



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

244906

(11) (B2)

{51} Int. Cl.⁴
A 61 K 39/40

{22} Přihlášeno 18 06 82

{21} (PV 4558-82)

{32} {31} {33} Právo přednosti od 19 06 81
(81 18886) Velká Británie

{40} Zveřejněno 17 09 85

{45} Vydáno 15 07 88

{72}

Autor vynálezu

RUSSELL ROY ROBERT BAIRD, BROMLEY, KENT (Velká Británie)

{73}

Majitel patentu

THE SECRETARY OF STATE FOR SOCIAL SERVICES, LONDÝN
(Velká Británie)

{54} Způsob výroby antigenního přípravku pro omezování nebo prevenci
zubního kazu

1

2

Antigenní bílkovina, nazvaná antigen C, přítomná v buněčných stěnách a v kulturách *Streptococcus mutans*, zejména genetické skupiny I [sérotypy {c, e a f}] se odděluje od ostatních antigenních bílkovin, zejména od těch, které poskytují zkříženou reakci se srdeční tkání; získá se antigení přípravek, který může být použit jako vakcína nebo ke zvýšení protilátek pro ochranu proti zubnímu kazu.

Antigen C se izoluje extrakcí z buněčných stěn působením vroucího vodného roztoku dodecylsírany sodného (10 g/litr) po dobu 10 minut.

Má molekulovou hmotnost $70\,000 \pm 5\,000$ a isoelektrický bod $4,45 \pm 0,24$. Je rozrušován proteolytickými enzymy a nereaguje zkříženě se srdeční tkání.

Vynález se týká způsobu výroby antigenního přípravku pro použití ke snížení výskytu zubního kazu.

O mikroorganismu *Streptococcus mutans* se má za to, že hraje důležitou úlohu při onemocnění zubním kazem i mnoho laboratorii dokázalo, že je možné snížit výskyt zubního kazu u pokusných zvířat aktivní imunizací vakcínou z této bakterie. Bylo například dokázáno, že u opic *Macaca fascicularis*, krmených dietou bohatou na cukr, dochází k význačnému snížení výskytu zubního kazu po imunizaci buď intaktním *S. mutans*, nebo materiálem bohatým na buněčné stěny (Bowen, *British Dental Journal*, sv. 126, 1969, str. 159 až 160, Bowen a spol., *British Dental Journal*, sv. 139, 1975, str. 45 až 50, Cohen a spol., *British Dental Journal*, sv. 147, 1979, str. 9 až 14).

Bylo rovněž prokázáno, že žádná ochrana nenastane, použijí-li se buněčné stěny *S. mutans*, na které bylo působeno trypsinem, aby se rozrušily bílkoviny, což dokazuje, že je to pravděpodobně některá bílkovinná složka *S. mutans*, které je zapotřebí pro ochrannou imunizaci (Colman a Cohen, *Pathogenic Streptococci*, 1979, str. 214, vydané M. T. Parkerem, Reedbooks, Chertsey, Anglie).

Při každém imunizačním procesu je důležité mít možnost poznat bakteriální složku, která se účastní ochrany. Jedním z obvyklých důvodů pro to je to, že přípravky lze potom zkoušet před použitím, aby bylo jisté, že složka nezbytná k protekci je přítomna. Kromě toho čištění ochranného antigenu umožňuje výrobu vakcín, ze které lze odstranit nežádoucí nebo toxické složky.

Byla vyvolána pozornost v přísadě *S. mutans*, když bylo demonstrováno, že tento organismus obsahuje složky, které antigenně reagují zkříženě se savčí srdeční tkání (viz například Hughes se spol. *Infect. Immun.*, 27, 1980, str. 576 až 588). Vědomí existence takových srdečních zkříženě reaktivních antigenů *S. mutans* činí žádoucím je identifikovat a charakterizovat tak, aby je bylo možno vyloučit z vakcínových přípravků.

Britský patentový spis č. 2 033 223 B popisuje dvě bílkoviny, které lze izolovat z buněčných stěn *S. mutans* a které mají antigenní vlastnosti. Jedna z těchto antigenních bílkovin (značkový antigen A) je chráněna v přihlášce, další (antigen B) má prokazatelnou zkříženou reaktivitu se srdeční tkání a předpokládá se, že jako složka vakcín pro humánní použití je nepřijatelný. Antigen A a B lze definovat následujícími sérii kritérii:

a. jsou přítomny v buněčných stěnách kmenů *S. mutans* genetické skupiny I (Coykendall, *J. Gen. Microbiol.* 83, 1974, str. 327). Tato genetická skupina obsahuje kmeny sé-

rotypů c, e a f, definované Perchem a spol. (*Acta Path. Microbiol. Scand. B* 82, 1974, str. 357).

b. zůstávají přítomny v buněčné stěně po vaření s vodným roztokem (10 g/litr) sodné soli dodecylsírany (SDS) po dobu 20 minut.

c. podle stanovení elektroforézy na SDS-polyakrylamidovém gelu (SDS—PAGE) jsou zřejmě jejich molekulové hmotnosti, pro A: asi 29 000; pro B: asi 190 000.

d. podle stanovení isoelektrickou fokusací v akrylamidovém gelu jsou jejich isoelektrické body pro A: asi 4,3; pro B: asi 5,4, a v případě antigenu A, antigenní bílkoviny.

e. jsou ničeny proteolytickými enzymy a

f. neposkytují zkříženou reakci se srdeční tkání.

Nyní bylo shledáno, že další skupinu antigenních bílkovin (antigen C) lze izolovat z buněčných stěn kmenů *S. mutans* genetické skupiny I. Tato skupina bílkovin se dá použít k přípravě monospecifického antiséra a zdá se, že se účastní ochrany proti zubnímu kazu, vyvolané vakcinací buněčnými stěnami *S. mutans*. Nebyla prokázána žádná zkřížená reaktivita se srdeční tkání savců.

Vynálezem je tedy způsob výroby antigenního přípravku pro omezování nebo prevenci zubního kazu, z bakterií skupiny *Streptococcus mutans* genetické skupiny I, kterýžto přípravek je v podstatě prost antigenů poskytujících zkříženou reakci se srdeční tkání, odvoditelných od *Streptococcus mutans*, kterýžto způsob zahrnuje kultivaci bakterií skupiny *Streptococcus* genetické skupiny I v kultivačním prostředí k produkci buněčné kultury, odstranění alespoň buněčných stěn z buněčné kultury pro získání bílkovinného roztoku, kterým je filtrát kultury, buněčný extrakt nebo jejich kombinace, a oddělování požadovaného antigenního přípravku od bílkovinného roztoku separačním postupem, který zahrnuje stupeň afinitní chromatografie, jenž obsahuje uvádění bílkovinného roztoku s imobilizovanou protilátkou, vymývání nežádoucích materiálů z imobilizované protilátky a eluování antigenního přípravku z imobilizované protilátky; tento způsob se podle vynálezu vyznačuje tím, že imobilizovaná protilátka má specifitu k jedné nebo více antigenním bílkovinám, (dále označovaným jako antigen C), které mají následující vlastnosti:

a) jsou přítomny na buněčných stěnách kmenů *Streptococcus mutans*, genetické skupiny I,

b) jsou rozrušovány nebo extrahovány zpracováním uvedených buněčných stěn vroucím vodným roztokem (10 g v litru) dodecylsulfátu sodného (SDS) po dobu 10 minut, ale zůstávají sdružené s uvedenými

buněčnými stěnami po zpracování vodným SDS (10 g/l) při 15 °C,

c) mají mol. hmotnost $70\,000 \pm 5\,000$, stanoveno SDS-polyakrylamidovou gelovou elektroforézou (SDS-PAGE),

d) jsou rozrušovány proteolytickým enzymem,

e) mají isoelektrický bod $4,45 \pm 0,24$ a

f) neposkytují zkříženou reakci se srdeční tkání.

Antigen C je přítomen jak na buněčných stěnách, tak i v bezbuněčných filtrátech kultury *S. mutans* adaptací obvyklých technik používaných k odstranění bílkovin z buněčných struktur, s výhodou se však separuje buď z filtrátů bezbuněčné kultury, nebo z celkových buněčných extraktů *S. mutans*, které obvykle obsahují méně látek, které by mohly interferovat s čistícími pochody.

Požaduje-li se směs antigenu C a antigenu A, je potom zapotřebí připravit oba antigeny afinitní chromatografií na imobilizované protilátce a potom je spojit, nebo směs může být připravena v jediném stupni pomocí afinitní chromatografie na kombinaci imobilizované protilátce s kombinací anti-antigenu C a anti-antigenu A.

Při alternativním provedení způsobu podle vynálezu imobilizovaná protilátka obsahuje kombinaci protilátek, přičemž první protilátka má specifitu k jedné nebo více antigenním bílkovin obsahujících antigen C a druhá protilátka má specifitu k jedné nebo více antigenním bílkovinám (dále jen „antigen A“), které mají následující vlastnosti:

a) jsou přítomny na buněčných stěnách kmenů *Streptococcus mutans*, genetické skupiny I,

b) zůstávají sdruženy s uvedenými buněčnými stěnami po vaření s vodným roztokem SDS (10 g/l) po dobu 20 minut,

c) mají molekulovou hmotnost 29 000, stanoveno postupem SDS-PAGE,

d) mají isoelektrický bod asi 4,3,

e) jsou rozrušovány proteolytickým enzymem,

f) nedávají zkříženou reakci se srdeční tkání.

Při způsobu podle vynálezu se s výhodou používá kmene *Streptococcus mutans*, sérotypu C.

Antigenního přípravku vyrobeného podle vynálezu lze použít ve formě farmaceutického přípravku, například vakcíny, přidáním vhodných farmaceuticky přijatelných ředidel nebo nosičů, například adjuvans (například hydroxid hlinitý), stabilizátorů a bakteriostatik. Podání vakcíny se může uskutečnit subkutánní, intramuskulární, intravenózní nebo submukosální injekční formou, typicky v dávkách 1 až 50 µg, zejména asi 10 µg veškerých antigenů na kg tělesné hmotnosti. Imunizaci lze uskutečnit

rovněž orální cestou, například polknutím tobolky obsahující antigenní přípravek nebo opakovaným použitím ústní vody nebo zubní pasty obsahující antigen C.

Je výhodou, že ochrana proti zubnímu kazu poskytované antigenní bílkovinou podle vynálezu vychází z protilátek proti tomuto antigenu produkovaných imunitní reakcí organismu. Takové protilátky lze rovněž pěstovat mimo subjekt, který má být imunizován, obvyklými technikami, například injekcí vhodného antigenního přípravku z *S. mutans*, včetně antigenu C, například kravám nebo králíkům následovanou vykrvácením. Podávání přípravků protilátek vyrobených tímto způsobem a zahrnujících obvyklá farmaceuticky přijatelná zředňovací nebo nosiče, je rovněž účinné při prevenci nebo snižování zubního kazu.

Kultivačním médiem může být kterékoliv obvyklé médium pro *S. mutans*, s výhodou například Todd-Hewittovo živné médium, trypton/kvasničný extrakt nebo něsnadnost následujícího čištění je výhodné chemicky definované prostředí. Antigen C je uvolňován do živného prostředí ve všech stadiích kultivace. Buňky mohou být pěstovány přetržitě a s výhodou izolovány v rané stacionární fázi (typicky 15 až 25 hodin při teplotě 37 °C). Buňky mohou být případně pěstovány v kontinuální kultuře, s výhodou ve zředňovacím poměru asi mezi 0,01 a 0,1; zejména asi 0,05 hod.⁻¹.

Roztokem bílkovin mohou být filtráty kultury, získané odstraněním celých buněk, nebo buněčný extrakt, zbavený buněčných stěn a zbytků. Případně to může být směs těchto roztoků vzniklých rozrušením stěn celé kultury a potom odstraněním buněčných stěn a zbytků. Buněčné stěny mohou být odstraněny jako celé buňky nebo fragmenty po desintegraci, a to obvyklými technikami, například odstředěním nebo filtrací.

Typické produkty a způsoby podle vynálezu budou dále popsány na příkladech s odkazem na připojené výkresy, na kterých jednotlivé obrazce mají následující význam.

Obr. 1 znázorňuje titraci (metodou ELISA) sérové IgG protilátky proti antigenu C připravené ze vzorků séra od pokusných opic [jak je popsáno Bowenem a spol., 1975 (pokus C)], vynesení střední absorbance p-nitrofenolu při 405 nm proti séru IgG pro 4 kontrolní opice (označeno na výkrese křížky ×) a pro 4 opice imunizované buněčnými stěnami *S. mutans* (označeno kroužky ○).

Obr. 2 srovnává časový vývoj zubního kazu v trvalém ozubení u tří opic (*Macaca fascicularis*) imunizovaných buněčnými stěnami *S. mutans*, s vývojem u pěti opic v kontrolní skupině [jak je popsáno Cohenem a spol. 1979 (pokus 19)], kde střední hodnoty vývoje zubního kazu u imunizovaných opic jsou označeny plnými čtvereč-

ky ■ a u kontrolních opic plnými kroužky ●.

Obr. 3 znázorňuje titraci (metodou ELISA) sérové IgG protilátky proti antigenu C připravené ze vzorků séra od čtyř pokusných opic [jak je popsáno Cohenem a spol. 1979 (pokus 19)], vynesení střední hodnoty absorbance p-nitrofenolu při 405 nm proti séru IgG pro 4 kontrolní opice (na výkrese označeno plnými kroužky ●) a pro 4 opice imunizované buněčnými stěnami S. mutans (označeno plnými čtverečky ■).

Antigen C

1. Příprava buněčných stěn

Byl použit S. mutans široce známého kmene Ingbritt. Tento kmen byl popsán Krassem (Archs Oral Biol. 11, 1966, str. 429 až 436) a je klasifikován jako genetická skupina I Coykendallem a jako sérotyp c podle Perche se spol. Tento kmen byl uložen v National Collection of Industrial Bacteria, Aberdeen, Skotsko jako NCIB 11516. Podobné výsledky byly docíleny s použitím kmene z National Collection of Type Cultures, Colindale, Londýn (NCTC 10449), který je blízký kmeni Ingbritt.

Bakterie byly pěstovány v prostředí popsaném Ellwoodem se spol. (Archs Oral Biol. 19, 1974, str. 659 až 664) v 600 ml chemostatu při rychlosti ředění $0,05 \text{ hod}^{-1}$, přičemž pH se udržuje automaticky přidáváním hydroxidu draselného na hodnotě 6,5. Bakterie byly izolovány pomocí odstředění, promyty fyziologickým roztokem a zahřívány při teplotě 60°C , po dobu 30 minut k inaktivaci autolytických enzymů. Potom byly rozdrceny protřepáním s Ballotiniho skleněnými kuličkami č. 12 v Mickleho tkáňovém desintegrátoru. Rozdrcené buňky byly odděleny od skleněných kuliček filtrací a promyty dvakrát vodou a dvakrát 1 M NaCl předtím, než byly resuspendovány v SDS (10 g/litr) ve vodě pomocí Potterova tkáňového homogenizátoru. Neporušené bakterie byly odděleny od stěn odstředěním za nízké rychlosti a stěny byly promyty důkladně fyziologickým roztokem a vodou před lyofilizací.

Podobné výsledky byly docíleny za použití bakterií rostoucích šaržovitě na Todd-Hewittově živném prostředí (J. Path. and Bacteriol. 35, 1932, str. 973 až 974) nebo na prostředí obsahujícím glukózu, trypton a kvasničný extrakt za kontroly pH a buď rozrušením buněk v Braunově homogenizátoru, nebo jejich vystavením dlouhodobé extrakci pomocí SDS při teplotě místnosti.

Příprava antiséra

Lyofilizované buněčné stěny byly suspendovány ve sterilním fyziologickém roztoku v koncentraci 1 mg/ml a použity k imuniza-

ci opic (viz níže) nebo králíků. Králíci dostali tři intramuskulární injekce vždy po třech týdnech, vždy 1 mg stěn ve fyziologickém roztoku obsahujícím 10 % hydroxidu hlinitého jako adjuvans. Potom byli vykrváčeni vpichem do srdce 1 týden po poslední injekci.

Imunoelektroforetické pokusy

Antisérum proti buněčným stěnám, připravené postupem popsaným vpředu, bylo použito jak při charakterizaci, tak i při čištění antigenu C. Když byly použity bílkoviny z filtrátu kultury kmene Ingbritt (nebo příbuzných kmenů) jako antigen ve zkříženém imunoelektroforetickém pokuse, provedeném způsobem popsaným Axelsenem se spol. (v „Manual af quantitative Immunoelectrophoresis, Oslo, 1973) a provedena elektroforéza na antisérum proti buněčným stěnám, byla pozorována tři maxima srážení. Pomocí pokusů s použitím intermediární gelové techniky (Axelsen se spol., str. 71) s intermediárním gelem obsahujícím buď antigen A a B, nebo monospecifická antiséra proti A a B, bylo možné ukázat, že dvě z maxim srážení byla vyvolána antigenem A a B a třetí odlišným antigenem, totiž C.

S cílem studovat charakter antigenu C, byl antigenní přípravek podroben různým vlivům před tím, že byl zkoumán zkříženou imunoelektroforézou. Bylo nalezeno, že antigen C byl zničen při inkubaci po dobu tří hodin při teplotě 37°C se $200 \mu\text{g/ml}$ proteolytického enzymu trypsinu nebo pronázy. Antigen C má tedy charakter bílkoviny.

Vzorky antigenu C byly zničeny rovněž při expozici pufrům o hodnotě pH nižší než 5,0, po dobu tří hodin z čehož plyne, že je rovněž acidolabilní.

Informace o fyzikálních vlastnostech antigenu C byly získány zkříženou imunoelektroforézou, kde první rozměrová separace byla SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza k rozdělení bílkovin na základě molekulární hmotnosti (podrobnosti metody v práci: Russell, J. Gen. Microbiol. 114, 1979, 109 až 115) nebo zkříženou imunoelektrofokusací na agaróze (Rosen, Aman, J. Immunol. Meth. 1979, 28, 1), kde se bílkoviny dělí na základě svého náboje.

Výsledky ukázaly, že antigen C měl zdánlivou molekulární hmotnost $70\,000 \pm 5\,000$ (SD) a isoelektrický bod $4,45 \pm 0,24$.

Antigen C by mohl být rovněž detegován imunodifúzními pokusy s antisérem stěn nebo čistého antigenu C (viz níže). Imunodifúze bylo tudíž použito k důkazu, že antigeny identické s C byly produkovány 6 dalšími kmeny S. mutans sérotypu c a rovněž představiteli sérotypů e a f.

4. Čištění antigenu C

Údaje shora uvedené ukazují, že antigen

C je přítomen jak v buněčných stěnách, tak i v bezbuněčném filtrátu kultury. Ačkoliv antigen C lze extrahovat ze stěn vhodnými prostředky, je výhodné čistit jej z filtrátu kultury, protože ten obsahuje méně látek, které mají snahu interferovat s čistícími postupy.

Zatímco antigen C může být čistěn rutinými laboratorními postupy sloupcové chromatografie, s použitím například vhodných matric gelové permeace a výměny iontů, nejvýhodněji jej lze izolovat imunosorbentní afinitní chromatografií a protokoly založené na této technice jsou uvedeny níže.

a. *S. mutans* kmen Ingbritt rostl v semi-definovaném médiu (Russel, FEMS Microbiol. Lett. 6, 1979, str. 197 až 1993) raně stacionární fáze a buňky byly odstraněny odstředěním, po kterém následovala filtrace skleněnými vlákny. Inhibitor proteázy fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) byl přidán do finální koncentrace 1 mM, spolu s azidem sodným (finální koncentrace 0,02 proc) k inhibici bakteriálního růstu. Filtrát byl potom pasážován sloupcem pro afinitní chromatografii obsahujícím kuličky nerozpustného glukózového polymeru mutanu a agarózového gelu (Sephacrose Cl-6B) připraveného v podstatě tak, jak je popsáno Russellem (J. Gen. Microbiol. 112, 1979, str. 197 až 201), s cílem odstranit glukosyltransferázové enzymy a další bílkoviny vázající dextran, které lze jinak vázat na následující imunosorbentní sloupce (Russell, FEMS Microbiol. Lett. 1981, 11, 279). Filtrát kultury byl potom pasážován postupně sérií tří imunosorbentních sloupců obsahujících

i) monospecifickou protilátkou proti antigenu A,

ii) monospecifickou protilátkou proti antigenu B,

iii) buněčné stěny.

Třetí sloupec potom obsahoval protilátky proti antigenům A, B a C, avšak když antigeny A a B se odstraní ze vzorku před dosažením třetího sloupce, byl zadržen jenom antigen C a mohl být potom eluován vhodným činidlem, například 3 M thiokyanátem sodným. Imunosorbentní sloupce byly připraveny standardními metodami, při nichž frakce séra s obsahem imunoglobulinu G byly kopulovány se zesítěnou agarózou (bromkyanem aktivovaná Sepharose 4B, Pharmacia Fine Chemicals Ltd) způsoby doporučenými výrobcem.

Antigen C, připravený výše uvedenými způsoby, byl potom použit k posílení monospecifického antiséra, umožňujícího sestavení C-specifického imunosorbentního sloupce, které dovolovaly čištění antigenu v jednom stupni.

b. Alternativní způsob čištění antigenu C zahrnoval imunosorbentní afinitní chromatografii následovanou hydrofobní interakční chromatografií. Při této metodě byl filtrát

kultury chromatografován nejprve na afinitním sloupci obsahujícím mutan a sefárovu, potom imunosorbentním sloupcem obsahujícím protilátku proti buněčným stěnám.

Antigeny A, B a C byly zadrženy takovým sloupcem a mohly být eluovány 3 M thiokyanátem sodným v 0,05 M Tris-HCl-puf-ru (pH 7,5). Thiokyanát sodný byl odstraněn dialýzou a roztok antigenních bílkovin ekvilibrován v 0,05 M Tris-HCl-puf-ru (pH 7,5), obsahujícím 1 M síran amonný. Tento roztok byl potom chromatografován na sloupci obsahujícím fenylsefárovu Cl-4B (Pharmacia Fine Chemicals).

Bílkoviny, zadržené na sloupci, byly potom eluovány gradientem se snižující se koncentrací síranu amonného a se současně vzrůstající koncentrací ethylenglykolu (finální koncentrace 0 % a 50 %). Antigen C byl eluován mezi koncentrací 0,6 a 0,7 M síranu amonného (15 až 20 % ethylenglykolu v přebytku k antigenu A a B).

Antigen C připravený výše uvedeným způsobem byl potom použit k posílení monospecifického antiséra, umožňujícího sestavení C-specifického imunosorbentního sloupce, který dovoloval čištění antigenu v jediném stupni.

Ochrana před zubním kazem pomocí imunizace buněčnými stěnami

Imunizace buněčnými stěnami *S. mutans* kmene Ingbritt, připravenými výše popsaným způsobem, prokázala ve dvou oddělených pokusech, že poskytuje ochranu proti kazům u opic (*Macaca fascicularis*) a podrobnosti těchto pokusů byly publikovány Bowenem se spol. British Dental Journal 1975, sv. 1939, str. 45 až 78) a Cohenem se spol. (British Dental Journal, 1979, sv. 147, str. 9 až 14).

V pokuse C, jak je popsáno Bowenem se spol., 5 kontrolních zvířat udržovaných na dietě podporující kaz, bylo srovnáno se 4 zvířaty imunizovanými buněčnými stěnami. Pět roků po začátku pokusu byl celkový počet kazových lézí u kontrolních zvířat 64, zatímco u zvířat v imunizované skupině byly nalezeny jenom 4 léze. Ochrana byla udržována nejméně po dobu 9 roků (Cohen se spol., 1979). Vyšetřování vzorků séra pokusných zvířat, odebraného po 5 rocích od začátku pokusu pomocí zkřížené imuno-elektroforézy prokázalo, že imunizace buněčnými stěnami indukovala protilátky proti antigenu A, B a C. Tato citlivá technika neodhalila existenci protilátky proti nějakým dalším antigenům.

Kvantitativní hodnocení reakce protilátek bylo prováděno imunosorbentním testem s vázanými enzymy (ELISA), technikou mikrodestičky podle Vollera se spol. (1977, Flowline Publications). Mikrotitrační misky z plastické hmoty byly potaženy čistým antigenem C v koncentraci zhruba 1 µg/ml.

Kvantitativní hodnocení množství opičí protilátky vázané na antigen, bylo docíleno inkubací s antihumánním IgG, konjugovaným na alkalickou fosfatázu (Sigma Chemical Co) a stanovením následně tvorby chromoforu [p-nitrofenol] měřením jeho absorbance při 405 nm. Obr. 1 ukazuje výsledky titrace antiséra u kontrolní a imunizované skupiny opic. Výsledky jsou uvedeny tabelární formou v tabulce 1.

Tabulka 1

Ředění	Kontrola	Imunizováno
1/20	1,35 $\pm$ 0,275	1,996 $\pm$ 0,01
1/40	0,91 $\pm$ 0,21	1,859 $\pm$ 0,09
1/80	0,747 $\pm$ 0,21	1,64 $\pm$ 0,21
1/160	0,566 $\pm$ 0,13	1,33 $\pm$ 0,29
1/320	0,386 $\pm$ 0,09	0,968 $\pm$ 0,27
1/640	0,262 $\pm$ 0,06	0,677 $\pm$ 0,20
1/1 280	0,18 $\pm$ 0,05	0,430 $\pm$ 0,13
1/2 560	0,115 $\pm$ 0,03	0,296 $\pm$ 0,08

V příkladu 19 popsaném Cohenem se spol. (1979) byla srovnána skupina kontrolních opic se skupinou imunizovanou buněčnými stěnami připravenými z *S. mutans* kmene Ingbritt, kultivovaného v chemostatu zře-

Imunizace buněčnými stěnami vedla k významnému zvýšení hladiny protilátky proti antigenu C. Lze uvést, že dříve bylo ukázáno, že i neimunizovaná kontrolní zvířata vyvíjejí protilátku proti antigenům *S. mutans* v závislosti na věku (Russell a Beighton, *Infection and Immunity* 1981, sv. 35, str. 741 až 744).

ďovací rychlostí (D) 0,05 hod^{-1} . Postup kazu u těchto zvířat je znázorněn na obr. 2 a ukazuje, že stěny buněk kultivované při D = 0,05 hod^{-1} vedly k význačné ochraně. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2

Doba od začátku pokusu (měsíce)	Průměrná velikost kazu + SE	
	Kontrola	Imunizováno
11	0	0
16	1,0 $\pm$ 0,45	0
18	1,4 $\pm$ 0,75	0
21	2,4 $\pm$ 0,97	0
25	3,2 $\pm$ 1,88	0
29	3,4 $\pm$ 1,63	0
31	3,6 $\pm$ 1,60	0,33 $\pm$ 0,3
34	5,2 $\pm$ 1,67	0,33 $\pm$ 0,3
36	5,75 $\pm$ 1,86	0,33 $\pm$ 0,3
45	7,25 $\pm$ 2,62	1,33 $\pm$ 0,29

Hladiny protilátek proti antigenu C ve vzorcích séra, odebraných v různých stadiích pokusu, byly měřeny pomocí ELISA. Pokus prokázal, že zvířata imunizovaná buněčnými stěnami kultivovanými při D = 0,05 h^{-1} měla zvýšené titry protilátek proti antigenu C a tyto titry byly signifikantně vyšší než u kontrolních zvířat. Reprezen-

tativní výsledky získané se vzorky séra odebraného 3 roky po začátku pokusu jsou znázorněny na obr. 3. Výsledky jsou uvedeny tabelární formou v tabulce 3.

Existuje přesvědčující korelace mezi indukcí vysoké hladiny protilátek proti antigenu C a ochranou proti kazu.

Tabulka 3

Ředění	Kontrola	Imunizováno
1/20	0,262 $\pm$ 0,08	0,752 $\pm$ 0,15
1/40	0,253 $\pm$ 0,07	0,478 $\pm$ 0,08
1/80	0,188 $\pm$ 0,04	0,400 $\pm$ 0,05
1/160	0,173 $\pm$ 0,04	0,330 $\pm$ 0,04
1/320	0,144 $\pm$ 0,02	0,228 $\pm$ 0,04
1/640	0,145 $\pm$ 0,03	0,181 $\pm$ 0,04

Reakce protilátek imunizovaných opic

Sérum ze zvířat imunizovaných buněčnými stěnami obsahovalo protilátky proti antigenu C. Takové protilátky by mohly být snadno prokázány imunodifúzí nebo imuno-elektroforetickými pokusy používajícími čistý antigen C. Žádné takové protilátky by neměly být pozorovány v séru z kontrolních neimunizovaných zvířat. Je zřejmé, že existence protilátky proti antigenu C koreluje

s ochranou u opic imunizovaných buněčnými stěnami.

Pokusy s imunizací opic různými vakcínami byly prováděny v těchto laboratořích po dobu 12 let. Vzorky séra mnoha zvířat z těchto pokusů jsou ještě dostupné a byly vyšetřovány na přítomnosti protilátek proti antigenu C. Výsledky jsou shrnuty níže v tabulce 4 a potvrzují korelaci mezi přítomností protilátek proti antigenu C a ochranou.

Tabulka 4

Pokus č.	Vakcína	Zmenšení výskytu kazu	Protilátky proti C
4	stěny	100 %	+
11	buňky	50 %	+
14	buňky	60 %	+
17	GTF (glukosyltransferáza)	0 %	—
19			
(30 měsíců)	stěny	100 %	+

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob výroby antigenního přípravku pro omezování nebo prevenci zubního kazu, z bakterií skupiny *Streptococcus mutans* genetické skupiny I, kterýžto přípravek je v podstatě prost antigenů poskytujících zkříženou reakci se srdeční tkání, odvoditelných od *Streptococcus mutans*, kterýžto způsob zahrnuje kultivaci bakterií skupiny *Streptococcus* genetické skupiny I v kultivačním prostředí k produkci buněčné kultury, odstranění alespoň buněčných stěn z buněčné kultury pro získání bílkovinného roztoku, kterým je filtrát kultury, buněčný extrakt nebo jejich kombinace, a oddělování požadovaného antigenního přípravku od bílkovinného roztoku separačním postupem, který zahrnuje stupeň afinitní chromatografie, jenž obsahuje uvádění bílkovinného roztoku do styku s imobilizovanou protilátkou, vymývání nežádoucích materiálů z imobilizované protilátky a eluování antigenního přípravku z imobilizované protilátky, vyznačující se tím, že imobilizovaná protilátka má specifitu k jedné nebo více antigenním bílkovinám, které mají následující vlastnosti: jsou přítomny na buněčných stěnách kmenů *Streptococcus mutans*, genetické skupiny I, jsou rozrušovány nebo extrahovány zpracováním uvedených buněčných stěn vroucím vodným roztokem o koncentraci 10 g v litru dodecylsulfátu sodného (SDS) po dobu 10 minut, ale zůstávají sdruženy s uvedenými buněčnými stěnami po zpracování vodným roztokem dodecylsulfátu sodného o koncentraci 10 g/l při 15 °C, mají molekulovou hmotnost $70\,000 \pm 5\,000$, stanoveno SDS-polyakrylamidovou

gelovou elektroforézou (SDS-PAGE), jsou rozrušovány proteolytickým enzymem, mají isoelektrický bod $4,45 \pm 0,24$ a neposkytují zkříženou reakci se srdeční tkání.

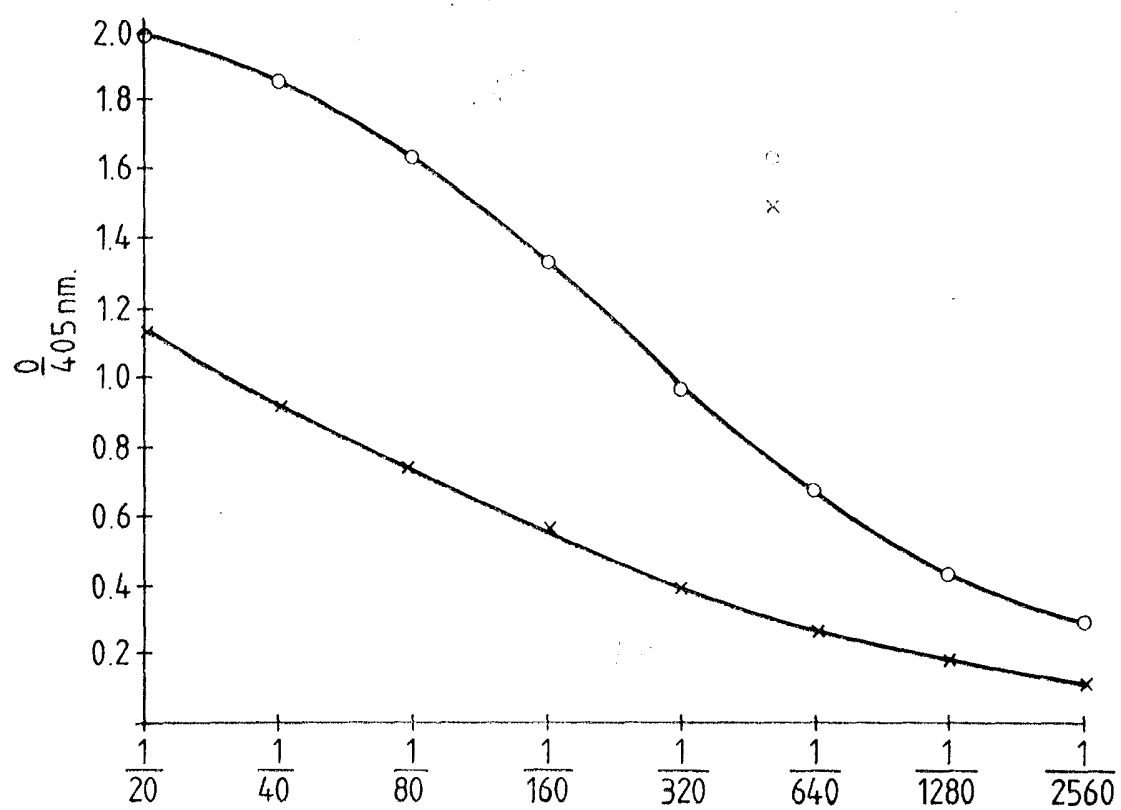
2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že imobilizovaná protilátka obsahuje kombinaci protilátek, přičemž prvá protilátka má specifitu k jedné nebo více antigenním bílkovinám, které mají následující vlastnosti: jsou přítomny na buněčných stěnách kmenů *Streptococcus*, genetické skupiny I, jsou rozrušovány nebo extrahovány zpracováním uvedených buněčných stěn vroucím vodným roztokem o koncentraci 10 g v litru dodecylsulfátu sodného (SDS) po dobu 10 minut, ale zůstávají sdruženy s uvedenými buněčnými stěnami po zpracování vodným roztokem dodecylsulfátu sodného o koncentraci 10 g/l při 15 °C, mají molekulovou hmotnost $70\,000 \pm 5\,000$, stanoveno SDS-polyakrylamidovou gelovou elektroforézou (SDS-PAGE), jsou rozrušovány proteolytickým enzymem, mají isoelektrický bod $4,45 \pm 0,24$ a neposkytují zkříženou reakci se srdeční tkání, a druhá protilátka má specifitu k jedné nebo více antigenním bílkovinám, které mají následující vlastnosti: jsou přítomny na buněčných stěnách kmenů *Streptococcus mutans*, genetické skupiny I, zůstávají sdruženy s uvedenými buněčnými stěnami po vaření s vodným roztokem dodecylsulfátu sodného o koncentraci 10 g/l po dobu 20 minut, mají molekulovou hmotnost 29 000, stanoveno postupem SDS-PAGE, mají isoelektrický bod

asi 4,3, jsou rozrušovány proteolytickým enzymem a nedávají zkříženou reakci se srdeční tkání.

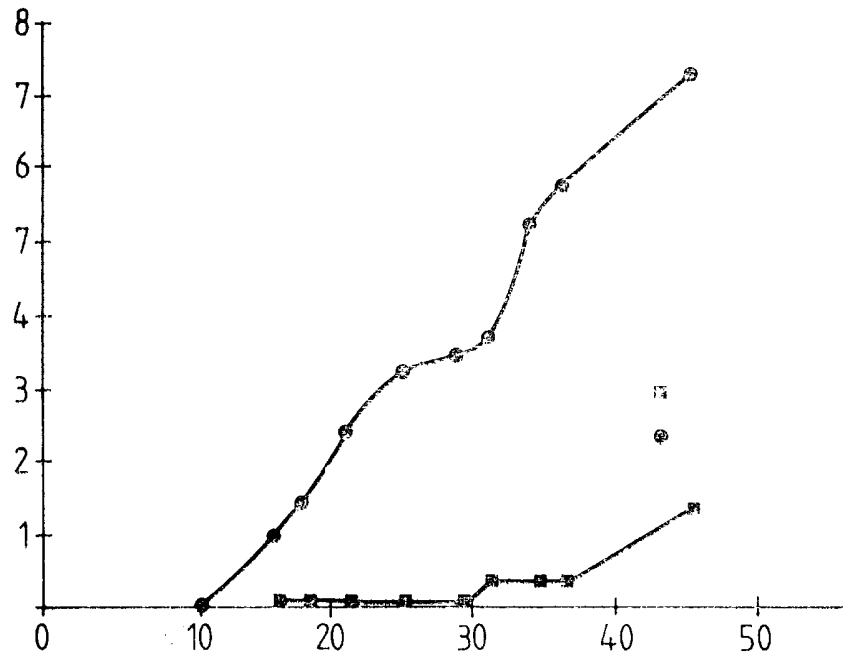
3. Způsob podle bodu 1 nebo podle bodu 2, vyznačující se tím, že bakterií je kmen *Streptococcus mutans*, sérotyp C.

2 listy výkresů

Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3

