РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(19) BG (11) 61935 B1

ОПИСАНИЕ КЪМ ПАТЕНТ
ЗА
ИЗОБРЕТЕНИЕ

6(51) A 61 K 39/02
A 61 K 35/14
C 07 K 1/00
C 07 K 2/00
C 07 K 4/04
C 07 K 14/205
C 07 K 16/12

(21) Регистров № 98294
(22) Заявено на 13.12.93
(24) Начало на действие на патента от: 09.04.93

Приоритетни данни

(31) 868286 (32) 13.04.92 (33) US

(41) Публикувана заявка в бюлетин № 2 на 28.02.95
(45) Отпечатано на 29.01.99
(46) Публикувано в бюлетин № 10 на 30.10.98
(56) Информационни източници:

(62) Разделена заявка от рег. №

(73) Патентопритежател(и):
ORA VAX, INC., VAX, OH (US)

(72) Изобретател(и):
Steven James Czinn
John Gilbert Nedrud, Cleveland, OH (US)

(74) Представител по индустриална собственост:
Фани Владимирова Божинова, 1000 София, п.к. 728

(86) № и дата на PCT заявка:
PCT/US93/03409, 09.04.93

(87) № и дата на PCT публикация:
WO93/20843, 28.10.93

(54) МЕТОД ЗА ОРАЛНО ЛЕЧЕНИЕ НА ИНФЕКЦИЯ, ПРИЧИНЕНА ОТ HELICOBACTER

(57) С метода се предизвиква защитен имунен отговор у бозайници срещу инфекция, причинена от Helicobacter, чрез орално приемане на имуногенно ефективно количество от Helicobacter антиген. Създаден е и състав на ваксина.

19 претенции, 2 фигури

BG 61935 B1

(54) МЕТОД ЗА ОРАЛНО ЛЕЧЕНИЕ НА ИНФЕКЦИЯ, ПРИЧИНЕНА ОТ HELICOBACTER

Област на техниката

Изобретението се отнася до лечение на стомашна инфекция у бозайници, включително и у хора. По-специално, изобретението се отнася до метод за лечение на инфекция, причинена от Helicobacter, у бозайници, включително и у хора, и до състав на ваксина и антитела, подходящи за използване при такова лечение.

Предшестващо състояние на техниката

Инфекцията на стомашния епител на човека, причинена от Helicobacter pylori (H.pylori), е главната причина за развитието на гастрит и язва и може да бъде рисков фактор за развитие на рак на стомаха (1 - 3).

Този нежен S-образен грам-отрицателен микроорганизъм е извлечен от стомашна тъкан на възрастни и деца с хистологична изява на гастрит или пептична язва. Доказателство за причинната връзка между H.pylori и гастродуоденалната болест се открива при изследване на хора доброволци, гнотобиотични прасета и гризачи, които не са носители на патогени, при които предположението на Кох се доказва чрез причиняване на хистологично потвърден гастрит, следващ поемането на живи микроорганизми (4 - 11). Въпреки че е трудна за лечение, когато се постигне радикално излекуване, лежащият в основата й гастрит се разсейва и при пациенти с дуоденална язвена болест процентът на рецидивиране на язвата спада драстично (12).

Въпреки чувствителността на инфекцията към много антимикробни агенти ин витро, ин виво дълготрайно пълно излекуване на установената H.pylori инфекция трудно може да се постигне посредством антимикробни средства (18). Микроорганизмът се открива вътре в мукозната обвивка, покриваща стомашния епител. Това местоположение не позволява да се постигне адекватно антимикробно ниво, когато антимикробните средства се дават орално. Понастоящем повечето авторитети препоръчват "тройна терапия", а именно бисмутова сол в комбинация с тетрациклин и метронидазол в продължение на 2 - 4 седмици. Все пак, ефективността на този или друг хемотерапевтичен режим остава под оптималната.

В момента се знае малко за ролята на мукозната имунна система на стомаха. Разположението на Ig продуциращите клетки в нормална стомашна кухина (антрум) показва, че IgA плазмените клетки обхващат повече от 80 % от цялата популация плазмени клетки. В допълнение, броят на плазмените IgA клетки, намиращи се в стомашната кухина, е сравним с други мукозни мембрани (25, 26). Въпреки че известен брой изследвания разглеждат нивата на имуноглобулина в различни ендокринни течности, няма достъпни данни относно концентрацията на имуноглобулини в стомашните секрети. Нещо повече, съществуват само ограничени данни, от които се предполага, че пациенти, инфектирани с H.pylori, развиват специфични IgG и/или IgA антитела във взета от стомаха течност (32). Така, след като веднъж е установена инфекцията, нито антителата, нито антибиотиците са много ефикасни за изкореняването й.

Czinn и сътр. показват, че повторно орално имунизиране с антигени на H.pylori и холерен токсин предизвиква индуциране на силен стомашно-чревен IgA анти-H.pylori отговор у мишки и малки порове. Но тъй като те са резистентни към инфекция от H.pylori и понеже до сега не съществува модел за оценка на защитата при малки животни, не е известно дали така образуваните антитела действат защитно.

Lee и сътр. съобщават за способността да се инфектират гризачи, които не са носители на патогени, с H.felis и възпроизводимо документират хистологичен гастрит (9, 10). Все пак, не се съобщава за оценка на защитната реакция.

Следователно, остава необходимостта от ефикасно лечение на стомашна инфекция, причинена от H.pylori, по-специално у хора. Настоящото изобретение се стреми да разреши тези проблеми.

Техническа същност на изобретението

Кратко описание на изобретението

Изненадващо бе открито, че орална имунизация на гостоприемник с антиген на Helicobacter предизвиква образуването на антитела,

които действат защитно срещу остра инфекция, причинена от род микроорганизми Helicobacter. Образуването на такива защитни антитела не може да бъде предсказано въз основа на досегашното ниво на техниката, тъй като преди настоящото изобретение не съществува модел, подходящ за оценка на защитата.

Съгласно един аспект на изобретението създаден е метод за предизвикване у гостоприемника-бозайник на защитен имунен отговор срещу инфекция, причинена от Helicobacter, който обхваща орално прилагане върху гостоприемника на имуногенно ефективно количество антиген на Helicobacter, за да се предизвика защитен имунен отговор.

Съгласно друг аспект на настоящото изобретение създаден е състав за ваксина, съдържащ антиген на Helicobacter в количество, ефективно да предизвика защитен отговор у човека, заедно с фармацевтичноприемлив носител.

Съгласно друг аспект на изобретението се осигурява метод за създаване у гостоприемника-бозайник на пасивна защита спрямо инфекция, причинена от Helicobacter, състоящ се в орално прилагане върху гостоприемника на имунологично ефективно количество IgA антитяло - специфично за Helicobacter, което му придава желаната пасивна защита.

Съгласно още един аспект на настоящото изобретение е създадено IgA или IgG моноклонално антитяло от мишки, специфично за H.felis.

Съгласно друг аспект на изобретението е създадена клетъчна линия N71-G_5-A_8 (депозирана в ATCC на 23.12.1993, под № H-B-11514).

Описание на приложените фигури

Изобретението се пояснява по-нататък в съответствие с приложените фигури, от които:

Фигура 1 представлява бар-графика на титрите на антитела в различни серуми и секреции от несъдържащи патогени мишки, след орално имунизиране с лизат от H.felis, заедно с холерен токсин;

фигура 2A и 2B са бар-графики на процента мишки, инфектирани с H.felis след активна имунизация (фиг. 2A)и пасивна имунизация (фиг. 2B), сравнени с контролите.

Подробно описание на изобретението

Настоящото изобретение показва, че оралната имунизация на мишки, като се използва H.felis-антиген, предизвиква защитен имунен отговор, при което в стомашните секрети присъстват антигенспецифични защитни антитела. Ефектът на защитния имунен отговор се състои в това, че имунизираните животни не се инфектират, когато се заразят с патоген, за разлика от неимунизираните животни.

Без връзка с определена теория съгласно изобретението се счита, че оралната имунизация с антиген на H.felis стимулира общата мукозна имунна система и може би локални центрове в стомашната лигавица, което има за резултат появата на стомашни секрети, които предотвратяват инфекцията, причинена от H.felis. Тъй като H.felis и H.pylori са подобни видове от един и същ род (Helicobacter), основателно е да се заключи, че имунизация например на свинче, което не е носител на патогени, с антиген на H.pylori плюс мукозна добавка, като холерен токсин, ще бъде ефективна за предотвратяване на инфекция на стомаха, причинена от H.pylori. Тъй като е рутинна практика да се провеждат предклинични опити за кандидат-ваксини, предназначени за използване при хора, на животински модели, счита се, че методологията съгласно настоящото изобретение е ефикасна при хора, специално за лечение на инфекция, причинена от H.pylori у човека.

Съгласно настоящото изобретение е установено, че моделът с мишки, които не са носители на H.felis, може да се използва за оценка на концентрацията на защитни антитела след имунизация с антиген на H.felis. Фиг. 1 се отнася до резултатите, получени при експерименти с модела с мишки, което не са носители на H.felis. Орално имунизиране на модела с бактериални антигени заедно с холерен токсин има за резултат повишени серумни, стомашни и чревни титри на антителата за H.felis и защита срещу остра инфекция на стомаха от патогени от H.felis. При експерименталните групи мишки от порода Swiss-Webster, които не носят патогени (Taconic), се имунизират орално 4 или 5 пъти за период от един месец с по 2 - 4 mg лизат от H.felis, обработен с ултразвук, плюс 10 μg холерен токсин. След това мишките се заразяват орално с по приблизи-

телно 10^6 живи бактерии H.felis. Мишките се убиват и се събират чревните и стомашни секрети, както е описано в следващите работни примери. Титрите на анти-H.felis антителата се определят посредством ELISA. Черните плътни колонки във фиг. 1 представляват средните титри (±S.D.) от имунизираните мишки, а незапълнените колонки показват средните титри (±S.D) от контролните неимунизирани мишки. Резултатите, представени графично на фиг. 1, са сумирани в таблица 1 по-долу.

Таблица 1.

Титър на антителата (LOG_2)

	Серум		Стомашен		Черва	
	IgA	IgG	IgA	IgG	IgA	IgG
Контроли	3,1	3	0	0	1,6	1,1
Имунизирани	11,8	16,8	2,1	4,25	4,5	4,4

	H.felis инфекция		Защита
	H.felis (+)	H.felis (-)	
Контроли n = 18	14	4	23 %
Имунизирани n = 17	4	13	78 %

От горните резултати може да се види, че при имунизираните мишки се наблюдава значително по-висок титър на антитела, отколкото при контролните животни.

Фигури 2A и 2B показват резултатите от изследването за доказване на защита срещу инфекция с H.felis чрез провеждане на експерименти с активна и пасивна имунизация. При експериментите с активна имунизация след убиване на мишките, заразени с H.felis както е описано по-горе във връзка с фиг. 1, се извършват стомашни биопсии и пробите се събират. Препаратите от биопсията се изследват за наличие на H.felis чрез бърз уреазен тест и/или културална позитивност, описана в следващите работни примери. Фиг. 2A показва резултатите от обединените данни от три опита (n = 18 имунизирани животни и 18 контролни животни). Черните (плътни) колонки представляват заразените имунизирани мишки, а защрихованите колонки - контролните неимунизирани мишки.

Вижда се, че от всичките 17 имунизирани животни само 4 са инфектирани, в сравнение с 14 от 18-те контролни животни. С други думи 78 % от имунизираните животни са защитени от инфекцията с H.felis, в сравнение с 23 % при неимунизираните животни.

Фактът, че защитата е пряк резултат от IgA антитела се установява чрез пасивна имунизация на мишки, които не носят патогени, с IgA моноклонални антитела, специфични за H.felis, и сравнение на получената в резултат защита с тази, показана при мишки, на които не са давани антитела или са им давани неподходящи такива (напр. специфични за вируса на Sendai IgA моноклонални антитела). Резултатите са представени на фиг. 2B.

IgA моноклонални антитела, реактивни с H.felis, се изолират и субклонират съгласно имунизационния протокол, подобно на описания във фиг. 1. Асцити, съдържащи IgA моноклонални антитела, специфични спрямо H.felis, получени от клетъчната линия N71-G_5A_8, приготвена както е описано в работните примери, или специфични спрямо IgA моноклонални антитела на Sendai вирус или физиологичен разтвор се дават орално на мишки, които не са носители на патогени в момента на инфектиране с H.felis и 4, 8 и 24 h по-късно. Седем дни след инфекцията мишките се убиват и стомашните препарати, получени чрез биопсия, се изследват за H.felis (n = 7 мишки получават моноклонални антитела, спе-

цифични към H.felis, и 13 мишки не получават антитела или получават специфични към Sendai вирус моноклонални антитела). Черните плътни колонки представят мишките, които са получили моноклонални антитела, специфични към H.felis, а защрихованите колонки представят мишките, които са получили или специфични към Sendai вирус моноклонални антитела или физиологичен разтвор (несъдържащ антитела).

Тези резултати показват, че IgA сами защитават срещу инфекция с H.felis на стомашната лигавица.

Наблюдава се също, че орално приемане на H.felis антиген има за резултат значително увеличена концентрация на анти-H.felis IgA антитела, както и на IgA антитела. Има много възможни обяснения на този феномен. Първо, наблюдавано е, че холерният токсин може, в някои случаи, да засили и двата антигенспецифични IgA и IgG отговори (22). Второ, изследвания на клетъчния път показват, че IgG лимфоцитите на мезентералния сплит са компоненти на мукозната имунна система и могат да пораждат мукозните IgG плазмени клетки, които са наблюдавани в стомашната лигавица. Трето, поне част от наблюдавания стомашен IgG може да бъде резултат от просмукване на серумни антитела в стомашната кухина като вторично омекотява, намалява възпалението, наблюдавано както в контролните, така и у имунизираните животни.

Горното обсъждане разглежда употребата на антиген на H.felis за лечение на инфекция от H.felis. Разбира се, че настоящото изобретение не се ограничава до лечение на инфекция от H.felis.

Така в обхвата на изобретението се включва лечение или профилактика на бозайници, включително хора, на инфекция, причинена от H.pylori, при което пациентът се имунизира орално с имунологично ефективно количество от антиген на H.pylori с оглед да се предизвика образуването на защитни антитела срещу патогена H.pylori. За предпочитане е H.pylori да се дава заедно с мукозна добавка, например холерен токсин.

Нещо повече, в обхвата на настоящото изобретение се включва пасивната имунизация на бозайници, включително хора, срещу инфекция, причинена от H.pylori. Това се постига чрез орално приложение към пациента на ефективно количество от специфични към H.pylori антитела. За предпочитане, на пациента се дават орално IgA моноклонални антитела, специфични за H.pylori.

Ваксината съгласно изобретението се прилага орално, в количество, което лесно може да бъде определено от специалистите, работещи в тази област. Така за възрастни подходящата доза е от порядъка на 10 μg до 10 mg, например от 50 μg до 5 mg. Подобен обхват на дозите е приложим за деца.

Както е отбелязано по-горе, подходящата мукозна добавка е холерният токсин. Други, които могат да се използват, са нетоксичните производни на холерния токсин, включително неговите B - субединици и/или конюгати от антиген плюс холерен токсин или неговата B - субединица, микрокапсули или имуностимулиращи комплекси (ISCOM's) или липозомни или атенюирани живи вектори като вируси или салмонелни бактерии. Количеството на използваната мукозна добавка зависи от типа на използваната мукозна добавка. Например, когато мукозната добавка е холерният токсин, подходящо е той да се използва в количество от 5 до 50 μg, например от 10 до 35 μg. Когато се използва във вид на микрокапсули, използваното количество зависи от количеството употребено в матрикса на микрокапсулата, за да се достигне желаната дозировка. Това зависи от умението на специалиста от тази област.

Подходящи носители и разредители са ентерокапсули с покритие и/или 0,2 N $NaHCO_3$, и/или физиологичен разтвор.

Примери за изпълнение на изобретението

Изобретението се илюстрира по-нататък чрез следващите неограничаващи примери.

а) Мишки. Мишките, използвани в експериментите, са порода Swiss Webster (на възраст 8 седмици) и са доставени от Taconic (Germantown, N. Y.). Животните, които не са носители на патогенни микроорганизми, се поставят в микроизолаторни клетки при условия на стерилност и им се оставя свободен достъп до автоклавирана лабораторна храна и вода. С изключение на случайно изолирани дифтероиди, животните се поддържат в състояние на отсъствие на патогени по време на имунизационния протокол.

б) Бактериални щамове. Бактерии, по-

лучени от образци от стомашна биопсия на котка, се идентифицират като H.felis въз основа на морфологията им, оцветяване по Gram и продуцирането на уреаза, каталаза и оксидаза (9). Организмите се съхраняват в 50 %-ен буфериран с фосфат физиологичен разтвор (PBS). 25 % глицерол; 25 % загрят серум от телешки зародиш при -70°C. Бактериите, използвани в следващите примери, се препосяват ин витро два до три пъти след изолирането им.

в) Бактериални антигени. Използваният щам се инокулира в Columbia агар (Difco, Detroit, MI), съдържащ 7 % конска кръв, и се инкубира микроаерофилно при 37°C в продължение на 5 - 7 дни. Организмите се събират в PBS и получената в резултат суспензия се разрушава с ултразвук, за да се лизират бактериите при 40°C, избистря се от клетъчни отломки чрез нискоскоростно центрофугиране и се филтрира стерилно. Тези хомогенати от разрушени цели клетки се съхраняват като 100 ml аликвотни части при -70°C, докато потрябват за орално имунизиране на животните.

г) Външни мембрани. Външни мембрани се приготвят както е описано (19). Накратко, бактериални суспензии се обработват с по 1 mg рибонуклеаза и дезоксирибонуклеаза (Sigma Chemical, St. Louis) в 0,5 M Трис-EDTA буфер (pH 7,8) при 4°C непосредствено преди разрушаването с ултразвук и нискоскоростното центрофугиране както по-горе. Бактериалните обвивки след това се отделят от избистрения лизат чрез ултрацентрофугиране при 150 000 x g в продължение на 1 h. Външните мембрани се отделят от клетъчните обвивки чрез диференциално разтваряне в натриев n-лаурилсаркозин и се събират посредством ултрацентрофугиране. Получените в резултат пелети се суспендират в 0,05 M фосфатен буфер (pH 7,0), разделят се на аликвотни части и се съхраняват при -70°C. Концентрацията на белтък се определя по метода на Lowry за използване в ELISA (20).

Пример 1. Мишки се анестезират леко чрез i. p. инжектиране на 1,0 mg кетамин преди вътрешностомашна имунизация. След това препаратът от разрушени с ултразвук цели клетки плюс 10 μg холерен токсин (List Biologicalsq Campbell, CA) се суспендира в 0,2 M $NaHCO_3$ и 0,5 ml от него се вкарват в стомаха на мишката чрез интубация през полиетиленова тръбичка, прикрепена към хиподермална спринцовка. Тази процедура се означава като орална имунизация.

За да се изпита възможността за развитие на функционален имунитет се оценяват три протокола за имунизация. Протокол 1 се състои от 4 орални имунизации за 1 месец, съдържащи 2 mg лизат от H.felis плюс холерен токсин (известна мукозна добавка). Протокол 2 увеличава H.felis до 4 mg за имунизация, плюс холерен токсин и протокол 3 се състои от 5 орални имунизации за 6 седмици, като всяка съдържа по 4 mg лизат от H.felis, плюс холерен токсин. Ако не е отбелязано друго, животните се заразяват 7 - 10 дни след последната имунизация и се убиват 3 - 7 дни по-късно.

Събират се следните тъканни течности: серум, стомашен секрет, секрет от тънките черва. Тези проби след това се титруват за присъствие на анти-H.pylori антитела, чрез ензимсвързващ имуносорбентен анализ (ELISA). В допълнение, вземат се и препарати от стомашна биопсия за бърз уреазен тест и култивиране. Инфекцията се дефинира като положителна, ако културата или уреазният тест (вж. по-долу) са положителни. Серум се получава от кръв от опашната вена, като кръвта се оставя да се съсири при стайна температура. Стомашните и чревни секрети се събират по модификация на процедурата на Elson и сътр. (21, 22). Накратко, стомашният и чревният секрет от мишките се събират отделно. Стомасите и червата се отстраняват и се инжектират с 2,0 ml промивна течност на база полиетиленгликол плюс антипротеазен разтвор. Стомашната промивна течност съдържа трисбуфер, за да се неутрализира стомашната киселинност.

ELISA се извършва както следва. Проби от мишки се анализират за антитела на H.felis както следва. Полистиренови микротитърни плаки с 96 ямки се покриват с 100 μl/ямка с подходящ протеин на външната мембрана (20 mg/ml) в продължение на една нощ при 4°C. Неспецифичните места на свързване се блокират с 1 % BSA в PBS в продължение на 90 min при стайна температура и след това плаките се промиват с 0,1 % BSA в PBS. Пробите се тестуват двукратно при разреждане от нула до 1:512 000 и по 100 μl от всяко разреждане се прибавя във всяка ямка от покритите с антитела плаки. След последващо инкуби-

ране при стайна температура, в продължение на 90 min плаките се промиват три пъти с 0,1 % BSA в PBS и към всяка ямка се прибавят по 100 µl от 1:1000 разреден кози анти-миши IgA или IgG алкалнофосфатазен конюгат (Zymed, San Francisco, CA) в продължение на 90 min. След промиване плаките се проявяват 1 h със 100 µl/ямка разтвор с концентрация 1 mg/ml p-нитрофенилфосфат в глицинов буфер (pH 9,6). Измерва се абсорбцията при 410 nm във всяка ямка, като се използва апарат Dynatech MR 700 Microtiter Plate Reader. Титърът на антителата се дефинира като реципрочен на найголямото разреждане, даващо оптична плътност над 0,05, сравнен с резултатите от ямки, съдържащи антиген, инкубирани с конюгат от антиген, но несъдържащи първичната проба от антитяло (10).

Бързият уреазен тест се извършва както следва. Две проби от стомашна биопсия по 10 mg мокро тегло от всяка мишка се поставят незабавно в 0,2 ml хранителна среда на Stuart за уреазен тест (28) и се инкубират при стайна температура. Наличието на уреаза се определя по промяната на цвета на хранителната среда от жълто до розово след 4 h (24).

Културите се получават както следва. Препрати от биопсия на стомашната кухина се хомогенизират и се поставят на плаки с агар Columbia, съдържащ 0,5 % овча кръв и се инкубират при 37°C при микроаерофилни условия (уред за генериране на газ от Oxoid Ltd., London, UK). Културата се определя като позитивна, ако е видим растежът след 5 дни. Всички изолати се идентифицират като H.felis на база морфология, оцветяване на Gram и продуциране на уреаза, каталаза и оксидаза.

Въпреки малките промени в експерименталната постановка между трите групи, в имунния отговор не се забелязват отчетливи разлики. Така, данните се обобщават и геометричните средни стойности на стомашните промивни течности, промивните разтвори от червата и титрите на серумните антитела от 13 контролни и 12 имунизирани изследвани животни са дадени на таблица 1 и фиг. 1, разгледани по-горе.

Въпреки, че тези животни са и имунизирани, и заразени, титрите на антителата не се различават значително от тези на мишките, които са имунизирани и не са заразени. При тези експерименти титрите на стомашните, чревните и серумните IgA и IgG антитела са значително по-високи от наблюдаваните у неимунизираните контролни животни. Специфично, има 4-кратно увеличение при стомашния IgA ($p = 0,001$), 8-кратно увеличение при чревния IgA ($p = 0,0038$) и 350-кратно увеличение при серумния IgA ($p = 0,0001$) в сравнение с неимунизираните контролни животни. Подобно, наблюдава се значително повишение на стомашния IgG ($p = 0,0009$), чревния IgG ($p = 0,0001$) и серумния IgG ($p = 0,0001$).

За да се оцени защитата от инфекция, причинена от H.felis, вземат се препарати от стомашна биопсия от всички животни при убиването им и се определят чрез едновременно култивиране и бърз уреазен тест, както е описано по-горе. В добавка, за да се определи дали контролните животни развиват хронична инфекция и дали имунизираните животни са определено H.felis - отрицателни, се заразяват допълнителен брой имунизирани и контролни животни както по-горе, но не се убиват в продължение на 4 седмици след заразяването. Степента на защита между всички имунизирани групи животни не е забележимо различна.

За да не се изключи възможна инфекция от ниска концентрация, оценката на пробите от стомашната биопсия както за положителен, така и за отрицателен растеж на H.felis не се прави до 5 дни след нанасянето на плаките. От серийните разреждания върху плаките на известен брой (чрез изброяване с хемацитометър) култури от H.felis се наблюдава, че чувствителността на тази крайна точка е приблизително 10 организма. В по-късни експерименти плаките с културите от биопсията се пазят понякога и повече от 5 дни и когато плаките, които остават отрицателни за видим растеж, се изстъргват и изследват като свеж препарат под микроскоп, понякога могат да се видят изолирани организми със спирална форма. Идентичността на тези изолирани организми не може да се определи и не е определяно дали те са живи. Във всеки случай, на база резултатите от култивирането на серийните разреждания на H.felis се счита, че пробите от биопсиите, които остават отрицателни за видим растеж след 5 дни, съдържат 10 или помалко бактерии.

Пример 2. IgA и IgG моноклонални антитела, специфични за H.felis, се приготвят чрез модификация на метода на Mazanec и сътр.

(15). BALB/c мишки, получени от Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine), се имунизират интрагастрално четири пъти, в течение на период от 6 седмици, първият път с 2 mg разрушени с ултразвук цели клетки H.felis плюс 10 μg холерен токсин (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). За последната имунизация холерният токсин не се поставя и мишките получават също венозно впръскване на 2 mg протеин от H.felis. Три дни по-късно мишките се убиват и техните далачни клетки се хибридизират с SP 2/O миеломни клетки. Клонове, получени чрез ограничено разреждане, се изследват за секреция на анти-H.felis IgA антитела чрез ензимносвързан имуносорбитен анализ (ELISA). Установено е, че получената в резултат клетъчна линия, идентифицирана като N71-G_5A_8 е стабилна, секретираща IgA хибридомна линия. След многократно субклониране стабилни IgA и IgG сектори се инжектират интраперитонеално на BALB/c мишки и асцитната течност се събира и избистря.

Клетъчната линия N71-G_5-A_8 е депозирана на 13 април, 1992 и се поддържа в живо състояние в лабораторията на Steven J. Czinn, M. D., Rainbow Babies and Children's Hospital, Room 465, Case Western University, 2074 Abington Road, Cleveland, Ohio, USA 44106. Достъпът до депозита е възможен за лица, определени от Комисията по патентите и търговските марки на САЩ, докато трае разглеждането на настоящата заявка и всички ограничения за достъп на обществеността до депозита отпадат безвъзвратно след издаването на патент по настоящото искане.

Клетъчната линия N71-G_5-A_8 е депозирана в American Type Culture Collection, намираща се на 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USA, под идентификационен номер N71-G_5-A_8. ATCC входящият номер и дата са съответно HB 11514 от 23.12.1993.

Пример 3. Извършени са изследвания за пасивна имунизация както следва. Асцити, съдържащи IgA моноклонални антитела, продуцирани от N71-G_5-A_8 (200 μl), се дават интрагастрално едновременно с 10^6 живи организми. Предварителни изследвания показват, че стомашните IgA титри на животните, които получават единична 200 μl доза от моноклонални IgA антитела клонят към нива, пониски от тези, наблюдавани в активно имунизираните животни на 8 h. Следователно, в течение на следващите 24 h се дават три допълнителни дози от MAb. Контролните животни се заразяват идентично, но получават или физиологичен разтвор, или специфични към вируса на Sendai IgA моноклонални антитела (неподходящи IgA антитела). Една седмица по-късно мишките се убиват, стомашната тъкан се инокулира в Columbia кръвно-агарни плочки и се инкубира 5 дни при 37°C. Инфекцията се определя като позитивна култура или позитивен бърз уреазен тест на Stuart.

За да се изследва дали IgA антителата, отличителният белег на мукозната имунна система, биха могли сами по себе си да защитават срещу инфекция от H.felis на стомашната лигавица, се получават H.felis IgA моноклонални ентитела, както е описано по-горе. Част от тези антитела (N71-G_5-A_8) се прилагат орално, пасивно към несъдържащи патогени мишки по време на и след заразяването с H.felis. Контролните животни получават или физиологичен разтвор, или специфични към Sendai вируса IgA моноклонални антитела, специфични за гликопротеина на хемаглутинин-невраминидаза на Sendai вируса (16).

Резултатите са представени на таблица 2.

Таблица 2.

Оценка на пасивно прилагане на антитела от несъдържащи патогени мишки преди и след заразяване с H.felis

Приложени антитела	Брой мишки	Процент инфектирани
Никакви антитела-контроли	7	57 %
Неподходящи IgA моноклонални	6	87 %
IgA-анти-H.felis моноклонални	7	14 %

Специфични към H.felis или Sendai вирус IgA моноклонални антитела се дават интрагастрално 4 пъти в течение на 24 h, конкурентно, с атака с 10^6 живи H.felis. Стомашни биопсии се правят 1 седмица след заразяването и инфекцията се доказва чрез култура и/или бърз уреазен тест.

От 13-те контролни животни, неполучили антитела към Sendai вирус, 70 % се инфектират (фиг. 2B). От седемте експериментални животни шест са защитени и само 1 (14 %) е инфектирано. По Chi Square анализа разликата е значителна ($p = 0,019$).

Сравнение на титрите на антителата между експерименталните групи се извършва чрез вариантен анализ и защитен Т-тест на Fisher. За защита, отсъствие или присъствие на експериментална инфекция между групите се оценява чрез Chi Square анализ.

Патентни претенции

1. Метод за предизвикване у бозайников гостоприемник на защитен имунен отговор спрямо инфекция, причинена от Helicobacter, характеризиращ се с това, че върху гостоприемника се прилага орално имуногенно ефективно количество антиген от Helicobacter.

2. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че антигенът от Helicobacter е антиген от H.pylori.

3. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че антигенът от Helicobacter е антиген от H.felis.

4. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че антигенът от Helicobacter се прилага заедно с мукозна добавка.

5. Метод съгласно претенция 4, характеризиращ се с това, че мукозната добавка е холерен токсин.

6. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че бозайникът гостоприемник е човек.

7. Състав на ваксина, подходяща за лечение на инфекция, причинена от Helicobacter, характеризиращ се с това, че съдържа имуногенно количество антиген от Helicobacter за предизвикване на защитен имунен отговор у бозайник - гостоприемник и фармацевтичноприемлив носител или разредител.

8. Състав на ваксина съгласно претенция 7, характеризиращ се с това, че съдържа и ефективно количество мукозна добавка.

9. Състав на ваксина съгласно претенция 8, характеризиращ се с това, че мукозната добавка е холерен токсин.

10. Ваксина съгласно претенция 7, характеризираща се с това, че Helicobacter антигенът е H.pylori антиген.

11. Ваксина съгласно претенция 7, характеризираща се с това, че Helicobacter антигенът е H.felis антиген.

12. Метод за придаване на бозайник - гостоприемник пасивна защита срещу инфекция, причинена от Helicobacter, характеризиращ се с това, че на гостоприемника се дава орално имунологично ефективно количество от Helicobacter специфични IgA антитела.

13. Метод съгласно претенция 12, характеризиращ се с това, че антителата са H.felis специфични IgA антитела от мишки.

14. Метод съгласно претенция 13, характеризиращ се с това, че антителата са H.felis специфични IgA моноклонални антитела от мишки, продуцирани от клетъчна линия N71-G_5-A_8.

15. Метод съгласно претенция 12, характеризиращ се с това, че бозайникът е човек.

16. H.felis специфични IgA моноклонални антитела от мишки.

17. H.felis специфични IgG моноклонални антитела от мишки.

18. Клетъчна линия N71-G_5-A_8, депозирана в ATCC под № HB 11514 от 23.12.1993.

19. Моноклонално антитяло, продуцирано от клетъчна линия N71-G_5-A_8.

Приложение: 2 фигури

Литература

1. Blaser, M.J. "Gastric Campylobacter-like organisms, gastritis and peptic ulcer disease" Gastroenterology 1987, 93, 371-183.

2. Graham, D.Y. "Camplyobacter pylori and peptic ulcer disease" Gastroenterology 1989, 96, 615-625.

3. Parsonnet, J., Vandersteen, D., Goates, J., Silbey, R.K., Pritkink, J. and Chang, Y. "Helicobacter pylori infection in intestinal and diffuse-type gastric adenocarcinomas" J. Natl. Cancer Inst. 1991, 93, 640-643.

4. Marshall B.J., Armstrong, J.A. and McGschie, D.B., "Attempt to fulfill Koch's postulate for pyloric Campylobacter" Med. J. Aust. 1985, 142, 436-439.

5. Morris, A. and Nicholson, H. "Ingestion of Campylobacter pyloridis causes gastritis and raised fasting gastric pH" Am. J. Gastroenterol. 1987, 82, 192-199.

6. Engstrand, L., Gustavsson, S., Jörgensen, A., Schwann, A., and Schaynius, A. "Inoculation of barrier-born pigs with Helicobacter pylori: a useful animal model for gastritis type B." Infect. Immun. 1990, 53, 1763-1768.

7. Fox, J.G., Cabot, E.B., Taylor, N.S. and Laraway, R. "Gastric colonization by campylobacter pylori subsp. mustelae in ferrets" Infect. Immun. 1988, 56, 2994-2996.

8. Fox, J.G., Pelayo, C., Taylor, N.S., Lee, A., Otto, G., Murphy, C. and Rose, R. "Helicobacter mustelae-associated gastritis in ferrets: an animal

model of Helicobacter pylori gastritis in humans" Gastroenterology 1990, 99, 352-361.

9. Lee, A., Fox, J.G., Otto, G. and Murphy J. "A small animal model of human Helicobacter pylori active chronic gastritis" Gastroenterology 1990, 99, 1315-1323.

10. Fox, J.G., Lee, A., Otto, G., Taylor, N.S. and Murphy J.C. "Helicobacter felis gastritis in gnotobiotic rats: an animal model of helicobacter pylori gastritis" Infect. Immun. 1991, 59, 785-791.

11. Eaton, K.A., Morgan, D.R. and Krakowka, S. "Campylobacter pylori virulence factors in Gnotobiotic piglets" Infect. Immun. 1989, 57, 1119-1125.

12. Peterson, W.L. "Helicobacter pylori and peptic ulcer disease" N. Engl. J. Med. 1991, 324, 1043-1048.

13. Rauws, E.A.J., Langenberg, W., Houthoff, H.J., Zenon, H.C. and Tytgat, G.N.C. "Campylobacter pyloridis-associated chronic antral gastritis. A prospective study of its prevalence and the effects of antibacterial and antiulcer treatment" Gastroenterology 1988, 94, 33-40.

14. Fubara, E.S. and Freter, H. "Protection against enteric infection by secretory IgA antibodies" J. Immunol. 1973, 111, 395-403.

15. Offit, P.A. and Clark, H.F. "Protection against rotavirus-induced gastroenteritis in a murine model by passively acquired gastrointestinal but not circulating antibodies" J. Virol. 1985, 54, 58-64.

16. Mazanec, M.B., Nedrud, J.G. and Lamm, M.E. "Immunoglobulin A monoclonal antibodies protect against Sendai virus" J. Virol. 1987, 61, 2624-2626.

17. Winner, L.I., Mack, J., Weltzin, R., McKalanos, J.J., Kraehenbuhl, J.P. and Neutra, M.R., "New model for analysis of mucosal immunity: Intestinal secretion of specific monoclonal immunoglobulin A from hybridoma tumors protect against Vibrio cholerae infection" Infect. Immun. 1991, 59, 977-982.

18. Czinn, S.J. and Nedrud, J.G. "Oral Immunization against Helicobacter pylori" Infect. Immun. 1991, 59, 2359-2363.

19. Sawai, T., Hiruma, R., Kawana, N., Kaneko, M. Taniyasu, F. and Inami, A. "Outer membrane permeation of beta-lactam antibodies in Eschericia coli, Proteus mirabilis and Enterobacter cloacae Antimicrob. Agents." Chemother, 1982, 22, 585-592.

20. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.J. and Randall, R.J. "Protein measurement with the folin phenol reagent" J. Biol. Chem. 1951, 193, 265-275.

21. Elson, C.O., Ealding, W. and Lefkowitz, J. "A lavage technique allowing repeated measurement of IgA antibody in mouse intestinal secretions" J. Immunol. Meth. 1984, 67, 101-108.

22. Nedrud, J.G., Liang, S., Hague, N. and Lamm, M.E. "Combined oral/nasal immunization protect mice from Sendai virus infection" J. Immunol. 1987, 139, 3484-3492.

23. Stuart, C., Van Stratum, E. and Rustigan, R. "Further studies on urease production by Proteus and related organisms" J. Bacteriol. 1945, 49, 437-444.

24. Czinn, S.J. and Carr, H. "Rapid diagnosis of Campylobacter pyloridis-associated gastritis, J. Pediatr. 1987, 110-569-570.

25. Brandtzaeg, P. "Role of H chain and

secretory component in receptor-mediated glandular and hepatic transport of immunoglobulins in man" Scan. J. Immunol. 1985, 22, 111-146.

26. Brandtzaeg, P., Bjerka, K., KEtt, K., Kvale, D., Rognum, T.O., Scott, H., Sollid, L.M. and Valnes, K. "Production and secretion of immunoglobulins in the gastrointestinal tract" Ann. Allergy 1987, 59, 21-39.

27. McDermott, M.R. and Bienenstock, J. "Evidence for a common mucosal immunologic system" I. migration of B. immunoblasts into intestinal, respiratory and genital tissues" J. Immunol. 1979, 122, 1892-1897.

28. Mestecky, J. "The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretions" J. Clin. Immunol. 1987, 7, 265-276.

29. McGhee, J.R., Mestecky, J., Dertzbaugh, M.T., Eldridge, J.H., Hirasawa, M. and Kiyono, H. "The mucosal immune system from fundamental concepts to vaccine development" Vaccine 1992, 10, 75-88.

30. Holmgren, J., Clemens, J., Sack, D.A. and Svennerholm, A.M. "New cholera vaccines" Vaccines 1989, 7, 94-96.

31. Ogra, P.L., Karzon, D.T., Righthand, F. and Macgillivray, M. "Immunoglobulin response in serum and secretions after immunization with live and inactivated poliovaccine and natural infection" N. Engl. J. Med. 1968, 279, 895-900.

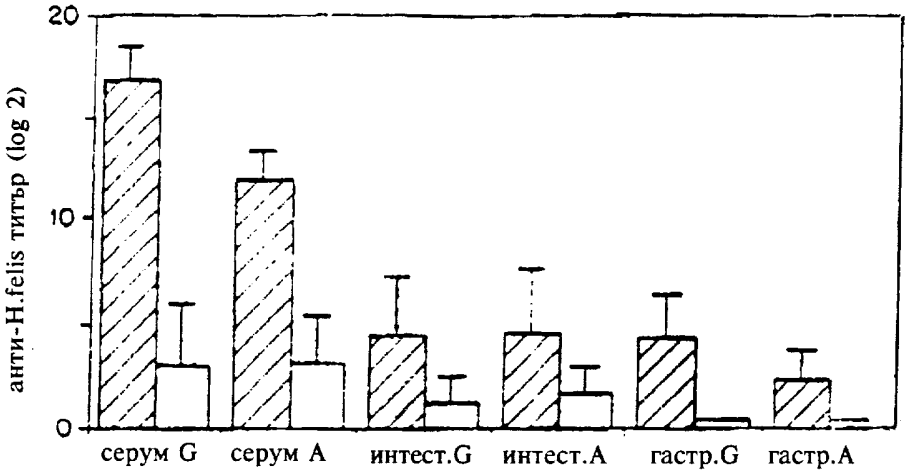
32. Wyatt, J.I., Rathbone, R.J. and Heatley, R.V. "Local immune response to gastritic campylobacter in non-ulcer dyspepsis" J. Clin. Path. 1986, 39, 863-870.

33. Kazi, J.I., Sinniah, R., Jaffrey, N.A., Alam S.M., Zaman, V., Zuberi, S.J. and Kazi, A.M. "Cellular and humoral immune response in campylobacter pylori-associated chronic gastritis" J. Pathol. 1989, 159, 231-237.

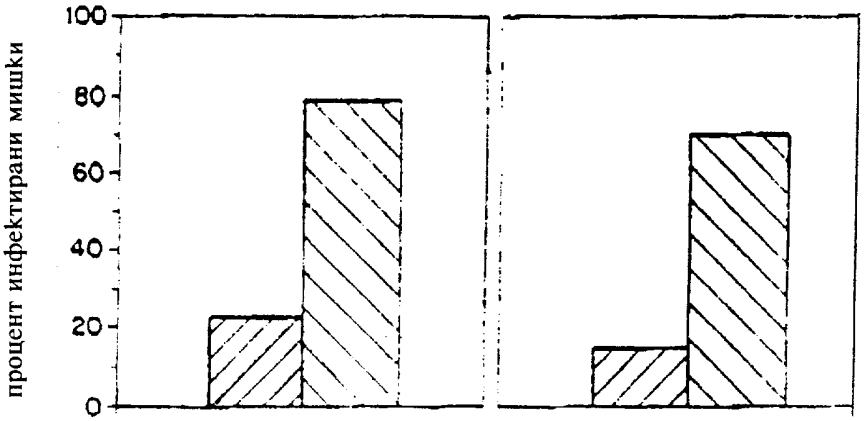
Издание на Патентното ведомство на Република България
1113 София, бул. "Д-р Г. М. Димитров" 52-Б

Експерт: Д. Кацарова Редактор: Р. Николова

Пор. № 39093 Тираж: 40 МВ



Фиг. 1



Фиг. 2A

Фиг.2B