a DOC kalciumfüggő (például behatolóképeséget) és kalciumtól nem függő (például Congo-vörös megkötést) mechanizmusokon keresztül szabályozza. Az eredmények továbbá arra utalnak, hogy a DOC által indukált fokozott immunológiai keresztreaktivitás és a Congo-vörös megkötése legalábbis részben a flagellintől független.

Az alábbi példában a *Campylobacter jejuni* DOC által indukált fokozott immunológiai keresztreaktivitását szemléltetjük.

32. példa

A jelen találmány szerint növesztett *Campylobacter jejuni* szérumtípusokra vonatkozó immunológiai keresztreakcióit a lemezen végzett gyors agglutinációs vizsgálattal állapítjuk meg. A vizsgálatokhoz az immunizált és nem-immunizált nyulakból származó bélnyálkát használjuk, hogy meghatározzuk a tenyésztési körülmények miként befolyásolják a *Campylobacter* heterológ törzseinek keresztreaktivitását. A nyulakat a szokásos módon tenyésztett *C.jejuni* 81-176 élő sejtjeivel immunizáljuk. A nyálkában lévő antitestek agglutinációs aktivitását 24 *Campylobacter* törzsszel szemben vizsgáltuk, melyek 18 szérumtípusba sorolhatók. A tenyésztésük a szokásos módon, illetve az 5. példában leírtak szerint történik.

Az agglutinációs vizsgálatok azt mutatják, hogy a heterológ *Campylobacter* törzsek kereszt-agglutinációja szélesebb körű és sok esetben erősebb, ha a törzseket a találmány szerint tenyésztjük. A heterológ agglutinációs reaktivitás több, mint kétszeresére nőtt: a szokásos módon növesztett 24 heterológ törzs közül 6 mutatott az anti-81-176 nyálkával szemben (+) szintű vagy ennél magasabb agglutinációt, míg ha ugyanazt a 24 törzset DOC jelenlétében tenyésztettük, 14 agglutinált (+) szinten vagy ennél erősebben. Továbbá, ha a szokásos módon tenyésztettünk, 18 heterológ törzs negatív vagy csak gyenge (+) agglutinációs aktivitást mutatott, ha viszont a jelen találmány szerinti körülmények között (például DOC-t tartalmazó közegben) nö-

vesztettük őket, ugyanezen törzsek közül 11 mutatott fokozott agglutinációs reakciót a szokásos módon növesztettekhez viszonyítva.

A XVI. táblázat 19 heterológ Lior szérumtípusba tartozó 22 törzs keresztreakcióját mutatja anti-81-176 immun nyúlgyámkával szemben. A törzseket a szokásos módon (BHI-YE), illetve az 5. példában leírtak szerint tenyésztettük („fokozott aktivitású”). Noha ezek a vizsgálatok az ismert Lior szérumtípusoknak csak egy hányadára terjedtek ki, az eredmények bizonyítják, hogy a találmány szerinti eljárás lényeges immunológiai keresztreaktivitást indukál a Lior szérumtípusok között. Az eredmények továbbá azt is mutatják, hogy a DOC fokozza vagy indukálja a *Campylobacter* azon antigénjét, melyek - úgy tűnik - fontos szerepet játszanak a rezisztenciával és a *Campylobacter* fertőzőes betegség gyógyulásával kapcsolatos IgA szekréciós válaszban.

Meg kell továbbá jegyezni, hogy a 8 Lior szérumtípus törzs egy másik fajt, a *Campylobacter coli*-t képviseli. Ezen szérumtípusba tartozó 2 törzs egyike (VC-167) erősen agglutinálódott (3+) az anti-81-176 immun nyúlgyámkában. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a *C.jejuni* törzsből (például Lior 5) származó vakcina nemcsak ugyanazon faj heterológ szérumtípusaival szemben nyújthat keresztvédelmet, hanem más *Campylobacter* fajokkal (például *Campylobacter coli*) szemben is. Ugyancsak érdemes megjegyezni, hogy az 1, 2, 4, 9 és 11 Lior szérumtípusok betegséggel kapcsolatos leggyakoribb szérumtípusok közé tartoznak világszerint. A vizsgálatokban valamennyien kimutatható keresztreakciót adtak.

XVI. T Á B L Á Z A T

Szokásos módon (BHI-YE), illetve a találmány szerint tenyésztett („fokozott aktivitású”) 20 Campylobacter szérumtípus agglutinációs válasza a nem-immunizált^b vagy az immunizált nyúl (anti-81-176^b nyálkájával szemben

törzs	Lior szérumtípus	agglutinációs válasz			
		nem indukált nyálka		immunizált nyálka	
		BHI-YE	fokozott aktivitású	BHI-YE	fokozott aktivitású
134	1	-	-	-	++
195	2	-	-	-	<u>+</u>
1	4	-	-	-	+++
170	5	-	-	+++	++++
81-176	5	-	-	++++	++++
6	6	-	-	++++	+++
81-116	6	-	-	+	++
35	7	-	-	-	+
52	8	-	+	+	++
VC-167	8	-	-	+	+++
VC-159	8	-	-	<u>+</u>	-
88	9	-	-	-	<u>+</u>
244	11	-	-	<u>+</u>	+++
556	17	-	-	+	-
563	18	-	-	-	-
544	19	-	++	-	++
699	21	-	-	<u>+</u>	++
1180	28	-	-	+	+++
1182	29	-	-	-	-
910	32	-	++	-	++
2074	36	-	-	-	-
HC	36	-	+	-	+
2984	46	-	-	-	-
7981	72	-	-	-	-

^a az anti-81-176 nyálkát a szokásos módon tenyésztett C.jejuni
81-176 élő sejtjeivel fertőzött nyúlból nyertük

^b a nem-immunizált nyálkát nem-fertőzött nyúlból nyertük

^c az agglutinációs válasz értékelése: (-) negatív

(+) nagyon gyenge

(+++++) nagyon erős

Az alábbi példában további kísérleti eredményeket adunk meg a *Campylobacter* vakcina hatékonyságára.

34. példa

A jelen találmány szerint tenyésztett *Campylobacter jejuni* formalinnal rögzített teljes sejtjeinek védőhatását egéren vizsgált megtelepedéssel határozzuk meg, ahogyan azt Baqar leírta [Infect. & Immun., 63:3731-3735 (1995)].

A *C.jejuni* 81-176 baktériumot az 5. példában leírtak szerint növesztjük és gyűjtjük össze. A sejteket 0,075 %-os formalinnal inaktiváljuk a fentiekben ismertetett módon. 6-8 hetes, nőstény Balb/c egerekből öttagú csoportokat képezünk, és az állatoknak szájon át három dózist (térfogata 0,25 ml/dózis endotoxin-mentes PBS-ben) adunk be. Az egyes dózisok 10^5 , 10^7 vagy 10^9 inaktivált baktériumot tartalmaznak 25 μ g hőlabilis *E.coli* enterotoxinnal (LT) vagy anélkül. A dózisokat 48 órás időközökkel adjuk be, és közvetlenül utána két 0,5 ml 5 %-os nátrium-hidrogén-karbonát oldatot (pH = 8,5) is beadunk 15 perces időközökkel, hogy semlegesítsük a gyomorsavat. A kontroll állatok csak PBS-t kapnak önmagában vagy LT adjuvánssal. Körülbelül 28 nappal a harmadik dózis beadása után, a vakcinált állatokat orron vagy szájon át megfertőztük 10^8 telepképző egységnyi (CFU), a szokásos módon te élő *C.jejuni* 81-176 baktériummal. Az intesztinális megtelepedés

időtartamát a széklettel való ürítés naponkénti vizsgálatával követjük nyomon 9 napon át. A székletet steril PBS-ben emulgeáljuk és a kivett mintát *Campylobacter* tenyésztéséhez használt véres agaron lemezeljük. A lemezeket 35°C hőmérsékleten, mikroaerofill körülmények között tartjuk (*Campylobacter* GasPak, BBL) 3-5 napon át. A megbetegedés eredményességét az adott mintavételi napon a *Campylobacter* ürítő állatok százalékában fejezzük ki.

Amint a 7. ábra mutatja, valamennyi orron keresztül megfertőzött állat - az immunizáltak és a kontroll állatok egyaránt - mikroorganizmus ürítenek közvetlenül a fertőzés után (1. nap). A kontroll állatok 80- 100 %-ában a mikroorganizmus megtelepedett marad a fertőzést követő 9 napon át. Ezzel szemben a vakcinált csoportban szignifikánsan kevesebb állat ürít mikroorganizmust a 9 napos vizsgálati periódus alatt. A fertőzött állatok kitisztulásának mértéke és ideje a beadott vakcina mennyiségétől függ. Az alacsony (10^5 baktérium/dózis) és a közepes (10^7 baktérium/dózis) vakcinadózis fokozatos és tökéletlen kitisztítást eredményez. Az adjuváns jelenléte fokozza e dózisok védőhatását. Meglepő módon a magas dózissal (10^9 baktérium/dózis) az adjuvánst nem tartalmazó vakcina azonos vagy kissé erősebb védelmet nyújt, mint az ugyanilyen dózis LT adjuvánssal.

Hasonló eredményeket kapunk az orálisan vakcinált állatok fertőzésénél (8. ábra). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a jelen találmány szerint tenyésztett és inaktivált *Campylobacter*rel történő immunizálás védelmet nyújt az utána bekövetkező élő *Campylobacter*rel végzett fertőzéssel szemben, és az immunizáció még akkor is hatásos, ha szájon át végezzük és

adjuvánst sem alkalmazunk.

Ugyancsak vizsgáltuk a jelen találmány szerint (például 5. példa) tenyésztett, formalinnal rögzített teljes sejt *Campylobacter jejuni* intraperitoneálisan (IP) beadott dózisainak védőhatását is. A kísérleteknél egy csoportba 20 nőtény Balb/c egeret kezelünk egyszeri dózissal, mely 0,5 ml endotoxin-mentes PBS-ben $1,3 \times 10^{10}$, $2,5 \times 10^9$, $5,0 \times 10^8$, $1,0 \times 10^8$, illetve $2,0 \times 10^7$ inaktivált *C.jejuni* sejtet tartalmaz adjuváns nélkül. 14 nappal később az állatokat élő *C.jejuni* 81-176 egyszeri letális dózissal (kb. $1,0 \times 10^{10}$ CFU endotoxin-mentes PBS-ben) fertőzzük meg, a dózist intraperitoneálisan bejuttatva. 4 napon át figyeljük az állatok napi mortalitását.

Amint a 17. táblázat mutatja $5,0 \times 10^8$ inaktivált *C.jejuni* egyszeri intraperitoneális dózisa indukál olyan immunválaszt, mely az élő *C.jejuni* fertőzéssel szembeni védelemhez szükséges.

XVII. T Á B L Á Z A T

A találmány szerint tenyésztett és inaktivált, IP bejuttatott *C.jejuni* védőhatása

dózis	mortalitás				túlélés
	1	2	3	4 nap	
$1,3 \times 10^{10}$	0	4	0	0	16
$2,5 \times 10^9$	0	0	0	0	20
$5,0 \times 10^8$	0	0	0	0	20
$1,0 \times 10^8$	11	7	0	0	2
$5,0 \times 10^7$	10	6	2	0	2
BPS kontroll	4	3	2	0	1

Az alábbi példákban szemléltetjük hogy a DOC fokozza Shigella behatolókéességét, Congo-vörös megkötését és az immunológiai keresztreaktivitást.

35. példa

Az in vitro növesztett Shigella behatolókéességét a tenyészet növekedési fázisa befolyásolja. A Shigella flexneri 2457T behatolókéességét a 28. példában leírtak szerint vizsgáljuk a következő tenyészeteknél: hagyományosan növesztett (BHI); a találmány szerint, például a 9. példában leírtak alapján növesztett (DOC-EL) (a sejtek korai log fázisú tenyészetből származnak); a 9. példa szerint növesztett, de a sejtek késői log fázisban lévő tenyészetből származnak (DOC-LL). Az eredmények azt mutatják, hogy a DOC jelenlétében történő tenyésztésnél fokozódik a behatolókéesség és a maximum a korai log fázisban érhető el (9. ábra).

A találmány szerinti, DOC jelenlétében történő tenyésztés ugyancsak fokozza más Shigella fajok, például a S.sonnei, S.Dysenteriae behatolókéességét is (10. ábra). Polarizált hámsejteknél a Shigella fokozott behatolókéessége csak akkor figyelhető meg, ha a hámsejteket bazolaterálisan fertőzzük a baktériummal. Ez a megfigyelés megfelel az in vivo megfigyelt behatolási folyamatnak.

Az összehasonlító vizsgálatok mutatják, hogy a jelen találmány szerint növesztett Shigella közel tízszer olyan fertőzőképes, mint a Pope és munkatársai [Infect. & Immun., 63:3642-3648 (1995)] szerint tenyésztett Shigella.

36. példa

A jelen találmány szerint tenyésztett Shigella fokozott Congo-vöröst megkötő képességet is mutat. A 26. példában leírt, a festéket megkötő képesség vizsgálatához a Shigella flexneri 2457T és S.sonnei baktériumokat a szokásos módon, (BHI), illetőleg a jelen találmány szerint (például 9. példa) tenyésztjük. Az eredmények azt mutatják, hogy a DOC jelenlétében növekvő Shigella fajok Congo-vörös festéket megkötő képessége 10-20-szorosára növekszik (XVIII. táblázat).

XVIII. T Á B L Á Z A T

A szokásos módon (BHI), illetve a találmány szerint növesztett („fokozott aktivitású”) S.flexneri és S.sonnei Congo-vörös festéket megkötő képessége

törzs	<u>tenyésztési körülmények</u>	
	BHI	fokozott aktivitású
S.flexneri 2457T	0,04	0,44
S.sonnei	0,02	0,40

A Shigella 4 fajra és különféle szérumtípusokra oszlik. A jelen találmány szerint növesztett Shigella flexneri immunológiai keresztreaktivitását a 28. példában leírt agglutinációs módszerrel vizsgáljuk. A vizsgálatokhoz immunizált nyulak antiszérumát használjuk, hogy megállapítsuk a tenyésztési körülmények hatását az eltérő Shigella fajok immunológiai keresztreaktivitása. A nyulakat formalinnal rögzített Shigella flexneri 2457T baktériummal immunizáljuk a 9. példában leírt módon. Az

immunizált állatokból nyert IgG antitestek agglutinációs aktivitását a hagyományos és a találmány szerint (például 9. példa) tenyésztett, mind a 4 Shigella fajjal szemben vizsgáljuk. Az agglutinációs vizsgálatok eredményei azt mutatják, hogy a DOC jelenléte lényegesen növeli a homológ Shigella flexneri és a három heterológ Shigella faj anti-S.flexneri antitestekkel szembeni agglutinációs aktivitását (11. ábra).

Az alábbi példában a Shigella vakcina hatékonyságát szemlélítjük.

37. példa

A jelen találmány szerint növesztett, formalinnal rögzített teljes sejt Shigella flexneri védőhatását az orron át fertőzött egereken vizsgáljuk C.P. Mallett és munkatársai [Vaccine, 11:190-196 (1993)] módszerével. Röviden, a Shigella flexneri baktériumot például a 9. példában leírtak szerint növesztjük és gyűjtjük össze, majd a 30. példában ismertetett módon 0,075 % formalinnal inaktiváljuk. Kb. 10^7 inaktivált baktériummal vakcinálunk 14-16 hetes, nőstény Balb/c egereket. Az inaktivált S.flexneri baktériumokat steril, endotoxin-mentes PBS-ben szuszpendáljuk 10^8 /ml koncentrációban, és 35 μ l szuszpenziót viszünk orron keresztül az enyhén érzéstelenített állatokba. Egy vizsgálati csoportba 10 állat tartozik. 14. napos intervallumonként három immunizálást végzünk.

Az adjuvánsoknak a Shigella teljes sejt vakcina védőképességére gyakorolt hatásának vizsgálatához, az állatok csoportjait olyan inaktivált baktérium vakcinával immunizáljuk, ami E.coli-

ból származó 5 µg hőlabilis enterotoxint (LT) is tartalmaz. 14 nappal a harmadik immunizáló kezelés után, az állatokat orron keresztül élő *S.flexneri* vagy *S.sonnei* szubletális dózissal (10^5 CFU) fertőzzük meg. Közvetlenül a fertőzés előtt, majd az azt követő ., 2., 5. és 7. napon az állatok súlyát megmérjük és meghatározzuk a csoport átlagát. Az eredményeket a XIX. táblázatban foglaltuk össze

XIX. T Á B L Á Z A T

Inaktivált Shigella flexneri teljes sejtes vakcina védőhatása egereknél az orron át bejuttatott élő S.flexneri vagy S.sonnei baktériumokkal szemben

fertőző mikroorganizmus	vakcinálás	fertőzés utáni testsúlyváltozás			
		1.	2.	5.	7. nap
<i>S.flexneri</i>	PBS	-8,1	-18,2	-17,7	-18,3
	vakcina	-5,4	-2,9	-2,5	-1,6
	vakcina +				
	adjuváns	-7,0	-2,0	-1,5	1,5
<i>S.sonnei</i>	PBS	-8,1	-17,5	-9,3	-6,4
	vakcina	-6,7	-11,3	-6,5	-6,0
	vakcina +				
	adjuváns	-6,4	-5,2	-1,3	-2,1

Minden csoportban 10 egeret immunizáltunk háromszor, orron keresztül 10^7 , a 9. példában leírtak szerint növesztett és inaktivált *S.flexneri* baktériummal.

A találmány szerint növesztett, inaktivált *S.flexneri* tartalmazó vakcinával immunizált egerek védelmet nyernek az élő *S.flexneri*vel szemben. Ezeknél az egereknél kisebb a súlyveszteség.

ség és gyorsabban visszanyerik súlyukat, mint a nem-vakcinált, azaz csak PBS-sel kezelt kontroll állatok. Meglepő módon az *S.flexneri* vakcina az egereket az élő *S.flexneri* baktériumokkal történő fertőzéssel szemben is megvédi. Érdekes módon az LT adjuvánst nem tartalmazó vakcinát kapott állatok jobb védelmet nyernek a homológ *S.flexneri* fertőzéssel szemben, mint azokat az állatok, melyek adjuvánst is tartalmazó vakcinával immunizálunk. A csak *S.flexneri* baktériumot tartalmazó vakcina a heterológ *S.sonnei* ellen is védelmet nyújt. Az LT adjuváns jelenléte viszont észrevehetően fokozza az *S.sonnei* fertőzéssel szembeni védelmet. Ezek az eredmények jelzik, hogy a jelen találmány szerint előállított, inaktivált *Shigella* baktériumot tartalmazó vakcina hatékony egy ismert *Shigella* megbetegedés modell esetében, és nincs szükség adjuvánsra ahhoz, hogy védelmet nyújtson a különféle *Shigella* fertőzésekkel szemben vagy, hogy a fertőzést enyhíteni lehessen vele.

Az alábbi példában azokat a tényezőket szemléltetjük, melyek befolyásolják a *H.pylori* állati sejteken való megtapadást.

38. példa

A *H.pylori* megtapadását fokozza a glikokolát vagy az epe jelenlétében történő tenyésztés. A *H.pylori* NB3-2 vagy G-1-4 törzsek sejtjeit 4 % szarvasmarha szérumot tartalmazó BHI tápközeghez adjuk. Beoltás előtt az edényt 10 % CO₂, 5 % O₂ és 85 % N₂ összetételű gázeleggyel öblítjük át, majd a tenyészetet 22 órán keresztül rázatjuk 37°C hőmérsékleten. Az inkubálás után a tenyészetet 10 edényben hígítjuk, melyek mindegyike 1 liter BHI

tápközeget tartalmaz, kiegészítve 4 % szarvasmarha szérummal és különböző koncentrációjú szarvasmarha epével (0,025-0,2 %). Ezeket az edényeket ismét átöblítjük az említett gázeleggyel, és 37°C hőmérsékleten inkubálunk. A baktériumokat különböző időben összegyűjtjük - a maximális koruk 18 órás -, majd a 28. példában leírt módszerrel vizsgáljuk az INT-407 sejtekhez való kötődésüket. Az eredmények azt mutatják, hogy az epe jelenlétében történő tenyésztésük fokozza a *H.pylori* INT-407 sejtekhez való kötődését (12. és 13. ábra).

Az NB3-2 törzs esetében kb. 8 óra növesztésnél jelentkező maximális kötődés 4-6-szorosa az epe távollétében növesztett baktériumokénak (12. ábra). A G1-4 törzs esetében ez a csúcs a 12 és 14 órás, 0,2 % epe jelenlétében történő növesztés között jelentkezik, a kötődés itt 2-3-szorosára nő az epe nélkül növesztett baktériumokhoz viszonyítva (13. ábra). Mindegyik törzs esetében ezeknek a „csúcsoknak” az ideje általában enybe esik a növekedés log fázisával.

Az alábbi példával a jelen találmány szerinti módszerrel növesztett *Helicobacter* vakcina hatékonyságát szemléltetjük.

39. példa

A találmány szerint növesztett, formalinnal rögzített *Helicobacter pylori* teljes sejteket tartalmazó vakcina védő hatását Chen és munkatársai módszerével [Lancet, 339:1120-1121 (1992)] határozzuk meg. A módszer a *Helicobacter felis* baktériumának az egér gyomrában való megtelepedésén alapszik. A *Helicobacter pylori* G1-4 törzset az oltóanyag elkészítéséhez 4 %

szarvasmarha szérummal kiegészített BHI tápközegben tenyésztjük 22 órán át, 37°C hőmérsékleten és 10 % CO₂, 90 % levegő összetételű gázelegy alatt. A tenyészet kivétjével beoltunk egy tízszeres térfogatú ugyanilyen tápközeget, ami 0,1 % (térf./térf.) szarvasmarha epét tartalmaz. 12-14 órás, 37°C hőmérsékleten való tenyésztés után a sejteket centrifugálással összegyűjtjük és az eredeti térfogat 1/10-ét kitevő Hank's Balanced Salts Solution (HBSS) közegben szuszpendáljuk szobahőmérsékleten. A sejteket ismét centrifugáljuk, majd ismét szuszpendáljuk az eredeti HBSS térfogat 0/100 részében. A pufferolt sejtsuszpenzióhoz 0,075 % koncentrációban formalint adunk, és a sejteket szobahőmérsékleten 6 órán át kevertetve, majd 18 órán át 4°C hőmérsékleten tartva inaktiváljuk.

A védőhatást a rutin eljárással mérjük, a 6-8 hetes nőtény Balb/c Helicobacter-mentes egereknek a 0., 7. és 14. vagy a 0., 7. és a 21. napon szájon át három dózisban beadott, inaktivált teljes sejteket tartalmazó vakcina beadását követően. Az egyes dózis 10⁹ baktériumot tartalmaz hőlabil E.coli enterotoxin jelenlétében. A harmadik immunizáló dózis beadását követő 14. napon az állatokat szájon át élő H.felis egyetlen dózissal (10⁷ CFU/dózis) fertőzzük.

Két héttel a fertőzés után az állatokat elöljük, és az antralis gyomorszegmensek ureáz aktivitását analizáljuk, hogy meghatározzuk a H.felis jelenlétét. Az ureázaktivitás meghatározásához az antralis szövetmintákat 0,5 ml Stuart's Urease Broth (Remel) reagensben inkubáljuk 4-24 órán át szobahőmérsékleten. Ez alatt az idő alatt az oldat színe pozitív ureázvizsgálat esetében pirosra változik.

Amint a XX. táblázat adatai mutatják, a *H. pylori* G-1-4 törzset alkalmazva, a fokozott aktivitású *Helicobacter* teljes sejteket tartalmazó vakcina beadásával az állatok megvédhetők az orális *H.felis* fertőzéssel szemben

XX. T Á B L Á Z A T

Helicobacter fertőzéssel szembeni védelem a jelen találmány szerinti módszerrel tenyésztett, inaktivált *H.pylori* baktériumot tartalmazó vakcinával

immunizáló ágens ^a	fertőzős mikro- organizmus (10 ⁷ CFU)	megtelepedett/ /összes	százalékos védelem
<u>1. kísérlet</u>			
<i>H.pylori</i> ^b	<i>H.felis</i>	4/13	71
PBS + LT	<i>H.felis</i>	9/9	0
<u>2. kísérlet</u>			
<i>H.pylori</i> ^b	<i>H.felis</i>	2/15	87
PBS + LT	<i>H.felis</i>	10/10	0

^a valamennyi ágens^t, 10 µg LT-vel (ETEC labilis toxin) együtt 3 dózisban, szájon át adjuk be 7 napos időközönként

^b 0,25 ml-ben beadva 1x10⁹ CFu G1-4 törzs.

A kísérletek eredményei mutatják a bélbaktériumok fokozottan aktív tulajdonságainak jelentőségét az in vivo immunizálásban.

A jelen találmány módszerével olyan baktériumokat állítunk elő, melyek képesek védelmet nyújtó immunogén választ kiváltani, és ezáltal felhasználhatók vakcinaként.

Az American Type Culture Collection törzsgyűjteményben

(12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USA) az alábbi mikroorganizmusokat helyeztük letétbe:

<u>mikroorganizmus</u>	<u>letéti szám</u>	<u>letétbehelyezés ideje</u>
<u>Helicobacter pylori NB3-2</u>		1995. szeptember 29.
<u>Helicobacter pylori G1-4</u>		1995. szeptember 29.

A jelen találmány eljárásaival ekvivalens más eljárások a szakemberek részéről könnyen meghatározhatók, és ezek beletartoznak a találmány oltalmi körébe. A leírás valamennyi lényegesnek tartott információt tartalmazza ahhoz, hogy egy szakember az igénypontokban összefoglaltakat a gyakorlatban megvalósíthassa. Minthogy az ideért szabadalmak és publikációk további hasznos információkat nyújthatnak, valamennyi idézett anyag a találmány referenciájába beépített.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás fokozott antigénaktivitású bélbaktériumok, nevezetesen *Campylobacter* sp., *Yersinia* sp., *Bacteroides* sp., *Klebsiella* sp., *Gastrospirillum* sp., *Enterobacter* sp., *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Aeromonas* sp., *Vibrio* sp., *Clostridium* sp., *Enterococcus* sp. és *Escherichia coli* előállítására, mely abból áll, hogy a bélbaktérium tenyészetét a korai log fázis, a korai log fázis és a stationer fázis közti vagy a stationer fázis állapotának eléréséig szükséges idő át in vitro növesztjük a környezeti tényezők alábbi kombinációja mellett:

- a) 0,05-3 % epe vagy 0,025-0,6 % egy vagy több epesav vagy sói jelenlétében;
- b) 30-42°C hőmérsékleten;
- c) levegő alatt mikroaerofill körülmények között, ahol a mikroaerofill körülmény (i) 5-20 % CO₂, 80-95 % levegő, vagy (ii) 5-10 % O₂, 10-20 % CO₂, 70-85 % N₂ összetételű gázelegyet jelent; és
- d) kétértékű kation-kelátképző jelenlétében, amit 0-100 µM BAPTA/AM, 1-10 mM EGTA vagy 0-100 µM EGTA/AM közül választunk ki.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, ahol a nevezett epesavsó a deoxikolát vagy a glikokolát.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, ahol a nevezett bélbaktérium egy *Campylobacter* sp.

4. A 3. igénypont szerinti eljárás, ahol a nevezett bélbaktérium a *Campylobacter jejuni* vagy a *Campylobacter coli*.

5. A 4. igénypont szerinti eljárás, ahol a nevezett *Campylobacter jejuni* az alábbi törzsek valamelyike:

Campylobacter jejuni 134, 195, 170, 81-176, 6, 81-116, 35, 52, VC-167, 88, 244, 544, 699, 1180, 910 vagy HC.

6. Az 5. igénypont szerinti eljárás, ahol a *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter jejuni* 81-176 törzs, melynek tenyésztését a stationer fázis állapot eléréséig szükséges időn át növesztjük a környezeti tényezők alábbi kombinációja mellett:

- a) 0,1 % epesavsó - ami deoxikolát - vagy 0,8 % epe jelenlétében;
- b) 37°C hőmérsékleten;
- c) 10-20 % CO₂ és 80-90 % levegő összetételű gázelegyenben.

7. Az 1. igénypont szerinti eljárás, ahol a nevezett bélbaktérium egy *Shigella* sp.

8. A 7. igénypont szerinti eljárás, ahol a nevezett bélbaktérium az alábbi *Shigella* fajok valamelyike:
S.flexneri, *sonnei*, *dysenteriae* vagy *boydii*.

9. A 8. igénypont szerinti eljárás, ahol a nevezett *Shigella* a *Shigella flexneri* vagy a *Shigella dysenteriae*.

10. A 9. igénypont szerinti eljárás, ahol a nevezett

Shigella flexneri a *Shigella flexneri* 2457T törzs, melynek tenyészetét a korai log fázis állapot eléréséig szükséges időn át növesztjük, a környezeti tényezők alábbi kombinációja mellett:

- a) 0,1 % deoxikolát vagy 0,8 % epe jelenlétében;
- b) 37°C hőmérsékleten;
- c) levegő alatt.

11. Az 1. igénypont szerinti eljárás, ahol a nevezett bélbaktérium egy *Yersinia* sp.

12. Az 1. igénypont szerinti eljárás, ahol a nevezett bélbaktérium az *Escherichia coli*.

13. A 12. igénypont szerinti eljárás, ahol a nevezett *Escherichia coli* egy entero-toxikus, entero-hemorrhagiás, entero-patogén vagy entero-invazív *Escherichia coli*.

14. Az 1. igénypont szerinti eljárás, ahol a nevezett bélbaktérium egy *Vibrio* sp.

15. Az 1. igénypont szerinti eljárás, ahol a nevezett bélbaktérium egy *Salmonella* sp.

16. Az 1. igénypont szerinti eljárás, ahol a nevezett bélbaktérium egy *Bacteroides* sp.

17. Az 1. igénypont szerinti eljárás, ahol a nevezett bélbaktérium egy *Clostridium* sp.

18. Az 1. igénypont szerinti eljárás, ahol a nevezett bélbaktérium egy *Enterococcus* sp.

19. Az 1. igénypont szerinti eljárás, ahol a nevezett bélbaktérium egy *Klebsiella* sp.

20. Az 1. igénypont szerinti eljárás, ahol a nevezett bélbaktérium egy *Enterobacter* sp.

21. Az 1. igénypont szerinti eljárás, ahol a nevezett bélbaktérium egy *Gastrospirillum* sp.

22. Eljárás fokozott antigénaktivitású bélbaktérium, nevezetesen *Campylobacter* sp., *Yersinia* sp., *Bacteroides* sp., *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp., *Gastrospirillum* sp., *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Aeromonas* sp., *Vibrio* sp., *Clostridium* sp., *Enterococcus* sp. és *Escherichia coli* előállítására, mely abból áll, hogy a bélbaktérium tenyészetét a korai log fázis, a korai log fázis és a stationer közötti vagy a stationer fázis állapot eléréséig szükséges időn át in vitro növesztjük a környezeti tényezők alábbi kombinációja mellett:

- a) kétértékű kation-keletképző jelenlétében, amit 1,0-25 μM BAPTA/AM, 0,5-10 mM EGTA vagy 1,0-100 μM EGTA/AM közül választunk ki;
- b) 30-42°C hőmérsékleten;
- c) levegőn vagy mikroaerofill körülmények között, ahol a mikroaerofill körülmény (i) 5-20 % CO_2 és 80-95 % levegő, vagy

(ii) 5-20 % CO₂ és 80-95 % N₂, vagy (iii) 5-10 % O₂, 10-20 % CO₂ és 70-85 % N₂ összetételű gázelegyet jelent.

23. Fokozott antigénaktivitású bélbaktérium, nevezetesen *Campylobacter* sp., *Yersinia* sp., *Bacteroides* sp., *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp., *Gastropirillum* sp., *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Aeromonas* sp., *Vibrio* sp., *Clostridium* sp., *Enterococcus* sp. vagy *Escherichia coli*, mely bélbaktériumot olyan tenyészetből gyűjtjük össze, ahol a bélbaktérium tenyésztét a korai log fázis, a korai log fázis és a stationer fázis, vagy a stationer fázis állapot eléréséig in vitro a környezeti tényezők alábbi kombinációja mellett növesztettünk:

- a) 0,05-3 % epe vagy 0,025-0,6 % egy vagy több epesav vagy sói jelenlétében;
- b) 30-42°C hőmérsékleten;
- c) levegő alatt mikroaerofill körülmények között, ahol a mikroaerofill körülmény (i) 5-20 % CO₂, 80-95 % levegő, vagy (ii) 5-20 % CO₂, és 80-95 % N₂ vagy (iii) 5-10 % O₂, 10-20 % CO₂ és 70-85 % N₂ összetételű gázelegyet jelent; és
- d) kétértékű kation-kelátképző jelenlétében, amit 0-100 µM BAPTA/AM, 0-10 mM EGTA vagy 0-100 µM EGTA/AM közül választunk ki.

24. A 23. igénypont szerinti bélbaktérium, ahol a nevezett epesavsó deoxikolát vagy glikokolát.

25. A 23. igénypont szerinti bélbaktérium, ahol a nevezett bélbaktérium egy *Campylobacter* sp.

26. A 25. igénypont szerinti bélbaktérium, ahol a nevezett *Campylobacter* sp. a *Campylobacter jejuni* vagy a *Campylobacter coli*.

27. A 26. igénypont szerinti bélbaktérium, ahol a nevezett *Campylobacter jejuni* az alábbi törzsek valamelyike:
Campylobacter jejuni 134, 195, 170, 81-176, 6, 81-116, 35, 52, VC-167, 88, 244, 544, 699, 1180, 910 vagy HC.

28. A 27. igénypont szerinti bélbaktérium, ahol a nevezett *Campylobacter jejuni* törzs a 81-176 törzs, amelynek tenyésztését stationer fázisig növesztjük a környezeti tényezők alábbi kombinációja mellett:

- a) 0,1 % deoxikolát vagy 0,8 % epe jelenlétében;
- b) 37°C hőmérsékleten;
- c) 10-30 % CO₂ és 80-90 % levegő összetételű gázelegyenben.

29. A 23. igénypont szerinti bélbaktérium, ahol a nevezett bélbaktérium egy *Shigella* sp.

30. A 29. igénypont szerinti bélbaktérium, ahol a nevezett *Shigella* faj a *Shigella flexneri*, *sonnei*, *dysenteriae* vagy *boydii*.

31. A 30. igénypont szerinti bélbaktérium, ahol a nevezett bélbaktérium a *Shigella dysenteriae*.

32. A 30. igénypont szerinti bélbaktérium, ahol a nevezett bélbaktérium a *Shigella flexneri*.

33. A 32. igénypont szerinti bélbaktérium, ahol a nevezett *Shigella flexneri* a *Shigella flexneri* 2457T törzs, melynek tenyészetét a korai log fázisig növesztjük a környezeti tényezők alábbi kombinációja mellett:

- a) 0,1 % doxikolát vagy 0,8 % epe jelenlétében;
- b) 37°C hőmérsékleten;
- c) levegő alatt.

34. A 23. igénypont szerinti bélbaktérium, ahol a nevezett bélbaktérium az *Escherichia coli*.

35. A 34. igénypont szerinti bélbaktérium, ahol a nevezett *Escherichia coli* egy enterotoxikus, enterohaemorrhagiás, enteropathogén vagy enteroinvazív *Escherichia coli* törzs.

36. A 23. igénypont szerinti bélbaktérium, ahol a nevezett bélbaktérium egy *Vibrio* sp.

37. A 23. igénypont szerinti bélbaktérium, ahol a nevezett bélbaktérium egy *Salmonella* sp.,

38. A 23. igénypont szerinti bélbaktérium, ahol a nevezett bélbaktérium egy *Bacteroides* sp.

39. A 23. igénypont szerinti bélbaktérium, ahol a nevezett

bélbaktérium Clostridium sp.

40. A 23. igénypont szerinti bélbaktérium, ahol a nevezett bélbaktérium egy Enterococcus sp.

41. A 23. igénypont szerinti bélbaktérium, ahol a nevezett bélbaktérium egy Klebsiella sp.

42. A 23. igénypont szerinti bélbaktérium, ahol a nevezett bélbaktérium egy Enterobacter sp.

43. A 23. igénypont szerinti bélbaktérium, ahol a nevezett bélbaktérium egy Gastrospirillum sp.

44. Fokozott antigénaktivitású bélbaktérium, nevezetesen Camylobacter sp., Yersinia sp., Bacteroides sp., Klebsiella sp., Gastrospirillum sp., Enterobacter sp., Salmonella sp., Shigella sp., Aeromonas sp., Vibrio sp., Clostridium sp., Enterococcus sp. vagy Escherichia coli, mely bélbaktériumot olyan tenyészetből gyűjtjük össze, ahol a bélbaktérium tenyészetét a korai log fázis és a stacioner fázis eléréséig in vitro a környezeti tényezők alábbi kombinációja mellett növesztettük:

- a) kétértékű kation-keletképző jelenlétében, amit 1,0-25 μM BAPTA/AM, 0,5-10 mM EGTA vagy 1,0-100 μM EGTA/AM közül választottunk ki;
- b) 30-42°C hőmérsékleten;
- c) levegőn vagy mikroaerofill körülmények között, ahol a mikro-

aerofill körülmény (i) 5-20 % CO₂ és 80-95 % levegő, (ii) 5-20 % CO₂ és 80-95 % N₂, vagy (iii) 5-10 % O₂, 10-20 % CO₂ és 70-85 % N₂ összetételű gázelegyet jelent.

45. Vakcina, mely a 23., 26., 28., 29., 30. vagy 33-44 igénypont szerinti bélbaktériumot, immunogén fragmensét vagy származékát tartalmazza.

46. A 45. igénypont szerinti vakcina, mely gyógyászati szempontból alkalmazható vívőanyagot vagy közeganyagot tartalmaz.

47. A 45. igénypont szerinti vakcina, ahol a nevezett bélbaktérium inaktivált.

48. A 47. igénypont szerinti vakcina, ahol a nevezett bélbaktérium formalinos kezeléssel inaktivált.

49. A 45. igénypont szerinti vakcina, ahol a nevezett vakcina alkalmas a nyálkahártyán át történő vagy a parenterális bevitelre vagy a nyálkahártyán át történő és parenterális bevitelre.

50. A 45. igénypont szerinti vakcina, mely adjuvánst is tartalmaz.

51. Eljárás potenciálisan antimikrobiális tulajdonságú hatóanyag vizsgálatára, mely abból áll, hogy a 23., 26., 28., 29., 30. vagy 33-34. igénypont szerinti bélbaktériumot a nevezett hatóanyaggal érintkezésbe hozzuk, és vizsgáljuk a nevezett ható-

sztatikus hatását.

52. Eljárás gazdaszervezet bélbaktériumokkal szembeni antitestjeinek kimutatására a szervezetben vagy az abból nyert biológiai mintában, mely abból áll, hogy (a) a nevezett biológiai mintát érintkezésbe hozzuk a 23., 26., 28., 29., 30. vagy 33-34. igénypontok szerinti bélbaktériummal vagy fragmensével, és (b) vizsgáljuk az antitestnek a bélbaktériumhoz vagy fragmenséhez való kötődését.

53. Eljárás bélbaktériumok szervezetben vagy az abból származó biológiai mintában történő kimutatására, mely abból áll, hogy (a) a nevezett biológiai mintát érintkezésbe hozzuk olyan antitesttel, mely kötődik a 23., 26., 28., 29. 30. vagy 33-34. igénypont szerinti bélbaktériumhoz vagy szegmenséhez, és (b) vizsgáljuk az antitestnek bélbaktériumhoz vagy fragmenséhez való kötődését.

54. Immundiagnosztikai készlet egy gazdaszervezet bélbaktériumokkal szembeni antitesttermelésének vagy a bélbaktériumnak a kimutatására, mely a 23., 26., 28., 29., 30. vagy 33-44. igénypont szerinti bélbaktériumot vagy az elleni antitestet és az immunológiai vizsgálathoz szükséges valamennyi lényeges készletalkotórészt tartalmazza.

55. Eljárás antibakteriális antitestek termelésére élőlényekben, mely abból áll, hogy az élőlényt a 23., 26., 28., 29., 30. vagy 33-34. igénypont szerinti bélbaktériumot tartalmazó

immunogén hatásos mennyiségével immunizáljuk, ahol a bélbaktériumokkal szembeni antitestek a nevezett bélbaktériumhoz vagy komponenséhez kötődnek.

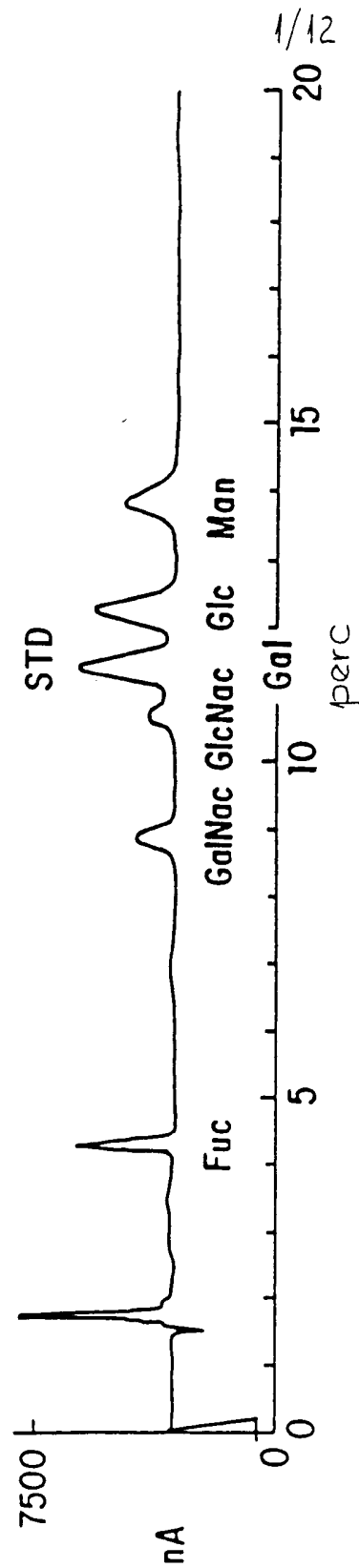
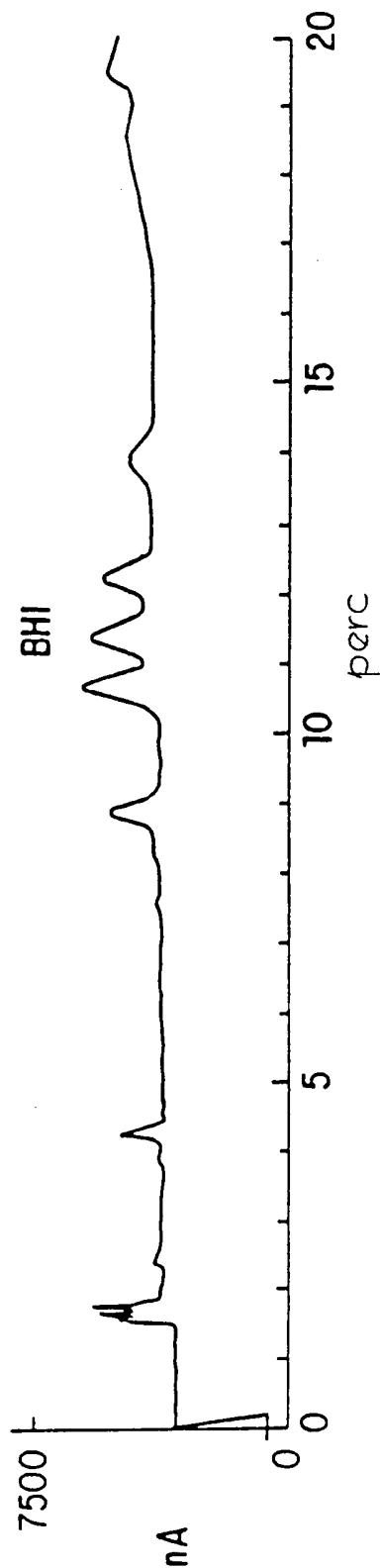
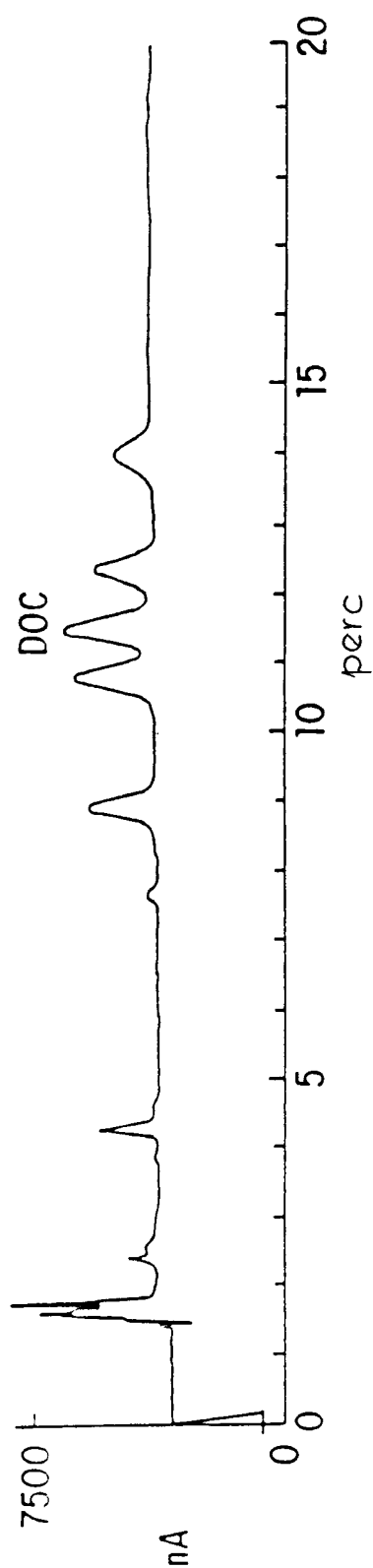
56. Eljárás élőlények immunválaszának stimulálására, mely abból áll, hogy a 23., 26., 28., 30. vagy 33-4. igénypont szerinti bélbaktériumot tartalmazó immunogén hatásos mennyiségét juttatjuk az élőlénybe, és a nevezett immunválasz az élőlény bélbaktérium, nevezetesen *Campylobacter* sp., *Yersinia* sp., *Bacteroides* sp., *Klebsiella* sp., *Gastrospirillum* sp., *Enterobacter* sp., *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Aeromonas* sp., *Vibrio* sp., *Clostridium* sp., *Enterococcus* sp. vagy *Escherichia coli* okozta fertőzését vagy betegségét megelőzi, enyhíti, illetve gyógyítja.

A meghatalmazott

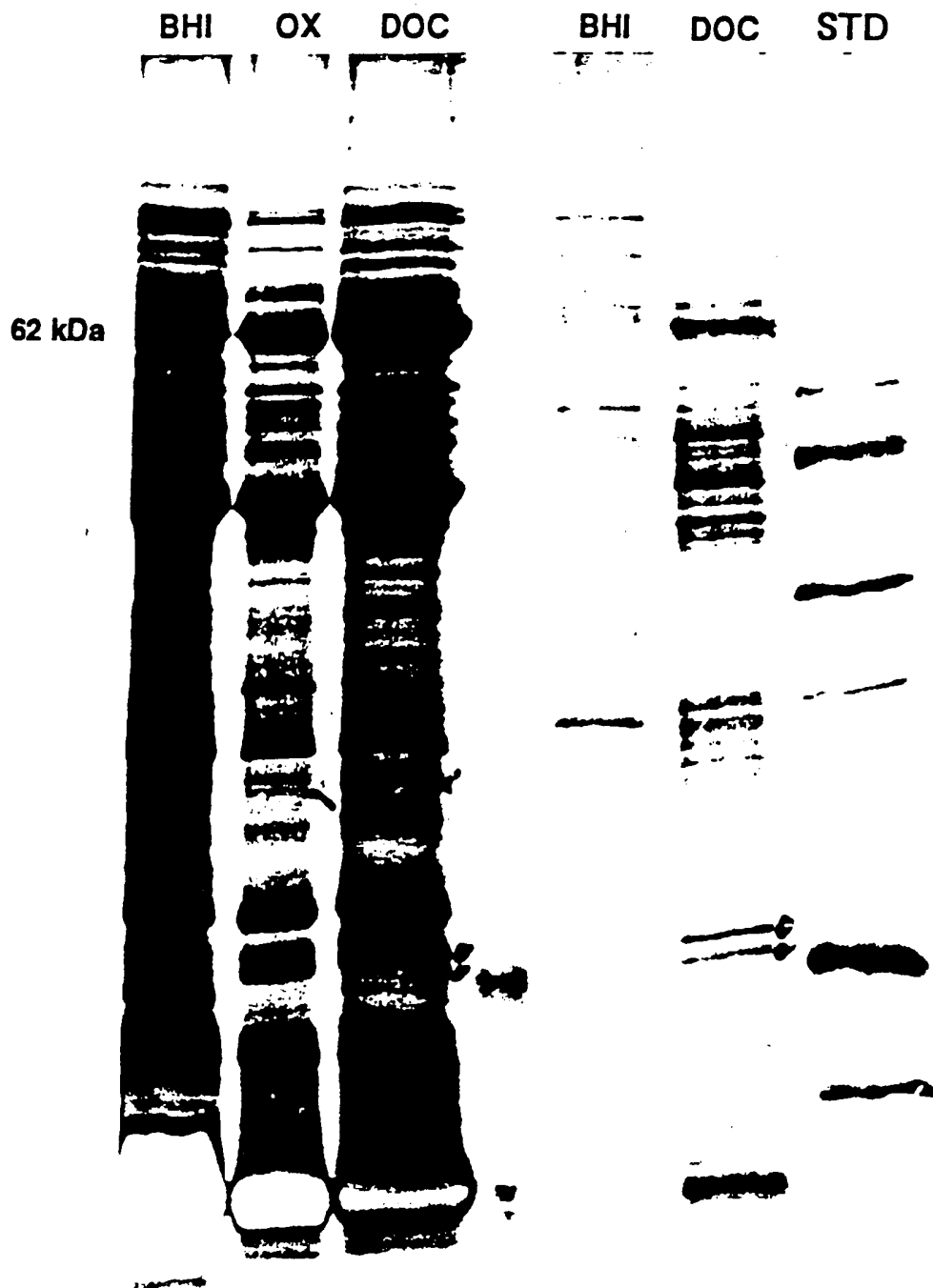
ifj. Szentpéteri Ádám

szabadalmi ügyvivő
az S.B.C. & K. Nemzetközi
Szabadalmi Iroda tagja
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 34-24-950; Fax: 34-24-323

35043



1/12



2. ábra

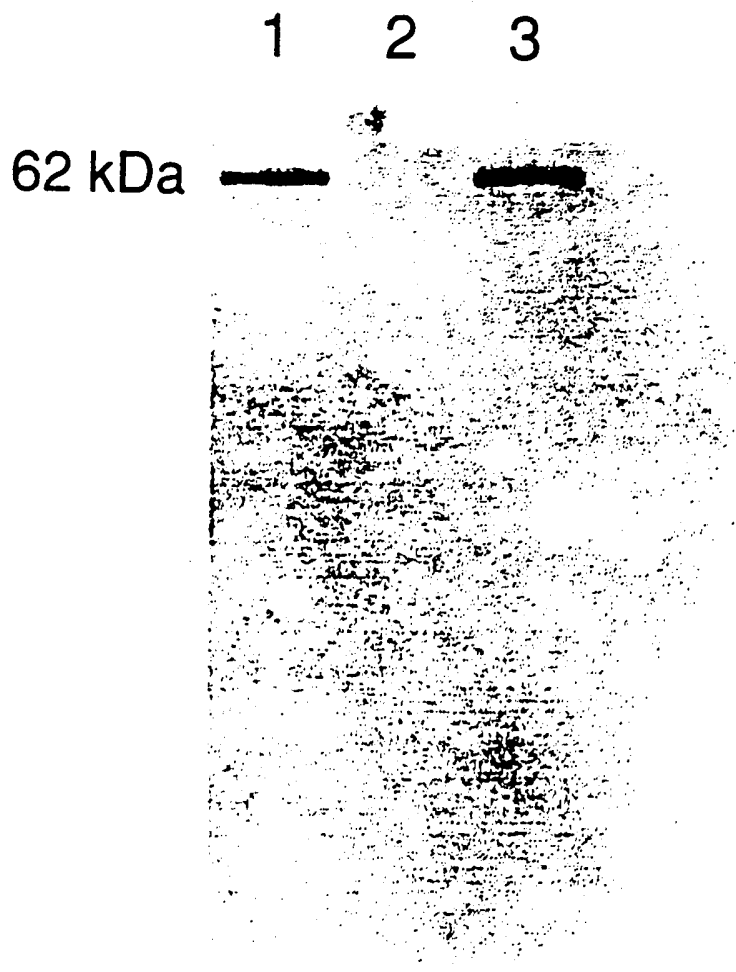
1 2 3 4 5

62 kDa



1. Sáv = BHI tenyészet
2. Sáv = BHI + 0.8% oxgall tenyészet
3. Sáv = BHI + 0.1% DOC tenyészet
4. Sáv = BHI tenyészet felületi kivonata
5. Sáv = BHI-DOC tenyészet felületi kivonata

3. ábra



1. Sáv = Fermentorban készült tenyészet
(fokozott aktivitású)
2. Sáv = Lombikban készült tenyészet
(szokásos körülmények közt)
3. Sáv = Lombikban készült tenyészet (fokozott aktivitású)

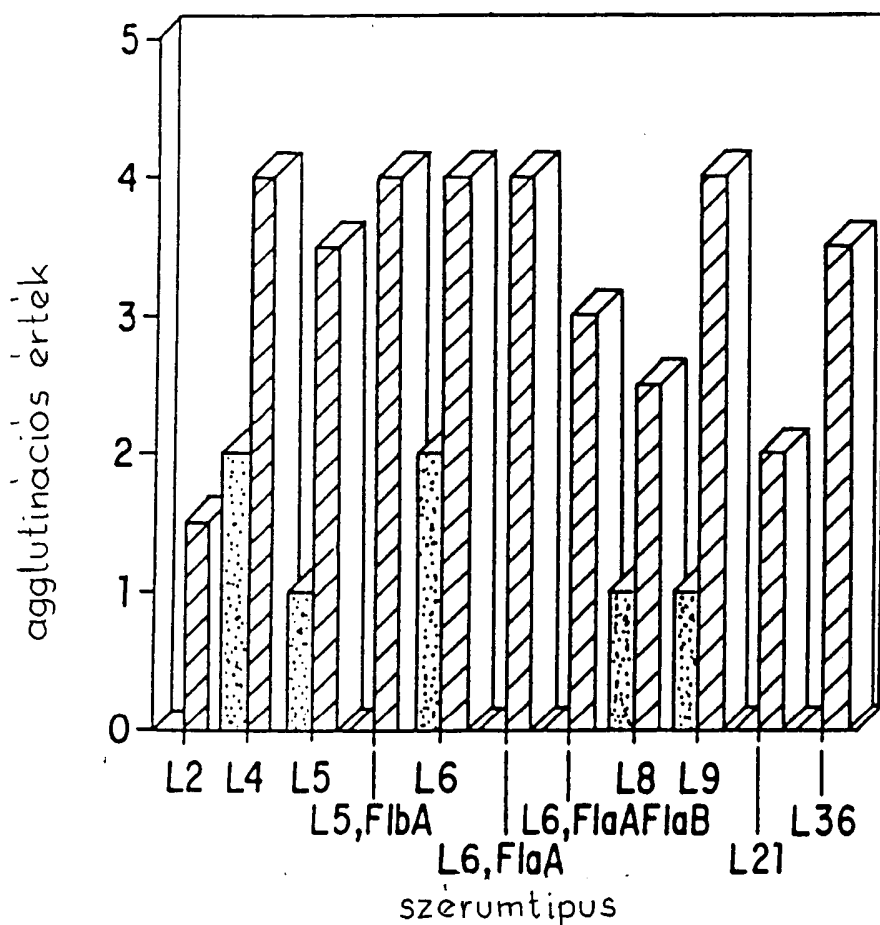
4. ábra



1

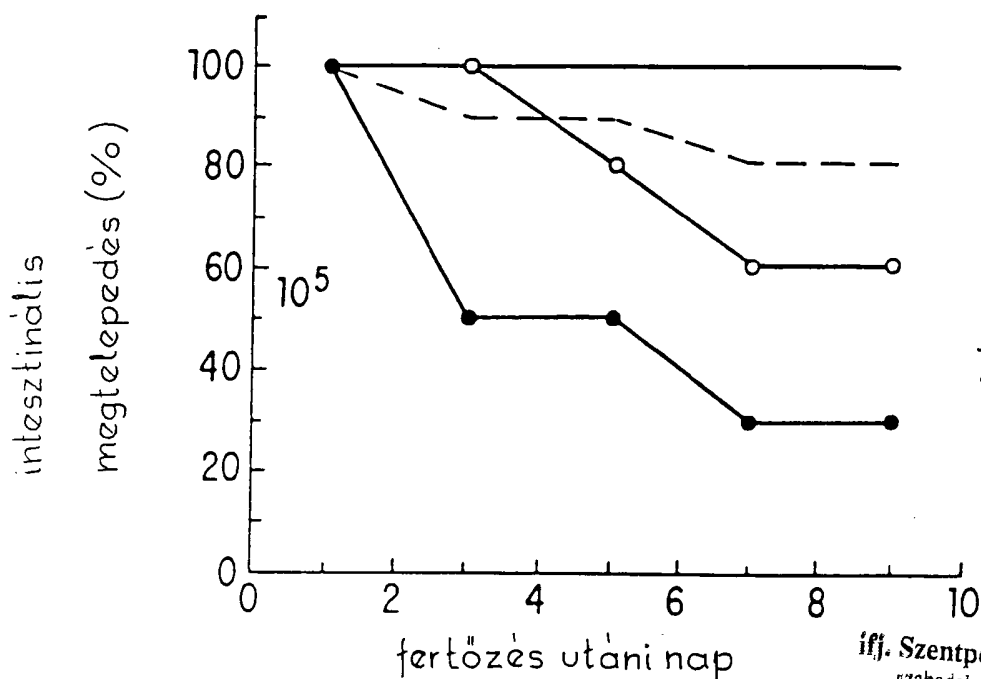
2

5. ábra

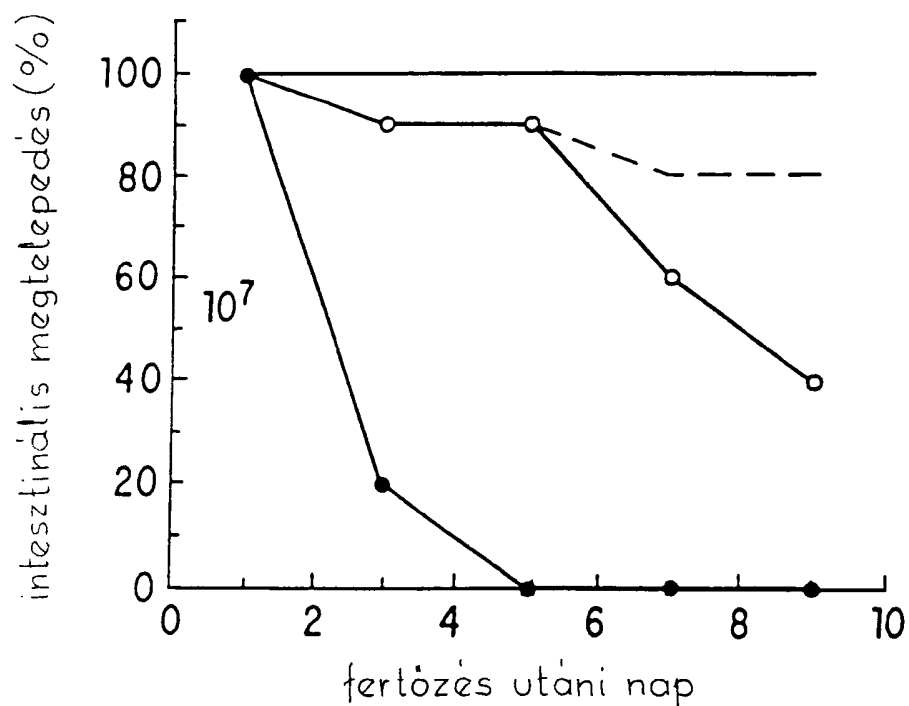


■ ANTI-C. JEJUNI 81-176, BHI körülmények mellett
 ▨ ANTI-C. JEJUNI 81-176, DOC jelenlétében } tenyésztett
 tenyésztett

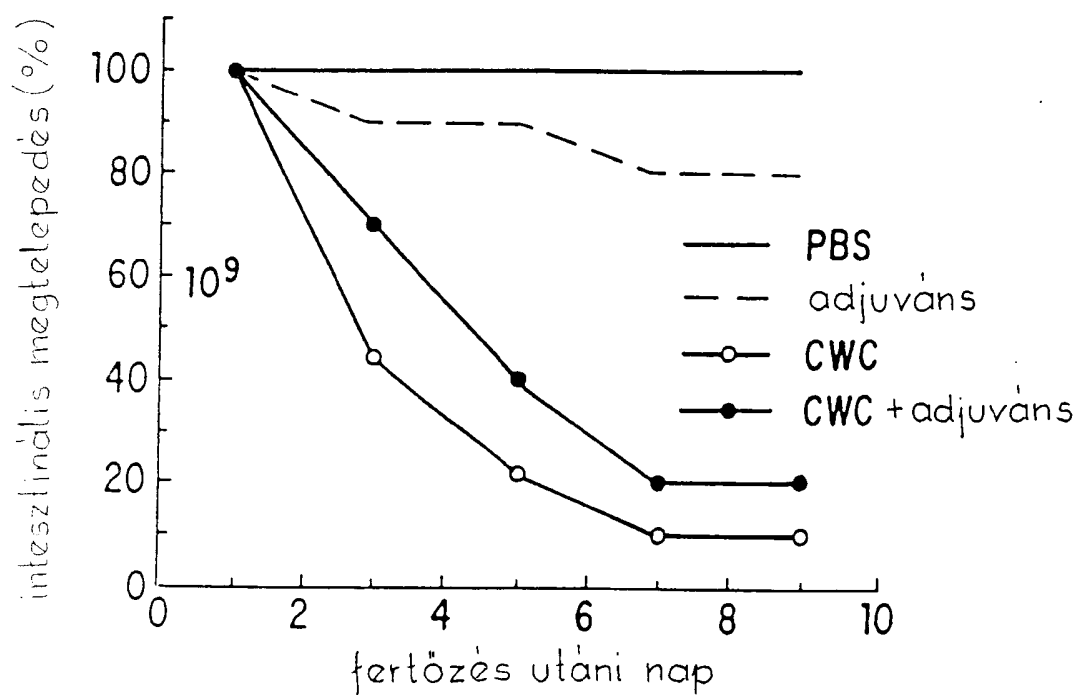
6. ábra



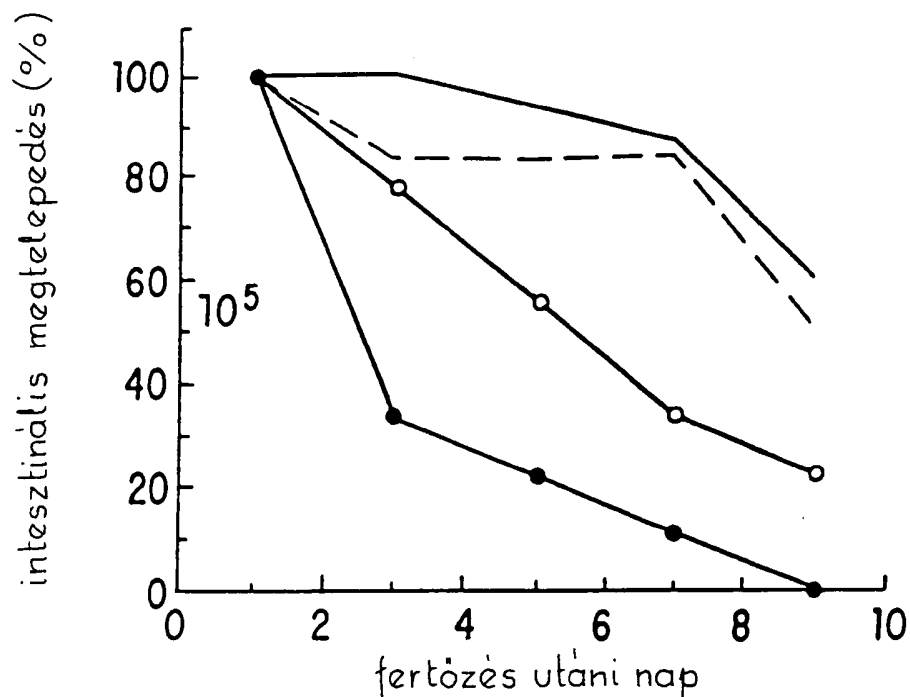
7A. ábra



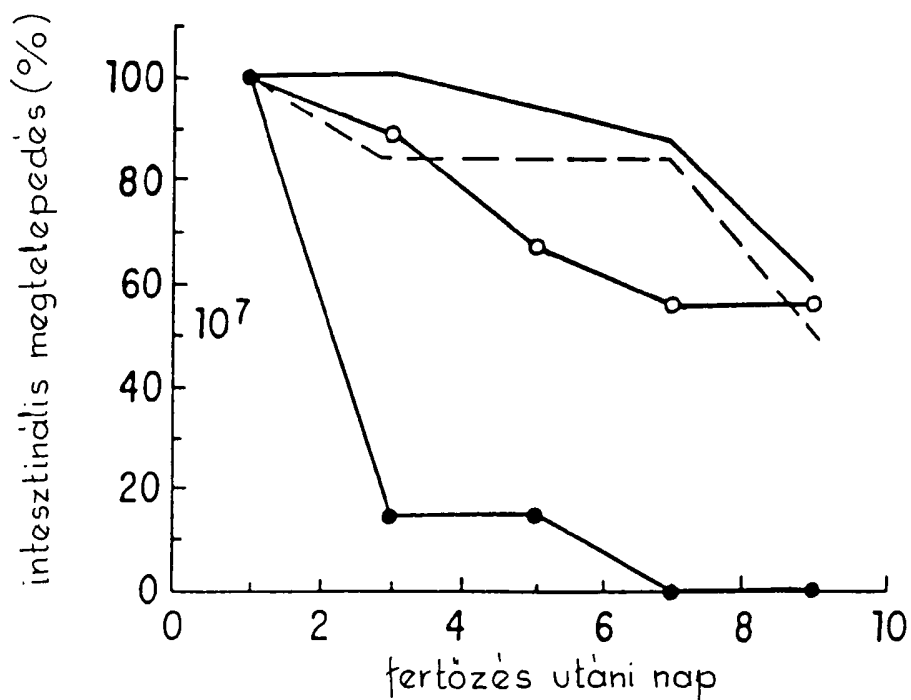
7B. ábra



7C. ábra

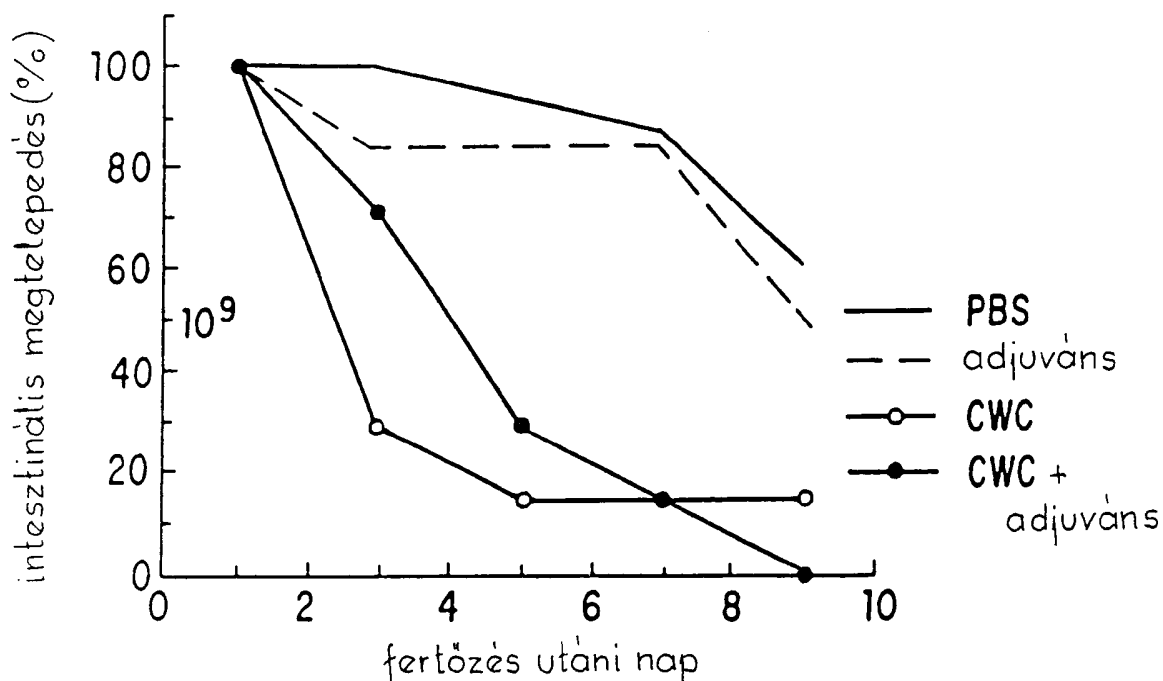


8A. ábra

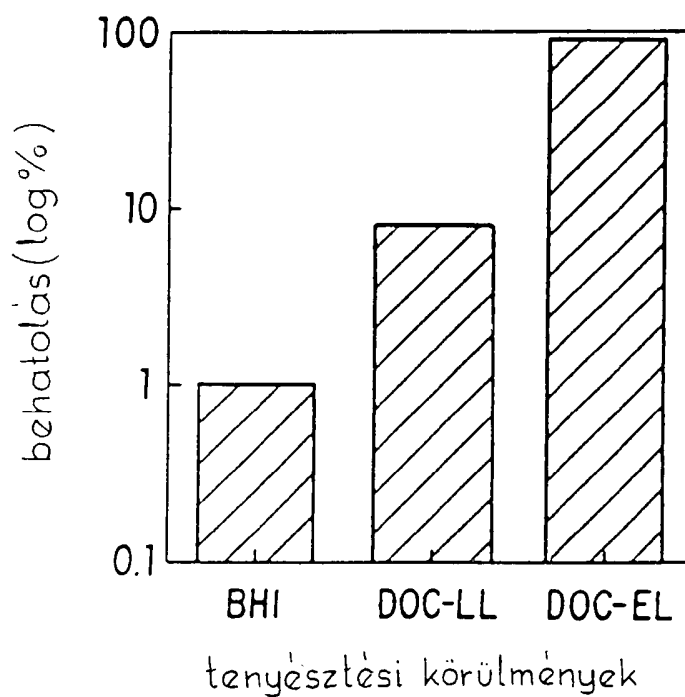


8B. ábra

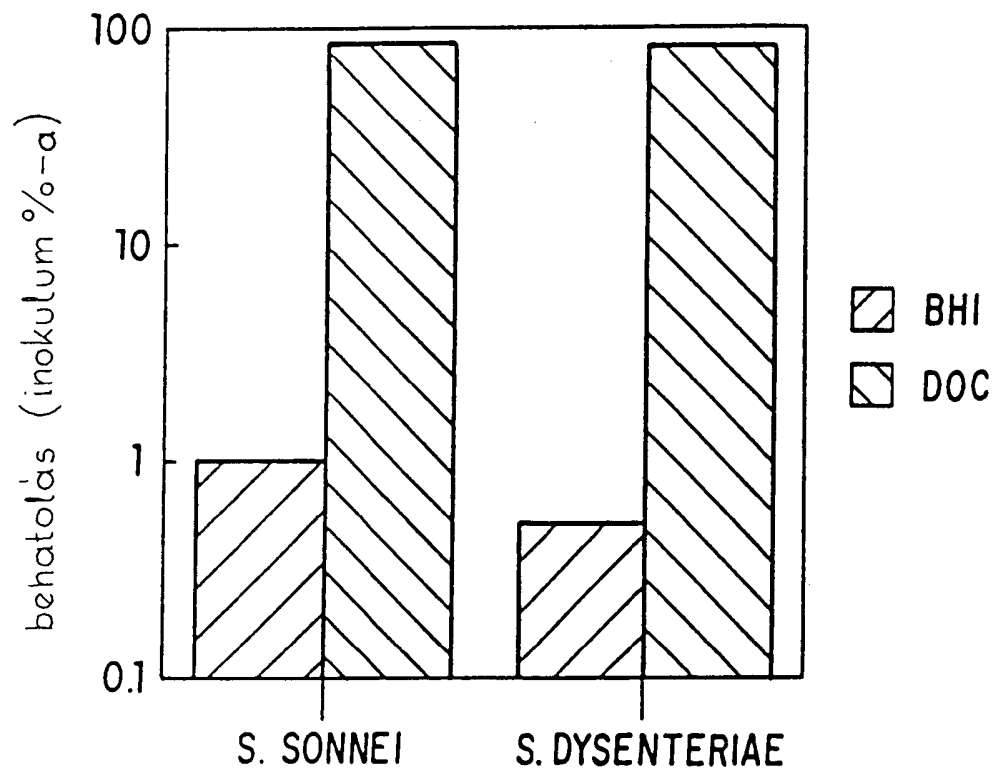
ifj. Szentpéteri Ádám
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Nemzetközi
Szabadalmi Iroda tagja
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-323



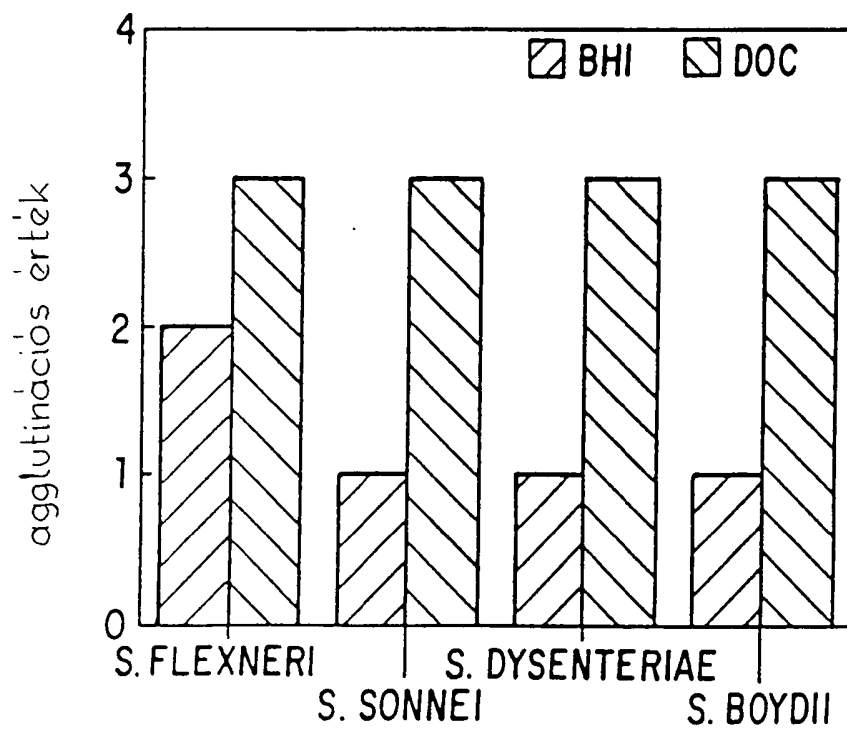
8C. ábra



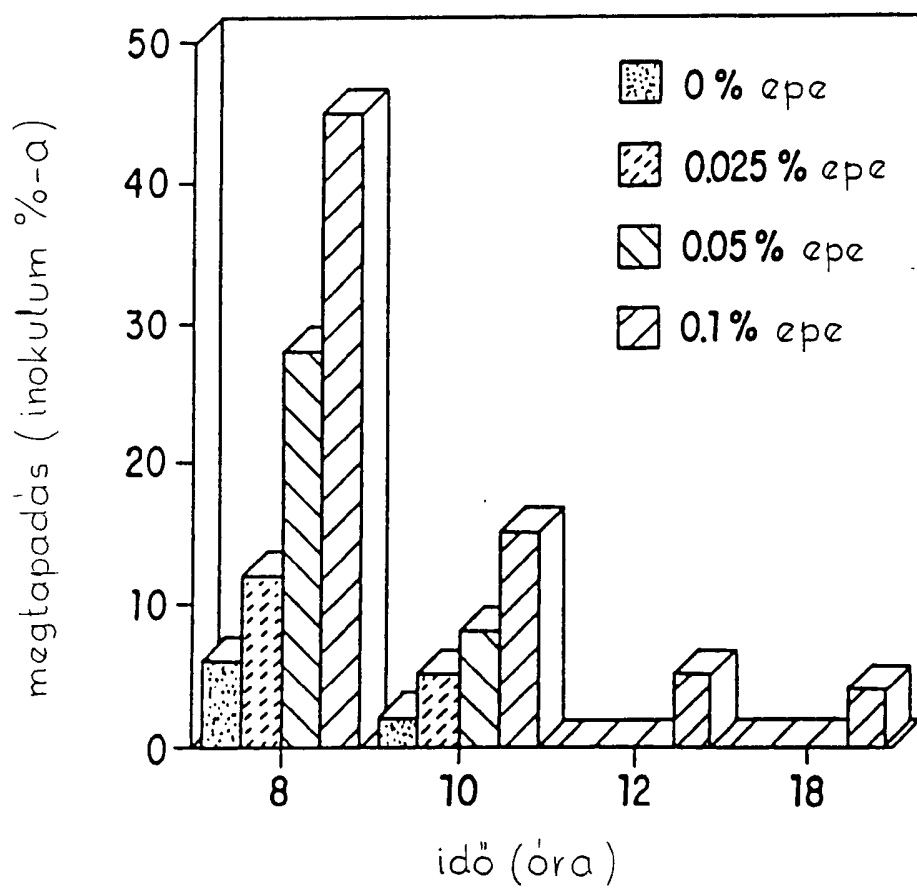
9. ábra



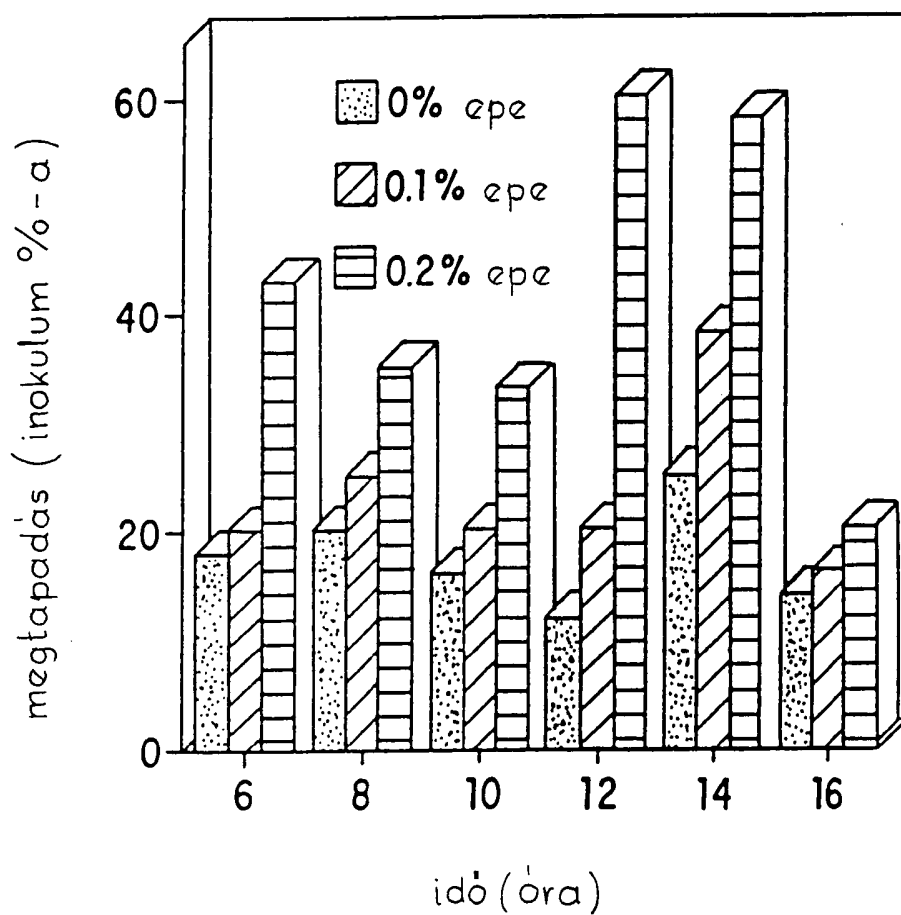
10. ábra



11. ábra



12. ábra



13. ábra