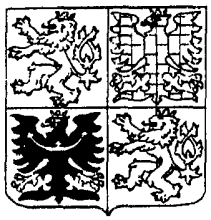
ČESKÁ REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(22) 23.02.95

(32) 23.02.94

(31) 94/200346

(33) US

(40) 11.12.96

(21) 2503-96

(13) A3

6(51) A 61 K 39/00
A 61 K 39/02

(71) ORAVAX, INC., Cambridge, MA, US;

(72) Michetti Pierre, Lausanne, CH;
Corthesy-Theulaz Irene, Lausanne, CH;
Blum André, Lausanne, CH;
Davin Catherine, Lausanne, CH;
Haas Rainer, Tubingen, DE;
Kraehenbuhl Jean-Pierre, Epalinges, CH;
Saraga Emilia, Lausanne, CH;

(54) **Použití prostředku obsahujícího Helicobacter ureasový peptid, použití protilátky, která rozpoznává Helicobacter ureasu, použití anti-idiotypové protilátky na Helicobacter ureasu, prostředek pro léčení gastroduodenálního onemocnění, prostředek pro léčení Helicobacter infekce, použití prostředku obsahujícího Helicobacter pylori ureasový polypeptid a prostředek pro prevenci Helicobacter pylori infekcí**

(57) Je popsáno použití prostředku obsahujícího Helicobacter ureasový peptid pro přípravu léčivého přípravku pro léčení gastroduodenálního onemocnění savců. Je popsáno také použití protilátky, která rozpoznává Helicobacter ureasu, a antiidiotypové protilátky na Helicobacter ureasu pro přípravu léčivého přípravku pro léčení savce infikovaného Helicobacter.Je popsán prostředek obsahující Helicobacter ureasový peptid, a prostředek užitečný pro léčení Helicobacter pylori infekce člověka, který obsahuje ure B podjednotku Helicobacter pylori ureasy, mukozní adjuvans a hydroxyapatit. Dále je popsán prostředek užitečný pro léčení gastroduodenálního onemocnění savce.

Použití prostředku obsahujícího Helicobacter ureasový peptid, použití protilátky, která rozpoznává Helicobacter ureasu, použití anti-idiotypové protilátky na Helicobacter ureasu, prostředek pro léčení gastroduodenálního onemocnění, prostředek pro léčení Helicobacter infekce, použití prostředku obsahujícího Helicobacter pylori ureasový polypeptid a prostředek pro prevenci Helicobacter pylori infekcí

Oblast techniky

Předložený vynález se týká použití prostředku obsahujícího Helicobacter ureasový peptid, použití protilátky, která rozpoznává Helicobacter ureasu, použití anti-idiotypové protilátky na Helicobacter ureasu, prostředku pro léčení gastroduodenálního onemocnění, prostředku pro léčení Helicobacter infekce, použití prostředku obsahujícího Helicobacter pylori ureasový polypeptid a prostředku pro prevenci Helicobacter pylori infekcí. Předložený vynález se tedy týká prevence a léčení žaludečních infekcí u savců, včetně člověka. Podrobněji se předložený vynález týká vakcíny, která je vhodná pro použití pro prevenci a léčení Helicobacter infekce savců, včetně člověka, a způsobu léčení lidí, kteří trpí žaludeční infekcí a jejími důsledky, jako je chronická gastritida nebo peptický vřed, a pro prevence rakoviny žaludku.

Dosavadní stav techniky

Helicobacter infekce žaludeční výstelky člověka způsobují gastritidu, jsou hlavním faktorem ve vývoji peptických vředů a žaludečního lymfomu a mohou být rizikovým faktorem pro vývoj rakoviny žaludku [Blaser M.J.: "Gastric Campylobacter-like Organisms, Gastritics and Peptic Ulcer Disease" v Gastroeneterology 93, 371 (1987), Graham D.Y.: "Campylobacter pylori and Peptic Ulcer Disease" v Gastroenterology 196, 615 (1989), Parsonnet J. a spol.: "Helicobacter pylori Infection in Intestinal and Diffuse-Type Gastric Adenocarcinomas" v J. Natl. Cancer Inst. 93, 640 (1991), Wotherspoon A.C. a spol.: "Regression of

Primary Low-Grade B-Cell Gastric Lymphoma of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Type After Eradication of Helicobacter pylori" v Lancet 342, 575 (1993).]. Nejčastějším infekčním činidlem je Helicobacter pylori, následovaný mnohem méně častým Helicobacter heilmanii. Helicobacter pylori je tenký gramnegativní mikroorganismu tvaru S, který se běžně isoluje po biopsii žaludku dospělých i dětí s histologickým průkazem gastritidy nebo peptického zvředovatění. Důkaz příčinného vzájemného vztahu mezi Helicobacter pylori a gastroduodenálním onemocněním pochází ze studií lidských dobrovolníků, pacientů se vředy a rakovinou žaludku, gnotobiotických prasat a bezmikrobních, tj. sterilních hlodavců. Pokud jde o etiologii, Kochovým postulátům bylo vyhověno dosažením histologicky potvrzené gastritidy u předem neinfikovaných jednotlivců po požití životaschopných mikroorganismů [Marshall B.J. a spol.: "Attempt to Fulfill Koch's Postulate for pyloric Campylobacter" v Med. J. Aust. 142, 436 (1985), Morris A. a spol.: "Ingestion of Campylobacter pyloritis Causes Gastritis and Raised Fasting Gastric pH" v Am. J. Gastroenterol. 82, 192 (1987), Engstrand L. a spol.: "Inoculation of Barrier-Born Pigs With Helicobacter pylori: A Useful Animal Model for Gastritis Type B" v Infect. Immun. 53, 1763 (1990), Fox J. G. a spol.: "Gastric Colonization by Campylobacter pylori Subsp. Mustelae in Ferrets" v Infect. Immun. 56, 2994 (1988), Fox J.G. a spol.: "Helicobacter mustelae-Associated Gastritis in Ferrets: An Animal Model of Helicobacter pylori Gastritis in Humans" v Gastroenterology 99, 352 (1990), Lee A. a spol.: "A Small Animal Model of Human Helicobacter pylori Active Chronic Gastritis" v Gastroenterology 99, 1315 (1990), Fox J.G. a spol.: "Helicobacter Felis Gastritis in Gnotobiotics Rats: An Animal Model of Helicobacter pylori Gastritis" v Infect. Immun. 59, 785 (1991), Eaton K.A. a spol.: "Campylobacter pylori Virulence Factors in Gnotobiotic Piglets" v Infect. Immun. 57, 1119 (1989).] a léčením, kterým se vymýtí Helicobacter pylori, čímž se odstraní gastritida, a u pacientů s onemocněním peptickým vředem dochází ke snížení frekvence recidiv [Peterson W.L.: "Helicobacter pylori and peptic Ulcer Disease" v N. Engl. J. Med. 324, 1043 (1991).].

Mezi gastrodueodenální onemocnění, o kterých se předpokládá, že souvisejí s Helicobacter infekcí, patří akutní, chronická a atrofní gastritida, peptické vředové onemocnění včetně jak žaludečních tak duodenálních vředů, rakovina žaludku, chronická dyspepsie se silnou erozivní gastroduodenitidou, úporná nevředová dyspepsie, intestinální metaplasie a MALT lymfom nízkého stupně. Helicobacter infekce je také základní příčinou asymptomatické chronické gastritidy.

Přes in vitro citlivost na mnoho antimikrobiálních činidel, se in vivo potlačení existujících Helicobacter pylori infekcí často obtížně dosahuje antimikrobiálními činidly [Czinn S.J. a Nedrud J.G.: "Oral Immunization Against Helicobacter pylori" v Infect. Immun. 59, 2359 (1991).]. Tento mikroorganismus se nalézá v mukózním potahu překrývajícím žaludeční výstelku a v žaludečních jamkách. To jsou místa, která zřejmě neumožňují dosažení příslušných antimikrobiálních hladin, i když se antibiotika podávají orálně ve vysokých dávkách. V dnešní době většina autorit doporučuje "trojité léčení", konkrétně vismutovou sůl v kombinaci s takovými léčivými přípravky, jako je tetracyklin a metronidazol, po dobu 2 až 4 týdnů. Účinnost tohoto nebo jiných chemoterapeutických režimů však často zůstává pod optimální úrovní. Nedávno panel lékařských expertů Národních ústavů zdraví doporučil pro léčení peptických vředů trojitou terapii s vismutem, tetracyklinem a metronidazolem podávanou po dobu dvou týdnů [Cimons M.: "Drug Combination Found Effective on Peptic Ulcers" v L.A. Times v A14 (10. února 1994).]. Toto léčení je však obvykle doprovázeno diareou a může vést k vážným nepříznivým reakcím na léčivý přípravek [viz Dick-Hegedus E. a Lee A.: "Use of a Mouse Model to Examine Anti-Helicobacter pylori Agents" v Scand. J. Gastroenterol. 26, 909 (1991).]. Léčení antibiotiky také nemusí vyřešit problém opětné infekce. V některých studiích existuje důkaz vysokého výskytu opětné infekce [Coelho L.G. a spol.: "Duodenal Ulcer and Eradication of H. pylori in a Developing Countries: An 18-month Follow-Up Study" v Scand. J. Gastroenterol. 27, 362 (1992).]. Existuje tedy velká potřeba vakcíny, která by se

mohla používat pro léčení infekce a pro předcházení budoucích infekcím.

V současné době je o roli mukózních imunních systémů v žaludku známo jen velmi málo. Distribuce buněk produkujících imunoglobulin (Ig) v normální žaludeční dutině ukazuje, že IgA plasmové buňky tvoří až 80 % z celkové populace plasmových buněk. Počet plasmových IgA buněk přítomných v žaludeční dutině je srovnatelný s jinými mukózními membránami [Brandtzaeg P.: "Role of J Chain and Secretory Component in Receptor-Mediated Glandular and Hepatic Transport of Immunogobulins in Man" v Scand. J. Immunol. 22, 111 (1985), Brandzaeg P. a spol.: "Production and Secretetion of Immunoglobulins in the Gastrointestinal Tract" v Ann. Allergy 59, 21 (listopad 1987).]. Četné studie u lidí [Wyatt J.I. a spol.: "Local Immune Response to Gastritis Campylobacter in Non-ulcer Dyspepsia" v J. Clin. Path. 39, 863 (1986).] a u zvířecích modelů [Fox J.G. a spol.: "Helicobacter mustelae-Associated Gastritis in Ferrets: An Animal Model of Helicobacter pylori Gastritis in Humans" v Gastroenterology 99, 352 (1990), Fox J.G. a spol.: "Helicobacter felis Gastritis in Gnotobiotic Rats: An Animal Model of Helicobacter pylori Gastritis" v Infect. Immun. 59, 785 (1991), Fox J.G. a spol.: "Local and Systematic Immune Responses in Murine Helicobacter felis Active Chronic Gastritis" v Infect. and Immun. 61, 2309 (1993).] prokázaly specifické IgG a IgA odpovědi v seru a v žaludečních sekretech jako odpověď na Helicobacter infekci. Avšak zjištění, že Helicobacter pylori infekce přetrvává jako chronická infekce po léta, navzdory indukci lokální a systémové imunní odpovědi, není povzbuzující pro vývoj imunitních strategií.

Lee a spol. popsali schopnost infikovat bezmikrobní hlodavce bakterií Helicobacter felis, blízce příbuznou s Helicobacter pylori, a reprodukovatelně dokumentovali histologickou gastritidu [Lee A. a spol.: "A Small Animal Model of Human Helicobacter pylori Active Chronic Gastritis" v Gastroenterology 99, 1315 (1990), Fox J.G. a spol.: "Helicobacter felis Gastri-

tis in Gnotobiotic Rats: An Animal Model of Helicobacter pylori Gastritis" v Infect. Immun. 59, 785 (1991).]. Od té doby je tento pár bakterie-hostitel přijat jako dobrý model pro studium Helicobacter-vyvolané gastritidy a její iniciující faktory [Lee A. a spol.: "Pathogenicity of Helicobacter pylori: A Perspective" v Infect. Immun. 61, 1601 (1993).]. Infekce myší H. felis vede k podobné pathologické odpovědi, jako je ta, která byla nalezena u lidí infikovaných H. pylori; oba typy infekcí vedou k aktivní, chronické gastritidě [Lee a spol.: Gastroenterology 99, 1315 (1990).]. Výzkumníci zjistili, že Helicobacter felis má stejnou vnímavost na antimikrobiální terapii jako Helicobacter pylori. Model H. felis/myš se používá pro vývoj nových léčení infekce H. pylori [Dick-Hegedus E. a Lee A.: "Use of a Mouse Model to Examine Anti-Helicobacter pylori Agents" v Scand. J. Gastroenterol. 26, 909 (1991), Chen a spol.: "Immunization Against Gastric Helicobacter Infection in Mouse/Helicobacter felis model" v Lancet 339, 1120 (1992).]. Czinn a spol. ukázali, že opakovaná orální imunizace surovým lyzátem Helicobacter pylori s přísadou toxinu cholery indukuje u myší a fretek silnou gastrointestinální IgA anti-Helicobacter pylori odpověď [Czinn S.J. a Nedrud J.G.: "Oral Immunization Against Helicobacter pylori" v Infect. Immun. 59, 2359 (1991).]. Chen a spol. a Czinn a spol. nedávno popsali, že orální imunizace surovým lyzátem H.fellis indukovala u myší ochranu proti H. felis infekci [Chen a spol.: "Immunization Against Gastric Helicobacter Infection in Mouse/Helicobacter felis Model" (letter) v Lancet 339, 1120 (1992), Czinn a spol.: "Oral Immunization Protects Germ-Free Mice Against Infection from Helicobacter felis" v Proceedings of the DDW, American Gastroenterological Association, 1321, A-331 (10. až 13. května 1992), Czinn a spol.: Vaccine 11, 637 (1993).]. Přesná povaha antigenu (antigenů) odpovědného (odpovědných) za indukci této ochrany však nebyla stanovena a nebyla uvedena žádná informace o tom, že by ochranný antigen (ochranné antigeny) H. felis, který (které) indukuje (indukují) ochranu proti tomuto pathogenu, indukoval(y) zkříženou ochranu i na jiné druhy Helicobacter.

My jsme poprvé ukázali, že Helicobacter pylori a H. felis sdílely antigenní determinanty získáním monoklonálních protilátek po orální imunizaci myší ultrazvukovými lyzáty (tzv. sonikáty) buď Helicobacter pylori nebo H. felis a že některé z těchto protilátek, směrované proti Helicobacter pylori, by mohly zkříženě reagovat s H. felis a naopak [Michetti P. a spol.: "Specificity of Mucosal IgA Response in Balb/C Mice Following H. felis or Helicobacter pylori Challenges" v Proceedings of the DDW, American Gastroenterological Association, 1001, A-251 (10. až 13. května 1992), Davin C a spol.: "Helicobacter pylori Urease Elicits Protection Against H. felis Infection in Mice" v Proceedings of the DDW, American Gastroenterological Association, 1213, A-304 (16. až 19. května 1993).], ale podstata těchto zkřížených reaktivit nebyla známa.

Na základě homologie existující mezi aminokyselinovými sekvencemi různých známých ureas bylo navrženo, že ureasa bobu východoindického chlebovníku by se mohla použít jako vakcína proti Helicobacter pylori [Pallen M.J. a Clayton C.L.: "Vaccination Against Helicobacter pylori Urease" v Lancet 336, 186 (1990).]. Nicméně, přes homologii mezi sekvencemi různých ureas není zkřížená reaktivita pravidlem. Guo a Liu před lety ukázali, že ureasy z Proteus mirabilis, Proteus vulgaris a Providencia rettgeri vykazují navzájem zkříženou reaktivitu, zatímco ureasy z bobu východoindického chlebovníku a Morganella morganii jsou imunologicky jiné než tři předcházející ureasy [Guo M. a Liu P.V.: "Serological Specificities of Ureases of Proteus Species" v J. Gen. Microbiol. 136, 1995 (1965).]. Takže i když antigenní zkřížená reaktivita Helicobacter pylori ureasy s jinými Helicobacter ureasami byla odůvodněně navržena, neexistovala žádná data, která by ukazovala, že tomu tak skutečně je až do té doby, než jsme ukázali, že některé H. felis monoklonální protilátky zkříženě reagovaly s Helicobacter pylori ureasou [Davin C. a spol.: "Helicobacter pylori Urease Elicits Protection Against H. felis Infection in Mice" v Proceedings of the DDW, American Gastroenterological Association, 1213, A-304 (16. až 19. května 1993).]. J. Pappo dále ukázal, že

myši, které byly infikovány H. felis, produkují protilátky, které zkříženě reagují s Helicobacter pylori ureasou ale nikoliv urasou bobu východindického chlebovníku[J. Pappo: nepublikovaná data, 1993.]. Skutečnost, že ureasa bobu východoindického chlebovníku nespadá do stejné imunologické kategorie jako Helicobacter ureasa, ukazuje na to, že ureasa bobu východoindického chlebovníku nemusí být užitečná pro imunizaci proti Helicobacter infekcím, což platí pro střevní bakterie [Pimental J.L. a Cook M.E.: "Improved Growth in the Progeny of Hens Immunized with Jackbean Urease" v Poultry Sci. 64, 434 (1988).]. Dále pak pokusy imunizovat myši proti infekci H. felis orálním nebo intraperitoneálním podáním ureasy bobu východoindického chlebovníku vedly k získání protilátek proti urease východindického chlebovníku, ale selhaly jako ochrana myší proti infekci [Chen M. a spol.: "Failure of Immunization Against Helicobacter Using Jack Bean Urease" v Acta Gastroenterol. Belg. 56, 94 (1993).].

Použití antigenu, který je reakčním produktem ureasy a glutaraldehydu, je popsáno v USA patentu č. 4 837 017 ("Urease Antigen Product and Process") LeVeena a spol. ze 6. června 1989. Tento patent popisuje použití antigenu pro snížení toxicity amoniaku způsobené organismy štěpícími močovinu. LeVeen a spol. popisují injekci glutaraldehydem zpracované ureasy bobu východoindického chlebovníku do krevního oběhu. LeVeenův patent nepopisuje podání ureasového antigenu do mukózního povrchu savce, aby se stimulovala produkce protilátek lokálním imunním systémem. A dále, ve spisu neexistuje žádný důkaz, že injekce antigenu ureasy bobu východoindického chlebovníku by mohla zabránit Helicobacter infekci nebo být použita pro léčení gastroduodenální infekce způsobené Helicobacter.

Eaton a spol. ukázaly, že kultury mutantu H. pylori se slabou ureasovou aktivitou nejsou schopny infikovat gnotobiotická selata [Eaton a spol.: "Essential Role of Urease in the Pathogeness of Gastritis Induced by Helicobacter pylori in Gnotobiotic Piglets" v Gastroenterology 98, A654 (1990).]. Ea-

ton nepopisuje použití ureasového antigenu jako vakcíny pro prevenci Helicobacter infekce nebo jako způsob léčení Helicobacter infekce.

Použití Helicobacter pylori ureasy nebo podobných ureas, jako vakcíny proti Helicobacter pylori infekci bylo již dříve navrženo A. Labignem a je zahrnuto v nárocích patentu podaného 6. října 1988 Pasteurovým ústavem v Paříži, Francie [Labigne A.: "Sequences of Nucleotides Coding for a Protein Having an Urease Activity", spis EPO 367 644 A1, 1989, mezinárodní spis č. WO 90/04030, 1990.]. Spis tohoto dokumentu však neobsahuje důkaz vakcinace ureasou jakékohokoliv savce proti Helicobacter infekci. Tato část patentu Pasterova ústavu tedy nebyla zpracována pro praxi a příslušné nároky (nárok 27 a 28, str. 16) by neměly být považovány za platné. Navíc se nároky tohoto dokumentu týkají proteinu s ureasovou aktivitou. Z níže popsaných pokusů bude jasné, že enzymová aktivita vakcíny na bázi ureasy není potřebná pro vyvolání ochrany po orální imunizaci.

Navíc, i když homologie sekvence s jinou bakteriální ureasou by mohla podporovat použití ureasy jako kadidáta vakcíny proti Helicobacter pylori infekci, současná znalost lidské Helicobacter infekce by použití ureasy jako kadidáta vakcíny proti Helicobacter pylori infekci zajisté nepodporovala. Za prvé, na rozdíl od skutečnosti, že infikovaní jednotlivci často mají silnou protilátkovou odpověď na ureasu, anti-ureasová imunitní odpověď nevede k odstranění nebo regulaci infekce. Za druhé, Helicobacter pylori je schopna transportovat ureasu z buňky a odstranit ji z jejího povrchu [Evans D.J. a spol.: "Urease-Associated Heat Shock Protein of Helicobacter pylori" v Infect. Immun. 60, 2125 (1992), Ferrero R.L. a Lee A.: The Importance of Urease in Acid Protection for Gastric-Colonizing Bacteria Helicobacter pylori and Helicobacter felis sp. nov." v Microb. Ecol. Health Dis. 4, 121 (1991).]. Ureasa tedy nemusí představovat příslušný cíl pro vývoj ochranné mukózní imunitní odpovědi. O mukózní imunitní ochraně se uvažuje, že je zprostředkována hlavně sekretovaným IgA, jehož aglutinující aktivi-

ta by byla narušena, kdyby mohl být rozpoznaný antigen odstraněn cílovým pathogenem. Za třetí, ureasa se zdá být toxická pro epitelní buňky v kultuře. Existuje podezření, že hraje roli při degradaci sliznice a při peptickém vředovatění in vivo [Mégraud F. a spol.: "Further Evidence of the Toxic Effect of Ammonia Produced by Helicobacter pylori Urease on Human Epithelial Cells" v Infect. and Immun. 60, 1858 (1992), Murakami M. a spol.: "Gastric Ammonia has a Potent Ulcerogenic Action on the Rat Stomach" v Gastroenterology 105, 1710 (1993).]. Její použití jako antigenu může tedy být toxické.

Nicméně jsme si uvědomili, že tento antigen by mohl být potenciálně účinnou vakcínou, jestliže:

- za prvé, bychom ho orálně dodávali v dostatečně vysoké dávce, aby se vyvolala silnější imunitní odpověď než ta, která existuje přirozeně,
- za druhé, množství produkovaných protilátek by bylo dostatečně vysoké na to, aby vázalo všechnu ureasu, odstraněnou nebo neodstraněnou a
- za třetí, použili bychom podjednotky ureasy nebo molekulární částice, které nejsou toxické.

Jiný aspekt tohoto vynálezu popisuje použití protilátek proti urease k prevenci a léčení Helicobacter infekce. Evropská patentová přihláška č. 91310049.1, podaná Kunido Andou 31. října 1991, která nárokuje prioritu japonské patentové přihlášky č. 296609/90 z 1. listopadu 1990 nazvané "A Method for Producing a New Medicine for Both Treating and Preventing Peptic Ulcer Diseases and Gastritis and Thus Formulated Medicines", popisuje orální podávání polyklonálních protilátek odvozených od hovězího mleziva a hovězího sera pacientům s aktivní chronickou gastritidou typu B a pacientům s duodenálním vředem. Andova přihláška popisuje použití protilátkového přípravku směrovaného proti mnoha antigenům včetně Helicobacter pylori a nepopisuje použití protilátky proti urease pro léčení nebo předcházení Helicobacter pylori infekce. Použití protilátek pro léčení žaludečního onemocnění u gnotobiotických selat bylo po-

psáno v USA patentech č. 5 258 178 a 5 260 057 Cordleho a Schallera s názvem "Method and Product for the Treatment of Gastric Disease". Patenty Cordleho a Schallera popisují použití protilátkového přípravku, který neobsahuje pouze protilátky proti Helicobacter pylori a nepopisuje použití protilátky proti urease pro léčení nebo předcházení Helicobacter pylori infekce. Nagata a spol. popisují přípravek monoklonální protilátky proti Helicobacter pylori, který inhibuje ureasovou aktivitu [Nagata K. a spol.: "Monoclonal Antibodies Against the Native Urease of Helicobacter pylori: Synergistic Inhibition of Urease Activity by Monoclonal Antibody Combinations" v Infect. and Immun. 60, 4826 (1992).]. Nagata a spol. nepopisují použití monoklonálních protilátek proti urease pro léčení nebo předcházení Helicobacter pylori infekce.

V literatuře je dostupno velmi málo příkladů terapeutických vakcín. Většina z nich se týká parenterální imunizace s cílem stimulovat hostitelský imunitní systém proti maligním nádorům, modulovat imunitní systém při autoimunitních onemocněních, jako je revmatická artritida nebo desenzibilizace u alergických stavů. Byly popsány také terapeutické vakcinační postupy proti různým infekcím, většina z nich parenterálním způsobem imunizace. Patří mezi ně imunizace proti lepře u lidí [Zaheer S.A. a spol.: "Combined Multidrug and Mycobacterium w Vaccine Therapy in Patients with Multibacillary Leprosy" v J. Infect. Dis. 167, 401 (1993), Mukherjee A. a spol.: "Histopathological Monitoring of an Immunotherapeutic Trial with Mycobacterium w." v Int. J. Lepr. Other Mycobat. Dis. 60, 28 (1992).] společně s antibiotickou terapií, vakcinací proti Phythiosis insidiori, mykologickou infekcí u koní [Mendoza L. a spol.: "Evaluation of Two Vaccines for the Treatment of Phythiosis insidiori in Horses" v Mycopathologia 119, 89 (1992).], nekontrolovaná studie použití autovakcín v chronické osteomyelitidě [Sologub V.V.: "Experience in Using an Autovaccine in Treating Patients with Chronic Osteomyelitis" v Vrach, Delo 122 (1992).] a systémová imunizace proti Campylobacter fetus infekci jalovic a krav [Schurig G.G. D. a spol.: "Bovine Venereal Vibriosis:

Cure of Genital Infection in Females by Systemic Immunization" v Infect. and Immun. 11, 245 (1975).]. Až do dneška byla provedena pouze jedna orální imunotherapeutická studie s cílem stimulovat mukózní imunitní systém, aby se léčila (a zabránilo opakovanému výskytu) mukózní infekce při infekci urinárního traktu [Schulman C.C. a spol.: "Oral Immunotherapy of Recurrent Urinary Tract Infections: A Double-Blind Placebo-Controlled Multicenter Study" v J. Urol. 150, 917 (1993).]. V této studii Schulman a spol. použili lyzát vybraných E. coli kmenů společně se současným léčením antibiotiky, chemoterapeutiky nebo desinfekčními činidly urinárního traktu pro léčení akutní infekce na počátku této studie. Až dosud tedy žádná studie neukázala účinnost terapeutické vakcíny, používané jako monoterapie, podávané do mukózního imunitního systému na bakteriální onemocnění.

Novost terapeutické vakcíny proti Helicobacter infekci pochází také z pozorování, že H. pylori přetrvává jako chronická infekce v žaludeční dutině po řadu let navzdory vyvolání intenzivní lokální a systémové imunitní odpovědi. Toto pozorování bylo již jako takové překážkou pro vývoj profylaktické vakcíny proti Helicobacter infekci, ale bylo i překážkou pro vývoj terapeutické imunizace.

Existuje tedy potřeba efektivního léčení a prevence Helicobater pylori indukované žaludeční infekce u lidí. Nedávná data ukázala možnost získat vakcínu proti této infekci, ale neposkytla jasnou identifikaci definovaného antigenu (definovaných antigenů), obecného (obecných) pro všechny kmeny Helicobacter pylori, který by mohl být zahrnut do bezpečné a efektivní vakcíny.

V tomto vynálezu jsme jako kandidáta vakcíny identifikovali ureasový antigen z Helicobacter pylori a ukázali jsme jeho účinnost na zvířecím modelu. Ukázali jsme také použití Helicobacter pylori ureasového antigenu při léčení a vymýcení Helicobacter infekce. Dále jsme ukázali, že samotná B podjednotka

ureasy (ure B) je účinná jako vakcína užitečná pro prevenci a léčení Helicobacter infekcí. Tyto výsledky byly neočekávané z hlediska přirozené historie Helicobacter infekcí.

Podstata vynálezu

Zjistili jsme, že je užitečné imunizovat zvířata Helicobacter ureasovými peptidy jak pro profylaktický účinek tak kvůli léčení. Imunizace zvířat Helicobacter ureasovými peptidy zabraňuje Helicobacter infekci a odstraňuje infekci u dříve infikovaných zvířat. Tento způsob a vakcínové prostředky jsou užitečné při prevenci a léčení gastroduodenálních onemocnění souvisejících s Helicobacter infekcí.

Objevili jsme, že imunitu lze indukovat u savců citlivých na gastrointestinální Helicobacter infekci využitím ureasových epitopů, které existují na nebo kolem povrchu Helicobacter organismů a jejich použitím jako vakcínový cíl. Imunitu lze indukovat imunizací přírodní ureasou, lze ji však také indukovat rekombinantní ureasovou podjednotkou produkovanou jako enzymaticky neaktivní a tedy netoxická forma. Tento vynález poskytuje způsob indukování imunity na Helicobacter infekci podáváním polyaminokyselinového přípravku, tj. směsi peptidů a/nebo proteinů, společně s příslušným adjuvans, do mukózního povrchu savce. Tento polyaminokyselinový přípravek představuje mnoho epitopů, které jsou charakteristické pro a vykazované ureasovým enzymem endogenním pro infikující Helicobacter organismus. Podávání polyaminokyselinového přípravku se může provádět orální cestou.

Účinná složka přípravku může obsahovat přírodní nebo biosyntetické epitopy a může mít různé formy. Mezi nevyčerpávající seznam možných přípravků patří vyčištěné, přirozeně se vyskytující nebo rekombinantně produkované ureasové přípravky bakteriálního nebo jiného původu, štěpy ureasy, napojené proteiny obsahující ureasové epitopy, zkrácené formy ureasového enzymu nebo peptidy homologní s aminokyselinovou sekvencí ureasy. Je-

likož vývoj imunity závisí na indukci humorální a/nebo buněčné imunitní odpovědi, která se váže na infikující Helicobacter organismus, výhodnými přípravky jsou ty přípravky, které jsou nebližším duplikátem epitopů ureasy endogenní pro infikující organismus. Například přípravky, které mají epitopy ureasy Helicobacter pylori, jsou výhodné pro podávání lidem citlivým na Helicobacter pylori, přípravky, které mají epitopy ureasy H. felis, jsou výhodné pro podávání lidem, kteří jsou citliví na H. felis. Avšak, v souladu s důležitým aspektem tohoto vynálezu, bylo objeveno, že se může použít ureasa z heterologních druhů. Například jsme ukázali, že H. felis infekci u myší lze zabránit podáváním ureasy z Helicobacter pylori. H. pylori ureasa se tedy může používat k ochraně proti H. pylori stejně jako proti H. felis. H. felis je příležitostnou příčinou lidské infekce a onemocnění [Wegman W. a spol.: Schweig. Med. Wochenschr. 121, 245 (1991).].

Podle prvního provedení se podle předloženého vynálezu získává způsob vyvolání ochranné imunitní odpovědi u savčího hostitele na Helicobacter infekci. Podle druhého provedení předloženého vynálezu se získává způsob léčení savčího hostitele, který je infikován Helicobacter.

Podle prvního aspektu předloženého vynálezu se tedy získává způsob vyvolání ochranné imunitní odpovědi na Helicobacter infekci u savčího hostitele. Tento způsob zahrnuje stupeň podání do mukózního povrchu savce, včetně člověka, imunologicky účinného množství ureasového antigenu, s výhodou Helicobacter pylori ureasy, které je schopno vyvolat tuto ochrannou imunitní odpověď. Pojem "zahrnuje" se zde používá tak, tak je to známo odborníkům z oblasti techniky.

Podle jednoho aspektu vynálezu se získává způsob vyvolání ochranné imunitní odpovědi na Helicobacter infekci u savčího hostitele, při čemž imunologicky efektivní množství ureasového antigenu schopného vyvolat takovou ochrannou imunitní odpověď, s výhodou Helicobacter pylori ureasy nebo Helicobacter pylori

ureasové B podjednotky, se podává do mukózního povrchu hostitele.

Podle druhého aspektu předložený vynález poskytuje způsob vyvolání ochranné imunitní odpovědi na Helicobacter infekci v savčím hostiteli. Tento způsob zahrnuje stupeň podání do mukózního povrchu savce, včetně lidí, imunologicky efektivního množství rekombinantní, enzymaticky neaktivní ureasové B podjednotky jako antigenu, s výhodou rekombinantní Helicobacter pylori ureasové B podjednotky, schopné vyvolat tuto ochrannou imunitní odpověď.

V rozsahu tohoto vynálezu je zahrnuto také léčení nebo profylaxe savců, včetně lidí, Helicobacter infekce, kdy se imunologicky efektivní množství ureasy nebo její podjednotky, které je schopno vyvolat ochrannou imunitní odpověď na Helicobacter infekci, podává do mukózního povrchu pacienta. Ureasa s výhodou znamená Helicobacter pylori ureasu nebo Helicobacter pylori ureasovou B podjednotku. Ureasa se s výhodou podává sypká společně s hydroxylovaným fosforečnanem vápenatým, například hydroxyapatitem. Je také výhodné podávat Helicobacter pylori ureasu společně s mukózním adjuvans, B podjednotkou toxinu cholery, muramyldipeptidem nebo jinými adjuvans.

Podle jiného aspektu předloženého vynálezu se získává vakcínový prostředek vhodný pro prevenci Helicobacter infekce, který obsahuje efektivní množství ureasového antigenu, s výhodou Helicobacter pylori ureasu, Helicobacter pylori ureasovou B podjednotku nebo rekombinantní Helicobacter pylori ureasové podjednotky, které je schopno v hostiteli vyvolat ochrannou imunitní odpověď na Helicobacter infekci, společně s farmaceuticky přijatelným nosičem nebo ředidlem. Vhodné nosiče a vhodná ředidla jsou známa odborníkům z oblasti techniky. Lze je nalézt například v Remington's Pharmaceutical Sciences (18. vydání, 1990).

Vakcíny podle tohoto vynálezu se podávají v takovém množ-

ství, které snadno stanoví odborníci z oblasti techniky. Pro dospělého bude vhodná dávka v rozmezí od 10 μg do 100 mg, například 50 μg až 50 mg. Vhodnou dávkou pro dospělého bude také dávka v rozmezí od 5 μg do 500 mg. Podobná dávková rozmezí lze použít pro děti. Mezi systémy nosičů pro lidi patří enterosolventní tobolky, které chrání antigen před kyselým prostředím žaludku a které obsahují ureasový antigen v nerozpustné formě jako napojené proteiny. Vakcína může být u dospělých nebo dětí podávána jako primární profylaktické činidlo, jako sekundární prevence, po úspěšném vymýcení Helicobacter pylori v infikovaném hostiteli, nebo jako léčivé činidlo s cílem indukovat imunitní odpověď v hostiteli, který je citlivý na vymýcení Helicobacter pylori.

Jak bylo shora uvedeno, vhodným mukózním adjuvans je toxin cholery. Jinými adjuvans, která se mohou použít, jsou netoxické deriváty toxinu cholery, včetně jeho B podjednotky, a/nebo konjugáty nebo genetickým inženýrstvím získaná napojení ureasového antigenu s toxinem cholery nebo jeho B podjednotkou. Mezi další vhodné způsoby podávání patří biodegradovatelné mikrotobolky, imunostimulační komplexy (ISCOM) nebo liposomy, genetickým inženýrstvím získané oslabené živé vektory, jako jsou viry nebo bakterie, a rekombinantní (chimerní) částice podobající se virům, např. bluetongue. Množství použitého mukózního adjuvans závisí na typu použitého mukózního adjuvans. Jestliže se například jako mukózní adjuvans používá toxin cholery, je vhodné ho použít v množství 5 μg až 50 μg, například 10 μg až 35 μg. Jestliže se používá ve formě mikrotobolek, bude toto množství záviset na množství použitém v matrici mikrotobolek, aby se dosáhlo žádoucího dávkování. Stanovení tohoto množství je ve schopnostech zručného odborníka z oblasti techniky.

Vhodnými nosiči pro vakcíny podle vynálezu jsou enterosolventní tobolky a polylaktid-glykolidové mikrokuličky. Vhodnými ředidly jsou 0,2N hydrogenuhličitan sodný a/nebo roztok chloridu sodného.

Jako nosič pro Helicobacter pylori ureasu pro aplikaci na mukózní povrchy je zvláště vhodným nosičem sypký hydroxylovaný fosforečnan vápenatý (HCP). Předpokládá se, že konjugát Helicobacter pylori ureasa/hydroxylovaný fosforečnan vápenatý je transportován přes epitel, kde zvyšuje polyIg imunitní odpověď. Hydroxylovaný fosforečnan vápenatý je s výhodou ve formě mikročásteček vhodných pro transport přes epitel, zvláště buňkami, které jsou specializovány pro tento účel (M buňky). Výhodnou formou hydroxylovaného fosforečnanu vápenatého je hydroxyapatit, komerčně dostupný krystalický hydroxylovaný fosforečnan vápenatý $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_6$.

Komerčně dostupný hydroxyapatit obvykle sestává z krystalů podobajících se destičkám, které jsou chemicky a fyzikálně analogické s anorganickým hydroxyapatitem v normální tkáni kostí. Požívání hydroxyapatitu by tedy mohlo být bezpečné, jak je vidět z existence výživných vápenatých/fosforečných doplňků odvozených od rozemletých kostí, které jsou určeny po požívání. Komerční vysokorozpustný hydroxyapatit (od CalNiocehm) sestává z krystalů s rozmanitou velikostí. Krystaly s větší délkou než 1 μm pravděpodobně nebudou M buňkami přijaty. Pro použití podle vynálezu se tedy komerční hydroxyapatitové krystaly rozlámou na malé, relativně jednotné krystalické fragmenty, například působením ultrazvuku. Podstatná část hydroxyapatitu je s výhodou přítomna jako fragmenty o velikosti 0,01 až 1,0 μm. Fragmentace se může změřit buď elektronovým mikroskopem nebo světelnou disperzí s použitím standardních technik.

Výhodnými způsoby podávání Helicobacter pylori ureasového antigenu jsou orální, nosní, rektální nebo oční způsoby podávání. Orální podávání může poskytovat podávání do jiné g.i. (gastrointestinální) mukózy včetně intestinální mukózy.

Vakcíny podle předloženého vynálezu se mohou podávat do mukózního povrchu ve formě aerosolu, suspenze, tobolky a/nebo čípku. Způsob podávání bude zřejmý odborníkovi z oblasti techniky a lze ho nalézt například v Remington's Pharmaceutical

Sciences (18. vydání, 1990).

Podle dalšího aspektu předloženého vynálezu se u savčího hostitele získává způsob vyvolání pasivní ochrany proti Helicobacter infekci, který zahrnuje podávání imunologicky efektivního množství ureasově specifické protilátky produkované v hostiteli imunizovaném ureasou, s výhodou Helicobacter pylori ureasou nebo Helicobacter pylori ureasovou B podjednotkou, schopnou vyvolat ochrannou imunitní odpověď na Helicobacter infekci, do mukózního povrchu hostitele.

Předložený vynález dále zahrnuje pasivní imunizaci savců, včetně lidí, proti Helicobacter infekci. Toho se dosáhne podáváním efektivního množství ureasově specifické protilátky, s výhodou efektivního množství Helicobacter pylori ureasové specifické IgA monoklonální protilátky, do mukózního povrchu pacienta.

Jelikož ureasa Helicobacter pylori znamená antigen, který hraje roli při indukování ochranné imunity, dalším aspektem tohoto vynálezu je použití Helicobacter pylori ureasy jako diagnostického reakčního činidla pro měření imunitní odpovědi osob, které obdržely vakcínu založenou na urease, nebo pro stanovení toho, jestli jednotlivec je imunní nebo vnímavý (a tedy jestli potřebuje vakcinaci). Předložený vynález zahrnuje také použití ureasy a ureasově specifických protilátek pro zkonstruování testů a sestav pro diagnosu Helicobacter imunity, zjištění vnímavosti na Helicobacter a definici imunitních odpovědí na vakcíny.

Podle třetího aspektu tento vynález poskytuje způsob léčení gastroduodenálního onemocnění savců. Tento způsob zahrnuje stupeň podávání terapeuticky efektivního množství prostředku, který obsahuje Helicobacter ureasové peptidy. Mezi gastroduodenální onemocnění v rozsahu tohoto vynálezu patří, ale nejsou na ně omezena, gastritida, peptické vředové onemocnění, včetně jak žaludečních tak duodenálních vředů, rakovina žaludku, chro-

nická dyspepsie se silnou erozivní gastroduodenitidou, úporná vředová dyspepsie, intestinální metaplazie, Malt lymfom nízkého stupně, Helicobacter infekce, Helicobacter pylori infekce a Helicobacter felis infekce. Pojem "ureasové peptidy" znamená, ale není na ně omezen, jakoukoliv ureasu nebo podjednotku ureasy, buď přirozeně se vyskytující nebo získanou technikami rekombinace DNA, stejně jako jeho rozštěpený fragment nebo peptid, napojené proteiny obsahující celou ureasu, podjednotky nebo jejich fragmenty, nebo zkrácené ureasové konstrukce. Pod pojem "ureasové peptidy" patří také proteiny nebo peptidy, které mají epitopy dostatečně homologní s epitopy Helicobacter ureasy, takže protilátky, které rozpoznávají epitopy Helicobacter ureasy budou rozpoznávat epitopy uvedených peptidů nebo proteinů.

V podrobnějším aspektu tento vynález poskytuje způsob léčení gastroduodenálního onemocnění způsobeného Helicobacter infekcí. Helicobacter infekce může znamenat, ale není na ně omezena, Helicobacter pylori nebo H. felis infekci.

Podrobněji - tento vynález poskytuje způsob léčení gastroduodenální nemoci způsobené Helicobacter infekcí, při čemž prostředek obsahující Helicobacter ureasové peptidy se podává do mukózního povrchu. Aniž by byl typ mukózního povrchu použitý pro podávání omezen, může tímto mukózním povrchem být orální, nosní, rektální nebo oční povrch.

Tento vynález se týká také podávání prostředku obsahujícího Helicobacter ureasové peptidy společně s mukózním adjuvans. Mukózní adjuvans může být vybráno z, ale není na ně omezeno, toxinu cholery, procholeragenoidu, B podjednotky toxinu cholery, houbových polysacharidů zahrnujících, ale bez omezení, schizofylan, muramyldipeptidu, derivátů muramyldipeptidu, forbolových esterů, mikrokuliček, ne-Helicobacter pylori bakteriálních lyzátů, labilního toxinu Escherichia coli, blokových polymerů, saponinů a ISCOM. Jiná mukózní adjuvans mohou uvést odborníci z oblasti techniky. Lze je nalézt například v následujících citacích: Azuma I.: "Synthetic Immunoadjuvants: Appli-

cation to Non-Specific Host Stimulation and Potentiation of Vaccine Immunogenicity" ve Vaccine 10, 1000 (1992), Pockley A.G. a Montgomery P.C.: "In vivo Adjuvant Effect of Interleukins 5 and 6 on Rat Tear IgA Antibody Responses" v Immunology 73, 19 (1991), Adam A. a Lederer E.: "Muramyl Peptides as Immunomodulators" v ISI ATLAS OF SCIENCE 205 (1988), Clements J.D. a spol.: "Adjuvant Activity of Escherichia coli Heat-labile Enterotoxin and Effect on the Induction of Oral Tolerance in Mice to Unrelated Protein Antigens" ve Vaccine 6, 269 (1988), Ben Ahmeida E.T.S. a spol.: "Immunopotentiation of Local and Systemic Humoral Immune Responses by ISCOMs, Liposomes and FCA: Role in Protection Against Influenza A in Mice" ve Vaccine 11, 1302 (1993) a Gupta R.K. a spol.: "Adjuvants -- A Balance Between Toxicity and Adjuvancity" ve Vaccine 11, 290 (1993).

Mukózní adjuvans může být na ureasové peptidy také geneticky nebo chemicky navázáno. Příklady tohoto typu napojeného peptidu jsou známy odborníkům z oblasti techniky a lze je nalézt v následujících citacích: Czerkinsky a spol.: "Oral Administration of a Streptococcal Antigen Coupled to Cholera Toxin B Subunit Evokes Strong Antibody Responses in Salivary Glands and Extramucosal Tissues" v Infect. Immun. 57, 1072 (1989), Nashar a spol.: "Current Progress in the Development of the B Subunits of Cholera Toxin and Escherichia Coli Heat--Labile Enterotoxin as Carriers for the Oral Delivery of Heterologous Antigens and Epitopes" ve Vaccine 11, 235 (1993) a Dertzbaugh a Elson: "Comparative Effectiveness of the Cholera Toxin B Subunit and Alkaline Phosphatase as Carriers for Oral Vaccines" v Infect. Immun. 61, 48 (1993). Například ureasová B podjednotka by mohla být exprimována jako chimerní protein, který je geneticky navázán na B podjednotku toxinu cholery použitím DNA expresního vektoru obsahujícího ure B nukleotidovou sekvenci navázanou na nukleotidovou sekvenci B podjednotky toxinu cholery.

V jiném příbuzném aspektu tento způsob zahrnuje podávání prostředku obsahujícího Helicobacter ureasové peptidy, kde jsou

tyto prostředky dodávány v sypké formě. Tento prostředek může být dodáván v supké formě společně s nosičem. Nosičem může být hydroxylovaný fosforečnan vápenatý, například hydroxyapatit. Pojem "hydroxyapatit" znamená, ale bez omezení na tento význam, jak tomuto pojmu rozumějí odborníci z oblasti techniky, trihydroxyfosforečnan vápenatý, který je někdy znám také jako hydroxylovaný fosforečnan vápenatý. Toto je jenom příklad, který není míněn jako omezení typu nosiče, který se může používat.

Podle jiného příbuzného aspektu podávaná dávka prostředku obsahujícího Helicobacter ureasové peptidy může být v rozmezí od 100 μg do 1 g, například 0,14 mg na kg tělesné hmotnosti. Odborníci z oblasti techniky vědí, že optimální dávkování více či méně závisí na tělesné hmotnosti pacienta, na nemoci, na způsobu podávání a na dalších faktorech. Dávkování se snadno stanoví standardními způsoby. Počet dávek bude záviset na onemocnění, na provedení prostředku a na datech účinnosti získaných z klinických zkoušek. Například pro primární program imunizace se během 1 měsíce mohou podat 3 až 8 dávek. Tento průběh léčení je příkladem a není míněn jako omezující.

Podle jednoho příbuzného aspektu tento způsob zahrnuje podávání prostředku obsahujícího Helicobacter ureasové peptidy, při čemž tento prostředek se podává společné s mikrokuličkovým nosičem. Takovým mikrokuličkovým nosičem může být například, ale není na něj omezen, polylaktid-koglykolidový biodegradovatelný mikrokuličkový nosič.

Podle jiného příbuzného aspektu tento způsob zahrnuje podávání prostředku obsahujícího Helicobacter ureasové peptidy, při čemž tento prostředek obsahuje rekombinantní živý vektor, který expresí poskytuje Helicobacter ureasový peptid. Odborníci z oblasti techniky rozpoznají, že takovým živým vektorem může být například bakteriální nebo virový vektor. Například, bez jakéhokoliv omezení, se může živý vektor vybrat ze skupiny sestávající ze Salmonella typhimurium, Salmonella typhi, Shigella, Bacillus, Lactobacillus, BCG, Escherichia coli, Vibrio cho-

lerae, Campylobacter, kvasinek, Herpes viru, Adenoviru, Polioviru (viru dětské obrny), Vakcínie a ptačích neštovic. Pro dodávání ureasového peptidu se může použít také takový systém nosiče, který exprimuje Helicobacter ureasový peptid, jako jsou částice podobné viru Bluetongue, částice podobné Rotaviru a Ty částice. Podle výhodného aspektu se živý vektor nebo systém nosiče může podávat do mukózního povrchu.

Výhodné provedení předloženého vynálezu zahrnuje způsob léčení člověka infikovaného Helicobacter pylori, podle kterého se orálně podává terapeuticky efektivní množství prostředku obsahujícího ure B podjednotku Helicobacter pylori ureasy spolu s mukózním adjuvans, které je vybráno ze skupiny sestávající z toxinu cholery, procholeragenoidu, B podjednotky toxinu cholery, houbových polysacharidů zahrnujících, ale bez omezení, schizofylan, muramyldipeptidu, derivátů muramyldipeptidu, forbolových esterů, mikrokuliček, ne-Helicobacter pylori bakteriálních lyzátů, labilního toxinu Escherichia coli, blokových polymerů, saponinů a ISCOM. Prostředek se podává v sypkém stavu společně s hydroxyapatitem. Tento prostředek se může podávat se současným orálním podáváním žvýkatelných 1,0g $NaHCO_3$ tablet. Pro účely tohoto vynálezu pojem "společně s" zahrnuje jakýkoliv typ společného podávání včetně, ale bez omezení jenom na tyto, chemického nebo genetické společného podávání, jako je tomu v napojeném proteinu.

Podle čtvrtého aspektu tento vynález poskytuje způsob léčení gastroduodenálního onemocnění savců, který zahrnuje podávání terapeuticky efektivního množství prostředku obsahujícího protilátku, která rozpoznává Helicobacter ureasu. Mezi gastroduodenální onemocnění zahrnutá v rozsahu tohoto vynálezu patří shora uvedená onemocnění. Tyto způsoby používají shora uvedený prostředek, který obsahuje Helicobacter ureasové peptidy pro vyvolání protilátkové odpovědi u savců. Protilátky produkované imunizovaným savcem se isolují a podávají se dotyčnému savci. Přípravek protilátek, které rozpoznávají daný antigen, jako je shora uvedený prostředek, je znám odborníkům z oblasti techni-

ky. Například polyklonální a monoklonální protilátky se mohou připravovat podle popisu uvedeného Harlowem E. a Lanem D.: Antibodies: A Laboratory Manual (1988).

V podrobnějším příbuzném aspektu se jako podávaná protilátka používá monoklonální protilátka. Přípravek monoklonální protilátky je znám odborníkům z oblasti techniky.

Podrobněji - podávanou protilátkou je IgA protilátka, buď polyklonální nebo monoklonální IgA protilátka. Přípravek monoklonálních IgA protilátek je znám odborníkům z oblasti techniky a lze ho nalézt například v následujících citacích: Winner L. a spol.: "New Model for Analysis of Mucosal Immunity: Intestinal Secretion of Specific Monoclonal Immunoglobulin A from Hybridoma Tumors Protects Against Vibrio Cholerae Infection" v Infect. and Immun. 59, 977 (1991) a Weltzin R. a spol.: "Binding and Transepithelial Transport of Immunoglobulins by Intestinal M cells: Demonstration Using Monoclonal IgA Antibodies Against Enteric Viral Proteins" v J. Cell Biol. 108, 1673 (1989).

Pojem "protilátka" tak, jak je používán pro účely tohoto vynálezu, zahrnuje, ale není na ně omezen, polyklonální protilátky, monoklonální protilátky a antiidiotypové protilátky. Protilátka může být přirozeně odvozena od jakéhokoliv zvířete, syntetizována v bakterii, může pocházet z jiného nezvířecího zdroje nebo chemicky syntetizována nebo geneticky syntetizována.

Podle výhodného aspektu tohoto vynálezu se získává způsob léčení lidí infikovaných Helicobacter pylori, který se vyznačuje tím, že se podává terapeuticky efektivní množství prostředku obsahujícího IgA monoklonální protilátku, která rozpoznává ure B podjednotku Helicobacter pylori ureasy.

Podle pátého aspektu tento vynález poskytuje prostředek užitečný pro léčení gastroduodenálního onemocnění, který obsa-

huje Helicobacter ureasové peptidy. Gastroduodenální onemocnění v rozsahu tohoto vynálezu stejně jako Helicobacter ureasové peptidy a mukózní adjuvans v rozsahu vynálezu jsou shora uvedeny.

V příbuzném aspektu tento prostředek obsahuje Helicobacter ureasové peptidy a mukózní adjuvans.

Podle jiného příbuzného aspektu je tento prostředek v sypké formě. Prostředek může existovat v sypké formě společně s nosičem. Nosičem může být například hydroxyapatit, jak shora uvedeno. To je jenom příklad, který není zamýšlen jako omezení na typ nosiče, který se může použít.

Podrobněji - prostředek je přítomen v sypké formě v kapalné suspenzi.

V příbuzném aspektu tento prostředek obsahuje Helicobacter ureasové peptidy společně s mikrokuličkovým nosičem. Takovými mikrokuličkami mohou být například, ale bez omezení na ně, polylaktid-koglykolidové biodegradovatelné mikrokuličky. Ureasové peptidy mohou být obsaženy v tobolkách v biodegradovatelných mikrokuličkách. Polylaktid-koglykolidové mikrokuličky se pomalu hydrolyzují v přítomnosti vody, stávají se tak ve vodě rozpustné a tím dodávají peptidy, které jsou v mikrokuličkách obsaženy.

Podle jiného příbuzného aspektu prostředek obsahuje Helicobacter ureasové peptidy, při čemž prostředek obsahuje rekombinantní živý vektor, který exprimuje Helicobacter ureasový peptid. Odborníci z oblasti techniky vědí, že takovým živým vektorem může být například bakteriální nebo virový vektor. Například, bez jakéhokoliv omezení, může být živý vektor vybrán ze skupiny, která sestává se Salmonella typhimurium, Salmonella typhi, Shigella, Bacillus, Lactobacillus, BCG, Escherichia coli, Vibrio cholerae, Campylobacter, kvasinek, Herpes viru, Adenoviru, viru dětské obrny, Vakcínie a ptačích neštovic. Dále

se může pro dodávání ureasového peptidu použít nosný systém, který exprimuje Helicobacter ureasový peptid, jako jsou částice podobné viru Bluetongue, částice podobné Rotaviru a Ty částice.

Ve výhodném provedení se získává prostředek, který je užitečný pro léčení Helicobacter infekce u člověka a který obsahuje ure B podjednotku Helicobacter pylori ureasy, mukózní adjuvans, které je vybráno ze skupiny sestávající z toxinu cholery, procholeragenoidu, B podjednotky toxinu cholery, houbových polysacharidů zahrnujících schizofylan, muramyldipeptidu, derivátů muramyldipeptidu, forbolových esterů, mikrokuliček, ne-Helicobacter pylori bakteriálních lyzátů, labilního toxinu Escherichia coli, blokových polymerů, saponinů a ISCOM a dále obsahuje hydroxyapatit, při čemž tento prostředek je v sypké formě v kapalné suspenzi. Pojem "společně s" je shora vysvětlen.

Podle šestého aspektu se získává prostředek, který je užitečný pro léčení gastroduodenálního onemocnění a který obsahuje protilátku, která rozpoznává Helicobacter ureasu. Gastroduodenální onemocnění v rozsahu tohoto vynálezu stejně jako protilátky v rozsahu vynálezu jsou shora uvedeny.

Ve výhodném provedení vynálezu se získává prostředek, který je užitečný pro léčení gastroduodenálního onemocnění a který obsahuje IgA monoklonální protilátku, která rozpoznává ure b podjednotku Helicobacter pylori ureasy.

Bez ohledu na teorii autoři předloženého vynálezu věří, že podávání ureasového antigenu nebo jeho B podjednotky do mukózního povrchu stimuluje obvyklý mukózní imunitní systém a možná lokální místa v žaludeční sliznici indukující imunitní odpověď včetně objevení se IgA protilátek specifických na Helicobacter pylori v žaludečních sekretech, což brání Helicobacter infekci. Vzhledem k tomu se zde používají pojmy "imunizace" a "vackína" v jejich obvyklých významech tak, jak jsou známy odborníkům z oblasti techniky a také pro označení způsobů a prostředků používaných pro léčení Helicobacter infekce, bez

omezení na tyto významy a bez jakéhokoliv ohledu na teorii, pokud jde o mechanismus léčení.

Jelikož provádění předklinických pokusů vakcín, které jsou kandidáty pro použití u lidí, na zvířecích modelech je rutinní věcí, předpokládá se, že metodologie předloženého vynálezu je účinná u lidí, zvláště při prevenci a léčení peptických vředů, gastritidy, žaludečních maligních příhod a dalších stavů, k nimž dochází jako důsledek přítomnosti Helicobacter pylori a/ /nebo H. felis.

Na základě dávkování a průběhu léčení, které úspěšně odstraňuje infekci u myšího modelu, by výhodné rozmezí dávkování bylo 100 μg až 10 g Helicobacter ureasových peptidů. Zručný odborník z oblasti techniky rozpozná příslušnou úroveň dávkování na základě výzkumu popsaného pro jiné orální vakcíny, jako je například výzkum prováděný s lyzátem Escherichia coli (6mg dávka denně až do celkem 540 mg) a enterotoxigenním E. coli vyčištěným antigenem (4 dávky po 1 mg) [Schulman a spol.: "Oral Immunotherapy of Recurrent Urinary Tract Infections: A Double--Blind Placebo-Controlled Multicenter Study" v J. Urol. 150, 917 (1993), Boedeker a spol.: "Safety, Immunogenicity and Efficacy in Human Volunteers of Biodegradable, Biocompatible Microspheres Containing Colonization Factor Antigen/II (CFA/II) as an Enteral Vaccine Against Enterotoxigenic E. coli (ETEC)" v American Gastroenterological Assoc. 999, A-222 (1993).]. Bez jakéhokoliv zamýšleného omezení, pokud jde o průběh léčení, by primární imunizace mohla probíhat podáváním 3 až 8 dávek po dobu 1 měsíce [Boedeker: American Gastroeneterological Assoc. 888, A-222 (1993).].

Doporučovaný způsob imunizace je podávání Helicobacter ureasového peptidového prostředku ve formě kapaliny samotné nebo suspenze obsahující $NaHCO_3$ nebo podobný materiál pro dočasnou neutralizaci žaludeční kyseliny. Neutralizující materiál může být dodáván také odděleně v době, kdy je peptidový prostředek podáván, jako je tomu ve formě žvýkatelných $NaHCO_3$ tablet. Pro-

středek se může podávat také ve formě enterosolventních tobolek. Tyto způsoby pravděpodobně způsobí obejití problému degradace ureasového prostředku během procházení horním gastrointestinálním traktem. Tyto způsoby jsou souhrnně uvedeny například v práci Levine a Norlega: "Vaccines to Prevent Enteric Infections" v Ballieres Clin. Gastro. 7, 501 (1993).].

I když vysoká dávka toxinu cholery není výhodná jako mukózní adjuvans pro použití u člověka, pro léčení lidí budou užitečnými jiná mukózní adjuvans, která jsou známa odborníkům z oblasti techniky, jak shora uvedeno.

Odborníkovi z oblasti techniky bude zřejmé, že k popsanému vynálezu lze udělat různé substituce a modifikace, aniž by se tyto odchýlily od rozsahu a duchu vynálezu.

V následující části bude tento vynález dále popsán s odkazem na doprovázející výkresy, v nichž obrázky 1 až 88 jsou grafickými znázorněními výsledků uvedených v tabulkách 1 až 9.

Obrázek 1 je grafickým znázorněním výsledků z tabulky 1 testů na protilátky v seru (IgG) a intestinálních sekretech (IgA) u myší, které nebyly chráněny po imunizaci ureasou.

Obrázek 2 je grafickým znázorněním výsledků z tabulky 1 testů na protilátky v seru (IgG) a intestinálních sekretech (IgA) u myší, které byly chráněny po imunizaci ureasou.

Obrázek 3 je grafickým znázorněním výsledků z tabulky 1 testů na protilátky v seru (IgG) a intestinálních sekretů (IgA) u myší, které nebyly chráněny po imunizaci Helicobacter pylori, na kterou bylo působeno ultrazvukem.

Obrázek 4 je grafickým znázorněním výsledků z tabulky 1 testů na protilátky v seru (IgG) a intestinálních sekretů (IgA) u myší, které byly chráněny po imunizaci Helicobacter pylori, na kterou bylo působeno ultrazvukem.

Obrázek 5 je grafickým znázorněním výsledků uvedených v tabulce 2 srovnávajících hladinu ochrany získané s Helicobacter pylori ureasou s ochranou získanou s Helicobacter pylori, na kterou bylo působeno ultrazvukem, a s toxinem cholery.

Obrázky 6A a 6B jsou grafickým znázorněním výsledků uvedených v tabulkách 5 a 6, které měří ureasovou aktivitu u myší, které byly stimulovány po orální imunizaci rekombinantními ureasovými A a B podjednotkami.

Obrázek 7 je grafickým znázorněním výsledků uvedených v tabulce 8, která měří ureasovou aktivitu žaludeční tkáně jako výraz Helicobacter infekce u myší, které byly následně léčeny Helicobacter pylori ure B podjednotkou, pouze toxinem cholery a hydroxyapatitem (zdánlivě imunizovány) nebo neléčeny.

Obrázky 8A a 8B jsou grafickým znázorněním výsledků uvedených v tabulce 9, které měří ureasovou aktivitu jako projev Helicobacter infekce u myší, které byly následně léčeny Helicobacter pylori ure B podjednotkou nebo pouze toxinem cholery a hydroxyapatitem (zdánlivě imunizovány). U obrázku 8A byly myši usmrceny a testy ureasy byly provedeny 2,5 týdne po poslední imunizaci. U obrázku 8B byly myši usmrceny a testy ureasy byly provedeny 8 týdnů po poslední imunizaci.

V další části tohoto spisu byl předložený vynález popsán podrobněji.

Autoři předloženého vynálezu objevili, že orální podání myším polyaminokyselinového přípravku vykazujícího epitopy Helicobacter pylori ureasy zvyšuje ochrannou imunologickou odpověď proti H. felis u myší, zvířecím modelu obecně přijímané hodnoty pro studie imunitní odpovědi na Helicobacter infekci [Lee A. a spol.: "A Small Animal Model of Human Helicobacter pylori Active Chronic Gastritis" v Gastroenterology 99, 1315 (1990).] a rozpoznaného pathogenu způsobujícího gastritidu u lidí [Wegman W. a spol.: Schweig. Med. Wochenschr. 121, 245

(1991).]. Účinek ochranné imunitní odpovědi spočívá v tom, že imunizovaná zvířata, jestliže jsou stimulována pathogen, mají velice snížený výskyt infekce při srovnání s neimunizovanými zvířaty. Dále autoři vynálezu objevili, že orální imunizace u myší Helicobacter pylori ureasovou B podjednotkou, produkovanou enzymaticky neaktivním rekombinantním proteinem, zvyšuje ochrannou imunologickou odpověď u myší proti H. felis. Účinek ochranné imunitní odpovědi spočívá v tom, že imunizovaná zvířata, jestliže jsou stimulována pathogenem, mají také velmi snížený výskyt infekce při srovnání s neimunizovanými zvířaty, která byla infikována.

Autoři předloženého vynálezu objevili, že orální podávání Helicobacter ureasových peptidů myším infikovaným H. felis vede k odstranění infekce. Tento výsledek ukazuje, že orální podávání Helicobacter ureasových peptidů je účinným léčením Helicobacter infekce u savců. Orální podávání Helicobacter pylori ureasové B podjednotky, produkované enzymaticky neaktivním rekombinantním proteinem významně snižuje úroveň H. felis infekce u infikovaných myší při srovnání s kontrolními infikovanými myšmi.

Následující příklady jsou ilustrací vynálezu a nejsou zamýšleny jako jakékoliv omezení tohoto vynálezu.

Příklady provedení vynálezu

A. Bakteriální kultury a čištění ureasy

Kmen Helicobacter pylori použitý ve studii pochází z pacienta s duodenálním vředem a byl kultivován na BHI agarosových deskách do homogenity. Helicobacter pylori se kultivuje ve vhodném mediu, typicky BHI (Brain-Heart Infusion) mediu, které obsahuje 0,25 % (hmotn.) kvasinkového extraktu a 10 % (hmotn.) plodového telecího séra, doplněném o 0,4 % (hmotn.) kvasinkového extraktu, 10 % (hmotn.) plodového telecího séra a 0,4 % (hmotn.) Campylocbacter selektivního doplňku (Skirrowův dopl-

něk; Oxoid 69). Bakterie se inkubují za mikroaerofilních podmínek při 37 °C v nádobách, které jsou zataveny a třepány 2 až 3 dny při 37 °C. Získá se tak kapalná kultura. Kultura se může připravit také v agarosových deskách obsahujících BHI s 0,25 % (hmotn.) kvasinkového extraktu a 5 % (hmotn.) ovčí krve za mikroaerofilních podmínek 3 dny při 37 °C. Množství bakterií se stanoví optickou hustotou BHI vzorku při 660 nm. Jedna jednotka optické hustoty odpovídá 10^8 bakterií. Kultury na agarosových deskách se nejdříve suspendují ve 154mM chloridu sodném.

Jedním běžně výhodným zdrojem polyaminokyselinových ureasových epitopů je vyčištěná ureasa, např. Helicobacter pylori ureasa získaná podle následujícího obecného postupu podle Dunna a spol.: J. Biol. Chem. 265, 9464, který byl modifikován jak dále popsáno. Po kultivaci se Helicobacter pylori isoluje ve vodě, odstřeďuje, rozmíchá a opětovným odstřeďováním se získá supernatant. Roztok obsahující ureasovou aktivitu Helicobacter pylori (zjištěna rychlým ureasovým testem, viz níže) se pak chromatografuje na koloně CL-6B. Frakce, které vykazují silnou ureasovou aktivitu, se spojí, dialyzují se přes noc a opět se chromatografují na anexovém gelu. Frakce se eluují v pufru se zvyšujícím se obsahem NaCl. Spojené frakce se silnou ureasovou aktivitou se jednotlivě podrobí SDS na gelu s následujícím obarvením Coomassie barvou. Jako ureasa se identifikují dva různé pásy odpovídající molekulovým hmotnostem kolem 63 000 a 28 000. Frakce obsahující ureasu se spojí. Získá se vyčištěná Helicobacter pylori ureasa s čistotou v mezích 95 až 99 % hmotn.

B. Orální imunizace ureasou vyčištěnou z Helicobacter pylori

I když je výhodné používat vyčištěnou Helicobacter pylori ureasu získanou jak shora uvedeno jako antigenní materiál, je tomu třeba rozumět tak, že je možné použít jako antigenní materiál také jakoukoliv ureasu nebo podjednotku ureasy, buď přirozeně se vyskytující nebo získanou technikou rekombiantní DNA, stejně jako jejich rozštěpené fragmenty, napojené proteiny ob-

sahující fragmenty ureasy nebo celou ureasu, zkrácené ureasové konstrukce nebo jiné peptidové nebo proteinové přípravky, které vykazují ureasové epitopy, které jsou schopny vyvolávat ochrannou imunitní odpověď na Helicobacter infekci (viz níže). Je tedy možné použít ureasu, která má podstatnou homologii s Helicobacter pylori ureasou a která je efektivní při zvýšení zkřížené ochranné imunitní odpovědi na Helicobacter. Příkladem takové ureasy je ureasa plodu východoindického chlebovníku, která je ze 70 % homologní s Helicobacter pylori ureasou. I když bylo jednou uvažováno o tom, že ureasa plodu východoindického chlebovníku by byla účinným antigenem při prevenci infekce Helicobacter, dnes už se nepředpokládá, že by tomu tak bylo [Chen M. a spol.: "Failure of Immunization Against Helicobacter Using Jack Bean Urease" viz Acta Gastroenterol. Belg. 56, 94 (1993).]. Tento vynález není tedy omezen na použití neporušené ureasy. Zahrnuje použití jakéhokoliv polyaminokyselinového přípravku, který vykazuje ureasové epitopy dostatečně homologní s Helicobacter pylori ureasou pro generaci ochranné imunologické odpovědi v hostiteli na Helicobacter infekci. Vhodná ureasa musí mít dostatečnou homologii s H. pylori ureasou, aby vyvolala ochrannou imunitní odpověď na Helicobacter infekci. Typicky se jako ureasový antigen podle vynálezu může používat ureasa, která má homologii větší než 70 %, například 80 až 90 %, vůči Helicobacter pylori urease.

Mezi neomezující seznam zdrojů potenciálně užitečných ureasových přípravků patří endogenní ureasové enzymy různých druhů Helicobacter, ureasa z jiných bakterií, jako je Klebsiella pneumoniae nebo Proteus mirabilis, a analogicky jakékoliv jiné ureasy za podmínky, že tyto ureasy sdílejí zkříženě reaktivní epitopy s Helicobacter pylori ureasou. Ureasové geny všech těchto shora uvedených organismů představují potenciální nástroj pro expresi rekombinantních ureasových produktů jako celého proteinu nebo jako jeho část.

Neomezující seznam potenciálně užitečných ureasových přípravků zahrnuje peptidy generované z vyčištěné ureasy (zdroje

jsou shora uvedeny), použití fyzikálních a/nebo chemických postupů štěpení (tj. CnBr) a/nebo proteolytické štěpení (použití proteas, např. V8-proteasy, trypsinu nebo jiných) nebo peptidy syntetizované chemicky a zachovávající si zkříženě reaktivní epitopy s ureasou.

Mezi další zdroje potenciálně užitečných epitopů patří epitopy identifikované jejich zkříženou reaktivitou s ureasou jako výsledek vyhledávání anti-ureasovými protilátkami. Tyto peptidy mohou znamenat přirozeně se vyskytující peptidy nebo peptidy pocházející z chemických syntéz. Tyto peptidy mohou být také výsledkem exprese rekombinantních náhodných oligonukleotidů.

Mezi další zdroje potenciálně užitečných epitopů patří epitopy podobné urease jako výsledek generace antiidotypických protilátek na ureasu. Tyto antiidiotypické protilátky, generované v jakémkoliv imunokompetentním hostiteli, se získávají imunizací tohoto hostitele s antiureasovými protilátkami s cílem generovat protilátky namířené proti antiureasovým protilátkám, které sdílejí strukturní homologie s ureasou.

Zde uvedená diskuse se zaměřuje na použití ureasy přirozeně produkované Helicobacter pylori (část B). Je však zřejmé, že ureasa nebo její shora uvedené podjednotky nebo kontrukce, které jsou schopny vyvolávat žádanou ochrannou imunitní odpověď, se mohou vyrábět technikami rekombinantní DNA dobře známými v oblasti techniky. Účinnost příslušných prostředků může být stanovena rutinním podáváním s využitím zvířecích modelů, orálním podáváním příslušné vakcíny a stimulací pathogenem použitím postupu, který je v podstatě podobný nebo identický s níže popsaným postupem.

Odborníkům z oblasti techniky bude zřejmé, že se pro podávání Helicobacter ureasových peptidů mohou používat jiné způsoby. Například se ureasové peptidy mohou podávat jako část prostředku s nosičem ve formě mikrokuliček. Bez omezení typu mi-

krokuliček jako nosiče může být jedním příkladem podávání ureasových peptidů jako část nosiče prostředku, kterým jsou polylaktid-koglykolidové biodegradovatelné mikrokuličky.

Jiným způsobem podávání Helicobacter ureasových peptidů by byla exprese ureasových peptidů v rekombinantní formě v živém vektoru, například bakteriálním nebo virovém vektoru. Pro zkonstruování takového živého vektoru se nukleotidové sekvence kodující ureasové peptidy zahrnou do genetického materiálu živého vektoru. Tento živý vektor by se podával jednotlivci kvůli zabránění Helicobacter infekcí a také kvůli léčení jednotlivce již infikovaného Helicobacter. Zruční odborníci z oblasti techniky vědí, že mezi příklady příslušných živých vektorů patří Salmonella typhimurium, Salmonella typhi, Shigella, Bacillus, Lactobacillus, BCG, Escherichia coli, Vibrio cholerae, Campylobacter, kvašinky, Herpes vir, Adenovir, Poliovir (vir dětské obrny), Vakcínie a ptačí neštovice. Pro dodání ureasového peptidu se může použít systém rekombinantního nosiče, který exprimuje Helicobacter ureasový peptid, jako jsou částice podobné viru Bluetongue, částice podobné viru Rotavirus nebo Ty částice. Shora uvedený seznam není míněn jako omezující. Živý vektor nebo nosný systém by se s výhodou podával mukózně tak, že rekombinantní ureasové peptidy exprimované živým vektorem by se podávaly do mukózního povrchu.

Níže uvedená tabulka 1 a tabulka 2 a obrázky 1 až 5 popisují výsledky získané u myší, které byly orálně imunizovány vyčištěnou Helicobacter pylori ureasou. V prvním pokusu se podávání Helicobacter pylori antigenu provádí orálním podáváním Helicobacter pylori ureasy, která byla vyčištěna tak, jak je to popsáno v části A a navázána na krystaly hydroxyapatitu, který se použije jako nosič pro zvýšení navázání a příjem M buňkami, myšmi. Jako mukózní adjuvans byl podáván toxin cholery (Sigma). V tomto pokusu se skupiny šest týdnů starých samiček myší SPF BALB/c 0., 7., 14. a 21. den orálně imunizují 30 μg vyčištěné Helicobacter pylori ureasy navázané na 1 mg hydroxyapatitu s 10 μg toxinu cholery jako adjuvans. Tyto myši se pak 28. a 30.

den stimulují dvakrát 10^8 H. felis. Pro účely srovnání se podobné šest týdnů staré samičky myší SPF BALB/c 0., 7., 14. a 21. den orálně imunizují 30 μg vyčištěného Helicobacter pylori lyzátu (získaného působením ultrazvuku; tento lyzát získaný působením ultrazvuku se někdy označuje jako sonikát, viz například tabulka 1)) a 10 μg toxinu cholery. Tyto myši se pak 28. a 30. den stimulují dvakrát H. felis. Helicobacter pylori ultrazvukový lyzát (sonikát) se připraví isolováním Helicobacter pylori z buněčných kultur, peletováním odstřeďováním a resuspendováním pelet v 0,9% (hmotn.) chloridu sodném a následujícím působením ultrazvuku.

Jako kontrola se šest týdnů staré samičky myší SPF BALB/c 0., 7., 14. a 21. den orálně zdánlivě imunizují 10 μg toxinu cholery a 1 mg hydroxyapatitu. Tyto myši se pak stimulují 28. a 30. den H. felis. Všechny myši v této studii se 35. den usmrtí.

C. Orální imunizace rekombinantními ureasovými podjednotkami Helicobacter pylori

Geny kodující strukturní A a B podjednotky Helicobacter pylori ureasy se získají polymerasovou řetězovou reakcí (PCR) klonováním podle standardních postupů na základě dříve publikovaných sekvencí [Clayton C.L. a spol.: "Nucleotide Sequence of Two Genes from Helicobacter pylori Encoding for Urease Subunits" v Nucleic Acid Res. 18, 362 (1990).]. Tyto geny se vloží do vektoru (nazvaného pEV40) určeného pro vysokou expresi a snadné čitění cizích genů v E. coli. Ve stručnosti - cizí gen se vloží po směru vlákna termorepresovatelného promotoru a do té části sekvence, která koduje opakování šesti histidinů. Gen ampR je v tomto vektoru přítomen pro selekci transformantů. Za příslušných tepelných podmínek se získá rekombinantní protein doplněný o šest histidinů na N-konci, což umožňuje jednostupňové afinitiní vyčištění na niklové koloně. Jak Helicobacter pylori rekombinantní ureasové A tak B podjednotky se odděleně exprimují v E. coli a vyčistí se na niklové koloně na čistotu

vyšší než 95 % hmotn.

I když je výhodné používat rekombinantní Helicobacter pylori ureasu získanou jak shora uvedeno jako antigenní materiál, je tomu třeba rozumět tak, že je možno jako antigenní materiál také použít jakoukoliv ureasu nebo podjednotku ureasy získanou technikou rekombinace (např. napojené proteiny) exprimací antigenních míst ureasy, která je schopna vyvolat ochrannou imunitní odpověď na Helicobacter infekci. Je tedy možné při konstrukci použít ureasový gen, který má podstatnou homologii s Helicobacter pylori ureasou a který je účinný pro zvýšení zkřížené ochranné imunitní odpovědi na Helicobacter. Příklady takové ureasy je ureasa plodu východoindického chlebovníku, která má 70% homologii s Helicobacter pylori ureasou, nebo H. felis ureasa, která má 88% homologii s Helicobacter pylori ureasou. Tento vynález tedy není omezen na použití Helicobacter pylori ureasových genů a jejich genových produktů, ale zahrnuje použití jakékoliv rekombinantní ureasy nebo jejích podjednotek, které jsou dostatečně antigenicky blízké pro to, aby generovaly ochrannou imunologickou odpověď v hostiteli Helicobacter infekce. V rozsahu tohoto vynálezu je použití jakékoliv ureasy nebo podjednotky ureasy, ať přirozeně se vyskytující nebo získané technikami rekombinantní DNA stejně jako jejich rozštěpeného fragmentu, napojeného proteinu obsahující celou ureasu, její podjednotky nebo fragmentu, nebo zkrácené ureasové konstrukce, která je účinná při snižování úrovně Helicobacter infekce u infikovaného savce. Typicky se jako rekombinantní ureasový antigen podle vynálezu může používat rekombinantní ureasa, která má 70 až 95% homologii, například 80 až 90% homologii, s Helicobacter pylori ureasou.

Diskuse se zde soustřeďuje na použití rekombinantních Helicobacter pylori ureasových A a B podjednotek produkovaných E. coli (část C). Rekombinantní ureasa nebo jejich shora uvedené podjednotky nebo konstrukce schopné vyvolávat žádanou ochrannou imunitní odpověď se mohou připravovat jinými technikami rekombinace DNA a jinými eukaryotickými nebo prokaryotickými

expresními vektory známými odborníkům z oblasti techniky.

Tabulky 3, 4 a 5 níže a obrázek 6 popisují výsledky získané při orální imunizaci myší rekombinantními Helicobacter pylori ureasovými podjednotkami připravenými v E. coli. V tomto pokusu se podávání Helicobacter pylori antigenu provádí orálním podáváním myším rekombinantních Helicobacter pylori ureasových A nebo B podjednotek produkovaných v E. coli, vyčištěných jak shora uvedeno a navázaných na hydroxyapatitové krystaly, používané jako nosič pro zvýšení vazby a příjmu M buňkami. Jako mukózní adjuvans se podává toxin cholery (Sigma). V tomto pokusu se skupiny šest týdnů starých samiček myší SPF BALB/c orálně imunizují 0., 8., 14. a 21. den 30 μg rekombinantní Helicobacter pylori ureasové A podjednotky navázané na 1 mg hydroxyapatitu s 10 μg toxinu cholery jako adjuvans. Tyto myši se pak stimulují dvakrát 10^8 H. felis 32., 34 a 36. den. Pro účely srovnání se podobné šest týdnů staré samičky myší SPF BALB/c orálně imunizují 0., 8., 14. a 21. den 30 μg rekombinantní Helicobacter pylori ureasové B podjednotky navázané na hydroxyapatit a 10 μg toxinu cholery. Tyto myši se pak stimulují třikrát H. felis 32., 34. a 36. den. Jako kontrola se šest týdnů staré samičky myší SPF BALB/c orálně zdánlivě imunizují 0., 8., 14. a 21. den 10 μg toxinu cholery a 1 mg hydroxyapatitu. Tyto myši se pak stimulují 32., 34. a 36. den H. felis. Všechny myši v této studii se imunizují a stimulují současně. Zvířata se 48. den (12 dnů po stimulaci) nebo 10. týden usmrtí.

D. Analýza žaludeční biopsie, krve a intestinálního sekretu

Biopsie se provedou ze žaludku a krve získané ze srdce. Vnitřnosti se odstraní a promyjí se 1mM PMSF (Boehringer) v PBS pufru. Získají se tak intestinální sekrety pro analýzu ELISA.

Při vyhodnocení ochrany proti H. felis kolonizaci se žaludeční biopsie každého zvířete analyzují na přítomnost H. felis vyhodnocováním rychlé ureasové aktivity testem Jatrox HP (Rohm Pharma) podle pokynů dodavatele. Stručně - žaludeční bio-

psie se ponoří do 0,5 ml dodávané směsi močoviny a fenolové červeně, indikátoru pH. Skutečnost, že jde o nekomerční versi směsi močoviny a fenolové červeně je známa odborníkům z oblasti techniky. Tato směs může obsahovat například Bacto kvasinkový extrakt (0,1 g), dihydrogenfosforečnan draselný (0,091 g), hydrogenfosforečnan sodný (0,095 g), močovinu (20 g) a Bacto fenolovou červeň (0,01 g) s výsledným pH 6,9 při 25 °C. Ureasová aktivita generuje z močoviny amoniak a hydrogenuhličitan, následuje barevná změna roztoku směrem k vyšší absorbanci při 550 nm. Urasová aktivita se kvantitativně vyhodnotí spektrofotometrickou analýzou. Další způsoby vyhodnocování ureasové aktivity jsou zřejmé odborníkům z oblasti techniky a lze je nalézt například v citaci Mobley H.L.T. a Hausinger R.P.: "Mikrobial Ureases: Significance, Regulation, and Molecular Characterization" v Mikrob. Reviews 53, 85 (1989).].

Žaludeční biopsie každého zvířete zahrnuté v tomto pokusu popsaném v části B byly kultivovány také na BHI agarosových deskách, doplněných jak shora uvedeno, pro detekci H. felis. Po 3 až 10 dnech inkubace v mikroaerofilních podmínkách byla přítomnost H. felis potvrzena obarvením Gram a stanovením ureasové aktivity. Jelikož byly pro detekci H. felis v žaludečních biopsiích mezi ureasovými testy a H. felis kulturami během první řady pokusů (viz tabulka 3) získány velmi významné korelace, byly pro detekci H. felis v pokusu popsaném v části C prováděny pouze testy ureasy gastrické biopsie. Detekce H. felis byla potvrzena mikroskopií dvěma nezávislými výzkumnými pracovníky použitím dvou různých zbarvení (akridinová oranž a kresylová violeť).

Vzorky krve byly sráženy 3 h za teploty místnosti (RT), serum byly isolováno a zmrazeno na -20 °C do další analýzy. Intestinální sekrece byly 5 minut odstřeďovány při 4 °C, aby se odstranily zbytky buněk, a zmrazeny na -20 °C. Serum a intestinální vzorky každého zvířete byly analyzovány testem ELISA na antiHelicobacter aktivitu, podle standardních postupů. Ve stručnosti - deska s 96 jamkami se potáhne sonikátem (tj. ly-

zátem získaným působením ultrazvuku) Helicobacter pylori, následuje nasycení 5% beztučným mlékem. Vzorky se seriálově zředí od 1:1 do 1:1000 a inkubují se přes noc při 4 °C na deskách ELISA. Pro stanovení množství protilátek se použije biotinylovaný antimyší IgG (serový) a antimyší IgA, následuje streptavidin-křenová peroxidasa.

Výsledky H. felis stimulací následujících po imunizaci vyčištěnou Helicobacter pylori ureasou jsou uvedeny v tabulkách 1 až 3 a na obrázcích 1 až 4. Výsledky stimulací H. felis následující po imunizaci rekombinantními Helicobacter A a B podjednotkami jsou uvedeny v tabulkách 4 až 6 a na obrázcích 5 a 6.

Tabulka 1

myši č.	imunizace	ureasový test	kultura Gram	imunoglobuliny serum		intest.sekr.	
		12 h		Ig	IgG	Ig	IgA
1	ureasa+HF	+	H. felis	27	0	25	258
2	ureasa+HF	0	0	264	273	221	246
3	ureasa+HF	0	0	84	44	318	354
4	ureasa+HF	+	H. felis	81	42	12	5
5	ureasa+HF	0	0	98	137	126	234
6	ureasa+HF	+	0	968	2093	31	22
7	ureasa+HF	0	0	98	0	96	34
8	ureasa+HF	0	0	247	1010	214	128
9	ureasa+HF	0	0	ND	ND	48	23
10	ureasa+HF	0	0	50	0	124	99
11	ureasa	0	0	319	205	44	53
12	ureasa	0	0	14	0	86	87
13	ureasa	0	0	0	0	0	0
14	ureasa	0	0	0	0	43	61
15	ureasa	0	0	58	0	110	127
16	ureasa	0	0	140	63	21	37

Tabulka 1 (pokračování)

myši č.	imunizace	ureasový test	kultura Gram	imunoglobuliny serum		intest.sekr.	
		12 h		Ig	IgG	Ig	IgA
17	ureasa	0	0	84	240	114	280
18	ureasa	0	0	ND	ND	93	148
19	ureasa	0	0	45	0	135	216
20	ureasa	0	0	261	197	161	261
21	CT+HF	0	0	0	0	0	2
22	CT+HF	+	H. felis	63	0	310	303
23	CT+HF	+	H. felis	90	0	ND	ND
24	CT+HF	+	H. felis	31	0	150	192
25	CT+HF	+	H. felis	197	250	250	440
26	CT+HF	+	H. felis	105	135	214	138
27	CT+HF	+	H. felis	140	47	109	55
28	CT+HF	+	0	0	0	16	15
29	CT+HF	+	H. felis	0	0	0	0
30	CT+HF	+	H. felis	ND	ND	ND	ND
31	HP sonikát+HF	+	H. felis	0	0	76	103
32	HP sonikát+HF	+	H. felis	77	0	11	33
32	HP sonikát+HF	+	H. felis	549	748	57	36
34	HP sonikát+HF	0	0	660	153	180	286
35	HP sonikát+HF	+	H. felis	730	192	0	5
36	HP sonikát+HF	+	H. felis	32	0	5	64
37	HP sonikát+HF	0	0	400	400	312	1149
38	HP sonikát+HF	+	H. felis	1007	1360	149	26
39	HP sonikát+HF	0	0	220	186	133	122
40	HP sonikát	0	0	873	1016	352	514
41	HP sonikát	0	0	727	899	126	191
42	HP sonikát	0	0	109	686	44	83
43	HP sonikát	0	0	147	949	167	97
44	HP sonikát	0	0	845	1094	246	64
45	HP sonikát	0	0	1217	1198	210	157
46	HP sonikát	0	0	81	0	256	218

Tabulka 1 (dokončení)

myši č.	imunizace	ureasový test	kultura Gram	imunoglobuliny serum		intest.sekr.	
		12 h		Ig	IgG	Ig	IgA
47	HP sonikát	0	0	329	210	241	276
48	HP sonikát	0	0	1049	737	197	211

V tabulce 1, která se týká pokusu popsaného v sekci B, "h" znamená hodina, "Ig" znamená imunoglobulin, "ND" znamená nestanoveno, "ureasa+HF" znamená, že myši byly imunizovány ureasou (navázanou na hydroxyapatit společně s toxinem cholery) a potom stimulovány H. felis, "ureasa" znamená, že myši byly imunizovány ureasou (navázanou na hydroxyapatit společně s toxinem cholery) a nebyly stimulovány, "CT+HF" znamená, že myši byly zdánlivě imunizovány toxinem cholery a stimulovány H. felis, "HP sonikát+HF" znamená, že myši byly imunizovány Helicobacter pylori sonikátem s toxinem cholery a stimulovány H. felis a "HP sonikát" znamená, že myši byly imunizovány Helicobacter pylori sonikátem s toxinem cholery a nebyly stimulovány. V tabulce 1 čísla u výsledků protilátek znamenají absorbanci při 595 nm násobenou 1000. Pozadí, které bylo změřeno v nepřítomnosti protilátek, bylo odečteno.

Výsledky pokusů popsané v části B získané na základě ureasových testů žaludečních biopsií a obarvením H. felis kultur Gram jsou uvedeny v tabulce 2. Infekce byla definována myší s jedním nebo více znaky kolonizace H. felis zahrnující ureasové nebo Gram obarvení kultur.

Tabulka 2

imunizace	stimulace	% infikovaných	% chráněných	
ureasa	H. felis	3/10 (30)	7/10 (70)	*
sonikát	H. felis	6/9 (66)	3/9 (33)	**
CT	H. felis	9/10 (90)	1/10 (10)	

* p = 0,0198 (dvoupásový Fisherův přesný test) při srovnání s CT kontrolou

** p = 0,303 (dvoupásový Fisherův přesný test) při srovnání s CT kontrolou

Z výsledků uvedených v tabulkách 1 a 2 je zřejmé, že statisticky významná ochrana proti stimulaci H. felis se získá orální imunizací Helicobacter pylori ureasou při srování s ochranou získanou buď použitím Helicobacter pylori sonikátu nebo toxinu cholery. Z tabulky 2 je vidět, že z celkem 10 imunizovaných zvířat pouze 3 se staly infekčními při srovnání se 6 ze zvířat imunizovaných Helicobacter pylori sonikátem a 9 ze zvířat imunizovaných toxinem cholery. Tabulka 2 ukazuje, že 70 % zvířat bylo ochráněno proti H. felis při srovnání se 33 % zvířat imunizovaných Helicobacter pylori sonikátem a 10 % zvířat imunizovaných toxinem cholery a potom podrobených stimulaci H. felis. Jinými slovy, 90 % kontrolních myší vystavených působení H. felis bylo tímto pathogenem infikováno na rozdíl od myší imunizovaných Helicobacter pylori ureasou 28 dnů před jejich vystavení působení H. felis, u nichž došlo pouze ke 30% infekci.

To představuje významné snížení infekce (p = 0,0198 u Fisherova přesného testu při srovnání s kontrolními myšmi). Jestliže byly myši orálně imunizovány Helicobacter pylori sonikátem, došlo k infekci ze 67 % (nevýznamné proti kontrole). Ochrana získaná Helicobacter pylori ureasou je neočekávaná a nemohla být předpovězena na základě výsledků pozorovaných pomocí Helicobacter pylori sonikátu.

Pokud se týká obrázků 1 až 4, obrázek 1 je grafickým znázorněním výsledků testů na protilátky v seru (IgG) a intestinálním sekretu (IgA) u myší, které nebyly chráněny po imunizaci ureasou. To jsou myši číslo 1, 4 a 6 v tabulce 1 a představují skupinu A. Obrázek 2 ukazuje protilátkovou odpověď myší, které byly chráněny po imunizaci ureasou (skupina B), tj. myši 2, 3, 5 a 7 až 10.

Obrázek 3 a 4 se týká výsledků získaných s myšmi číslo 31 až 39. Obrázek 3 (skupina C) popisuje protilátkovou opověď myší, které nebyly chráněny po imunizaci Helicobacter pylori sonikátem (myši číslo 31, 32, 33, 35, 36 a 38), a obrázek 4 (skupina D) popisuje protilátkové odpovědi myší, které byly chráněny po imunizaci Helicobacter pylori sonikátem (myši číslo 34, 37 a 39). Je zajímavé si na obrázcích 3 a 4 všimnout, že IgA protilátkové odpovědi (ale nikoliv IgG) jsou vyšší u myší vykazujících ochranu než u myší, které nejsou chráněny, což ukazuje na korelaci mezi ochranou a IgA odpovědí. Serové IgA odpovědi nevykazují korelace. O mukózním IgA, ale nikoliv o serovém IgG, je známo, že hraje roli v ochraně proti bakteriálním infekcím střev [McGhee J.R. a Kyono H.: "New Perspectives in Vaccine Development: Mucosal Immunity to Infections" v Infect. Agents Dis. 2, 55 (1993).].

Výsledky korelace mezi detekcí H. felis v žaludečních biopsiích ureasovými testy a kulturami jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3

	ureasový test +	ureasový test -	celkem
H. felis kultura (+)	16	0	16
H. felis kultura (-)	2	30	32
celkem	18	30	48

Fisherův přesný test: $p<0,0001$

Tabulka 3 ukazuje, že existuje velmi významná korelace mezi výsledky ureasových testů prováděných na žaludečních biopsiích a identifikací H. felis kulturami. Všechna zvířata uvedená v tabulce 3, která byla positivní na ureasovou aktivitu, byla histopatologicky positivní na H. felis. Jelikož kultury detegovaly méně často H. felis infekci než ureasové testy, ureasové testy byly zvýhodněny pro diagnosu H. felis infekce u myší v dalších pokusech vzhledem k jejich lepší citlivosti. Tento přístup umožňoval duplikaci ureasových testů s většími fragmenty žaludku každé myši a dále zvyšoval citlivost ureasového testu. Použití způsobu s nejvyšší citlivostí dále zabraňuje přecenění ochrany získané vakcínovým přípravkem, který se testuje. Jestliže se jako standard pro infekci použije positivní kultura, ochrana indukovaná po ureasové imunizaci během pokusu uvedeného v části B je tak významná jako u společného použití ureasového testu a kultury ($p = 0,021$ proti $p = 0,019$).

Výsledky pokusů popsaných v části C (rekombinantní ureasové podjednotky), získané na základě ureasových testů žaludečních biopsií, jsou uvedeny v tabulce 4, 5 a 6 a na obrázku 6.

Tabulka 4

imunizace	myš č.	ureasový test	infekce
CT, usmrceny 12 dnů po stimulaci	20	0,49	+
	21	0,31	+
	22	0,62	+
	23	0,67	+
	24	0,55	+
	50	0,50	+
	51	0,37	+
	52	0,29	+
	53	0,79	+
	54	0,32	+

Tabulka 4 (pokračování)

imunizace	myš č.	ureasový test	infekce
ure A + HAP + CT, usmrceny	40	0,67	+
12 dnů po stimulaci	41	0,48	+
	42	0,42	+
	43	0,65	+
	44	0,56	+
	45	0,52	+
	46	0,33	+
	47	0,63	+
	48	0,22	+
	49	0,37	+
ure B + HAP + CT, usmrceny	25	0,15	-
12 dnů po stimulaci	26	0,07	-
	27	0,03	-
	28	0,64	+
	29	0,13	-
	30	0,02	-
	31	0,66	+
	32	0,00	-
	33	0,79	+
	34	0,15	-
ure A + HAP + CT, usmrceny	68	0,00	-
10 týdnů po stimulaci	69	0,07	-
	70	0,42	+
	71	0,00	-
	72	0,00	-
ure B + HAP + CT, usmrceny	73	0,37	+
10 týdnů po stimulaci	74	0,00	-
	75	0,37	+
	76	0,00	-
	77	0,00	-
	78	0,00	-
	79	0,39	+
	80	0,00	-

Tabulka 4 (dokončení)

imunizace	myš č.	ureasový test	infekce
	81	0,37	+
	82	0,00	-

V tabulce 4 "CT" znamená toxin cholery, "ure A" znamená rekombinantní Helicobacter pylori ureasovou A podjednotku, "ure B" znamená rekombinantní Helicobacter pylori ureasovou B podjednotku a "HAP" znamená hydroxyapatitové krystaly. Myši 20 až 54 byly usmrceny 12 dnů po stimulaci a myši 68 až 82 10 týdnů (106 dnů) po stimulaci. Výsledky ureasového testu provedené z biopsie žaludku každého živočicha byly vyjádřeny jako hodnoty OD (optická hustota) při 550 nm. OD hodnota pro testovaný roztok samotný (0,075) byla odečtena jako pozadí od OD hodnoty získané pro každou myš. Positivní a negativní známénka označují konečný stav infekce každého zvířete podle positivity nebo negativity ureasového testu na detekci H. felis. Positivita: OD_{550} hodnoty větší než 0,2. Hodnota 0,2 byla zvolena pro definování positivní infekce, protože při této hodnotě lze pozorovat změnu barvy roztoku Jatrox pouhým okem.

Tabulka 5
Ochrana měřená 12 dnů po stimulaci

imunizace	stimulace	% infikovaných	% chráněných
ureasová A podjednotka	H. felis	10/10 (100)	0/10 (0)
ureasová B podjednotka	H. felis	3/10 (30)	7/10 (70) *
CT	H. felis	10/10 (100)	0/10 (0)

* p = 0,0031 (dvoupásový Fisherův přesný test) při srovnání s CT kontrolou

Tabulka 6
Ochrana měřená 10 týdnů po stimulaci

imunizace	stimulace	% infikovaných	% chráněných
ureasová A podjednotka	H. felis	1/10 (20)	4/5 (80) *
ureasová B podjednotka	H. felis	4/10 (40)	6/10 (60) **

* p = 0,003 (dvoupásový Fisherův přesný test) při srovnání s CT kontrolou

** p = 0,01 (dvoupásový Fisherův přesný test) při srovnání s CT kontrolou

Z výsledků uvedených v tabulkách 4, 5 a 6 je vidět, že statisticky významná ochrana proti stimulaci H. felis se získá orální imunizací rekombinantní Helicobacter pylori ureasovou B podjednotkou při srování s ochranou získanou buď použitím rekombinantní Helicobacter pylori ureasové A podjednotky nebo toxinu cholery. Na základě tabulky 4 je vidět, že 12 dnů po stimulaci se z celkem 10 imunizovaných zvířat pouze 3 staly infekčními ve skupině ureasové B podjednotky při srovnání se všemi 10 zvířaty imunizovanými Helicobacter pylori A podjednotkou ureasy a 10 z 10 zvířat imunizovaných toxinem cholery. Tabulka 4 ukazuje, že 70 % zvířat bylo ochráněno proti stimulaci H. felis při srovnání s 0 % zvířat imunizovaných Helicobacter pylori ureasovou A podjednotkou a 0 % zvířat imunizovaných toxinem cholery a potom podrobených stimulaci H. felis. Jinými slovy, 100 % kontrolních myší vystavených působení H. felis bylo infikováno na rozdíl od myší imunizovaných rekombinantní Helicobacter pylori ureasovou B podjednotkou, kterých bylo infikováno pouze 30 %. To znamená významné snížení infekce (p = 0,0031 u Fisherova přesného testu při srovnání s kontrolními myšmi). Skutečnost, že ochrana pozorovaná u Helicobacter pylori ureasy je zcela získána imunizací B podjednotkou ureasy a že A podjednotka nemá tento vliv, nebyla očekávána na základě

našich pokusů s vyšištěnou ureasou. Tato definice úloh 2 strukturních podjednotek ureasy při vzniku ochranné imunitní odpovědi je tedy nová. Ochrana získaná rekombinantními ureasovými podjednotkami, které jsou enzymaticky neaktivní, také popisuje, že se netoxické formy ureasy mohou použít jako orální vakcína proti Helicobacter infekci. Tyto výsledky dále ukazují, že rozpoznání aktivního místa není pro ochranu potřebné, jelikož neaktivní ureasová B podjednotka velmi nepravděpodobně indukuje protilátky, které budou rozpoznávat a inhibovat katalytické místo přírodní ureasy.

Pokud jde o tabulku 6, je vidět, že v případě 20 myší usmrcených 10 týdnů po infekci 60 % (6 z 10 myší) zvířat imunizovaných ureasovou B podjednotkou a 80 % (4 myši z 5) zvířat imunizovaných Helicobacter pylori ureasovou A podjednotkou bylo ochráněno proti H. felis infekci. Skutečnost, že ochrana získaná imunizací ureasové B podjednotky trvá celou dobu a že imunizace ureasou A indukuje ochranu, která je zpožděna při srovnání s ochranou indukovanou ureasovou B podjednotkou, nemohla být očekávána z našich pokusů s vyčištěnou ureasou nebo z jiného dříve provedeného pokusu. Skutečnost, že imunizace ureasovou A podjednotkou uděluje ochranu, definitivně potvrzuje, že pro ochranu není potřeba rozpoznání aktivního místa.

Obrázek 6 shrnuje výsledky získané po orální imunizaci rekombinantními ureasovými A a B podjednotkami (popsáno v tabulkách 5 a 6).

Druhá řada myší byla imunizována a testována na infekci Helicobacter felis 10 týdnů po stimulaci podle postupu popsaného v části C. V tomto příkladu se 12 myší zdánlivě imunizuje samotným toxinem cholery, 12 myší se imunizuje rekombinantní ure A podjednotkou a 10 myší se imunizuje rekombinanantní ure B podjednotkou. Střední hladina ureasové aktivity nalezená ve vzorcích žaludku myší, které byly imunizovány ure B, ale neinfikovány (neinfikovaná kontrola), byla 0,045. Toto množství bylo odečteno jako pozadí od každé získané OD hodnoty. Myši byly

považovány za infikované, jestliže OD hodnota byla větší než hodnota dvojnásobku standardní odchylky hodnot získaných u kontroly neinfikovaných myší; standardní odchylka byla 0,022. Data, která byla získána v tomto pokusu, jsou uvedena v tabulce 7.

Tabulka 7

imunizace	myš č.	ureasový test	infekce
CT, usmrceny 10 týdnů po stimulaci	135	0,40	+
	136	0,28	+
	137	0,25	+
	138	0,10	+
	139	0,10	+
	140	0,34	+
	141	0,41	+
	142	0,36	+
	143	0,46	+
	144	0,40	+
	145	0,40	+
	146	0,51	+
ure A + HAP + CT, usmrceny 10 týdnů po stimulaci	161	0,12	+
	162	0,47	+
	163	0,00	-
	164	0,00	-
	165	0,02	-
	166	0,01	-
	167	0,01	-
	168	0,37	+
	169	0,00	-
	170	0,39	+
	171	0,47	+
	172	0,00	-

Tabulka 7 (pokračování)

imunizace	myš č.	ureasový test	infekce
ure B + HAP + CT, usmrceny	151	0,00	-
10 týdnů po stimulaci	152	0,00	-
	153	0,00	-
	154	0,03	-
	155	0,00	-
	156	0,00	-
	157	0,02	-
	158	0,00	-
	159	0,01	-
	160	0,00	-

Použitím tohoto alternativního způsobu analýzy byla data uvedená v tabulce 4 reanalyzována společně s daty v tabulce 7. Místo odečtení OD hodnoty pozadí získané se samotným ureasovým testovaným roztokem (OD 0,075) byla jako hodnota pozadí použita střední ureasová hladina získaná z kontroly neinfikovaných myší.

Střední ureasová hladina získaná z neinfikovaných myší usmrcených 12. den byla 0,089. Myši označené 20 až 54 byly považovány za infikované tehdy, jestliže hodnota OD byla větší než dvojnásobek standardní odchylky hodnot získaných s kontrolou neinfikovaných myší; standardní odchylka byla 0,008. Hodnota pozadí odečtená od OD hodnot myší usmrcených 10. týden byla 0,045. Myši byly považovány za infikované, jestliže hodnota OD byla větší než 0,044.

Při použití tohoto alternativního způsobu analýzy nelze vidět žádný účinek 12 dnů po stimulaci nebo po zdánlivé imunizaci ani po imunizaci ure A podjednotkou. Avšak u 70 % zvířat imunizovaných ure B podjednotkou byla pozorována infekce pouze nízkého stupně (hodnota OD < 0,22) ($p = 0,02$, Mann Whitney

U-test, srovnání se zdánlivě imunizovanou kontrolou). Když byly myši usmrceny 10 týdnů po stimulaci, 59 % (10/17) myší imunizovaných ure A podjednotkou bylo chráněno proti H. felis infekci ($p = 0,0019$, Fisherův přesný test, při srovnání se zdánlivě imunizovanými myšmi). 80 % (16/20) myší imunizovaných ure B podjednotkou bylo chráněno proti H. felis infekci ($p = 0,00002$, Fisherův přesný test, srovnání s kontrolou, zdánlivě imunizované myši). Podle této alternativní analýzy ure A podjednotka také vykazuje ochrannou imunitu. Výsledky získané podle jakéhokoliv způsobu analýzy ukazují, že imunizace rekombinantními Helicobacter pylori ureasovými podjednotkami vykazuje ochrannou imunitu proti Helicobacter infekci.

Tento vynález bude nyní dále popsán odkazem na následující neomezující příklady.

a) Bakteriální kmeny

H. felis byl poskytnout J. Foxem (Division of Comparative Medicine, Mass. Institute of Technology, Boston, USA). Helicobacter pylori byl isolován z pacientů s vředovým onemocněním (CHUV, Lausanne, Švýcarsko).

b) Bakteriální kultury

Kapalná kultura - Bakterie byly kultivovány na BHI (Brain-Heart Infusion, BioMerieux) kapalném mediu obsahujícím 0,25 % (hmotn.) kvasinkového extraktu (Difco) a 10 % (hmotn.) plodového telecího sera (Inotech) doplněném 0,4 % (hmotn.) Campylobacter selektivního doplňku (Oxoid). Bakterie byly inkubovány za mikroaerofilních podmínek při 37 °C a třepány 2 až 3 dny při 37 °C.

Zmrazená kultura - Bakterie byly kultivovány v kapalném mediu, potom byly testovány na ureasovou aktivitu a morfologie byla vyhodnocována obarvením Gram a motilita mikroskopem. Bakterie byly potom odstřeďovány a resuspendovány na koncentraci

OD 30 na ml v BHI plus 20 % (hmotn.) glycerolu a zmrazeny na - 80 °C. Těsně před použitím se zmrazené zásobní podíly nechají roztát v ledu, promyjí ve 20 ml BHI, odstřeďují a resuspendují na koncentraci OD 1,0 až 1,5 na 200 µl v 5mM hydrogenuhličitanu sodném.

Kultura na agarosových deskách - Bakterie byly kultivovány na agarové desce obsahující BHI s 0,25 % (hmotn.) kvasinkového extraktu a 5 % ovčí krve za mikroaerofilních podmínek 3 dny při 37 °C.

Kvantifikace - Množství bakterií bylo stanoveno optickou hustotou BHI roztoku při 660 nm (1 jednotka optické hustoty (1 OD) odpovídá 10^8 bakteriím). Počet živých bakterií se měří počtem jednotek tvořících kolonie.

c) Příprava sonikátů

Helicobacter pylori byla isolována z 31 krevních agarových destiček v 0,15M NaCl a odstřeďována 5 minut při 1400 g při 4 °C. Peleta byla resuspendována ve 3 ml NaCl a podrobena působení ultrazvuku po dobu 4 minut. Množství proteinu bylo vyhodnocováno Bradfordovým testem (BioRad Kit, podle dodavatele).

d) Navázání imunogenu na hydroxyapatit

Imunogen (ureasa nebo její podjednotka) se inkubuje 1 h při 4 °C s hydroxyapatitem. Použije se 1,0 mg hydroxyapatitu na 30 µg imunogenu na myš. Na konci inkubace se přidá 10 µg toxinu cholery na konečný objem 200 µl PBS.

e) Stimulace Helicobacter felis

Myši se mírně anestetizují před nitrožaludeční stimulací Helicobacter felis. H. felis v celkovém objemu 200 µl se dodává do žaludků příslušných myší silikonovou trubicí připojenou k subkutánní injekční stříkačce.

Příklad 1

a) Extrakce

Helicobacter pylori ze 30 krevních agarových desek se isoluje do 0,15M NaCl v ledu. Tento roztok se odstřeďuje 5 minut při 1400 g při 4 °C. Peleta se resuspenduje ve 20 ml vody a 45 vteřin se rozmíchává (maximální rychlost). Extrakt se pak odstřeďuje 20 minut při 6700 g při 4 °C. Isoluje se supernatant. Vyhodnotí se množství proteinu (viz shora uvedenou "kvantifikaci") a protein se vysráží 70% (hmotn.) síranem amonným.

b) Čištění ureasy

Roztok se chromatografuje na koloně se Sepharosou CL-6B (Pharmacia) s PBS (fosforečnanem pufrovaný solný roztok) jako mobilní fází. 22 frakcí, které vykazují silnou ureasovou aktivitu, se spojí a dialyzují se přes noc při 4 °C proti 3 litrům PEB (20mM fosforečnanový pufr, pH 7). Potom se chromatografují na rychle tekoucí Sepharose Q (Pharmacia) s PEB jako mobilní fází. Frakce se eluují 0 až 500mM gradientem NaCl. Deset ze spojených frakcí se silnou ureasovou aktivitou se podrobí SDS na gelu s následujícím obarvením Coomassie. Šest frakcí, které měly 2 rozdílné pásy odpovídající molekulovým hmotnostem 63 000 a 28 000, se spojí a považují se za vyčištěnou ureasu.

Příklad 2 (viz také část B)

Myši, které se používají při imunizačních studiích, se před nitrožaludeční imunizací mírně anestetizují etherem. Potom se sonikovaný přípravek nebo vyčištěná ureasa, hydroxyapatit a toxin cholery suspendují v PBS. Do žaludku příslušné myši se polyethylenovou trubičkou připojenou k subkutánní injekční stříkačce dodá 200 µl přípravku. Tento postup se označuje jako orální imunizace.

Vyhodnocují se tři protokoly orální imunizace, které jsou

popsány níže.

Protokol B1 - vakcinace vyčištěnou ureasou

BALB/c myší samičky staré 6 týdnů (20) se orálně imunizují 30 μg vyčištěné Helicobacter pylori ureasy s 1 mg hydroxyapatitu a 10 μg toxinu cholery 0., 7., 14. a 21. den. Deset myší se pak stimuluje 28. den a 30. den 5.10^7 a 10^8 H. felis z kapalné kultury.

Protokol B2 - vakcinace Helicobacter sonikáty

BALB/c myší samičky staré 6 týdnů (20) se orálně imunizují 2 μg roztoku Helicobacter pylori sonikátu 0., 7., 14 a 21. den. Deset myší se pak stimuluje 28. den a 30. den 5.10^7 a 10^8 H. felis z kapalné kultury.

Protokol B3 - kontrola

BALB/c myší samičky staré 6 týdnů se orálně imunizují 1 mg hydroxyapatitu a 10 μg toxinu cholery 0., 7., 14. a 21. den. Myši se pak stimulují 28. den a 30. den 5.10^7 a 10^8 H. felis. 35. den se myši usmrtí a provedou se biopsie žaludku a také intestinálních sekretů a krve.

Ochrana a vyhodnocení

Pro vyhodnocení ochrany se biopsie analyzují na ureasovou aktivitu Jatrox HP testem (Rohm Pharma) podle pokynů dodavatele. Množství ureasy se zjistí kvantitativním vyhodnocením spektrofotometrických měření při 550 nm. Biopsie se kultivují také na přítomnost H. felis. Přítomnost H. felis se stanoví Gram obarvením. Žaludeční antrální biospie se homogenizují, zředí (1:10 až 1:1000) v 0,15M NaCl a vysejí se na krevní agarové desky, které se inkubují za mikroaerofilních podmínek při 37 °C 4 až 10 dnů.

ELISA

Intestinální sekrety a krev se analyzují testem ELISA, kterým se vyhodnocuje titer protilátek. ELISA se provádí následujícím způsobem. Polystyrenové desky (96 jamek) se potahují 1 μg/jamku vyčištěné ureasy 2 h při 37 °C. Nespecifická vazebná místa se blokují 5% (hmotn.) sušeným mlékem v PBS s 0,1 % (hmotn.) Tweenu 30 minut při 37 °C. Desky se promyjí jednou PBS s 0,1 % hmotn. Tweenu. Krevní vzorky se testují při zředění 1:1000 a intestinální sekrety při 1:1. K antigenem potaženým deskám se přidá 100 μl každého vzorku. Po 2 h inkubace se desky promyjí třikrát PBS obsahujícím 0,1 % (hmotn.) Tweenu. Protimyší biotinylovaná kozí celá protilátka a protimyší IgA, IgG a IgM (Amersham) se přidají (100 μl) v ředění 1:500 (s výjimkou IgA (1:250)0. Inkubuje se 1 h při 37 °C. Desky se promyjí třikrát PBS s 0,1 % (hmotn.) Tweenu, přidá se 100 μl streptavidinu a křenové peroxidasy v PBS obsahujícím 0,1 % hmotn. Tweenu v ředění 1:1000 a 30 minut se nechá se probíhat inkubace při 37 °C. Desky se třikrát promyjí, přidá se 50 μl o-fenyldiaminu v citrátovém pufru o pH 5,0 v ředění 1:50 společně s 1 μl/ml 30% (hmotn.) peroxidu vodíku a inkubuje se 20 minut za teploty místnosti. Měří se absorbance při 495 nm každé jamky.

Příklad 3 (viz také část C)

Myši použité v imunizačních studiích se před nitrožaludeční imunizací mírně anestetizují etherem. Potom se 30 μg rekombinantní Helicobacter pylori ureasové A nebo B podjednotky, produkované v E. coli, navázané na hydroxyapatit a doplněné toxinem cholery, suspenduje v PBS. Do žaludku příslušné myši se polyethylenovou trubicí napojenou na subkutánní injekční stříkačku dodá 200 μl. Tento postup se označuje jako orální imunizace.

Vyhodnocují se tři protokoly orální imunizace, které jsou uvedeny níže.

Protokol C1 - vakcinace rekombinantní ureasovou A podjednotkou

BALB/c myší samičky staré 6 týdnů (10) se orálně imunizují 30 μg vyčištěné rekombinantní Helicobacter pylori ureasové A podjednotky s 1 mg hydroxyapatitu a s 10 μg toxinu cholery 0., 8., 14. a 21. den. Deset myší se pak stimuluje 32., 34. a 36. den 10^8 H. felis z kapalné kultury.

Protokol C2 - vakcinace rekombinantní ureasovou B podjednotkou

BALB/c myší samičky staré 6 týdnů (10) se orálně imunizují 30 μg rekombinantní Helicobacter pylori ureasové B podjednotky s 1 mg hydroxyapatitu a s 10 μg toxinu cholery 0., 8., 14. a 21. den. Deset myší se pak stimuluje 32., 34. a 36. den 10^8 H. felis z kapalné kultury.

Protokol C3 - kontrola

BALB/c myší samičky staré 6 týdnů se orálně imunizují 1 mg hydroxyapatitu a 10 μg toxinu cholery 0., 8., 14. a 21. den. Myši se pak stimulují 32., 34. a 36. den 10^8 H. felis. 42. den nebo 106. den se myši usmrtí a provede se více biopsií žaludku.

Ochrana a vyhodnocení

Pro vyhodnocení ochrany se biopsie tělesa a předsíně žaludku analyzují na ureasovou aktivitu Jatrox HP testem (Rohm Pharma) podle pokynů dodavatele. Množství ureasy se zjistí kvantitativním vyhodnocením spektrofotometrických měření při 550 nm. Přičtou se celkové hodnoty OD tělesa a předsíně a získá se tak konečná OD hodnota pro každou myš.

Příklad 4

Pro stanovení toho, jestli by imunizace ureasovými peptidy byla účinným léčením Helicobacter infekcí živočichů se myši nejdříve stimulují H. felis a potom se imunizují Helicobacter

pylori ure B podjednotkou. Užitečnost imunizace Helicobacter pylori ure B podjednotkou pro léčení Helicobacter infekce je ukázána jak v příkladu 4 tak v příkladu 5.

a) Infekce myší H. felis

BALB/c myší samičky staré 6 až 8 týdnů se stimulují H. felis 1. a 3. den 1 OD zmrazené kultury. Tyto myši se stimulují 5. den 1,53 OD kapalné H. felis kultury.

b) Vakcinace rekombinantní Helicobacter pylori ureasovou B podjednotkou

Osm myší infikovaných H. felis se orálně imunizuje 30 μg rekombinantní Helicobacter pylori ureasové B podjednotky, 1 mg hydroxyapatitu a 10 μg toxinu cholery (holoenzym získaný od Calbiochem) 23., 30., 37. a 44. den.

c) Kontroly

Deset myší infikovaných H. felis se orálně imunizuje 1 mg hydroxyapatitu a 10 μg toxinu cholery (holoenzym získaný od Calbiochem) 23., 30., 37. a 44. den. Tyto myši se označí jako "zdánlivě" imunizované myši. Sedm myší infikovaných H. felis nebylo imunizováno.

d) Usmrcení a vyhodnocení

70. den se všechny myši usmrtí. Žaludky se odstraní a podélně se rozříznou na dvě poloviny. Pro vyhodnocení ochrany se jedna polovina žaludku každé myši (jak těleso tak předsíň) vyhodnotí na ureasovou aktivitu 3 až 4 h po usmrcení testem Jatrox HP (Rohm Pharma) podle pokynů dodavatele. Množství ureasy se kvantitativně vyhodnotí spektrofotometrickým měřením při 550 nm. Deset pro pokusy dosud nepoužitých (neinfikovaných) BALB/c myší slouží jako kontrola. Tyto myši byly usmrceny 70. den a vzorky žaludků byly vyhodnoceny na ureasovou aktivitu pro sta-

novení hladina ureasové aktivity pozadí. Střední hodnota 0,033 OD byla odečtena od OD hodnoty pro každou myš. Standardní odchylka ureasové aktivity mezi myšmi dosud nepoužitými pro pokusy byla 0,025 OD. Výsledky ureasové analýzy jsou uvedeny v tabulce 8 a znázorněny na obrázku 7. Na obr. 7 čárkovaná čára znamená OD hodnotu pro dvojnásobek standardní odchylky ureasové aktivity mezi myšmi, které dosud nebyly použity k pokusům.

Tabulka 8

léčení	myš č.	ureasový test	infekce
neléčeny	1	0,42	+
	2	0,36	+
	3	0,41	+
	4	0,33	+
	5	0,38	+
	6	0,52	+
	7	0,48	+
zdánlivě (pouze HAT+CP)	8	0,51	+
	9	0,48	+
	10	0,61	+
	11	0,44	+
	12	0,51	+
	13	0,48	+
	14	0,44	+
	15	0,58	+
	16	0,48	+
	17	0,53	+
ure B + HAP + CT	18	0,36	+
	19	0,01	-
	20	0,43	+
	21	0,07	+/-
	22	0,39	+
	23	0,10	+/-
	24	0,38	+
	25	0,06	+/-

V tabulce 8 "ure B" znamená rekombinantní Helicobacter ureasovou B podjednotku jak shora uvedeno, "CT" znamená toxin cholery, "HAP" znamená hydroxyapatitové krystaly a "neléčeno" znamená, že myši byly stimulovány H. felis, ale nedostaly žádnou následnou imunizaci. Výsledky ureasových testů provedených z biopsií žaludku každého zvířete jsou vyjádřeny jako OD hodnoty při 550 nm. Hodnota OD pozadí odečtená od OD hodnoty pro každou myš byla 0,033. Infekce se hodnotí jako positivní (označeno znaménkem "+"), jestliže OD hodnota při 550 nm je více než dvojnásobek standardní odchylky nalezené u kontroly myší, které nebyly dosud použity pro pokusy (OD 0,05). Označení "+/-" znamená, že OD hodnota je větší než pozadí, ale menší než 0,08, a že tato hodnota je při srovnání se zdánlivě imunizovanými kontrolami nižší.

Z výsledků uvedených v tabulce 7 a na obrázku 7 je vidět, že podávání Helicobacter pylori ure B podjednotky myším infikovaným H. felis vede ke ztrátě infekce u jedné z osmi myší. Podle jiné, méně konzervativní interpretace těchto výsledků, definující positivní výsledek jako hodnoty větší než 0,2, čtyři z osmi myší (č. 2, 4, 6 a 8) léčených ure B by byly považovány za chráněné před infekcí. Avšak při jakékoliv z těchto dvou definic positivního výsledku tyto myši vykazovaly sníženou ureasovou aktivitu při srovnání s neléčenými a zdánlivě imunizovanými myšmi. Při použití hodnoty 0,05 pro definování infekce hladina infekce u ure B imunizovaných myší při srovnání se zdánlivě imunizovanými myšmi vykazuje statisticky významné snížení (hodnota p menší než 0,004). Výsledky z příkladu 4 tedy ukazují, že podání ure B myším infikovaným H. felis vede ke snížení úrovně infekce.

Příklad 5

a) Infekce myší H. felis

BALB/c myší samičky ve stáří 5 až 8 týdnů byly 1. den stimulovány 1 OD kapalné kultury H. felis. Myši byly stimulovány

3. den 0,8 OD H. felis kultivovaných na agarosových deskách. Tyto myši byly stimulovány 5. den 1 OD H. felis kultivovaných na agarosových deskách.

b) Vakcinace rekombinantní Helicobacter pylori ureasovou B podjednotkou

Myši infikované H. felis se 23., 30., 37. a 44. den orálně imunizují 30 μg rekombinantní Helicobacter pylori ureasové B podjednotky, 1 mg hydroxyapatitu a 10 μg toxinu choleru (holoenzym získaný od Calbiochem). Tyto myši byly označeny jako "imunizované".

c) Kontroly

Myši infikované H. felis se orálně imunizují 1 mg hydroxyapatitu a 10 μg toxinu choleru 23., 30., 37. a 44. den. Tyto myši se označí jako "zdánlivě" imunizované.

d) Usmrcení a vyhodnocení

62. den se 10 imunizovaných a 6 zdánlivě imunizovaných myší usmrtí. 8 týdnů po poslední imunizaci se 10 imunizovaných a 8 zdánlivě imunizovaných myší usmrtí. Vzorky žaludků se vyhodnocují na ureasovou aktivitu jak shora popsáno v příkladu 4. Střední hodnota pozadí pro 29 BALB/c myší, které dosud nebyly použity pro pokusy a které byly usmrceny v různou dobu, byla 0,04 OD. Tato úroveň aktivity byla použita jako měření pozadí a byla odečtena od OD hodnoty pro každou myš. Standardní odchylka ureasové aktivity mezi myšmi dosud nepoužitými pro pokusy byla 0,02 OD. Výsledky ureasové analýzy jsou uvedeny v tabulce 9 a znázorněny na obrázku 8. Na obrázku 8 čárkovaná čára znamená OD hodnotu pro dvojnásobnou standardní odchylku ureasové aktivity myší, které dosud nebyly použity k pokusům.

e) Analýza krevních a fekálních vzorků

Sbírání vzorků krve

Krevní vzorky bylu nechány srážet 3 h za teploty místnosti, serum bylo isolováno a zmrazeno na - 20 °C do další analýzy.

Sbírání fekálních pelet

Čerstvé fekální pelety (3 až 8) byly sebrány do 1,5ml Eppendorfových zkumavek obsahujících 500 µl PBS + 5 % hmotn. netučného sušeného mléka + inhibitory proteasy (AEBSF 0,2 mM, Aprotinin 1 µg/ml, Leupeptin 10 µM, Bestatin 3,25 µM). Vzorky byly do použití zmrazeny na - 20 °C. Potom byly roztáty v ledu, rozdrceny a odstřeďovány při 10 000 g 10 minut při 4 °C. Získal se tak žlutavě hnědý supernatant bez zbytků buněk.

ELISA

Vzorky sera a fekálních pelet každého zvířete byly analyzovány testem ELISA na antiureasovou aktivitu podle standardních postupů.

Fekální pelety a krev se analyzují testem ELISA, kterým se vyhodnocuje titer protilátek. Polystyrenové desky (96 jamek) se potahují 0,5 µg/jamku vyčištěné rekombinantní ureasy 2 h při 37 °C. Nespecifická vazebná místa se blokují 5% (hmotn.) sušeným mlékem v PBS s 0,1 % (hmotn.) Tweenu 30 minut při 37 °C. Desky se promyjí jednou PBS s 0,1 % hmotn. Tweenu. Krevní vzorky se testují při zředění 1:200 a fekální pelety při zředění 1:1. K antigenem potaženým deskám se přidá 100 µl každého vzorku. Po 2 h inkubace se desky promyjí třikrát PBS obsahujícím 0,1 % (hmotn.) Tweenu. Protimyší biotinylovaná celá protilátka z koz (Amersham) a protimyší IgA navázaný na křenovou peroxidasu (Serotec) se přidají (100 µl) v ředění 1:500. Inkubuje se 1 h při 37 °C. Desky se promyjí třikrát PBS s 0,1 % (hmotn.)

Tweenu, přidá se 100 µl streptavidinu a křenové peroxidasy v PBS obsahujícím 0,1 % hmotn. Tweenu v ředění 1:500 a 30 minut se nechá se probíhat inkubace při 37 °C. Desky se třikrát promyjí, přidá se 50 µl o-fenyldiaminu v citrátovém pufru o pH 5,0 v ředění 1:50 společně s 1 µl/ml 30% (hmotn.) peroxidu vodíku a směs se inkubuje 20 minut za teploty místnosti. Měří se absorbance při 495 nm každé jamky.

Pro vyhodnocení celkových IgA ve fekálních peletách se ELISA provede jak shora popsáno s tím, že se desky potáhnou 1 µg/ml kozího protimyšího IgA (Sigma) a fekální supernatant se testuje při zředění 1:200.

Tabulka 9

usmrcení	léčení	myš č.	ureasový test	infekce
2,5 týdne	zdánlivé	1	0,58	+
	(pouze HAT+CP)	2	0,51	+
		3	0,50	+
		4	0,54	+
		5	0,47	+
		6	0,36	+
	ure B + HAP + CT	7	0,02	-
		8	0,06	+
		9	0,01	-
		10	0,00	-
		11	0,02	-
		12	0,02	-
		13	0,02	-
		14	0,44	+
		15	0,00	-
		16	0,03	-
8 týdnů	zdánlivé	17	0,30	+
	(pouze HAT+CP)	18	0,27	+
		19	0,29	+
		20	0,20	+

Tabulka 9 (dokončení)

usmrcení	léčení	myš č.	ureasový test	infekce
		21	0,27	+
		22	0,27	+
		23	0,37	+
		24	0,31	+
	ure B + HAP+CT	25	0,26	+
		26	0,30	+
		27	0,00	-
		28	0,17	+
		29	ND	
		30	0,00	-
		31	0,00	-
		32	0,00	-
		33	0,00	-
		34	0,00	-

Tabulka 10

usmrcení	léčení	% vyléčených
2,5 týdne	ure B	8/10 (80) *
	zdánlivé	0/6
8 týdnů	ure B	6/9 (67) **
	zdánlivé	0/9

* p = 0,007 (dvoupásový Fisherův přesný test) při srovnání s kontrolou zdánlivě léčenou

** p = 0,014 (dvoupásový Fisherův přesný test) při srovnání s kontrolou zdánlivě léčenou

V tabulkách 9 a 10 "ure B" znamená shora uvedenou rekombinantní Helicobacter pylori ureasovou B podjednotku, "CT" znamená toxin cholery a "HAP" znamená hydroxyapatitové krystaly. "U-

smrceny" znamená datum usmrcení měřeno 44. den od poslední imunizace. "ND" znamená, že nebyla dostupna žádná data. Výsledky ureasového testu provedeného z biopsií žaludku každého živočicha jsou vyjádřeny jako OD hodnoty při 550 nm. Infekce se hodnotí jako positivní (označeno znaménkem "+"), jestliže OD hodnota při 550 nm je více než dvojnásobek standardní odchylky nalezené u dospělých myší (OD 0,04). Hodnota pozadí odečtená od OD hodnoty pro každou myš byla 0,04 OD. V tabulce 10 "% vyléčených" znamená odstranění infekce podle měření ureasovým testem.

Z výsledků v tabulkách 9 a 19 a z obrázku 8 bude vidět, že podávání Helicobacter pylori ure B podjednotky myším infikovaným H. felis vedlo k odstranění infekce u osmi myší z deseti při testu, při kterém byly myši usmrceny 2,5 týdne po poslední imunizaci. Jestliže se test prováděl tak, že myši byly usmrceny 8 týdnů po poslední imunizaci, byla infekce odstraněna u 6 z 9 myší. Jestliže se pro definování infekce zvolí vyšší hodnota 0,2, jak je diskutováno u tabulky 8, podle tohoto způsobu interpretace léčení ure B podjednotkou vedlo k odstranění infekce u 9 z 10 myší usmrcených po 2,5 týdne.

Tabulka 10 ukazuje, že statisticky významné léčení H. felis infekce se získá orální imunizací rekombinantní Helicobacter pylori ureasovou B podjednotkou při srovnání se zdánlivou imunizací samotným toxinem cholery a hydroxyapatitem. Tabulka 10 ukazuje, že při měření po 2,5 týdnech od poslední imunizace bylo 80 % infikovaných myší zbaveno infekce. Jestliže se měří 8 týdnů po poslední imunizaci, 67 % infikovaných myší bylo zbaveno infekce. Žádná ze zdánlivě imunizovaných myší nebyla zbavena infekce, ať se měří 2,5 nebo 8 týdnů po poslední imunizaci. Významnost snížení procenta myší zbavených infekce, jestliže se měření provádí 8 týdnů od poslední imunizace proti měření po 2,5 týdne, je v současné době nejasná.

Tabulka 11

myš č.	ureasový test	celkem antiureB Ig v krvi	celkem IgA ve fekáliích	ureB IgA ve fekáliích	ureB IgA ve fekáliích/celkem IgA ve fekáliích
př.4:					
8	0,51	0,27	0,77	0,05	0,06
9	0,48	0,23	0,65	0,02	0,03
10	0,61	0,25	0,43	0,08	0,18
11	0,44	0,36	0,69	0,03	0,04
12	0,51	0,31	0,58	0,00	0,00
13	0,48	0,32	0,67	0,11	0,17
14	0,44	0,27	0,51	0,03	0,05
15	0,58	0,29	0,82	0,07	0,08
16	0,48	0,30	0,77	0,18	0,23
17	0,53	0,30	0,53	0,09	0,18
18	0,36	0,22	0,51	0,00	0,00
19	0,01	0,47	0,62	0,47	0,75
20	0,43	0,35	0,57	0,15	0,26
21	0,07	0,25	0,64	0,11	0,17
22	0,39	0,27	0,50	0,15	0,30
23	0,10	0,27	1,08	ND	ND
24	0,38	0,28	0,66	ND	ND
25	0,06	0,28	0,53	ND	ND
př.5:					
7	0,02	0,11	0,61	0,06	0,11
8	0,06	0,13	0,62	0,02	0,03
9	0,01	0,15	0,62	0,04	0,07
10	0,00	0,15	0,59	0,03	0,05
11	0,02	0,19	0,60	0,15	0,24
12	0,02	0,16	0,60	0,00	-0,01
13	0,02	0,19	0,66	0,07	0,11

Tabulka 11 (dokončení)

myš č.	ureasový test	celkem antiureB Ig v krvi	celkem IgA ve fekáliích	ureB IgA ve fekáliích	ureB IgA ve fekáliích/celkem IgA ve fekáliích
14	0,44	0,18	0,62	0,00	0,00
15	0,00	0,10	0,64	0,08	0,12
16	0,03	0,14	0,62	0,29	0,46
25	0,26	0,35	0,98	0,07	0,07
26	0,30	0,38	1,12	0,04	0,03
27	0,00	0,39	1,15	0,01	0,01
28	0,17	0,33	0,97	0,02	0,02
29	ND*	0,38	1,00	0,08	0,08
30	0,00	0,34	0,69	0,04	0,06
31	0,00	0,38	0,76	0,08	0,10
32	0,00	0,37	0,58	0,02	0,04
33	0,00	0,38	1,07	0,22	0,21
34	0,00	0,35	0,64	0,06	0,09

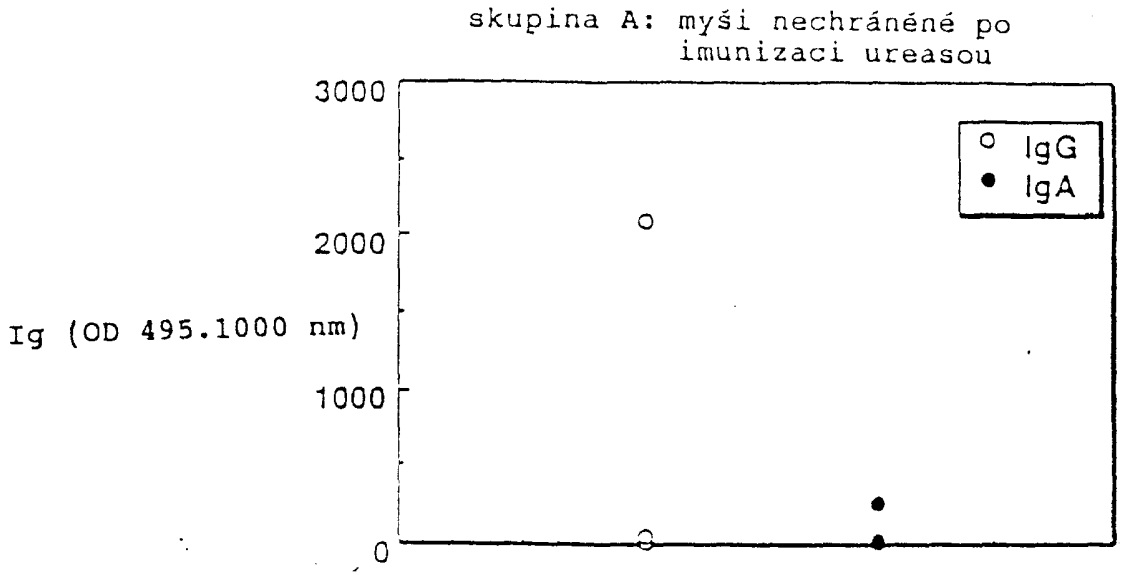
V tabulce 11 byly myši, které byly léčeny ure B, použité v příkladech 4 a 5, hodnoceny na obsah protilátky v krvi a fekáliích. Číslo použité myši odpovídá číslu, které je uvedeno v tabulkách 8 a 9. Výsledky ureasového testu odpovídají výsledkům popsaným v tabulkách 8 a 9. "ND*" znamená, že nebyla dostupna žádná data, protože jeden ze žaludků od myší 18 až 21 byl ztracen. Vynálezci nejsou schopni určit, která z řady dat od myší 18 až 21 není úplná. "ND" tedy neznamená, že je specificky přiřazeno myši číslo 21.

Při testech myší z příkladu 4 a myší očíslovaných 1 až 10 z příkladu 5 měly vynálezci obtíže se získáním příslušných vzorků pro analýzy.

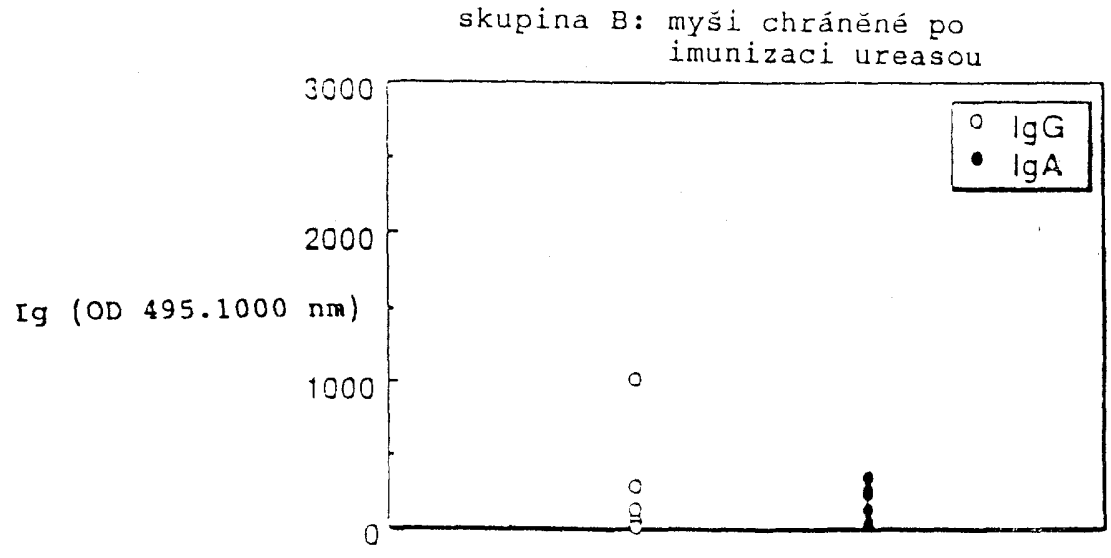
Odstranění H. felis infekce orálním podáváním Helicobacter

pylori ure B podjednotky nebylo očekáváno a je tedy nové. Zde popsané výsledky také popisují, že ure B podjednotku lze použít k léčení Helicobacter infekce.

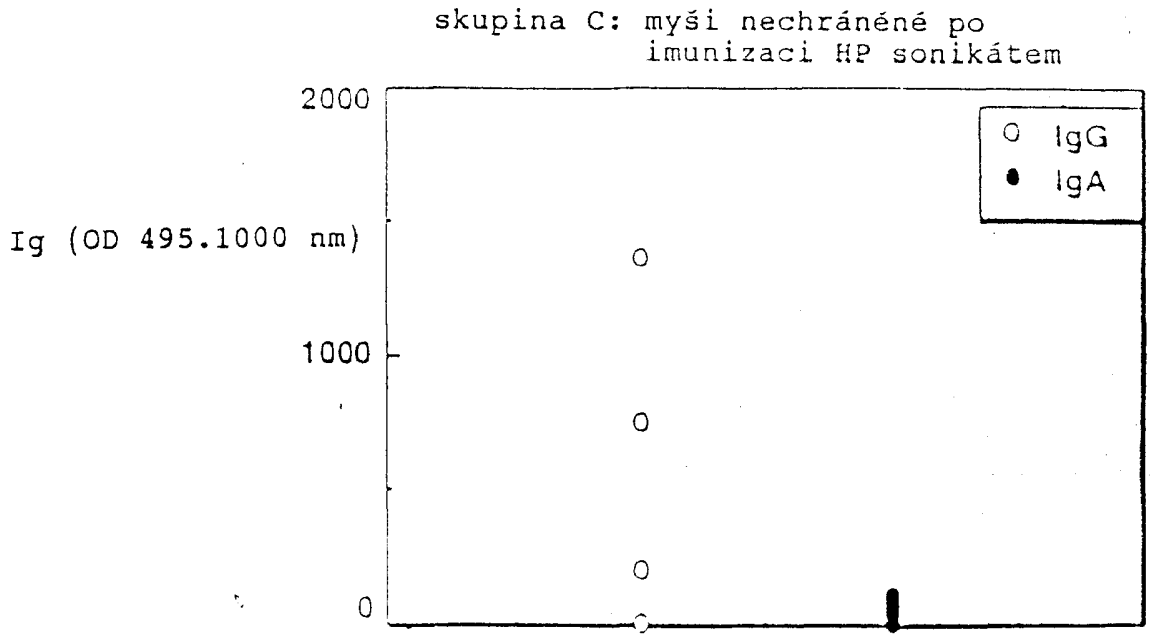
Odborníci z oblasti techniky ocení, že předložený vynález je dobře přizpůsoben předmětům a dosažení uvedených cílů a výhod také těm, které jsou v něm obsaženy. Ureasové peptidy, mukózní adjuvans, nosiče a protilátky spolu se způsoby, postupy, léčeními a analýzami jsou příklady a nejsou zamýšleny jako omezení rozsahu vynálezu. Pro odborníka jsou jasné jejich změny a změny v jejich použitích, které jsou zahrnuty v duchu vynálezu tak, jak je to definováno rozsahem nároků.


skupina A: myši nechráněné po imunizaci ureasou
3000
2000
1000
0
Ig (OD 495.1000 nm)
IgG
IgA

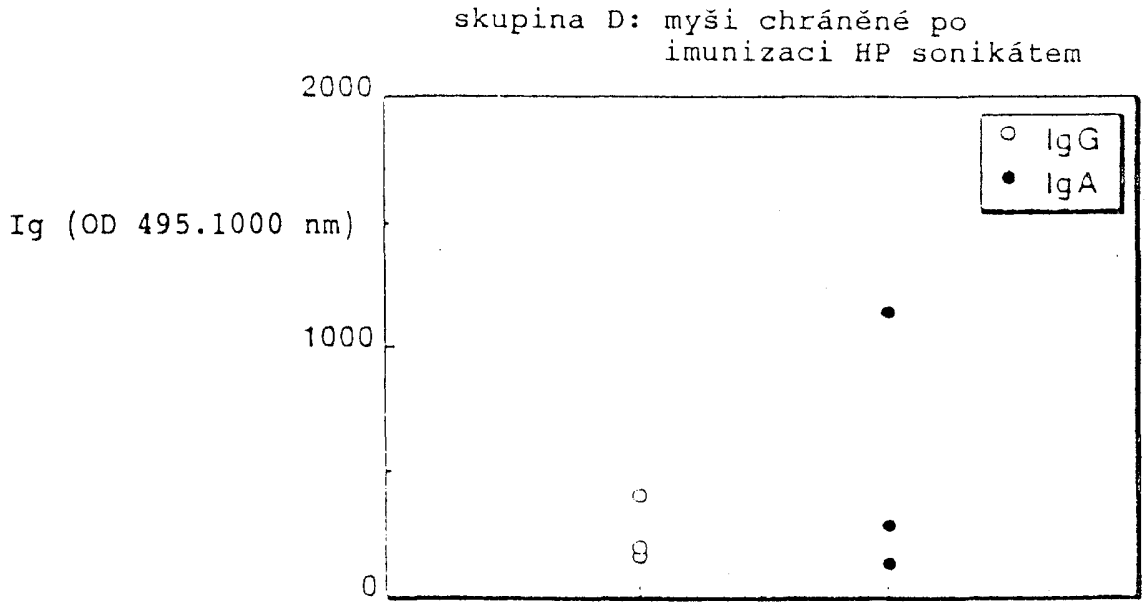
OBR. 1


skupina B: myši chráněné po imunizaci ureasou
3000
2000
1000
0
Ig (OD 495.1000 nm)
IgG
IgA

OBR. 2

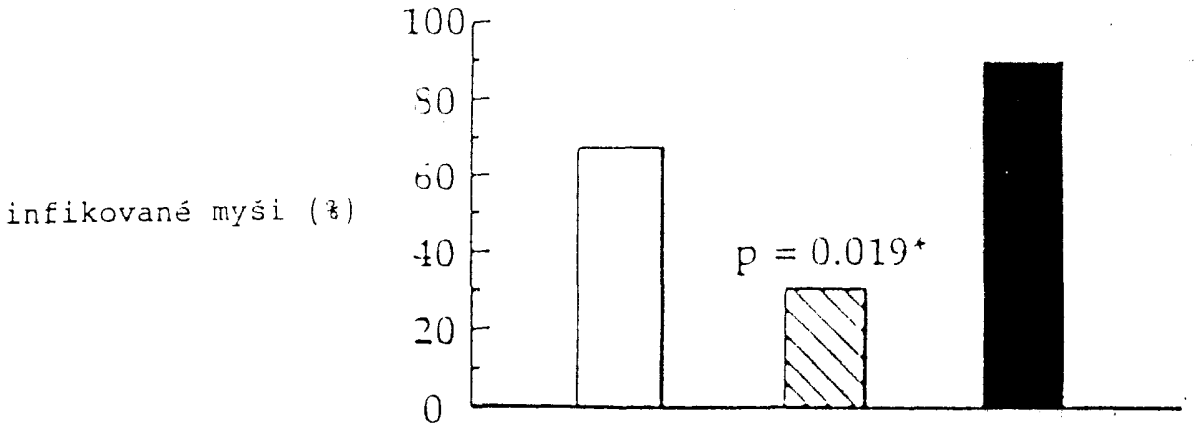

skupina C: myši nechráněné po imunizaci HP sonikátem
2000
1000
0
Ig (OD 495.1000 nm)
IgG
IgA

OBR. 3


skupina D: myši chráněné po imunizaci HP sonikátem
2000
1000
0
Ig (OD 495.1000 nm)
IgG
IgA

OBR. 4

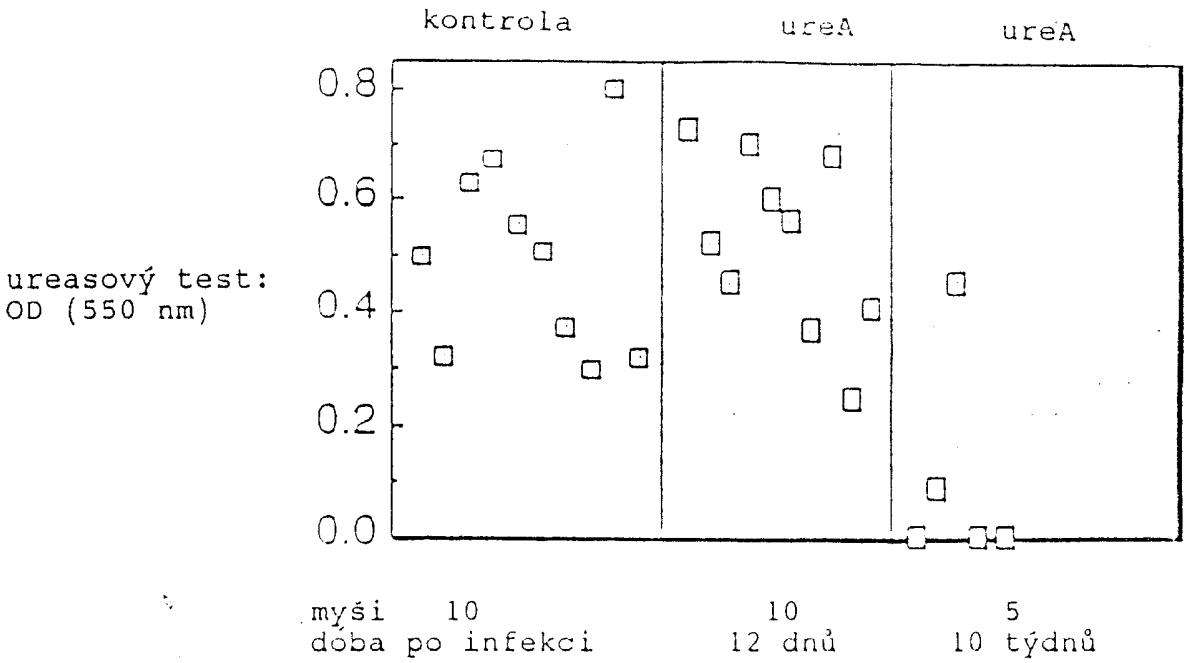
PV 2503-96



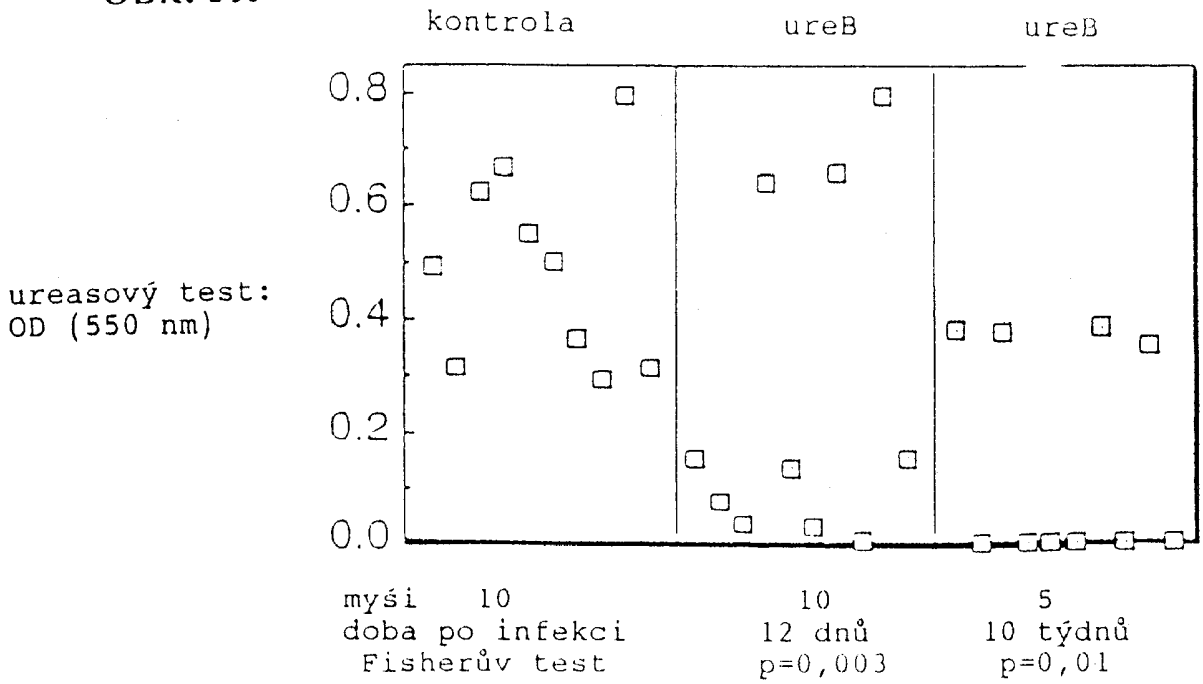
imunizace:	H. pylori sonikát	H. pylori ureasa	kontrola
chráněno:	3/9	7/10	1/10

* Fišerův přesný test

OBR. 5

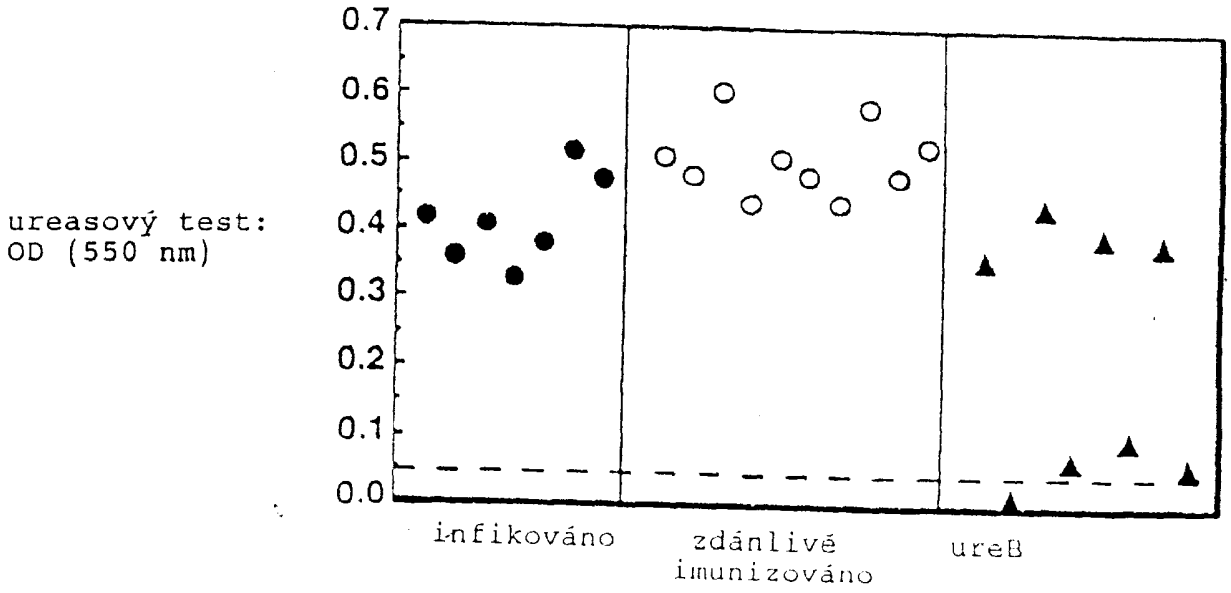

kontrola
ureA
ureA
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
ureasový test:
OD (550 nm)
myši 10 10 5
doba po infekci 12 dnů 10 týdnů

OBR. 6A

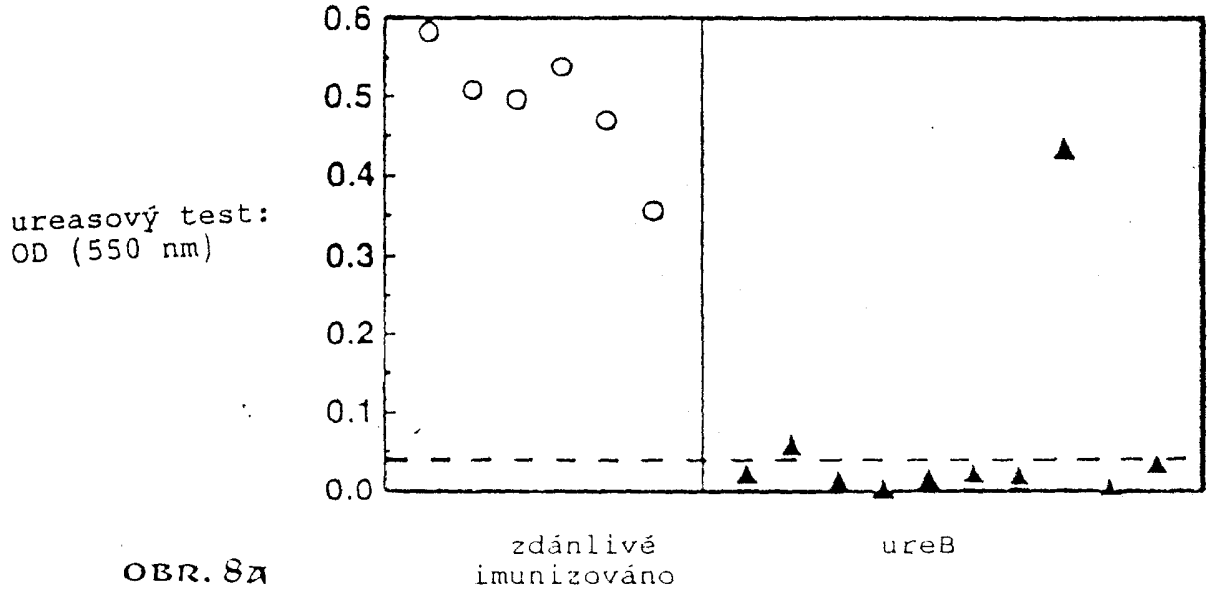

kontrola
ureB
ureß
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
ureasový test:
OD (550 nm)
myši 10 10 5
doba po infekci 12 dnů 10 týdnů
Fisherův test p=0,003 p=0,01

OBR. 6B

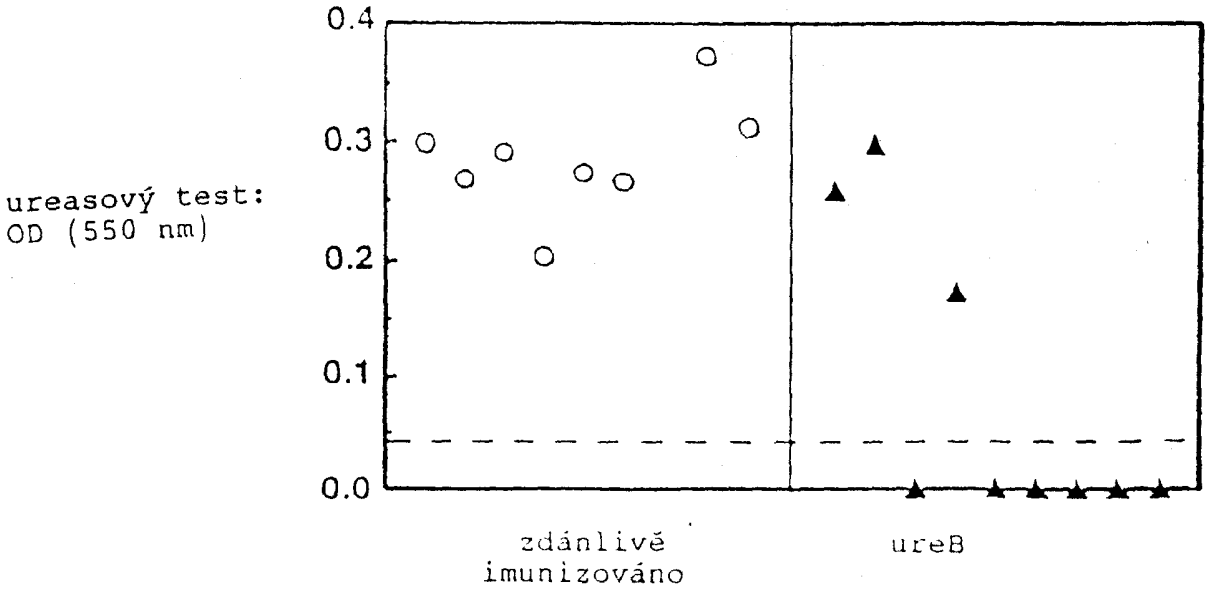
PV 2503-9



OBR. 7


ureasový test:
OD (550 nm)
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
zdánlivě
imunizováno
ureB

OBR. 8A


ureasový test:
OD (550 nm)
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
zdánlivě
imunizováno
ureB

OBR. 8B

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Použití prostředku obsahujícího rekombinantní Helicobacter antigen pro přípravu léčivého přípravku pro léčení Helicobacter infekce u savců.

2. Použití prostředku podle nároku 1, v němž Helicobacter infekcí je Helicobacter pylori infekce.

3. Použití prostředku podle nároku 1, v němž rekombinantní Helicobacter antigen obsahuje Helicobacter pylori antigen.

4. Použití prostředku podle nároku 1, v němž rekombinantní Helicobacter antigen obsahuje Helicobacter ureasu nebo její fragment.

5. Použití prostředku podle nároku 1, v němž rekombinantní Helicobacter antigen obsahuje podjednotku Helicobacter ureasy nebo její fragment.

6. Použití prostředku podle nároku 1, v němž prostředek dále obsahuje mukózní adjuvans.

7. Použití prostředku podle nároku 6, v němž mukózní adjuvans obsahuje tepelně labilní toxin z Escherichia coli nebo jeho fragment.

8. Použití prostředku podle nároku 6, v němž mukózní adjuvans obsahuje B podjednotku tepelně labilního toxinu z Escherichia coli nebo jeho fragment.

9. Použití prostředku podle nároku 1, v němž savcem je člověk.

10. Použití prostředku podle nároku 1, v němž je prostředek podáván savci orálně, nazálně nebo rektálně.

11. Použití protilátky, která rozpoznává Helicobacter antigen pro přípravu léčivého přípravku pro léčení Helicobacter infekce u savců.

12. Použití protilátky podle nároku 11, v němž Helicobacter infekce znamená Helicobacter pylori infekci.

13. Použití protilátky podle nároku 11, v němž savcem je člověk.

14. Použití protilátky podle nároku 11, v němž Helicobacter antigen obsahuje Helicobacter pylori antigen.

15. Použití protilátky podle nároku 11, v němž Helicobacter antigen obsahuje Helicobacter ureasu.

16. Použití protilátky podle nároku 11, v němž se jako protilátka používá monoklonální protilátka.

17. Použití protilátky podle nároku 11, v němž se jako protilátka používá IgA protilátka.

18. Prostředek užitečný pro léčení Helicobacter infekce u savců, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje rekombinantní Helicobacter antigen.

19. Prostředek podle nároku 18, v y z n a č u j í c í s e t í m, že Helicobacter antigen obsahuje Helicobacter pylori antigen.

20. Prostředek podle nároku 18, v y z n a č u j í c í s e t í m, že Helicobacter antigen obsahuje Helicobacter ureasu nebo její fragment.

21. Prostředek podle nároku 18, v y z n a č u j í c í s e t í m, že Helicobacter antigen obsahuje podjednotku Helicobacter ureasy nebo její fragment.

22. Prostředek podle nároku 18, v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále obsahuje mukózní adjuvans.

23. Prostředek podle nároku 18, v y z n a č u j í c í s e t í m, že mukózní adjuvans obsahuje tepelné labilní toxin z Escherichia coli nebo jeho fragment.

24. Prostředek podle nároku 18, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje B podjednotku tepelně labilního toxinu z Escherichia coli nebo jeho fragment.

25. Prostředek užitečný pro léčení Helicobacter infekce u savců, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje protilátku, která rozpoznává Helicobacter antigen.

26. Prostředek podle nároku 25, v y z n a č u j í c í s e t í m, že Helicobacter antigen obsahuje Helicobacter pylori antigen.

27. Prostředek podle nároku 25, v y z n a č u j í c í s e t í m, že Helicobacter antigen obsahuje Helicobacter pylori ureasu.

28. Prostředek podle nároku 25, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se jako protilátka používá monoklonální protilátka.

29. Prostředek podle nároku 25, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se jako protilátka používá IgA protilátka.

Zastupuje: