



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

226190

(11) (B2)

(51) Int. Cl.³

A 61 K 35/74

(22) Přihlášeno 24 08 79
(21) (PV 5761-79)

(32) (31)(33) Právo přednosti od 01 09 78
(35383/78) Velká Británie

(40) Zveřejněno 29 07 83

(45) Vydáno 15 03 86

(72) Autor vynálezu

COLMAN GEOFFREY, SEVENOAKS, RUSSELL ROY ROBERT BAIRD,
BROMLEY (Velká Británie)

(73) Majitel patentu

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

(54) Způsob výroby antigenního přípravku pro potlačování zubního kazu

1

Vynález se týká antigenních proteinových přípravků pro použití ve vakcínách ke snížení výskytu zubního kazu, způsobu výroby uvedených přípravků a směsí obsahujících uvedené přípravky nebo příslušné protilátky.

O zubním kazu se široce uznává, že je způsobován kyselinou tvořenou bakteriemi sídlícími na povrchu zubů, přičemž hlavní zúčastněný druh bakterie je znám jako *Streptococcus mutans*. Tento poznatek vedl k četným pokusům zabránit nebo alespoň snížit výskyt zubního kazu imunizací celými buňkami nebo složkami buněk *S. mutans*. Byly popsány pokusy (Bowen se spol., British Dental Journal, sv. 139, 1975, strany 45 až 48, Cohen se spol., British Dental Journal, sv. 147, 1979, strany 9 až 41), při kterých byl výskyt zubního kazu u opic snížen imunizací buď celými buňkami nebo materiálem obohaceným buněčnými stěnami usezenými při odstředění desintegrovanych buněk. (Imunizace přípravky s enzymem glukozyltransferázou nevedla k ochraně).

Ačkoliv bylo prokázáno, že taková imunizace vyvolává imunitní odezvu vedoucí ke tvorbě protilátek u *S. mutans*, cesta, kterou tyto protilátky dosahují orálních kolonií, je nejistá. Ochrana byla pozorována po imunizaci submukosálně do úst nebo subkutánně do nohy. Alternativní, leč patrně nákladnější přístup zahrnuje místní aplikaci přípravků s protilátkami, například hovězího mléka, obsahujícího protilátky proti antigenům *S. mutans* (britský patentový spis č. 1 505 513).

Zatímco se zdá, že imunizace celými buňkami nebo preparáty z buněčných stěn *S. mutans* poskytuje ochranu, může toho být dosaženo rovněž s jistým rizikem, zejména, když se použije živých celých buněk. O streptokokoch je známo, že se účastní některých chorob, např. reumatických srdečních chorob a imunizace celými buňkami nebo dokonce necharakterizovanými

buněčnými složkami může zvyšovat nežádoucí vedlejší účinky. Pro maximální bezpečnost, stejně jako z důvodů maximální účinnosti, by měla vakcína obsahovat jenom specifický antigen nebo antigeny nezbytné k poskytnutí ochrany proti zubnímu kazu.

Identifikovali jsme nyní dva antigenní proteiny (dále označované antigen A a B), které jsou přítomny ve výše uvedených preparátech z buněčných stěn a které, jak se zdá, spolupůsobí při ochraně proti zubnímu kazu.

O antigenu B bylo prokázáno, že stimuluje protilátky, které reagují s lidskou srdeční tkání (Hughes, Pathogenic Streptococci, 1979, str. 222 až 223, vydáno M. T. Parkerem, Reedbooks, Chertsey, Anglie). Možnost, že vakcinace preparáty obsahujícími antigen B by mohla indukovat autoimunitní odezvu poškozující srdce, znamená, že antigen B, jak je dosud charakterizován, bude ve vakcině nepřijatelný.

Způsobem podle vynálezu se získává antigenní přípravek obsahující antigen A (definovaný dříve), v zásadě prostý dalších antigenních proteinů odvozených od Streptococcus mutans. Vynález poskytuje dále farmakologický přípravek obsahující takový antigenní přípravek nebo jeho protilátky spolu s farmaceuticky přijatelným nosičem. Název farmakologický přípravek, jak se zde užívá, zahrnuje jak profylaktická činidla, například vakcíny a činidla pro použití po infekci ke zmenšení výsledného poškození.

Antigen A je antigenní protein zůstávající na buněčných stěnách Streptococcus mutans sérotypu c /jak je popsáno Bratthallem, Odont. Revy 20, 1969, 231 až 243), jehož příkladem je kmen NCTC 10449, po extrakci buněčných stěn vodným roztokem 10 g/litr dodecylsírnu sodného (SDS) po dobu 1 hodiny při teplotě místnosti nebo po dobu 20 minut za varu, který má molekulární hmotnost asi $29\,000 \pm 3\,000$ a izoelektrický bod 4,1 až 4,5.

V podstatě stejné proteiny byly nalezeny i v jiných kmenech S. mutans genetické skupiny I (Coykendall, J. Gen. Microbiol. sv. 83, str. 327 až 338) zahrnující sérotypy e a f, například kmeny popsané Russellem RRB, Microbios Letters, sv. 2/1976, str. 55 až 59. Antigenně příbuzné proteiny se nalézají u kmenů jiných genetických skupin, například sérotypu b.

Vynález zahrnuje také antigenně příbuzné proteiny a název "antigen A", používaný v tomto popisu a připojeném předmětu vynálezu, by měl být chápán tak, že je zahrnuje. Vynález není tedy omezen na některý jednotlivý kmen nebo kmeny.

Antigen A nelze snadno oddělit od buněčných stěn extrahovaných SDS, avšak imunizace králíků extrahovanými buněčnými stěnami poskytuje antiséra proti dvěma proteinům (nazvané antigeny A a B), které mohou být detegovány a odděleny z extraktů celých buněk nebo z filtrátů kultur prostých buněk. Antigen se takto vhodně vyrábí z filtrátů kultury nebo z celkových kultur po rozrušení buněk.

Podle dalšího význaku vynálezu způsob pro přípravu antigenu A (popsaného výše) zahrnuje pěstování bakterií druhu Streptococcus mutans ve vhodném kultivačním médiu, přičemž se odstraňují alespoň buněčné stěny ze získané kultury, aby byl získán roztok proteinu a z uvedeného roztoku proteinu se získává antigen A.

Kultivačním médiem může být kterýkoliv obvyklé médium pro S. mutans, například Todd-Hewittova živná páda (Todd E. W. a Hewitt L. F., J. Path. and Bacteriol., 35, 1932, str. 973 až 974), trypton/kvasničný extrakt nebo chemicky definované médium. Pro snadné následující čištění je dáвана přednost chemicky definovanému médiu. Antigen A se uvolňuje do růstového média ve všech stadiích kultury. Buňky jsou izolovány výhodně v rané stacionární fázi (typicky 15 až 25 hodin při teplotě 37 °C). Buňky mohou růst rovněž v kontinuální kultuře.

Bílkovinný roztok může obsahovat pouze filtrát kultury získaný odstraněním celých buněk nebo buněčný extrakt prostý buněčných stěn a fragmentů nebo může být jejich směsí získávaných desintegrací buněk celkové kultury a následným odstraněním buněčných stěn a fragmentů. Buněčné stěny lze odstranit buď jako celé buňky nebo fragmenty po desintegraci obvyklým způsobem, jako například odstředěním nebo filtrací.

Antigen A se odděluje z bílkovinného roztoku postupem, který zahrnuje afinitní chromatografii na protilátkách proti antigenu A. Tyto protilátky mají specifitu pro jeden nebo více antigenů, jimiž jsou buď

I. antigenní bílkoviny o molekulové hmotnosti asi 29 000 s isoelektrickým bodě 4,1 až 4,5, které zůstávají na buněčných stěnách mikroorganismů *Streptococcus mutans* genetického typu I po extrakci vroucím roztokem 10 g/litr dodecylsíranu sodného ve vodě po dobu 20 minut, nebo

II. bílkoviny, které dávají zkříženou reakci s antigenními bílkovinami skupiny I.

Protilátkami mohou být typicky imunoglobulin G (IgG)-protilátky vytvořené u vhodného zvířete, například u králíka, a mohou být imobilizovány na obvyklém nosiči, například zesíťné agaróze po aktivaci bromkvanem.

Před chromatografií může být do postupu oddělování zahrnuto srážením síranem amonným. Toto srážení síranem amonným lze provádět buď v jednom stupni, s výhodou při 65% nasycení, je však výhodné provádět je ve dvou stupních při 45% a 65% nasycení.

Sráženina z prvního stupně obsahuje pouze menší část antigenu A, zatímco srážení z druhého stupně obsahuje převážnou část antigenu A a menší podíl ostatních proteinů, zejména antigenu B. Antigen A lze oddělit chromatograficky buď pouze ze srážení z druhého stupně, nebo z obou srážení, v závislosti na ekonomice procesu.

Ačkoli výše uvedené srážení je výhodným znakem způsobu podle vynálezu, není však znakem podstatným, jelikož filtráty kultury, buněčný extrakt nebo jejich směs mohou být použity přímo do prostředí pro afinitní chromatografii.

Čištěný přípravek antigenu A lze zpracovat ve vakcínu s obvyklými farmaceuticky přijatelnými nosiči včetně pomocných látek (například hydroxidu hlinitého), stabilizátorů a bakteriostatik. Vakcína může obsahovat protein z jednoho nebo více kmenů *S. mutans* a lze ji podávat člověku nebo jiným savcům subkutánně, intramuskulárně, intravenózně nebo submukózně, typicky v dávkách 1 až 50, zejména asi 10 µg na kg tělesné hmotnosti.

Aby byla vyvolána dostatečná odezva protilátek, může být zapotřebí více injekcí. Ochrany lze docílit imunizací rovněž orální cestou, například požitím tobolky obsahující antigen.

Podle dalšího významu vynálezu přípravek ke prevenci nebo kontrole zubního kazu u savců obsahuje protilátky proti antigenu A ve farmaceuticky přijatelném vehikulu. Preparát může mít formu injekcí nebo může to být kompozice vhodná pro lokální aplikaci, například jako zubní pasta nebo ústní voda. Může obsahovat jenom protilátky proti antigenu A nebo může obsahovat směs protilátek proti jiným antigenům.

Protilátky lze připravit obvyklými způsoby vstříknutím antigenního přípravku *S. mutans*, včetně antigenu A, vhodným zvířetům, například krávám nebo králíkům. Vhodné antigenní přípravky obsahují zejména SDS promyté buněčné stěny a čištěný antigen A připravený výše popsaným způsobem.

Předpokládá se, že účinek všech produktů podle vynálezu je způsoben antigenem A obsaženým buď v podaném produktu nebo vyvolaném imunitní odezvou subjektu. Účinnost těchto protilátek při ochraně před zubním kazem není zcela jasná, avšak takové pochopení není podstatné při provádění způsobu podle vynálezu.

Je možné, že ovlivňují metabolismus buněk bakterií, přičemž inhibují tvorbu glukanu nebo kyseliny. Mělo by však být jasné, že vynález není žádným způsobem omezován specifickou teorií mechanismu účinků materiálů. Podobně vynález není omezován na specifické kmeny *Streptococcus mutans* uvedené vpředu nebo užití v následujících příkladech.

Typické způsoby a produkty podle vynálezu budou nyní popsány pomocí příkladů s odkazem na připojené výkresy, na kterých obr. 1 znázorňuje IgG odezvy imunizovaných (křivka a) a kontrolních zvířat (křivka b) na antigen A. Obr. 2 znázorňuje IgG odezvy na antigen A u jediného zvířete.

Výroba antiséra

Bylo použito *Streptococcus mutans* dobře známého kmene Ingbritt. Kmen byl popsán B. Krassem; Archs, Oral Biol.; 11, str. 429 až 436 a je klasifikován jako genetický typ 1 systémem Coykendal (J. Gen. Microbiol. 83, 1974, 327 až 338) a sérotyp g podle Bratthalla (Odont. Revy 20, 1969, 231 až 243) a uložen v NCIB, Aberdeen, Scotland jako NCIB.....

Bakterie rostly v Todd-Hewitově živném prostředí (popsaném E. W. Toddem a L. F. Hewittem, J. Psht. and Bacteriol. sv. 35, 1932, str. 973 až 974), až bylo dosaženo stacionární fáze (16 hodin).

Buňky byly potom izolovány odstředěním a suspendovány v roztoku sodné soli dodecylsírany (SDS) jako solubilizačním pufru Laemmliho (Nature 227, 1970, str. 680 až 685) ve vroucí vodní lázni po dobu 20 minut. Buňky byly potom promyty vodou pomocí odstředění, lyofilizovány a resuspendovány znovu do vody v koncentraci 10 mg/ml.

Králík byl imunizován 1 ml těchto SDS extrahovaných buněk a 0,1 ml adjuvans hydroxidu hlinitého intramuskulární injekcí v 0,2% a 48. den. Padesátého pátého dne byl králík vykrvácen po kardiální punkci.

Podobných výsledků bylo dosaženo, když byly buňky extrahovány vodným roztokem 10 g na litr SDS za varu po dobu 20 minut nebo po dobu 1 hodiny při teplotě místnosti.

Charakterizace antigenů A a B

Antisérum připravené výše popsaným způsobem bylo zkoušeno pomocí imunodifúze proti buněčným složkám Ingbritt (ve formě extraktu celých buněk zpracovaného ultrazvukem), stejně jako proteinů z filtrátu kultury Ingbritt, který byl koncentrován srážením síranem amonným. Byly pozorovány dvě čáry precipitinu a ty byly antigenně identické s produktem zpracovaným ultrazvukem a supernatentem.

Působení nespecifického proteolytického enzymu pronázy (Sigma Chemical Comp.) na kterýkoliv antigenní přípravek nevedlo k následnému vzniku precipitinových čar, ukazujících na proteinový charakter antigenů.

Když bylo antisérum zkoušeno proti buňkám zpracovaným ultrazvukem a proti filtrátu kultury citlivější technikou imunoelektroforézy, mohly by být detegovány jenom dvě precipitinové reakce antigen/protilátka.

Stejně dva antigeny by mohly být detegovány, když byl jiný kmen sérotypu dostupný v National Collection of Type Cultures, Colindale, Anglie jako NCTC 10449 extrahován a použit k přípravě antiséra výše popsaným způsobem.

Informace o fyzikálních vlastnostech obou antigenů byla získána zkříženou imuno-elektroforézou, ve které prvním stadiem separace bylo izoelektrické zaostřování v polyakrylamidovém gelu (oddělení proteinů na základě rozdílů náboje) nebo pomocí elektroforézy na SDS-polyakrylamidovém gelu (oddělení proteinů na základě jejich molekulární hmotnosti).

Získané výsledky ukazují, že antigen A má izoelektrický bod 4,3 a molekulární hmotnost $29\,000 \pm 3\,000$, zatímco antigen B má izoelektrický bod 5,4 a molekulární hmotnost blízkou 200 000. Přesnější způsob využívající gradientové elektroforózy na SDS-polyakrylamidovém gelu potvrzuje hodnotu 29 000 pro antigen A a poskytl hodnotu 190 000 pro antigen B.

Kontrolní proteiny užitě jako standardy molekulární hmotnosti byly myosin králíka 200 000, beta-galaktosidáza 116 000, fosforyláza A 94 000, hovězí sérový albumin 68 000, aalbumin 43 000, chymotrypsinogen A 25 700. Hodnota pro B je prozatím, protože diferenciální barvicí metody ukazují, že B obsahuje některé uhlohydráty a glukoproteiny, o nichž je známo, že vykazují enomální migraci při gelové elektroforéze.

Antisérum proti SDS-extrahovaným buňkám kmene Ingbritt bylo užito k důkazu, že antigeny totožné s A a B byly produkovány dalšími šesti kmeny sérotypu c /včetně FW293, C67-1 GS-5 a OMT-70, popsané Russellem RRB, Microbios Letters, sv. 2 (1976), str. 55 až 59) a rovněž reprezentativní kmeny sérotypů a (kmen P4) a f (Kmen 151).

Poslední dva sérotypy jsou ve stejné genetické skupině jako sérotyp c (tj. v genetické skupině I Coykendall, 1977, Int. J. Syst. Bacteriol. 27, str. 26 až 30) a bylo prokázáno, že jsou antigenně blízce příbuzné (Bratthall se sp., J. dent. Res. 55A, 1976, str. 60 až 64; Perch se spol. Acta path. microbiol. scand. Sec. B82, 1974, str. 357 až 370) a mají podobné složení proteinů (Russell, Microbios Letters 2, 1976, str. 55 až 59).

Kmeny sérotypu b obsahují antigen zkříženě reagující s antigenem A, zatímco antigeny reagující zkříženě s antigenem B byly pozorovány v sérotypech a, b a g a kmenech S- sanguis.

Příprava čištěného antigenu A

Po detegování proteinů A a B ve filtrátech kultury ukázaly další pokusy, že oba antigeny jsou vylučovány během růstového cyklu buď v živném prostředí Todd-Hewittově, trypton/kvasničném extraktu nebo chemicky definovaném (CD) médiu Jendy a Kuramitsu (Infect. Immun. 14, 1976, str. 191 až 202). Protože CD médium obsahuje minimum složek interferujících snadno s čistícími operacemi, bylo zvoleno k použití.

S. mutans kmene Ingbritt rostl v CD médiu do rané stacionární fáze a buňky byly odstraněny odstředěním následovaným filtrací přes skleněné vlákno. Je-li žádoucí příprava čistého antigenu A, filtrát by měl projít chromatografickým sloupcem obsahujícím nerozpustný polymer glukózy mutan a polyakrylamidový gel v kuličkách (BioGel P2), připravený způsobem popsaným McCabem a Smithem (Infect. Immun. 1977, 16: 760 až 765) a cílem odstranit glukosyltransferázové enzymy, které mají jinek sklon čistit se spolu s antigenem B.

Pevný síran amonný byl zvolna přidán do vzniku 45% nasycenosti a sraženina, která se utvořila přes noc při teplotě 4 °C, byla izolována filtrací. Předběžné pokusy ukázaly, že antigen B se srazil maximálně při 45% nasycení síranem amonným, zatímco antigen A se srazil maximálně při 65%. Byl tudíž přidáván další síran amonný, aby filtrát kultury dosáhl 65 % nasycenosti a sraženina byla znovu izolována.

Obě frakce byly dialyzovány proti 50 mM Tris HCl pufru (hodnota pH 7,5), kteréhožto pufru bylo používáno během čištění, před dalším stupněm, kterým byla chromatografie na DEAE zesíťném dextranu (DEAE Sephadex A25 - obchodní značka).

Vzorky byly nanášeny na oddělené kolony, které byly předem ekvilibrovány Tris-pufrem. Kolony byly eluovány průchodem jednoho objemu Tris-pufru před aplikací lineárního gradientu od 0 do 0,3 M chloridu sodného v Tris-pufru. Po sobě jdoucí frakce byly shromažďovány a analyzovány elektroforézou na SDS-polyakrylamidovém gelu a pomocí "raketové" imuno elektroforézy proti antiséru připravenému proti SDS-extrahovaným buňkám.

Antigen B (z 45% sířenu smonného) se eluuje přibližně 0,8 M chloridem sodným, zatímco antigen A se eluuje přibližně 0,13 M chloridem sodným. V každém případě antigenní proteiny byly hodnoceny jako z 90 % čisté. Frakce obsahující antigen byly spojeny, dialyzovány proti Tris-pufru a koncentrovány ultrafiltrací. Každý parciálně čištěný antigen byl potom nanášen na sloupec agarózového gelu (Sephacrose CL-6B-obchodní značka) a eluován Tris-pufrem. Frakce byly znovu shromažďovány a analyzovány jejich složení proteinů a antigenů.

Výše uvedený způsob vedl k přípravkům proteinů A a B, které byly čisté na základě kritérií elektroforézy na SDS-polyakrylamidovém gelu a isoelektrického zosťňování na polyakrylamidovém gelu.

Když tyto přípravky antigenů A a B byly vstříknuty s adjuvans králíkům a následoval imunizační postup shodný s tím, který je popsán vpředu pro SDS-extrahované buňky, vznikala nespecifická séra, která, když byla zkoušena proti surovým antigenním přípravkům pomocí srážení gelové techniky, srážela jenom homologický antigen.

Nespecifická antiséra proti antigenům A a B lze použít pro imunosorbentní afinitní chromatografické čištění antigenů. Při typické přípravě, frakce séra imunoglobulinu G byla kopulována na zesíťnou agarózu (CnBr-aktivovaná Sepharosa, Pharmacia) způsobem doporučeným výrobcem. Koncentrovaný filtrát kultury S. mutans kmene Ingbritt v 0,05 M Tris/HCl pufru o hodnotě pH 7,5, obsahujícího 1 % Tritonu X-100, byl nanášen na sloupec kolony.

Sloupec byl potom promýván několika objemy Tris-pufru před elucí Tris-pufrem obsahujícím buď 3 M rhodanid sodný nebo 0,1 M glycin/HCl pufr o hodnotě pH 2,8 (ačkoliv jiná eluční činidla mohou být rovněž dostačující). Způsob poskytuje čisté přípravky požadovaného antigenu. Kdyby docházelo k nějakému unikání IgG ze sloupce kolony, může být oddělen snadno od antigenu již popsanou iontoměničovou chromatografií.

Složení aminokyselin afinitně čištěného antigenu bylo stanoveno po hydrolýze po dobu 48 hodin při teplotě 105 °C v 6 N kyselině chlorovodíkové a je uvedeno v tabulce 1.

T a b u l k a -- 1

Složení aminokyselin proteinových hydrolyzátů

Zbytky na 1 000 celkových zbytků		
	Antigen A	Antigen B
Kyselina asparagová	101	103
Threonin	56	60
Serin	91	61
Kyselina glutamová	106	111
Prolin	65	44
Glycin	190	212
Alanin	89	117
Cystin	-	-
Valin	53	58
Methionin	-	-
Isoleucin	38	38
Leucin	61	53
Fenylalanin	28	25
Tyrosin	-	10
Histidin	50	18
Lysin	46	64
Arginin	27	26
Aminocukr	-	4

Hodnocení antigenních a ochranných vlastností

Antigeny A a B jsou exponovány na povrchu bakterií a působí jako imunogeny. Pokusy zahrnující imunizaci několika tuctů králíků a opic ukázaly, že odezvy protilátek na antigeny A a B jsou zřetelně silnější než jiné antigeny. Tento účinek je dokonce ještě význačnější, když jsou zvířata imunizována přípravky obohacenými buněčnými stěnami. Jak je popsáno vpředu, SDS-extrahované stěny uvolňují protilátky jenom proti A a B, zatímco stěny podrobené intenzivní extrakci poskytovaly ještě mohutnější odezvy na A a B, zatímco u jiných antigenů byly pozorovány slabší odezvy.

Protilátky lze detegovat obvyklými způsoby zkřížené imuno elektroforézy nebo reverzní "reketové" elektroforézy.

Kvantitativní hodnocení odezvy protilátek bylo prováděno enzymovou imunosorpční zkouškou (ELISA), následovanou technikou na mikrodiskách podle Vollera, Bidwella a Bartletta (1977, Flowline Publications). Plastikové mikrotitrační misky byly potaženy imunoafinitně čištěnými antigeny A a B v koncentracích přibližně 1 µg/ml.

Zkouška množství protilátky opic, která vázala antigen, byla docílena inkubací s anti-lidským IgG konjugovaným na alkalickou fosfatázu (Don Whitley Ltd.). Výsledky byly vyjádřeny jako bod ekvivalence (tj. konečná hranice ředění, která vykazuje konečné zbarvení), nebo měřením absorpance při 405 nm získané od vzorku séra příslušného ředění.

Imunogenní vlastnosti celých buněk

Několik pokusů, při nichž byly úspěšně imunizovány opice celými buňkami *S. mutans*, bylo popsáno, jak je uvedeno vpředu (Bowen se sp., Brit. Dent. J. 1975 a Cohen se sp. Brit. Dent. J. 1979), přičemž redukce zubního kazu je 50 % nebo více. V reprezentativním

pokuse 4 pokusná a 2 kontrolní zvířata byla léčena obdobně usmrcenými celými buňkami (skupina 14 Cohena se spl. British Dental Journal sv. 147, 1979, str. 9 až 14). Injekce byly podávány 0., 2., 5., 6., 12. a 18. měsíc. Průměrné hladiny protilátek (IgG) u pokusné a kontrolní skupiny jsou uvedeny na obr. 1.

Hladina protilátek proti antigenu A po 12 měsících byla nejméně 30x vyšší ve srovnání s kontrolami, ačkoliv tato hladina klesá mezi vrcholy. Musí být zdůrazněno, že je nepravděpodobné, aby pro ochranu byly zásadně nutné tak četné injekce, avšak tento aspekt vynálezu nebyl zkoumán.

Čtyři roky po začátku pokusu měla kontrolní zvířata průměrný počet pěti kazových poškození na stálých zubech, zatímco imunizovaná zvířata měla průměrně dvě poškození.

Z těchto výsledků lze vidět zřejmou korelaci mezi hladinami antigenů A a ochranou před zubním kazem. Protilátky proti antigenu A se vyskytují pouze zřídka a v nízkých hladinách u neimunizovaných subjektů. Taková "přirozená protilátka" proti antigenu B byla rovněž pozorována v některých případech.

Není známo, kdy těchto protilátek přibývá nebo kdy jsou způsobeny antigenní stimulací pomocí *S. mutans* na zubech, systémovou infekcí pomocí *S. mutans*, nebo zkříženou reaktivitou antigenů jiných bakterií, vůči nimž má zvíře imunitní odezvu.

V jiném pokuse byla imunizována skupina osmi opic, celými buňkami a hydroxidem hliníovým jako adjuvans subkutánní injekcí do nohy (skupina 11, Cohen se sp., British Dental Journal, uvedený vpředu) a srovnána s osmi kontrolními zvířaty. V této skupině byly hladiny protilátky proti antigenu A u všech kontrolních zvířat zvýšeny, přičemž průměrný titer je 1/520.

Je třeba upozornit na to, že v důsledku variací při způsobu není možné srovnávat titrační hodnoty uvedené zde u různých skupin. Průměrné titrační hodnoty u zvířat imunizovaných celými bakteriemi byly však, 6 měsíců po injekci, 1/2830-více než pětinašobek hladiny u kontrol. Protilátky proti antigenu B byly rovněž přítomny u imunizovaných zvířat. 55% snížení kazu bylo pozorováno mezi imunizovanými a kontrolními zvířaty.

Imunogenní vlastnosti porušených buněčných stěn

O imunizaci porušenými buněčnými stěnami kmene Ingbritt popsané Bowenem se sp. (British Dental Journal 1975, str. 45 až 58) bylo prokázáno, že poskytují ochranu proti následnému čelenžování tímto kmenem. Imunizace trypsinovanými buněčnými stěnami neposkytuje ochranu, což dokazuje, že protein se účastní ochranného procesu.

Séra byla shromážděna od čtyř experimentálních opic imunizovaných přípravkem z buněčných stěn kmene Ingbritt a čelenžovány stejným kmenem, který je popsán pro skupinu C Bowenem se sp. Podobně bylo působeno bez imunizace na pět kontrolních opic.

Kontrolní zvířata měla titrační hodnoty protilátky proti antigenu A <1/20 (3 zvířata), 1/80 (1 zvíře) a 1/1 280 (1 zvíře), zatímco imunizovaná a chráněná zvířata měla titrační hodnoty mezi 1/80 a 1/640 s průměrnou hodnotou 1/220. Tyto hodnoty byly získány ze vzorků séra odebraných 20 měsíců po poslední injekci. Hladiny by měly být pochopitelně vyšší právě po vrcholu.

Pět roků po začátku pokusu byl celkový počet zubních kazů u čtyř pokusných zvířat 4. U pěti kontrolních zvířat bylo 64 poškozeno a toto číslo představovalo opačnou relaci k hladině protilátek v séru, se dvěma kontrolními zvířaty, která nevykazovala jakoukoliv protilátkovou odezvu ukazující vyvíjející se kaz.

Devět let po začátku pokusu existuje 5 přežívajících zvířat, dvě zvířata z imunizované skupiny a 2 kontroly uhynuly. Tři přežívající kontrolní zvířata měla všechna ustupující až přibývajících kaz, zaujímající 56, 69 a 93 napadeného povrchu. Jedno malé poškození se vyvinulo na zubu jednoho imunizovaného zvířete, zatímco ostatní zůstala bez kazu.

Imunogenní vlastnosti čistého antigenu A

Z výše uvedených výsledků je jasné, že antigeny A a B vstříknuté jako složky celých bakterií nebo buněčných stěn bakterií jsou schopny vyvolat imunitní odezvu, v nepřítomnosti adjuvens (skupina C) nebo po přidání hydroxidu hlinitého jako adjuvens (skupina II). Imunizace čistými antigeny však vyžaduje pro rychlou a trvalou odezvu přítomnost adjuvens. Odezva jedné opice (asi o 5 kg hmotnosti) imunizované 50 μ g antigenu A (připraveného, jak je popsáno vpředu, za použití srážení síranem amonným) s hydroxidem hlinitým je uvedeno na obr. 2.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob výroby antigenního přípravku pro potlačování zubního kazu u savců, kultivací druhu *Streptococcus mutans* v živném prostředí pro získání kultury, přičemž se z kultury odstraňují alespoň buněčné stěny pro získání zbývajících bílkovinného roztoku, který je filtrátem kultury, buněčným extraktem nebo kombinací jich obou, a požadovaný antigenní přípravek se oddělí od bílkovinného roztoku, vyznačující se tím, že antigenní přípravek se oddělí od bílkovinného roztoku separačním postupem zahrnujícím afinitní chromatografii, zahrnující uvádění bílkovinného roztoku do styku s imobilizovanou protilátkou, vymývání nežádoucích materiálů z imobilizované protilátky a eluování požadovaného antigenního přípravku z imobilizované protilátky, přičemž imobilizovaná protilátka je charakterizována specificitou pro jeden nebo více antigenů, které jsou buď antigenními bílkovinami o molekulové hmotnosti asi 29 000 a isoelektrickém bodu 4,1 až 4,5 a které zůstávají na buněčných stěnách *Streptococcus mutans* genetického typu I po extrakci vroucím roztokem 10 g/litr dodecylsíranu sodného ve vodě po dobu 20 minut, nebo jsou bílkovinami, které dávají zkříženou reakci s uvedenými antigenními bílkovinami.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že před afinitní chromatografií se provádí oddělování přidáním síranu amonného k bílkovinnému roztoku do 45 až 65% nasycení, přičemž pevný podíl se shromažďuje a rozpouští za vzniku druhého bílkovinného roztoku vhodného pro uvádění do styku s imobilizovanou protilátkou.

3. Způsob podle bodu 2, vyznačující se tím, že před afinitní chromatografií se provádí oddělování přidáním síranu amonného k roztoku bílkovin až do asi 45% nasycení, odstraní se první pevný podíl, k bílkovinnému roztoku se přidá síran amonný pro vysrážení druhého pevného podílu, druhý pevný podíl se shromažďuje a pak se rozpustí pro získání druhého bílkovinného roztoku vhodného pro uvádění do styku s imobilizovanou bílkovinou.

226190

