SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**

ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

PATENTOVÝ SPIS

(21) Číslo prihlášky: **1412-93**

(22) Dátum podania: **09.04.1993**

(31) Číslo prioritnej prihlášky: **868 286**

(32) Dátum priority: **13.04.1992**

(33) Krajina priority: **US**

(40) Dátum zverejnenia: **06.07.1994**

(45) Dátum zverejnenia udelenia vo Vestníku: **18.01.2001**

(86) Číslo PCT: **PCT/US93/03409, 09.04.1993**

(11) Číslo dokumentu:

281 238

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl[7]:

A 61K 39/106
C 07K 14/205

(73) Majiteľ patentu: OraVax, Inc., Cambridge, MA, US;

(72) Pôvodca vynálezu: Czinn Steven James, Cleveland Heigts, OH, US;
Nedrud John Gilbert, Shaker Heights, OH, US;

(74) Zástupca: Bušová Eva, JUDr., Bratislava, SK;

(54) Názov vynálezu: **Očkovacia látka, bunková línia a monoklonálna protilátka**

(57) Anotácia:
Očkovacia látka vhodná na prevenciu alebo liečbu infekcií vyvolaných mikroorganizmom rodu *Helicobacter*, ktorá obsahuje imunogénne účinné množstvo antigénu *Helicobacter* na vyvolanie ochrannej imunitnej odpovede pri cicavčom hostiteľovi, v spojení s farmaceuticky vhodným nosičom alebo riedidlom. Bunková línia s označením 71-G_5-A_8, uložená v ATCC pod depozitným číslom HB 11514, produkujúca IgA monoklonálnu protilátku. Murinná Helicobacter felis-špecifická IgA monoklonálna protilátka, produkovaná uvedenou bunkovou líniou.

Oblasť techniky

Vynález sa týka očkovacej látky vhodnej na prevenciu a liečbu infekcií vyvolaných mikroorganizmom rodu *Helicobacter*, bunkovej línie produkujúcej IgA monoklonálnu protilátku a murinnej *Helicobacter* felis-špecifickej IgA monoklonálnej protilátky. Očkovacie látky podľa vynálezu je možné použiť na liečenie gastrickej infekcie cicavcov, vrátane človeka.

Doterajší stav techniky

Infekcia mikroorganizmom *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) gastrického epitelu človeka je hlavným faktorom, ktorý sa podieľa na vzniku gastritis a vredov a môže sa stať rizikovým faktorom, ktorý sa podieľa na vzniku rakoviny žalúdka [Blaser M. J. „Gastric Campylobacter-like organisms, gastritis and peptic ulcer disease" Gastroenterology 1987, 93, 371 až 183 ; Graham, D. Y. „*Campylobacter pylori* and peptic ulcer disesse" Gastroenteralogy 1989, 96, 615 až 625; Parsonnet, J., Vandersteen, D., Goates, J., Silbey, R. K. Pritkink, J. a Chang, Y. *"Helicobacter pylori* infection in intestinal and diffuse type gastris adenocarcinomas" J. Natl. Cancer Inst. 1991, 93, 640 až 643]. Tento tenký gram-negatívny mikroorganizmus v tvare písmena S sa rutinným spôsobom získava zo žalúdočného tkaniva dospelých ľudí a detí, u ktorých bola histologicky preukázaná gastritis alebo peptická ulcerácia. Dôkaz, že *H. pylori* je príčinou gastroduodenálnej choroby je zrejmý zo štúdií vykonávaných na ľudských dobrovoľníkoch, gnotobiotických prasatách a bezmikrobálnych hlodavcoch, pričom sú splnené Kochové postuláty tým, že po konzumácii živých mikroorganizmov sa vyvinie histologicky potvrdená gastritis. [Marshall, R. J., Armstrong, J. A. a McOschle, D. B., „Attempt to fulfill Koch's postulate for pyloric *Campylobacter"* Med. J. Aust. 1985, 142, 436 až 439; Morris, A. a Nicholson, H. „Ingestion of *Campylobacter pyloridis* causes gastritis and raised fasting gastric pH" Am. J. Gastroenterol, 1987, 82, 192 až 199; Engstrand, L., Gustavsson, S., Jörgensen, A., Schwann, A., a Schaynius, A. „Inoculation of barrier-born pigs with *Heliobacter pylori* a useful animal model for gastritis type B." Infect. Immun. 1990, 53, 1763 až 1768 Fox, J. Q., Cabot, E. B., Taylor, N. S. a Larawny, E. „Gastric colonization by *Campylobacter pylori* subor. mustelae in ferrets" Infect. Immun. 1988, 56, 2994 až 2996; Fox J. G., Pelayo, C., Taylor,. N. S., Lee, A. , Otto, G. Murphy, C. and Rose, R. „*Helicobacter mustelae* associated gastritis in ferrets, an animal model of *Helicobacter pylori* gastritis in humans" Gastroenterology 1990, 99, 352 až 361; Lee, A., Fox, J. G., Otto, G. a Murphy J. „A small animal model of human *Helicobacter pylori* active chronic gastritis" Gastroenterology 1990, 99, 1315 až 1323 ; Fox, J. C., Lee, A., Otto, G., Taylor, N. S., a Murphy, J. S. „*Helicobacter felis* gastritis in gnobiotic rats: an animal model of *Helicobacter pylori* gastritis" Infect. Immun. 1991, 59, 785 až 791 Eaton, K. A., Morgan, D. R. a Krakowka, S. „*Campylobacter pylori* virulence factors in Gnobiotic piglets" Infect. Immun. 1989, 57, 1119 až 1125]. I napriek tomu, že gastritis je ťažko liečiteľná, pokiaľ sa dosiahne vyhubenie mikroorganizmu *H. pylori*, gastritis ustúpi a u pacientov s vredmi na dvanástorníku sa dramaticky zníži početnosť opakovaného výskytu vredov [Peterson, W. L. „*Helicobacter pylori* and peptic ulcer disease" N. Engl. J. Med. 1991, 324, 1043 až 1048].

Aj napriek tomu, že *H. pylori* je in vitro susceptibilný voči mnohým antimikrobiálnym činidlám, obtiažne sa dosahuje dlhodobé potlačenie už vzniknutých infekcií *H. pylori* in vivo [Czinn, S. J, a Nedrud, J. G. „Oral Immunization againat *Helicobacter pylori"* Infect. Immun. 1991, 59, 2359 až 2363]. Mikroorganizmus sa vyskytuje v slizovitom povlaku, ktorý pokrýva žalúdočný epitel. To je miesto, ktoré neumožňuje dosiahnutie dostatočnej koncentrácie antimikrobiálne účinného činidla pokiaľ sa podáva orálne. V súčasnej dobe odporúča väčšina autorít tzv. „trojnásobnú terapiu", totiž liečbu soľami bizmutu v kombinácii s tetracyklínom a metronidiazolom počas dvoch až štyroch týždňov. Účinnosť tohto a iných chemoterapeutických režimov však jednako nie je optimálna.

V súčasnosti je len málo poznatkov o úlohe mukozálneho imunitného systému v žalúdku. Distribúcia buniek produkujúcich imunoglobulín (Ig) v normálnej žalúdočnej dutine ukazuje, že IgA plazmové bunky tvoria 80 % celkovej populácie plazmových buniek. Okrem toho, počet plazmových IgA buniek, ktoré sú prítomné v žalúdočnej dutine, je porovnateľný s inými sliznicovými membránami [Brandtzang, P. „Role of H chain and secretory component in receptor-mediated glandular and hepatic transport if immunoglobuline in man" Scan. J. Immunol. 1985, 22, 111 až 146; Brandtzang, P., Bjerka, K., Kett, K., Kvale, D., Rognum, T. O., Scott, H., Sollid, L. M. a Valnes, K. „Production and secretion of immunoglobulins in the gastraintestinal tract" Ann. Allergy 1987, 59, 21 až 39]. Aj napriek tomu, že sa početné štúdie zaoberajú hladinou imunoglobulínu v rôznych endokrinných tekutinách, nie sú k dispozícii žiadne údaje, ktoré by sa vzťahovali na koncentráciu imunoglobulínov v žalúdočných sekrétoch. Okrem toho existuje len obmedzený počet údajov, ktoré uvádzajú, že sa u pacientov infikovaných *H. pylori* vyvinú špecifické IgG a/alebo IgA protilátky v gastrických aspiarátoch [Wyatt, J. I., Rathbone., R. J. a Heatley, R. V. „Local immune response to gastritic campyrlobacter in non-ulcer dyspepsis" J. Clin. Path, 1980, 39, 863 až 870]. Ak sa teda infekcia už rozvinie, nie sú ani protilátky a ani antibiotiká veľmi účinné pri jej potlačovaní.

Czinn a ďalší ukázali, že opakované orálne očkovanie antigénom *H. pylori* a toxínom cholery má za následok indukciu silnej gastrointestinálnej IgA anti-*H. pylori* odpovede u myší a fretky [Czinn, S. J. a Nedrud, J. G. „Oral Immunization against *Helicobacter pylori*" Infect. Immun. 1991, 59, 2359 až 2363 . Vzhľadom na to, že myši a fretky sú rezistentné voči infekciám *H. pylori* a že v tej dobe neexistovalo žiadne malé modelové zviera na vyhodnocovanie ochrany nebolo potvrdené, či vytvorené protilátky majú ochranný účinok.

Lee a ďalší oznámili, že je možné bezmikróbne hlodavce infikovať *H. felis* a histologickým spôsobom reprodukovateľne dokumentovať gastritis [Lee, A., Fox, J. G., Otto, G. a Murphy, J. „A small animal model of human *Helicobacter pylori* active chronic gastritis" Gastroenterology 1990, 99, 1315 až 1323; Fox, J. G., Lee., A., Otto, G., Taylor, N. S. a Murphy J. S. „*Helicobacter felis gastritis* in gnobiotic rats: an animal model of helicobacter pylori gastritis" Infect. Immun. 1991, 59, 785 až 791;]. Nebolo však oznámené žiadne vyhodnotenie ochranného účinku.

Pretrváva preto potreba nájsť účinnú liečbu žalúdočnej infekcie vyvolanej *H. pylori*, predovšetkým u človeka.

Tento vynález sa snaží uspokojiť túto potrebu.

Podstata vynálezu

S prekvapením sa teraz zistilo, že orálne očkovanie hostiteľa antigénom *Helicobacter* má za následok tvorbu protilátok, ktoré poskytujú ochranu proti akútnej infekcii spôsobenej mikroorganizmami *Helicobacter*. Okolnosť, že sa vytvoria takéto ochranné protilátky nebolo možné predvídať na základe predchádzajúcich výskumov, pretože pred vyvinutím tohto vynálezu neexistoval žiadny vhodný model na vyhodnotenie ochrany.

Predmetom vynálezu je očkovacia látka vhodná na prevenciu alebo liečbu infekcií vyvolaných mikroorganizmom rodu *Helicobacter*, podstata ktorej spočíva v tom, že obsahuje imunogénne účinné množstvo antigénu *Helicobacter* na vyvolanie ochrannej imunitnej odpovede pri cicavčom hostiteľovi, v spojení s farmaceuticky vhodným nosičom alebo riedidlom.

Predmetom vynálezu je ďalej bunková línia s označením 71-G_5-A_8 uložená v ATCC pod depozitným číslom HB 11514 produkujúci IgA monoklonálnu protilátku.

Predmetom vynálezu je tiež murinná Helicobacter felis-špecifická IgA monoklonálna protilátka, produkovaná uvedenou bunkovou líniou.

Nasleduje podrobnejší opis vynálezu, v ktorom sa používajú odkazy na priložené výkresy.

Prehľad obrázkov na výkrese

Na obr. 1 je znázornený stĺpcový diagram titru protilátky v rôznych sérach a sekrétoch bezmikróbnych myší po orálnom očkovaní lyzátom *H. felis*, v spojení s toxínom cholery.

Na obr. 2A a 2B sú znázornené stĺpcové: diagramy uvádzajúce percentuálny podiel myší infikovaných *H. felis* po aktívnom očkovaní (obr. 2A) a pasívnom očkovaní (obr. 2B), v porovnaní s kontrolnými zvieratami.

Pri práci na vynáleze sa ukázalo, že orálne očkovanie myší pri použití antigénu *H. felis* vyvoláva ochrannú imunitnú odpoveď, pri ktorej sú v žalúdočných sekrétoch prítomné antigén-špecifické ochranné protilátky. Účinok tejto ochrannej imunitnej odpovede spočíva v tom, že keď sú očkované zvieratá konfrontované s patogénom, nedôjde u nich k infekcii v porovnaní s neočkovanými zvieratami, ktoré infikované naopak sú. Bez toho, aby sa chceli pôvodcovia tohto vynálezu viazať na platnosť nejakej teórie, domnievajú sa, že orálnym očkovaním antigénom *H. felis* sa stimuluje spoločný mukozálny imunitný systém a snáď i určité miesta v žalúdočnej sliznici, čo má za následok vytvorenie *H. felis*-špecifických IgA protilátok v žalúdočných sekrétoch, ktoré zabraňujú vzniku infekcie: *H. felis*. Vzhľadom na to, že *H. felis* a *H. pylori* sú podobné druhy, ktoré spadajú do rovnakého rodu (*Helicobacter*), je možné odôvodnene urobiť záver, že očkovanie napríklad bezmikróbneho prasaťa antigénom *H. pylori*, v spojení s mukozálnou pomocnou látkou, ako toxínom cholery, bude účinné pri prevencii infekcie žalúdka *H. pylori*. Pretože predklinické skúšky vyvíjaných očkovacích látok pre človeka sa rutinne robia na zvieracích modeloch, predpokladá sa, že metodika tohto vynálezu bude účinná i u človeka, zvlášť pri liečení infekcií vyvolaných *H. pylori*.

V súvislosti s vynálezom bolo zistené, že na vyhodnocovanie úrovne ochrany protilátkami po očkovaní antigénom *H. felis* je možné použiť *H.felis*-bezmikróbny myší model. Na obr. 1, sú uvedené výsledky, ktoré boli dosiahnuté pri pokusoch na *H. felis*-bezmikróbnom myšom modeli. Orálne očkovanie modelu bakteriálnymi antigénami v spojení s -toxínom cholery malo za následok zvýšenie titru anti-H. *felis* protilátok v sére, žalúdku a v črevách a ochranu proti akútnej infekcii žalúdka patogénom *H. felis*, Pri pokusoch boli skupiny bezmikróbnych myší Swiss-Webster (Taconic) orálne očkované 4 x alebo 5 x v priebehu jedného mesiaca 2 až 4 mg pomocou ultrazvku vyrobeného lyzátu *H. felis*, v spojení s 10 µg toxínu cholery. Potom boli myši exponované orálne provokačnou injekciou približne 10^6 živých baktérií *H. felis*. Myši boli usmrtené a boli im odobrané intestinálne a gastrické sekréty (spôsobom opísaným v nasledujúcich príkladoch). Titry anti-*H. felis* protilátok boli stanovené metódou ELISA. Šrafované stĺpce na obrázku č. 1 predstavujú hodnoty stredného titru protilátok (± smerodajná odchýlka) u očkovaných myší, zatiaľ čo prázdne stĺpce predstavujú hodnoty stredného titru protilátok (± smerodajná odchýlka) u kontrolných neočkovaných myší. Výsledky, ktoré sú graficky spracované na obr. I, sú číselne prezentované v tabuľke č. 1.

Tabuľka 1

Titer protilátok (Log_2) v

	sére		žalúdku		črevách	
	IgA	IgG	IgA	IgG	IgA	IgG
kontrólna	3,1	3	0	0	1,6	1,1
očkovaná	11,8	16,8	2,1	4,25	4,5	4,4

	Infekcia H. felis		ochrana
	H. felis (+)	H. felis (-)	
kontrólna n=18	14	4	23 %
očkovaná n=17	4	13	78 %

Z uvedených výsledkov je zrejmé, že u očkovaných myší je možné pozorovať podstatne vyššie titry protilátok v porovnaní s kontrolnými zvieratami.

Na obr. 2A a 2B sú dokumentované výsledky štúdií ochrany proti infekcii *H. felis* pri pokusnom aktívnom a pasívnom očkovaní. Čo sa týka pokusov s aktívnym očkovaním, boli myšiam, konfrontovaným s provokačnou in fekciou *H. felis* (pozri pokusy opísané v súvislosti s obr. 1), po usmrtení odobraté vzorky pre gastrickú biopsiu. Pri biopsii bola hľadaná prítomnosť *H. felis* pomocou rýchleho ureázového testu a/alebo na základe pasivity kultúry spôsobmi, opísanými v nasledujúcich príkladoch. Na obr. 2A sú súhrnne znázornené výsledky z troch pokusov (n = 17 je počet očkovaných zvierat a n = 18 je počet kontrolných zvierat). Ľavý stĺpec sa vždy vzťahuje na očkované myši a pravý stĺpec vždy na kontrolné neočkované myši, pričom všetky myši boli konfrontované s provokačnou infekciou.

Je zrejmé že z celkového počtu 17 očkovaných zvierat boli infikované len 4 zvieratá v porovnaní so 14 infikovanými zvieratami z 18 kontrolných zvierat. Inými slovami, proti infekcii *H. felis* bolo chránených 78 % očkovaných zvierat a len 23 % neočkovaných zvierat.

Skutočnosť, že ochrana je priamym dôsledkom IgA protilátok, bola dokázaná pasívnym očkovaním bezmikróbnych myší *H. felis*-špecifickými IgA monoklonálnymi protilátkami a porovnaním výslednej ochrany s ochranou dosiahnutou u myší, ktorým nebola podaná žiadna protilátka alebo ktorým bola podaná irelevantná protilátka napríklad Sendai vírus-špecifická IgA monoklonálna protilátka. Výsledky sú uvedené na obr. 2B.

IgA monoklonálna protilátka, reaktívna voči *H. felis*, bola izolovaná a subklonovaná po očkovacom protokole, ktorý je podobný ako protokol opísaný na obr. 1. Bezmikróbnym myšiam bol v čase infekcie *H. felis* a 4, 8 a 24 hodín po ňom orálne podaný ascites obsahujúci *H. felis*-špecifické IgA monoklonálne protilátky, produkovaný v

bunkovej línii č. 71-G_5-A_8, vyrobenej spôsobom opísaným v nasledujúcich príkladoch prevedenia alebo Sendai vírus-špecifická IgA monoklonálna protilátka alebo roztok soli. Sedem dní po infekcii sa myši usmrtia a vykoná sa gastrická biopsia, zameraná na *H. felis* (n = 7 predstavuje počet myší, ktoré dostali *H. felis*-špecifickú monoklonálnu protilátku a n = 13 predstavuje počet myší, ktoré nedostali žiadnu protilátku alebo ktoré dostali Sendai vírus-špecifickú monoklonálnu protilátku). Ľavý stĺpec v grafe sa vzťahuje vždy na myši ktoré dostali *H. felis*-špecifickú monoklonálnu protilátku a pravý stĺpec sa vzťahuje na myši, ktoré dostali buď Sendai vírus-špecifickú monoklonálnu protilátku alebo roztok soli (bez protilátky).

Výsledky ukazujú, že samotný IgA chráni proti infekcii žalúdočnej sliznice baktériami *H. felis*.

Je tiež pozorované, že orálne podanie antigénu *H. felis* má za následok podstatné zvýšenie úrovne anti-*H.felis* IgG protilátok ako i IgA. Pre tento úkaz existuje niekoľko možných vysvetlení. Predovšetkým bolo pozorované že toxín cholery môže v niektorých prípadoch zosilniť antigén-špecifickú IgA a IgG odpoveď [Nedrud, J. G., Liang, S., Hague, N. a Lamm, M. E. „Combined oral/nasal immunization protect mice from Sendai virus infection" J. Immunol. 1987, 139, 3484 až 3492 J. Okrem toho, štúdie pohybu buniek („cell trafic") ukázali, že IgG lymfocyty mesenterických uzlín predstavujú zložku mukozálneho imunitného systému a môžu vyvolať tvorbu mukozálnych IgG plazmových buniek, ktoré boli pozorované v žalúdočnej sliznici. Po tretie, prinajmenšom časť pozorovaného IgG môže byť výsledkom transudácie protilátky v sére do gastrickej svetlosti, čo je sekundárny jav pozorovaný pri miernych až stredných zápaloch ako pri kontrolných, tak aj pri očkovaných zvieratách.

Uvedená diskusia bola zameraná na použitie antigénu *H. felis* pri liečbe infekcie spôsobenej mikroorganizmov *H. felis*. Vynález sa však neobmedzuje na použitie pri liečbe infekcií spôsobených *H. felis*.

Do rozsahu vynálezu spadá tiež liečba alebo profylaxia infekcií spôsobených mikroorganizmom *H. pylori* u cicavcov, vrátane človeka, pri ktorej sa pacient orálne očkuje imunologicky účinným množstvom antigénu *H. pylori*, za účelom vyvolania tvorby ochranných protilátok proti patogénu *H. pylori*. *H. pylori* sa prednostne podáva v spojení s mukozálnym adjuvantom, napríklad toxínom cholery.

Do rozsahu tohto vynálezu spadá tiež pasívne očkovanie cicavcov, vrátane človeka, proti infekciám vyvolaným *H. pylori*. Toto očkovanie sa realizuje tak, že sa pacientovi orálne podá účinné množstvo *H. pylori*-špecifickej protilátky. Prednostne sa pacientovi orálne podá *H. pylori*-špecifická IgA monoklonálna protilátka. Očkovacia látka podľa vynálezu sa podáva orálne v množstvách, ktoré sú odborníci v tomto odbore schopní ľahko určiť. Vhodná dávka pre dospelých je teda v rozmedzí od asi 10 µg do 10 mg, napríklad 50 µg do 5 mg. Podobné rozmedzie dávkovania je vhodné aj pre deti.

Ako už bolo uvedené, ako vhodný mukozálny adjuvant je možné použiť toxín cholery. Z iných látok, ktoré je možné použiť, je možné uviesť netoxické deriváty toxínu cholery, vrátane jeho B podjednotky a/alebo konjugáty antigénu s toxínom cholery alebo jeho B podjednotkou, mikrokapsuly, komplexy stimulujúce imunitu (ISCOM) alebo lipozómy a oslabené živé vektory, ako sú vírusy alebo baktérie *Salmonella*. Množstvo mukozálneho adjuvanta, ktoré sa používa, závisí od jeho typu. Tak napríklad, keď sa ako mukozálny adjuvant použije toxín cholery, je jeho vhodné množstvo v rozmedzí od 5 do 50 µg, napríklad od 10 do 35 µg. Pokiaľ sa používa vo forme mikrokapsúl (mikropúzdier), bude použité množstvo závisieť od množstva použitého v matrici mikrokapsuly na dosiahnutie požadovanej dávky. Voľba vhodného množstva mukozálneho adjuvanta je tiež v rozsahu skúseností bežného odborníka v tomto odbore.

Ako vhodné nosiče a riedidlá je možné uviesť enterický potiahnuté kapsuly a/alebo 0,2N roztok hydrogenuhličitanu sodného a/alebo roztok chloridu sodného.

Vynález je bližšie objasnený v nasledujúcich príkladoch uskutočnenia. Tieto príklady majú výhradne ilustratívny charakter a rozsah vynálezu v žiadnom ohľade neobmedzujú.

Príklady uskutočnenia vynálezu

V príkladoch sa používajú ďalej opísané pokusné zvieratá, bakteriálne kmene, bakteriálne antigény a vonkajšie membrány.

a) Myši

Pri týchto pokusoch sa používajú 8-týždňové bezmikróbne myši Swiss Webster, ktoré je možné získať od firmy Taconic (Germantown, N. Y., USA). Zvieratá sa chovajú v mikroizolátorových klietkach za bezmikróbnych podmienok a majú voľný prístup k laboratórnemu krmivu, spracovanému v autokláve, a vode. S výnimkou príležitostne izolovaných diphteroidov sú zvieratá uchovávané v bezmikróbnom stave po celý čas očkovania.

b) Bakteriálne kmene.

Používajú sa baktérie izolované zo vzoriek žalúdka mačky, ktoré boli podrobené biopsii. Tieto baktérie sa identifikujú podľa morfológie ako baktérie *H. felis*. Urobí sa Gramovo farbenie a produkuje sa ureáza, kataláza a oxidáza [Lee, A., Fox, J. G., Otto, G. a Murphy, J. „A small animal model of human *Helicobacter pylori* active chronic gastritis" Gastroenterology 1990, 99, 1315 až 1323. Organizmy sa uchovávajú v 50 % roztoku chloridu sodného, ktorý je pufrovaný fosfátovým pufrom PBS, 25 % glycerole a 25 % tepelne spracovanom fetálnom teľacom sére pri -70 °C. Baktérie. používané v nasledujúcich príkladoch sa po izolácii 2 až 3 x pasážujú in vitro.

c) Bakteriálne antigény

Skúšobný kmeň sa naočkuje na agar Columbia (Difco, Detroit, MI, USA) s obsahom 7 % konskej krvi. Inkubácia sa robí mikroaerofilicky pri 37 °C počas 5 a ž 7 dní. Organizmy sa zoberú v PBS a výsledne sa suspenzie spracujú ultrazvukom pri 40 °C, aby došlo na lýziu baktérií. Rozdrvené bunky sa oddelia centrifugáciou pri nízkej frekvencii otáčania a supernatant sa pri sterilných podmienkach prefiltruje. Takto získané ultrazvukom spracované vzorky (sonikáty) z celých buniek sa uložia vo forme 100 µl alikvótov pri -70 °C až do času ich použitia na orálne očkovanie zvierat.

d) Vonkajšie membrány

Vonkajšie membrány sa vyrobia spôsobom opísaným v Sawau, T., Hiruma, R., Kawana, N., Kaneko, M., Taniyasu, F. a Inami, A. „Outer membrane permeation of beta-lactam antibodies in Escherichia coli, Proteus mirabilis and *Enterobacter cloacae* Antimicrob. Agennts", Chemother, 1982, 22, 585 až 592. Skrátene je možné tento spôsob opísať tak, že sa na bakteriálne suspenzie pôsobí 1 mg ribonukleázy a deoxyribonukleázy Sigma Chemical, St. Luis, USA, v 0,5 M Tris-EDTA pufre (s hodnotou pH 7,8) pri 4.°C, bez-

prostredne pred spracovaním ultrazvukom (sonikáciou) a odstredením pri nízkej frekvencii otáčania, ako je to opísané. Obaly baktérií sa potom oddelia od vyčereného lyzátu ultracentrifugáciou pri 150000 x g v priebehu 1 hodiny. Vonkajšie membrány sa oddelia od bunkových obalov diferenciálnou solubilizáciou v n-lauroylsarkozíne sodnom a izolujú sa ultracentrifugáciou. Výsledné palety sa suspendujú v 0,05 M fosfátovom pufre (pH 7,0), rozdelia sa na alikvóty a uchovávajú pri -70 °C. Koncentrácia proteínu sa stanoví spôsobom, ktorý opísali Lowry a ďalší na použitie pri metóde ELISA [Lovrry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. J, a Randall, R. J. „Protein measurement with the folin phenol reagent" J. Biol. Chem. 1951, 193, 265 až 275].

Príklad 1

Myši sa slabo anestetizujú i. p. injekciou 1,0 mg ketamínu pred intragastrickým očkovaním. Potom sa alikvót sonikátu z celých buniek suspenduje spolu s 10 µg toxínu cholery (List Bilogicals, Cambell CA, USA) v 0,02 M roztoku hydrogenuhličitanu sodného a 0,5 ml vzniknutej suspenzie sa dopraví do žalúdka každej myši intubáciou pomocou polyetylénovej trubičky pripojenej na injekčnú striekačku. Tento postup je ďalej označovaný názvom „orálne očkovanie".

Na zistenie možnosti vývinu funkčnej imunity sa používajú celkove tri očkovacie protokoly. Podľa prvého protokolu sa robia 4 orálne očkovania v priebehu jedného mesiaca, ktoré zahrnujú podanie 2 mg lyzátu baktérií *H. felis*, v spojení s toxínom cholery, (mukozálny adjuvans). Podľa druhého protokolu sa zvýši množstvo lyzátu na 4 mg pri každom očkovaní a lyzát sa používa v spojení s toxínom cholery. Podľa tretieho protokolu sa robí 5 orálnych očkovaní v priebehu 8 týždňov, pričom pri každom očkovaní sa podávajú 4 mg lyzátu baktérií *H. felis*, v spojení s toxínom cholery. Pokiaľ nie je uvedené inak, zvieratá sa provokujú infekciou po 7 až 10 dňoch po poslednom očkovaní a usmrtia sa za ďalších 7 dní.

Zachytia sa nasledujúce tkanivové tekutiny (sérum, gastrické sekréty a intestinálne sekréty). Tieto vzorky sa potom titrujú na prítomnosť anti-*H. pylori* protilátok pomocou stanovenia na imunosorbente, ktorý je spojený s enzýmom (ELISA). Okrem toho, vykonajú sa gastrické biopsie na rýchly ureázový test a kultúru. Infekcia sa definuje ako pozitívna, ak je buď kultúra alebo rýchly ureázový test (pozri ďalej) pozitívny. Sérum sa získa z krvi odobratej z chvostovej vény, pričom krv sa nechá zraziť pri teplote miestnosti. Gastrické a intestinálne sekréty sa odoberajú s použitím modifikovaného postupu, ktorý opísali Elson a ďalší [Elson, C. O., Ealding, W. a Lefkowitz, J. „A lavage technique allowing repeated measurement of IgA antibody in mouse intestinal secretions" J. Immunoi. Meth. 184, 67, 101 až 108; Nedrud, J. G., Liang, S., Hague, N. a Lamm M. E. „Combined oral/nasal immurization protect mice from Sendai virus infection„ J. Immunol. 1987, 139, 3484 až 3492]. Gastrické a intestinálne sekréty myší sa odoberajú oddelene. Žalúdok a črevá každej myši sa vyberú a injekčne sa k nim pridá 2,0 ml premývacej tekutiny na báze polyetylénglykolu, v zmesi s anti-proteázovým roztokom. Tekutina na premývanie žalúdka obsahuje Tris pufer na neutralizáciu žalúdočnej kyseliny.

Skúška ELISA sa robí spôsobom opísaným ďalej. Murinné vzorky sa skúmajú na prítomnosť protilátok proti *H. felis* takto: polystyrénové mikrotitrové platne s 96 jamkami sa potiahnu, v množstve 100 µl na jamku, príslušnými vonkajšími membránovými proteínmi (20 µg/ml) cez noc pri 4 °C. Nešpecifické väzbové miesta sa blokujú pomocou 1 % BSA v PBS počas 90 minút pri teplote miestnosti a potom sa platne opláchnu 0,1 % BSA v PBS. Vzorky sa skúšajú duplicitne pri zriedení, ktoré leží v rozmedzí od nulového zriedenia až do zriedenia 1 : 512000 a do každej jamky na platni potiahnutej antigénom sa pridá 100 µl príslušne zriedenej vzorky.

Inkubuje sa 90 minút pri teplote miestnosti a potom sa platne 3 x opláchnu 0,1 % BSA v PBS a do každej jamky sa na čas 90 minút pridá 100 µl kozieho protimyšacieho IgA alebo IgG alkalického fosfatázového konjugátu v zriedení 1 : 1000 (Zymed, San Francisco, CA, USA). Po opláchnutí sa realizuje vyvíjanie prídavkom roztoku p-nitrofenylfosfátu v glycínovom pufre (pH 9,6) v koncentrácii 1 mg/ml, v množstve 100 µl/jamku, v priebehu 1 hodiny. V každej jamke sa meria absorbancia pri 410 nm pri použití čítacieho zariadenia pre mikrotitračné platne Dynatech MR T00 Microtiter Piate Reader. Titer protilátky je definovaný ako prevrátená hodnota najvyššieho zriedenia, ktoré poskytuje optickú hustotu 0,05 nad jamkou, ktorá obsahuje antigén a ktorá bola inkubovaná s konjugátom protilátky, ale bez primárnej vzorky protilátky [Czinn, S. J., a Nedrud, J. G. „Oral Immunization against *Helicobacter pylori" Infect.* Imnun. 1991, 59, 2359 až 2363].

Rýchly ureázový test sa robí takto: Dve vzorky na gastrickú biopsiu s hmotnosťou za vlhka 10 µg z každej myši sa ihneď umiestni do 0,2 ml Stuartovej ureázovej skúšobnej pôdy [Mestecky, J. „The common mucosai immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretions" J. Clin. Immunol. 1987, 7, 265 až 276] a inkubuje sa pri teplote miestnosti. Prítomnosť ureázy sa stanoví na základe farebnej zmeny zo žltej na ružovú v skúšobnej pôde po 4 hodinách [Czinn, S. J. a Carr, H. „Rapid diagnosis of *Campylobacter pyloridis*-associateci gastritis, J. Pediatr. 1987, 110, 569 až 570] .

Kultúry sa získajú takto: Vzorky na gastrickú antrálnu biopsiu sa homogenizujú a nanesú na agar Columbia obsahujúci 5 % ovčej krvi. Inkubuje sa pri 37 °C za mikroaerofilných podmienok (súprava na vývoj plynu od firmy Oxoid Ltd, Londýn, Veľká Británia). Pozitívna kultúra je definovaná ako kultúra s viditeľným rastom po 5 dňoch. Všetky izoláty sa identifikujú ako *H. felis* na základe morfológie Gramovho farbenia a produkcie urázy, katalázy a oxidázy.

Napriek malým zmenám v realizácii pokusu medzi troma skupinami nebol zaznamenaný žiadny podstatný rozdiel v imunitnej odpovedi. Údaje boli teda spojené a boli vypočítané geometrické stredy titru protilátky v gastrickej premývacej tekutine, intestinálnej premývacej tekutine a sére trinástich kontrolných a dvanástich očkovaných zvierat. Tieto údaje sú uvedené v tabuľke 1 a na obr. 1, ako je to opísane.

I napriek tomu, že boli tieto zvieratá očkované a vystavené provokačnej infekcii, nelíšil sa titer protilátky podstatne od myší, ktoré boli očkované, ale ktoré neboli vystavené provokačnej infekcii. Pri týchto pokusoch boli zistene titry IgA a IgG protilátky, v žalúdku, črevách a sére podstatne vyššie, v porovnaní s titrami zistenými u neočkovaných kontrolných zvierat. Konkrétne bolo pozorované štvornásobné zvýšenie titru gastrického IgA ($p = 0,001$), osemnásobné zvýšenie titru intestinálneho IgA ($p = 0,0038$) a 350 násobne zvýšenie titru IgA v sére ($p = 0,0001$), v porovnaní s neočkovanými kontrolnými zvieratami. Podobne bolo pozorované i signifikantné zvýšenie titru gasterického IgG ($p = 0,0009$), intestinálneho IgG ($p = 0,0001$) a sérového IgG ($p = 0, 0001$).

Na vyhodnotenie ochrany pred infekciou spôsobenou baktériou *H. felis* sa po usmrtení zvierat odoberú vzorky na gastrickú biopsiu, ktoré sa hodnotia jednak rýchlym ureázovým testom a jednak v kultúre, ako je opísané. Okrem

toho, z dôvodu stanovenia, či sa u kontrolných zvierat vyvinie chronická infekcia a či sú očkované zvieratá definívne *H. felis*-negatívne, vystavia sa ďalšie očkované a kontrolné zvieratá opísanej provokačnej infekcii. Tieto zvieratá sa však usmrtia až 6 týždňov po provokačnej infekcii. Miera ochrany vo všetkých očkovaných skupinách zvierat sa príliš nelíši. Aby sa nevylúčila možnosť nízkej úrovni nákazy, robí sa hodnotenie, či sú vzorky na gastrickú biopsiu pozitívne alebo negatívne na rast *H. felis* až po 5 dňoch po nanesení na misku. Zo sériového riedenia kultúr so známym počtom (počítanie pomocou hemacytometra) baktérií *H. felis* sa zistí, že najnižšia citlivosť je približne 10 organizmov. Pri neskorších experimentoch sa misky s kultúrami vzoriek na biopsiu udržovali niekedy aj dlhšie ako 5 dní a keď boli misky, ktoré zostali negatívne na viditeľný rast zoškrabané a za vlhka bola analyzovaná nahromadená vrstva, občas bolo možné zistiť izolovaný organizmus špirálovitého tvaru. Totožnosť týchto izolovaných organizmov nebolo možné potvrdiť a nebolo možné potvrdiť, či boli tieto organizmy živé. V každom prípade je možné výsledky zistené v kultúrach pri sériovom riedení *H. felis* interpretovať tak, že vzorky na biopsiu, ktoré zostali negatívne na viditeľný rast po 5 dňoch, obsahovali 10 baktérií alebo menej.

Príklad 2

IgA a IgA monoklonálnej protilátky špecifickej pre *H. felis* sa získajú modifikáciou postupu, ktorý opísali Mazanec a ďalší [Mazanec, M. B., Nedrud, J. G. a Lamm, M. E. „Immunoglobulin a monoclonal artidodies protect against Sendai virus" J. Virol., 1987, 61, 2624. až 2626. Myši BALB/c, získané od firmy Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA) sa očkujú intragastricky 4 x v priebehu 6 týždňového obdobia, pričom pri prvých 3 očkovaniach sa podávajú 2 mg sonikovanej vzorky s obsahom *H. felis*, v kombinácii s 10 µg toxínu cholery (Sigma Chemical Co., St. Luis, MO, USA). Pri poslednom očkovaní sa vypustí toxín cholery a myši tiež dostanú intravenóznu preočkovaciu látku 2 mg proteínu *H. felis*. Po 3 dňoch sa myši usmrtia a ich slezinové bunky sa hybridizuju s myelomovými bunkami SP2/O. Klony, ktoré sa získajú obmedzeným riedením sa skúmajú na sekréciu anti-*H. felis* IgA protilátky pomocou stanovenia ELISA. Výsledná bunková línia, označená symbolom 71-G_5-A_8, predstavuje stabilný hybridom, vylučujúci IgA. Po niekoľkonásobnom subklonovaní sa stabilné IgA a IgG sekretory injekčne podajú intraperitoneárnou cestou pristanom primovaným myšiam BALB/c a z týchto myší sa získa ascitická tekutina, ktorá sa vyčerí. Bunková línia č. 71-G_5-A_8 z 13. apríla 1992 je uložená a uchovávaná v živom stave v Laboratory of Steven J. Czinn, M. D., Rainbow Babies and Children s Hospital, Room 465, Case Western University, 2074 Abington Road, Cleveland, Ohio, USA 44106. Prístup k tejto uloženej vzorke bude oprávneným osobám umožnený patentovým úradom USA v priebehu konania o prihláške vynálezu. Po udelení patentu budú po tom všetky obmedzenia, vzťahujúce sa na dostupnosť tejto vzorky pre verejnosť definitívne zrušené.

Bunková línia č. 71-G_5-A_8 bola uložená v zbierke kultúr American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852 , USA, pod identifikačným číslom 71-G_5-A_8. Prírastkové číslo zbierky ATCC je ..... a dátum uloženia je .....

Príklad 3

Pasívne očkovanie sa robí nasledujúcim spôsobom: Ascites obsahujúci IgA monoklonálnu protilátku produkovanú bunkovou líniou č. 71-G_5-A_8 200 µl sa podá intragastricky, súčasne s 106 živých organizmov. Predbežné štúdie ukázali, že titer IgA v žalúdku zvierat, ktoré dostali jedinú dávku 200 µl monoklonálnej IgA protilátky, poklesol na hodnotu nižšiu, ako je hodnota pozorovaná u aktívne očkovaných zvierat, do 8 hodín. Z tohto dôvodu sa v nasledujúcich 24 hodinách podajú 3 ďalšie dávky MAb. Kontrolné zvieratá sa provokujú rovnakou provokačnou injekciou, ale dostanú buď roztok chloridu sodného alebo Sendai vírus-špecifickú IgA monoklonálnu protilátku (irelevantnú IgA monoklonálnu protilátku). Po 1 týždni sa myši usmrtia. Tkanivo žalúdka sa naočkuje na krvný agar Columbia a misky sa inkubujú 5 dní pri 37 °C. Infekcia sa stanoví ako pozitívna na základe pozitívnej kultúry alebo pozitívneho výsledku Stuartovej rýchlej ureázovej skúšky so živnou pôdou.

Na zistenie, či IgA protilátky, ktoré sú charakteristickým znakom mukozálneho imunitného systému, sú schopné samy o sebe chrániť sa proti injekcii žalúdočnej sliznice mikroorganizmom *H. felis*, sa uvedeným spôsobom generujú *H. felis* IgA monoklonálne protilátky. Jedna z týchto protilátok č. 71-G_5-A_8 sa potom pasívne orálne podá bezmikróbnym myšiam v čase vystavenia provokačnej infekcii *H. felis* a po tomto čase. Kontrolné zviera dostanú buď roztok kuchynskej soli alebo Sendai vírus-špecifickú IgA monoklonálnu protilátku, ktorá je špecifická pre hemaglutinín-neuraminidásový glykoproteín vírusu Sendai [Mazanec, M. B., Nedrud, J. G. a Lamm, M. E. „Immunoglobulin a monoclonal antibodies protect against Sendai virus" J. Virol., 1987, 61. 2624 až 2626].

Výsledky sú uvedené v tabuľke 2.

Tabuľka 2

Hodnotenie skúšky pasívneho podania protilátky bezmikróbnym myšiam pred a po expozícii provokačnej infekcie *H. felis*.

Podaná protilátka	Počet myší	Podiel infikovaných myší %
žiadna - kontrólny pokus	7	57
irelevantná IgA monokl.protilátka	6	83
IgA anti-*H. felis* monokl.protilátka	7	14

H. felis alebo Sendai vírus-špecifická IgA monoklonálna protilátka sa podáva intragastricky, 4 x v priebehu 24 hodín, súčasne s expozíciou provokačnej infekcie 106 živých baktérií *H. felis*. Vzorky na gastrickú biopsiu sa odoberú 1 týždeň po expozícii provokačnej infekcie a infekcia sa stanovuje v kultúre a/alebo rýchlou ureázovou skúškou.

Z 13 kontrolných zvierat, ktoré nedostali žiadnu protilátku alebo ktoré dostali Sendai vírus-špecifickú protilátku, bolo infikovaných 70 % zvierat (obr. 2B). Zo 7 experimentálnych zvierat bolo 6 chránených a len 1 (14 %) bolo nakazené. Tento rozdiel je signifikantný podľa Chí analýzy štvorcov ($p = 0,019$).

Porovnanie titra protilátky v rôznych experimentálnych skupinách bolo spracované analýzou variancie a Fischerovým chráneným T- testom. Pri zisťovaní ochrany na základe neprítomnosti alebo prítomnosti experimentálnej infekcie v jednotlivých skupinách bolo použité hodnotenie analýzou Chí štvorcov.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Očkovacia látka vhodná na prevenciu alebo liečbu infekcií vyvolaných mikroorganizmom rodu *Helicobacter*, **vyznačujúca sa tým**, že obsahuje imunogénne účinné množstvo antigénu *Helicobacter* na vyvolanie ochrannej imunitnej odpovede pri cicavčom hostiteľovi, v spojení s farmaceuticky vhodným nosičom alebo riedidlom.

2. Očkovacia látka podľa nároku 1, **vyznačujúca sa tým**, že ďalej obsahuje účinné množstvo mukozálneho adjuvansu.

3. Očkovacia látka podľa nároku 2, **vyznačujúca sa tým**, že mukozálnym adjuvansom je toxín cholery.

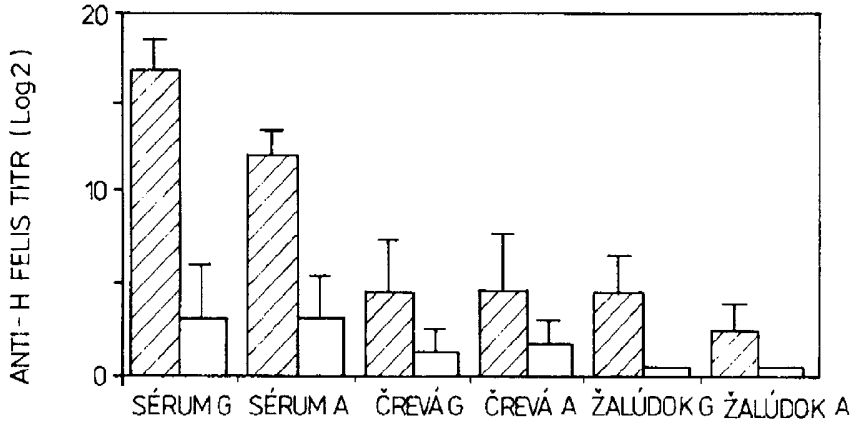
4. Očkovacia látka podľa nároku 1, **vyznačujúca sa tým**, že antigén *Helicobacter* je antigén *Helicobacter pylori*.

5. Očkovacia látka podľa nároku 1, **vyznačujúca sa tým**, že antigénom *Helicobacter* je antigén *Helicobacter felis*.

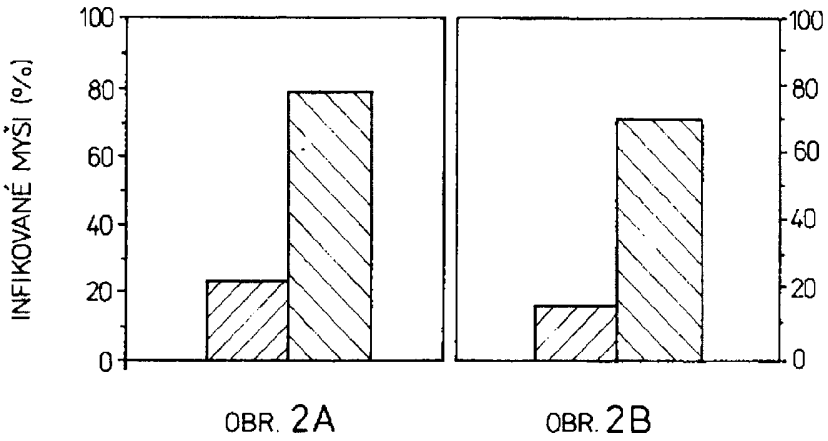
6. Bunková línia s označením 71-G_5-A_8 uložená v ATCC pod depozitným číslom HB 11514 produkujúca IgA monoklonálnu protilátku.

7. Murinná Helicobacter felis-špecifická IgA monoklonálna protilátka, produkovaná bunkovou líniou podľa nároku 6.

1 výkres



OBR. 1



OBR. 2A OBR. 2B

Koniec dokumentu