



SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(B) (11) KUULUTUSJULKAISU UTLÄGGNINGSSKRIFT

86508

C (12) Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen 10 09 1986

(51) Kv.1k.5 - Int.cl.5

A 61K 39/104, 35/74 //(A 61K 39/104, C 12R 1:385)

(21) Patenttihakemus - Patentansökning	872750
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	22.06.87
(24) Alkupäivä - Löpdag	22.06.87
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	25.12.87
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	29.05.92

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

24.06.86 AT 1716/86 P

(71) Hakija - Sökande

1. IMMUNO Aktiengesellschaft, Industriestrasse 67, 1221 Wien, Österreich, (AT)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Dorner, Friedrich, Peterlinigasse 17, 1230 Wien, Österreich, (AT)
2. Eibl, Johann, Gustav Tschermakgasse 2, 1180 Wien, Österreich, (AT)

(74) Asiamies - Ombud: Seppo Laine Ky

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä *Pseudomonas aeruginosa* -infektioihin tehoavien koostumusten valmistamiseksi
Förfarande för framställning av sammansättningar som är verksamma mot *Pseudomonas aeruginosa* -infektioner

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

FI A 863677 (A 61K 39/104)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee *Pseudomonas aeruginosa*-infektioihin tehoavia valmisteita, nimittäin rokotteita aktiiviseen immunisointiin sekä vasta-aineita sisältäviä, passiiviseen suojaamiseen tarkoitettuja valmisteita ja menetelmiä niiden valmistamiseksi. Rokotteet sisältävät suojaavia H-serotyyppin a ja b flagella(H)-antigenejä, jotka koostuvat monomeerisistä aineosista, jokainen monomeerinen aineosa koostuu määrätystä aminohapoista, joissa on määrätty N-terminaalinen aminohap-
posekvenssi ja määrätty molekyylipaino. Rokotteet voidaan valmistaa puhdistetuista flagella(H)-antigeeni-liuoksista. Immunoglobuliini-G-pitoiset valmisteet sisältävät protektiivisilla flagella(H)-antigeneillä immunoitujen verenluovut-tajien tai vastaavasti nisäkkäiden veri-plasmasta saatuja flagella(H)-vasta-aineita. Ne voidaan puhdistaa affiniteet-tikromatografisilla menetelmillä.

Uppfinningen avser preparat som är verksamma mot *Pseudomonas aeruginosa* infektioner, nämligen vacciner för aktiv immunisering samt preparat innehållande antikroppar avsedda för passivt skydd, samt förfaranden för framställning av dessa. Vaccinerna innehåller protektiva flagella(H)-antigener av H-serotyp a och b, vilka består av monomera beståndsdelar, varje monomer beståndsdel är uppbyggd av bestämda aminosyror med en bestämd N-terminal aminosyrasekvens och uppvisar en bestämd molekylvikt. Vaccinerna framställs från renade lösningar av flagella(H)-antigener. De immunoglobulin G-haltiga preparaten innehåller flagella(H)-antikroppar utvunna ur blodplasmat av humandonatorer respektive däggdjur som immuniserats med protektiva flagella(H)-antigener. De kan renas genom affinitetskromatografiska förfaranden.

Menetelmä *Pseudomonas aeruginosa* -infektioihin tehoavien koostumusten valmistamiseksi

Keksinnön liittyy *Pseudomonas aeruginosa* -bakteeri-infektioihin tehoaviin koostumuksiin eli valmisteisiin. Etenkin keksintö koskee patenttivaatimuksen 1 johdannon mukaista menetelmää tällaisten tuotteiden valmistamiseksi.

Selityksessä on kuvattu rokotteita, jotka sisältävät protektiivista *Pseudomonas aeruginosa* flagella(H)-antigeeniä ja jotka on tarkoitettu käytettäväksi aktiivisessa immunoinnissa, sekä immunoglobuliini-G-pitoisia bakteerin *Pseudomonas aeruginosa* -infektioon tehoavia valmisteita, jotka on tarkoitettu passiiviseen suojaan.

Bakteeri *Pseudomonas aeruginosa* on opportunistinen, patogeeninen taudinaiheuttaja, jota esiintyy usein sairaalainfektioissa, pääasiassa potilailla, joilla on heikko vastustuskyky, kuten palamisvaurioita saaneilla potilailla, henkilöillä, joilla on kystiinifibroosi tai orgaanisia toimintahäiriöitä, ja tuumoripotilailla. Antibiootit tehoavat bakteerien resistenssin vuoksi vain rajoitetusti *Pseudomonas*-infektioihin, mistä syystä on yritetty kehittää immunologisia menetelmiä *Pseudomonas aeruginosa* aiheuttamien infektioiden torjumiseksi.

Infektioita voivat laukaista useat kannat, jotka tuottavat O-ryhmäantigeenejä ja H-antigeenejä. Ansorgin H-antigeenikaavion mukaisesti (Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A 242, 228 - 238 (1978) käytettäessä epäsuoraa immunofluoresenssi-tekniikkaa erotetaan toisistaan *Pseudomonas aeruginosa* kohdalla kompleksinen flagella-antigeeni a, jossa on osa-antigeenit a_0 , a_1 , a_2 , a_3 , a_4 , ja yhtenäinen flagella-antigeeni b. Osatekijät a_0 - a_4 ovat riippumattomia determinantteja, niin että tuloksena syntyy useita H-tyyppejä sisältävä flagellaarinen antigeenikaavio. O-ryhmillä ja H-tyypillä on vapaita yhdistelmiä.

Pseudomonas aeruginosa -bakteerivalmistukseen käytetyt kannat ja tuotetut antigeenit on esitetty taulukossa 1.

Taulukko 1:

	Kanta		H-tyyppi
1	170001	-	b
	M-2	-	b
2	5142	-	a ₀
3	5940	-	a ₀ , a ₂
4	5939	-	a ₀ , a ₃
5	5933	-	a ₀ , a ₁ , a ₂
	1210	-	a ₀ , a ₁ , a ₂
	16990	-	a ₀ , a ₁ , a ₂
6	170018	-	a ₀ , a ₃ , a ₄

Eristettyjen flagelliantigeenien säikeet, jotka voidaan ottaa talteen ravistelemalla, homogenisoimalla ja sitten sentrifugoimalla (R. Ansorg, W. Schmitt, Med. Microbiol. Immunol. (1980) 168, 217 - 226), koostuvat flagelleista ja flagellien osista, jotka esiintyvät yhdessä lipopolysakkarideista (LPS) ja ravintoaineen epäpuhtauksista koostuvassa kompleksissa. Tällaiset valmisteet ovat luonnollisesti pyrogeenisia eikä niitä voida käyttää ihmisessä.

PCT-julkaisussa WO 86/03947 on esitetty puhdistusmenetelmän jälkeen saatujen, pyrogeenisista aineista vapaiden, polydisperssien natiivisten *Pseudomonas*-flagella(H)-antigeenien (FAG):n rakenne. Ne koostuvat monomeeristä osista, jolloin jokainen monomeerinen osa sisältää

- a) seuraavia aminohappoja: asparagiinihappoa tai vastaavasti asparagiiniä (Asp/Asn), treoniiniä (THR), seriiniä (Ser), glutamiinihappoa tai vastaavasti glutamiinia (Glu/Gln), glysiiniä (Gly), alaniinia (Ala), valiinia (Val), isoleusiiniä (Ile), leusiinia (Leu), tyrosiinia (Tyr), fenyyialaniinia (Phe), lysiiniä (Lys), arginiinia (Arg) ja mahdollisesti tryptofaania (Trp),

- b) siinä on N-terminaalinen aminohapposekvenssi Ala-Leu-Thr-Val-Asn-THr-Asn-Ile-Ala,
- c) sen molekyylipaino on 43.500 - 53.050 ja
- d) se on vapaa proliinista (Pro), metioniinistä (Met), puolikystiinistä (1/2 Cys) ja histidiinistä (His).

Yksittäisille flagella(H)-antigeenityypeille on edelleen tunnusomaista se, että monomeeriset muodot sisältävät aminohapot asparagiini/-happo, treoniini, seriini, glutamiini/happo, glysiini, treoniini, seriini, glutamiini/-happo, fenyylialaniini, lyysiini ja arginiini määrätyissä suhteissa toisiinsa nähden. Taulukossa 2 on esitetty monomeeristen flagella(H)-antigeenien suhdeluvut ja molekyylipainot.

Taulukko 2

Aminohappojen lukumäärä flagelliini-molekyyliä kohti

Kannat ja niihin kuuluva H-serotyyppi

Aminohapot	170018	5939	5142	M-2	1210	5940
Asparagiinihappo	64	69	74	74	76	68
Treoniini	33	35	50	48	44	41
Seriini	35	38	49	48	40	37
Glutamiinihappo	42	44	49	49	52	46
Glysiini	44	47	49	51	50	44
Alaniini	68	73	89	91	81	73
Valiini	29	30	37	38	32	29
Isoleusiini	29	30	29	30	32	29
Leusiini	37	60	44	43	41	37
Tyrosiini	3	3	5	4	4	3
Fenyylialaniini	10	12	14	13	12	10
Lysiini	19	21	17	18	20	16
Arginiini	15	16	16	18	18	16
Σ	= 450	478	522	525	502	449
MP	= 43.500	46.700	52.720	53.050	51.250	45.900

PCT-patenttijulkaisun WO 86/03974 tietojen mukaisesti polydisperssien natiivien *Pseudomonas aeruginosa* flagella(H)-antigeenien tuottamiseksi kasvatetaan bakteeriviljelmiä minimiväliaineessa ja niitä käsitellään sitten detergenssillä, minkä jälkeen flagella(H)-antigeenit voidaan erottaa viljelmästä. Tällöin bakteeriviljelmä voidaan joko hajottaa ennen detergenssikäsittelyä ja alistaa leikkausvoimille tai se voidaan alistaa leikkausvoimille detergenssin läsnäollessa. Lisäämällä detergenssi voidaan vaikuttaa siihen, miten antigeeni eroaa bakteeriviljelmästä. Liuoksessa sitten olevat antigeenit voidaan erottaa.

Tämän jälkeen voidaan, kuten yllä mainittiin, bakteeriviljelmästä erotetut antigeenit puhdistaa kromatografisesti niissä olevista epäpuhtauksista, kuten lipopolysakkarideista, nukleiinihapoista, suoloista, polysakkarideista jne. Vielä läsnä oleva detergenssi voidaan poistaa pylväskromatografisessa puhdistusvaiheessa.

Tähän mennessä ei ole ollut tunnettua, onko näillä antigeeneillä suojavaikutusta vai ei. Nyt todettiin, että PCT-julkaisussa WO 86/03974 esitetyillä flagella(H)-antigeenityypeillä on suojavaikutus, jolloin monovalenttisten ja polyvalenttisten rokotteiden valmistus on mahdollista. Tämä on esillä olevan keksinnön lähtökohta.

Etenkin keksinnön tarkoituksena on mahdollistaa aktiivinen immunoprofylaksia *Pseudomonas aeruginosa* aiheuttamia infektioita vastaan, etenkin henkilöryhmille, joilla on suuri riski kärsiä palovammoista, esim. palokuntaan kuuluville tai sotilashenkilöstölle, tai potilaille, joita tulisi käsitellä immunosuppressiivisilla lääkeaineilla.

Eräs toinen keksinnön tehtävä on saada aikaan immunoglobuliini-G-pitoisia valmisteita, jotka soveltuvat *Pseudomonas aeruginosa* -infektioiden passiiviseen immunisointiin.

Keksinnön mukaisille ratkaisulle on tunnusomaista se, että valmistetaan koostumuksia, jotka sisältävät suojaavan H-serotyypisen flagella(H)-antigeenin a tai vastaavasti b, joka koostuu monomeerisistä osista, jolloin

- a) jokainen monomeerinen osa sisältää seuraavia aminohappoja: asparagiinihappoa (Asp), treoniiniä (Thr), seriiniä (Ser), glutamiinihappoa (Glu), glysiiniä (Gly), alaniinia (Ala), valiinia (Val), isoleusiiniä (Ile), leusiinia (Leu), tyrosiinia (Tyr), fenyylialaniinia (Phe), lysiiniä (Lys), arginiinia (Arg) ja mahdollisesti tryptofaania (Trp) ja metioniiniä,
- b) siinä on N-terminaalinen aminohapposekvenssi Ala-Leu-Thr-Val-Asn-Thr-Asn-Ile-Ala-aminohapposekvenssi,
- c) sen molekyylipaino on 43.500 - 53.050 ja
- d) se on vapaa proliinista (Pro), puolisyysteiniä ja histidiinistä ja se on vapaa pyrogeenisistä aineista.

Etenkin valmistetaan kuusi spesifistä H-serotyyppiä, jotka on tarkoitettu rokotteiden komponenteiksi, nimittäin

- H-serotyypin a_0 , a_3 , a_4 flagella(H)-antigeeni, jonka monomeerinen muoto sisältää aminohappoina: asparagiinihappoa, treoniinia, seriiniä, glutamiinihappoa, glysiiniä, alaniinia, valiinia, isoleusiinia, leusiinia, tyrosiinia, fenyylialaniinia, lysiiniä ja arginiinia suhteessa 64 : 33 : 35 : 42 : 44 : 68 : 29 : 29 : 37 : 3 : 10 : 19 : 15 ja jonka molekyylipaino on 43.500,
- H-serotyypin a_0 , a_3 -flagella(H)-antigeeni, jonka monomeerinen muoto sisältää aminohapot: asparagiinihappo, treoniini, seriini, glutamiinihappo, glysiini, alaniini, valiini, isoleusiini, leusiini, tyrosiini, fenyylialaniini, lysiini ja arginiini suhteessa 69 : 35 : 38 : 44 : 47 : 73 : 30 : 30 : 60 : 3 : 12 : 21 : 16 ja jonka molekyylipaino on 46.700;
- H-serotyypin a_0 flagella(H)-antigeeni, jonka monomeerinen osa sisältää aminohappoina: asparagiinihappoa, treoniinia, seriiniä, glutamiinihappoa, glysiiniä, alaniinia, valiinia, isoleusiinia, leusiinia, tyrosiinia, fenyylialaniinia,

- lysiiniä ja arginiinia suhteessa 74 : 50 : 49 : 49 : 49 : 89 : 37 : 29 : 44 : 5 : 14 : 17 : 16 jonka molekyylipaino on 52.720;
- H-serotyyppin b flagella(H)-antigeeni, jonka monomeerinen muoto sisältää aminohappoina: asparagiinihappoa, treoniinia, seriiniä, glutamiinihappoa, glysiiniä, alaniinia, valiinia, isoleusiinia, leusiinia, tyrosiinia, fenyylialaniinia, lysiiniä ja arginiinia suhteessa 74 : 48 : 48 : 49 : 51 : 91 : 38 : 30 : 43 : 4 : 13 : 18 : 18 ja jonka molekyylipaino on 53.050.
 - H-serotyyppin a₀, a₁, a₂ flagella(H)-antigeeni, jonka monomeerinen muoto sisältää aminohappoina: asparagiinihappoa, treoniinia, seriiniä, glutamiinihappoa, glysiiniä, alaniinia, valiinia, isoleusiinia, leusiinia, tyrosiinia, fenyylialaniinia, lysiiniä ja arginiinia suhteessa 76 : 44 : 40 : 52 : 50 : 81 : 32 : 32 : 41 : 4 : 12 : 20 : 18 ja jonka molekyylipaino on 51.250;
 - H-serotyyppin a₀, a₂ flagella(H)-antigeeni, jonka monomeerinen muoto sisältää aminohappoina: asparagiinihappoa, treoniinia, seriiniä, glutamiinihappoa, glysiiniä, alaniinia, valiinia, isoleusiinia, leusiinia, tyrosiinia, fenyylialaniinia, lysiiniä ja arginiinia suhteessa 68 : 41 : 37 : 46 : 44 : 73 : 29 : 29 : 37 : 3 : 10 : 16 : 16 : ja jonka molekyylipaino on 45.900.

Menetelmälle keksinnön mukaisten rokotteiden valmistamiseksi on patenttivaatimuksen 1 mukaan tunnusomaista se, että *Pseudomonas aeruginosa* -viljelmistä saadut puhdistetut flagella(H)-antigeenit steriilisuodatetaan, mahdollisesti sekoitetaan apuaineen, kuten Al(OH)₃:n kanssa ja haluttaessa niihin sekoitetaan säilöntäainetta, kuten mertiolaattia.

Edelleen keksinnön kohteena on menetelmä immunoglobuliini-G-pitoiten, *Pseudomonas aeruginosa* -bakteerin infektiota vastaan tehokkaiden valmisteiden tuottamiseksi, jotka valmisteet on tarkoitettu profylaktiseen ja terapeuttiseen käyttöön, ja joille on ominaista se, että ne sisältävät

protektiivisilla flagella-(H)-antigeenillä immunoitujen verenluovuttajien tai vastaavasti nisäkkäiden veriplasmasta saatuja flagella-(H)-vasta-aineita.

Näillä flagella(H)-vasta-aineilla on motiliteettiä estävä vaikutus sekä parempi *Pseudomonas aeruginosa* -bakteerien fagosytoosi ja intrasellulaarinen tuhoamiskyky.

Eräiden edullisten suoritustuotojen mukaisesti voidaan nämä immunoglobuliini-G-pitoiset, *Pseudomonas aeruginosa* -bakteerin infektoita vastaan vaikuttavat valmisteet valmistaa siten, että protektiivisillä flagella(H)-antigeeneillä immunoitujen verenluovuttajien tai vastaavasti nisäkkäiden plasmaa käsitellään proteiinin saostusaineilla, kuten ammoniumsulfaatilla, saostettu immunoglobuliini-G-pitoinen fraktio liuotetaan ja puhdistetaan, jolloin immunoglobuliini-G-pitoisen fraktion puhdistus edullisesti suoritetaan siten, että liuos johdetaan jonkin kantoväliaineen läpi, johon on kovalenttisesti sitoutunut monomeerisessä tai polymeerisessä muodossa olevaa flagella-antigeeniä, eluoidaan flagella-spesifinen vasta-aine pH:n muutoksella tai kaotrooppisella aineella, kuten NH_4SCN :llä, geelistä ja valmistetaan galeeniseen muotoon.

Keksintöä selitetään seuraavien esimerkkien avulla lähemmin, jolloin esimerkit 1 - 3 esittävät rokotteiden valmistusta ja esimerkki 4 esittää immunoglobuliini-g-pitoisten valmisteiden valmistusta.

Esimerkki 1:

Rokotevalmistus *Pseudomonas aeruginosa* M-2-flagellarokotetta varten

Bakteeri *Pseudomonas aeruginosa* M-2 valmistettu ja yllä esitetyllä tavalla detergenssikäsitelyllä, leikkausvoimia käyttämällä ja kromatografisesti puhdistettu flagelliliuos asetetaan tislatussa pyrogeenivapaalla vedellä 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$:n

proteiinikonsentraatioon ja tehdään isotoniseksi lisäämällä kiinteää natriumkloridia ja mertiolaattia (loppukonsentraatio 0,9 % tai vastaavasti 0,01 %). Tämän jälkeen liuos steriilisuodatetaan Sartorius-kertakäyttösuodattimen (0,2 μ m) läpi.

Steriilisuodatetun näytteen proteiinimäärityksen jälkeen flagelli-suspension konsentraatio asetettiin steriilillä NaCl/mertiolaattiliuoksella (0,9 %/0,0 %) arvoon 25 g proteiiniä/ml, minkä jälkeen se laimennettiin lisäämällä 1 %:sta aluminiumhydroksidisuspensiota steriilissä NaCl/mertiolaattiliuoksessa 20 μ g proteiinia/ml.

Valmiiksi adjuvantoitu rokote sisältää/ml:

20 μ g flagelliproteiinia

2 mg Al(OH)₃

9 mg NaCl

0,1 mg mertiolaattia stabilisaattorina

Esimerkki 2:

Rokotevalmiste *Pseudomonas aeruginosa* 1210-flagellirokotetta varten

Bakteeri *Pseudomonas aeruginosa* 1210-viljelmästä saatu ja yllä esitetyllä tavalla detergenssikäsittelyllä, leikkaamalla ja kromatografisesti puhdistettu flagelliliuos asetettiin tislattulla pyrogeenivapaalla vedellä 100 μ g/ml:n proteiinkonsentraatioon ja tehtiin isotoniseksi lisäämällä kiinteää natriumkloridia ja mertiolaattia (loppukonsentraatio 0,9 % tai vastaavasti 0,01 %). Tämän jälkeen liuos steriilisuodattiin Sartorius-kertakäyttösuodattimen (0,2 μ m) läpi.

Steriilisuodatetun näytteen proteiinimäärityksen jälkeen flagelli-suspensio asetettiin steriilillä NaCl/mertiolaattiliuoksella (0,9 %/0,0 %) 25 g proteiiniä/ml ja tämän jälkeen laimennettiin lisäämällä 1 %:sta aluminimhydroksidisuspensiota steriilissä NaCl/mertiolaattiliuoksessa 20 μ g proteiinia/ml.

Valmiiksi adjuvantoitu rokote sisältää/ml:

20 µg flagelliproteiinia

2 mg Al(OH)₃

9 mg NaCl

0,1 mg mertiolaattia stabilisaattorina

Esimerkki 3:

Rokotevalmiste *Pseudomonas aeruginosa* polyvalenttista flagellirokotetta varten

Bakteeri *Pseudomonas aeruginosa* -viljelmistä (tyypit M-2, 1210, 5142, 5939, 5940 ja 170018) talteenotetut ja yllä esitetyllä tavalla detergenssikäsittelyllä, leikkaamalla ja kromatografisesti puhdistetut flagellilioukset asetettiin tislatussa pyrogeenivapaalla vedellä 100 µg/ml:n proteiini-konsentraatioon, sekoitettiin yhtä suuriin osiin ja tehtiin isotonisiksi lisäämällä kiinteää natriumkloridia ja mertiolaattia (loppukonsentraatio 0,9 % tai vastaavasti 0,01 %). Tämän jälkeen liuos steriilisuodatettiin Sartorius-kertakäyttösuodattimen (0,2 µm) läpi.

Steriilisuodatetun näytteen proteiinimäärityksen jälkeen flagelli-suspension konsentraatio asetettiin steriilillä NaCl/mertiolaattiliuoksella (0,9 %/0,0 %) arvoon 25 µg proteiiniä/ml ja tämän jälkeen sitä laimennettiin lisäämällä 1 %:sta aluminimhydroksidisuspensiota steriilissä NaCl/mertiolaattiliuoksessa 20 µg proteiinia/ml.

Valmiiksi adjuvantoitu rokote sisältää/ml:

20 µg flagelliproteiinia

2 mg Al(OH)₃

9 mg NaCl

0,1 mg mertiolaattia stabilisaattorina

Esimerkki 4:

Pyrogeenitesti

Esitetyllä tavalla valmistetut rokotteet tarkastettiin, olivatko ne vapaita pyrogeenisistä aineosista. Koepariaate oli sellainen, että tuotteen i.v.-injektion jälkeen kolmeen tai useampaan kaniiniin lämpötila mitattiin 3 tunnin ajan (Eur. Ph., 2 painos, 1980, osa 1, V.2.1.4); maks. lämpötilan nousu rekisteröitiin jokaisen kanin kohdalla ja se toimi tuotteen pyrogeeniteetin mittana.

Kokeen suorittamiseksi käytettiin:

Termodeja (kaniineille tarkoitettuja Cu-Konstantan-lejeerinkipohjaisia termoelementtejä, Ph-Schenk),
lämpötilakirjoittimia (kuusiväripistekirjoittimia, tyyppiltään STD 62A, mittausalue 36...42°C, mittaustarkkuus + 0,08°C),

steriilejä pyrogeenivapaita muovi-injektioruiskuja,
steriilejä pyrogeenivapaita injektioneuloja,
teräspyrogeenitestilaatikoita, joissa kaulakiinnitys,
vaunu 6 pyrogeenitestilaatikkoa varten,
termostaatilla varustettu vesihaude,
lämpömittarit,

vaaka: Sauter ES 120.

Koe-eläiminä käytettiin terveitä, ainakin 1500 g painavia, täyskasvuisia naaras- ja koiraskaniineja, joita syötettiin täysipainoisella antibioottivapaalla vakiodieetillä ja jotka eivät osoittaneet koetta edeltävällä viikolla painonpudotusta.

Näytteenä käytettiin apuainevapaata M2-flagellirokotetta, joka lämmitettiin ennen injektiota n. 38°C:seen. Koe suoritettiin kolmen kaniinin ryhmällä, jotka sijoitettiin vähintään 90 min. ennen kokeen alkua pyrogeenitestilaattikoihin. Jokaiselle kaniinille määritettiin alkulämpötilaksi keskiarvo kahdesta 30 min:n välein suoritetusta lämpötilanmittauksesta,

joka suoritettiin noin 40 min. ennen näyteliuoksen antamista. Seuraavaan kokeeseen ei otettu kaniineja, joilla alkulämpötilaa määritettäessä kahden mittauksen välillä esiintyi $0,2^{\circ}\text{C}$ suurempi lämpötilapoikkeama. Kokeessa käytettiin ainoastaan kaniineja, joiden alkulämpötilat erosivat vain $0,1^{\circ}\text{C}$. Pääkokeessa ei käytetty yhtään kania, jonka alkulämpötila oli korkeampi kuin $39,8^{\circ}\text{C}$ tai alhaisempi kuin 38°C . Jokaisen kanin korvanreunuslaskimoon injektoitiin hitaasti 1 ml näyttettä/kg. Injektionkesto oli korkeintaan 4 min. Maksimilämpötilaksi määritettiin jokaiselle kanille korkein rekisteröity lämpötila kolmessa tunnissa injektion jälkeen. Jokaisen kanin lämpötila rekisteröitiin korkeintaan 30 min:n välein, alkaen vähintään 90 min. ennen koeaineen antamista ja päättyen 3 tuntia injektion antamisen jälkeen. Jokaisen kanin alkulämpötilan ja maksimilämpötilan välinen erotus arvioitiin tulokseksi. Negatiiviset erot arvioitiin nollassa.

Tulosten tarkastelu:

Tulosten tarkastelua varten lämpötilaerot laskettiin yhteen. Kolmen kanin ryhmissä näyte vastaa vaatimuksia, kun yksittäisarvojen summa oli pienempi kuin $1,15^{\circ}\text{C}$. Jos summa on suurempi kuin $2,65^{\circ}\text{C}$, niin näyte ei vastaa vaatimuksia. Näiden molempien yllä mainittujen arvojen välillä olevien tulosten kohdalla on testi toistettava yllä esitetyllä tavalla. Korkeintaan kolme toistoa suoritettiin.

Toistojen jälkeiseen tarkasteluun otettiin kaikki testatut eläimet (3, 6, 9 tai korkeintaan 12). Tarkastuskriteerit on esitetty seuraavassa taulukossa:

Kanien määrä	Aine vastaa koetta pyrogeenivapauden suhteen, kun yksittäisarvojen summa on pienempi kuin	Aine ei vastaa koetta, kun yksittäisarvojen summa on suurempi kuin
3	1,15°	2,65°
6	2,80°	4,30°
9	4,45°	5,59°
12	6,60°	6,60°

Näyte vastaa koevaatimuksia, kun kolmen yksittäisarvon summa on pienempi kuin 1,15°C tai täyttää toistettaessa yllä olevassa taulukossa esitetyt edellytykset.

Tulokset, jotka saatiin testattaessa M2-flagellirokotetta injisoitaessa 1 ml/kg kania kohden kolmen kanin yksittäisten t-arvojen suhteen, olivat seuraavat:

Rokotekonsentraatio

10 µg/ml	0,1°	0,1°	0,3°	$\sum \Delta t$ 0,5°C
10 µg/ml	0,3°	0,4°	0,2°	$\sum \Delta t$ 0,9°C
20 µg/ml	0,3°	0,5°	0,2°	$\sum \Delta t$ 1,0°C
20 µg/ml	0,2°	0,1°	0,2°	$\sum \Delta t$ 0,5°C
20 µg/ml	0,1°	0,4°	0,2°	$\sum \Delta t$ 0,7°C

Testattua valmistetta on siten pidettävä pyrogeenivapaana.

Esimerkki 5:

Passiiviseen immunisointiin käytettävän IgG-jakeen eristäminen hiiri-hyperimmuniplasmasta

Kerättiin suojaavalla M2-tyyppisellä flagella(H)-antigeenillä immunisoitujen hiirten plasma, sitä kuumennettiin ravistellen 30 min. 56°C:ssa fibriinin saostamiseksi. Sentrifugoitiin 30 minuutin ajan 10.000 x g:ssä, minkä jälkeen suoritettiin saostus lisäämällä kiinteää ammoniumsulfaattia aina 25 %:n

(p/t) konsentraatioon asti. Suspensiota sekoitettiin 20 minuutin ajan ja sen annettiin seistä tunnin ajan huoneenlämpötilassa. Tämän jälkeen suspensio sentrifugoitiin 30 min. 10.000 x g:ssä ja pestiin kerran kyllästetyllä ammoniumsulfaattiliuoksella. Sakka liuotettiin 10 mM Na-fosfaattipuskurilla, pH 7,5, 50 mM NaCl:llä ja dialysoitiin tämän jälkeen yön yli tätä puskuria vasten.

Sentrifugoinnin jälkeen suoritettiin ioninvaihtokromatografia (DE-52 Cellulose Whatman)). Läpivirtaus sisälsi immunoglobuliini-G:n (IgG). Testauksen jälkeen IgG:n suhteen liuos konsentroitiin alkumäärään Amicon-kennolla ja dialysoitiin yön yli 0,9 %:sta NaCl-liuosta vasten. Tämän jälkeen suoritettiin geelikromatografia Sephadex G-200:lla. IgG-positiiviset fraktiot konsentroitiin alkumäärään käyttämällä Amicon--kennoa.

Tämä menetelmä on muunnelma D.M. Weirin kirjassa Handbook of Experimental Immunology, 3 painos, 1978, luku VII, VIII esittämästä menetelmästä.

Valmistettaessa bakteerin *Pseudomonas aeruginosa* flagella-antigeenejä vastaan monospesifisesti vaikuttavia immunoglobuliineja voidaan kuitenkin käyttää myös muita tunnettuja menetelmiä kuin ammoniumsulfaattisaostusta, esim. DEAE-kromatografiaa, proteiini A-affiniteettikromatografiaa tai yhdistettyjä menetelmiä, jotka ovat ammattimiehelle tunnettuja. Immunoglobuliini-G-valmisteet voidaan puhdistaa edelleen immuuniaffiniteettikromatografisesti jälleen monospesifiseksi immunoglobuliineiksi.

Monospesifisen immunoglobuliinin valmistamiseksi käytetään edullisesti immunosorbenssina kantoaineväliainetta - mieluummin Sepharose 4B:tä, johon puhdistettu flagelliantigeeni monomeerisessä tai polymeerisessä muodossaan on sitoutunut kovalenttisesti.

IgG-pitoinen liuos voidaan sitten pumpata affiniteettihartsin läpi virtausnopeudella, joka edullisesti on 1 - 2 pylvästila-vuutta tunnissa. Hartsin pesun jälkeen voidaan suuremman ionivahvuuden omaavilla puskuriliuoksilla (esim. 0,5 M NaCl) eluoida flagellispesifiset vasta-aineet pH-muutoksen tai kaotrooppisten aineiden (esim. 3M NH₄SCN) avulla geelistä.

Keksinnön mukaisten antigeenien ja vasta-aineiden tehokkuus on esitetty seuraavassa:

Keksinnön mukaisesti rokotteina käytettävien antigeenien suojaavan vaikutuksen osoitus tapahtuu osoittamalla flagella(H)-vasta-aineet henkilöiden seerumissa, jotka ovat sairastaneet *Pseudomonas aeruginosan* aiheuttamaa infektiota.

Antiflagelli-vasta-aineiden konsentraation määrittämiseksi käytetään immuuniabsorbenttianlyysiä, nimittäin "Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA) tai radioimmunoanalyysiä (RIA). Keksinnön mukaisesti aikaansaadut erittäin puhtaat flagella(H)-antigeenit depolymeroidaan vahvalla detergenssillä, tämän jälkeen niiden annetaan sitoutua ei-spesifisen vuorovaikutuksen kautta muovipintaan ja saatetaan kosketuksiin ihmisen seerumin näytteiden kanssa. Jos ihmisen seerumissa on anti-flagella(H)-vasta-aineita, niin nämä sitoutuvat spesifisesti kiinteässä faasissa immobilisoituun antigeeniin. Merkityllä anti-humaaniIgG-vasta-aineella osoitetaan muovipinnalle muodostuneet flagelli(H)-antigeenivasta-ainekompleksit.

Tämä menetelmä voidaan tulkita helposti kvantitatiivisesti. Taulukko 3 osoittaa seeruminäytteiden seulonnan tulokset vasta-aineiden suhteen erilaisia flagelli-serotyyppejä vastaan.

Taulukko 3

Flagella(H)-vasta-ainetiitteri ihmisseerumissa

Pseudomonas aeruginosa- kanta	M2	1210	5939	5940	5142	170018
H-serotyyppi	b	a0a1a2	a0a3	a0a2	a0	a0a3a4
Seerumi #						
1	-	-	+	-	-	+
2	(+)	(+)	+++	+	+	+++
3	++	+++	+++	+++	++	+++
4	-	-	-	-	-	-
5	+	(+)	++	+	-	+
6	++	-	(+)	-	+	-
7	-	-	-	-	-	-
8	-	-	++	-	-	++
9	-	-	-	-	-	-
10	-	+	+	+	-	+
11	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-
13	-	+	(+)	(+)	-	++
14	+	-	-	-	+	-
15	+	+	+	+	+	++

- ei mitään vasta-ainetta todettavissa ++ tiitteri > 1 : 100 +++ tiitteri > 1 : 300
 (+) niukasti osoitusrajan yläpuolella +++ tiitteri > 1 : 200
 + tiitteri > 1 : 20 > 1 : 100

Taulukossa 3 esitetyillä tuloksilla flagelli(H)-vasta-aineiden löytymisestä sattumaperiaatteella valittujen lahjoittajien seerumeista osoitetaan natiivin *Pseudomonas aeruginosa* flagelli(H) antigeenien immuniteetti.

Vasta-aineet käynnistävät kehoon tunkeutuneiden vieraiden organismien torjunnan eri tavoin. Yhdessä humoraalisen puolustusjärjestelmän (komplementtijärjestelmän) kanssa tuhotaan vasta-aineiden tunnistamat vieraat organismit peräkkäisillä reaktioilla lyysillä. Edelleen vieraisiin organismeihin sitoutuneet vasta-aineet voivat yhdessä komplementtijärjestelmän osien kanssa indusoida vieraan organismin kiinnityksen (fagosytoosin) immuunijärjestelmän torjuntasoluihin (esim. granulosyytteihin).

Flagelleja kantavien bakteerien tapauksessa voidaan solun liikettä vastaan kohdistuvien vastaaineiden suojavaikutuksen myös katsoa liittyvän motiliteetin estoon ja siten infektiopesäkkeen leviämisen estoon.

Motiliteetin esto flagella(H)-vasta-aineilla voidaan osoittaa siten, että taulukossa 1 esitettyjen serotyyppien flagella(H)-antigeenejä käytetään hiirien immunoimiseksi ja näin saatua anti-flagella(H)-seerumia käytetään motiliteetin estokokeissa. Antiseerumilla kostutetut suodatinpaperirenkaat asetetaan motiliteetti-agar-levyille ja agar ympätään näissä renkaissa homologisen *Pseudomonas*-kannan suspensiolla. Solumäärä, joka näkyy 24 tuntia kestävän inkuboinnin jälkeen suodatinpaperirenkaan ulkopuolella, toimii mittana motiliteetin eston arvioimiseksi. Taulukon 4 tulokset osoittavat, että flagella(H)-antigeeneillä valmistetut hiiren antiseerumit estävät homologisen *Pseudomonas*-bakteerikannan motiliteetin.

Taulukko 4

Motiliteetin estyminen homologisen antFLAGELLISEERUMIN eri määrittä

Kanta	Homologinen antFLAGELLISEERUMI (μ l/seerumi/ μ l itiösuspensiota*)			
	30/5	20/10	10/10	5/10
M-2	-	-	+-	+-
1210	-	+	+	+
5939	-	-	-	-
5940	-	-	-	-
5142	-	+-	+-	+-
170018	-	+-	+-	+-

*) itiösuspensio 10^3 itiötä/ml

- ei yhtään solua suodatinpaperirenkaan ulkopuolella
 - +- soluja ainoastaan muutamissa kohdissa suodatinpaperirenkaan ulkopuolella
 - + vähäinen solukasvu suodatinpaperirenkaan ulkopuolella
 - ++ selvä solukasvu suodatinpaperirenkaan ulkopuolella
- normaalilla hiiriseerumilla aina selvä solukasvu (++)

Estämällä infektiopesäkkeessä olevien bakteerien motiliteettiä estetään niiden edelleenleviäminen potilaan kehossa tapahtuneen kolonisaation jälkeen. Pesäkkeessä olevat bakteerit pystyvät kuitenkin edelleen kuormittamaan potilaan organismia erittämällä esimerkiksi toksineja, proteaaseja jne. Aito suoja infektiota vastaan on taattu ainoastaan silloin, kun aktiivissa immunoinnissa (rokotuksessa) muodostuneet vasta-aineet johtavat pesiytyneiden bakteereiden nopeaan tuhoamiseen.

Seuraavassa osoitetaan, että flagella(H)-vasta-aineet aiheuttavat homologisten Pseudomonas-bakteerikantojen fagosytoosin ja tuhoutumisen solujen sisällä.

Fagosytoositestissä esi-inkuboitiin taulukossa 3 esittämätön seerumi (# 16) sekä seerumit # 3 ja # 5 Pseudomonas

aeruginosa-kannan M-2 flagellittomalla (fla⁻) mutantilla (Montie, T.C., D. Doyle-Huntzinger, R.C. Craven ja I.A. Holder (1982) Infect. Immun. 38, 1292 - 1298) flagellispesifisten vasta-aineiden poistamiseksi seerumeista. Eristetyt huumaanigranulosyytit käytettiin *Pseudomonas aeruginosa* M-2:n ja isogeenisen flagellittoman mutantin intrasellulääriseen tuhoutumisen määrittämiseksi käsittelemättömässä ja esiabsorboidussa seerumissa. Taulukon 5 tulokset osoittavat, että flagella(H)-vasta-aineet indusoivat fagosytoosin ja *Pseudomonas aeruginosa*n flagelleja sisältävän kannan tämän jälkeisen intrasellulääriseen tuhoamiseen, ja siten keksinnön mukaisesti niillä on suojavaikutus tämän itiön aiheuttamia infektioita vastaan.

Taulukko 5

Pseudomonas aeruginosa M-2:n ja isogeenisen flagellittoman mutantin fagosytoosi ja solunsisäinen tuhoaminen

Seerumi Laimennus		Pseudomonas aeruginosa M-2:n solunsisäinen tuhoaminen		Pseudomonas aeruginosa M-2 fla-	
		Seerumi Seerumi abs. Seerumi ilman Seerumi Seerumi abs. Seerumi ilman		granulosyyttejä	
		94 %		92 %	
		59 %		0 %	
		24 %		0 %	
		13 %		3 %	
		51 %		1 %	
		29 %		2 %	
		25 %		0 %	
		57 %		0 %	
		24 %		0 %	
		0 %		0 %	

Niiden antigeenien suojavaikutuksen suora osoitus, joita tulee käyttää aktiiviseen immunisointiin, voidaan suorittaa vain eläinmallissa. Potilaat *Pseudomonas*-tartunnalle altistavien tilanteiden simuloimiseksi käytettiin kahta kirjallisuudessa esitettyä eläinmallia: burned mouse-malli (Stieritz, D.D. ja I.A. Holder (1975) *J. Infect. Dis.* 131, 688 - 691) ja Endoxan-malli (Cryz, S.J. Jr., Fürer, E., Germanier, R. (1983) *Infect. Immunity* 40, 659 - 664).

Molemmissa malleissa selvitettiin *Pseudomonas aeruginosa*n LD₅₀-annos ei-immunoiduissa eläimissä, jotka Endoxan-mallissa immunsupprimoitiin; burned mouse-mallissa tuotettiin määrätyn suuruinen palaminen. Flagella(H)-antigeeneillä suoritettun immunoinnin jälkeen palovammaiset eläimet tai vastaavasti immunosupprimoidut eläimet tartutettiin homologisella *Pseudomonas*-kannalla, jonka määrä oli moninkertainen edellä selvitettyyn LD₅₀-itiömäärään nähden. Taulukko 6 osoittaa ne LD₅₀-itiömäärän kerrannaismäärät, jotka 100 % esitetyn koncentraation omaavalla antigeenillä immunisoiduista eläimistä sietävät Endoxan- ja burned mouse-mallissa.

Taulukko 7 osoittaa M-2-flagella-antigeenin suojavaikutuksen riippuvuuden. Tässä tapauksessa eläimet immunoitiin M-2-antigeenin kasvavilla määrillä ja testattiin molemmissa malleissa. Molemmissa tapauksissa havaitaan immunointiin käytetyn M-2-flagelliantigeenin suojavaikutuksen selvä annosriippuvuus.

Taulukko 6

Aktiiviset suojakokeet *Pseudomonas aeruginosa* flagella(H)-antigeeneillä

Antigeeni	määrä/hiiri adjuvantointi päivää ennen AL(OH) ₃ :lla chall.	immunisointi	endoksaanimalli x LD50	poltetun hiiren malli x LD50
M-2	1 µg	14	10	>10 ³
	3 µg	14	30	>10 ⁴
	3 µg	14 + 7	30	>10 ⁴
1210	3 µg	14 + 7	30	>10 ⁴
M-2 + 1210	kukin 1,5 µg	14	10 ² M-2 10 1210	>10 ⁴ M-2 >10 ⁴ 1210
polyva- lentti (6 tyyppiä)	kukin 3 µg	14 + 7	10 ² M-2 10 1210	10 ⁴ M-2 10 ⁴ 1210

Taulukko 7

M-2-flagelli(H)-antigeenin suojavaikutuksen annosriippuvuus

Challenge-luku (x LD ₅₀)	Eloonsijäviiden eläinten määrä:		a) endoksaanimalli		b) poltetun hiiren malli	
	3 µg	1 µg	0,3 µg	0,1 µg	0,03 µg	0,01 µg
	a) b)	a) b)	a) b)	a) b)	a) b)	a) b)
10	100% 80%	89% 90%	100% 90%	89% 40%	100% 60%	70% 78%
30	100% 80%	100% 30%	90% 20%	80% 10%	50% 20%	40% 20%
100	80% 60%	90% 20%	90% 10%	90% 0%	100% 0%	30% 20%
300	90% 50%	90% 10%	100% 0%	90% 10%	80% 20%	20% 0%
1000	100% 30%	100% 20%	70% 0%	100% 10%	90% 20%	20% 0%

Niiden vasta-aineiden suojavaikutuksen suora osoitus, joita tulee käyttää passiiviseen immunisointiin (seerumihoitoon), voidaan osoittaa ainoastaan eläinmallissa. Tilanteiden simuloimiseksi, jotka altistavat potilaat *Pseudomonas*-infektioille, suoritettiin kirjallisuudesta tunnettu Endoxan-malli (Cryz, S.J. Jr., Fürer, E., Germanier, R. (1983) Passive Protection Against *Pseudomonas aeruginosa* Infection in an Experimental Leukopenic Mouse Model. *Infect. Immunity* 40, 659 - 664).

Tässä testissä selvitettiin *Pseudomonas aeruginosa*-itiöiden LD₅₀-annos immunsupprimoiduissa eläimissä; - tässä esitetyn testin kohdalla tämä oli $9,5 \times 10^2$ itiötä. 2 tuntia passiivisen immunoinnin jälkeen hiiren anti-*Pseudomonas aeruginosa* M-2-hyperimmunplasmalla, jolle määritettiin vasta-aine-ELISASSA titteriasteeksi 1 : 1600, tartutettiin immunsuprimoidut eläimet homologisen *Pseudomonas*-kannan edellä selvitetyn LD₅₀-itiömäärän moninkertaisella määrällä.

Taulukko 8 osoittaa, että passiivisesti immunisoidut eläimet on suojattu Challenge-itiön 30-kertaiseen LD₅₀-annokseen asti.

Taulukko 8

Passivinen Pseudomonas-suojakoe

Inokulointi 2 h ennen infektiota	E n d o k s a a n i m a l l i	
	Elossa olevien eläinten määrä 3 päivän kuluttua (eläinten määrä kokeessa)	0,1 ml hyperimmuuniplasma i.v.
3 LD ₅₀ M-2:sta	0 (10)	0,1 ml hyperimmuuniplasma i.v.
10 LD ₅₀ M-2:sta	0 (10)	
30 LD ₅₀ M-2:sta	0 (10)	9 (10)
100 LD ₅₀ M-2:sta	0 (10)	8 (10)
300 LD ₅₀ M-2:sta	0 (10)	6 (10)
		0 (10)
		0 (10)

Patenttivaatimukset:

1. Menetelmä *Pseudomonas aeruginosa* -infektioihin tehoavien koostumusten valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että steriilisuodatetaan *Pseudomonas aeruginosa* -viljemistä saadut, puhdistetut *Pseudomonas-flagella*(H) -antigeenit, jotka koostuvat monomeerisistä osista, jolloin

- a) jokainen monomeerinen osa sisältää seuraavat aminohapot: asparagiinihappo (Asp), treoniini (Thr), seriini (Ser), glutamiinihappo (Glu), glysiini (Gly), alaniini (Ala), valiini (Val), isoleusiini (Ile), leusiini (Leu), tyrosiini (Tyr), fenyylialaniini (Phe), lysiini (Lys), arginiini (Arg) ja mahdollisesti tryptofaani (Trp) ja metioniini (Met),
- b) jokaisessa monomeerisessä osassa on N-terminaalinen aminohapposekvenssi alaniini (Ala) - leusiini (Leu) - treoniini (Thr) - valiini (Val) - asparagiini (Asn) - treoniini (Thr) - asparagiini (Asn) - isoleusiini (Ile) - alaniini (Ala),
- c) jokaisen monomeerisen osan molekyylipaino on 43.500 - 53.050 ja
- d) jokainen monomeerinen osa on vapaa proliinista, puolikystiinistä ja histidiinistä, jolloin etenkin steriilisuodatetaan

uusi H-serotyyppin a_0 , a_3 , a_4 flagella(H)-antigeeni, jonka monomeerinen muoto sisältää aminohapot asparagiinihappo, treoniini, seriini, glutamiinihappo, glysiini, alaniini, valiini, isoleusiini, leusiini, tyrosiini, fenyylialaniini, lysiini ja arginiini suhteessa 64 : 33 : 35 : 42 : 44 : 68 : 29 : 29 : 37 : 3 : 10 : 19 : 15 ja jonka molekyylipaino on 43.500,

uusi H-serotyyppin a_0 , a_3 flagella(H)-antigeeni, jonka monomeerinen muoto sisältää aminohapot asparagiinihappo, treoniini, seriini, glutamiinihappo, glysiini, alaniini, valiini, iso-

leusiini, leusiini, tyrosiini, fenyylialaniini, lyysiini ja arginiini suhteessa 69 : 35 : 38 : 44 : 47 : 73 : 30 : 30 : 60 : 3 : 12 : 21 : 16 ja jonka molekyylipaino on 46.700,

uusi H-serotyyppin a_0 flagella(H)-antigeeni, jonka monomeerinen muoto sisältää aminohapot asparagiinihappo, treoniini, seriini, glutamiinihappo, glysiini, alaniini, valiini, isoleusiini, leusiini, tyrosiini, fenyylialaniini, lyysiini ja arginiini suhteessa 74 : 50 : 49 : 49 : 49 : 89 : 37 : 29 : 44 : 5 : 14 : 17 : 16 ja jonka molekyylipaino on 52.720,

uusi H-serotyyppin b flagella(H)-antigeeni, jonka monomeerinen muoto sisältää aminohapot asparagiinihappo, treoniini, seriini, glutamiinihappo, glysiini, alaniini, valiini, isoleusiini, leusiini, tyrosiini, fenyylialaniini, lyysiini ja arginiini suhteessa 74 : 48 : 48 : 49 : 51 : 91 : 38 : 30 : 43 : 4 : 13 : 8 : 18 ja jonka molekyylipaino on 53.050,

uusi H-serotyyppin a_0 , a_1 , a_2 flagella(H)-antigeeni, jonka monomeerinen muoto sisältää aminohapot asparagiinihappo, treoniini, seriini, glutamiinihappo, glysiini, alaniini, valiini, isoleusiini, leusiini, tyrosiini, fenyylialaniini, lyysiini ja arginiini suhteessa 76 : 44 : 40 : 52 : 50 : 81 : 32 : 32 : 41 : 4 : 12 : 20 : 18 ja jonka molekyylipaino on 51.250,

uusi H-serotyyppin a_0 , a_2 flagella(H)-antigeeni, jonka monomeerinen muoto sisältää aminohapot asparagiinihappo, treoniini, seriini, glutamiinihappo, glysiini, alaniini, valiini, isoleusiini, leusiini, tyrosiini, fenyylialaniini, lyysiini ja arginiini suhteessa 68 : 41 : 37 : 46 : 44 : 73 : 29 : 29 : 37 : 3 : 10 : 16 : 16 ja jonka molekyylipaino on 45.900,

mahdollisesti sekoitetaan steriilisuodattuksesta saatu tuote apuaineen, kuten $Al(OH)_3$, kanssa, ja haluttaessa siihen sekoitetaan säilöntäainetta, kuten mertiolaattia ja muodostetaan galeeniseksi valmisteeksi.

2. Menetelmä immunoglobuliin-G-pitoisten, bakteerin *Pseudomonas aeruginosa* -infektioihin vaikuttavien, profylaktiseen ja terapeuttiseen käyttöön tarkoitettujen valmisteiden tuottamiseksi, jotka valmisteet sisältävät flagella(H)-vasta-aineita, joilla on motiliteettiä estävä vaikutus ja parempi *Pseudomonas aeruginosa* -bakteerien fagosytoosi ja intrasellulaarinen tuhoamis-kyky, t u n n e t t u siitä, että suojaavilla flagella(H)-antigeeneillä immunoitujen verenluovuttajien tai vastaavasti nisäkkäiden plasma käsitellään proteiinisäostusaineilla, kuten ammoniumsulfaatilla, saostettu immunoglobuliini-G-pitoinen fraktio liuotetaan ja puhdistetaan.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että immunoglobuliini-G-pitoisen fraktion puhdistus suoritetaan siten, että liuos johdetaan jonkin kantoväliaineen läpi, johon on sitoutunut kovalenttisesti monomeerisessä tai polymeerisessä muodossa esiintyvä puhdistettu flagelli--antigeeni, eluoidaan flagellispesifinen vasta-aine pH-muutoksella tai kaotrooppisella aineella, kuten NH_4SCN :llä geelistä ja valmistetaan galeeniseen muotoon.

Patentkrav:

1. Förfarande för framställning av sammansättningar som är verksamma mot *Pseudomonas aeruginosa* -infektioner, k ä n n e t e c k n a t av att man sterilfiltrerar renade *Pseudomonas-flagella*(H)-antigener erhållna från kulturer av *Pseudomonas aeruginosa*, vilka antigener består av monomera delar, varvid varje monomer del
- a) innehåller följande aminosyror: asparaginsyra (Asp), treonin (Thr), serin (Ser), glutaminsyra (Glu), glycin (Gly), alanin (Ala), valin (Val), isoleucin (Ile), leucin (Leu), tyrosin (Tyr), fenylalanin (Phe), lysin (Lys), arginin (Arg) och möjligen tryptofan (Trp) och metionin (Met),
 - b) uppvisar den N-terminala aminosyrasekvensen alanin (Ala) - leucin (Leu) - treonin (Thr) - valin (Val) - asparagin (Asn) - treonin (Thr) - asparagin (Asn) - isoleucin (Ile) - alanin (Ala),
 - c) uppvisar en molekylvikt på mellan 43.500 och 53.050 och
 - d) är fri från prolin, halv-cystin och histidin, varvid man i synnerhet sterilfiltrerar

den nya flagella(H)-antigenen av H-serotyp a_0, a_3, a_4 , vars monomera form innehåller aminosyrorna asparaginsyra, treonin, serin, glutaminsyra, glycin, alanin, valin, isoleucin, leucin, tyrosin, fenylalanin, lysin och arginin i ett förhållande av 64 : 33 : 35 : 42 : 44 : 68 : 29 : 29 : 37 : 3 : 10 : 19 : 15 och uppvisande en molekylvikt på 43.500,

den nya flagella(H)-antigenen av H-serotyp a_0, a_3 , vars monomera form innehåller aminosyrorna asparaginsyra, treonin, serin, glutaminsyra, glycin, alanin, valin, isoleucin, leucin, tyrosin, fenylalanin, lysin och arginin i ett förhållande av 69 : 35 : 38 : 44 : 47 : 73 : 30 : 30 : 60 : 3 : 12 : 21 : 16 och uppvisande en molekylvikt på 46.700,

den nya flagella(H)-antigenen av H-serotyp a_0 , vars monomera form innehåller aminosyrorna asparaginsyra, treonin, serin, glutamin-syra, glycin, alanin, valin, isoleucin, leucin, tyrosin, fenyl-alanin, lysin och arginin i ett förhållande av 74 : 50 : 49 : 49 : 49 : 89 : 37 : 29 : 44 : 5 : 14 : 17 : 16 och uppvisande en molekylvikt på 52.720,

den nya flagella(H)-antigenen av H-serotyp b, vars monomera form uppvisar aminosyrorna asparaginsyra, treonin, serin, glutaminsyra, glycin, alanin, valin, isoleucin, leucin, tyrosin, fenylalanin, lysin och arginin i ett förhållande av 74 : 48 : 48 : 49 : 51 : 91 : 38 : 30 : 43 : 4 : 13 : 18 : 18 och uppvisande en molekylvikt på 53.050,

den nya flagella(H)-antigenen av H-serotyp a_0 , a_1 , a_2 , vars monomera form uppvisar aminosyrorna asparaginsyra, treonin, serin, glutaminsyra, glycin, alanin, valin, isoleucin, leucin, tyrosin, fenylalanin, lysin och arginin i ett förhållande av 76 : 44 : 40 : 52 : 50 : 81 : 32 : 32 : 41 : 4 : 12 : 20 : 18 och uppvisande en molekylvikt på 51.250,

den nya flagella(H)-antigenen av H-serotyp a_0 , a_2 , vars monomera form uppvisar aminosyrorna asparaginsyra, treonin, serin, glutaminsyra, glycin, alanin, valin, isoleucin, leucin, tyrosin, fenylalanin, lysin och arginin i ett förhållande av 68 : 41 : 37 : 46 : 44 : 73 : 29 : 29 : 37 : 3 : 10 : 16 : 16 och uppvisande en molekylvikt på 45.900,

produkten som erhållits från sterilfiltreringen blandas möjligen med en adjuvens, såsom $Al(OH)_3$ och, om så önskas, tillsätts ett konserveringsmedel, såsom mertiolat, och produkten formuleras till ett galeniskt preparat.

2. Förfarande för framställning av immunoglobulin-G-haltiga preparat som är verksamma mot *Pseudomonas aeruginosa*-bakterie-infektioner och avsedda för profylaktisk och terapeutisk användning, vilka preparat uppvisar flagella(H)-antikroppar

med en motilitetshämmande verkan och med förmåga till förhöjd fagocytos och förhöjd intracellulär avdödning av *Pseudomonas aeruginosa* -bakterier, k ä n n e t e c k n a t av att plasma från blodgivare respektive däggdjur som immuniserats med protektiva flagella(H)-antigener behandlas med proteinutfällningsmedel, såsom ammoniumsulfat, den utfällda immunoglobulin-G-haltiga fraktionen löses och renas.

3. Förfarande enligt patentkrav 2, k ä n n e t e c k n a t av att reningen av den immunoglobulin-G-haltiga fraktionen utförs på sådant sätt, att lösningen leds genom ett sådant bärarmedium, till vilket renade flagella-antigener i monomer eller polymer form är kovalent bundna, de flagellspecifika antikropparna elueras från gelen medelst ändring av pH-värdet eller med hjälp av kaotropa ämnen, såsom NH_4SCN och formuleras till ett galeniskt preparat.