

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 971402 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 971402

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification

C12N 1/20 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

C12Q 1/18 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 04.10.1995

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 04.04.1997

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 04.06.1997

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 13.06.2019

(86) Kansainvälinen hakemus - 04.10.1995 PCT/US1995/012986
Internationell ansökan - International
application

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

05.10.1994 US 318409

03.10.1995 US 538544

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Antex Biologics Inc., 300 Professional Drive, Gaithersburg MD 20879, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Pace, John L., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 •Walker, Richard I., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

3 •Frey, Steven M., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Menetelmä voimistettujen antigeenisten Helico-bacter-lajien ja niitä sisältävien rokotteiden valmistamiseksi

Förfarande för framställning av stegrade antigeniska Helicobacter arter och vaccin innehållande desamma

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism - Deposit of microorganism

55713 ATCC

55714 ATCC

Menetelmiä antigeenisyydeltään parannetun *Helicobacter* sp:n valmistamiseksi ja tätä sisältäviä rokotteita - Förfaranden för producering av *Helicobacter* sp. innehållande förbättrad antigenicitet och vacciner innehållande densamma

5

Tämä patenttihakemus on jatkohakemus samanaikaisesti haettavana olevalle patenttihakemusjulkaisulle nro 08/318 409, joka on jätetty 5.10.1994.

10

1. Keksinnön ala

Keksintö liittyy yleisesti suolistobakteerien antigeenien ja/tai virulenssitekijöiden ilmentymisen käynnistämisen tai voimistamismenetelmiin, joita käytetään in vitro -olosuhteissa ja joiden avulla saadaan tuotettua antigeenisyydeltään parannettuja suolistobakteereja, sekä antigeenisyytensä suhteen parannettuja suolistobakteereja sisältäviin rokotteisiin.

15

20

2. Keksinnön tausta

On yleisesti tunnettua, että bakteerit, joita viljellään in vitro -olosuhteissa tavanomaisia elatusaineita ja olosuhteita käyttäen, ilmentävät ominaisuuksia, jotka poikkeavat niistä ominaisuuksista, joita bakteerit ilmentävät kasvaessaan luonnollisissa elinympäristöissään, joita ovat normaalin mikroflooran tai patogeenien kasvu in vivo -olosuhteissa isäntäeläimessä. Tästä syystä tällaiset in vitro -olosuhteissa kasvatetut patogeeniset bakteerit eivät saata olla hyvä valinta käytettäväksi rokotekomponentteina. Jos kuitenkin olisi mahdollista määritellä olosuhteet, jotka käynnistävät virulenssitekijöiden, asiaankuuluvan fysiologian tai antigeenien, mukaan lukien pinta-antigeenien, muodostumisen tai tehostavat niiden ilmentymistä, niin voitaisiin nopeasti tunnistaa tärkeitä tuotteita ja terapeuttisia aineita (esimerkiksi uusia antigeenejä rokotteena käytettäväksi, uusia antibioottien vaikutuskohteita ja uusia bakteerien ominaisuuksia diagnostisia sovellutuksia varten).

25

30

35

On tunnistettu useita ympäristöperäisiä tekijöitä, jotka vaikuttavat virulenssideterminanttien ilmentymiseen bakteereissa [Mekalanos, J.J., J. Bacteriol. 174 (1992) 1 - 7]. Pitkään on tutkittu esimerkiksi raudan ja bakteerien, erityisesti Shigellan [Payne, Mol. Microbiol. 3 (1989) 1301 - 1306], Neisserian [Payne ja Finkelstein, J. Clin. Microbiol. 6 (1977) 293 - 297] ja Pasteurellan [Gilmour, et al., Vaccine 9 (1991) 137 - 140] virulenssin välistä suhdetta.

Muita ympäristöperäisiä signaaleja, joiden on osoitettu ohjaavan kasveilla ja eläimillä esiintyvien hyvin useiden erilaisten bakteerien koordinoitusti säädeltyjen virulenssideterminanttien ilmentymistä, ovat fenoliyhdisteet, monosakkaridi, aminohapot, lämpötila, osmolaarisuus ja muut ionit [Mekalanos, J. Bacteriol. 174 (1992) 1 - 7].

Bakteeripatogeenit, jotka tunkeutuvat isäntäeläimeen suoliston kautta (toisin sanoen oraalista tietä pitkin), joutuvat useiden sellaisten isännän muodostamassa ympäristössä esiintyvien komponenttien ja olosuhteiden vaikutukselle alttiiksi, jotka voivat vaikuttaa bakteerien fysiologiaan ja virulenssitekijöiden ilmentymiseen. Näitä komponentteja ja olosuhteita ovat sappi, sappihapot tai suolat, mahan pH, mikroaerofiiliset olosuhteet (suolen CO₂-pitoisuus on korkea ja O₂-pitoisuus on pieni), osmolaarisuus ja monet muut vielä määrittelemättömät tekijät. Elimistöön tunkeutuvat suolistopatogeenit tarvitsevat de novo -proteiinisynteesiä solujen sisään päästäkseen [Headley ja Payne, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990) 4179 - 4183]. Tästä syystä bakteerit voivat tuottaa näitä tunkeutumistekijöitä optimaalisesti ainoastaan vasteena tietyille ympäristöperäisille signaaleille, joita tavallisesti ei esiinny in vitro -olosuhteissa. Tälle hypoteesille on jokin aika sitten saatu tukea raportista, jonka mukaan tavanomaisesti kasvatettuja *C. jejuni*a vastaan valmistetut antiseerumit estivät ainoastaan marginaalisesti bakteerien pääsyn solujen sisään in vitro -olosuhteissa [Konkel, et al., J. Infect. Dis. 168 (1993) 948 - 954].

Kaniinien immunisointi uutteilla, jotka oli valmistettu *Campylobacter*-bakteereista, joita oli kasvatettu yhden solukerroksen paksuisten epiteelisoluviljelmien läsnäollessa olosuhteissa, jotka voimistavat soluihin tunkeutumista, tuotti tulokseksi sen, että saatiin valmistettua antiseerumia, joka inhiboi huomattavasti bakteerien tunkeutumista soluihin.

Tutkijat ovat tutkineet bakteerien kasvua suoliston muodostamassa ympäristössä asiaankuuluvien virulenssitekijöiden tunnistamiseksi. Esimerkiksi *Campylobacter*-kanta 81-176, jota on kasvatettu kaniinin sykkyräsuolen mutkissa, ilmentää proteiineja, jotka eivät ilmenny tavanomaisissa laboratorioissa käytettävissä viljelyolosuhteissa in vitro -olosuhteissa [Panigrahi, et al., *Infect. Immun.* 60 (1992) 4938 - 4944]. Uusien proteiinien tai proteiinien voimistunutta synteesiä on havaittu *Campylobacter*-bakteereissa, joita on kasvatettu yhden solukerroksen paksuisissa INT 407 -soluviljelmissä verrattuna bakteereihin, joita on viljelty ilman epiteelisoluja [Konkel, et al., *J. Infect. Dis.* 168 (1993) 948 - 954]. Lisäksi nämä muutokset liittyivät ajallisesti *C. jejuni* voimistuneeseen kykyyn tunkeutua elimistöön. *C. jejuni* avirulentissa kannassa indusoitui muita muutoksia, kuten solujen morfologia, flagellan menetys, uusien ulkomembraaniproteiinien ilmentyminen ja solun pinnan hiilihydraattien muutos silloin, kun bakteereja kasvatettiin välillä kanan alkioissa suonensisäisesti ja ravitsemuskalvolla [Field, et al., *J. Med. Microbiol.* 38 (1993) 293 - 300].

Muiden suoliston komponenttien, kuten sappihappojen tai suolojen, tiedetään olevan inhibitorisia joillekin bakteereille, mutta sappihapoilla voi olla jokin muu osuus, jolla ne vaikuttavat bakteerin virulenssin ilmentymiseen.

Pope ja Payne [93rd Am. Soc. Microbiol. B-147 (1993)] ovat raportissaan maininneet, että natriumkenodeoksikolaattia

sisältävässä lihalielessä viljellyn *Shigella flexneri* voitiin osoittaa kykenevän infektoimaan HeLa-solujen yhden solukerroksen paksuisia viljelmiä 3 - 5-kertaa normaalia voimakkaammin. He raportoivat kuitenkin, että muilla sappi-

5 hapoilla ja detergenteillä, joita olivat kolaatti, glyko-

kolaatti, taurodeoksikolaatti ja CHAPS-detergenttisarja, digitoniini ja Triton X-100 ja tämän natriumsuolat, ei ollut vaikutusta *S. flexneri* kykyyn tunkeutua soluihin. Lisäksi

heidän käyttämällään lihalielessä, joka sisälsi kenodeoksi-

10 kolaattia, ei myöskään ollut vaikutusta *E. coli* tai avirulenttien *Shigella*-kantojen kykyyn tunkeutua soluihin.

S. flexneri uusien proteiinin synteesin saa myös aikaan pH:n, lämpötilan ja elatusaineen ionikoostumuksen muuttaminen [Mekalanos, J. Bacteriol. 174 (1992) 1 - 7].

15

PCT-patenttihakemusjulkaisussa nro WO 93/22 423, joka on julkaistu 11.11.1993, kuvataan menetelmiä bakteerien kasvat-

20 tamiseksi lipideissä, kuten fosfatidyylikeriiniinissä, tai limassa, ja sellaisten proteiinien eristämiseksi, joiden ilmentyminen voimistuu fosfatidyylikeriinin läsnäollessa suoritettun kasvatuksen vaikutuksesta. Tässä kirjallisuus-

viitteessä ei kuvata eikä ehdoteta tämän keksinnön mukaisia menetelmiä sellaisten suolistobakteerien valmistamiseksi,

25 joiden virulenssi tai antigeeniset ominaisuudet ovat voimistuneet.

Rokotteita monia suolistopatogeenisiä, kuten *Campylobacter*-bakteereita ja *Shigella*ta, vastaan ei ole vielä saatavilla,

30 mutta näiden taudin aiheuttajien epidemiologia tekee näistä rokotteista tärkeän päämäärän. Shigelloosia esiintyy endemisenä kaikkialla maailmassa ja sen lukuun lasketaan kehitysmaissa noin 10 % vuosittaisesta ripulista johtuvasta 5 miljoonasta lapsuusiän kuolemasta. Vaikkakin *Campylobacter*-bakteerit on vasta jokin aika sitten tunnistettu suolistopatogeeniksi, sen katsotaan nykyisin olevan yksi tärkeimmistä ripulitaudin aiheuttajista sekä kehittyneissä

35

että alikehittyneissä maissa. Vuosittain arvioidaan esiintyvän noin 400 - 500 miljoonaa *Campylobacter-ripulia* ja yli 2 miljoonaa tapausta esiintyy Yhdysvalloissa.

5 Shigelloosi on seurausta bakteerien tunkeutumisesta koolonin limakalvoon. Tunkeutuminen liittyy sellaisen plasmidin esiintymiseen, joka esiintyy kaikissa tunkeutumiskykyisissä isolaateissa [Sansonetti, et al., *Infect. Immun.* 35 (1982) 852 - 860]. Tämän plasmidin fragmentti sisältää invaasio-
10 plasmidiantigeeni (Ipa) -geenit, Ipa A, -B, -C, and -D. Ipa B, -C ja -D-proteiinit ovat välttämättömiä tunkeutumistapahtumalle [Baudry, et al., *J. Gen. Microbiol.* 133 (1987) 3403 - 3413].

15 Ipa-proteiinien ehdollepanolle rokotteiksi on loogisia perusteita, vaikkakaan näiden suojaustehokkuudesta ei ole saatu selvää näyttöä. Ipa B ja Ipa C ovat immunodominantteja proteiineja [Hale, et al., *Infect. Immun.* 50 (1985) 620 - 629]. Lisäksi 62 kDa:n suuruinen Ipa B -proteiini (invasiini, joka käynnistää tunkeutumisen soluun ja toimii membraaniin sitoutuneen fagosytoosirakkulan hajoamisessa) [High, et al., *EMBO J.* 11 (1992) 1991 - 1999], on säilynyt voimakkaasti Shigella-lajeissa. Pitkään jatkuva sairaus, jota havaitaan aliravituissa lapsissa, joilla ei ole merkittävää limakalvon vasta-ainetta Shigellan Ipa:ta vastaan, viittaa
25 siihen, että Ipa:ta vastaan suunnattu limakalvon antigeeni voi rajoittaa infektion leviämistä ja vakavuutta.

Vaikkakin eläimissä ja ihmisessä on tutkittu useita ehdolla
30 olleita Shigellalle soveltuvia rokotteita, ei ole löydetty yhtään suotuisaa rokotetta. Huolimatta Ipa-proteiinien mahdollisesta merkityksestä virulenssissa, perustuvat useimmat shigelloosia vastaan kehitetyt ehdolla olevat rokotteet lipopolysakkaridiantigeeniin, jossa serotyypispesifiset
35 determinantit sijaitsevat. On myös kehitetty parenteraalisesti annettava polysakkaridin ja proteiinin konjugaattirokote, mutta sen on vielä osoitettava antavan merkittävän

5 suojan eläimissä [Robbins, et al., Rev. Inf. Dis. 13 (1991) S362 - 365]. Samalla tavoin annettu ribosomaalinen rokote saa aikaan limakalvon immunitetin, mutta sen suojaus-
tehokkuus on vielä osoitettava [Levenson, et al., Arch. Allergy Appl. Immunol. 87 (1988) 25 - 31].

10 Campylobacter-infektioiden patogeneesiä ei ymmärretä yhtä hyvin kuin Shigella-infektioiden patogeneesiä. Soluihin tunkeutumista koskevat tutkimukset in vitro -olosuhteissa [Konkel, et al., J. Infect. Dis. 168 (1993) 948 - 954], ja histopatologiset tutkimukset [Russell, et al., J. Infect. Dis. 168 (1993) 210 - 215], viittaavat siihen, että koolonin invaasio on myös tärkeä. Tämä johtopäätös on yhdenmukainen sen havainnon suhteen, että Campylobacter-bakteerien aiheut-
15 tama ripuli voi olla vakava ja siihen voi liittyä veren esiintyminen ulosteissa. Nämä aktiivisuudet voivat liittyä immunodominanttiin 62 kDa:n suuruiseen flagelliini-proteiiniin. Jokin aika sitten julkaistu raportti viittaa siihen, että flagellan esiintyminen on välttämätön Campylo-
20 bacter-bakteerin pääsyle yhden solukerroksen paksuisten polaaristen epiteelisolukerrosten läpi [Grant, et al., Infect. Immun. 61 (1993) 1764 - 1771].

25 Minkään spesifisen Campylobacter-antigeenin ei ole osoitettu olevan suojaava. Tässä suhteessa arvellaan kuitenkin pienimoolimassaisten (28 - 31 kDa)-proteiinien eli PEB-proteiinien ja immunodominantin flagellan proteiinien olevan lupaa-
via [Pavlovskis, et al., Infect. Immun. 59 (1992) 2259 - 2264; Blaser ja Gotschilch, J. Bio. Chem. 265 (1990) 14529 -
30 14535]. Flagellaproteiinin tärkeyteen viittaa sen liittymisen suolen kolonisaatioon ja kantojen väliseen suojaan infektiota vastaan Lior-alaryhmissä [Pavlovskis, et al., Infect. Immun. 59 (1992) 2259 - 2264]. Flagellaproteiiniin perustuvaan Campylobacter-rokotteeseen voi kuitenkin olla
35 otettava mukaan flagellaproteiinantigeeni 8 - 10 kliinisesti merkityksellisestä serologisesta Lior-ryhmästä.

Tästä syystä tämän keksinnön tavoitteita ovat 1) viljelyolosuhteet, joita käytetään suolistobakteerien kasvattamiseen tai käsittelymiseen in vitro -olosuhteissa ja jotka ovat optimaaliset käynnistämään invasiivisten aktiivisuuksien ja/tai tiettyjä ominaisuuksien, mukaan lukien solun pinnan ominaisuuksien, muodostumisen tai tehostamaan kyseessä olvia aktiivisuuksia tai ominaisuuksia; 2) muutokset, jotka korreloivat edellisen kohdan suhteen ja jotka koskevat bakteerien kykyä tunkeutua soluihin tai solujen ominaisuuksia, mukaan lukien pinnan ominaisuuksia, ja näiden yhteydessä esiintyviä antigeeniprofiilien muutoksia; 3) näiden organismien virulenssin lisääminen pieneläinmalleissa; ja 4) antiseerumit, jotka ovat suunnattuja sellaisia organismeja vastaan, joiden tunkeutumiskyky soluihin on voimistunut tai jotka ovat muuttuneet ominaisuuksiltaan, pinnan ominaisuudet mukaan lukien, jotka antiseerumit ovat tavanomaisesti kasvatettuja bakteereja vastaan suunnattuja antiseerumeja tehokkaampia neutralisoimaan eläviä organismeja, joita käytetään patogeeneinä eläinten käsittelyyn in vitro tai in vivo -olosuhteissa. Tämä keksintö on tehty ratkaisujen löytämiseksi näihin ja muihin tarpeisiin.

Missään edellä tarkastellussa kirjallisuusviitteessä ei neuvota tai ehdoteta tämän keksinnön mukaisia in vitro -olosuhteissa käytettäviä menetelmiä eikä tämän keksinnön mukaisia rokotteita, jotka sisältävät antigeenisyydeltään parannettuja suolistobakteereja. Minkä tahansa tässä kappaleessa tai missä tahansa tämän patenttihakemusjulkaisun muussa kappaleessa esiintyvän kirjallisuusviitteen siteeraamisen tai mainitsemisen ei ole katsottava viittaavan siihen, että tällainen kirjallisuusviite on käytettävissä tekniikan tasona tämän keksinnön suhteen.

3. Keksinnön yhteenveto

Tästä keksinnöstä saadaan käyttöön suolistobakteereille tarkoitettuja tarkkaan rajattuja viljelyolosuhteita ja kasvatusmediumiin lisättäviä komponentteja, joiden vaikutuk-

sesta bakteereihin muodostuu virulenssitekijöitä ja muita antigeenejä tai näiden muodostuminen tehostuu. Nämä antigeenit ovat edullisesti immunogeenisiä. Näillä immunogeenisillä antigeeneillä on edullisemmin korrelaatiota virulenssi-indeksien suhteen.

Suolistobakteereita kasvatetaan käyttäen olosuhteita ja komponentteja, jotka jäljittelevät tiettyjä in vivo -olosuhteita, joihin organismi joutuu luonnossa. Tämän keksinnön mukaisilla menetelmillä saadaan aikaan suolistobakteereja, joiden antigeenisyyttä on saatu parannettua ja joissa esiintyy fenotyypin muutoksia, kuten solua kohti ilmoitetun kokonaisproteiinimäärän lisääntymistä, uusia yksittäisiä proteiineja tai näiden määrän lisääntymistä, pinnan hiilihydraattien muuttumista tai näiden määrän lisääntymistä, solun pinnan lipopolysakkaridien muuttumista, adheesiokyvyn lisääntymistä, invaasiokyvyn lisääntymistä ja/tai liikkuvuuden tehostumista solujen välisessä tilassa. Lisäksi tämän keksinnön mukaiset menetelmät ovat sovitettavissa käytännön tasolla suuressa mittakaavassa suoritettaviin fermentaatioihin kaupallisia käyttömuotoja varten.

Mainittuja antigeenisyyden suhteen parannettuja suolistobakteereja voidaan käyttää suojaavien rokotteiden, kuten inaktivoiduista kokonaisista soluista valmistettujen rokotteiden tai alayksikkörokotteiden, valmistamiseen, tai diagnostisiin tarkoituksiin, kuten vasta-aineiden valmistamiseen ja patogeenisten suolistobakteerien havaitsemiseen tai antibioottien valmistamiseen. Lisäksi tämän keksinnön mukaisesti parannettujen suolistobakteerien aikaansaamia vastaaineita voidaan käyttää passiivisinä rokotteina.

Tästä syystä yksi tämän keksinnön kohde on menetelmä sellaisten suolistobakteerien valmistamiseksi, joita ovat antigeenisten ominaisuuksiensa suhteen parannetut *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. tai Escherichia coli ja joka menetelmä käsittää sen, että: kasvatetaan mainittuja suolistobakteereja in vitro -olosuhteissa sellaisen olo-
- 5 suhteiden yhdistelmän vallitessa, joka käsittää a) 0,05 - 3 % sappea tai 0,025 - 0,6 % yhtä tai useampaa sappihappoa tai näiden suolaa, 30 °C:n ja 42 °C:n välisessä lämpötilassa siihen asti, että viljelmä on varhaisessa logaritmivaiheessa, varhaisen logaritmivaiheen ja stationaarivaiheen väli-
- 10 sessä vaiheessa tai stationaarivaiheessa, ilmassa tai mikroaerofiilissä olosuhteissa, kuten 5 - 20-%:isen CO₂:n ja 80 - 95-%:isen ilman seoksessa, 5 - 20-%:isen CO₂:n ja 80 - 95-%:isen N₂:n seoksessa; tai 5 - 10-%:isen O₂:n, 10 - 20-%:isen CO₂:n ja 70 - 85-%:isen N₂:n seoksessa; ja mahdoll-
- 15 lisesti divalenttien kationien kelaattorien, kuten, 0 - 100 µM, edullisesti 25 µM, BAPTA/AM:n, 0 - 10 mM EGTA:n ja 0 - 100 µM EGTA/AM:n, läsnäollessa, mainittuihin kuitenkin rajoittumatta, tai b) menetellen kuten kohdassa a) lukuun ottamatta sitä, että kasvatus tapahtuu divalenttien katio-
- 20 nien kelaattorin, kuten 1,0 - 100 µM, edullisesti 25 µM, BAPTA/AM:n, 0,5 - 10 mM EGTA:n tai 1 - 100 µM EGTA/AM:n, läsnäollessa ja ilman sappea, sappihappoja tai sappihapon suoloja.
- 25 Tämän keksinnön mukaisesti minkä tahansa yksittäisen sappihapon tai tämän suolan konsentraatioita ovat 0,025 - 0,6-%:inen, edullisesti 0,05 - 0,5-%:inen, edullisemmin 0,05 - 0,2-%:inen konsentraatio, ja edullisin on 0,05 % tai 0,1 %. Edullisia ovat menetelmät, joissa mainittu sappihappo
- 30 tai tämän suola käsittää deoksikolaatin tai glykokolaatin.
- Vielä yksi tämän keksinnön kohde on suolistobakteeri, joka on Campylobacter sp., Yersinia sp., Helicobacter sp., Gastrospirillum sp., Bacteroides sp., Klebsiella sp.,
- 35 Enterobacter sp., Salmonella sp., Shigella sp., Aeromonas sp., Vibrio sp., Clostridium sp., Enterococcus sp. tai Escherichia coli, jossa kohteessa mainittuja suolistobaktee-

reja kasvatetaan in vitro -olosuhteissa sellaisten olosuhteiden yhdistelmän vallitessa, joka edistää antigeenisiltä ominaisuuksien tehostumista, ja mainitut olosuhteet käsittävät olosuhteet, jotka ovat: a) 0,05 - 3 % sappea tai 0,025 - 0,6 % yhtä tai useampaa sappihappoa tai näiden suolaa, 30 °C:n ja 42 °C:n välisessä lämpötilassa siihen asti, että viljelmä on varhaisen logaritmivaiheen kohdalla, varhaisen logaritmivaiheen ja stationaarivaiheen välissä tai stationaarisen vaiheen kohdalla, ilmassa tai mikroaerofiilissä olosuhteissa, kuten 5 - 20-%:isen CO₂:n ja 80 - 95-%:isen ilman seoksessa, 5 - 20-%:isen CO₂:n ja 80 - 95-%:isen N₂:n seoksessa; tai 5 - 10-%:isen O₂:n, 10 - 20-%:isen CO₂:n ja 70 - 85-%:isen N₂:n seoksessa; ja mahdollisesti divalenttisten kationien kelaattorin, kuten, 0 - 100 µM, edullisesti 25 µM, BAPTA/AM:n, 0 - 10 mM EGTA:n ja 0 - 100 µM EGTA/AM:n, läsnäollessa, mainittuihin kuitenkin rajoittumatta, tai b) menetellen kuten kohdassa a) lukuun ottamatta sitä, että kasvatus tapahtuu divalenttisten kationien kelaattorin, kuten 1,0 - 100 µM, edullisesti 25 µM, BAPTA/AM:n, 0,5 - 10 mM EGTA:n tai 1 - 100 µM EGTA/AM:n, läsnäollessa ja ilman sappea, sappihappoja tai sappihapon suoloja.

Vielä yksi tämän keksinnön kohde on rokote, joka sisältää antigeenisten ominaisuuksiensa suhteen parannettuja kokonaisia suolistobakteereja tai näiden komponentteja, jotka ovat *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. tai *Escherichia coli*, tai näiden immunogeenistä fragmenttia; ja mahdollisesti farmaseuttisesti hyväksyttävää kantaja-ainetta tai laimenninta.

Edullinen rokote on rokote, joka sisältää kokonaisia inaktivoituja antigeenisyytensä suhteen parannettuja suolisto-

bakteereja. Vielä yksi tämän keksinnön kohde on rokote, joka lisäksi sisältää adjuvanttia.

5 Vielä yksi tämän keksinnön kohde kohdistuu vasta-aineisiin (mukaan lukien mutta mainittuihin kuitenkin rajoittumatta antiseerumit, puhdistetut IgG- tai IgA-vasta-aineet, Fab-fragmentit ja muut näitä vastaavat muodot), jotka kykenevät sitoutumaan spesifisesti vähintään yhteen tämän keksinnön mukaiseen suolistobakteerin antigeeniseen determinanttiin.

10 Tällaiset polyklonaaliset ja monoklonaaliset vasta-aineet ovat käyttökelpoisia immunomääritysreagensseina suolistobakteerien havaitsemiseksi eläimestä tai tästä peräisin olevasta biologisesta näytteestä. Tämän keksinnön mukaiset polyklonaaliset ja monoklonaaliset vasta-aineet ovat myös

15 käyttökelpoisia passiivisinä rokotteina käytettäväksi antamaan suojaa suolistobakteeri-infektioita ja -sairauksia vastaan.

20 Vielä yksi tämän keksinnön kohde on in vitro -olosuhteissa käytettävä menetelmä mahdollisten antimikrobiaalisten aineiden määrittämiseksi, joka menetelmä sisältää vaiheet, joissa antigeenisten ominaisuuksiensa suhteen parannettuja suolistobakteereita, jotka ovat *Campylobacter* sp., *Yersinia* sp., *Helicobacter* sp., *Gastrospirillum* sp., *Bacteroides* sp.,

25 *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp., *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Aeromonas* sp., *Vibrio* sp., *Clostridium* sp., *Enterococcus* sp. and *Escherichia coli*, saatetaan kosketukseen potentiaaalisten aineiden kanssa ja bakterisidiset ja bakteriostaattiset vaikutukset määritetään.

30

Vielä yksi tämän keksinnön kohde on in vitro -olosuhteissa käytettävä menetelmä, joka on tarkoitettu käytettäväksi isännässä muodostuneiden vasta-aineiden havaitsemiseen tai suolistobakteerien havaitsemiseen eläimestä tai tästä peräisin olevasta biologisesta näytteestä, joka menetelmä sisältää vaiheet, joissa isännästä peräisin oleva biologinen

35 näyte saatetaan kosketukseen tämän keksinnön mukaisten

antigeenisten ominaisuuksiensa suhteen parannettujen suolistobakteerien kanssa, jotka ovat *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. tai *Escherichia coli*, näiden sisältämien antigeenien kanssa tai näitä vastaan suunnattujen vasta-aineiden kanssa, ja suoritetaan seulonta vasta-aineen ja antigeenin välisten vuorovaikutusten havaitsemiseksi.

Vielä yksi tämän keksinnön kohde liittyy diagnostiseen määrittelyspakkaukseen, joka on tarkoitettu käytettäväksi sellaisten isännän muodostamien vasta-aineiden havaitsemiseen, jotka on suunnattu suolistobakteereja vastaan, tai suolistobakteerien havaitsemiseen, joka määrittelyspakkaus sisältää antigeenisten ominaisuuksiensa suhteen parannettuja suolistobakteereita, jotka ovat *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. tai *Escherichia coli*, tai näitä vastaan suunnattuja vasta-aineita, sekä kaikki muut määrittelyspakkauksen välttämättömät komponentit.

Edullisia suolistobakteereja, joihin tämän keksinnön useat eri kohteet liittyvät, ovat *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 gallinarum*, *Salmonella pullorum*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella enteritidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* ja *Enterococcus faecalis*. Edullinen *Escherichia coli* sisältää mainittuihin kuitenkin rajoittu-

matta enterotoksisia, enterohemorragisia, enteroinvasiivisia, enteropatogeenisia tai muita kantoja.

Tämä keksintö perustuu osaksi siihen hämmästyttävään havaintoon, että tämän keksinnön mukaiset antigeenisyytensä suhteen parannetut suolistobakteerit saavat aikaan immuunivasteita, jotka antavat kantojen tai tyyppien väliset rajat ylittävän suojan laajempaa kantojen valikoimaa vastaan tai saman bakteerilajin serotyyppejä vastaan kuin mitä samat suolistobakteerit, joita on kasvatettu tavanomaisia viljelyolosuhteita käyttäen. Vähintään yhdessä tapauksessa antaa tämän keksinnön mukaisten antigeenisyytensä suhteen parannettujen suolistobakteerien aikaansaama immuunivaste lajien rajat ylittävän suojan eri suolistobakteerilajeja vastaa.

4. Lyhyt kuvaus piirroksista

Kuviot 1A, 1B ja 1C kuvaavat graafisesti tuloksia C. jejuni 81-176:n pinnan uutteen hydrolysaateista peräisin olevien monosakkaridien korkean suorituskyvyn nestekromatografiasta.

Kuvio 1A: standardit: fukoosi "Fuc", N-asetyyli-galaktoosamiini "GalNac", N-asetyyli-glukosamiini "GlcNac", galaktoosi "Gal", glukooosi "Glc", mannoosi "Man". Kuvio 1B: tavanomaisesti kasvatettujen bakteerien "BHI" pinnasta peräisin oleva uute. Kuvio 1C: tämän keksinnön mukaisten menetelmien mukaan kasvatettujen bakteerien "DOC" pinnasta peräisin olevat utteet.

Kuvio 2 esittää kuvallisessa muodossa natriumdodekyylisulfaatti-polyakryyliamidigeelielektroforeesin (SDS-PAGE) tuloksia, jotka esittävät tavanomaisesti kasvatetun "BHI" tai tämän keksinnön mukaisten menetelmien mukaisesti kasvatetun (0,8 % härän sapen sappihappoja "OX" tai 0,1 % deoksikolaattia "DOC") C. jejuni 81-176:n kokonaisten solujen (kanavat 1, 2 ja 3) tai solun pinnan uutteen (kanavat 5 ja 6) proteiineja toisiinsa verrattuna.

Kuvio 3 esittää kuvallisessa muodossa Western-blotti-analyysin tuloksia, jotka esittävät kokonaisilla *C. jejuni* 81-176 -soluilla suoritettun infektiion aikaansaaman hillerin IgA:ta sisältävän liman sitomia proteiineja koskevaa tutkimusta. Tavanomaisesti kasvatetut kokonaiset *C. jejuni* 81-176 -solut, "1"; tai tämän keksinnön mukaisten menetelmien mukaisesti kasvatetut kokonaiset *C. jejuni* 81-176 -solut, joiden kasvatukseen on käytetty 0,8-%:isia härän sapsen sappihappoja, "2", tai 0,1-%:ista deoksikolaattia, "3"; tai solun pinnan uutteen, jotka ovat peräisin tavanomaisesti kasvatetusta *C. jejuni* 81-176:sta, "4"; tai tämän keksinnön mukaisten menetelmien mukaisesti 0,1-%:ista deoksikolaattia käyttäen kasvatetusta *C. jejuni* 81-176:sta, "5".

Kuvio 4 esittää kuvallisessa muodossa Western-blottianalyysin tuloksia, jotka esittävät vertailua, joka koskee flagelliinispesifisen monoklonaalisen 72C-vasta-aineen sitomia proteiineja, jotka ovat peräisin tämän keksinnön mukaisten menetelmien mukaisesti kasvatetuista kokonaisista *C. jejuni* 81-176-soluista, "3"; tavanomaisesti kasvatetuista *C. jejuni* 81-176-soluista, "2"; tai fermentorissa tämän keksinnön mukaisten menetelmien mukaisesti kasvatetuista *C. jejuni* 81-176-soluista, "1".

Kuvio 5 esittää kuvallisessa muodossa SDS-PAGE-tuloksia, jotka esittävät sellaisen lipopolysakkaridien (LPS) vertailua, jotka ovat peräisin tavanomaisesti kasvatetuista, kanava "1", tai tämän keksinnön mukaisten menetelmien mukaisesti 0,1-%:ista deoksikolaattia käyttäen kasvatetuista, kanava "2", kokonaisista *S. flexneri* 2457T -soluista.

Kuvio 6 esittää graafisesti tämän keksinnön mukaisten menetelmien mukaisesti kasvatetun *C. jejuni* immunologisen ristiinreagoivuuden voimistumista. *C. jejuni* 81-176 -soluja, joita oli kasvatettu tavanomaisesti tai tämän keksinnön mukaisten menetelmien mukaisesti kuvaavana esimerkkinä esitettyssä esimerkissä 5 kuvatulla tavalla (DOC), käytettiin

vasta-aineiden muodostumisen indusoimiseksi. Kuviossa on esitetty näiden kahden vasta-ainetyypin (toisin sanoen anti-C. jejuni 81-176:n, jota bakteeria oli viljelty BHI:ssa, ja anti-C. jejuni 81-176:n, jota bakteeria oli viljelty DOC:ssa) agglutinaatioaktiivisuutta useita eri C. jejuni-serotyyppejä vastaan. Yksityiskohdat on esitetty esimerkin 32 kappaleessa 9.

Kuviot 7A, 7B ja 7C ovat graafisia esityksiä, jotka esittävät tehokkuutta, jolla inaktivoituja kokonaisia C. jejuni 81-176 -soluja sisältävä rokote suojaa hiiriä nenän kautta annetuilla elävillä C. jejuni 81-176 -soluilla tehtyä käsitelyä vastaan. Hiiret oli rokotettu fosfaatilla puskuroidulla fysiologisella suolaliuoksella (PBS; yhtenäinen viiva), PBS:lla + LT-adjuvantilla (adjuvantti; katkoviiva), formaliinilla inaktivoituilla kokonaisilla C. jejuni 81-176 -soluilla, jotka oli kasvatettu ja koottu talteen esimerkin 5 mukaisesti, ilman adjuvanttia (CWC; avoin ympyrä/yhtenäinen viiva) tai LT-adjuvantin kanssa (CWC + adjuvantti; täytetyt ympyrät/yhtenäinen viiva). Rokotteiden tehokkuuksia tutkittiin käyttäen suolen kolonisaatioon perustuvaa määrittystä. Kuvio 7A (ylin osakuvio) esittää sellaisilla rokotuksilla aikaansaattua suojaa koskevia tuloksia, joihin oli käytetty kolmea oraalista annosta, jotka sisälsivät 10^5 inaktivoitua bakteeripartikkelia annosta kohti. Kuvio 7B (keskimäinen osakuvio) esittää sellaisilla rokotuksilla aikaansaattua suojaa koskevia tuloksia, joihin oli käytetty kolmea oraalista annosta, jotka sisälsivät 10^7 inaktivoitua bakteeripartikkelia annosta kohti. Kuvio 7C (alin osakuvio) esittää sellaisilla rokotuksilla aikaansaattua suojaa koskevia tuloksia, joihin oli käytetty kolmea oraalista annosta, jotka sisälsivät 10^9 inaktivoitua bakteeripartikkelia annosta kohti. Yksityiskohdat on esitetty esimerkin 34 kappaleessa 11.

Kuviot 8A, 8B ja 8C ovat graafisia esityksiä, jotka esittävät tehokkuutta, jolla inaktivoituja kokonaisia C. jejuni

81-176 -soluja sisältävä rokote suojaa hiiri oraalisesti annetuilla elävillä *C. jejuni* 81-176 -soluilla tehtyä käsittelyä vastaan. Hiiret rokotettiin kuvioiden 7A, 7B ja 7C lyhyessä kuvauksessa kuvatulla tavalla. Rokotteiden tehokkuuksia tutkittiin käyttäen suolen kolonisaatioon perustuvaa määrittystä. Kuvio 8A (ylin osakuvio) esittää sellaisten rokotusten tuottamaa suojaa koskevia tuloksia, joihin oli käytetty kolmea oraalista annosta, jotka sisälsivät 10^5 inaktivoitua bakteeripartikkelia annosta kohti. Kuvio 8B (kes-

5 kimmäinen osakuvio) esittää sellaisten rokotusten tuottamaa suojaa koskevia tuloksia, joihin oli käytetty kolmea oraalista annosta, jotka sisälsivät 10^7 inaktivoitua bakteeripartikkelia annosta kohti. Kuvio 8C (alin osakuvio) esittää

10 sellaisten rokotusten aikaansaamaa suojaa koskevia tuloksia, joihin oli käytetty kolmea oraalista annosta, jotka sisälsivät 10^9 inaktivoitua bakteeripartikkelia annosta kohti. Yksityiskohdat on esitetty esimerkin 34 kappaleessa 9.

15

Kuvio 9 on graafinen esitys *Shigella flexneri* -viljelmän kasvuvaiheen vaikutuksesta *Shigella flexneri* 2457T -solujen invaasiokykyyn. *Shigella flexneri* 2457T -soluja kasvatettiin tavanomaisesti (BHI) tai tämän keksinnön mukaisten menetelmien mukaisesti sellaisena kuin nämä on esitetty kuvaavana esimerkkinä esimerkissä 9 (DOC-EL) - toisin sanoen solut

20 koottiin talteen viljelmän ollessa varhaisessa logaritmivaiheessa - tai esimerkin 9 mukaisesti mutta antaen solujen saavuttaa myöhäinen logaritmivaihe ennen solujen talteenottoa (DOC-LL). Kuviossa on esitetty näiden eri preparaattien invaasiokyky. Yksityiskohdat on esitetty esimerkin 35 kappaleessa 12.

25

30

Kuvio 10 esittää graafisesti *Shigella*-solujen invaasiokyvyn voimistumista viljeltäessä näitä tämän keksinnön mukaisilla menetelmillä. *S. sonnei* ja *S. dysenteriae* 3818:aa viljeltiin tavanomaisesti (BHI) tai tämän keksinnön mukaisten menetelmien mukaisesti esimerkissä 9 kuvaavana esimerkkinä esitetyllä tavalla. Kuviossa esitetään näiden eri *Shigella*-

35

solupreparaattien kykyä tunkeutua INT-407-soluihin. Yksityiskohdat on esitetty esimerkin 35 kappaleessa 12.

5 Kuvio 11 kuvaa graafisesti tämän keksinnön mukaisten menetelmien mukaisesti kasvatetun Shigellan immunologisen ristiinreagoivuuden voimistumista. Vasta-aineiden muodostumisen käynnistämiseen käytettiin tämän keksinnön mukaisten menetelmien mukaisesti kasvatettua *S. flexneri* 2457T:tä esimerkissä 9 kuvaavana esimerkkinä esitetyllä tavalla.

10 Kuviossa on esitetty näiden muodostuneiden vasta-aineiden agglutinaatioaktiivisuutta *S. flexnerin*, *S. sonnein*, *S. dysenteriae* ja *S. boydii* serotyyppejä vastaan, joita oli kasvatettu tavanomaisesti (BHI) tai tämän keksinnön mukaisten menetelmien mukaisesti esimerkissä 9 kuvaavana esimerkkinä esitetyllä tavalla. Yksityiskohdat on esitetty esimerkin 36 kappaleessa 12.

15

20 Kuvio 12 kuvaa graafisesti sapen konsentraation ja *Helicobacter pylori* -viljelmän kasvuvaiheen vaikutusta *Helicobacter pylori* NB3-2 -solujen adheesiokykyyn. *H. pylori* NB3-2 -soluja kasvatettiin elatusaineessa, joka sisälsi 0 %, 0,025 %, 0,05 % tai 0,1 % sappea ja ne koottiin talteen 8, 10, 12 ja 18 h ympäryksestä. Kuviossa on esitetty näiden eri *H. pylori* NB3-2 -solupreparaattien kykyä tunkeutua INT-407-soluihin. Yksityiskohdat on esitetty esimerkin 38 kappaleessa 14.

25

30 Kuvio 13 esittää graafisesti sapen konsentraation ja *Helicobacter pylori* -viljelmän kasvuvaiheen vaikutusta *Helicobacter pylori* G1-4 -solujen adheesiokykyyn. *H. pylori* G1-4 -soluja kasvatettiin elatusaineessa, joka sisälsi 0 %, 0,1 % tai 0,2 % sappea ja ne koottiin talteen 6, 8, 10, 12, 14 ja 16 tuntia ympäryksestä. Kuviossa on esitetty näiden erilaisen *H. pylori* G1-4 -solupreparaattien kykyä tunkeutua INT-407-soluihin. Yksityiskohdat on esitetty esimerkin 38 kappaleessa 15.

35

5. Keksinnön yksityiskohtainen selitys

Tämän keksinnön mukaiset menetelmät liittyvät suolistobakteerien kasvattamiseen in vitro -olosuhteissa käyttämällä tiettyjen olosuhteiden yhdistelmää, jossa tietyt komponentit on valittu käynnistämään antigeenien ja/tai virulenssitekijöiden ilmentymisen tai voimistamaan tätä.

Tässä keksinnössä ja patenttivaatimuksissa termi "suolisto-" tarkoittaa bakteereja, jotka esiintyvät normaalisti tai ovat assosioituneena mihin tahansa eläimen gastrointestinaalikanavan osaan, sekä mitä tahansa bakteeria, joka saa aikaan infektion missä tahansa eläimen gastrointestinaalikanavan osassa. Näitä suolistobakteereja ovat sekä grampositiiviset että gramnegatiiviset bakteerit.

Termit "komponentit" ja "olosuhteet" liittyvät tässä keksinnössä ja patenttivaatimuksissa moniin tekijöihin, jotka liittyvät suolistobakteerin luonnolliseen ympäristöön in vivo -olosuhteissa ja muihin tekijöihin. Näitä komponentteja ja olosuhteita ovat mainittuihin kuitenkin rajoittumatta sappi, sappihapot tai tämän suolat tai niiden biologiset prekursorit, kuten kolesteroli, pH, mikroaerofiiliset olosuhteet, osmolaarisuus ja bakteerien talteenotto tai kokoaminen halutussa bakteerien kasvuvaiheessa.

Termi "antigeenit" ja siihen liittyvä termi "antigeeninen" sisältää tässä keksinnössä ja patenttivaatimuksissa antigeenit tai antigeenien ominaisuudet, joita ovat mainittuihin kuitenkin rajoittumatta makromolekyylit, jotka tuovat osansa solujen morfologiaan tai solujen liikkuvuuteen; proteiinit, tarkemmin sanottuna pinnan proteiinit, lipopolysakkaridit ja hiilihydraatit. Mainitut antigeenit ovat edullisesti immunogeenisiä.

Termi "immunogeeninen" tarkoittaa tässä keksinnössä ja patenttivaatimuksissa kykyä saada aikaan vasta-aineiden muodostuminen eläimissä sen jälkeen kun mainittua eläintä on

käsitelty koostumuksella, joka sisältää tämän keksinnön mukaisesti valmistettuja kokonaisia bakteereita tai mainitun kokonaisen bakteerin fragmenttia.

5 Termi "antigeenisyyden suhteen parannettu" tai antigeenisten ominaisuuksiensa suhteen parannettu" tai "parannettu" tarkoittavat tässä keksinnössä ja patenttivaatimuksissa sitä tilaa, jossa tämän keksinnön mukaisten menetelmien mukaisesti kasvatetut suolistobakteerit ovat antigeeniensä suhteen. Tietyt immunogeeniset antigeenit ja/tai uudet immuno-
10 geeniset antigeenit esiintyvät näissä bakteereissa suurempina pitoisuuksina kuin näissä samoissa bakteereissa, joita on kasvatettu tavanomaisia menetelmiä käyttäen.

15 Termi "tavanomainen" tarkoittaa tässä keksinnössä ja patenttivaatimuksessa tällä alalla entuudestaan vallitsevaa tietämyksen tasoa.

20 Termi "mikroaerofiiliset olosuhteet" tarkoittaa tässä keksinnössä ja patenttivaatimuksissa anaerobisia olosuhteita tai korkeita CO₂-pitoisuuksia, 5 - 20 % CO₂:ta ja 80 - 95 % ilmaa sisältävää seosta; 5 - 20 % CO₂:ta ja 80 - 95 % N₂:ta sisältävää seosta; tai 5 - 10 % O₂:ta, 10 - 20 % CO₂:ta ja 70 - 85 % N₂:ta sisältävää seosta.

25 Termi "virulenssi" tarkoittaa tässä keksinnössä ja patenttivaatimuksessa niitä suolistobakteerien tekijöitä, jotka liittyvät bakteerin kykyyn tarttua ja/tai tunkeutua isäntään ja/tai kyetä elämään isännässä ja/tai saada aikaan patologinen tila.
30

35 Termi "immunologisesti ristiin suojaava" tarkoittaa tässä keksinnössä ja patenttivaatimuksissa yhden bakteerikannan tai serotyypin, joka on kokonainen solu tai jokin muu muoto, aikaansaaman immuunivasteen kykyä estää tai heikentää saman isännän infektiota eri bakteerikannalla, serotyypillä tai saman suvun lajilla.

Termi "immunologisesti ristiinreagoiva" tarkoittaa tässä keksinnössä ja patenttivaatimuksissa yhden bakteerikannan tai serotyypin, joka on kokonainen solu tai jokin muu muoto, aikaansaaman humoraalisen immuunivasteen (toisin sanoen vasta-aineiden) kykyä ristiinreagoida (toisin sanoen vasta-aineen sitoutumisen perusteella) samaan sukuun kuuluvan eri bakteerikannan, -serotyypin tai -lajin kanssa. Immunologinen ristiinreagoivuus merkitsee bakteeri-immunogeenin potentiaalia saada aikaan immunologinen ristiinsuojaus, mikä pitää myös paikkansa kääntäen.

Termi "isäntä" tarkoittaa tässä keksinnössä ja patenttivaatimuksessa joko eläimessä in vivo -olosuhteissa tai eläinsoluviljelmissä in vitro -olosuhteissa. Termi "eläin" sisältää tässä keksinnössä ja patenttivaatimuksissa, mainittuihin kuitenkin rajoittumatta, kaikki tasalämpöiset eliöt, kuten nisäkkäät ja linnut (esimerkiksi kana, kalkkuna, ankka ja muut näitä vastaavat linnut).

Antigeeniensä suhteen parannettuja suolistobakteereja tai näiden immunogeenista fragmenttia tai johdannaista sisältävässä rokotteessa voivat suolistobakteerit olla tämän keksinnön mukaisesti joko eläviä bakteereita tai ne voivat olla inaktivoituja ja ne voivat lisäksi sisältää adjuvanttia, kuten alumiinioksidia, öljy-vesi-emulsiota, enterotoksi-geenisestä E. colista peräisin olevaa lämpölabiilia toksiinia (LT), tämän ei-toksigeenisia muotoja (esimerkiksi mLT) ja/tai tämän yksittäisiä alayksikköjä, Bacille Calmette-Guerin (BCG) -adjuvanttia tai Freundin adjuvanttia, mainittuihin kuitenkin rajoittumatta, ja ne voivat lisäksi sisältää sopivaa farmaseuttista kantaja-ainetta, joita ovat mainittuihin kuitenkin rajoittumatta fysiologinen suolaliuos, glukoosi tai jokin muu vesipitoinen liuos. Muita sopivia farmaseuttisia kantaja-aineita on kuvattu teoksessa Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, joka on tämän alan perusteos. Tässä keksinnössä ja patenttivaatimuksissa sisältää termi "rokote" myös "passii-

viset rokotteet", jotka sisältävät vasta-aineita, jotka sitoutuvat spesifisesti niihin patogeeneihin, joiden aiheuttamilta infektioilta tai sairauksilta pyritään näillä toimenpiteillä suojautumaan.

5

Termi "inaktivoidut bakteerit" tarkoittaa tässä keksinnössä ja patenttivaatimuksissa suolistobakteereja, jotka ovat infektiokyvyttömiä ja/tai kolonisoitokyvyttömiä ja niihin sisältävät sekä heikennetyt että tapetut bakteerit. Heikennetyt bakteerit voivat replikoitua mutta eivät voi aiheuttaa infektiota tai tautia. Mainitut bakteerit voidaan inaktivoida millä tahansa alan ammattikokemuksen perusteella tunnetulla menetelmällä. Bakteerit voidaan esimerkiksi inaktivoida kemiallisesti, kuten kiinnittämällä formaliinilla, tai

10 inaktivoida fysikaalisesti, kuten käyttämällä lämpöä, ultraäänikäsittelyä tai säteilytystä, jotta ne saadaan kykenemättömäksi replikoitumaan ja/tai saamaan aikaan infektiota ja/tai aiheuttamaan sairautta.

15

20

Rokotetta on annettava tehokas määrä, jossa "tehokas määrä" määritellään sellaiseksi suolistobakteerien tai näiden immunogeenisen fragmentin tai johdannaisen määräksi, joka kykenee saamaan aikaan immuunivasteen potilaassa. Tarvittava määrä on erilainen käytetyn bakteerin, fragmentin tai johdannaisen antigeenisyyden mukaan ja rokotettavan kohteen lajin ja painon mukaan, mutta se voidaan saada selville vakiomenetelmin. Tämän keksinnön edullisissa sitä rajoittamattomissa sovellutusmuodoissa tehokas määrä rokotetta saa aikaan antibakteriaalisen vasta-ainetiitterin kohoamisen,

25 joka on vähintään kaksinkertainen ennen rokotusta vallinneseen tiitteriin verrattuna. Edullisessa spesifisessä tätä keksintöä rajoittamattomassa sovellutusmuodossa annetaan isännälle noin 10^7 - 10^{11} bakteeria ja edullisesti 10^8 - 10^{10} bakteeria. Edullisia rokotteita ovat inaktivoituja kokonaisia bakteereja sisältävät rokotteet.

30

35

25

30

35

Termi "tehokas määrä" sellaisena kuin sitä käytetään passiivisiin rokotteisiin, on se vasta-ainemäärä, joka kykenee estämään tai vähentämään bakteerisairautta tai infektiota. Tarvittava määrä on erilainen vasta-ainetyypin ja vasta-

5 ainetiitterin ja rokotettavan kohteen lajin ja painon mukaan, mutta tämä voidaan saada selville vakiomenetelmin.

Tämän keksinnön mukaisia rokotteita voidaan antaa paikallisesti ja/tai systeemisesti millä tahansa tällä alalla tun-

10 netulla menetelmällä, mukaan lukien mainittuihin kuitenkin rajoittumatta, annostelu suonensisäisesti, ihonalaisesti, lihaksensisäisesti, emättimensisäisesti, intraperitoneaalisesti, intranasaalisesti, oraalisesti tai jollakin muulla limakalvon kautta tapahtuvalla annostelulla.

15 Rokotteita voidaan antaa valmistettuna sopivaan, ei-toksiiseen farmaseuttiseen kantaja-aineeseen, ne voivat olla valmistettuja mikrokapseleihin, ja/tai ne voivat olla valmistettuja rokotetta pitkään vapauttavaan implanttiin.

20 Rokotteita voi olla vasta-ainepitoisuuksien säilyttämiseksi haluttua antaa useita kertoja tietyin aikaväleihin.

25 Tämän keksinnön mukaisia rokotteita voidaan antaa muiden bakteriosidisten tai bakteriostaattisten menetelmien yhteydessä.

30 Tämän keksinnön mukaisia vasta-aineita voidaan saada käyttämällä mitä tahansa tämän alan ammattikokemuksen perusteella tunnettua tavanomaista menetelmää, kuten, mainittuihin kuitenkin rajoittumatta, menetelmää, joka on kuvattu teoksessa Antibodies A Laboratory Manual [E. Harlow, D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)]. Taval-

35 lisesti eläin (voidaan käyttää hyvin suurta määrä selkärangaislajeja ja yleisimmin käytettyjä ovat hiiret, rotat, mersu, hamsterit ja kaniinit), immunisoidaan tämän keksinnön mukaisilla kokonaisilla antigeenisyydeltään parannetuilla

suolistobakteerisoluilla tai näiden immunogeenisellä fragmentilla tai johdannaisella adjuvantin tai minkä tahansa immunogeenin tehokkuutta voimistavan aineen läsnäollessa, joka myös voidaan jättää pois, ja tehosterokotukset suoritetaan säännöllisen välein. Eläimen seerumista määritetään haluttu vasta-aine millä tahansa sopivalla menetelmällä. Mainitun eläimen seerumia tai verta voidaan käyttää polyklonaalisten vasta-aineiden lähtömateriaalina.

Monoklonaalisten vasta-aineiden kyseessä ollessa eläimiä käsitellään edellä kuvatulla tavalla. Kun vasta-aineen tiitterin havaitaan olevan hyväksyttävää luokkaa, eläin lopetetaan ja perna poistetaan aseptisesti fuusiota varten. Pernasolut yhdistetään erityisesti valittuun myeloomajatkosolulinjaan ja seosta käsitellään solujen fuusiota edistävällä aineella, tyypillisesti polyetyleeniglykolilla tai jollakin muulla tätä vastaavalla aineella. Fuusion osapuolet valikoituvat näissä olosuhteissa sattumanvaraisesti ja tulokseksi saatava tuote on fuusioituneita soluja sisältävä seos, joka myös sisältää molempia fuusioitumattomia solutyyppisiä olevia soluja. Fuusioon käytettävät myeloomasolulinjat on valittu erityisesti siten, että selektiomediumia, kuten HAT:tä, hypoksantiinin, aminopteriinin ja tymidiinin seosta, käyttämällä ainoastaan solut, jotka säilyvät elossa niitä fuusioseoksesta viljeltäessä, ovat immunisoidusta luovuttajasta peräisin olevien solujen ja myeloomasolujen välisiä hybridejä. Solut laimennetaan fuusion jälkeen ja niitä viljellään selektiomediumeissa. Viljelymediumista seulotaan vasta-aine, jonka spesifisyys valittua antigeeniä kohtaan on haluttua tyyppiä. Haluttua vasta-ainetta sisältävistä viljelmistä valmistetaan soluklooneja rajalaimennoksella, joka on sitä luokkaa, että soluviljelmän voidaan katsoa olevan peräisin yhdestä solusta. Tämän keksinnön mukaisilla vasta-aineilla on käyttöä passiivisinä rokotteina suolistobakteeri-infektioita ja sairauksia vastaan.

Menetelmiin isännässä esiintyvien vasta-aineiden tai mainittujen bakteerien havaitsemiseksi sisältyvät immunomääritykset. Tällaiset määritykset ovat tällä alla tunnettuja ja niitä ovat mainittuihin kuitenkin rajoittumatta radio-

5 immunomääritykset (RIA), entsyymivälitteiset immunosorbenttimääritykset (ELISA), fluoresenssi-immunomääritykset ja fluoresenssipolarisaatioimmunomääritykset (FPIA).

Vielä yhteen sovellutusmuotoon sisältyvät diagnostiset määrityspakkaukset, jotka sisältävät kaikki välttämättömät reagenssit, joita tarvitaan tämän keksinnön mukaisen halutun immunomäärityksen suorittamiseen. Diagnostinen määrityspakkaus voidaan valmistaa kaupallisesti pakattuun muotoon yhdistelmänä, joka sisältää yhden tai useamman säiliön,

10 joihin halutut reagenssit on asetettu. Tällainen määrityspakkaus sisältää tämän keksinnön mukaisia suolistobakteereja, ja/tai tämän keksinnön mukaista monoklonaalista tai polyklonaalista vasta-ainetta yhdistettynä useisiin tavanomaisiin määrityspakkauksen komponentteihin. Tavanomaiset

15 määrityspakkauksen komponentit ovat tämän alan ammattikokemuksen perusteella ilmeisiä ja niitä on kuvattu useissa julkaisuissa, mukaan lukien julkaisu Antibodies A Laboratory Manual [Harlow, E., Lane, D., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)]. Tavanomaisia määrityspakkauksen komponentteja

20 voivat olla sellaiset tarvikkeet, kuten esimerkiksi mikrotiitterilevyt, puskurit, joiden tarkoituksena on säilyttää määritysseoksen pH (kuten Tris, HEPES ja muut vastaavat puskurit, mainittuihin kuitenkin rajoittumatta), konjugoidut sekundaariset vasta-aineet, kuten peroksidaasilla

25 konjugoitu anti-hiiri-IgG (tai mikä tahansa sellaista eläintä vastaan suunnattu anti-IgG, josta ensimmäinen vasta-aine oli valmistettu) ja muut näitä vastaavat komponentit ja muut vakioagenssit.

30 Tämän keksinnön mukaisia menetelmiä ovat suolistobakteerien kasvatus sopivassa välttämättömät ravinteet sisältävässä perusviljelymediumissa, kuten kaupallisesti saatavilla oleva

aivo-sydän-infuusiolihaliemi "BHI", Luria-lihaliemi ("LB"), lampaanveriagar "SBA", Brucella-lihaliemi, Mueller-Hinton-lihaliemi, proteose peptone beef extract -lihaliemi ja muut vastaavat tuotteet, mainittuihin kuitenkin rajoittumatta, ja joissa käytetään useita erilaisia olosuhteita ja komponentteja, joita ovat 0,05 - 3 % sappea tai 0,025 - 0,6 % yhtä tai useampaa sappihappoa tai näiden suolaa tai näiden biologista prekursoria, kuten kolesterolia, mainittuihin kuitenkin rajoittumatta, 30 - 42 °C:n välisessä lämpötilassa siihen asti, kunnes solut ovat saavuttaneet varhaisen logaritmisen vaiheen kohdalla, varhaisen logaritmisen vaiheen ja stationaarivaiheen välissä tai stationaarivaiheen kohdalla olevan kasvuvaiheen, ilmassa tai mikroaerofiilissä olosuhteissa, kuten 5 - 20 % CO₂:ta ja 80 - 95 % ilmaa sisältävässä seoksessa; 5 - 20 % CO₂:ta ja 80 - 95 % N₂:ta sisältävässä seoksessa; tai 5 - 10 % O₂:ta, 10 - 20 % CO₂:ta ja 70 - 85 % N₂:ta sisältävässä seoksessa, ja mahdollisesti divalenttisten kationien kelaattorin läsnäollessa, kuten, mainittuihin kuitenkin rajoittumatta 0 - 100 μM, edullisesti 25 μM, BAPTA/AM (2'-(etyleenidioksi)dianiliini-n,n,n',n'-tetraetikkahappo/asetoksimetyyliesterin; Molecular Probes, Eugene, OR), 0 - 10 mM EGTA:aa (etyleenibis(oksietyleeninitriilo)-tetraetikkahappoa; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 0 - 100 μM EGTA/AM:ää (etyleenibis(oksietyleeninitriilo)-tetraetikkahappo/asetoksimetyyliesteri; Molecular Probes, Eugene, OR); ja tulokseksi saatava olosuhteiden ja komponenttien yhdistelmä tuottaa antigeenisiltä ominaisuuksiltaan parannettuja suolistobakteereja.

Vielä yhden sovellutusmuodon mukaisesti tämän keksinnön mukaiset menetelmät sisältävät myös suolistobakteerien kasvattamisen välittömästi edellä kuvatulla tavalla lukuun ottamatta sitä, että kasvatus tapahtuu divalenttisten kationien kelaattorin, kuten 1,0 - 100 μM, edullisesti 25 μM, BAPTA/AM:n, 0,5 - 10 mM EGTA:n tai 1 - 100 μM EGTA/AM:n, läsnäollessa, mainittuihin kuitenkin rajoittumatta, mutta ilman sappea, sappihappoja tai sappisuoloja.

Tämän keksinnön kyseessä ollessa käyttökelpoista sappea tai käyttökelpoisia sappihappoja tai näiden suoloja ovat mikä tahansa luonnossa esiintyvä sappiyhdiste, joita maksa erittää ja jotka normaalisti konsentroituvat sappirakkoon, sekä
 5 tämä alan ammattikokemuksen perusteella tunnetut synteettiset sappihapot, kuten, mainittuihin kuitenkin rajoittumatta, "OXGALL" (Difco Laboratories, Detroit, Michigan), naudan sappi (Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri) tai jotkin muut kaupallisesti saatavilla olevat preparaattit sekä koli-, de-
 10 oksikoli-, taurokoli- ja glykokolihapot. Edullinen vaihtoehto on deoksikolaatti (DOC), joka on kaupallisesti saatavilla oleva sappihappo, joka esiintyy in vivo -olosuhteissa ohutsuolen loppuosassa ja paksusuolella olevissa kohdissa, joita jotkin suolistobakteerit kolonisoivat. Edullinen on
 15 myös glykokolaatti (GC).

Tämän keksinnön mukaisesti voidaan suolistobakteeriviljelmiä, joita ovat *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. tai *Escherichia coli*, valmistaa pakastettuina varastoviljelminä
 20 tämän alan ammattikokemuksen perusteella yleisesti tunnetuilla menetelmillä niitä voidaan säilyttää -80 °C:ssa tulevaa käyttöä varten. *Campylobacter jejuni* kantaviljelmiä voidaan esimerkiksi valmistaa kasvattamalla organismia 20 h ajan trypticase soy agar -elatusaineessa, joka sisältää 5 % lampaan erytrosyyttejä, joista fibriini on poistettu (SBA), seoksessa, joka sisältää 5 % O₂:ta, 10 % CO₂:ta, 85 % N₂:ta
 25 (mikroaerofiiliset olosuhteet, "MC"). *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Helicobacter pylori* ja *Shigella flexneri* -kantaviljelmiä voidaan valmistaa kasvattamalla organismia brain heart infusion -lihalieimessä ("BHI"). Bakteerit voidaan koota talteen pakastamista varten millä
 30 tahansa tunnetulla menetelmällä, esimerkiksi pyyhkimällä viljelämä pumpulipuikolla maljalta ja suspendoimalla se BHI:hin, joka sisältää 30 % glyserolia. Analyyttisiin tar-

koituksiin tai tuotantofermentaatioihin tarkoitettut viljelmät voidaan valmistaa millä tahansa yleisesti tunnetulla menetelmällä, kuten kasvattamalla organismia 1,5 % agarissa sisältävässä BHI:ssa 37 °C:ssa MC -olosuhteissa tai olosuhteissa, joissa viljelmä on kosketuksessa ympäröivään ilmaan, ja siirtämällä tämän jälkeen yksittäinen pesäke lihaliemeen ja viljelemällä tämän keksinnön mukaisilla menetelmillä, joita on kuvattu tässä keksinnössä. Bakteerit voidaan koota talteen millä tahansa alan ammattikokemuksen perusteella yleisesti tunnetulla menetelmällä, kuten sentrifugoimalla.

Edullisissa sovellutusmuodoissa kasvatetaan voimakkaasti antigeenisia *Campylobacter* sp-soluja, jotka ovat edullisesti jejuni- tai coli-lajeja, ja edullisesti jejuni-kantaa 81-176, välttämättömät ravinteet sisältävässä elatusaineessa, edullisesti BHI-lihaliemessä, joka lisäksi sisältää noin 0,1 % DOC:a tai noin 0,8 % sappea, 37 °C:ssa noin 10 - 80 % CO₂:ta ja noin 80-90 % ilmaa sisältävässä seoksessa ja solut kootaan talteen viljelmän kasvun edettyä myöhäisestä logaritmivaiheesta stationaariseen vaiheeseen olevaan vaiheeseen, ja tämä tapahtuu tyypillisesti noin 20 tunnin kuluttua ympäyksestä.

Muissa edullisissa sovellutusmuodoissa kasvatetaan antigeeniensä suhteen parannettuja *Shigella* sp. -soluja, jotka ovat edullisesti flexneri- tai dysenteriae-lajeja ja edullisemmin flexneri-kantaa 2457T, välttämättömät ravinteet sisältävässä peruselatusaineessa, joka on edullisesti BHI-lihaliemi, joka lisäksi sisältää noin 0,1 % DOC:tä tai noin 0,8 % sappea 37 °C:ssa ilmassa ja kootaan talteen viljelmän kasvun saavutettua varhaisen logaritmivaiheen, joka on tyypillisesti noin 30 minuuttia ympäyksestä, käyttäen viljelmää, jonka kasvuvaihe on varhaisesta logaritmivaiheesta logaritmivaiheen keskipaikkeille.

Vielä muissa edullisissa sovellutusmuodoissa antigeenisyydeltään parannettuja *Helicobacter pylori* -soluja, edullisesti kantaa ATCC 49503, NB3-2 tai G1-4, kasvatetaan välttämättömät ravinteet sisältävässä peruselatusaineessa, joka on edullisesti BHI-lihalientä, joka lisäksi sisältää noin 0,05 - noin 0,2 % sappea tai noin 0,05 % glykokolaattia (GC), 37 °C:ssa seoksessa, joka sisältää noin 5 - 20 % CO₂:ta ja noin 80 - 95 % ilmaa, tai noin 10 % CO₂:ta, joka sisältää noin 5 % O₂:ta sekä noin 85 % N₂:ta, ja solut kootaan talteen viljelmän kasvun saavutettua logaritmivaiheen tai stationaarisen vaiheen. Edullisemmassa sovellutusmuodossa solut kootaan talteen sen jälkeen kun viljelmä on saavuttanut logaritmisen vaiheen.

Tämän keksinnön mukaisten menetelmien mukaisesti viljeltyjen suolistobakteerien morfologia ja/tai solujen liikkuvuudet ovat muuttuneet ja/tai ne tuottavat tiettyjä uusia proteiineja, lipopolysakkarideja ja/tai hiilihydraatteja ja/tai ne tuottavat näitä makromolekyyliä toisenlaisina pitoisuuksina kuin pelkästään peruselatusaineessa viljeltyt solut. Voidaan tunnistaa sellaisia optimaalisia viljelyolosuhteita, jotka parantavat solujen saantoa ja patogeenisuutta kuvaavia arvoja. Näitä viljelyolosuhteita käyttäen voidaan tunnistaa virulenssiin liittyviä antigeenejä, joiden esiintymistaso on kohonnut tai joiden muodostuminen on käynnistynyt.

Liikkuvuus ja karkeat morfologiset muutokset voidaan havaita tarkastelemalla joko käsittelemättömiä tai värjättyjä bakteereja mikroskooppisesti. Tämän keksinnön mukaisia menetelmiä käyttämällä voi olla mahdollista saada tulokseksi muita sellaisia muutoksia, joita voidaan havaita elektronimikroskoopilla tai fluoresenssimikroskoopilla.

Tämän keksinnön mukaisilla menetelmillä kasvatettujen suolistobakteerien morfologia ja limaa muistuttavat ominaisuudet viittaavat siihen, että soluissa on saattanut indusoitua kapselin ja/tai pintakerroksen ilmentyminen. Kapselin muo-

dostumisen tutkimista varten voidaan valmistaa pinnan komponenttien, kuten proteiinien, hiilihydraattien ja lipopolysakkaridien, fenoliuutteita. Hiilihydraattien määrän lisääntyminen voidaan havaita korkeapainenestekromatografialla (HPLC).

Tämän keksinnön mukaisissa virulenssia voimistavissa kasvatolosuhteissa kasvatetuista suolistobakteereista valmistettujen ulkomembraanien proteiiniprofiileja voidaan luonnehtia natriumdodekyylisulfaatti-polyakryyliamidigeelielektroforeesilla (SDS-PAGE) ja niitä voidaan verrata vastaaviin profiileihin, jotka ovat peräisin tavanomaisissa elatusaineissa kasvatetuista organismeista. Suoritetaan SDS-PAGE niiden muutosten määrittämiseksi, joita bakteerisolujen proteiineissa ja uutetuissa proteiineissa on indusoitunut vasteena antigeenisyyttä voimistaville tai muuttaville olosuhteille. Näistä koetuloksista saadaan kvalitatiivista ja kvantitatiivista informaatiota, joka koskee niitä solun pinnassa tapahtuneita muutoksia, jotka liittyvät elimistöön tunkeutumiskyvyn lisääntymiseen tai antigeenisyyden muuttamiseen.

Indusoituneiden tai muuntuneiden proteiinantigeenien immunogeeninen potentiaali voidaan määrittää Western-blottauksella. SDS-PAGE:n avulla tunnistettujen indusoituneiden tai muuntuneiden bakteeriproteiinien immunogeenisyys voidaan määrittää yleisesti hyväksytyillä Western-blottausmenetelmillä tuonnempana kuvattavalla tavalla. Bakteeriantigeenien määrittämiseen voidaan käyttää mitä tahansa vasta-aineiden materiaalilähdettä, kuten infektiosta toipumassa olevan kaniinin tai hillerin immuuniseerumia (tämä on tavanomaisesti tai tämän keksinnön mukaisten menetelmien mukaan kasvatuilla elävillä organismeilla oraalisesti infektoiduista eläimistä peräisin oleva vasta-aineiden materiaalilähde), suoliston lima (IgA-vasta-aineen lähtömateriaali), polyklonaaliset antiseerumit tai monoklonaalinen vasta-aine,

esimeriksi *C. jejuni* flagelliinin kanssa ristiinreagoiva vasta-aine.

Useilla näistä bakteeriantigeeneistä seuraa muodostumisen lisääntymistä virulenssiin liittyvien ominaisuuksien voimistuminen. Näitä ominaisuuksia ovat adheesio viljeltyihin ihmisten suolen epiteelisoluihin ja tunkeutuminen näihin sekä kongopuna-väriaineen sitomiskyky. Kongopuna-väriaineen sitomiseen perustuva määrittely on yleisesti hyväksytty virulenssia ennustava menetelmä, joka on kuvattu tuonnempana ja julkaisussa Andrews, et al., [Infect. Immun. 60 (1992) 3287 - 3295]; ja Yoder [Avian Dis. 33 (1989) 502 - 505]. Bakteerien kyky sitoa kongopunaa viittaa siihen, että nämä bakteerit kykenevät sitomaan hemiiniä, ja tällä hemiinin-sitomiskyvyllä on korrelaatiota virulenssiin. Kongopunan sitomiskyky korreloi myös sen suhteen, että bakteerien tunkeutuminen epiteelisoluihin tapahtuu normaalia tehokkaammin.

Useimpien tavanomaisesti kasvatettujen *C. jejuni* Lior-serotyyppeiden on aikaisemmin osoitettu olevan immunologisesti ristiinreagoimattomia. Näiden tietojen perusteella näyttäisi tarpeelliselta valmistaa ja antaa potilaille useita Lior-serotyyppikantoja sisältäviä rokotteita tai yhdistelmärokotetta yleisen suojan aikaansaamiseksi *Campylobacter*-bakteereita vastaan. Tämän keksinnön mukaisesti valmistetut voimakkaasti antigeeniset *Campylobacter*-bakteerit ovat immunologisesti ristiinreagoivia laajempaa Lior-serotyyppi-joukkoa vastaan kuin mitä on saatu aikaan käyttäen tavanomaisesti kasvatettuja *Campylobacter*-bakteereita. Samalla tavoin ovat tämän keksinnön mukaisten menetelmien mukaisesti valmistetut antigeenisyydeltään parannetut *Shigella*-bakteerit immunologisesti ristiinreagoivia ja immunologisesti ristiin suojaavia laajempaa *Shigella*-lajien joukkoa vastaan kuin mitä on saatavissa aikaan käyttäen tavanomaisesti kasvatettuja *Shigella*-bakteereja. Tuonnempana kuvattavien agglutinaatiomäärittelysten ja rokotetutkimusten tulokset ovat

osoituksena näistä immunologisesti ristiinreagoivista ja immunologisesti ristiin suojaavista ominaisuuksista.

Tämän keksinnön mukaisilla menetelmillä antigeenisyytensä suhteen parannettujen suolistobakteerien valmistamiseksi on korrelaatiota virulenssin voimistumiseen pieneläinmalleissa. Useita kotieläimiä voidaan käyttää ihmisillä esiintyvän *Campylobacter*-sairauden malleina. Immunisaatiotehokkuuden kannalta tutkituin malli on Caldwell, et al.' :n, [Infect. Immun. 42 (1983) 1176 - 1182] avattavissa oleva suolen solminta, aikuisten kaniinien ripuli (RITARD-malli). Tällä mallilla on myös osoitettu Lior-serotyyppien liittyvän kantojen väliseen suojaukseen. Tällä mallilla saadaan kuitenkin määritettyä pikemminkin resistenssiä kolonisaatiota vastaan kuin resistenssiä sairautta vastaan. Bell, et al.' :n [Infect. Immun. 58 (1990) 1848 - 1852] hillerimalli voi olla käyttökelpoisempi malli, koska tähän eläimeen kehittyy ihmisillä esiintyvän *Campylobacter*-sairauden oireita muistuttavia oireita. Tätä uudempi malli on Bagar'in [Infection and Immunity 63 (1995) 3731 - 3735] malli, jossa määritetään kolonisaatiota hiiressä. Tämä malli sisältää immunisoinnin, minkä jälkeen immunisoidulle hiirelle annetaan nasaalisesti tai oraalisesti elävää *Campylobacter*-bakteeria ja tämän jälkeen tutkitaan suoliston kolonisaatiota seuraamalla *Campylobacter*-bakteerien esiintymistä ulosteissa. Shigellan kyseessä ollessa käytetään virulenssin ja rokotteen tehokkuuden määrittämiseen hiiren käsittelyä patogeeneilla nasaalisesti Mallet, et al.' :n kuvaamalla tavalla (tätä on käsitelty edellä kappaleessa 13). *Helicobacter pylori*n kyseessä ollessa arvioidaan tämän keksinnön mukaisten menetelmien mukaan valmistetun *H. pylori*n potentiaalia rokotteenä käyttämällä Chen, et al.' n [Lancet 339 (1992) 1120 - 1121] kuvaamaa mallia, joka perustuu mahan kolonisaatioon *Helicobacter felis*' illä.

On olemassa muita eläinmalleja, joilla on relevanssia suolistobakteerien invaasion ja infektion kyseessä ollessa,

ja niitä voidaan käyttää tutkimuksissa, joilla pyritään selvittämään tämän keksinnön mukaisesti valmistettujen parannettujen suolistobakteerien tehokkuutta rokotteenä.

5 Tämän keksinnön mukaisten menetelmien avulla valmistettuja antigeenisyydeltään parannettuja suolistobakteereja käytetään tapetuista kokonaisista soluista tai alayksiköistä tehtyjen prototyyppi-rokotteiden valmistamiseen. Näiden rokotteiden voidaan osoittaa käynnistävän vasta-aineiden muodostumisen sen jälkeen kun niitä on annettu eläimille, mikä
10 siten on pitävänä osoituksena rokotteiden suojaavasta potentiaalista. Kun näiden antigeenien pitoisuus tai niiden muodostuminen bakteerisolussa lisääntyy, saadaan soluja, joiden avulla saadaan aikaisempaa tehokkaampia rokotteita.

15 Tämän keksinnön mukaisten menetelmien avulla valmistettuja ehdolla olevia rokotepreparaatteja voidaan käyttää useiden limakalvon immunisointistrategioiden yhteydessä saamaan aikaan immuunivaste suolessa. Suotuisan tuloksen tuottavia immunisointimenetelmiä voidaan tämän jälkeen käyttää antamaan suoja eläimille, joita on käsitelty patogeeneillä, joiden antigeenisuus on tai ei ole normaalia voimakkaampaa.
20 Rokotteet voidaan myös formuloida yhdistelmärokotteiksi, esimerkiksi Shigella- ja Campylobacter-soluja tai näiden komponentteja voidaan yhdistää yhdeksi rokotteeksi, ja niistä voidaan suorittaa tutkimuksia.

Tuonnempana kuvattavien kokeellisten lähestymistapojen avulla kyetään havaitsemaan pinta-antigeenien ja muiden ominaisuuksien muutoksia, jotka liittyvät soluihin tunkeutumisen tehostumiseen. Nämä muutokset ovat sekä kvalitatiivisia että kvantitatiivisia. Tärkeimpänä on pidettävä sitä, että
30 näillä kokeilla saadaan pitävää näyttöä tämän keksinnön mukaisilla menetelmillä aikaansaataavasta soluihin tunkeutumisen voimistumisesta ja immunogeenisesti asiaankuuluvien antigeenien muodostumisen käynnistymisestä. Tällaiset antigeenisyydeltään parannetut bakteerit saavat aikaan immuno-

geenisen vasteen, joka antaa sellaisen suojan infektioita vastaan, joka kattaa tavanomaisesti kasvatettuihin bakteereihin verrattuna suuremman määrän bakteerikantoja, serotyypppejä ja/tai lajeja, mistä syystä nämä ovat käyttökelpoisia tehokkaina rokotteina.

Tämän alan ammattikokemuksen perusteella tunnetaan useita hyväksyttyjä malleja ja nämä ovat käyttökelpoisia antigeenien ominaisuuksien, bakteerien virulenssin ja rokotteen tehokkuuden parantumisen arviointiin tuonnempana kuvattavalla tavalla.

Seuraavaksi kuvataan tämän keksinnön esimerkkejä, jotka eivät ole sitä rajoittavia.

15

6. Esimerkit: Menetelmät antigeenisyydeltään parannettujen bakteerien valmistamiseksi

20

Esimerkki 1. Campylobacter jejuni -kantaa 81-176 siveltiin juoviksi veriagarmaljoille (nämä sisälsivät trypticase soy-agaria, ynnä 5 % lampaan erytrosyyttejä, joista fibriini oli poistettu) ja maljoja inkuboitiin 20 h mikroaerofiilissä GasPak-kammiossa (BBL, Cockeysville, MD) 37 °C:ssa. Bakteerimattoja otettiin maljalta pyyhkimällä sitä pumpulipuikolla ja bakteerit ympätettiin pulloihin, jotka sisälsivät 1 litran BHI-mediumia, joka oli tasapainotettu etukäteen sellaisen seoksen suhteen, jonka koostumus oli 10 % CO₂:ta ja 90 % ilmaa ja joka sisälsi 0,8 % OXGALL'ia (Difco, Detroit, MI). Viljelmiä inkuboitiin 20 tuntia ravistellen 37 °C:ssa suljetussa pullossa, joka sisälsi 10 % CO₂:ta ja 10 % ilmaa, ja solut koottiin sitten talteen edellä kuvatulla tavalla.

30

35

Esimerkki 2. Campylobacter jejuni -kantaa 81-176 siveltiin juoviksi veriagarmaljoille (nämä sisälsivät trypticase soy-agaria, ynnä 5 % lampaan erytrosyyttejä, joista fibriini oli poistettu) ja maljoja inkuboitiin 20 h mikroaerofiilissä GasPak-kammiossa (BBL, Cockeysville, MD) 37 °C:ssa. Bakteerimattoja otettiin maljalta pyyhkimällä sitä pumpuli-

puikolla ja bakteerit ympätettiin pulloihin, jotka sisälsivät 1 litran BHI-mediumia, joka oli tasapainotettu etukäteen 10-%:isen CO₂:n suhteen ja joka sisälsi 0,01 - 0,1 % natriumdeoksikolaattia (DOC). On ratkaisevaa valmistaa DOC ja autoklavoida tämä kantaliuoksena erikseen BHI-mediumista ja lisätä tätä välittömästi ennen bakteerien ympäystä aseptisesti BHI-mediumiin sellainen määrä, että loppukonsentraatioksi saadaan 0,01 - 0,1 %). Viljelmiä inkuboitiin eripituisia aikoja korkeintaan 20 tuntia ravistellen 37 °C:ssa seoksessa, jonka koostumus oli 5 % O₂:ta, 10 % CO₂:ta ja 85 % N₂:ta, ja solut koottiin tämän jälkeen talteen edellä kuvatulla tavalla.

Esimerkki 3. Campylobacter jejuni -kantaa 81-176 siveltiin juoviksi veriagarmaljoille (nämä sisälsivät trypticase soy-agaria, ynnä 5 % lampaan erytrosyyttejä, joista fibriini oli poistettu) ja maljoja inkuboitiin 20 h mikroaerofiilissä GasPak-kammiossa (BBL, Cockeysville, MD) 37 °C:ssa. Bakteerimattoja otettiin maljalta pyyhkimällä sitä pumpulipuikolla ja bakteerit ympätettiin pulloihin, jotka sisälsivät 1 litran Brucella-lihalientä, joka oli tasapainotettu etukäteen 10-%:isen CO₂:n suhteen ja joka sisälsi 0,01 - 0,1 % natriumdeoksikolaattia. Viljelmiä inkuboitiin 20 tuntia ravistellen 37 °C:ssa seoksessa, jonka koostumus oli 5 % O₂:ta, 10 % CO₂:ta ja 85 % N₂:ta, ja solut koottiin tämän jälkeen talteen edellä kuvatulla tavalla.

Esimerkki 4. Campylobacter jejuni -kantaa 81-176 siveltiin juoviksi veriagarmaljoille (nämä sisälsivät trypticase soy-agaria, ynnä 5 % lampaan erytrosyyttejä, joista fibriini oli poistettu) ja maljoja inkuboitiin 20 h mikroaerofiilisessä GasPak-kammiossa (BBL, Cockeysville, MD) 37 °C:ssa. Bakteerimattoja otettiin maljalta pyyhkimällä sitä pumpulipuikolla ja bakteerit ympätettiin pulloihin, jotka sisälsivät 1 litran Mueller-Hinton-lihalientä, joka oli tasapainotettu etukäteen 10-%:isen CO₂:n suhteen ja joka sisälsi 0,01 - 0,1 % natriumdeoksikolaattia. Viljelmiä inkuboitiin 20 tun-

tia ravistellen 37 °C:ssa seoksessa, jonka koostumus oli 5 % O₂:ta, 10 % CO₂:ta ja 85 % N₂:ta, ja solut koottiin tämän jälkeen talteen edellä kuvatulla tavalla.

5 Esimerkki 5. *Campylobacter jejuni* -kantaa 81-176 siveltiin juoviksi veriagarmaljoille (nämä sisälsivät trypticase soy -agaria, ynnä 5 % lampaan erytrosyyttejä, joista fibriini oli poistettu) ja maljoja inkuboitiin 20 h mikroaerofii-
 10 lisessä GasPak-kammiossa (BBL, Cockeysville, MD) 37 °C:ssa. Bakterimattoja otettiin maljalta pyyhkimällä sitä pumpulipuikolla ja bakteerit ympättiin pulloihin, jotka sisälsivät 1 litran BHI-mediumia, joka oli tasapainotettu etukäteen 10-%:isen CO₂:n suhteen ja joka sisälsi 0,1 % natriumdeoksikolaattia. Viljelmiä inkuboitiin 20 tuntia sekoittaen niitä
 15 hitaasti 37 °C:ssa 10-%:isen CO₂:n ja 90-%:isen ilman seoksessa, ja solut koottiin tämän jälkeen talteen edellä kuvatulla tavalla.

20 Esimerkki 6. *Vibrio cholerae*ta sivellään juoviksi BHI-agarmaljoille (nämä sisälsivät trypticase soy -agaria, ynnä 5 % lampaan erytrosyyttejä, joista fibriini oli poistettu) ja maljoja inkuboitiin 20 h ilmassa 37 °C:ssa. Bakterimattoja otetaan maljalta pyyhkimällä sitä pumpulipuikolla ja bakteerit ympätään pulloihin, jotka sisältävät 1 litran BHI-mediumia, joka sisältää 0,1 % natriumdeoksikolaattia. Viljelmiä inkuboidaan 20 tuntia ravistellen 37 °C:ssa ilmassa, ja solut kootaan tämän jälkeen talteen edellä kuvatulla tavalla.

30 Esimerkki 7. *Salmonella choleraesuis*ia sivellään juoviksi BHI-agarmaljoille ja maljoja inkuboidaan 20 h ilmassa 37 °C:ssa. Bakterimattoja otetaan maljalta pyyhkimällä sitä pumpulipuikolla ja bakteerit ympätään pulloihin, jotka sisältävät 1 litran BHI-mediumia, joka sisältää 0,1 %
 35 natriumdeoksikolaattia. Bakterimattoja ympätään pulloihin, jotka sisältävät 1 litran BHI-mediumia, joka sisälsi 0,1 % natriumdeoksikolaattia. Viljelmiä inkuboidaan 20 h ajan

ravistellen 37 °C:ssa ilmassa ja solut kootaan tämän jälkeen talteen edellä kuvatulla tavalla.

Esimerkki 8. Salmonella typhimuriumia sivellään juoviksi Luria-lihaliemiagarmaljoille ja maljoja inkuboidaan 20 h ilmassa 37 °C:ssa. Bakteerimattoja ympätään pulloihin, jotka sisältävät 1 litran BHI-mediumia, joka sisältää 0,1 % natriumdeoksikolaattia. Viljelmiä inkuboidaan 20 h ajan ravistellen 37 °C:ssa seoksessa, joka sisältää 10 % CO₂:ta ja 90 % ilmaa. Yksi pesäke siirretään yhteen litraan LB-mediumia, joka sisältää 0,1 % DOC:ta, ja tätä inkuboidaan yläosastaan suljetussa kasvatuspullossa 37 °C:ssa ravistellen hitaasti. 12 tunnin kulutta laimennetaan 60 ml viljelmää 1 litraksi samaa juuri valmistettua etukäteen lämmitettyä mediumia ja tätä inkuboidaan vielä 30 minuuttia ja kootaan sitten talteen edellä kuvatulla tavalla.

Esimerkki 9. Shigella flexneri 2457T:ta siveltiin juoviksi kongopuna-agarmaljoille ja näitä inkuboitiin 20 tuntia 37 °C:ssa ilmassa. Yksi punainen pesäke ympättiin pulloihin, jotka sisälsivät 1 litran BHI-mediumia ja näitä inkuboitiin ravistellen 12 tuntia. 50 ml tätä viljelmää ympättiin 250 ml:aan edeltä käsin lämmitettyä BHI-mediumia, joka sisälsi 0,1 % natriumdeoksikolaattia. Viljelmää inkuboitiin ravistellen 4 tunnin ajan 37 °C:ssa ilmassa. Tämä viljelämä laimennettiin sitten etukäteen lämmitetyllä BHI:lla, joka sisälsi 0,1 % DOC:tä siten, että sen OD₆₀₀-arvoksi saatiin noin 0,17, ja viljelmää inkuboitiin 30 minuuttia ravistellen 37 °C:ssa ilmassa ja solut koottiin sitten talteen edellä kuvatulla tavalla.

Esimerkki 10. Campylobacter jejuni 81-176, 81-116 tai HC-bakteereita (valmistettuna BHI:hin, joka sisälsi 30 % glyserolia) sulatettiin nopeasti ja ne maljattiin lampaanveriagarille (SBA, 0,1 ml maljaa kohti). Ympättyjä maljoja inkuboitiin 20 tunnin ajan 37 °C:ssa GasPak-kammiossa, joka sisälsi mikraerofiilisen ympäristön valmistamiseen tarkoi-

tetun CampyPak Plus -reagenssipakkauksen (BBL, Cockeysville, MD). Bakterimatto poistettiin maljoilta pyyhkimällä pumpulipuikolla ja bakteerit suspendoitiin 10 ml:aan BHI:tä. Bakterisuspensio ympätettiin 2 litran pulloon, joka sisälsi 1 litran pelkkää BHI-lihalientä tai BHI-lihalientä, joka sisälsi 0,1 % DOC:ta, tasapainotettuna etukäteen 10-%:isen CO₂:n ja 90-%:isen ilman seoksen suhteen. Ympästä lisättiin edeltä käsin tasapainotettuun mediumiin siihen asti, kunnes OD₆₂₅-arvo vastasi arvoa 0,05. Ympättyyn pulloon johdettiin uudelleen 10-%:isen ja 90-%:isen ilman seosta ja pulloa sekoitettiin hitaasti 20 tunnin ajan 37 °C:ssa. Tässä vaiheessa bakteerit koottiin talteen edellä kuvatulla tavalla.

Esimerkki 11. *Helicobacter pyloria* lisättiin BHI-lihalie-meen, joka sisälsi 4 % nautavasikan seerumia. Ympäyksen jälkeen pullot huuhdeltiin seoksella, jonka koostumus oli 5 % O₂, 10 % CO₂, 85 % N₂, ja niitä inkuboitiin 22 tuntia 37 °C:ssa ravistellen. Tämän inkuboinnin jälkeen 2,5 ml tätä viljelmää siirrettiin kasvatuspulloon, joka sisälsi BHI-lihalientä, joka sisälsi 4 % nautavasikan seerumia tai tätä samaa mediumia, joka lisäksi sisälsi 0,05 % natriumglykokaattia. Näiden viljelmien kaasutilaa huuhdeltiin uudelleen mikroaerofiilisella kaasuseoksella (5 % O₂, 10 % CO₂, 85 % N₂), ja niitä inkuboitiin 20 - 24 tuntia 37 °C:ssa. Solut koottiin talteen edellä kuvatulla tavalla.

Esimerkki 12. *Salmonella typhimurium* (valmistettuna LB:hen, joka sisälsi 30 % glyserolia) siveltiin juoviksi LB-agarmaljalle ja maljaa viljeltiin 18 - 20 tuntia 37 °C:ssa ilmassa. Maljalta poimittiin yksi pesäke ja se siirrettiin 1 litraan LB-mediumia tai LB-mediumia, joka sisälsi 0,1 % DOC:tä pulloissa, joiden kaasutilaa huuhdeltiin seoksella, jonka koostumus oli 10 % CO₂, 5 % CO₂, 85 % N₂, pullot suljettiin ja niitä inkuboitiin 12 tuntia ravistellen 37 °C:ssa. Tämän jälkeen bakteerit laimennettiin samaan mediumiin siten, että OD₆₀₀-arvoksi saatiin 0,17 ja niitä inkuboitiin identtisissä olosuhteissa siihen asti, kunnes

viljelmä saavuttaa varhaisen logaritmivaiheen, tyypillisesti 30 minuuttia laimentamisen jälkeen. Solut koottiin talteen edellä kuvatulla tavalla.

- 5 Esimerkki 13. Salmonella typhimuriumia sivellään juoviksi LB-agarmaljalle ja viljellään 18 - 20 tuntia 37 °C:ssa ilmassa. Maljalta poimitaan yksi pesäke ja se siirretään 1 litraan LB:tä tai LB:tä, joka sisältää 0,1 % DOC:tä, ja soluja inkuboitiin 12 tuntia 37 °C:ssa ilmassa. Tämän jäl-
- 10 keen viljelmä laimennetaan (1/5) samaan juuri valmistettuun mediumiin ja tätä inkuboidaan vielä 4 tuntia identtisissä olosuhteissa. Tämän jälkeen bakteerit laimennetaan samaan mediumiin, joka on juuri valmistettua, siten, että OD₆₀₀-
- 15 arvoksi saadaan 0,17 ja niitä inkuboidaan identtisissä olosuhteissa siihen asti, kunnes viljelmä saavuttaa logaritmivaiheen, tyypillisesti 30 minuuttia laimentamisen jälkeen. Solut kootaan talteen edellä kuvatulla tavalla.

- 20 Esimerkki 14. Klebsiella pneumoniae sivellään juoviksi BHI-agarmaljalle ja inkuboidaan 18 - 20 tuntia 37 °C:ssa ilmassa. Maljalta poimitaan yksi pesäke ja se ympätään 1 litraan BHI:tä tai BHI:tä, joka sisältää 0,1 % DOC:tä, ja pulloja ravistellaan 12 tuntia 37 °C:ssa ilmassa. Tämän jälkeen bakteerit laimennetaan samaan mediumiin siten, että OD₆₀₀-
- 25 arvoksi saadaan 0,17, ja niitä kasvatetaan vielä 30 minuuttia ja solut kootaan sitten talteen edellä kuvatulla tavalla.

- 30 Esimerkki 15. Enterobacter cloacae sivellään juoviksi BHI-agarmaljalle ja inkuboidaan 18 - 20 tuntia 37 °C:ssa ilmassa. Yksi pesäke ympätään 1 litraan BHI:tä tai BHI:tä, joka sisältää 0,1 % DOC:tä, ja pulloja ravistellaan 12 tuntia 37 °C:ssa. Tämän jälkeen bakteerit laimennetaan samaan mediumiin siten, että OD₆₀₀-arvoksi saadaan 0,17, ja niitä
- 35 kasvatetaan vielä 30 minuuttia ja solut kootaan sitten talteen edellä kuvatulla tavalla.

Esimerkki 16. *Escherichia coli* -kantaa 0157:H7 siveltiin juoviksi lampaanveriagarmaljalle ja maljaa inkuboitiin 18 - 20 tuntia 37 °C:ssa ilmassa. Yksi pesäke ympättiin 1 litraan BHI:tä tai BHI:tä, joka sisältää 0,1 % DOC:tä, ja pulloa ravistellaan 12 tuntia 37 °C:ssa. Tämän jälkeen bakteerit laimennetaan siten, että OD₆₀₀-arvoksi saadaan 0,17, ja niitä kasvatetaan vielä 30 minuuttia ja solut kootaan sitten talteen edellä kuvatulla tavalla.

Esimerkki 17. *Enterococcus faecalis* sivellään juoviksi lampaanveriagarmaljalle ja inkuboidaan 18 - 20 tuntia 37 °C:ssa ilmassa. Yksi pesäke ympätään 1 litraan BHI:tä tai BHI:tä, joka sisältää 0,1 % DOC:tä, ja pulloa ravistellaan 12 tuntia 37 °C:ssa. Tämän jälkeen bakteerit laimennetaan siten, että OD₆₀₀-arvoksi saadaan 0,17, ja niitä kasvatetaan vielä 30 minuuttia ja solut kootaan sitten talteen edellä kuvatulla tavalla.

Esimerkki 18. *Clostridium difficile* (jauhelihamedium, joka sisältää 30 % glyserolia) sivellään juoviksi anaeroobeille tarkoitettulle naudanmaksamediumista valmistetulle maljalle, joka sisältää 1,5 % agarua ja jota viljellään 37 °C:ssa mikroaerofiilisissä olosuhteissa (5 % CO₂ ja 95 % N₂). Yksi pesäke siirretään 1 litraan modifioitua jauhelihamediumia tai tätä samaa mediumia, joka sisältää 0,1 % DOC:tä. Bakteereja viljellään mikroaerofiilisissä olosuhteissa 37 °C:ssa 12 tuntia ja ne kootaan talteen edellä kuvatulla tavalla.

Esimerkki 19. *Bacteroides fragilis* (jauhelihamedium, joka sisältää 30 % glyserolia) sivellään juoviksi modifioidusta jauhelihamediumista valmistetulle agarmaljalle ja viljellään 37 °C:ssa mikroaerofiilisissä olosuhteissa (5 % CO₂ ja 95 % N₂). Yksi pesäke siirretään 1 litraan modifioitua jauhelihamediumia tai tätä samaa mediumia, joka sisältää 0,1 % DOC:tä. Bakteereja viljellään mikroaerofiilisissä olosuhteissa 37 °C:ssa 12 tuntia ja ne kootaan talteen edellä kuvatulla tavalla.

Esimerkki 20. *Yersinia pseudotuberculosis* (Luria-lihaliemi, joka sisältää 30 % glyserolia) sivellään juoviksi Luria-lihaliemiagarmaljalle ja inkuboidaan 30 °C:ssa. Yksi pesäke siirretään 1 litraan LB-mediumia ja tätä inkuboidaan 12 tuntia 30 °C:ssa. Tämä viljelmä laimennetaan (1/5) LB:hen tai LB:hen, joka sisältää 0,1 % DOC:ta, ja viljelmää inkuboidaan 4 tuntia 37 °C:ssa. Viljelmät laimennetaan tämän jälkeen samaan mediumiin siten, että OD₆₀₀-arvoksi saadaan 0,17 ja viljelmää inkuboidaan vielä 30 minuuttia, minkä jälkeen solut kootaan talteen edellä kuvatulla tavalla.

Esimerkki 21. *Helicobacter pylori* lisätään BHI-lihaliemeen, jossa on lisäksi 4 % naudavasikan seerumia. Pullojen kaasutila huuhdellaan ympäyksen jälkeen seoksella, joka sisältää 5 % O₂, 10 % CO₂, 85 % N₂ ja niitä inkuboidaan ravistellen 22 tuntia 37 °C:ssa. Tämän inkuboinnin jälkeen 2,5 ml viljelmää siirretään pulloon, joka sisältää BHI-lihalientä sekä 4 % naudavasikan seerumia tai tätä samaa mediumia, joka lisäksi sisältää noin 0,1 - noin 0,2 % naudan sappea. Näiden viljelmien kaasutilaa huuhdellaan uudelleen mikroaerofiilisellä kaasuseoksella (5 % O₂, 10 % CO₂, 85 % N₂) ja inkuboidaan 20 - 24 tuntia 37 °C:ssa. Solut kootaan talteen edellä kuvatulla tavalla.

7. Esimerkit: Antigeenisyyden suhteen parannetut bakteerit

Esimerkki 22. Liikkuvuuden ja karkean morfologian tarkasteluseksi käytettiin märkänä kiinnitettyjen bakteerien tarkastelua mikroskoopilla. Pintakerroksia tarkasteltiin värjäämällä kapseli tussivärillä (nigrosiinilla). Solut vasta-
värjättiin ilmakeivauksen jälkeen kristallivioletilla. Tarkastelut suoritettiin kokonaisuudessaan 1000-kertaisella suurennoksella.

Tämän keksinnön mukaisten menetelmien mukaisesti viljeltyjen bakteerien (näistä käytetään tuonnempana nimitystä "parannetut" bakteerit) morfologia oli muuttunut pelkässä perus-mediumissa viljeltyihin (tavanomaisesti kasvatettuihin)

bakteereihin verrattuna. Esimerkiksi "parannetut" C. jejuni -bakteerit aggregoituivat ja muodostuvat suuria solukokkeita, kun taas tavanomaisesti kasvatetut solut olivat pääasiassa yksittäisiä. Kapseliväjäyksestä kävi ilmi (tuloksia ei ole esitetty), että bakteerien viljely tämän keksinnön mukaisia menetelmiä käyttäen muutti bakteerien pintaa. Tämä pinnan muuttuminen johti itse asiassa siihen, että "parannetut" bakteerit sitoivat väriaineesta nigrosiini-partikkeleita. "Parannettujen" bakteerien liikkuvuus säilyi hyvin voimakkaana.

Esimerkki 23. C. jejunin pinnan komponentit analysoitiin fenoliuuttoa käyttäen. Valmistettiin uutteita tavanomaisesti kasvatetuista tai esimerkin 2 mukaan viljellyistä C. jejuni 81-176 -bakteereista. C. jejuni -solut koottiin talteen elatusaineesta sentrifugoimalla edellä kuvatulla tavalla. Solunappia uutettiin 1-%:isella fenolilla 2 tuntia huoneenlämmössä. Kokonaiset solut erotettiin uutetusta materiaalista sentrifugoimalla tätä 45 minuutin ajan. Uuttuneita bakteerin pinnan komponentteja sisältävä supernatantti dialysoitiin tislattua vettä vastaan yön yli. Retentaatti sentrifugoitiin 105 000 x g:n voimalla 3 tunnin ajan 4 °C:ssa. Uutetun materiaalin nappi liuotettiin uudelleen 10-%:iseen NaCl:ään ja saostettiin liuoksen tilavuutta kaksi kertaa vastaavalla määrällä kylmää 95-%:ista etanolia. Saostus toistettiin ja näyte lyofilisoitiin. Näyte liuotettiin näiden vaiheiden jälkeen veteen konsentraatioon 1 mg/ml tarkemmin analysoitavaksi.

Uutteen hiilihydraattipitoisuus määritettiin käyttäen yleisesti hyväksyttyä fenoli-rikkihappomenetelmää käyttäen standardina glukoosia. Uutteen uronihappopitoisuus määritettiin Dischen menetelmällä käyttäen karbatsolireagenssia. Fenoliuutteen kokonaisproteiinipitoisuus määritettiin bikinkoniinihappomääritysreagenssipakkauksella (biccichinoic acid assay kit) (Pierce Chem. Co. Rockford, IL).

Merkillepantavaa oli uronihapon puuttuminen uutteesta. Monet
 tyypilliset bakteerikapselit koostuvat uronihappopolymee-
 reista. C. jejuni 81-176:n pinnan uutteet olivat odottamatta
 itse asiassa pääasiassa proteiinia. "Parannettujen" solujen
 5 uutteiden kokonaishiilihydraattipitoisuus oli kuitenkin
 tavanomaisesti kasvatettujen solujen kokonaishiilihydraatti-
 pitoisuutta suurempi.

Uutteiden hiilihydraatin ja proteiinin suhde on esitetty
 10 alla olevassa taulukossa 1.

Taulukko 1. Tavanomaisesti (BHI) tai esimerkin 2 mukaisen
 menetelmän mukaisesti (parannettu) kasvatettujen C. jejuni
 -solujen solun pinnan uutteiden hiilihydraatin ja proteiinin
 15 välinen suhde

Lisäyksestä ku- lunut aika (h)	BHI	Parannettu
1	2	2
2	2	10
4	2	15
6	3	29

DOC:n käyttö elatusaineessa ja bakteerista uutettavissa ole-
 van pinnan hiilihydraattipitoisuuksien kohoaminen olivat
 25 suorassa suhteessa toisiinsa (taulukko 1). Uutettavissa ole-
 vien pinnan hiilihydraattien pitoisuus kohosi yli 8-kertai-
 sesti tämän keksinnön mukaisten menetelmien mukaisesti
 viljellyissä bakteereissa; pitoisuuden ei havaittu nousevan
 tavanomaisesti kasvatetuissa bakteerissa. DOC-mediumissa
 30 viljeltyjen bakteerisolujen aggregaatio näytti johtuvan
 pinnan uutteiden komponenteista.

Uute kykeni geelilytymään voimakkaasti vedessä sen jälkeen
 kun se oli hydroitu uudelleen, mikä teki liuoksesta erittäin
 35 viskoottisen ja limamaisen ja luonteeltaan samanlaisen kuin
 aggregoituneet bakteerit. Uute muistutti toiminnallisilta
 ominaisuuksiltaan mukiinityyppejä glykoproteiineja.

Uutteet hydrolysoitiin yksittäisten monosakkaridien analysoimiseksi suljetuissa pulloissa 1 N trifluorietikkahapossa. Näytteitä kuivattiin typen alla 2 h ja ne suspendoitiin uudelleen tislattuun veteen. Sokerit erotettiin HPLC:lla käyttäen Dionex Corp. -yhtiön kromatografiamatrksia ja liuotinjärjestelmää, joka sisälsi liuottimena seosta, joka sisälsi 3 % 0,5 N NaOH:ta ja 97 % H₂O:ta. Erotettujen monosakkaridien määrittämiseen käytettiin amperometristä havaitsemista. Vertailun vuoksi HPLC:lla analysoitiin myös autenttinen monosakkaridistandardi, joka koostui fukoosista, galaktosamiinista, glukosamiinista, galaktoosista, glukosista ja mannoosista.

Hydrolysoidun pinnan uutteen HPLC-analyysistä kävi selville, että se sisälsi useita monosakkarideja (kuvio 1). Tavanomaisesti kasvatetuista tai edellä olevan esimerkin 2 mukaisen menetelmän mukaisesti kasvatetuista bakteereista peräisin olevien uutteen hiilihydraattikoostumukset eivät näyttäneen eroavan kvalitatiivisesti toisistaan. Ilmeni kuitenkin pieniä kvantitatiivisia eroavuuksia.

Esimerkki 24. Bakteerien proteiinit analysoitiin SDS-PAGE:lla ja Western-blottauksella. Käytettiin Lugtenberg, et al.:n [FEBS Letters 58 (1975) 254 - 258] geelisysteemiä. Geelisysteemi on epäjatkuva geeli, joka koostuu pinoutumisgeelistä, jonka akryyliamidipitoisuus on pieni (tyypillisesti 4 %) ja jonka pH on 6,8, ja erotusgeelistä, jonka akryyliamidiprosenttimäärä on suurempi ja jonka pH on 8,8. Molemmat geelit ja kaikki käytetyt puskurit sisälsivät SDS:ää (0,1 %). Proteiinit erottuivat molekyylikoon mukaisesti ja käytettiin erotusgeelejä, jotka sisälsivät 8 tai 12 % akryyliamidia. Erottuneet proteiinit visualisoitiin kiinnitettyjen geelien hopeavärjäyksellä ja molekyylikoko määritettiin standardeina käytettyjen tunnettujen proteiinien M_r-arvojen perusteella.

C. jejuni -solujen proteiinit erotettiin SDS-PAGE:lla ja visualisoitiin hopeavärjäyksellä. DOC:tä käyttäen viljellyissä soluissa indusoitui tai voimistui neljä proteiinia, joiden joukossa esiintyi 62 kDa:n suuruinen proteiini (kuvio 2).

5

Esimerkki 25. S. flexnerin LPS analysoitiin fenoliuuttoa käyttäen. S. flexneri -solut, joita oli kasvatettu tavanomaisesti tai tämän keksinnön mukaisesti sellaisena kuin tämä on esitetty kuvaavana esimerkkinä edellä olevassa esimerkissä 9, koottiin talteen elatusaineesta sentrifugoimalla edellä kuvatulla tavalla. Lipopolysakkaridit (LPS) uutettiin Westphal'in ja Jann'in [teoksessa Whistler, R., ed., Methods in Carbohydrate Chemistry, vol 5; p. 83, (1965)] menetelmällä. Lyhyesti mainittuna BHI:ssa tai edellä olevassa kuvaavana esimerkkinä käytetyssä esimerkissä 9 mainitulla tavalla viljeltyt solut koottiin talteen sentrifugoimalla ja ne pestiin kerran PBS:ssa. Soluja uutettiin tämän jälkeen 15 minuutin ajan 68 °C:ssa veteen valmistetulla 45-%:isella fenolilla. Uute jäähdytettiin 10 °C:een ja se sentrifugoitettiin. LPS:ää sisältävä vesipitoinen yläfaasi poistettiin imulla ja dialysoitiin tislattua vettä vastaan. Retentaatti sentrifugoitettiin 4 °C:ssa kerran 7 h ajan 80 000 x g:n voimalla ja kolme kertaa 105 000 x g:n voimalla kullakin kerralla 3 tunnin ajan. Lopullinen nappi lyofilisoitiin. Ennen analysointia LPS suspendoitiin uudelleen veteen (1 mg/ml). Puhdistettu LPS luonnehdittiin hiilihydraattipitoisuuden suhteen edellä kuvatulla tavalla ja käyttämällä natriumdodekyylisulfaatti-polyakryyliamidigeelielektroforeesia (SDS-PAGE) tuonnempana kuvattavalla ja kuviossa 5 esitetyllä tavalla.

25

30

S. flexnerin proteiiniprofiileista ei käynyt ilmi mitään suuria eroavuuksia tavanomaisesti viljeltyjen ja "parannettujen" solujen välillä kun ne analysoitiin käyttäen tätä nimenomaista SDS-PAGE-järjestelmää. "Parannetuista" soluista peräisin olevan LPS:n hiilihydraatin ja kuivapainon väliset suhteet olivat pienempiä kuin BHI-soluista peräisin olevissa

35

utteissa. *S. flexnerin* LPS:lle suoritettu SDS-PAGE ja tämän jälkeen tehty hapetus ja hopeavärjäys osoittivat kuitenkin LPS:n rakenteen muuttuneen huomattavasti (kuvio 5). Kuten geelin kanavassa "2" havaitaan, oli "parannetusta" *S. flexneristä* peräisin olevan LPS:n O-antigeenifraktion pituus pienentynyt. Tämä tulos täydensi "parannetuista" soluista peräisin olevan LPS:n pienentynyttä hiilihydraatin ja kuivapainon välistä suhdetta koskevia havaintoja.

Nämä tulokset viittaavat siihen, että "parannetut" solut muodostavat pinnalleen lyhyehköjä O-antigeenisivuketjuja ja ne saattavat tehdä bakteerista potentiaalisesti normaalia hydrofobisemman. Normaalista hydrofobisempi bakteeri voi osallistua normaalia voimakkaampaan vuorovaikutukseen suoliston hydrofobisten pintojen kanssa.

Esimerkki 26. Proteiinien immunogeenisyys määritettiin Western-blottien avulla. Tavanomaisesti tai tämän keksinnön mukaisten menetelmien, sellaisena kuin ne on esitetty kuvaaavana esimerkkinä edellä olevassa esimerkissä 1 tai 5, avulla kasvatettuja bakteereista peräisin olevat proteiinit erotettiin SDS-PAGE:lla ja ne siirrettiin sitten elektroforeettisesti nitroselluloosa- tai PVDF-membraaneille ja membraanit tehtiin reagoimattomiksi tavallisesti käytetyllä reagoimisen estävällä reagenssilla (3-%:inen BSA, 50 mM Tris (pH 8,5), 50 mM NaCl, 0,2 % Tween 20]. Membraania käsiteltiin primaarisella vasta-aineella reagoinnin ehkäisypuskurissa, tämän jälkeen blotti pestiin ja membraania käsiteltiin sekundaarisen vasta-aineen ja reportteriryhmän muodostavalla konjugaatilla. Blotti visualisoitiin pesun jälkeen valoa tai kromoforia tuottavilla substraateilla. Käytetty reportteriryhmä oli piparjuuriperoksidaasi tai alkalinen fosfataasi.

Kuvio 3 kuvaa IgA:ta sisältävällä kaniinin immuunilimalla suoritetusta Western-blottauksesta saatuja proteiineja. Kuten voidaan havaita, oli 62 kDa:n suuruinen proteiini immunodominantti antigeeni. 62 kDa:n suuruisen proteiinin immu-

nogenisyys voimistui huomattavasti DOC:n tai sapen kanssa viljellyissä soluissa. Tämä proteiini oli myös vallitseva antigeeni DOC:n kanssa viljellyistä soluista valmistetussa pinnan uutteessa.

5

Voimistuneesti käyttäytyvän proteiinin osoitettiin hiiressä tehtyä *Campylobacter*-solujen flagelliinin kanssa ristiinreagoivaa monoklonaalista vasta-ainetta käyttäen olevan *C. jejuni* flagelliini (kuvio 4). Tämä oli merkittävä havainto, koska useat tutkijat ovat osoittaneet, että *C. jejuni* flagelliini liittyy patogeenisiin ja sillä esiintyy assosiaatiota bakteerin invasiivisten ominaisuuksien suhteen.

10

15

20

25

Esimerkki 27. Virulenssin määrittämiseen käytettiin solujen kykyä sitoa kongopuna-väriainetta. Suolistobakteerit, joita oli kasvatettu tavanomaisesti (BHI) tai tämän keksinnön mukaisten menetelmien avulla ("parannettu") BHI-agarmaljoilla, jotka sisälsivät 0,025 % kongopunaa, suspendoitiin uudelleen tislattuun veteen ja uutettiin asetonilla 10 minuutin ajan. Solujätteet sentrifugoitiin napiksi ja väriaineen OD₄₈₈ määritettiin käyttäen nollaliuoksena liuosta, joka sisälsi 40 % asetonia ja 60 % vettä. Väriaineen absorbanssia verrattiin solujen absorbanssin 660 nm:n kohdalta ja tulos ilmoitettiin OD₄₈₈/OD₆₆₀-suhteena. Tulokset on esitetty alla olevassa taulukossa 2.

Taulukko 2. Tavanomaisesti (BHI) tai tämän keksinnön mukais-
ten menetelmien mukaisesti (parannettu) kasvatettujen pato-
geenisten suolistobakteerien sitoman kongopuna-väriaineen
määrä

5		Väriaineen absorbanssi	
	Kanta	BHI	Parannettu
	C. jejuni 81-176	0,07	0,49
	C. jejuni 81-116	0,06	0,49
	S. typhimurium SR11	0,05	0,3
10	S. flexneri 2457T	0,02	0,13
	V. cholera 569b	0,7	2

Taulukosta 2 käy ilmi, että useiden tämän keksinnön mukai-
sesti viljeltyjen suolistobakteerilajien kyseessä ollessa
15 sitoutui kongopuna-väriainetta tavanomaista voimakkaammin.
Nämä tulokset osoittavat, että tämän keksinnön mukaisten
menetelmien mukaiset in vitro -olosuhteissa käytettävät
menetelmät ovat käyttökelpoisia virulenssin aikaansaamiseen
ja muiden sellaista ominaisuuksien aikaansaamiseen, joiden
20 tiedetään korreloivan patogeneesiin in vivo -olosuhteissa
muiden bakteerilajien kyseessä ollessa.

Esimerkki 28. Analysoitiin bakteerien adheesiota viljeltyi-
hin epiteelisoluihin. Bakteerien adheesio määritettiin
25 Galan'in ja Curtiss'in [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989)
6383 - 6387] kuvaamalla tavalla. Kudosviljelysoluja
[INT-407-soluja tai Henle-soluja (ATCC # CCL6) sekä ihmisen
CaCo-2 (ATCC # HTB37) -suolistosolulinjoja] viljeltiin 24-
kuoppaisissa kudosviljelylevyissä (37 °C, 5 % CO₂) siihen
30 asti kunnes ne olivat saavuttaneet 60 - 80-%:isen yhteen-
kasvamisasteen. Medium on riippuvainen käytetystä solulin-
jasta, mutta Henle-solujen kyseessä ollessa käytettiin
Dulbeccon modifioimaa Eaglen mediumia, joka sisälsi 10 % fe-
taalista naudanseerumia sekä G-penisilliiniä ja strepto-
35 mysiiniä, joiden kummankin konsentraatio oli 50 mg/ml, ja
CaCo-2-solujen viljelyn kyseessä ollessa käytettiin RPMI

1640 -mediumia, joka sisälsi 10 % fetaalista naudanseerumia ja G-penisilliiniä ja streptomysiiniä, joiden kummankin konsentraatio oli 50 mg/ μ l. Elatusaine poistettiin viimeistään 3 h ennen määrittystä ja solut pestiin kaksi kertaa Hank's balanced salt solution -liuoksella (HBSS), joka sisälsi magnesiumia ja kalsiumia. Tämän jälkeen yhden solukerroksen paksuisten kasvustojen päälle lisättiin elatusainetta, josta antibiootit oli jätetty pois.

Adheesiomäärittäystä varten bakteereita esikäsiteltiin seuraavalla tavalla. Hitaasti kasvavien suolistobakteerien, kuten *Campylobacter*- ja *Helicobacter*-solujen, kyseessä ollessa bakteeriviljelmä laimennettiin juuri valmistetulla etukäteen tasapainotetulla mediumilla tiheydeltään OD₆₂₅-arvoon, jonka suuruus oli 0,1, ja tätä käytettiin tämän jälkeen määrittäyksessä. Shigellan ja muiden nopeasti kasvavien suolistobakteerien kyseessä ollessa bakteeriviljelmä laimennettiin OD₆₂₅-arvoon 0,17 juuri valmistetulla etukäteen tasapainotetulla mediumilla ja tätä käytettiin sitten määrittäyksessä. Bakteerit lisättiin epiteelisoluihin käyttäen kylläisyystason välttämiseksi infektion multiplisiteettinä 10 bakteeria solua kohti. Kudosviljelykuoppaan ympättyjen bakteerien lukumäärä laskettiin laskemalla bakteerien määrä maljausmäärittäyksellä. 5-%:isessa CO₂:ssa suoritettun infektion jälkeen, johon *Campylobacter*-solujen kyseessä ollessa käytettiin 2 tuntia ja Shigellan kyseessä ollessa 30 minuuttia, poistettiin sitoutumattomat bakteerit pesemällä HBSS:lla, minkä jälkeen yhden solukerroksen paksuinen kasvusto hajotettiin 0,1-%:isella deoksikolaatilla ja maljattiin adheesion määrittämiseksi.

Alla olevassa taulukossa 3 on esitetty, miten lämpötila vaikuttaa tavanomaisesti tai tämän keksinnön mukaisten menetelmien, sellaisena kuin ne on esitetty kuvaavana esimerkkinä edellä olevassa esimerkissä 5, mukaisesti kasvatettujen *C. jejuni* 81-176 -bakteerin adheesioon INT407-soluihin.

Alla olevassa taulukossa 4 on esitetty useiden tavanomaisesti tai tämän keksinnön mukaisten menetelmien mukaisesti kasvatettujen C. jejuni -kantojen adheesiokyvyn eroja.

5 Adheesio-% on ilmoitettu yhden solukerroksen paksuisesta kasvustosta talteen saatujen pesäkkeitä muodostavien yksiköiden (CFU) lukumääränä jaettuna yhden solukerroksen paksuiseen kasvustoon ympätyllä CFU-lukumäärällä, ja tulos on kerrottu luvulla 100.

10

Taulukko 3: Lämpötilan vaikutus tavanomaisesti (BHI) kasvatettujen tai tämän keksinnön mukaisesti (parannetut) kasvatettujen C. jejuni -solujen adheesioon INT-407-soluihin.

15

	BHI	Parannettu
Lämpötila	(adheesio-%)	(adheesio-%)
37 °C	5,5	62,3
42 °C	5,5	11,2

20

Taulukko 4. Tavanomaisesti (BHI) tai tämän keksinnön mukaisesti menetelmien mukaisesti (parannettu) kasvatettujen eri C. jejuni -kantojen adheesio INT-407:ään (vertailutaso monikertoina).

25

Kanta	BHI	Parannettu
81-176	1	8,4
81-116	1	12,5
HC	1	28,2

30

Invaasiomäärityksissä epiteelisoluja kasvatettiin ja esikäsiteltiin niiden edellä kuvattujen menetelmien mukaisesti, joita käytettiin adheesiomäärityksen kyseessä ollessa. Tavanomaisesti tai tämän keksinnön mukaisten menetelmien mukaisesti kasvatettuja bakteereita lisättiin epiteelisoluihin käyttäen infektion multiplisiteettinä kylläisyystason välttämiseksi 10 bakteeria solua kohti. Kudosviljelykuoppaan lisättyjen bakteerien lukumäärä laskettiin laskemalla bakteerien lukumäärä maljausmenetelmällä. Sellaisen infektion

35

jälkeen, jossa *Campylobacter*-bakteereilla käytettiin 2 tunnin käsittelyä 5-%:isessa CO₂:ssa ja *Shigella*lla 30 minuuttia, poistettiin infekioon käytetyt bakteerit imulla, ja yhden solukerroksen paksuisen kasvuston päälle lisättiin gentamisiiniä sisältävää elatusainetta kaikkien solunulkoisten bakteerien tuhoamiseksi. Kaikki viljeltävissä olevat bakteerit, jotka tässä vaiheessa olivat vielä havaittavissa, olivat tunkeutuneet yhden solukerroksen paksuiseen epiteelisolukerrokseen. Inkubointia jatkettiin CO₂:ssa 3 tuntia *C. jejuni*lla infektoidujen solujen kyseessä ollessa ja 1,5 h *Shigella*lla infektoidujen solujen kyseessä ollessa. Yhden solukerroksen paksuiset kasvustot pestiin HBSS:lla gentamisiinin poistamiseksi ja ne hajotettiin lisäämällä 0,1 % deoksikolaattia. Lysaattien sisältämien bakteerien määrä laskettiin laskemalla niiden määrä maljausmenetelmällä ja invaasio-% ilmoitettiin gentamisiinille resistenttien bakteerien lukumääränä verrattuna ympättyjen bakteerien lukumäärään.

Invaasio ilmoitetaan yhden solukerroksen paksuiseen kasvustoon tunkeutuneiden solujen prosenttimääränä, joka on määritetty jakamalla se pesäkkeitä muodostavien yksiköiden (CFU) lukumääränä, joka on saatu talteen yhden solukerroksen paksuisesta kasvustosta gentamysiinikäsittelyn jälkeen, yhden solukerroksen paksuiseen kasvustoon ympätyllä CFU-määrällä ja kertomalla tämä tulos sadalla.

Alla olevassa taulukossa 5 on esitetty lämpötilan vaikutus tavanomaisesti tai edellä olevan esimerkin 5 mukaisten menetelmien mukaan kasvatettujen *C. jejuni* 81-176:n invaasioon INT-407-soluihin.

Alla oleva taulukko 6 esittää, miten tavanomaisesti tai tämän keksinnön mukaisten menetelmien mukaisesti kasvatetut useat *C. jejuni* -kannat poikkeavat toisistaan sen suhteen, missä määrin ne kykenevät tunkeutumaan INT-407-soluihin.

Alla olevassa taulukossa 7 on esitetty DOC:n vaikutus tavanomaisesti tai edellä olevan esimerkin 5 mukaisten menetelmien mukaan kasvatettujen C. jejuni 81-176:n adheesioon ja invaasioon INT-407-soluihin.

5

Alla olevassa taulukossa 8 on esitetty DOC:n vaikutus tavanomaisesti tai edellä olevan esimerkin 5 mukaisten menetelmien mukaan kasvatettujen Shigellan adheesioon ja invaasioon INT-407-soluihin.

10

Taulukko 5: Lämpötilan vaikutus INT-407-soluihin tunkeutumiseen tavanomaisesti kasvatetulla (BHI) tai tämän keksinnön mukaisesti kasvatetulla (parannettu) C. jejuni 81-176:lla

15

Lämpötila	BHI (tunkeutumis-%)	Parannettu (tunkeutumis-%)
37 °C	2,5	49,5
42 °C	4	7,1

20

Taulukko 6. INT-407-soluihin tunkeutumisen lisääntyminen (suuruusluokka) tavanomaisesti kasvatetuilla (BHI) tai tämän keksinnön mukaisesti kasvatetuilla (parannettu) eri C. jejuni -kannoilla

25

Kanta	BHI	Parannettu
81-176	1	9,2
81-116	1	10
HC	1	26,7

Taulukko 7. DOC:n konsentraation vaikutus INT-407-soluihin tarttumiseen ja niihin tunkeutumiseen tavanomaisesti kasvatetulla (BHI) tai tämän keksinnön mukaisesti kasvatetulla (parannettu) *C. jejuni* 81-176:lla

5

Käsittely	Adheesio (%)	Invaasio (%)
BHI	9,3	6,3
Parannettu; 0,025 % DOC	18,3	17,4
Parannettu; 0,1 % DOC	52,6	37

10

Taulukko 8: DOC:n vaikutus INT-407-soluihin tunkeutumiseen tavanomaisesti kasvatetulla (BHI) tai tämän keksinnön mukaisesti kasvatetulla (parannettu) *S. flexneri*llä

15

Ominaisuus	BHI	Parannettu
Adheesio	1	140,0 ^a
Invaasio	1	94,4

a Talteen saatiin enemmän kuin aluksi lisätyt bakteerit, mikä johtui bakteerien kasvusta määrityksen aikana

20

Sapen tai deoksikolaatin lisääminen elatusaineeseen voimisti huomattavasti useiden *C. jejuni*n humaani-isolaattien (toisin sanoen 81-116:n, 81-176:n ja HC:n) adheesiota ja tunkeutumista viljeltyihin INT-407-soluihin (ks. taulukot 4 ja 6). Tehokkain DOC:n annos oli 0,1 % (taulukko 7). Voimakkain vaste saavutettiin 37 °C:ssa mutta ei 42 °C:ssa (*Campylobacter*-bakteerien tavanomainen kasvatuslämpötila) (taulukot 3 ja 5).

25

30

Samanlaisia havaintoja tehtiin käyttäen *Shigella flexneri*ä (taulukko 8). Tämän keksinnön mukaisten menetelmien mukaisesti kasvatetuilla *Shigella*-bakteereilla olivat sekä adheesio- että invaasiokyvyt huomattavasti voimistuneet.

35

Nämä koetulokset osoittavat, että tämän keksinnön mukaiset menetelmät voimistavat suolistopatogeenien invaasiota ja adheesiota.

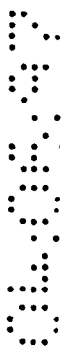
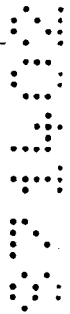
Esimerkki 29. Immunologisen ristiinreagoivuuden osoittamiseen käytettiin nopeaa agglutinaatiomäärittystä aluslaseilla. C. jejuni -kantoja, joita oli kasvatettu tavanomaisesti tai tämän keksinnön mukaisten menetelmien mukaisesti sellaisena

5 kuin nämä on esitetty kuvaavana esimerkkinä esimerkissä 5, käsiteltiin sellaisista eläimistä peräisin olevalla seerumin IgG:lla, jotka oli immunisoitu C. jejuni 81-176 (Lior 5) -soluilla, joita oli kasvatettu joko tavanomaisesti tai tämän keksinnön mukaisten menetelmien mukaisesti (esi-

10 merkiksi esimerkki 5). IgG-vasta-aineet oli immobilisoitu proteiini-A:lla päällystetyille lateksihelmille. Jos tutkitavan serotyypin ja Lior 5 -serotyyppiä vastaan valmistettujen vasta-aineiden kesken esiintyy ristiinreagoivia epitooppeja, niin solujen havaitaan kokkaroituvan (toisin sanoen

15 agglutinoituvan) lähes välittömästi. Tämä kokkaroituminen arvioidaan arvosteluasteikolla 0 - 3 sen jälkeen kun reaktio on edistynyt lyhyen aikaa, jossa 0 tarkoittaa ei lainkaan havaittavissa olevaa kokkaroitumista ja 3 tarkoittaa erittäin suurta agglutinaatioastetta. Neljän kannan tulokset on

20 esitetty alla olevassa taulukossa 9.



Taulukko 9. Ristiinreagoivuus tavanomaisesti kasvatetuilla (BHI) ja tämän keksinnön mukaisilla menetelmillä (parannettu) kasvatetuilla Lior-serotyypeillä

Viljelmä	Kasvatus- olosuhteet	Helmet	Reagoivuus
81-176 (L5)	BHI	Anti-BHI ^a	1
"	"	Anti-ENH ^b	2
"	Parannettu	Anti-BHI	2
"	"	Anti-ENH	2,5
L2	BHI	Anti-BHI	1
"	"	Anti-ENH	1,5
"	Parannettu	Anti-BHI	0
"	"	Anti-ENH	1,5
L8	BH	Anti-BHI	2
"	"	Anti-ENH	1
"	Parannettu	Anti-BHI	1
"	"	Anti-ENH	2,5
L21	BHI	Anti-BHI	0
"	"	Anti-ENH	2
"	DOC	Anti-BHI	0
"	"	Anti-ENH	2
Elatus- aineet	BHI	Anti-BHI	0
	"	Anti-ENH	0

a Tavanomaisesti kasvatetun 81-176:n aikaansaamat vasta-aineet

b Tämän keksinnön mukaisten menetelmien mukaan esimerkissä 5 kuvaavana esimerkkinä esitetyllä tavalla kasvatettujen 81-176-bakteerien aikaansaamat vasta-aineet

Taulukko 9 osoittaa, että kaikki neljä tutkittua Lior-serotyyppiä (L5, L2, L8, L21) ristiinreagoivat sellaisen vasta-aineen kanssa, joka oli valmistettu parannetulla C. jejuni 81-176 Lior-serotyypillä L5 immunisoiduista eläimistä. C. jejuni 81-176:lla infektoidujen kaniinien suolista peräisin

oleva limaa sisältävä huuhteluliuos, joka sisälsi IgA:ta, reagoi 8 serotyyppin kanssa niistä kymmenestä C. jejuniin kliinisesti tärkeimmästä serotyypistä (toisin sanoen ihmisen patogeeneista), joita oli kasvatettu tämän keksinnön mukais-
 5 ten menetelmien mukaisesti ja jotka ristiinreagoivat Lior 5 -serotyypistä kantaa vastaan suunnattujen vasta-aineiden kanssa (ks. alla oleva taulukko 16). Tulokset osoittavat, että tämän keksinnön mukaiset menetelmät laajentavat merkit-
 10 tävästi niiden Lior-serotyyppien määrää, jotka ristiinreagoivat C. jejuniin Lior 5 -serotyypikannalla immunisoiduista eläimistä peräisin olevan anti-seerumin kanssa.

Tämän keksinnön mukaisten menetelmien mukaisesti kasvatetut useat Shigella-lajit ristiinreagoivat tavanomaisesti kasva-
 15 tetuista Shigella-lajeista poiketen myös DOC:n kanssa kasvatetulla Shigella flexneri 2457T:lla immunisoiduista eläimistä peräisin olevien IgG-vasta-aineiden kanssa.

8. Esimerkit: Rokotteen tehokkuus

20 Esimerkki 30. Campylobacter-bakteerin patogeenesisin tutkimiseen soveltuvaa hillerimallia voidaan käyttää mallina, jolla pyritään määrittämään se tehokkuus, jolla rokote antaa suojan kolonisaatiota ja/tai sairautta vastaan, koska hille-
 25 rien infektiota tuottaa toistettavissa olevalla tavalla kaksi ihmisissä havaituista kolmesta sairauden ilmenemismuodosta.

Kaksikymmentäneljä koiraspuolista 7 - 9 viikon ikäistä hilleriä immunisoitiin oraalisesti joko PBS:lla (kontrolliksi) tai formaliinilla kiinnitetyllä C. jejuni -kannalla
 30 81-176, jota oli kasvatettu tavanomaisesti (BHI) tai esimerkin 5 mukaisten menetelmien mukaisesti (parannettu). Seerumia otettiin talteen perustason IgG-tiitterien määrittämiseksi. Kaikkia rokotteita ja PBS:ää annettiin LT-adjuvantin läsnäollessa kaksi kertaa viikon välein (0. päivänä
 35 ja 7. päivänä, "rokotus"). Seerumi otettiin talteen yhden viikon kuluttua (14. päivänä) ("rokotuksen jälkeen") IgG-vasta-ainetiitterien määrittämiseksi. Neljän viikon kuluttua

rokotuksesta (patogeenikäsittely) hillerit nukutettiin ACE promatsiinin ja ketamiinin seoksella ja niille annettiin oraalisesti 10 ml PBS-liuosta, joka sisälsi eläviä C. jejuni 81-176 -soluja (1×10^{10} CFU). Tämän jälkeen eläimiä seurattiin päivittäin limaisen ripulin, bakteremian, ulosteisiin erittyvien Campylobacter-bakteerien, painonmuutosten, ulosteissa esiintyvän veren ja fekaalisten leukosyyttien havaitsemiseksi. Bakteremia havaittiin ottamalla 1 - 2 ml verta nukutettujen hillereiden kaulalaskimosta ja inkuboimalla näytettä ilmastetussa trypticase soy -lihaliemiviljelmässä. Jatkoviljelyt veriagarmaljoille tehtiin 2, 5 ja 7 päivän kuluttua käsittelystä. Seeruminäytteet IgG-tiitterien määrittämiseksi oli koottu talteen ennen immunisointia (perustaso), viikon kuluttua toisesta immunisoinnista sekä käsittelyajankohdalla ja viikko käsittelyn jälkeen.

Ulosteissa esiintyvä veri havaittiin tutkimalla ulostemateriaalia Hemacult-levyllä. Ulostemateriaalia levitettiin aluslasille ja se värjättiin metyleenisinellä fekaalisten leukosyyttien havaitsemiseksi. Campylobacter-bakteerien ilmaantuminen ulosteisiin varmistettiin viljelemällä vanupuikoilla otettuja rektaalisivelyvalmisteita Campylobacter'in suhteen selektiivistä mediumia sisältävillä maljoilla (trypticase soy -agar, 5 % lampaan verta, trimetopriimiä, vankomysiiniä, polymyksiini B:tä, kefalotiinia ja amfoterisiini B:tä, Remel, Lenexa, KS). Näiden kokeiden tulokset on esitetty alla olevissa taulukoissa 10 ja 11.

Taulukko 10: Rokotus antaa suojan C. jejuni 81-176:tta vastaan hillereissä

Rokote	Positiivinen kolonisaatio 5. päivänä käsittelyn jälkeen ^a	Sairaus ^b
PBS	6/6	1/6
BHI	0/6	2/6
Parannettu	0/5 ^c	0/6

^a positiivisen kolonisaation lukumäärä/tutkittujen eläinten lukumäärä

5 ^b sairaus vihreää limaa sisältävistä/koossapysymättömistä/vetisistä ulosteista

^c yksi eläin tässä ryhmässä kuoli sairauden tilan määrittämisen jälkeen mutta ennen kolonisaation määrittämistä

10 Taulukko 11: Hillerien seerumien IgG:n tiitterin geometrinen keskiarvo

Ryhmä	Perus- taso	Viikko rokotuk- sesta	Käsittely- ajankoh- dalla	Viikko käsitte- lystä
PBS	6,4	4,9	6,4	1380,4
BHI	6,4	94	94	26505,3
15 Parannettu	6,8	234,4	1621,8	56234,1 ^a

^a viiden henkiinjääneen eläimen tiitterin keskiarvo

20 Taulukosta 10 käy ilmi, että tämän keksinnön mukaisella tapettuja kokonaisia soluja sisältävällä rokotteella immunisoidut eläimet olivat saaneet suojan elävillä bakteereilla suoritettun patogeenikäsittelyn tuottamaa kolonisaatiota ja sairautta vastaan. Taulukon 11 koetulokset osoittavat, että tämän keksinnön mukaiset rokotteet tuottivat
25 paljon suuremman IgG-vasta-ainetiitterin (parannettu) kuin tavanomaisesti viljellyt suolistobakteerit (BHI).

Nämä tulokset osoittavat, että tämän keksinnön mukaisilla
30 rokotteilla saatiin aikaan immunogeenisyyttä (taulukko 11) ja suoja infektiota vastaan (taulukko 10) ja nämä olivat voimakkaampia kuin mitä havaittiin tavanomaisesti kasvatetuilla bakteereilla rokotetuilla eläimillä. Tästä syystä
35 tämän keksinnön mukaisesti valmistetut bakteerit ovat käyttökelpoisia rokotteina, joilla on tarkoitus suojata nisäkkäitä infektiolta.

Esimerkki 31. Hiiret eivät tavallisesti infektoidu luonnostaan Campylobacter- tai Shigella-bakteereilla samalla

tavoin kuin hillerit mutta niitä on alan ammattikokemuksen perusteella käytetty osoittamaan, että immunisoidut eläimet ovat resistenttejä suun kautta tapahtuvan patogeenikäsit-

5 immunisoidut eläimet ovat resistenttejä keuhkojen infektoin-

nin välityksellä syntyvää sairautta vastaan. Mallia, joka perustuu bakteerien antamiseen hiiriin intranasaalisesti, voidaan sitten käyttää ennustamaan sellaisten rokotteiden tehokkuutta, jotka on tarkoitettu käytettäväksi muilla

10 eläimillä tai ihmisillä. Tämän määrittäminen ovat kuvanneet Mallet, et al. [Vaccine 11 (1993) 190 - 196].

Kymmenestä naaraspuolisesta Balb/C-hiiristä, jotka olivat noin 16 viikon ikäisiä, koottuja 10 hiiren ryhmiä immuni-

15 soitiin oraalisesti fosfaatilla puskuroidulla fysiologisella suolaliuoksella (PBS), tavanomaisesti kasvatetulla C. je-

junilla (BHI) tai esimerkin 5 mukaisesti kasvatetulla C. jejunilla (parannettu) noin 10^7 CFU:n tai 10^9 CFU:n suuruisi-

na annoksina ja niitä käsiteltiin tämän jälkeen patogeeneil-

20 la. Suoliston limasta saadut IgA-tiitterit kussakin ryhmässä määritettiin ELISA-menetelmällä ja ne on esitetty alla olevassa taulukossa 12.

Taulukko 12. IgA-vasteet hiirillä oraalisesti (10^7 tai 10^9) kokonaisista Campylobacter-soluista valmistetulla rokotteel-

25 la suoritettun immunisoinnin jälkeen

Immunisointi	Huuhtelu- liuoksen IgA- tiitteri ^a	Reagoivien yksi- löiden %-määrä ^b
PBS	23	14
Parannettu (10^7)	114	75
Parannettu (10^9)	78	75
BHI (10^7)	40	25
BHI (10^9)	32	12

^a huuhteluliuoksen tiitteri tarkoittaa kustakin yksittäisestä hiirten ryhmästä saatujen C. jejunia vastaan suunnattujen IgA-tiittereiden keskiarvoa.

35

^b reagoivat yksilöt määritellään eläimiksi, joiden tiitterien loppupiste on kahden standardipoikkeaman verran pelkkää PBS:ää saaneiden eläinten keskiarvon yläpuolella

5 Taulukosta 12 käy ilmi, että tämän keksinnön mukaisten menetelmien mukaisesti kasvatetuilla bakteereilla immunisoidujen eläinten suoliston IgA-vasta-ainetiitteri on suurempi, mikä käy ilmi suuremmasta reagoivien eläinten määrästä kuin mitä tavanomaisesti kasvatetuilla bakteereilla immunisoiduilla eläimillä on asianlaita.

9. Esimerkki: DOC:n aikaansaaman antigeenien muuttumisen tai vaikutuksen tehostumisen mekanismi

15 Esimerkki 32. Vaikkakaan tämän keksinnön ei ole tarkoitus rajoittua mihinkään tiettyyn nimenomaiseen vaikutusmekanismiin, on tässä keksinnössä saatu todisteita, jotka viittaavat siihen että deoksikolaatilla (DOC) vaikuttaa olevan kahtalainen vaikutus suolistobakteerien antigeenisyyden muuttumis- tai voimistumistapahtumassa. Todisteet viittaavat 20 siihen, että DOC vaikuttaa yhtäältä kalsiumista riippuvaisen vaikutusten välityksellä, koska DOC sitoo kalsiumia ja pienentää siten kalsiumin konsentraatiota mediumissa. Todisteet ovat seuraavanlaiset. Kun C. jejuni 81-176:tta viljellään membraanin läpi kulkeutuvan kalsiumkelaattorin, BAPTA/AM:n, läsnäollessa ja ilman DOC:ta, sen tunkeutumiskyky INT-407-soluihin voimistuu noin 10-kertaisesti (ks. 25 alla oleva taulukko 13). Pelkkä BAPTA/AM-käsittely ei kuitenkaan voimista C. jejuni 81-176-solujen immunologista ristiinreagoivuutta.

30 Taulukossa 13 esitetyt tulokset oli saatu käyttäen C. jejuni 81-176:tta, jota oli viljelty esimerkissä 5 kuvatun menetelmän mukaisesti lukuunottamatta sitä, että 0,1-%:isen DOC:n tilalla käytettiin 25 μ M BAPTA/AM:ää. Invaasiomääritykset suoritettiin ja tulokset arvioitiin edellä olevan esimerkin 35 28 kappaleessa 7 kuvatulla tavalla.

Taulukko 13 Tavanomaisesti kasvatetun (BHI) tai BAPTA/AM:n läsnäollessa kasvatetun *C. jejuni*in tunkeutuminen INT-107-soluihin

5	Viljelyolosuhteet		
	Kanta	BHI	BAPTA/AM
	<i>C. jejuni</i> 81-176	3	36,9

Useat bakteerisuvut, jotka ovat herkkiä saponin tai sappihappojen, kuten DOC:n, aikaansaamalle antigeenisyyden voimistumiselle tai muuntumiselle (esimerkiksi *Campylobacter*, *Shigella*, *Helicobacter*), sisältävät geenejä, jotka ovat homologisia *Yersinia*stä peräisin olevien matalalle kalsiumpitoisuudelle syntyvästä vasteesta (*lcr*) vastaavien geenien suhteen. *lcr*-lokuksen tiedetään säätelevän pienille kalsiumpitoisuuksille muodostuvana vasteena syntyvää *Yersinia* virulenssia. *lcr*-tuote säätelee osaksi kahta *Campylobacter*-bakteerien flagelliinin ilmentymiseen ja kokoonpanoon liittyvistä geeneistä, joita tarvitaan bakteerien tunkeutumiselle soluihin (*flaA*, *flbA*). Analysoitaessa tavanomaisesti tai tämän keksinnön mukaisissa virulenssia voimistavissa olosuhteissa kasvatettujen *Campylobacter*-bakteerien *flaA*- ja *flbB*-mutanttien käyttäytymistä ilmenee, että invaasio on kalsiumista riippuvaista, mutta näin ei ole asianlaita kongopuna-väriaineen sitoutumisen tai voimistuneen ristiinreagoivuuden kyseessä ollessa (ks. alla oleva taulukko 14).

Taulukossa 14 esitetyt tulokset oli saatu käyttäen *C. jejuni*a, jota oli viljelty tavanomaisesti tai kuvaavana esimerkkinä esimerkissä 5 esitettyjen tämän keksinnön mukaisten menetelmien mukaisesti. Invaasiomääritykset suoritettiin ja niiden tulos arvioitiin edellä olevassa esimerkissä 28 kuvatulla tavalla.

Taulukko 14: Tavanomaisesti kasvatettujen (BHI) tai tämän keksinnön mukaisten menetelmien mukaisesti kasvatettujen (parannettu) *C. jejuni* -mutanttien tunkeutuminen INT-407-soluihin

5

	Viljelyolosuhteet	
Kanta	BHI	Parannettu
<i>C. jejuni</i> 81-176	3,5	40,8
<i>C. jejuni</i> flaA	0,05	0,05
<i>C. jejuni</i> flbA	0,01	0,04

10

15

20

25

C. jejuni fla- ja flbA-mutanteilla esiintyy todellakin merkittävästi voimistunutta kongopunan sitomista ja immunologista ristiinreagoivuutta, kun soluja viljellään DOC:n läsnäollessa (ks. taulukko 15 ja kuvio 6, mainitussa järjestyksessä ilmoitettuna). Taulukossa 5 ja kuviossa 6 esitetyt tulokset oli saatu käyttäen *C. jejuni*a, jota oli viljelty tavanomaisesti tai tämän keksinnön mukaisten kuvaavana esimerkkinä edellä olevassa esimerkissä 5 esitettyjen menetelmien mukaisesti. Kongopuna-väriaineen sitoutumismääritykset, joiden tulokset on esitetty taulukossa 15, suoritettiin edellä olevassa esimerkissä 26 kuvatulla tavalla. Immunologisen ristiinreagoivuuden tutkiminen, jota koskevat tulokset on esitetty kuviossa 6, suoritettiin edellä olevassa esimerkissä 29 kuvatulla tavalla.

Taulukko 15: Kongopuna-väriaineen sitominen tavanomaisesti kasvatetuilla (BHI) tai tämän keksinnön mukaisten menetelmien mukaisesti kasvatetuilla (parannettu) *C. jejuni* -mutanteilla

30

	Viljelyolosuhteet	
Kanta	BHI	Parannettu
<i>C. jejuni</i> 81-176	0,07	1,68
<i>C. jejuni</i> flaA	0,1	1,6
<i>C. jejuni</i> flbA	0,12	0,8

35

flaA-mutantti ei kykene ilmentämään flagelliinia. flaA-mutantti ja flaA-flaB-kaksoismutantti (tämä oli saatu C. Grant'ilta, NIH), ovat molemmat ei-invasiivisia jopa DOC:lla suoritettun käsittelyn jälkeen, mikä viittaa siihen, että flagelliini on välttämätön soluihin tunkeutumiselle. On mielenkiintoista panna merkille, että näissä mutanteissa ei esiinny normaalisti esiintyvää (toisin sanoen DOC:sta riippumattomalla tavalla indusoitua) immunologista ristiinreagoivuutta, jota havaitaan näiden fla-mutanttien isogeenisen lähtökannan ja tiettyjen muiden C. jejuniin Lior-serotyypin kesken. Näissä flagelliinittomissa mutanteissa voi DOC-käsittely kuitenkin saada aikaan immunologisen ristiinreagoivuuden ja kongopunan sitomiskyvyn voimistumista.

Nämä havainnot viittaavat siihen, että DOC säätelee virulenssitoimintoja suolistobakteereissa kalsiumista riippuvaisella (esimerkiksi invaasiokyky) ja kalsiumista riippumattomalla (esimerkiksi kongopuna-väriaineen sitomiskyky) mekanismeilla. Nämä havainnot viittaavat lisäksi siihen, että DOC:n aikaansaama immunologisen ristiinreagoivuuden ja kongopunan sitomiskyvyn voimistuminen on vähintään osaksi flagelliinista riippumatonta.

10. Esimerkki: DOC saa aikaan Campylobacter jejuniin serotyyppien ja lajien välisen immunologisen ristiinreagoivuuden tehostumista

Esimerkki 33. Tämän keksinnön mukaisten menetelmien mukaisesti kasvatetun Campylobacter jejuniin serotyyppien välistä immunologista ristiinreagoivuutta tutkittiin käyttäen nopeaa agglutinaatiomääritystä aluslaseilla. Tähän määrittämiseen käytettiin immunisoiduista ja immunisoimattomista kaniineista peräisin olevaa suolen limaa niiden vaikutuksen määrittämiseksi, joita viljelyolosuhteiden muuttamisella on heterologisten Campylobacter-kantojen ristiinreagoivuteen. Kanineja immunisoitiin tavanomaisesti kasvatetuilla elävillä C. jejuni 81-176-bakteereilla. Liman vasta-aineiden agglutinaatioaktiivisuus tutkittiin 24 Campylobacter-kantaa vas-

taan, jotka bakteerit sisälsivät 18 serotyyppiä, ja joita oli kasvatettu tavanomaisesti BHI-YE-mediumissa tai esimerkissä 5 kuvaavana esimerkkinä esitettyjen tämän keksinnön mukaisten menetelmien mukaisesti.

5

Agglutinaatiomäärittysten tulokset osoittavat, että heterologisten *Campylobacter*-kantojen ristiinagglutinoituminen oli laajempaa ja monissa tapauksissa voimakkaampaa silloin, kun kannat oli kasvatettu tämän keksinnön mukaisten menetelmien mukaisesti kuin silloin, kun ne oli kasvatettu tavanomaisesti. Yksityiskohtaisesti mainittuna lisääntyi heterologinen agglutinaatioreagoivuus yli kaksinkertaiseksi: 6 kantaa tavanomaisesti kasvatetuista 24 heterologisesta kannasta agglutinoitui tasolla + tai tätä voimakkaammin anti-81-176-immuunilimassa, kun taas 14 näistä samoista 24 kannasta, joita oli kasvatettu DOC:tä sisältävissä olosuhteissa, agglutinoituivat tasolla + tai tätä voimakkaammin. Lisäksi samalla kun 18:lla näistä heterologisista kannoista esiintyi heikkoa (+) agglutinaatiota tai ei lainkaan agglutinaatiota tavanomaisesti kasvatettuna, esiintyi 11:llä näistä samoista kannoista agglutinaatiovasteen voimistumista silloin, kun niitä oli kasvatettu parannetuissa viljelyolosuhteissa (esimerkiksi DOC:tä sisältävässä mediumissa).

25

Taulukko 16 kuvaa kaniinin anti-81-176-immuuniliman ristiinreagoivuutta 19 heterologista Lior-serotyyppiä vastaan, jotka koostuivat 22 kannasta, joita oli kasvatettu tavanomaisesti (BHI-YE) tai käyttäen esimerkin 5 mukaisia menetelmiä (parannettu). Vaikkakin tässä kokeessa määritettiin ainoastaan

30

osa tunnetuista Lior-serotyypeistä, osoittavat tulokset, että tämän keksinnön mukaiset menetelmät saavat aikaan huomattavan immunologien ristiinreagoivuuden Lior-serotyyppien kesken. Tulokset osoittavat lisäksi, että DOC:n voimistamat tai indusoimat antigeenit näyttävät *Campylobacter*-bakteereissa olevan tärkeitä sekretorisessa IgA-vasteessa, joka liittyy resistenssiin ja toipumiseen *Campylobacter*-bakteerien aikaansaamasta suolistoinfektiosta.

35

On lisäksi pantava merkille, että Lior-serotyypin 8 kannat ovat eri lajia, *Campylobacter colia*. Yksi tämän serotyypin kahdesta kannasta (VC167) agglutinoitui voimakkaasti (3+) kaniinin anti-81-176-immuunilimassa. Tämä tulos viittaa siihen, että *C. jejuni* -kannasta (esimerkiksi Lior 5) peräisin oleva rokote ei ainoastaan saa aikaan kantojen välistä suojausta saman lajin heterologisia serotyyppijä vastaan, vaan myös muita *Campylobacter*-lajeja (esimerkiksi *Campylobacter coli*) vastaan. Myös huomionarvoinen seikka on se, että Lior-serotyypit 1, 2, 4, 9 ja 11 ovat maailmanlaajuisesti kaikkein esiintyvimpiä sairauteen liittyviä serotyyppijä. Näillä kaikilla oli osoitettavissa tässä määrityksessä havaittavaa ristiinreagoivuutta.

Taulukko 16 Tavanomaisesti kasvatettujen (BHI-YE) tai tämän keksinnön mukaisten menetelmien mukaisesti kasvatettujen (parannettu) 20 *Campylobacter*-serotyypin agglutinaatiovaste kaniinin ei-immuuni^b- tai anti-81-176^a-immuunilimaa vastaan.

5

Kanta	Lior-sero- tyyppi	Agglutinaatiovaste ^c			
		Ei-immuunilima		Immuunilima	
		BHI- YE	Paran- nettu	BHI- YE	Paran- nettu
134	1	-	-	-	++
195	2	-	-	-	±
10	1	4	-	-	+++
170	5	-	-	+++	++++
81-176	5	-	-	++++	++++
6	6	-	-	++++	+++
81-116	6	-	-	+	++
15	35	7	-	-	+
52	8	-	+	+	++
VC-167	8	-	-	+	+++
VC-159	8	-	-	±	-
88	9	-	-	-	±
20	244	11	-	+	+++
556	17	-	-	+	-
563	18	-	-	-	-
544	19	-	++	-	++
699	21	-	-	±	++
25	1180	28	-	+	+++
1982	29	-	-	-	-
910	32	-	++	-	++
2074	36	-	-	-	-
HC	36	-	+	-	+
30	2984	46	-	-	-
79171	72	-	-	-	-

^a anti-81-176-lima oli saatu kaniineista, jotka oli infektoitu tavanomaisesti kasvatetulla elävällä *C. jejuni* 81-176:lla.

5 ^b ei-immuunilima oli saatu infektoimattomista kaniineista

^c agglutinatiovasteet ulottuvat negatiivisesta (-) hyvin heikon (±) kautta hyvin voimakkaaseen (++++)

10 11 Esimerkki: Lisäkokeet *Campylobacter*-bakteerien tehokkuudesta rokotteenä

Esimerkki 34. Tämän keksinnön mukaisten menetelmien mukaisesti kasvatettujen formaliinilla kiinnitettyjen kokonaisten *Campylobacter jejuni* -solujen suojaustehokkuus määritettiin käyttäen Bagar'in [Infect. & Immun. 63 (1995) 3731 - 3735] raportoimaa kolonisaatiomallia hiirellä.

C. jejuni 81-176:tta kasvatettiin ja bakteerit koottiin talteen esimerkin 5 mukaisesti ja inaktivoitiin käyttäen 20 0,075 % formaliinia edellä kuvatulla tavalla. Ryhmille, jotka koostuivat viidestä 6 - 8 viikon ikäisestä naaraspuolisesta Balb/C-hiirestä, annettiin 3 oraalista annosta (0,25 ml/annos PBS:ssa, joka ei sisältänyt endotoksiinia), jotka sisälsivät 10^5 , 10^7 tai 10^9 inaktivoitua bakteeripartikkeliä yksinään tai yhdistettynä 25 µg:aan *E. colista* (LT) peräisin olevaa lämpölabiilia enterotoksiinia. Annoksia annettiin 48 tunnin välein ja eläimille annettiin välittömästi annosten antamisen jälkeen 15 minuutin pituisin aikavälein mahan happamuuden neutraloimiseksi kaksi 0,5 ml:n 30 suuruista annosta 5-%:ista natriumvetykarbonaattiliuosta (pH 8,5). Eläimistä koottuja ryhmiä rokotettiin kontrolleiksi pelkällä PBS:lla tai LT-adjuvanttiin yhdistetyllä PBS:llä. Rokotettuja eläimiä käsiteltiin noin 28 päivää kolmannen annoksen antamisesta joko nasaalisesti tai oraalisesti noin 35 10^8 pesäkettä muodostavalla yksiköllä (CFU) elävää tavanomaisesti kasvatettua *C. jejuni* 81-176:tta. Suoliston kolonisatiion kesto määritettiin monitoroimalla bakteerien esiintymistä ulosteessa jokaisena päivänä 9 päivän aikana. Ulostemateriaali emulgoitiin steriiliin PBS:ään ja näytteitä 40 maljattiin *Campylobacter*-veriagarille. Maljoja inkuboitiin

35 °C:ssa mikroaerofiillisissä olosuhteissa (Campylobacter GasPak, BBL) 3 - 5 päivää, jotta C. jejunilla olisi ollut tilaisuus kasvaa. Kolonisaatiotulokset on ilmoitettu niiden eläinten lukumäärän %-osuutena, joiden ulosteissa esiintyy Campylobacter-organismeja tiettyinä näytettä vastaavana päivänä.

Kuten kuviossa 7 on esitetty, esiintyi kaikilla nasaalisesti käsiteltyillä eläimillä, jotka oli sekä immunisoituja että kontrolleja, organismeja ulosteissaan välittömästi käsittelyn jälkeen (1. päivä). 80 - 100 % kontrollieläimistä pysyi kolonisoituneena 9 päivän ajan käsittelyn jälkeen. Tästä poiketen esiintyi organismeja ulosteessa merkittävästi pienemmällä määrällä eläimiä rokotetuissa ryhmissä 9 päivän mittaisen määritysjakson kuluessa. Sekä käsittelyyn käytettyjen organismien puhdistumisaste että aika, joka kului käsittelyyn käytettyjen organismien poistumiseen elimistöstä, olivat riippuvaisia annetusta rokotteen määrästä. Pienillä (10^5 partikkelia/annos) ja keskitasoa edustavilla rokoteannoksilla (10^7 partikkelia/annos) saatiin vähittäinen ja epätäydellinen puhdistumistulos. Adjuvantin läsnäolo lisäsi suojausastetta näillä annoksilla. Oli hämmästyttävää panna merkkeille, että korkeimmalla tutkitulla annoksella (10^9 partikkelia/annos) sai rokote, jossa ei ollut käytetty adjuvanttia, sellaisen suojaustason, joka oli vastaavansuuruinen tai hieman suurempi kuin suojaustaso, joka oli saatu aikaan silloin, kun vastaava annos annettiin LT-adjuvantin yhteydessä.

Samanlaisia tuloksia saatiin käsiteltäessä oraalisesti rokotettuja eläimiä myöhemmin oraalisesti patogeeneilla (ks. kuvio 8). Nämä tulokset viittaavat siihen, että immunisointi tämän keksinnön mukaisten menetelmien mukaisesti kasvatetuilla inaktivoiduilla Campylobacter-bakteereilla saadaan suoja myöhemmin tehtävää elävillä Campylobacter-bakteereilla suoritettavaa käsittelyä vastaan ja immunisaatio on tehokas jopa annettuna oraalisesti adjuvanttia käyttämättä.

Arvioitiin myös tämän keksinnön mukaisten menetelmien mukaisesti kasvatettujen formaliinilla kiinnitettyjen kokonaisten *Campylobacter jejuni* -solujen suojaustehokkuus (ks. esimerkiksi esimerkki 5), joita oli annettu intraperitoneaalisesti (IP). Näissä kokeissa annettiin 20 naaraspuolisesta Balb/C-hiirestä kootuille ryhmille ilman adjuvanttia $1,3 \times 10^{10}$, $2,5 \times 10^9$, $5,0 \times 10^8$, $1,0 \times 10^8$ tai $2,0 \times 10^7$ suuruinen annos inaktivoituja *C. jejuni* -partikkeleita 0,5 ml:ssa PBS:ää, joka ei sisältänyt endotoksiinia. Eläimiä käsiteltiin 14 päivää myöhemmin yhdellä letaalilla annoksella eläviä *C. jejuni* 81-176-bakteereita (noin $1,0 \times 10^{10}$ CFU valmistettuna PBS:ään, joka ei sisältänyt endotoksiinia), joka annettiin intraperitoneaalisesti. Eläimiä seurattiin päivittäin 4 päivän ajan niiden kuolevuuden määrittämiseksi.

Kuten taulukossa 17 on esitetty, sai yksi $5,0 \times 10^8$ aktivoitua *C. jejuni* -partikkelia sisältävä intraperitoneaalinen annos aikaan immunologisen vasteen, joka oli riittävä antamaan eläimille suojan elävillä *C. jejuni* -bakteereilla suoritettua käsittelyä vastaan.

Taulukko 17: Intraperitoneaalisesti annettujen tämän keksinnön mukaisten menetelmien mukaisesti valmistettujen V2:lla inaktivoitujen *C. jejuni* -bakteerien antama suoja

Annos	Päivä	Kuolevuus				Henkiin jääneet
		1	2	3	4	
$1,3 \times 10^{10}$		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
PBS-kontrolli		4	3	2	0	1

12 Esimerkit: DOC:n avulla voimistunut invaasiokyky, kongopunan sitomiskyky ja immunologinen ristiinreagoivuus Shigella

Esimerkki 35. Viljelmän kasvuvaihe vaikuttaa in vitro -olosuhteissa kasvatetun Shigella sp:n invaasiokykyyn. Tavanomaisesti (BHI) tai esimerkin 9 avulla kuvaavana esimerkkinä esitettyjen tämän keksinnön mukaisten menetelmien mukaisesti (DOC-EL) (jossa solut ovat peräisin varhaisesta logaritmivaiheen viljelmästä) tai muuten esimerkin 9 mukaisesti, mutta antamalla viljelmän saavuttaa ennen solujen talteenottoa myöhäinen logaritmivaihe (DOC-LL) kasvatettujen Shigella flexneri 2457T -solujen invaasiokyky tutkittiin esimerkissä 28 kuvattujen menetelmien mukaisesti. Tulokset osoittavat, että DOC:n kanssa suoritettu viljely tehostaa invaasiokykyä ja voimistuminen on maksimaalisella tasolla varhaisessa kasvuvaiheessa (ks. kuvio 9).

Viljely tämän keksinnön mukaisten menetelmien mukaisesti DOC:n läsnäollessa voimistaa myös muiden Shigella-lajien, S. sonnei ja S. dysenteriae invaasiokykyä (ks. kuvio 10). Polarisoiduissa epiteelisoluissa havaittiin Shigellan invaasiokyvyn tehostuminen ainoastaan silloin, kun bakteerit infektoivat epiteelisoluja basolateraalaisesti. Tämä havainto on yhdenmukainen in vivo -olosuhteissa havaitun invaasiotapahtuman suhteen.

Vertailututkimukset osoittavat, että tämän keksinnön mukaisten menetelmien mukaisesti kasvatetut Shigella-bakteerit ovat lähes 10 kertaa invasiivisempia kuin Pope, et al.:n [Infect. & Immun. 63 (1995) 3642 - 3648] kuvaaman menetelmän mukaisesti valmistetut Shigella-bakteerit.

Esimerkki 36. Tämän keksinnön mukaisten menetelmien mukaan viljellyillä Shigella-bakteereilla esiintyy myös kongopunan sitoutumisen voimistumista. Tavanomaisesti (BHI) tai esimerkissä 9 kuvaavana esimerkkinä esitettyjen tämän keksinnön mukaisten menetelmien mukaisesti kasvatetuista S. flexneri

2457T:sta ja *S. sonneista* määritettiin myös niiden kyky sitoa väriainetta käyttäen edellä olevassa esimerkissä 26 kuvattuja menetelmiä. Tulokset osoittavat, että näiden kahden *Shigella*-lajin kasvattaminen DOS:ssa voimisti solujen kykyä sitoa kongopunaa 10 - 20-kertaisesti. (ks. taulukko 18).

Taulukko 18: Kongopunan sitomiskyky tavanomaisesti (BHI) tai tämän keksinnön mukaisten menetelmien mukaisesti (parannettu) kasvatetuilla *S. flexnerillä* ja *S. sonneilla*

Kanta	Viljelyolosuhteet	
	BHI	Parannettu
<i>S. flexneri</i> 2457T	0,04	0,44
<i>S. sonnei</i>	0,02	0,4

15

Shigella jaetaan neljään lajiin ja useisiin serotyyppeihin. Tämän keksinnön mukaisten menetelmien mukaisesti kasvatetun *Shigella flexnerin* immunologista ristiinreagoivuutta tutkittiin käyttäen esimerkissä 28 kuvattua agglutinaatiomääritystä. Tässä määrittämisessä käytettiin immunisoiduista kaniineista saatua antiseerumia viljelyolosuhteiden vaikutusten määrittämiseksi eri *Shigella*-lajien immunologiseen ristiinreagoivuuteen. Kaniinit immunisoitiin formaliinilla kiinnitetyllä *Shigella flexneri* 2457T:lla, joka oli kasvatettu esimerkin 9 mukaisten menetelmien mukaisesti. Immunisoiduista eläimistä saatujen IgG-vasta-aineiden agglutinaatioaktiivisuus tutkittiin kaikkia neljää *Shigella*-lajia vastaan, joita oli kasvatettu tavanomaisesti BHI-mediumissa tai tämän keksinnön mukaisten menetelmien mukaisesti (esimerkiksi esimerkki 9). Agglutinaatiomääritysten tulokset osoittavat, että kasvatus DOC:n kanssa voimisti merkittävästi homologisen *Shigella flexnerin* agglutinaatioaktiivisuutta sekä kolmen heterologisen *Shigella*-lajin agglutinaatioaktiivisuuksia anti-*S. flexneri* -vasta-ainetta vastaan. (ks. kuvio 11).

35

13 Esimerkki: Shigellan tehokkuus rokotteenä

Esimerkki 37. Tämän keksinnön mukaisten menetelmien mukaisesti kasvatettujen kokonaisten formaliinilla kiinnitettyjen Shigella flexneri -solujen suojaustehokkuus määritettiin käyttäen hiirten nasaaliseen käsittelyyn perustuvaa mallia, jonka ovat kehittäneet Mallet, C.P., et al. [Vaccine 11 (1993) 190 - 196]. Lyhyesti mainittuna Shigella flexneriä kasvatettiin ja solut koottiin talteen kuvaavana esimerkkinä esimerkissä 9 esitettyjen menetelmien mukaisesti, ja inaktivoitiin 0,075 %:isella formaliinilla esimerkissä 30 kuvatulla tavalla. 14 - 16 viikon ikäisiä naaraspuolisia Balb/C-hiiriä rokotettiin noin 10^7 inaktivoidulla bakteeripartikkelilla. Inaktivoitu S. flexneri suspendoitiin steriiliin PBS:ään, joka ei sisältänyt endotoksiinia, konsentraatioon 10^8 partikkelia/ml ja 35 μ l tätä materiaalia annettiin nasaalisesti ryhmille, joihin oli koottu 10 kevyesti nukutettua eläintä. Kaikkiaan 3 immunisaatiota annettiin 14 päivän välein.

Sen vaikutuksen tutkimiseksi, joka adjuvantilla on kokonaisia Shigella-soluja sisältävän rokotteen suojauskykyyn, immunoitiin eläimistä koottuja ryhmiä käyttäen suspensiota, joka sisälsi inaktivoitua rokotetta ja 5 μ g E. coli (LT):stä peräisin olevaa lämpölabiilia enterotoksiinia. 14 päivää kolmannen immunisoinnin jälkeen eläimiä käsiteltiin nasaalisesti subletaalilla heikentävällä annoksella (10^5 CFU) joko elävää S. flexneriä tai S. sonneita. Välittömästi ennen käsittelyä ja 1, 2, 5 ja 7 päivää käsittelyn jälkeen eläimet punnittiin ja ryhmän keskipaino määritettiin. Tulokset on esitetty taulukossa 19.

Taulukko 19: Inaktivoituja kokonaisia *Shigella flexneri* -soluja sisältävä rokote suojaa hiiriä elävillä *S. flexneri*-lä tai *S. sonnei*lla suoritettua nasaalista patogeenisittelyä vastaan

Patogeenisittelyyn käytetty organismi	Rokote	Prosentuaalinen muutos patogeenisittelyn jälkeen			
		1. päivä	2. päivä	5. päivä	7. päivä
<i>S. flexneri</i>	PBS	-8,1	-18,2	-17,7	-18,3
	rokote	-5,4	-2,9	-2,5	-1,6
	rokote + adjuvantti	-7	-2	-1,5	1,5
<i>S. sonnei</i>	PBS	-8,1	-17,5	-9,3	-6,4
	rokote	-6,7	-11,3	-6,5	-6
	rokote + adjuvantti	-6,4	-5,2	-1,3	-2,1

Kussakin ryhmässä olevat 10 hiirtä immunisoitiin 3X nasaa-
lisesti rokotteella, joka sisälsi 10^7 esimerkin 9 mukaisesti
kasvatettua inaktivoitua *S. flexneri*ä

Sellaiset hiiret, jotka oli immunisoitu tämän keksinnön mu-
kaisten menetelmien mukaisesti kasvatettua inaktivoitua *S.*
*flexneri*ä sisältävällä rokotteella, saivat suojan elävillä
S. flexneri -organismeilla suoritettua patogeenisittelyä
vastaan. Painonlasku näillä hiirillä oli vähäisempää ja pai-
non palautuminen nopeampaa kuin rokottamattomilla hiirillä,
toisin sanoen valekäsiteltyssä PBS-kontrolliryhmässä. Oli
hämmästyttävää panna merkille, että *S. flexneri* -rokote
suojasi myös hiiriä elävillä *S. sonnei*lla suoritettua pato-
geenisittelyä vastaan. Oli mielenkiintoista panna merkil-
le, että eläimet, joille oli annettu pelkkää rokotetta ilman
LT-adjuvanttia, saivat yhtä hyvän suojan homologista *S.*
flexneri -käsittelyä vastaan kuin eläimet, joille oli annet-
tu adjuvanttia sisältävää rokotetta. Pelkkä *S. flexneri*
-rokote antoi myös suojan heterologista *S. sonnei* -käsitte-
lyä vastaan. LT-adjuvantin käyttö voimisti kuitenkin huomattavasti

tavasti *S. sonnei* -käsittelyjä vastaan suuntautuvaa suojaa. Nämä havainnot viittaavat siihen, että tämän keksinnön mukaisten menetelmien mukaisesti valmistettu inaktivoitu *Shigella* on tehokas hyväksytyssä *Shigella*-sairausmallissa eikä siinä tarvita adjuvanttia useiden erilaisten *Shigella*-infektioiden ehkäisemisessä tai heikentämisessä.

14 Esimerkki: Tekijät, jotka vaikuttavat *H. pylori*n kykyyn tarttua eläinsoluihin

10 Esimerkki 38. Kasvu glykokolaatissa tai sapessa voimistaa *H. pylori*n tarttuvuutta. *H. pylori* -kantojen NB3-2 tai G1-4 soluja lisättiin BHI-lihaliemeen, joka sisälsi 4 % nautavasikan seerumia. Kun pullot oli ympätty, ne huuhdeltiin kaasuseoksella, jonka koostumus oli 10 % CO₂, 5 % O₂ ja 85 %

15 N₂, ja niitä inkuboitiin ravistellen 22 tuntia 37 °C:ssa. Tämän inkuboinnin jälkeen viljelmä laimennettiin suhteessa 1 : 10 pulloon, joka sisälsi 1 litran BHI-mediumia, joka sisälsi 4 % nautavasikanseerumia ja joka sisälsi useita eri konsentraatioita naudan sapetta (0,025 - 0,2 %). Nämä viljel-

20 mät huuhdeltiin uudelleen tällä samalla kaasuseoksella ja niitä inkuboitiin 37 °C:ssa. Solut koottiin talteen useina eri ajankohtina 18 tuntiin asti ja niiden adheesio INT-407-soluihin määritettiin käyttäen esimerkissä 28 kuvattuja menetelmiä. Tulokset osoittavat, että viljely sapon kanssa

25 voimisti *H. pylori*n adheesiota INT 407 -soluihin (ks. kuviot 12 ja 13). Adheesiokyky NB3-2-kannan kyseessä oli huipussaan noin 8 tunnin kasvun jälkeen ollen 4 - 6-kertaisesti voimistunut verrattuna viljelmään, jonka ominaisuuksia ei oltu parannettu (kuvio 12). Adheesiokyky G1-4-kannan kyseessä

30 ollessa oli huipussaan 0,2 %:isessa sapessa kasvun edistyttyä 12 - 14 h, ollen 2 - 3-kertainen tehostamattomaan viljelmään verrattuna (kuvio 13). Nämä "huipun" ajankohdat vastaavat tavallisesti sitä ajankohtaa, jolloin kummankin kannan viljelmä oli logaritmisessa kasvuvaiheessa.

35

15 Esimerkki: Tämän keksinnön mukaisten menetelmien mukaisesti kasvatetun Helicobacter'in tehokkuus rokotteenä

Esimerkki 39. Tämän keksinnön mukaisten menetelmien mukaisesti kasvatettujen formaliinilla kiinnitettyjen kokonaisten

5 Helicobacter pylori -solujen suojaustehokkuus määritettiin käyttäen hiirimallia, joka perustuu mahan kolonisaatioon Helicobacter felisillä ja jonka ovat kuvanneet Chen, et al. [Lancet 339 (1992) 1120 - 1121]. Helicobacter pylori -kantaa G1-4 kasvatettiin ympypiviljelmänä noin 22 tuntia 37 °C:ssa
10 10-%:isen CO₂:n ja 90-%:isen ilman seoksessa BHI-mediumissa, joka sisälsi 4 % nautavasikan seerumia. Osa tästä viljelmästä käytettiin ympiksi, joka ympättiin sen omaa tilavuutta 10 kertaa suurempaan tilavuuteen samaa mediumia, joka sisälsi 0,1 % (v/v) naudnan sappea. Kun soluja oli kasvatettu 12 -
15 24 tuntia 37 °C:ssa, ne koottiin talteen sentrifugoimalla ja suspendoitiin huoneenlämmössä uudelleen kymmenesosaan alkuperäistä tilavuuttaan Hank's balanced salts solution (HBSS) -liuokseen. Solut sentrifugoitiin uudelleen HBSS:ään, jonka tilavuus oli sadasosa alkuperäisestä tilavuudesta. Pusku-
20 roituun solususpensioon lisättiin sellainen määrä formaliniä, että sen konsentraatioksi saatiin 0,075 %, ja solut inaktivoitiin sekoittamalla suspensiota huoneenlämmössä 6 tuntia, minkä jälkeen liuosta pidettiin jäädytettynä 4 °C:ssa 18 tunnin ajan.

25 Suojauspotentiaali määritettiin rutiininomaisesti antamalla 3 annosta tätä inaktivoituja kokonaisia soluja sisältävää rokotetta oraalisesti 6 - 8 viikon ikäisille naaraspuolisille Balb/C-hiirille, joissa ei esiintynyt Helicobacter-bakteereja, 0., 7. ja 14. päivänä tai 0., 7. ja 21. päivänä. Arviointiin käytettiin annoksia, jotka sisälsivät annosta kohti 10⁹ bakteeripartikkelia yhdistettynä E. colin lämpölabiiliin enterotoksiiniin. 14 päivää kolmannen immunsointiannoksen jälkeen eläimiä käsiteltiin oraalisesti
30 yhdellä annoksella eläviä H. felis -bakteereita (10⁷ CFU/annos).

Eläimet lopetettiin kaksi viikkoa käsittelyn jälkeen ja mahaportin sopen segmenteistä analysoitiin ureaasi-aktiivisuus *H. felis*in esiintymisen määrittämiseksi. Ureaasiaktiivisuus määritettiin inkuboimalla mahaportin soppikudosnäytteitä 0,5 ml:ssa Stuart's urease broth (Remel) -elatusaineetta huoneenlämmössä 4 - 24 tuntia. Tänä aikana tapahtuvan värin muuttumisen läpinäkyvästä punaiseksi katsottiin merkitsevän positiivista ureaasitulosta.

Kuten taulukossa 20 on esitetty, suojaasi *H. pylori* -kantaa G1-4 käyttäen valmistetun parannetuista kokonaisista *Helicobacter*-soluista valmistetun rokotteen antaminen eläimiä oraalista *H. felis* -käsittelyä vastaan.

Taulukko 20: Tämän keksinnön mukaisten menetelmien mukaisesti kasvatettua inaktivoitua *H. pyloria* sisältävillä rokotteilla saatava suoja *Helicobacter*-infektioita vastaan

Immunisointiin käytetyt aineet ^a	Patogeeni-käsittelyn organismit (10 ⁷ CFU:ta)	Koloni-soituneita/yhteensä	Suojaus-%
Koe 1			
<i>H. pylori</i> ^b	<i>H. felis</i>	4/13	71
PBS + LT	<i>H. felis</i>	9/9	0
Koe 2			
<i>H. pylori</i> ^b	<i>H. felis</i>	2/15	87
PBS + LT	<i>H. felis</i>	10/10	0

^a kaikki aineet annettiin yhdessä 10 µg:n suuruisen LT-adjuvanttierän (ETEC:n labiili toksini) kanssa kolmena oraalisena annoksena 7 päivän välein

^b annettu 1 x 10⁹ CFU:na G1-4-kantaa 0,25 ml:n annoksessa

Näiden kokeiden tulokset osoittavat parannettujen suolistobakteerien ominaisuuksien relevanssin immunogeenisyydelle in vivo -olosuhteissa.

Tämän keksinnön mukaisilla menetelmillä saadaan aikaan bakteereja, jotka kykenevät indusoimaan immunogeenisen vasteen, joka on suojaava ja ne ovat tästä syystä käyttökelpoisia rokotteina.

5

16. Mikro-organismien talletus

Seuraavat mikro-organismit on talletettu talletuslaitokseen American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USA, ja niille on annettu seuraavat hakunumerot:

10

Mikro-organismi	Haku-numero	Talletuspäivämäärä
Helicobacter pylori NB3-2		29.9.1995
Helicobacter pylori G1-4		29.9.1995

15

Alan ammattikokemuksen perusteella on vaikeuksitta selvitetävissä muita tämän keksinnön mukaisia menetelmiä vastaavia menetelmiä ja nämä vastaavuudet on tarkoitettu tähän keksintöön kuuluviksi. Edellä oleva selitys sisältää kaikkien informaation, joka katsotaan olevan olennaista patenttivaatimuksen mukaisen keksinnön käyttämiseksi alan ammattikokemuksen perusteella. Koska siteeratuista patenttijulkaisuista tai julkaisuista voidaan saada muuta käyttökelpoista informaatiota, on kaikki tässä keksinnössä siteerattu kirjallisuusmateriaali liitetty tähän keksintöön kokonaisuudessaan siihen oikeuttavien säännösten nojalla.

20

25

MICROORGANISMS

Optional Sheet in connection with the microorganism referred to on page 61, lines 30-38 of the description

A. IDENTIFICATION OF DEPOSIT *

Further deposits are identified on an additional sheet *

Name of depositary institution *

American Type Culture Collection

Address of depositary institution (including postal code and country) *

12301 Parklawn Drive
Rockville, MD 20852
US

Date of deposit * September 29, 1995 Accession Number * _____

B. ADDITIONAL INDICATIONS * (leave blank if not applicable) This information is continued on a separate attached sheet:

C. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE * (if the indications are not all designated States)

D. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS * (leave blank if not applicable)

The indications listed below will be submitted to the International Bureau later * (Specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")

E. ☐ This sheet was received with the International application when filed (to be checked by the receiving Office)

(Authorized Officer)

☐ The date of receipt (from the applicant) by the International Bureau *

was

(Authorized Officer)

International Application No: PCT/ /

Form PCT/RO/134 (cont.)

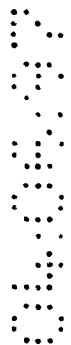
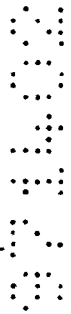
American Type Culture Collection

12301 Parklawn Drive
Rockville, MD 20852
US

Accession No.

Date of Deposit

September 29, 1995



Patenttivaatimukset

1. Menetelmä antigeenisiltä ominaisuuksiltaan parannettujen Helicobacter-bakteerien aikaansaamiseksi, **tunnettu** siitä, että menetelmä käsittää sen, että Helicobacter-bakteeriviljelmää kasvatetaan in vitro -olosuhteissa olosuhteiden yhdistelmässä, joka käsittää sen, että siihen käytetään:

a) noin 0,05 - noin 3 % sappea tai noin 0,025 - noin 0,6 % yhtä tai useampaa sappihappoa tai näiden suolaa;

b) kasvatusta noin 30 - noin 42 °C:n lämpötilassa;

c) kasvatusta ilmassa tai mikroaerofiilissä olosuhteissa, joissa mikroaerofiiliset olosuhteet käsittävät i) noin 5 - noin 20 % CO₂:ta ja noin 80 - noin 95 % ilmaa; tai ii) noin 5 - noin 10 % O₂:ta, noin 10 - noin 20 % CO₂:ta ja noin 70 - noin 85 % N₂:ta; ja

d) divalenttisten kationien kelaattoria, joka on 0 - noin 100 μM BAPTA/AM, 0 - noin 10 mM EGTA tai 0 - noin 100 μM EGTA/AM;

riittävän pitkän aikaa, jotta viljelmä saavuttaa varhaista logaritmivaihetta, varhaisen logaritmivaiheen ja stationaarivaiheen välivaihetta tai stationaarivaihetta vastaavan kasvuvaiheen.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että sappisuola tai -happo käsittää glykokolaatin tai glykokolihiapon.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että mainittu Helicobacter on Helicobacter pylori tai Helicobacter felis.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että mainittu *Helicobacter* on *Helicobacter pylori* -kanta 49503, NB3-2 tai G1-4.

5 5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että olosuhteiden yhdistelmä käsittää sen, että siinä käytetään:

10 a) noin 0,05 % sappisuolaa, joka on glykokolaatti, tai noin 0,1 - noin 0,2 % sappea;

b) noin 37 °C:n lämpötilaa;

15 c) kasvatusta noin 10 - noin 20 % CO₂:ta ja noin 80 - noin 90 % ilmaa sisältävässä seoksessa tai noin 10 % CO₂:ta, noin 5 % O₂:ta ja noin 85 % N₂:ta sisältävässä seoksessa; ja

viljelmää kasvatetaan riittävän pitkän aikaa, jotta viljelmä on saavuttanut logaritmisen vaiheen.

20

6. Menetelmä antigeenisiltä ominaisuuksiltaan parannettujen *Helicobacter*-bakteerien aikaansaamiseksi, **tunnettu** siitä, että menetelmä käsittää sen, että *Helicobacter*-bakteeriviljelmää kasvatetaan in vitro -olosuhteissa olosuhteiden yhdistelmässä, joka käsittää sen, että siihen käytetään:

25

a) divalenttisten kationien kelaattoria, joka on noin 1,0 - noin 25 μM BAPTA/AM, noin 0,5 - noin 10 mM EGTA tai noin 1,0 - noin 100 μM EGTA/AM;

30

b) kasvatusta noin 30 - noin 42 °C:n lämpötilassa; ja

c) kasvatusta ilmassa tai mikroaerofiilissä olosuhteissa, joissa mikroaerofiiliset olosuhteet käsittävät i) noin 5 - noin 20 % CO₂:ta ja noin 80 - 95 % ilmaa; tai ii) noin 5 - noin 10 % O₂:ta, noin 10 - noin 20 % CO₂:ta sekä noin 70 - noin 85 % N₂:ta,

35

riittävän pitkän aikaa, jotta viljelmä on saavuttanut ,
varhaista logaritmivaihetta, varhaisen logaritmivaiheen ja
stationaarivaiheen välivaihetta tai stationaarivaihetta
vastaavan kasvuvaiheen.

5

7. Antigeenisilta ominaisuuksiltaan parannettu *Helicobacter*-
bakteeri, **tunnettu** siitä, että se on otettu talteen *Helico*-
bacter-bakteerien viljelmästä, jota on kasvatettu in vitro
-olosuhteissa sellaisten olosuhteiden yhdistelmässä, joka
10 käsittää sen, että siihen käytetään:

a) noin 0,05 - noin 3 % sappea tai noin 0,025 - noin 0,6 %
yhtä tai useampaa sappihappoa tai näiden suolaa;

15

b) kasvatusta noin 30 - noin 42 °C:n lämpötilassa;

c) kasvatusta ilmassa tai mikroaerofiilissä olosuhteissa,
joissa mikroaerofiiliset olosuhteet käsittävät i) noin 5 -
noin 20 % CO₂:ta ja noin 80 - 95 % ilmaa; tai ii) noin 5 -
20 noin 10 % O₂:ta, noin 10 - noin 20 % CO₂:ta ja noin 70 - noin
85 % N₂:ta; ja

d) divalenttien kationien kelaattoria, joka on 0 - noin
25 µM BAPTA/AM, 0 - noin 10 mM EGTA tai 0 - noin 100 µM
25 EGTA/AM;

ja siitä, että mainittu *Helicobacter*-viljelmä on varhaisessa
logaritmivaiheessa, varhaisen logaritmivaiheen ja statio-
naarivaiheen välivaiheessa tai stationaarivaiheessa.

30

8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen *Helicobacter*-bakteeri,
tunnettu siitä, että sappisuola tai -happo käsittää glyko-
kolaatin tai glykokolihton.

35

9. Patenttivaatimuksen 7 mukainen *Helicobacter*-bakteeri,
tunnettu siitä, että mainittu *Helicobacter* on *Helicobacter*
pylori tai *Helicobacter felis*.

10. Patenttivaatimuksen 7 mukainen *Helicobacter*-bakteeri, **tunnettu** siitä, että mainittu *Helicobacter* on *Helicobacter pylori* -kanta 49503, NB3-2 tai G1-4.

5 11. Patenttivaatimuksen 7 mukainen *Helicobacter*-bakteeri, **tunnettu** siitä, että olosuhteiden yhdistelmä käsittää sen, että siinä käytetään:

10 a) noin 0,05 % sappisuolaa, joka on glykokolaatti, tai noin 0,1 - noin 0,2 % sappea;

b) noin 37 °C:n lämpötilaa;

15 c) kasvatusta noin 10 - noin 20 % CO₂:ta ja noin 80 - noin 90 % ilmaa sisältävässä seoksessa tai noin 10 % CO₂:ta, noin 5 % O₂:ta ja noin 85 % N₂:ta sisältävässä seoksessa; ja

viljelmä on logaritmivaiheessa.

20 12. Patenttivaatimuksen 11 mukainen *Helicobacter*-bakteeri, **tunnettu** siitä, että mainittu *Helicobacter* on *Helicobacter pylori* tai *Helicobacter felis*.

25 13. Antigeenisilta ominaisuuksiltaan parannettu *Helicobacter*-bakteeri, **tunnettu** siitä, että se on otettu talteen *Helicobacter*-bakteerien viljelmästä, jota on kasvatettu in vitro -olosuhteissa sellaisten olosuhteiden yhdistelmässä, joka käsittää sen, että siihen käytetään:

30 a) divalenttisten kationien kelaattoria, joka on noin 1,0 - noin 25 µM BAPTA/AM, noin 0,5 - noin 10 mM EGTA tai noin 1,0 - noin 100 µM EGTA/AM;

35 b) kasvatusta noin 30 - noin 42 °C:n lämpötilassa;

c) kasvatusta ilmassa tai mikroaerofiilissä olosuhteissa, joissa mikroaerofiiliset olosuhteet käsittävät i) noin 5 -

noin 20 % CO₂:ta ja noin 80 - 95 % ilmaa; tai ii) noin 5 -
noin 10 % O₂:ta, noin 10 - noin 20 % CO₂:ta sekä noin 70 -
noin 85 % N₂:ta,

5 ja siitä, että Helicobacter-viljelmä on varhaisessa
logaritmivaiheessa, varhaisen logaritmivaiheen ja statio-
naarivaiheen välivaiheessa tai stationaarivaiheessa.

14. Rokote, **tunnettu** siitä, että se sisältää patenttivaati-
10 muksen 7, 9, 11, 12 tai 13 mukaista Helicobacter-bakteeria
tai tämän immunogeenista fragmenttia tai johdannaista.

15. Patenttivaatimuksen 14 mukainen rokote, **tunnettu** siitä,
että se lisäksi sisältää farmaseuttisesti hyväksyttävää
15 kantaja-ainetta tai laimenninta.

16. Patenttivaatimuksen 14 mukainen rokote, **tunnettu** siitä,
että mainittu Helicobacter-bakteeri on inaktivoitu.

20 17. Patenttivaatimuksen 16 mukainen rokote, **tunnettu** siitä,
että mainittu Helicobacter-bakteeri on inaktivoitu forma-
liinikäsittelyllä.

25 18. Patenttivaatimuksen 14 mukainen rokote, **tunnettu** siitä,
että mainittu rokote soveltuu annettavaksi limakalvon kautta
tai parenteraalisesti tai annettavaksi limakalvon kautta
sekä parenteraalisesti.

30 19. Patenttivaatimuksen 14 mukainen rokote, **tunnettu** siitä,
että se lisäksi sisältää adjuvanttia.

35 20. Menetelmä potentiaallisen antimikrobiaalisen aineen mää-
rittämiseksi, **tunnettu** siitä, että se sisältää sen, että
patenttivaatimuksen 7, 9, 11, 12 tai 13 mukaista Helico-
bacter-bakteeri saatetaan kosketukseen mainitun aineen
kanssa ja määritetään mainitun aineen bakterisidiset tai
bakteriostaattiset vaikutukset Helicobacter-bakteeriin.

21. Menetelmä eläimessä tai tästä peräisin olevassa biologisessa näytteessä esiintyvien *Helicobacter*-bakteereja vastaan suunnattujen isännän vasta-aineiden havaitsemiseksi, **tunnettu** siitä, että menetelmä käsittää vaiheet, jotka ovat a) saatetaan mainittu biologinen näyte kosketukseen patenttivaatimuksen 7, 9, 11, 12 tai 13 mukaisen *Helicobacter*-bakteerin tai tämän fragmentin kanssa ja b) suoritetaan seulonta, jolla on tarkoituksena havaita vasta-aineen sitoutuminen *Helicobacter*-bakteeriin tai tämän fragmenttiin.

22. Menetelmä eläimessä tai tästä peräisin olevassa biologisessa näytteessä esiintyvien *Helicobacter*-bakteerien havaitsemiseksi, **tunnettu** siitä, että menetelmä sisältää vaiheet, jotka ovat a) saatetaan mainittu biologinen näyte kosketukseen vasta-aineen kanssa, joka sitoo patenttivaatimuksen 7, 9, 11, 12 tai 13 mukaista *Helicobacter*-bakteeria tai tämän fragmenttia ja b) suoritetaan seulonta, jolla on tarkoituksena havaita vasta-aineen sitoutuminen *Helicobacter*-bakteeriin tai tämän fragmenttiin.

23. Diagnostinen immunomäärityspakkaus *Helicobacter*-bakteereja vastaan suunnattujen isännän muodostamien vasta-aineiden havaitsemiseksi tai *Helicobacter*-bakteerien havaitsemiseksi, **tunnettu** siitä, että se sisältää patenttivaatimuksen 7, 9, 11, 12 tai 13 mukaista *Helicobacter*-bakteeria tai tätä vastaan suunnattuja vasta-aineita, sekä halutun immunomäärityksen suorittamiseen tarvittavat kaikki muut olennaiset määrityspakkauksen komponentit.

24. Menetelmä *Helicobacter*-bakteeria vastaan suunnattujen vasta-aineiden muodostamiseksi eläimessä, **tunnettu** siitä, että menetelmä käsittää sen, että eläin immunisoidaan tehokkaalla määrällä immunogeeniä, joka sisältää patenttivaatimuksen 7, 9, 11, 12 tai 13 mukaista *Helicobacter*-bakteeria, sekä siitä, että *Helicobacter*-bakteeria vastaan suunnatut vasta-aineet sitovat mainittua *Helicobacter*-bakteeria tai tämän komponenttia.

25. Menetelmä immuunivasteen stimuloimiseksi eläimessä, **tunnettu** siitä, että tämä käsittää sen, että annetaan eläimelle tehokas määrä immunogeeniä, joka sisältää patenttivaatimuksen 7, 9, 11, 12 tai 13 mukaista *Helicobacter*-bakteeria, sekä siitä, että mainittu immuunivaste ehkäisee, lievittää eläimellä esiintyviä *Helicobacter*-infektioita tai sairauksia tai parantaa nämä.

06-08-99

371602

1/13

FIGURE 1C

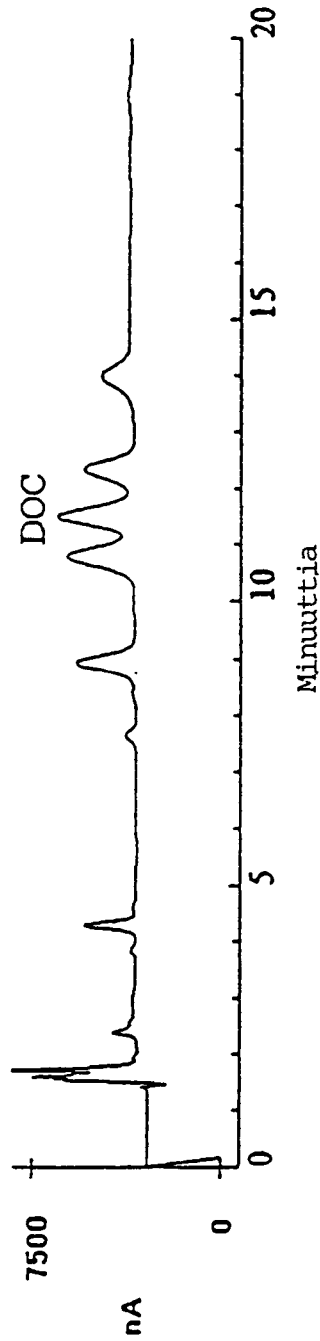


FIGURE 1B

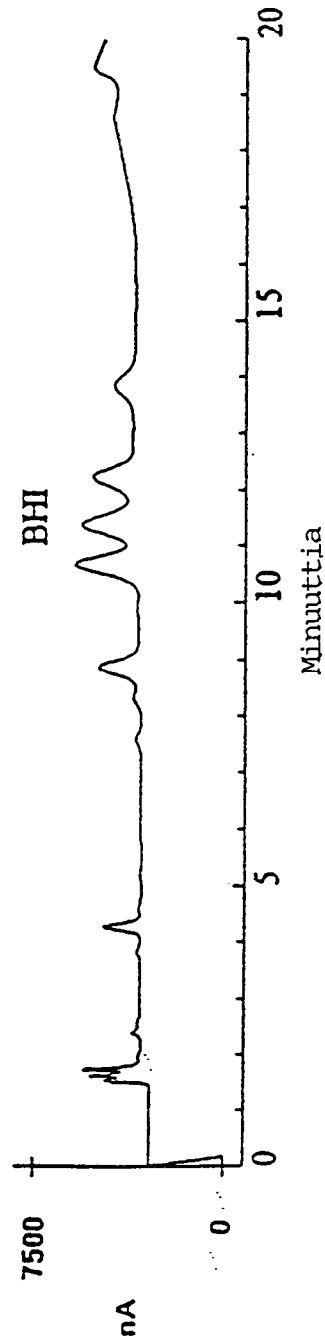


FIGURE 1A

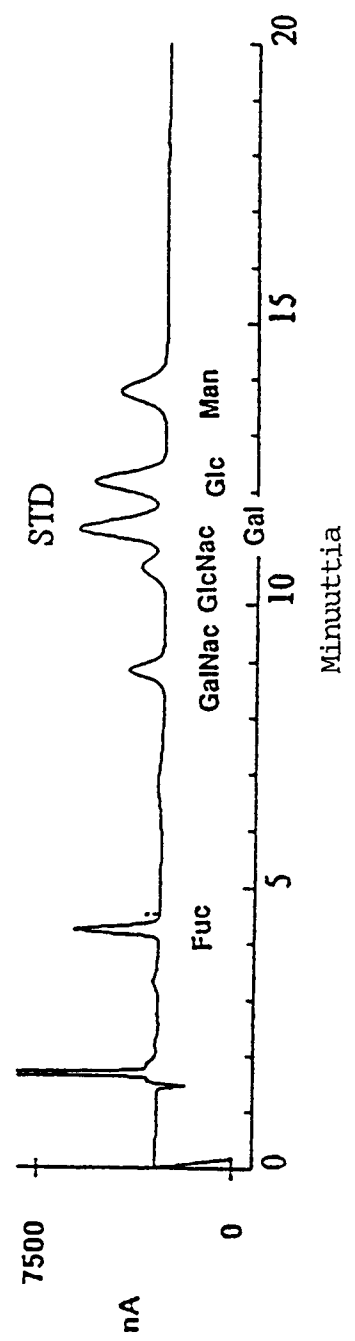


FIGURE 2

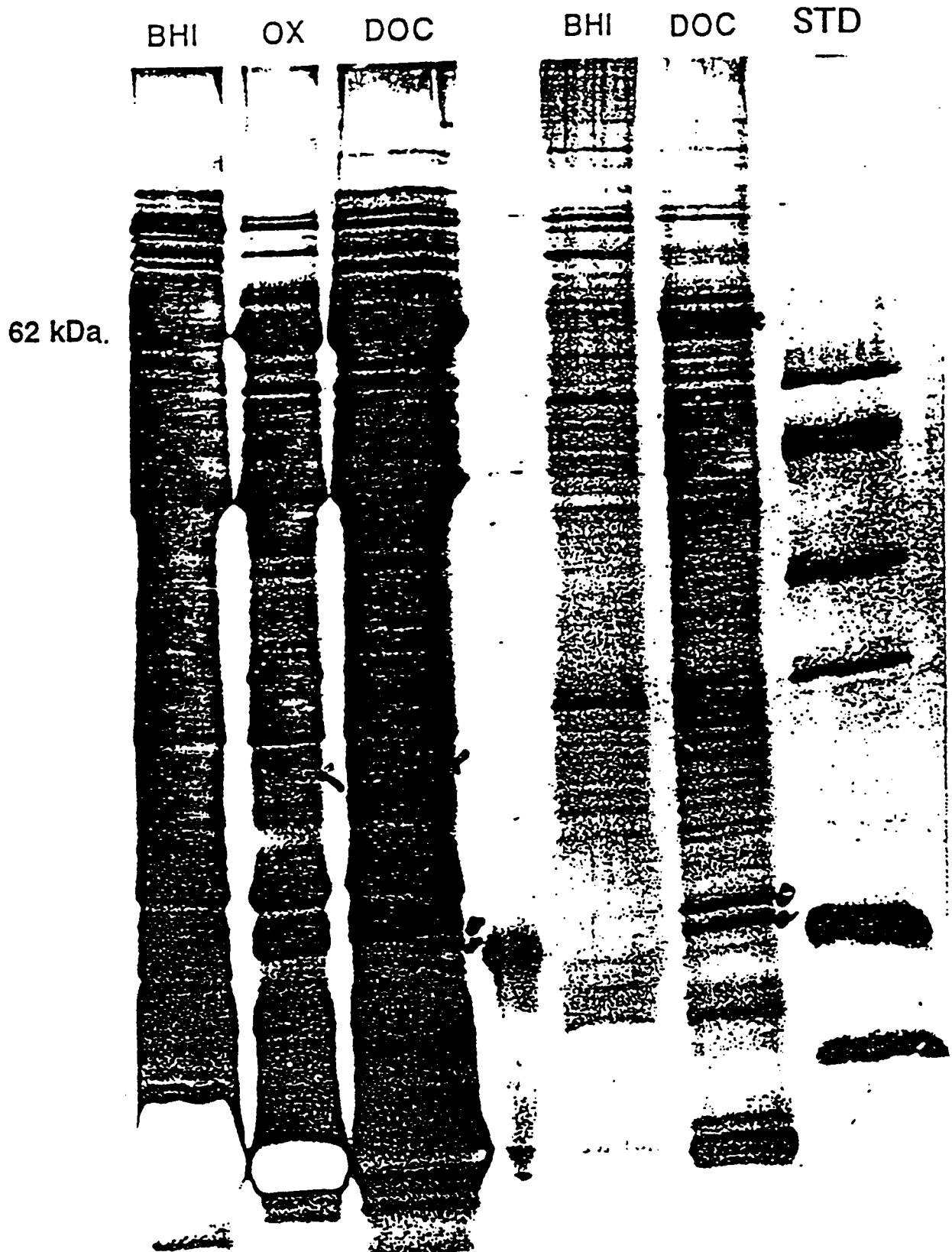


FIGURE 3

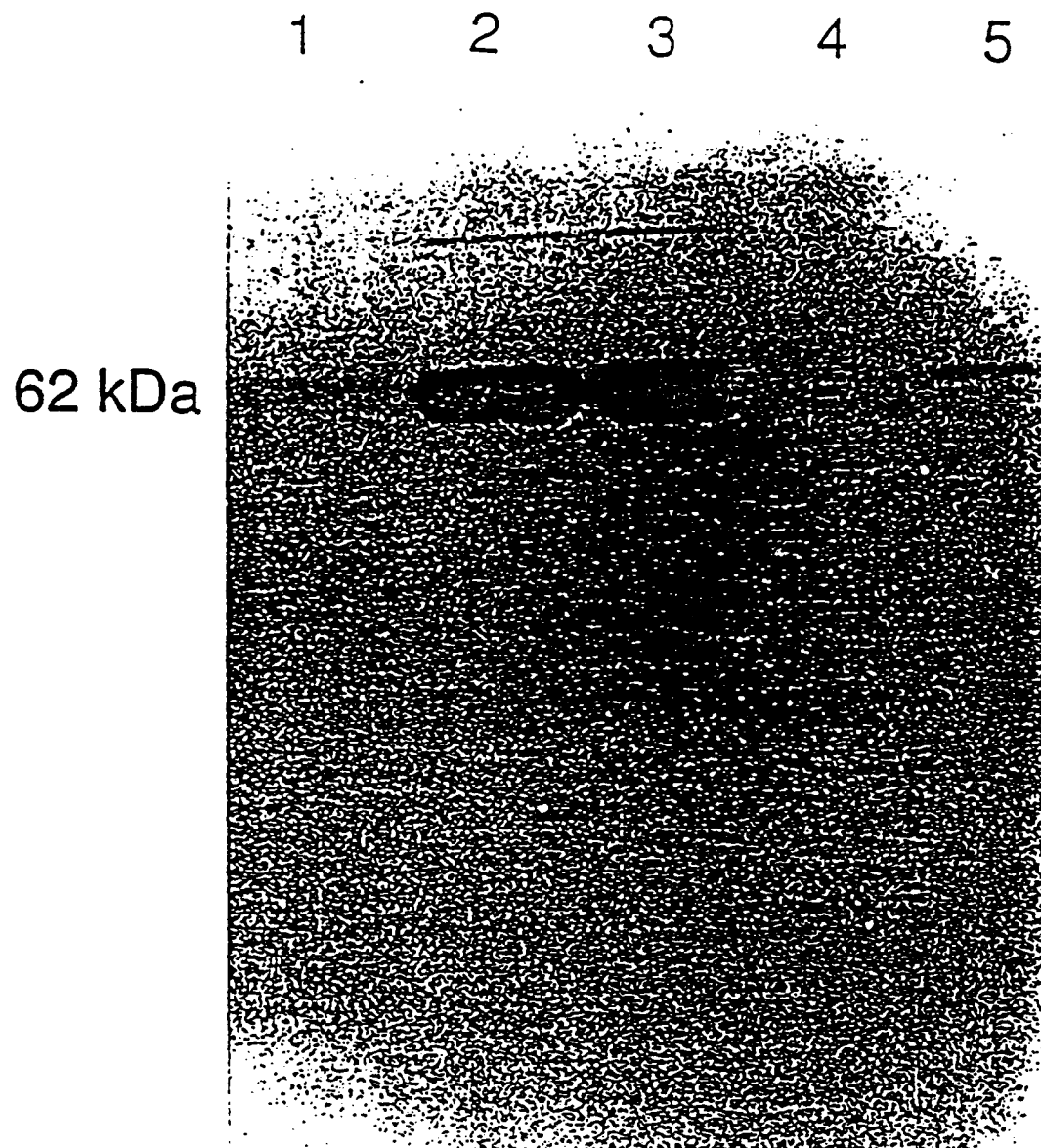


FIGURE 4

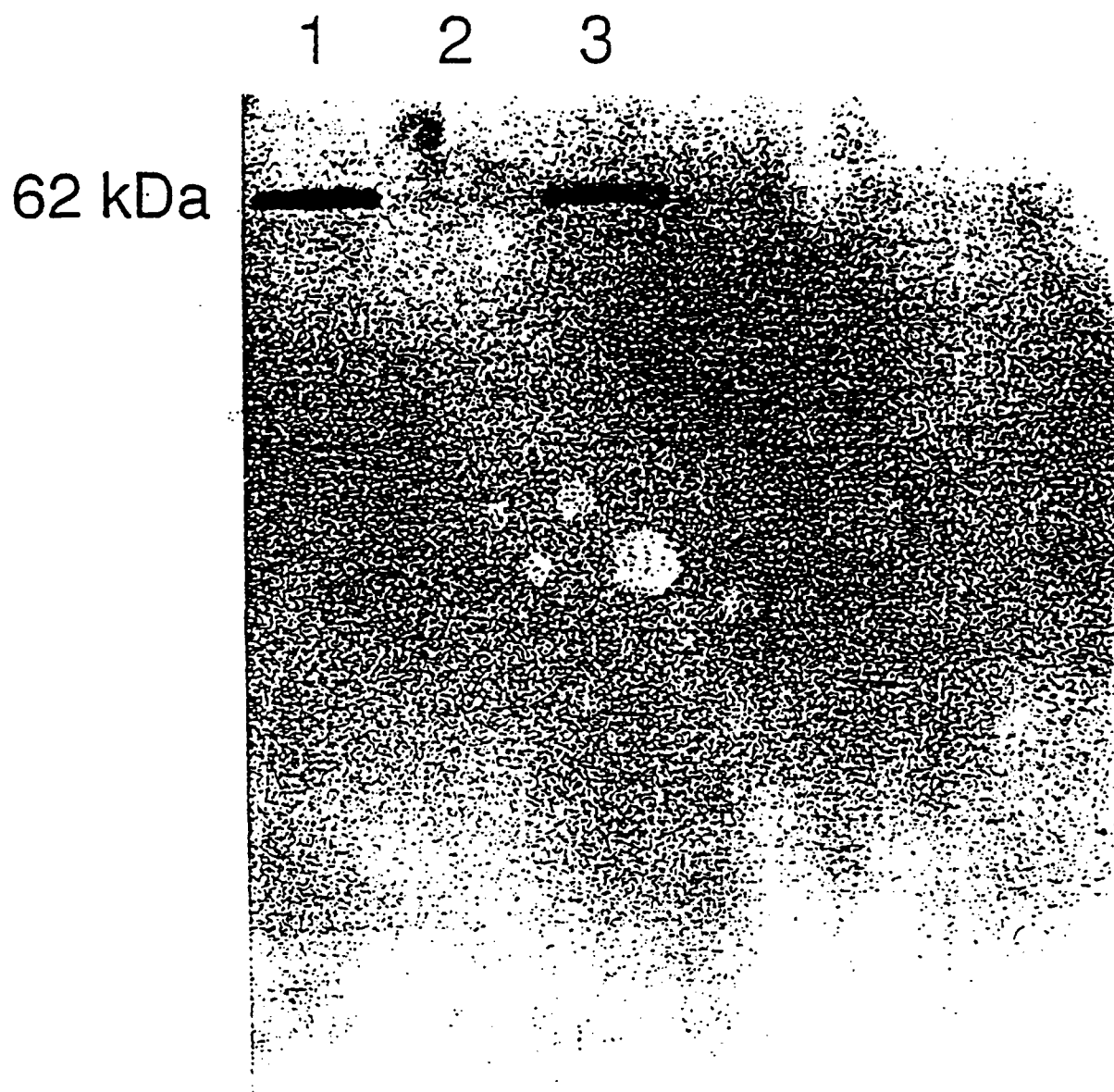


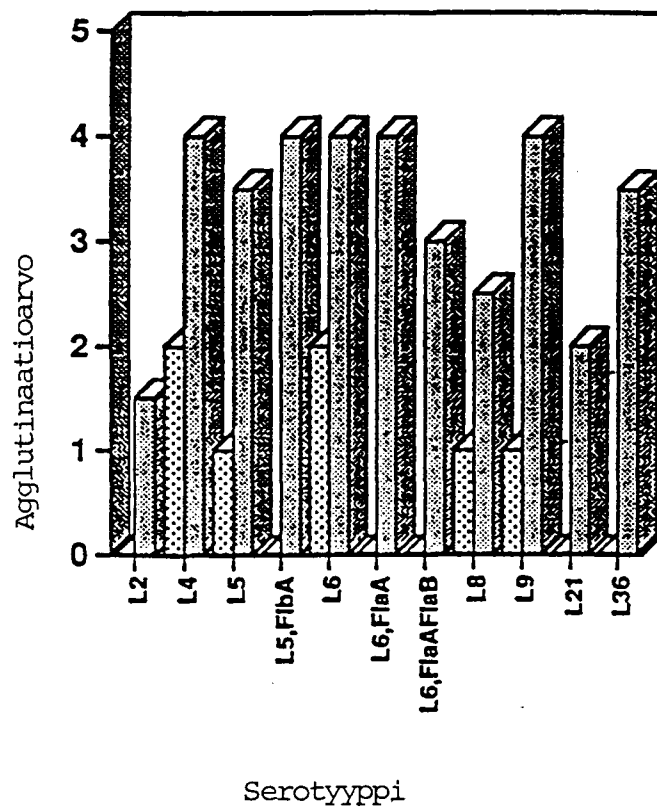
FIGURE 5



1

2

FIGURE 6



-  BHI:ssä viljeltyä C.jejuni 81-176:tta vastaan suunnattu vasta-aine
 DOC:ssa viljeltyä C.jejuni 81-176:tta vastaan suunnattu vasta-aine

Oraalinen rokotus - Nasaalinen patogeenisäätely

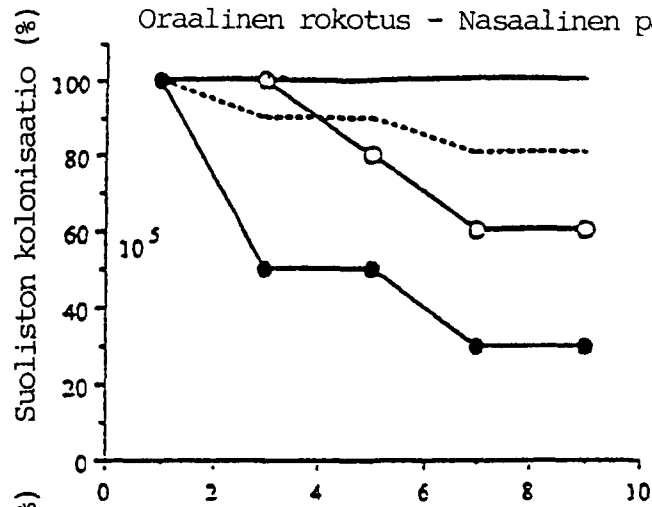


FIGURE 7A

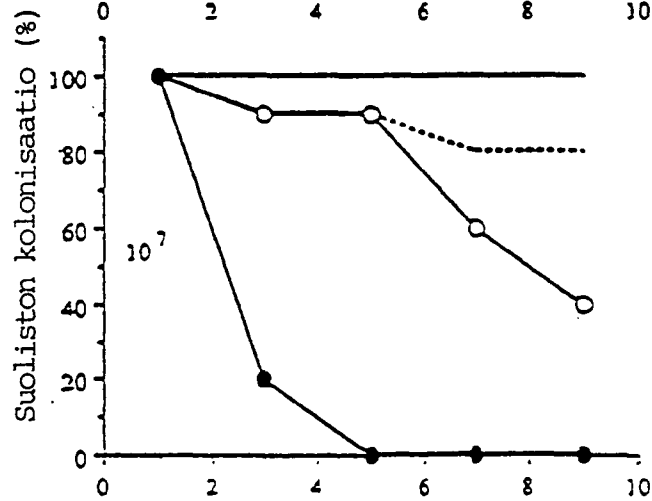


FIGURE 7B

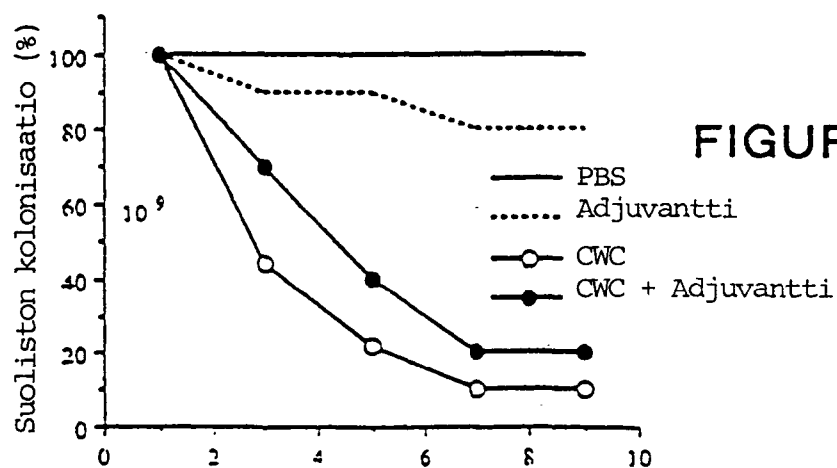


FIGURE 7C

Päivää patogeenisäätelyn jälkeen

Oraalinen rokotus - Oraalinen patogeenisäätely

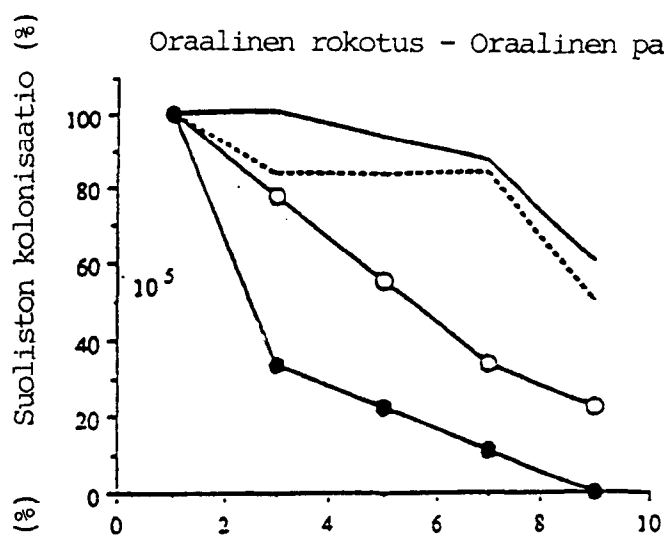


FIGURE 8A

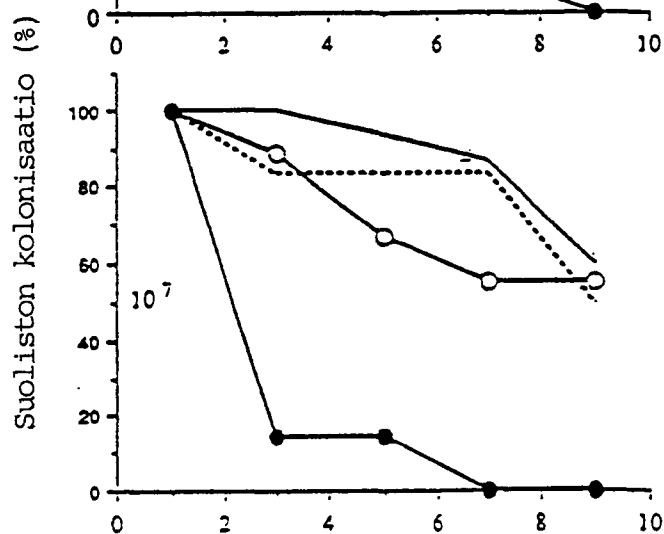


FIGURE 8B

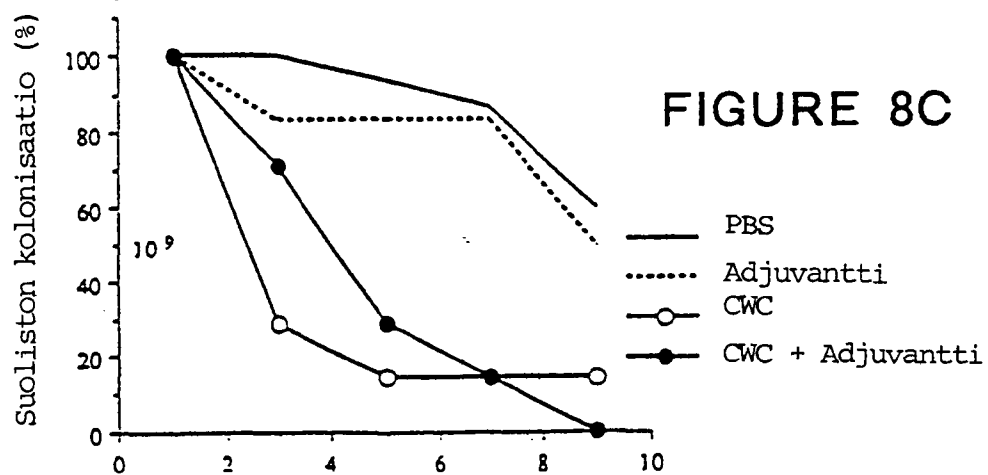


FIGURE 8C

FIGURE 9

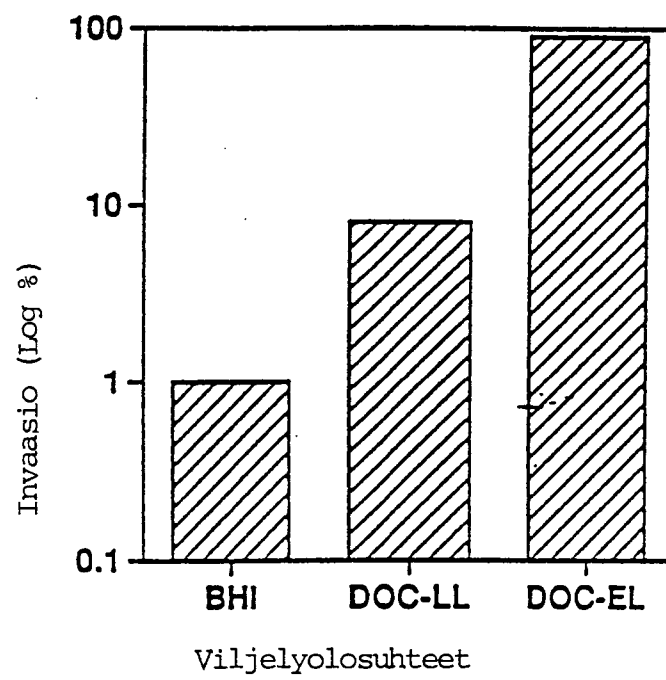


FIGURE 10

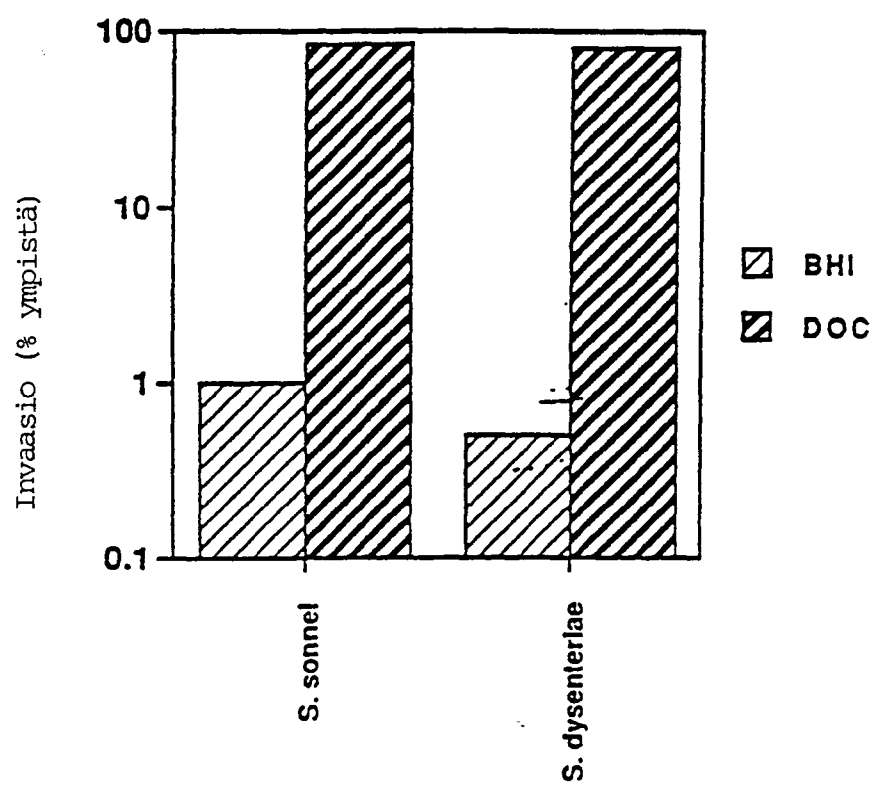


FIGURE 11

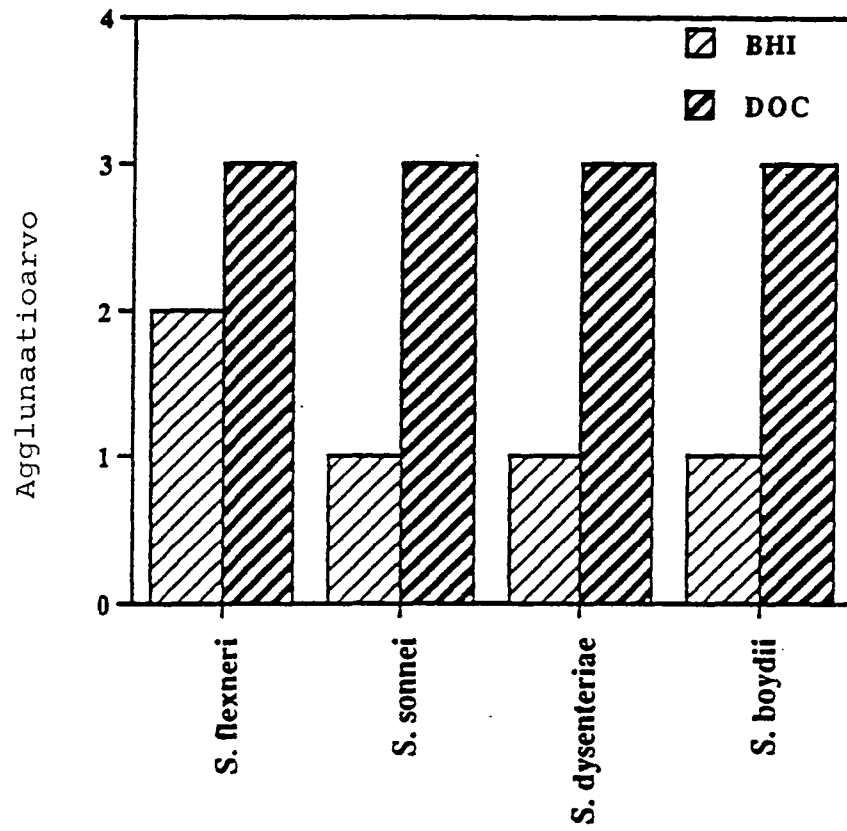


FIGURE 12

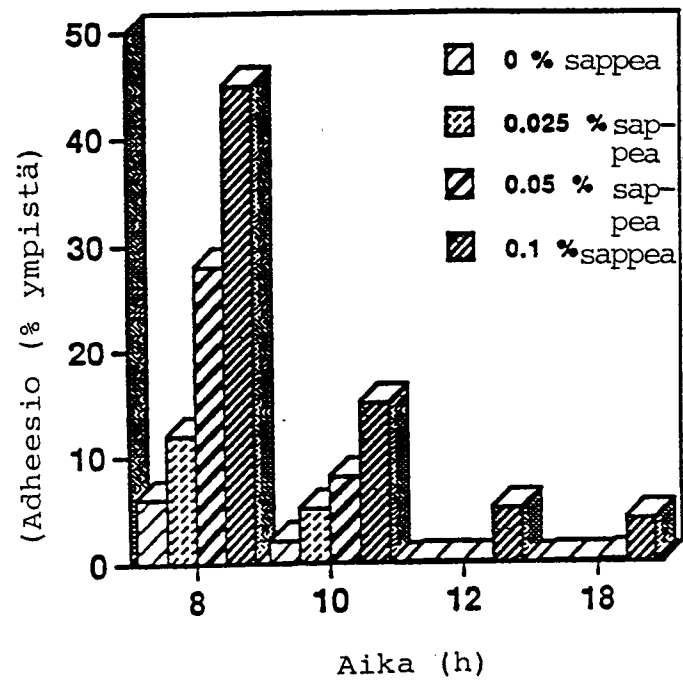


FIGURE 13

