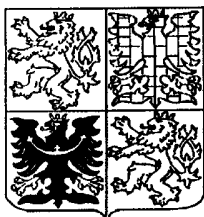


ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(22) 09.04.93
(32) 09.04.93, 13.04.92
(31) 93US/9303409, 92/868286
(33) WO, US
(40) 13.04.94

(21) 2730-93

(13) A3

5(51)

A 61 K 39/02
A 61 K 35/14
C 07 K 3/00
C 07 K 13/00
C 07 K 17/00

- (71) Czinn Steven James, Cleveland Heights, Ohio, US;
Nedrud John Gilbert, Shaker Heights, Ohio, US;
- (72) Czinn Steven James, Cleveland Heights, Ohio, US;
Nedrud John Gilbert, Shaker Heights, Ohio, US;
- (54) **Očkovací látka vhodná pro léčbu infekcí
vyvolaných mikroorganismem rodu Helicobacter**
- (57) Předmětem řešení je očkovací látka vhodná pro léčbu infekcí vyvolaných mikroorganismem rodu Helicobacter obsahující imunogenicky účinné množství antigenu Helicobacter pro vyvolání ochranné imunitní odpovědi u savčího hostitele, ve spojení s farmaceuticky vhodným nosičem nebo ředidlem a s výhodou též s účinným množstvím mikosálního adjuvantu, kterým je přednostně toxin chole-ry. Dále je předmětem řešení též murinní H.felis-specifická IgA monoklonální protilátka a buněčná linie č. 71-G5-A8, která tuto monoklonální látku produkuje.

PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ	URAD	0 1 9 4	000212	č.j.	2730-93
Přil.					

Očkovací látka vhodná pro léčbu infekcí vyvolaných mikroorganismem rodu *Helicobacter*

Oblast techniky

Vynález se týká léčby gastrické infekce savců, včetně člověka. Vynález se zejména týká způsobu léčby infekcí vyvolaných mikroorganismem rodu *Helicobacter* u savců, včetně člověka. Předmětem vynálezu je očkovací látka a protilátky, kterých lze použít při této léčbě.

Dosavadní stav techniky

Infekce mikroorganismem *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) gastrického epithelu člověka je hlavním faktorem, který se podílí na vzniku gastritis a vředů a může se stát rizikovým faktorem, který se podílí na vzniku rakoviny žaludku [Blaser M. J. "Gastric *Campylobacter*-like organisms, gastritis and peptic ulcer disease" *Gastroenterology* 1987, 93, 371 až 483; Graham, D. Y. "Campylobacter *pylori* and peptic ulcer disease" *Gastroenterology* 1989, 96, 615 až 625; Parsonnet, J., Vandersteen, D., Goates, J., Silbey, R. K. Pritikin, J. a Chang, Y. "Helicobacter *pylori* infection in intestinal and diffuse type gastric adenocarcinomas" *J. Natl. Cancer Inst.* 1991, 93, 640 až 643]. Tento tenký gram-negativní mikroorganismus ve tvaru písmene S se rutinním způsobem získává z žaludeční tkáně dospělých lidí a dětí, u nichž byla histologicky prokázána gastritis nebo peptická ulcerace. Důkaz, že *H. pylori* je příčinou gastroduodenální choroby je zřejmý ze studií prováděných na lidských dobrovolnících, gnotobiotických vepřích a bezmikrobních hlodavcích, přičemž jsou splněny Kochovy postuláty tím, že po konzumaci živých mikroorganismů se vyvine histologicky potvrditelná gastritis [Marshall R. J., Armstrong, J. A. a McOschle, D. B., "Attempt to fulfill

Koch's postulate for pyloric Campylobacter" Med. J. Aust. 1985, 142, 436 až 439; Morris, A. a Nicholson, H. "Ingestion of Campylobacter pyloridis causes gastritis and raised fasting gastric pH" Am. J. Gastroenterol, 1987, 82, 192 až 199; Engstrand L., Gustavsson, S., Jörgensen, A., Schwann, A., a Schaynius, A. "Inoculation of barrier-born pigs with Helicobacter pylori a useful animal model for gastritis type B." Infect. Immun. 1990, 53, 1763 až 1768; Fox, J. O., Cabot, E. B., Taylor, N. S. a Larawny, E. "Gastric colonization by campylobacter pylori subor. mustelae in ferrets" Infect. Immun. 1988, 56, 2994 až 2996; Fox. J. G., Pelayo, C., Taylor, N. S., Lee, A., Otto, G. Murphy, C. and Rose, R. "Helicobacter mustelae associated gastritis in ferrets, an animal model of Helicobacter pylori gastritis in humans" Gastroenterology 1990, 99, 352 až 361; Lee, A., Fox. J. G., Otto, G. a Murphy J. "A small animal model of human Helicobacter pylori active chronic gastritis" Gastroenterology 1990, 99, 1315 až 1323; Fox, J. C., Lee, A., Otto, G., Taylor, N. S. a Murphy J. S. "Helicobacter felis gastritis in gnotobiotic rats: an animal model of helicobacter pylori gastritis" Infect. Immun. 1991, 59, 785 až 791; Eaton, K. A., Morgan, D. R. a Krakowka, S. "Campylobacter pylori virulence factors in Gnotobiotic piglets" Infect. Immun. 1989, 57, 1119 až 1125]. Přestože je gastritis obtížně léčitelná, pokud se dosáhne vyhubení mikroorganismu H. pylori, gastritis ustoupí a u pacientů s dvanáctníkovými vředy se dramaticky sníží četnost opakovaného výskytu vředů [Peterson, W. L. "Helicobacter pylori and peptic ulcer discase" N. Engl. J. Med. 1991, 324, 1043 až 1048].

Přestože je H. pylori in vitro susceptibilní vůči mnoha antimikrobiálním činidlům obtížně se dosahuje dlouhodobého potlačení již vzniklých infekcí H. pylori in vivo [Czinn, S. J. a Nedrud, J. G. "Oral Immunization

against *Helicobacter pylori*" Infect. Immun. 1991, 59 2359 až 2363]. Mikroorganismus se vyskytuje v slizovitém povlaku, který pokrývá žaludeční epitel. To je místo, které neumožňuje dosažení dostatečné koncentrace antimikrobiálně účinného činidla, pokud se podává orálně. V současné době doporučuje většina autorit tzv. "trojnásobnou terapii", totiž léčbu solemi vizmutu v kombinaci s tetracyklinem a metronidazolem po dobu dvou až čtyř týdnů. Účinnost tohoto a jiných chemoterapeutických režimů však nicméně není optimální.

V současné době je jen málo známo o úloze mukosálního imunitního systému v žaludku. Distribuce buněk produkujících imunoglobulin (Ig) v normální žaludeční dutině ukazuje, že IgA plasmové buňky tvoří 80 % celkové populace plasmových buněk. Kromě toho, počet plasmových IgA buněk, které jsou přítomny v žaludeční dutině, je srovnatelný s jinými sliznicovými membránami [Brandtzaeg, P. "Role of H chain and secretory component in receptor-mediated glandular and hepatic transport of immunoglobulins in man" Scan. J. Immunol. 1985, 22, 111 až 146; Brandtzang, P., Bjerka, K., Kett, K., Kvale, D., Rognum, T. O., Scott, H., Sollid, L. M. a Valnes, K. "Production and secretion of immunoglobulins in the gastrointestinal tract" Ann. Allergy 1987, 59, 21 až 39]. Přestože se četné studie zabývaly hladinou imunoglobulinu v různých endokrinních tekutinách, nejsou k dispozici žádná data, která by se vztahovala ke koncentraci imunoglobulinů v žaludečních sekretech. Kromě toho, existuje jen omezený počet dat, která uvádějí, že se u pacientů infikovaných *H. pylori* vyvinou specifické IgG a/nebo IgA protilátky v gastrických aspirátech [Wyatt, J. I. Rathbone, R. J. a Heatley, R. V. "Local immune response to gastritic campylobacter in non-ulcer dyspepsia" J. Clin. Path., 1980, 39, 863 až 870]. Jestliže se tedy

infekce již rozvine, nejsou ani protilátky ani antibiotika velmi účinné při jejím potlačování.

Czinn a další ukázali, že opakované orální očkování antigenem *H. pylori* a toxinem cholery má za následek indukci silné gastrointestinální IgA anti-*H. pylori* odpovědi u myši a fretky [Czinn, S. J. a Nedrud, J. G. "Oral Immunization against *Helicobacter pylori*" *infect. Immun.* 1991, 59 2359 až 2363]. Vzhledem k tomu, že však myši a fretky jsou rezistentní vůči infekcím *H. pylori* a že v té době neexistovalo žádné malé modelové zvíře pro vyhodnocování ochrany, nebylo potvrzeno, zda vytvořené protilátky mají ochranný účinek.

Lee a další oznámili, že je možno bezmikrobní hlodavce infikovat *H. felis* a histologickým způsobem reprodukovatelně dokumentovat gastritis [Lee, A., Fox, J. G., Otto, G. a Murphy J. "A small animal model of human *Helicobacter pylori* active chronic gastritis" *Gastroenterology* 1990, 99, 1315 až 1323; Fox, J. C., Lee, A., Otto, G., Taylor, N. S. a Murphy J. S. "*Helicobacter felis* gastritis in gnotobiotic rats: an animal model of *helicobacter pylori* gastritis" *Infect. Immun.* 1991, 59, 785 až 791;]. Nebylo však oznámeno žádné vyhodnocení ochranného účinku.

Přetrvává proto potřeba nalézt účinnou léčbu žaludeční infekce vyvolané *H. pylori*, zejména u člověka. Tento vynález se snaží uspokojit tuto potřebu.

Podstata vynálezu

S překvapením se nyní zjistilo, že orální očkování hostitele antigenem *Helicobacter* má za následek tvorbu protilátek, které poskytují ochranu proti akutní infekci

způsobené mikroorganismy *Helicobacter*. Okolnost, že se vytvoří takové ochranné protilátky nebylo možno předvídat na základě dřívějších výzkumů, poněvadž před vyvinutím tohoto vynálezu neexistoval žádný vhodný model pro vyhodnocení ochrany.

Podle jednoho aspektu se vynález týká způsobu vyvolávání ochranné imunitní odpovědi vůči infekci *Helicobacter* u savčího hostitele, při němž se hostiteli orálně podává imunogenicky účinné množství antigenu *Helicobacter*, za účelem vyvolání požadované imunitní odpovědi.

Podle dalšího aspektu je předmětem vynálezu očkovací látka obsahující antigen *Helicobacter* v množství, které je účinné pro vyvolání ochranné odpovědi u humánního pacienta, v kombinaci s farmaceuticky vhodným ředidlem.

Podle dalšího aspektu se vynález týká způsobu udělování pasivní ochrany vůči infekci způsobené mikroorganismem *Helicobacter* u savčího hostitele, jehož podstata spočívá v tom, že se hostiteli podává imunologicky účinné množství *Helicobacter*-specifické IgA protilátky, za účelem dodání požadované pasivní ochrany.

Podle ještě dalšího aspektu je předmětem vynálezu *Helicobacter felis*-specifická IgA nebo IgG monoklonální protilátka.

Podle dalšího aspektu je konečně předmětem vynálezu také buněčná linie č. 71-G₅-A₈.

Následuje podrobnější popis vynálezu, v němž se používá odkazů na přiložené výkresy.

Přehled obr. na výkrese

Na obr. 1 je znázorněn sloupcový diagram titru protilátky v různých sérech a sekretech bezmikrobních myší po orálním očkování lysátem *H. felis*, ve spojení s toxinem cholery.

Na obr. 2A a 2B jsou znázorněny sloupcové diagramy uvádějící procentický podíl myší infikovaných *H. felis* po aktivním očkování (obr. 2A) a pasivním očkování (obr. 2B), ve srovnání s kontrolními zvířaty.

Při práci na vynálezu se ukázalo, že orální očkování myší za použití antigenu *H. felis* vyvolává ochrannou imunitní odpověď, při níž jsou v žaludečních sekretech přítomny antigen-specifické ochranné protilátky. Účinek této ochranné imunitní odpovědi spočívá v tom, že když jsou očkována zvířata konfrontována s patogenem, nedojde u nich k infekci, ve srovnání s neočkovanými zvířaty, která infikována naopak jsou. Aniž by se chtěli původci tohoto vynálezu vázat na platnost nějaké teorie, domnívají se, že orálním očkováním antigenem *H. felis* se stimuluje společný mukosální imunitní systém a snad i určitá místa v žaludeční sliznici, což má za následek vytvoření *H. felis*-specifických IgA protilátek v žaludečních sekretech, které zabráňují vzniku infekce *H. felis*. Vzhledem k tomu, že *H. felis* a *H. pylori* jsou podobné druhy, které spadají do stejného rodu (*Helicobacter*), je odůvodněně možno učinit závěr, že očkování například bezmikrobního vepře antigenem *H. pylori*, ve spojení s mukosální pomocnou látkou, jako toxinem cholery, bude účinné při prevenci infekce žaludku *H. pylori*. Poněvadž předklinické zkoušky vyvíjených očkovacích látek pro člověka se rutinně provádějí na zvířecích modelech, předpokládá se, že metodologie tohoto vynálezu

bude účinná i u člověka, zvláště při léčení infekcí vyvolaných *H. pylori*.

V souvislosti s vynálezem bylo zjištěno, že pro vyhodnocování úrovně ochrany protilátkami po očkování antigenem *H. felis* je možno použít *H. felis*-bezmikrobního myšího modelu. Na obr. 1 jsou uvedeny výsledky, kterých bylo dosaženo při pokusech na *H. felis*-bezmikrobním myším modelu. Orální očkování modelu bakteriálními antigeny, ve spojení s toxinem cholery, mělo za následek zvýšení titru anti-*H. felis* protilátek v séru, žaludku a střevech a ochranu proti akutní infekci žaludku patogenem *H. felis*. Při pokusech byly skupiny bezmikrobních myší Swiss-Webster (Taconic) orálně očkovány 4x nebo 5x v průběhu jednoho měsíce 2 až 4 mg pomocí ultrazvuku vyrobeného lysátu *H. felis*, ve spojení s 10 µg toxinu cholery. Potom byly myši exponovány orálně provokační infekcí přibližně 10^6 živých bakterií *H. felis*. Myši byly usmrceny a byly jim odebrány intestinální a gastrické sekrety (způsobem popsáným v následujících příkladech). Titry anti-*H. felis* protilátek byly stanoveny metodou ELISA. Šrafované sloupce v obr. 1 představují hodnoty středního titru protilátek ($\pm$ směrodatná odchylka) u očkováných myší, zatímco prázdné sloupce představují hodnoty středního titru protilátek ($\pm$ směrodatná odchylka) u kontrolních neočkováných myší. Výsledky, které jsou graficky zpracovány v obr. 1, jsou číselně presentovány v tabulce 1.

T a b u l k a 1

Titř protilátek (Log_2) v

	séru		žaludku		střevech	
	IgA	IgG	IgA	IgG	IgA	IgG
kontrolní	3,1	3	0	0	1,6	1,1
očkováná	11,8	16,8	2,1	4,25	4,5	4,4

Infekce <i>H. felis</i>		ochrana	
<i>H. felis</i> (+)	<i>H. felis</i> (-)		
kontrolní n=18	14	4	23 %
očkováná n=17	4	13	78 %

Z výše uvedených výsledků je zřejmé, že u očkových myší lze pozorovat podstatně vyšší titry protilátek, ve srovnání s kontrolními zvířaty.

Na obr. 2A a 2B jsou dokumentovány výsledky studií ochrany proti infekci *H. felis* při pokusném aktivním a pasivním očkování. Pokud se týče pokusů s aktivním očkováním, byly myšim, konfrontovaným s provokační infekcí *H. felis* (viz pokusy popsání v souvislosti s obr. 1), po usmrcení odebrány vzorky pro gastrickou biopsii. Při biopsii byla hledána přítomnost *H. felis* pomocí rychlého ureasového testu a/nebo na základě positivity kultury, způsoby popsány v následujících příkladech. Na obr. 2A jsou souhrnně znázorněny výsledky z tří pokusů (n=17 je počet očkových zvířat a n=18 je počet kontrolních zvířat). Levý sloupec se vždy vztahuje k očkováným myšim a pravý sloupec

vždy ke kontrolním neočkovaným myším, přičemž všechny myši byly konfrontovány s provokační infekcí.

Je zřejmé, že z celkového počtu 17 očkovaných zvířat byla infikována pouze 4 zvířata, ve srovnání s 14 infikovanými zvířaty z 18 kontrolních zvířat. Jinými slovy, proti infekci *H. felis* bylo chráněno 78 % očkovaných zvířat a pouze 23 % neočkovaných zvířat.

Skutečnost, že ochrana je přímým důsledkem IgA protilátek, byla prokázána pasivním očkováním bezmikrobních myší *H. felis*-specifickými IgA monoklonálními protilátkami a porovnáním výsledné ochrany s ochranou dosaženou u myší, kterým nebyla podána žádná protilátka nebo kterým byla podána irelevantní protilátka (například Sendai virus-specifická IgA monoklonální protilátka). Výsledky jsou uvedeny na obr. 2B.

IgA monoklonální protilátka, reaktivní vůči *H. felis*, byla izolována a subklonována po očkovacím protokolu, který je podobný, jako protokol popsáný na obr. 1. Bezmikrobním myším byl v době infekce *H. felis* a 4, 8 a 24 hodin po ní orálně podán ascites obsahující *H. felis*-specifické IgA monoklonální protilátky, produkované v buněčné linii č. 71-G₅-A₈, vyrobené způsobem popsáným v následujících příkladech provedení nebo Sendai virus-specifická IgA monoklonální protilátka nebo roztok soli. Sedm dní po infekci se myši usmrtí a provede se gastrická biopsie, zaměřená na *H. felis* (n=7 představuje počet myší, které obdržely *H. felis*-specifickou monoklonální protilátku a n=13 představuje počet myší, které neobdržely žádnou protilátku nebo které obdržely Sendai virus-specifickou monoklonální protilátku. Levý sloupec v grafu se vztahuje vždy k myším, které obdržely *H. felis*-specifickou monoklonální protilátku a pravý sloupec se vztahuje k myším,

které obdržely buď Sendai virus-specifickou monoklonální protilátku nebo roztok soli (bez protilátky).

Výsledky ukazují, že samotný IgA chrání proti infekci žaludeční sliznice bakteriemi *H. felis*.

Je také pozorováno, že orální podání antigenu *H. felis* má za následek podstatné zvýšení úrovně anti-*H. felis* IgG protilátek, jakož i IgA protilátek. Pro tento úkaz existuje několik možných vysvětlení. Předně, bylo pozorováno, že toxin cholery může v některých případech zesílit antigen-specifickou IgA a IgG odpověď [Nedrud, J. G., Liang, S., Hague, N. a Lamm, M. E. "Combined oral/nasal immunization protect mice from Sendai virus infection" *J. Immunol.* 1987, 139, 3484 až 3492]. Kromě toho, studie pohybu buněk ("cell traffic") ukázaly, že IgG lymfocyty mesenterických uzlin představují složku mukosálního imunitního systému a mohou vyvolat tvorbu mukosálních IgG plasmových buněk, které byly pozorovány v žaludeční sliznici. Za třetí, přinejmenším část pozorovaného IgG může být výsledkem transudace protilátky v séru do gastrického průsvitu, což je sekundární jev pozorovaný u mírných až středních zánětů jak u kontrolních, tak u očkovanych zvířat.

Výše uvedená diskuse byla zaměřena na použití antigenu *H. felis* při léčbě infekce způsobené mikroorganismem *H. felis*. Vynález se však neomezuje na použití při léčbě infekcí způsobených *H. felis*.

Do rozsahu vynálezu spadá také léčba nebo profylaxe infekcí způsobených mikroorganismem *H. pylori* u savců, včetně člověka, při níž se pacient orálně očkuje imunologicky účinným množstvím antigenu *H. pylori*, za účelem vyvolání tvorby ochranných protilátek proti patogenu *H.*

pylori. H. pylori se přednostně podává ve spojení s mukosálním adjuvantem, například toxinem cholery.

Do rozsahu tohoto vynálezu spadá také pasivní očkování savců, včetně člověka, proti infekcím vyvolaným H. pylori. Toto očkování se provádí tak, že se pacientovi orálně podá účinné množství H. pylori-specifické protilátky. Přednostně se pacientovi orálně podá H. pylori-specifická IgA monoklonální protilátka.

Očkovací látka podle vynálezu se podává orálně v množstvích, která jsou odborníci v tomto oboru schopni snadno určit. Vhodná dávka pro dospělé je tedy v rozmezí od asi 10 μ g do 10 mg, například od 50 μ g do 5 mg. Podobné rozmezí dávkování je vhodné i pro děti.

Jak již bylo uvedeno výše, jako vhodného mukosálního adjuvantu je možno použít toxinu cholery. Z jiných látek, kterých lze použít, je možno uvést netoxické deriváty toxinu cholery, včetně jeho B podjednotky a/nebo konjugátů antigenu s toxinem cholery nebo jeho B podjednotkou, mikrokapsle, komplexy stimulující imunitu (ISCOM) nebo liposomy a oslabené živé vektory, jako jsou viry nebo bakterie Salmonella. Množství mukosálního adjuvantu, kterého se používá, závisí na jeho typu. Tak například, když se jako mukosálního adjuvantu použije toxinu cholery, je jeho vhodné množství v rozmezí od 5 do 50 μ g, například od 10 do 35 μ g. Pokud se ho používá ve formě mikrokapslí (mikropouzder), bude použité množství záviset na množství použitém v matici mikrokapsle pro dosažení požadované dávky. Volba vhodného množství mukosálního adjuvantu je také v rozsahu zkušeností běžného odborníka v tomto oboru.

Jako vhodné nosiče a ředidla je možno uvést entericky potažené kapsle a/nebo 0,2N roztok hydrogenuhličitanu sodného a/nebo roztok chloridu sodného.

Vynález je blíže objasněn v následujících příkladech provedení. Tyto příklady mají výhradně ilustrativní charakter a rozsah vynálezu v žádném ohledu neomezují.

Příklady provedení vynálezu

V příkladech se používá dále popsaných zkušebních zvířat, bakteriálních kmenů, bakteriálních antigenů a vnějších membrán.

a) Myši

Jako myši se při těchto pokusech používá bezmikrobních myši Swiss Webster o stáří 8 týdnů, které lze získat od firmy Taconic (Germantown, N. Y., USA). Zvířata se chovají v mikroizolátorových klecích za bezmikrobních podmínek a mají volný přístup k laboratornímu krmivu, zpracovanému v autoklávu a vodě. S výjimkou příležitostně izolovaných diphtheroidů jsou zvířata uchovávána v bezmikrobním stavu po celou dobu očkování.

b) Bakteriální kmeny

Používá se bakterie izolovaných ze vzorků žaludku kočky, které byly podrobeny biopsii. Tyto bakterie se identifikují podle morfologie jako bakterie *H. felis*. Provede se Gramovo barvení a produkuje se ureasa, katalasa a oxidasa [Lee, A., Fox, J. G., Otto, G. a Murphy J. "A small animal model of human *Helicobacter pylori* active

chronic gastritis" Gastroenterology 1990, 99, 1315 až 1323;]. Organismy se uchovávají v 50% roztoku chloridu sodného, který je pufrován fosfátovým pufrem (PBS), 25% glycerolu a 25% tepelně zpracovaném fetálním telecím séru při -70 °C. Bakterie používané v následujících příkladech se po izolaci 2 až 3x pasážují in vitro.

c) Bakteriální antigeny

Zkušební kmen se naočkuje na agar Columbia (Difco, Detroit, MI, USA) s obsahem 7 % koňské krve. Inkubace se provádí mikroaerofilicky při 37 °C po dobu 5 až 7 dnů. Organismy se sklídí v PBS a výsledné suspenze se zpracují ultrazvukem při 40 °C, aby došlo k lysi bakterií. Rozdrcené buňky se oddělí centrifugací při nízké frekvenci otáčení a supernatant se za sterilních podmínek přefiltruje. Takto získané ultrazvukem zpracované vzorky (sonikáty) z celých buněk se uloží ve formě 100µl alikvotů při -70 °C až do doby jejich použití na orální očkování zvířat.

d) Vnější membrány

Vnější membrány se vyrobí způsobem popsaným v Sawau, T., Hiruma, R., Kawana, N., Kaneko, M. Taniyasu, F. a Inami, A "Outer membrane permeation of beta-lactam antibodies in Escherichia coli, Proteus mirabilis and Enterobacter cloacae Antimicrob. Agents", Chemother, 1982, 22, 585 až 592. Zkráceně lze tento způsob popsat tak, že se na bakteriální suspenze působí 1 mg ribonukleasy a deoxyribonukleasy (Sigma Chemical, St. Louis, USA) v 0,5M Tris-EDTA pufru (o hodnotě pH 7,8) při 4 °C, bezprostředně před zpracováním ultrazvukem (sonikací) a odstředěním při nízké frekvenci otáčení, jak je to popsáno výše. Obaly bakterií se potom oddělí od vyčereného lysátu ultracentrifugací při 150000 x g v průběhu 1 hodiny. Vnější

membrány se oddělí od buněčných obalů diferenciální solubilizací v n-lauroylsarkosinu sodném a izolují se ultracentrifugací. Výsledné pelety se suspendují v 0,05M fosfátovém pufru (pH 7,0), rozdělí se na alikvoty a uchovávají při -70 °C. Koncentrace proteinu se stanoví způsobem, který popsali Lowry a další pro použití při metodě ELISA [Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. J. a Randall, R. J. "Protein measurement with the folin phenol reagent" J. Biol. Chem. 1951, 193, 265 až 275] .

P ř í k l a d 1

Myši se slabě anestetizují i. p. injekcí 1,0 mg ketaminu před intragastrickým očkováním. Potom se alikvot sonikátu z celých buněk suspenduje spolu s 10 µg toxinu cholery (List Biologicals, Cambell CA, USA) v 0,2M roztoku hydrogenuhličitanu sodného a 0,5 ml vzniklé suspenze se dopraví do žaludku každé myši intubací pomocí polyethylenové trubičky připojené k injekční stříkačce. Tento postup je dále označován názvem "orální očkování".

Pro zjištění možnosti vývinu funkční imunity se používá celkem tři očkovacích protokolů. Podle prvního protokolu se provádějí 4 orální očkování v průběhu jednoho měsíce, která zahrnují podání 2 mg lysátu bakterií *H. felis*, ve spojení s toxinem cholery (známé mukosální adjuvans). Podle druhého protokolu se zvýší množství lysátu na 4 mg při každém očkování a lysátu se používá ve spojení s toxinem cholery. Podle třetího protokolu se provádí 5 orálních očkování v průběhu 8 týdnů, přičemž při každém očkování se podávají 4 mg lysátu bakterií *H. felis*, ve spojení s toxinem cholery. Pokud není uvedeno jinak zvířata se provokují infekcí po 7 až 10 dnech po posledním očkování a usmrtí se za dalších 7 dnů.

Zachytí se následující tkáňové tekutiny (sérum, gastrické sekrety a intestinální sekrety). Tyto vzorky se potom titrují na přítomnost anti-H. pylori protilátek pomocí stanovení na imunosorbentu, které je spojeno s enzymem (ELISA). Kromě toho, se provedou gastrické biopsie pro rychlý ureasový test a kulturu. Infekce se definuje jako pozitivní, je-li buď kultura nebo rychlý ureasový test (viz dále) pozitivní. Serum se získá z krve odebrané z ocasní vény, přičemž krev se nechá srazit při teplotě místnosti. Gastrické a intestinální sekrety se odebírají za použití modifikovaného postupu, který popsali Elson a další [Elson, C. O., Ealiding, W. a Lefkowitz, J. "A lavage technique allowing repeated measurement of IgA antibody in mouse intestinal secretions" J. Immunol. Meth. 1984, 67, 101 až 108; Nedrud, J. G., Liang, S., Hague, N. a Lamm, M. E. "Combined oral/nasal immunization protect mice from Sendai virus infection" J. Immunol. 1987, 139, 3484 až 3492]. Gastrické a intestinální sekrety myši se odebírají odděleně. Žaludek a střeva každé myši se vyjmou a injekčně se k nim přidá 2,0 ml promývací tekutiny na bázi polyethylenglykolu, ve směsi s anti-proteasovým roztokem. Tekutina pro promývání žaludku obsahuje Tris pufr pro neutralizaci žaludeční kyseliny.

Zkouška ELISA se provádí způsobem popsáním dále. Murinní vzorky se zkoumají na přítomnost protilátek proti H. felis takto: polystyrenové mikrotitrové plotny s 96 jamkami se potáhnou, v množství 100 μ l na jamku, příslušnými vnějšími membránovými proteiny (20 μ g/ml) přes noc při 4 °C. Nespecifická vazebná místa se blokují pomocí 1% BSA v PBS po dobu 90 minut při teplotě místnosti a potom se plotny opláchnou 0,1% BSA v PBS. Vzorky se zkoušejí duplicitně při zředění, které leží v rozmezí od nulového zředění až do zředění 1:512000 a do každé jamky na plotně potažené antigenem se přidá 100 μ l příslušně zředěného vzorku.

Inkubace se provádí 90 minut při teplotě místnosti a potom se plotny 3x opláchnou 0,1% BSA v PBS a do každé jamky se na dobu 90 minut přidá 100 μ l koziho protimysího IgA nebo IgG alkalického fosfatasového konjugátu ve zředění 1:1000 (Zymed, San Francisco, CA, USA). Po opláchnutí se provede vyvíjení přidavkem roztoku p-nitrofenylfosfátu v glycinovém pufru (pH 9,6) o koncentraci 1 mg/ml, v množství 100 μ l/jamku, v průběhu 1 hodiny. V každé jamce se měří absorbance při 410 nm za použití čtecího zařízení pro mikrotitrační plotny Dynatech MR 700 Microtiter Plate Reader. Titr protilátky je definován jako převrácená hodnota nejvyššího zředění, které poskytuje optickou hustotu 0,05 nad jamkou, která obsahuje antigen a která byla inkubována s konjugátem protilátky, ale bez primárního vzorku protilátky [Czinn, S. J. a Nedrud, J. G. "Oral Immunization against *Helicobacter pylori*" Infect. Immun. 1991, 59, 2359 až 2363].

Rychlý ureasový test se provádí takto: Dva vzorky pro gastrickou biopsii o hmotnosti za vlhka 10 μ g z každé myši se ihned umístí do 0,2 ml Stuartovy ureasové zkušební půdy [Mestecky, J. "The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretions" J. Clin. Immunol, 1987, 7, 265 až 276] a provede se inkubace při teplotě místnosti. Přítomnost ureasy se stanoví na základě barevné změny ze žluté na růžovou v zkušební půdě po 4 hodinách [Czinn, S. J. a Carr, H. "Rapid diagnosis of *Campylobacter pyloridis*-associated gastritis, J. Pediatr. 1987, 110, 569 až 570].

Kultury se získají takto: Vzorky pro gastrickou antrální biopsii se homogenizují a nanesou na agar Columbia obsahující 5 % ovčí krve. Inkubace se provádí při 37 °C za mikroaerofilních podmínek (souprava pro vývoj plynu od firmy Oxoid Ltd, Londýn, Velká Británie). Pozitivní kultura je

definována jako kultura s viditelným růstem po 5 dnech. Všechny izoláty se identifikují jako *H. felis* na základě morfologie, Gramova barvení a produkce ureasy, katalasy a oxidasy.

Přes malé změny v provedení pokusu mezi třemi skupinami nebyl zaznamenán žádný podstatný rozdíl v imunitní odpovědi. Data byla tedy spojena a byly vypočteny geometrické středy titru protilátky v gastrickém promývací tekutině, intestinální promývací tekutině a séru třinácti kontrolních a dvanácti očkovaných zvířat. Tyto údaje jsou uvedeny v tabulce 1 a na obr. 1, jak je to popsáno výše.

Přestože byla tato zvířata očkována a vystavena provokační infekci, nelišil se titr protilátky podstatně od myší, které byly očkovány, ale které nebyly vystaveny provokační infekci. Při těchto pokusech byly zjištěny titry IgA a IgG protilátky v žaludku, střevech a séru podstatně vyšší, ve srovnání s titry zjištěnými u neočkovaných kontrolních zvířat. Konkrétně bylo pozorováno čtyřnásobné zvýšení titru gastrického IgA ($p=0,001$), osminásobné zvýšení titru intestinálního IgA ($p=0,0038$) a 350ti násobné zvýšení titru IgA v séru ($p=0,0001$), ve srovnání s neočkovanými kontrolními zvířaty. Podobně bylo pozorováno i signifikantní zvýšení titru gastrického IgG ($p=0,0009$), intestinálního IgG ($p=0,0001$) a sérového IgG ($p=0,0001$).

Pro vyhodnocení ochrany před infekcí způsobenou bakterií *H. felis* se po usmrcení zvířat odeberou vzorky pro gastrickou biopsii, které se hodnotí jednak rychlým ureasovým testem a jednak v kultuře, jak je to popsáno výše. Kromě toho, za účelem stanovení, zda se u kontrolních zvířat vyvine chronická infekce a zda jsou očkovaná zvířata definitivně *H. felis*-negativní, vystaví se další očkovaná a kontrolní zvířata provokační infekci, popsané výše. Tato

zvířata se však usmrtí teprve 6 týdnů po provokační infekci. Míra ochrany ve všech očkováných skupinách zvířat se příliš neliší.

Aby se nevyloučila možnost nízké úrovně nákazy, provádí se hodnocení, zda jsou vzorky pro gastrickou biopsii pozitivní nebo negativní na růst *H. felis* teprve po 5 dnech po nanesení na miskou. Ze seriového ředění kultur se známým počtem (počítání pomocí hemacytometru) bakterií *H. felis* se zjistí, že nejnižší citlivost je přibližně 10 organismů. Při pozdějších experimentech se misky s kulturami vzorků pro biopsii udržovaly někdy i déle než 5 dnů a když byly misky, které zůstaly negativní na viditelný růst, seškrabány a za vlhka byla analyzována nahromaděná vrstva, občas bylo možno zjistit izolovaný organismus spirálovitého tvaru. Totožnost těchto izolovaných organismů nebylo možno potvrdit a nebylo možno potvrdit, zda byly tyto organismy živé. V každém případě lze výsledky zjištěné v kulturách při seriovém ředění *H. felis* interpretovat tak, že vzorky pro biopsii, které zůstaly negativní na viditelný růst po 5 dnech, obsahovaly 10 bakterií nebo méně.

P ř í k l a d 2

IgA a IgA monoklonální protilátky specifické pro *H. felis* se získají modifikací postupu, který popsali Mazanec a další [Mazanec, M. B., Nedrud, J. G. a Lamm, M. E. "Immunoglobulin a monoclonal antibodies protect against Sendai virus" J. Virol, 1987, 61, 2624 až 2626]. Myši BALB/c, získané od firmy Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA) se očkují intragastricky 4x v průběhu 6 týdenního období, přičemž při prvních 3 očkováních se podávají 2 mg sonikovaného vzorku s obsahem *H. felis*, v kombinaci s 10 µg toxinu cholery (Sigma Chemical Co., St.

Louis, MO, USA). Při posledním očkování se vypustí toxin cholery a myši také obdrží intravenosní přeočkovací dávku 2 mg proteinu H. felis. Po 3 dnech se myši usmrtí a jejich slezinové buňky se hybridizují s myelomovými buňkami SP2/0. Klony, které se získají omezeným ředěním se zkoumají na sekreci anti-H. felis IgA protilátky pomocí stanovení ELISA. Výsledná buněčná linie, označená symbolem 71-G₅-A₈, představuje stabilní hybridom, vylučující IgA. Po několikanásobné subklonování se stabilní IgA a IgG sekretory injekčně podají intraperitoneární cestou pristanem primovaným myším BALB/c a z těchto myší se získá ascitická tekutina, která se vyčeří.

Buněčná linie č. 71-G₅-A₈ z 13. dubna 1992 je uložena a uchovávána v živém stavu v Laboratory of Steven J. Czinn, M. D., Rainbow Babies and Children's Hospital, Room 465, Case Western University, 2074 Abington Road, Cleveland, Ohio, USA 44106. Přístup k tomuto uloženému vzorku bude oprávněným osobám umožněn patentovým úřadem USA v průběhu řízení o přihlášce vynálezu. Po udělení patentu budou pak všechna omezení, vztahující se k dostupnosti tohoto vzorku pro veřejnost, definitivně zrušena.

Buněčná linie č. 71-G₅-A₈ byla uložena ve sbírce kultur American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USA, pod identifikačním číslem 71-G₅-A₈. Přírůstkové číslo sbírky ATCC je HB 11514 a datum uložení je 23. prosince 1993.

P ř í k l a d 3

Pasivní očkování se provádí následujícím způsobem: Ascites obsahující IgA monoklonální protilátku produkovanou buněčnou linií č. 71-G₅-A₈ (200 µl) se podá intragastricky.

č.j.	001620
DOŠLO	12.1.94
URAD PRŮMYŠLOVÉHO VLASTNICTVÍ	PŘÍL.

současně s 10^6 živých organismů. Předběžné studie ukázaly, že titry IgA v žaludku zvířat, která obdržela jedinou 200 μ l dávku monoklonální IgA protilátky, poklesl na hodnotu nižší, než je hodnota pozorovaná u aktivně očkovaných zvířat, do 8 hodin. Z toho důvodu se v následujících 24 hodinách podají 3 další dávky MAb. Kontrolní zvířata se provokují stejnou provokační infekcí, ale obdrží buď roztok chloridu sodného nebo Sendai virus-specifickou IgA monoklonální protilátku (irelevantní IgA monoklonální protilátku). Po 1 týdnu se myši usmrtí. Tkáň žaludku se naočkuje na krevní agar Columbia a inkubace misek se provádí 5 dnů při 37 °C. Infekce se stanoví jako pozitivní na základě pozitivní kultury nebo pozitivního výsledku Stuartovy rychlé ureasové zkoušky se živnou půdou.

Pro zjištění, zda IgA protilátky, které jsou charakteristickým znakem mukosálního imunitního systému, jsou schopny samy o sobě chránit proti infekci žaludeční sliznice mikroorganismem *H. felis*, se výše uvedeným způsobem generují *H. felis* IgA monoklonální protilátky. Jedna z těchto protilátek (č. 71-G₅-A₈) se potom pasivně orálně podá bezmikrobním myším v době vystavení provokační infekci *H. felis* a po této době. Kontrolní zvířata obdrží buď roztok kuchyňské soli nebo Sendai virus-specifickou IgA monoklonální protilátku, která je specifická pro hemaglutinin-neuraminidasový glykoprotein viru Sendai [Mazanec, M. B., Nedrud, J. G. a Lamm, M. E. "Immunoglobulin a monoclonal antibodies protect against Sendai virus" *J. Virol*, 1987, 61, 2624 až 2626].

Výsledky jsou uvedeny v tabulce 2.

T a b u l k a 2

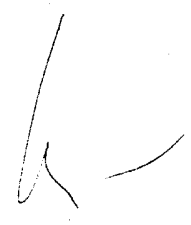
Hodnocení zkoušky pasivního podání protilátky bezmikrobním myším před a po expozici provokační infekci *H. felis*.

Podaná protilátka	Počet myší	Podíl infikovaných myší (%)
žádná - kontrolní pokus	7	57
irelevantní IgA monokl. protilátka	6	83
IgA anti- <i>H. felis</i> monokl. protilátka	7	14

H. felis nebo Sendai virus-specifická IgA monoklonální protilátka se podává intragastricky 4x v průběhu 24 hodin, současně s expozicí provokační infekci 10^6 živých bakterií *H. felis*. Vzorky pro gastrickou biopsii se odeberou 1 týden po expozici provokační infekci a infekce se stanovuje v kultuře a/nebo rychlou ureasovou zkouškou.

Z 13 kontrolních zvířat, která neobdržela žádnou protilátku nebo která obdržela Sendai virus-specifickou protilátku, bylo infikováno 70 % zvířat (obr. 2B). Ze 7 experimentálních zvířat bylo 6 chráněno a pouze 1 (14 %) bylo nakaženo. Tento rozdíl je signifikantní podle Chí analýzy čtverců ($p=0,019$).

Porovnání titru protilátky v různých experimentálních skupinách bylo provedeno analýzou variance a Fischerovým chráněným T-testem. Při zjišťování ochrany na základě nepřítomnosti nebo přítomnosti experimentální infekce v jednotlivých skupinách bylo použito hodnocení analýzou Chí čtverců.



P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Očkovací látka vhodná pro léčbu infekcí vyvolaných mikroorganismem rodu *Helicobacter*, v y z n a -
č u j í c í s e t í m , že obsahuje imunogenicky účinné množství antigenu *Helicobacter* pro vyvolání ochranné imunitní odpovědi u savčího hostitele, ve spojení s farmaceuticky vhodným nosičem nebo ředidlem.

2. Očkovací látka podle nároku 1, v y z n a č u -
j í c í s e t í m , že dále obsahuje účinné množství mukosálního adjuvantu.

3. Očkovací látka podle nároku 2, v y z n a č u -
j í c í s e t í m , že mukosálním adjuvantem je toxin cholery.

4. Očkovací látka podle nároku 1, v y z n a č u -
j í c í s e t í m , že antigenem *Helicobacter* je antigen *H. pylori*.

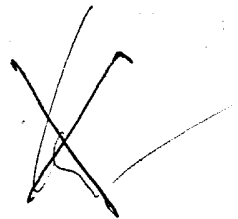
5. Očkovací látka podle nároku 1, v y z n a č u -
j í c í s e t í m , že antigenem *Helicobacter* je antigen *H. felis*.

6. Murinní *H. felis*-specifická IgA monoklonální protilátka.

7. Murinní H. felis-specifická IgA monoklonální protilátka.

8. Buněčná linie č. 71-G₅-A₈.

9. Monoklonální protilátka produkovaná buněčnou linií č. 71-G₅-A₈.



~~MP-2033-93-Če~~

PCT/US93/03409

WO 93/20843

2730-93

1/1

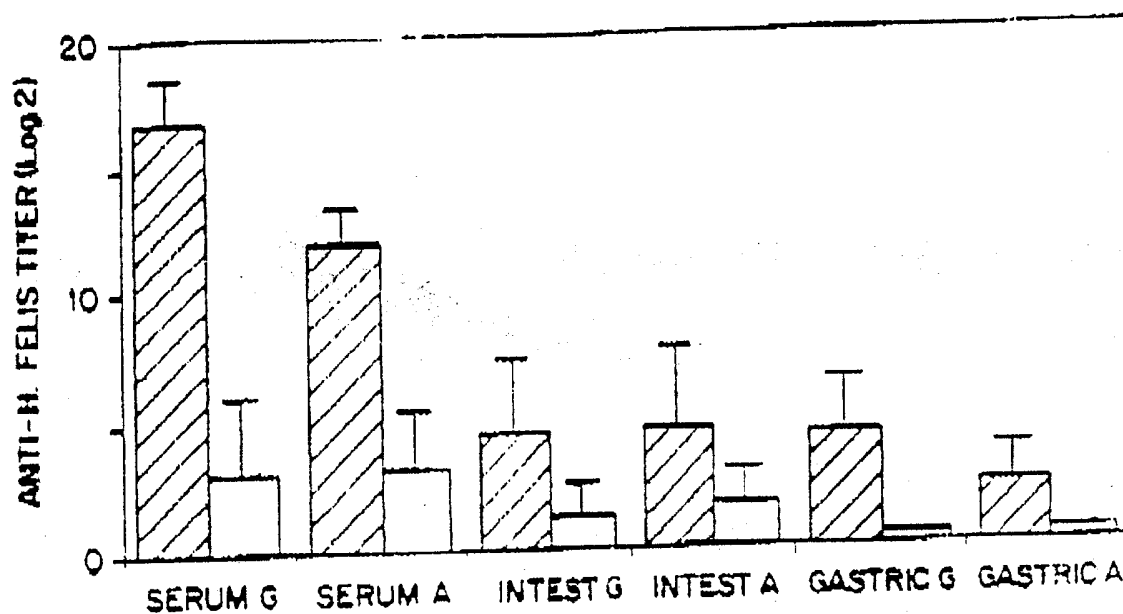


FIG. 1

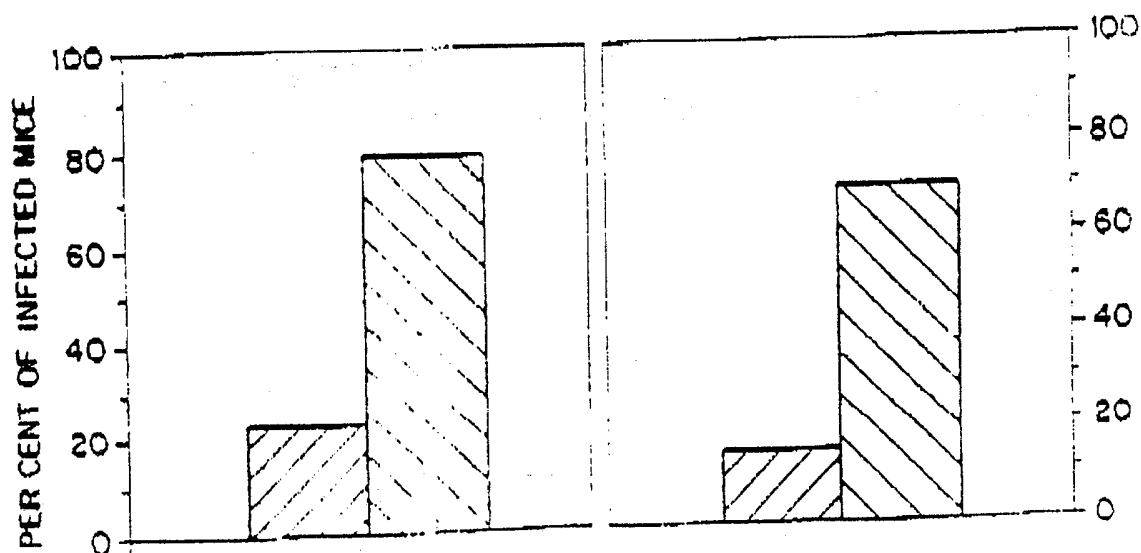


FIG. 2A

FIG. 2B