



(12) Wirtschaftspatent

Geändert gemäß § 23 Absatz 1
der Anordnung über die Verfahren
vor dem Patentamt

(19) DD (11) 240 669 C2

4(51) A 61 K 39/09
C 12 N 1/20

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

(21)	WP A 61 K / 280 394 2	(22)	06.09.85	(44)	18.11.87
				(44)	12.11.86

(71)	Karl-Marx-Universität, Goethestraße 3–5, Leipzig, 7010, DD
(72)	Linde, Klaus, Prof. Dr. sc. med.; Lehmann, Olaf, Dipl.-Stom., DD

(54) Verfahren zur Herstellung von Präparaten zur biologischen Kariesprophylaxe

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Präparaten zur biologischen Kariesprophylaxe. Aufgabe der Erfindung ist die Herstellung solcher Präparate, die geeignet sind, eine lokale Immunisierung gegen Karies herbeizuführen durch lokale bzw. orale Applikation dieser Präparate in Konzentrationen, die eine Monokolonisierung simulieren und daher das immunologische Switch on auslösen. Das Wesen der Erfindung besteht darin, daß Streptokokkus mutans Wildstämme bzw. GTF-Mutanten mittels an sich bekannter, eine hohe Ausbeute garantierender Verfahren in Massenkultur vermehrt und das so gewonnene Bakterienmaterial als resuspendiertes Sediment oder als Milchpräparat entweder

- mit an sich bekannten Verfahren in der Weise schonend inaktiviert wird, daß die Attachmentaktivität nicht beeinträchtigt wird, oder
- das Attachmentprinzip aus Erreger und/oder Kulturüberstand extrahiert oder
- die GTF-Mutante als Lebendantigen belassen wird

und ein für die lokale Applikation und Immunisierung attachmentaktives Präparat erhalten wird, das erforderlichenfalls konzentriert und in für die Applikation bzw. Immunisierung zweckmäßigen Formen weiterverarbeitet wird.

Erfindungsanspruch

- 1 Verfahren zur Herstellung von Präparaten zur biologischen Kariesprophylaxe **gekennzeichnet dadurch**, daß Streptokokkus mutans Wildstämme bzw. GTF Mutanten mittels an sich bekannter eine hohe Ausbeute garantierender Verfahren in Massenkultur vermehrt und das so gewonnene Bakterienmaterial als resuspendiertes Sediment oder als Milchpräparat entweder – mit an sich bekannten Verfahren in der Weise schonend inaktiviert wird, daß die Attachmentaktivität nicht beeinträchtigt wird, oder
– das Attachmentprinzip aus Erreger und/oder Kulturüberstand extrahiert oder
– die GTF Mutante als Lebendantigen belassen wird
und ein für die lokale Applikation und Immunisierung attachmentaktives Präparat erhalten wird das erforderlichenfalls konzentriert und in für die Applikation bzw. Immunisierung zweckmäßigen Form mittels an sich bekannter Techniken weiterverarbeitet wird
- 2 Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß das für die lokale Applikation und Immunisierung erhaltene Präparat soweit konzentriert wird, bis die Mutans Streptokokken der Mundhöhle über eine Attachment Konkurrenz aus dem Biotop verdrängt werden und als Folge dieser „simulierten Monokolonisierung“ ein immunologisches switch on ausgelöst wird
- 3 Verfahren nach Punkt 1 und 2 **gekennzeichnet dadurch**, daß ein für eine Periode der Grundimmunisierung und der nachfolgenden turnusmäßigen Boosterungen zu verabreichendes Präparat erhalten wird
- 4 Verfahren nach Punkt 1 bis 3, **gekennzeichnet dadurch**, daß ein für die lokale bzw. orale Applikation in Form von Zahnpflegemitteln, Gelen, Bonbons, Milchpräparaten usw. zubereitbares und applizierbares Präparat erhalten wird

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Präparaten zur biologischen Kariesprophylaxe, welche bei lokaler bzw. oraler Applikation von Konzentrationen, die eine meßbare Attachment Konkurrenz auslösen
– einerseits Str. mutans aus dem Biotop verdrängen und damit kurzfristig die Karies unterbinden und
– andererseits, über den zeitweilig hohen „eine Monokolonisierung simulierenden“ Antigenspiegel, die lokale durch Boosterung reaktivierbare Immunität stimulieren, wodurch die Kariesinzidenz signifikant reduziert wird

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Karies ist eine durch Ernährungsgewohnheiten manifest werdende Infektionskrankheit. Die durch mehrere Serotypen insbesondere von Str. mutans verursachten Zerstörungen am Zahnschmelz betreffen das Milchgebiß (mit Nachfolgeschaden bei der Dentition) und die permanenten Zähne des Adulten mit einem Maximum zwischen dem 10. und 20. Lebensjahr (LEHNER, Brit. dental J. 149, [1980], 318–325).

Mutans Streptokokken verankern sich (Attachment) offensichtlich mit Hilfe von Proteinrezeptoren (VAN HOUTE, in: Dental Plaque and Surface Interactions in the Oral Cavity, IRL Press Ltd., [1980], 69–100, McGHEE u. MICHALEK Ann. Rev. Microbiol. 35 [1981], 595–638, GIBBONS, J. Dent. Res. 63, [1984], 378–385) an komplementären Strukturen von Glykoproteinen, welche sich aus Speichel dem Zahnschmelz auflagern.

Andere Publikationen sehen in Glucanen bzw. Lipoteichonsäuren das Attachmentprinzip. Insgesamt ist jedoch von den zur irreversiblen Keim- und Plaqueverankerung führenden molekularen Vorgängen wenig bekannt, eine wichtige Rolle soll die feste Bindung der Glucosyltransferase (GTF) an Glucan (FIGURES u. EDWARDS, Carbohydr. Res. 88 [1981], 107–117, KOGA u. INOUE, Infect. & Immun. 19, [1978], 402–410, HAMADA et al. J. Dent. Res. 63, [1984], 407–411, TSUMORI et al. Microbiol. Immunol. 26, [1982], 677–688, STINSON et al. Infect. Immun. 32, [1981], 583–591) und Kokken sowie die Adhärenz des Glucan an den Erreger und Schmelz spielen. Die nunmehr am Zahnschmelz haftenden und zur Mikrokolonie auswachsenden Kokken synthetisieren aus Saccharose mit Hilfe hauptsächlich der (evtl. Plasmid codierten (ELWELL, Ann. Rev. Microbiol. 34, [1980], 465–496) GTF ein hochverzweigtes Glucan (Mutan) Polymer, welches als Plaque dem Zahnschmelz aufliegt (McGHEE u. MICHALEK, Ann. Rev. Microbiol. 35 [1981], 595–638) und von weiteren zuckerspaltenden Mundhöhlenkeimen besiedelt wird. Diese Plaqueflora verursacht durch Kohlenhydratabbau eine im Plaquebereich wirksam werdende Senkung der H⁺-Ionenkonzentration unterhalb des kritischen Schwellenwertes von pH 5,5, welcher zur Entmineralisierung des Schmelzes führt. Demzufolge korreliert die quantitative Bildung unlöslicher Glucane mit der kariogenen Aktivität bzw. Virulenz der verschiedenen Str. mutans Stämme (MICHALEK et al. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 150, [1975], 498–502).

Derzeit diskutierte bzw. praxiswirksame Kariesprophylaxe

- Saccharosearme bzw. freie Ernährung. Eine solche Prophylaxe scheitert an unseren Ernährungsnormen.
- Zahnpflegemittel mit Plaque-auflösenden Enzymen (DE 3 248 541, DT 2 265 327) oder dem bakteriell → Zellwände bzw. deren Mureingerüst spaltenden Lysozym (DE 2 852 792).
- Fluoridierung des Trinkwassers bzw. Nahrung oder/und lokale Applikation von Fluor (Übersicht: HOROWITZ, Brit. dental J. 149 [1980], 311–318). Diese Prophylaxe bedingt eine Remineralisierung des Schmelzes (außerdem steht eine sich im Grenzbereich zur Enzymhemmung akkumulierende Fluoranreicherung im Plaque zur Diskussion (MARQUIS, J. dental Res. 56, [1977], 6, 704). Die Leistungsgrenze dieser Prophylaxe liegt bei etwa 40 % Kariesreduktion.
- Vorwiegend tierexperimentelle Studien zur Immunprophylaxe, um über eine durch sekretorische Antikörper bedingte Attachmentblockade* (BROWN et al. J. dental Res. 57, [1978], 882–893, MICHALEK et al. Infect. & Immun. 19, [1978], 217–224), oder/und GTF Hemmung die Plaquebildung zu unterbinden.
 - Parenterale Applikation von inaktivierten Mutans Streptokokken bedingt eine nachweisbare lokale Immunantwort und Kariessenkung (OE Patentschrift Nr. 320 848, LINZER et al. Infect. & Immun. 31, [1981], 345–351, CALDWELL, J. Med. Microbiol.

* Neben Attachment blockierenden spezifischen und unwirksamen s. IGA anderer Spezifität kommen im Speichel weitere die Anheftung (fördernde und) hemmende Komponenten vor (GAHNBERG et al. Infect. & Immun. 37, [1982], 401–406), wie z.B. daß das Wachstum-hemmende Lactoferrin (ARNOLD et al. Infect. & Immun. 28 [1980], 893–898).

10, [1977], 213–224) In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, daß bei Immunisierung mit lebenden Keimen andere Antikorperspektren auftreten (BRATHALL u. PETERSON J. dental Res 55, [1976], 60–64)

- Immunisierung mit dem Enzym GTF vermittelt eine Serotyp-unabhängige Schutzwirkung gegen Kariesbefall (SMITH et al. Infect. & Immun 37, [1982], 656–661, TAUBMAN, United States Patent [19], 4, 150, 116, Apr. 17. 1979. McGHEE u. MICHALEK Ann. Rev. Microbiol 35 [1981], 595–638)
- Orale Immunisierung mit Vollkeimen oder/und im Kulturrüberstand stimuliert lokal – bzw. über „homing“, d. h. durch Einwanderung von sIgA bildenden Zellen aus der Peyerschen Plaques in Speichel- etc. -Drüsen (MONTGOMERY et al. in McGHEE et al. Proceedings of the International Symposium on the Secretory Immune System and Caries Immunity, Plenum Press, New York and London 1978 p. 113–122, HANSON et al. ebenda p. 165–176, MONTGOMERY et al. ebenda p. 113–122, LEHTONEN et al. Infect. Immun 43, [1984], 308–313) – im Oralbereich protektive sekretorische Antikörper wobei nach Boosterung eine rasche und hohe IgA-Synthese eintritt (McGHEE u. MICHALEK, Ann. Rev. Microbiol 35 [1981], 505–638, LINZER et al. Infect. & Immun 31, [1981], 345–351, MESTECKY et al. J. clin. Invest 61, [1978], 731–737, McGHEE et al. in McGHEE et al. Proceedings of the International Symposium on the Secretory Immune System and Caries Immunity, Plenum Press, New York and London 1978 p. 177–184)
- Neuerdings wird als Immunogen eine „Ribosomen-Präparation“ (EVERHART et al. Med. Microbiol. Immunol 172 [1984], 215–222) vorgestellt, welche als Antigen mit den Seren von allen Str. mutans Serotypen reagiert. Von dieser „Ribosomen Vaccine“ erwarten die Autoren dreierlei:
 - Eine alle Serotypen erfassende Karies-protektive Wirkung (wobei u. a. übersehen wird, daß im Zellinnern liegende Antigene für eine Antikörper-vermittelte Attachmentblockade keine Rolle spielen)
 - Keine Bildung von kreuzreagierenden Antikörpern gegen humanes Herz- und Muskelgewebe
 - Keine Bildung von Antikörpern gegen Lipoteichonsäuren grampositiver Bakterien, wodurch evtl. unerwünschte immunologische Reaktionen auftreten können. Interessant ist der Hinweis, daß der Titer humoraler Präzipitine gegen Teichonsäuren oraler Bakterien – als Ausdruck der von der Normalflora ausgehenden permanenten Immunstimulation – mit einer zumindest nicht erhöhten bis signifikanten verminderten Kariesanfälligkeit korreliert (LEVINE et al. Arch. oral Biol 29, [1984], 191–194)

Diese bisher noch nicht zur Praxisrelevanz entwickelte aktive Immunprophylaxe führt im Prinzip nur zu einer Erhöhung bzw. zeitlichen Vorverlegung* der natürlichen lokalen Grundimmunität, welche z. B. beim Menschen durch $\geq 10^{11}$ /Tag verschluckte Mundhohlenkeime stimuliert wird (McGHEE u. MICHALEK, Ann. Rev. Microbiol 35 [1981], 595–638) und vermutlich die mit zunehmendem Alter abnehmende Kariesinzidenz bedingt. Diese korreliert mit der Beobachtung, daß sich Menschen mit geringer von solchen mit hoher Kariesanfälligkeit durch ihren erhöhten Antigen-spezifischen IgA im Speichel unterscheiden (LEHTONEN et al. Infect. Immun 43, [1984], 308–313, CLANCY u. BIENENSTOCK, in Ferguson et al. Immunological aspects of the liver and gastrointestinal tract pp. 121–152, Baltimore, Univ. Park Press, 1976, McNABB, Ann. Rev. Microbiol 35, [1981], 477–496, LAMM, Advances Immunol 22, [1976], 223–290, MESTECKI et al. J. Clin. Invest 61, [1978], 731–737). Die beim Versuchstier gefundene Immunantwort gegen ein kolonisierendes Antigen (FITZGERALD u. BIRDSELL, J. periodontal Res 17, [1982], 237–246) gilt somit sinngemäß auch für den kolonisierenden – oder zusätzlich in hohen Dosen verabreichten – Str. mutans beim Menschen. Schwierig bzw. nur mit Vorsicht interpretierbar ist in diesem Zusammenhang der mitgeteilte Befund (MICHALEK et al. Infect. & Immun 19, [1978], 217–224), daß bei Ratten 10^7 und 10^8 Formalin-inaktivierte Str. mutans CFU/Gramm Futter einen signifikanten s-IgA Titer auslösen, jedoch 10^9 /CFU des gleichen Antigens offenbar zu keiner Immunantwort im Speichel führen. Die momentanen Schwerpunkte in der mikrobiologischen Kariesforschung bzw. -prophylaxe (Abstracts of Papers 62nd General Session International Association for Dental Research, March 15–18, 1984 in J. Dental Research 63, [1984], Special Issue), orientieren auf:

- Implantationen (Kolonisierung) Versuche am Tiermodell mit nichtkariogenen Streptokokkenstämmen zwecks kompetitiver Verdrängung von Str. mutans im Biotop und dem Ziel: Senkung der Karieshäufigkeit. (In diesem Sinn lassen sich auch die Untersuchungen zur Ansiedlung von definierten Str. mutans bzw. sanguis Stämmen in der Mundhöhle interpretieren (SVANBERG et al. Infect. Immun 43, [1984], 817–821, WESTERGREN u. SVANBERG Arch. Oral Biol 28, [1983], 729–733))
- Untersuchungen zur Korrelation zwischen dem Titer Antigen-spezifischer sekretorischer IgA im Speichel und der Kariesanfälligkeit des Menschen, inclusive von entsprechenden Immunisierungsversuchen bei Ratten. Dieser Gesetzmäßigkeit wird die Patentschrift (DE 3 427 477) gerecht, welche den Zusatz von – durch Immunisierung von Tieren hergestellten – Antikörpern gegen die sauren Glykoproteine der Str. mutans Zelloberfläche zu Zahnpflegemitteln vorschlägt
- Studien über das Substrat des Attachments, wobei die mitgeteilten Daten auf Proteine bzw. Glykoproteine (Fussy coat) hinweisen

Der Objektivität halber soll erwähnt werden, daß bei parenteral hyperimmunisierten Kaninchen humorale Antikörper mit Kreuzreaktivität zum Herzgewebe gefunden wurden (FERRETTI et al. Infect. & Immun 30, [1980], 69–73), jedoch andererseits solche Tiere weniger anfällig waren für eine experimentell auszulösende Streptokokken-Endocarditis (McGHEE u. MICHALEK, Ann. Rev. Microbiol 35, [1981], 595–638)

Des Weiteren finden sich Angaben (HUGHES et al. Infect. Immun 27, [1980], 576–588, VAN DER RIGEN et al. J. Dent. Res 55, [1976], 59–64, STINSON et al. Infect. Immun 27, [1980], 604–613), wobei nach Immunisierung des Menschen mit Str. mutans Vollkeim-Vaccinen mit Herz- und Muskelgewebe kreuzreagierende Antikörper auftreten können. In diesem Zusammenhang ist der Hinweis notwendig, daß das gesetzmäßige Auftreten humoraler Antikörper gegen oral zugeführte bzw. kolonisierende Antigene (u. a. PIERCE, J. exper. Med 148, [1978], 195–205, CUSHING, Develop. Biol. Standard Vol 53, pp. 107–111) nicht als klinisch bedenklich einzustufen ist, da etwa 70% aller Jugendlichen im Serum Antikörper gegen Milcheiweiß besitzen (zitiert in ROTHBERG et al. J. Immunol 98, [1967], 386–395)

Wurde man den Gedanken „mögliche Nebenwirkungen“ mit aller Konsequenz verfolgen, dürfte dies zu einer Infragestellung letztlich jeglicher Therapie bzw. Immunprophylaxe führen.

Beispielsweise

- führen Penicilline stets zu einer Resorption von großen Mengen der biologisch vielschichtig wirksamen Peptidoglycane aus grampositiven Kokken (PARK et al. Infect. Immun 43, [1984], 139–142)

* Vergleichbare Verhältnisse werden bei den Meningokokken, Pneumokokken und Haemophilus influenzae Polysaccharid-Impfstoffen angetroffen, die protektive Titer ab Ende 2. Lebensjahr induzieren. Ungeimpfte Populationen erwerben solche Titer erst mit dem 5. Lebensjahr über inapparente Infektionen bzw. Kolonisierung (Linde et al. Zschr. ärztl. Fortbild 75 [1981] 669–674)

– vermitteln Virusimpfungen in Einzelfällen die allergische Reaktionsbereitschaft für eine spätere natürliche Infektion (KARZON, in Human Immunity to Viruses Symp on Human Immune Responses to Viruses Recent Developments, ed Orlando, F A, Academic Press 1983, p 111–130)

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, ein Verfahren zur Herstellung solcher Präparate zur biologischen Kariesprophylaxe zu entwickeln, die ohne die Forderung nach unrealistischen Ernährungsgewohnheiten eine hohe Effektivität in der Kariesprophylaxe besitzen und schon im Kindes- und Jugendalter zu einer Immunität führen, wodurch sich bei konsequenter Anwendung ein hoher gesundheitspolitischer und ökonomischer Nutzen ergibt

Wesen der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Herstellung von Präparaten zur biologischen Kariesprophylaxe zu schaffen, in dessen Resultat Präparate entstehen, welche geeignet sind, eine lokale Immunisierung gegen Karies herbeizuführen durch lokale bzw. orale Applikation dieser Präparate in Konzentrationen, die eine Monokolonialisierung simulieren (Verdrängung von Str. mutans aus dem Biotop) und daher das immunologische switch on auslösen

Erfindungsgemäß werden dazu Streptokokkus mutans Wildstämme bzw. GTF Mutanten eingesetzt. Es wurde gefunden, daß eine verbesserte Kariesprophylaxe durch temporäre Applikation von und zeitweilige Boosterung mit attachmentaktiven inaktivierten Streptokokkus mutans Präparationen oder der lebenden GTF Mutanten in Konzentrationen erreicht wird, welche zu einer kompetitiven Verdrängung (simulierte ein immunologisches switch on auslösende Monokolonisierung) der Str. mutans Wildstammpopulation im Biotop führen

Das erfindungsgemäße Verfahren ist durch die folgenden Verfahrensschritte gekennzeichnet: Streptokokkus mutans Wildstämme bzw. GTF Mutanten werden mittels an sich bekannter, eine hohe Ausbeute garantierender Verfahren in Massenkultur vermehrt. Das so gewonnene Bakterienmaterial wird als resuspendiertes Sediment oder als Milchpräparat entweder

- mit an sich bekannten Verfahren in der Weise schonend inaktiviert, daß die Attachmentaktivität nicht beeinträchtigt wird, oder
- das Attachmentprinzip aus Erreger und/oder Kulturüberstand extrahiert oder
- die GTF Mutante als Lebendantigen belassen

Es wird ein für die lokale bzw. orale Applikation oder Immunisierung attachmentaktives Präparat erhalten. Dieses ist erforderlichenfalls zu konzentrieren. Anschließend wird es in für die Applikation bzw. Immunisierung zweckmäßigen Formen mittels an sich bekannter Techniken weiterverarbeitet.

Das für die lokale bzw. orale Applikation oder Immunisierung erhaltene Präparat wird in vorteilhafter Weise in solchen Konzentrationen angewendet, bis die Mutans-Streptokokken der Mundhöhle über eine Attachment-Kompetition aus dem Biotop verdrängt werden und als Folge dieser „simulierten Monokolonialisierung“ ein immunologisches switch on eintritt. Das erhaltene und entsprechend konzentrierte Präparat wird weiter dadurch charakterisiert, daß es in einer Grundimmunisierung sowie in zeitlichen Abständen als Boosterung verabreicht wird. Die Grundimmunisierung kann etwa 4 Wochen betragen. Daran schließen sich in turnusmäßigen Abständen die Boosterungen an. Beispielsweise können diese in 2 bis 4 Wochen Abstand über jeweils einen Tag erfolgen. Zur lokalen bzw. oralen Applikation wird das Präparat in Form von Zahnpflegemitteln, Gelen, Bonbons, Milchpräparaten usw. zubereitet.

Die Vermehrung durch Massenkultur erfolgt zweckmäßigerweise dadurch, daß während der Inkubation auf pH neutral korrigiert wird. Ebenso ist es zweckmäßig, bei Vollkeim-Präparaten aus Str. mutans Wildstämmen die schonende Inaktivierung z. B. bei 56 °C oder mittels 0,35 % Formalin vorzunehmen.

Die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Präparate sichern eine hohe Effektivität in der Kariesprophylaxe durch eine Vorverlegung der mit zunehmenden (Erwachsenen-) Alter sich natürlich entwickelnden – mehr oder weniger protektiven – Immunität gegen Karies in das Kindes- und Jugendalter. Hierbei wird von folgender

Konzeption zur biologischen Kariesprophylaxe ausgegangen:

Die Standortflora der Schleimhäute, bzw. die in dieses Biotop eindringenden pathogenen Erreger, verankern sich spezifisch mittels spezieller Oberflächenstrukturen an Rezeptoren der Wirtsoberfläche, wodurch ihre Ausverdünnung durch den Saftstrom verhindert und die nachfolgende Vermehrung zur Mikrokolonie (Kolonisierung) möglich wird. Beispiele hierfür sind die Kolonisationsfaktorenantigene bzw. Fimbrien (Plasmid oder/und chromosomal codiert) der Enterobacteriaceae, Pilistrukturen der Gonokokken, etc., etc. (ELWELL, Ann. Rev. Microbiol. 34, [1980], 465–496; BARON u. SAZ, J. Bacteriol. 133, [1978], 972–986; RABSCH et al. Adhasine bei gramnegativen Bakterien, Sonderheft der Tierhygiene Information 17, [1985], ISSN 0138 1881).

Vereinzelte direkte und indirekte Hinweise über die prophylaktische oder therapeutische Wirksamkeit einer aus heutiger Sicht auf Attachment-Kompetition beruhender Substitutionsbehandlung u. a. mit Colikeimen, tauchen seit etwa 50 Jahren immer wieder in der Literatur auf. Die wissenschaftliche Anerkennung eines solchen auf Attachment-Kompetition und Biotopausfüllung mit apathogenen „Normalflora“-Keimen beruhenden Wirkungsprinzips scheiterte bislang an einer nicht reproduzierbaren (z. B. $\geq 50\%$ der Enterobacteriaceae-Flora ausmachenden) „Monokolonisierung“ durch solche „Substitutionsstämme“ oder daran, daß durch quantitativ zu geringe Antigenmengen keine signifikante Attachment-Kompetition resultiert.

Therapeutisch oder prophylaktisch relevante Attachment-Kompetitionen implizieren jedoch Antigenkonzentrationen, welche einer unphysiologischen Monokolonisierung entsprechen und daher eine lokale Immunantwort zur Folge haben (Schroder et al. unveröffentlicht).

Solche Verhältnisse im Biotop sind etwa vergleichbar mit dem traveller disease durch enterotoxische Coli. Der empfängliche Wirt besitzt gegen den für ihn bislang unbekannten Erreger keine spezifische lokale Abwehr, so daß es zu einer – mit entsprechenden klinischen Symptomen einhergehenden – de facto (Enterobacteriaceae) Monokolonisierung kommt. Die hierbei auftretenden, einen kritischen Schwellenwert überschreitenden Antigenkonzentrationen stimulieren nunmehr eine meßbare lokale Immunität (welche die apparente Infektion beendet).

Aus molekularbiologischer Sicht ist – innerhalb des komplexen Pathomechanismus der Kariesinfektion – das Attachment der Mutans Streptokokken an die Schmelzoberfläche von essentieller Bedeutung. Speziell der an die GTF Mutante hinsichtlich Kolonisierung und Kariesprevention (DE STOPPELAAR Arch Oral Biol 16 [1971], 791–975) über „Attachment Verdrängung“ gestellten aber nicht erfüllten Erwartungen ist zu sagen, daß als Folge von nicht mit letzter Konsequenz, bezüglich der quantitativen Aspekte der Attachmentblockade mit nachfolgender Stimulierung der lokalen Immunität durchgeführten und ausgewerteten Versuche weiterführende Experimente entfielen.

Gleichmaßen überraschender Weise wie folgerichtig haben wir gefunden, daß eine quantitative Aspekte berücksichtigende simulierte „Monokolonisierung“ unter Verwendung eines schonend inaktivierten Attachmentaktiven Str. mutans Antigens kompetitiv mit dem Attachment der Str. mutans Wildstammpopulation am Zahnschmelz interferiert und nachfolgend eine lokale Immunität erkennbar z. B. am Rattenmodell durch fehlenden Nachweis von Str. mutans im Biotop, Plaquereduktion und Kariesprevention während der vierwöchigen Antigengabe sowie dem Fortbestehen der Kariesresistenz „nach Abschluß dieser oralen Immunisierungsperiode“ bei zeitweiliger Boosterung.

Entsprechend unserer Konzeption wird unter Verwendung von schonend inaktivierten Antigen (zu einem späteren Zeitpunkt wäre evtl. eine aktive kolonisierende GTF Mutante [mögliche Lösung des Problems „reproduzierbare Kolonisierung“ mit einer GTF Mutante u. a. siehe DD 218 834 Verfahren zur Herstellung von Bakterienmutanten mit veränderten Leistungsparametern] anzustreben) kompetitiv die Str. mutans Wildstamm Population aus dem Attachmentsites verdrängt und damit im kurzfristigen Rattenexperiment die Plaquebildung beeinflusst bzw. die Kariesentstehung* unterbunden. Gleichzeitig wird als Folge der oralen Immunisierung mit hohen Antigengaben – welche den kritischen Schwellenwert zur Auslösung immunologischer Reaktivität überschreiten – die Prävention über Attachmentsite Verdrängung zunehmend durch sekretorische IgA vermittelte immunologische Parameter der Attachmentblockade abgelöst.

* Unter dem Blickwinkel einer biologischen Kariesprophylaxe waren z. B. auch Versuche mit kolonisierenden Veillonellen Mutanten als natürlicher Symbiont zu diskutieren, da diese Keime über einen verstärkten Milchsäure Abbau die Kariesanfälligkeit senken können (VAN DER HOEVEN et al Caries Res 12 [1978] 142–147).

Ausführungsbeispiele

Die Erfindung wird nachstehend anhand von Ausführungsbeispielen erläutert.

A. Karies Ratten Modell

Haltung der Tiere und Auswertung der Versuche

- a) Zu Beginn der Versuchsserie waren die OSBORNE MENDEL Ratten nicht älter als 21 Tage. Jedes Tier erhielt täglich 15 g Futter* sowie Aqua dest. ad libitum. Die Tiere wurden vormittags gefüttert. Die durchschnittliche Gewichtszunahme pro Tier betrug innerhalb des Versuchszeitraumes 70 Gramm.
- b) Die Auswertung der Fissurenkaries erfolgte nach dem modifizierten Schema von KONIG (Möglichkeiten der Kariesprophylaxe beim Menschen und ihre Untersuchung im kurzfristigen Rattenexperiment, Hans Huber Verlag, Bern 1966) welches den Befall der Fissuren in 4 Schweregraden einteilt¹:
 - Grad A (1) Farbreaktion auf dem Schmelz beschränkt bei intakter Schmelzoberfläche und nicht angefarbter Schmelz Dentin Grenze
 - Grad T (2) Farbreaktion bis zur Schmelz Dentin Grenze
 - Grad B (3) Farbreaktion an und jenseits der Schmelz Dentin Grenze beginnende Dentinbeteiligung und geringe Ausbreitung in die Tiefe und nach okklusal
 - Grad C (4) intensive Dentinfärbung okklusalwärts und pulpawärts, d. h. fortgeschrittene Karies mit beginnender Abhebung des Schmelzes und beginnende Kavitation

Beurteilt wurden 5 Fissuren (1. und 2. Molar), und für jede Fissur die Anzahl der total durchlaufenen Stadien gewertet. Auf speziellen Diagnoseblättern wurden die kariösen Läsionen eines jeden Zahnes eingetragen, die total durchlaufenen Stadien separat angegeben, summiert und der Mittelwert gebildet (max. 20).

- B. Der Plaqueindex wurde planimetrisch ermittelt. Nach Entfernung der Weichteile wurde die vestibuläre Unterkieferhälfte mit einer Fuchsinlösung – bestehend aus 3 Teilen Aqua dest. und 1 Teil gesättigter alkoholischer basischer Fuchsinlösung – für 15 Sekunden angefarbt, anschließend kurz mit Leitungswasser abgespült und die flächenmäßige Ausdehnung der angefarbten Plaque mit dem Stereomikroskop SMXX (VEB Carl Zeiss) im Auflichtverfahren gemessen.

Bewertet wurden die Stadien

0 = keine Anfärbung

1 = Anfärbung nur im unteren Drittel der vestibulären Molarfläche (v. M.)

2 = Anfärbung dehnt sich auf zwei Drittel der v. M. aus

3 = vollständige Rotfärbung der v. M.

Die am ersten und zweiten Molaren einer Unterkieferhälfte ermittelten Zahlen (Stadien) Werte wurden summiert und der Mittelwert (Maximalzahl = 6) gebildet (STOOKEY Plaque Scoring Evaluation in living Animals, in: Proceeding Symposium on Animal Models in Biology Ed. Tanzer J. M. Sp. Supp. Microb. Abstracts [1981] 205–214 Int. Retrieval Inc. London).

- C. Semiquantitative Bestimmung der CFU von Streptokokken insgesamt und Str. mutans in etwa 1 mg Plaquematerial von bukkalen Zahnoberflächen

Das mit sterilen Myrtenblättern entnommene Plaquematerial wurde in 1 ml steriler gepufferter physiologischer Kochsalzlösung suspendiert und mittels Glaskugeln und 15minütiger Vibrationsrüttel-Behandlung homogenisiert. Von dieser „Keimsuspension“ wurde unter Verwendung von gepufferter physiologischer Kochsalzlösung eine logarithmische Verdünnungsreihe hergestellt und je Verdünnungsstufe 0,1 ml auf Mitis Salivarius Agar mit und ohne 0,1 % Sulfisomidin (MSA B

* Standardfutter = Negativkontrolle

reine Kariesdiät (Stephan 580 König et al. siehe unter Ab.) = Positivkontrolle

Kariesdiät mit entsprechenden Konzentrationen des „biologischen Präparats“ = Versuchsreihen

238, Difco} ausgespatelt und für 24 Stunden anaerob sowie weitere 24 Stunden aerob bei 37 °C bebrütet. Die auf dem Medium ohne Sulfisomidin gewachsenen Kolonien wurde als Streptokokkenspecies angesprochen, während die auf dem Medium mit Hemmsubstrat wachsenden Keime als Streptokokkus mutans gezählt wurden (KLIMM, Zahn- Mund u Kieferheilkunde 66, [1978], 771–775, KLIMM, Diss. Prom. B Leipzig [1981]). Die auf dem Sulfisomidin Medium gewachsenen Kolonien wurden stichprobenartig hinsichtlich ihrer Str. mutans Identität mit dem Str. mutans Referenzstamm NCTC 10449 kolonimorphologisch und mittels Gramfärbung verglichen bzw. bestätigt.

D Verwendete Nährboden und Modalitäten der Bebrütung

a) Handelsübliche Thioglykollat Bouillon mit 0,5% Dextrose. Bebrütung des beimpften Medium für 24 Stunden bei 37 °C und Nachregulation des pH auf 7,4 nach 10 und 24 Stunden.

Die erreichte Reinausbeute betrug 2×10^9 CFU/ml

b) Supplementierte H-Milch

Die mit 0,1 % Hefeextrakt (VEB Bramsch, Dresden) angereicherte und auf pH 7,4 eingestellte H-Milch wurde nach Beimpfung 18 Stunden bei 37 °C bebrütet. Zu diesem Zeitpunkt wurde 0,25% Dextrose zugesetzt und unter Korrektur des pH auf 7,4 weitere 12 Stunden bei 37 °C incubiert. Dadurch konnte die Gesamtausbeute von 4×10^8 CFU/ml H-Milch auf 2×10^{10} CFU/ml supplementierte und pH korrigierte H-Milch erhöht werden.

E Herstellung von wirksamen (und unwirksamen) Präparationen zur biologischen Kariesprophylaxe

a) Die wie unter D 1 in Thioglykollat Bouillon angezuchteten Keime wurden zentrifugiert, das Sediment auf $\frac{1}{10}$ des Ausgangsvolumens in physiologischer Kochsalzlösung resuspendiert und anschließend für 30 Minuten bei Kerntemperaturen von 45 °C, 50 °C, 56 °C, 65 °C, 75 °C und 85 °C inaktiviert. Eine weitere Charge wurde für 15 Minuten bei 100 °C abgetötet. Die Inaktivierung mit 0,35% Formalin erfolgte über 24 Stunden bei 4 °C, nachfolgend wurde durch Zentrifugieren das freie Formalin ausgewaschen. Die GTF-Mutante wurde als Lebendantigen eingesetzt.

b) Die wie unter D 2 in supplementierter H-Milch angezuchteten Keime wurden in der Milch für 30 Minuten bei 56 °C inaktiviert.

c) Extraktion und Aufbereitung des aktiven Prinzips nach an sich bekannten Verfahren, wie z. B. in DE 3 427 477 beschrieben.

Beispiel 1

Quantitative Beziehungen zwischen lokal/oral applizierten unterschiedlichen Konzentrationen einer Karies-prophylaktischen Präparation und der realisierten simulierten „Monokolonisierung“ (als Schwellenwert für ein immunologisches switch on), meßbar an der Kariesprävention im kurzfristigen Karies-Rattenmodell.

Zum Nachweis der konzentrationsabhängigen Wirksamkeit des biologischen Prinzips „kompetitive Attachment-Verdrängung“ wurde das 56 °C inaktivierte Str. mutans Antigen – bzw. die H-Milch nach partieller Anreicherung mit in Thioglykollat-Bouillon gezuchteten Antigen – in abgestuften CFU-Keimaquivalenten von 10^8 , $5 \cdot 10^8$, $2 \cdot 10^9$ und $5 \cdot 10^9$ /Gramm Kariesfutter eingesetzt. Die quantitative Abhängigkeit der Kariesreduktion von der Konzentration der aktiven biologischen Präparation ist in Tabelle 1 festgehalten.

Tabelle 1 (siehe Seite 6)

Wie Tabelle 1 zeigt, nimmt mit steigenden oder sinkenden Konzentrationen des aktiven Prinzips die Kariesanfälligkeit progressiv ab bzw. zu. Bei 10^8 CFU-Keimaquivalente/Gramm Kariesfutter sinkt die Wirksamkeit auf die „Maximalwerte der Fluorprophylaxe“ (siehe Tabelle 4), 5×10^9 CFU Keimaquivalente unterbinden im Rattenmodell jeglichen Kariesbefall.

Beispiel 2

Nachweis der realisierten Attachment-Kompetition im Gefolge einer simulierten Monokolonisierung über

- die spezifische Verdrängung der Str. mutans Keime im Plaque im Vergleich zu den sonstigen Mundhohlenstreptokokken sowie
- den veränderten Plaqueindex

Während und nach der Prophylaxe mit 2×10^9 CFU-Keimaquivalenten/Gramm Kariesfutter wurde im Vergleich zu den Kontrollen semiquantitativ die CFU von Str. mutans und der sonstigen Mundhohlen-Streptokokken wie unter C beschrieben bestimmt, sowie der Plaqueindex wie unter B beschrieben ermittelt.

Die summarischen Mittelwerte sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Tabelle 2 (siehe Seite 6)

Tabelle 2 veranschaulicht, daß während einer realisierten „Monokolonisierung“ in Übereinstimmung mit dem Ausmaß der Kariesreduktion

- der Str. mutans unter die Nachweisgrenze sinkt. In der Positivkontrolle und nach Absetzen der wirksamen biologischen Präparation wird dieser Erreger mit einer Häufigkeit von $\sim 10^3$ CFU/ $\sim$ mg Plaquematerial angetroffen, die Werte in der Negativkontrolle bewegen sich um 10^1 CFU.
- Die Spezifität dieser Attachment-Verdrängung ist aus den Versuchs-unabhängigen unveränderten $\geq 10^4$ CFU der sonstigen Mundhohlenstreptokokken ersichtlich.
- der Plaqueindex mit etwa 4,3 sich zwischen dem Negativkontrollwert von $\sim 3,5$ und dem Positivkontrollwert von $\sim 5,0$ bewegt.

Beispiel 3

Indirekter Hinweis auf eine nach 4wöchiger effektiver simulierter Monokolonisierung – mit bei 56 °C inaktivierten Str. mutans 2×10^9 CFU Keimaquivalenten/Gramm Kariesdiät – zusätzlich wirksam werdende kariespreventive, immunologische Komponente.

Zum indirekten Nachweis einer solchen immunologisch wirksam werdenden Komponente wurde die 2., 3. und 4wöchige Antigenapplikation eines 28 Tage Versuches mit einem 8 Wochen „Langzeitversuch“ verglichen, bei dem nach durchgehender Kariesprävention in den ersten 4 Wochen anschließend reine Kariesdiät, bzw. reine Kariesdiät mit je einer Tagesboosterung am Ende der 6. Woche, bzw. zwei Tagesboosterungen verteilt auf je einen Tag am Ende der 5. und 7. Woche verabfolgt wurde.

Die Kariesinzidenz innerhalb dieser unterschiedlichen Versuchsgruppen ist in Tabelle 3 festgehalten.

Tabelle 3 (siehe Seite 7)

Wie Tabelle 3 zeigt, ist eine zwei- und dreiwöchige Prophylaxe auf die Kariesinzidenz am Ende des 28 Tage Versuches de facto ohne Einfluß. Bei vierwöchiger durchgangiger Applikation des kariesprophylaktischen biologischen Präparates bleibt eine deutliche, nur immunologisch erklärbare, Schutzwirkung bestehen und der einmalige Booster nach 14 Tagen am Ende der 6. Woche garantiert im 8 Wochen-Versuch die optimale Kariesprävention.

Beispiel 4

Vergleich der Wirksamkeiten verschiedener Präparationen von 2×10^9 CFU Keimaquivalenten des Str. mutans untereinander sowie mit der Effektivität einer Fluorprophylaxe am kurzfristigen Karies Rattenmodell

Die wie unter D a und D b gezüchteten und entsprechend E a und E b aufbereiteten Präparationen wurden bei Str. mutans Wildstamm als inaktiviertes Antigen bzw. bei der GTF Mutante als lebende Keime in der Konzentration von 2×10^9 CFU Keimaquivalenten/Gramm Kariesfutter zugesetzt

Der Einfluß dieser Präparationen auf die Kariesreduktion im Vergleich zur Positiv- u. Negativkontrolle sowie zur Effektivität der Fluorprophylaxe ist in Tabelle 4 dargestellt

Tabelle 4 (siehe Seite 7)

Wie die Tabelle 4 ausweist, reduzieren 2×10^9 CFU Keimaquivalente der lebenden GTF Mutante bzw. als inaktiviertes 56 °C oder Formalin Antigen die Karies hochsignifikant von Faktor ≥ 10 auf Faktor ~ 1 . Auch gegenüber der optimalen Fluorprophylaxe ist eine signifikante Kariesreduktion zu verzeichnen. Mit steigenden Inaktivierungstemperaturen sinkt die kariesprophylaktische Wirksamkeit, bei ≥ 85 °C inaktivierte Antigene sind de facto wirkungslos

Tabelle 1

Dosisabhängigkeit der simulierten Monokolonisierung bzw. biologischen Kariesprophylaxe am kurzfristigen Karies Rattenmodell, nachweisbar durch Zusatz von – bei 56 °C inaktivierten (in H. Milch und/oder Thioglykollat Bouillon angezüchteten) – abgestuften Str. mutans CFU Keimaquivalent Konzentrationen („Antigen“)/Gramm Kariesdiät (KD)
Versuchsdauer 4 Wochen, Versuchsgruppen jeweils 26 Ratten

Futter	Konzentration des „Antigens“ CFU Äquivalente	Mittelwert des Kariesbefalls max. 20 bei fünf Fissuren	Signifikanz		
			5×10^8 2×10^9	CFU zu 5×10^8	1×10^8
KD	$1 \cdot 10^8$	3,0			
KD	$5 \cdot 10^8$	1,9			
KD	$2 \cdot 10^9$	0,8	$\alpha 0,1$	$\alpha 0,01$	$\alpha 0,01$
KD	$5 \cdot 10^9$	0,0			
KD	Positivkontr.	12,3			
Standardf	Negativkontr.	0,1			

Tabelle 2

Plaquesindizes sowie semiquantitative Bestimmung der CFU von Str. mutans und sonstigen Mundhohlenstreptokokken (Anzucht auf Mitis Salivarius Agar mit und ohne Sulfisomidin)/ $\sim$ mg Plaque material während und nach der prophylaktischen Gabe von – bei 56 °C inaktivierten – Str. mutans 2×10^9 CFU Keimaquivalenten („Antigen“)/Gramm Kariesdiät (KD) am kurzfristigen Karies Rattenmodell

Futter	Karies befall siehe Tab. 4	CFU Str. mutans während „Antigen“	nach Gabe	sonstige Str. mit und ohne „Antigen“	Plaques indices
KD plus „Antigen“	1,0	$< 10^0$	$\sim 10^3$	$\geq 10^4$	$\sim 4,3$
KD Positiv- kontr.	12,0		$\sim 10^3$	$\geq 10^4$	$\sim 5,0$
Standardf Negativ- kontr.	0,1		$\sim 10^1$	$\geq 10^4$	$\sim 3,5$

Tabelle 3

Indirekter Nachweis einer nach 4wöchiger Anwendung von – bei 56 °C inaktivierten – Str.mutans 2×10^9 CFU Keimäquivalenten („Antigen“)/Gramm Kariesdiät (KD) wirksam werdenden kariespreventiven immunologischen Komponente am Karies-Rattenmodell

Versuchsdauer 4 bis 8 Wochen; Versuchsgruppen jeweils 26 Ratten

Dauer des Versuches	Futter	„Antigen-Applikation: Permanente Gabe → über X Wochen bzw. Booster ↓ über einen Tag am Ende der X. Woche								Mittelwert des Kariesbefalls: max. 20 bei fünf Fissuren
		1	2	3	4	5	6	7	8	
vier Wochen	KD	→								7,0
	KD	→	→							6,8
	KD	→	→	→						1,0
	KD	Positivkontrolle								11,8
	Standardf.	Negativkontrolle								0,1
acht Wochen	KD	→	→	→	→					2,0
	KD	→	→	→	→	↓				1,0
	KD	→	→	→	→	↓	↓			1,2
	KD	→	→	→	→	→	→	→	→	1,2
	KD	Positivkontrolle								12,0
	Standardf.	Negativkontrolle								0,1

Tabelle 4

Einfluß unterschiedlicher Inaktivierungstemperaturen sowie der Formalinabtötung auf die (Attachment-Kompetition bedingte) kariesprophylaktische Aktivität von 2×10^9 CFU Str. mutans Keimäquivalenten/Gramm Kariesdiät im Vergleich zur lebenden GTF-Mutante als „Antigen“ sowie zur Effektivität einer Fluorprophylaxe am kurzfristigen Karies-Rattenmodell

Futter	biologisches Präparat 2×10^9 CFU	Mittelwert des Kariesbefalls: max. 20 bei fünf Fissuren	Signifikanz zur	
			Positiv-kontr.	Fluorpro-phylaxe
KD	Wildst. 56 °C	0,8	α 0,01	α 0,01
KD	Wildst. 65 °C	3,6		
KD	Wildst. 75 °C	3,8		
KD	Wildst. 85 °C	7,8		
KD	Wildst. 100 °C	8,0		
KD	Wildst. Formalin	1,0	α 0,01	α 0,01
KD	GTF-Mutanten	0,7	α 0,01	α 0,01
KD	Positivkontr.	12,0		
Stand-dardf.	Negativkontr.	0,2		
KD	Silica Fluor	5,0		
KD	Elmex Gel	3,1		