

(19) HU

MAGYAR
NÉPKÖZTÁRSASÁG



ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL

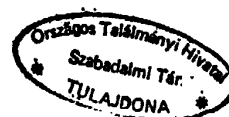
SZABADALMI LEÍRÁS

(11) (13)
190 893 B

Nemzetközi
osztályjelzet:
(51) Int. Cl.₄:
A 61 K 39/09

(21) 1289/83. (22) A bejelentés napja: 79. 08. 30.
A bejelentés elsőbbsége:
(33) GB
(32) 78.09.01.
(31) 35383/78

(41) (42) Közzététel napja: 84.05.28.
(45) A leírás megjelent: 89. 01. 31.



Feltaláló(k): (72)

Colman Geoffrey orvos, Sevenoaks, Roussel Roy Robert Baird orvos,
Bromley, Kent, GB

Szabadalmaz: (73)

The Secretary of State for Social Services,
London, GB

(54) ELJÁRÁS FOGSZUVASODÁST GÁTLO, FEHÉRJE JELLEGŰ ANTIGÉNPREPARÁTUMOK ELŐÁLLÍTÁSÁRA

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás emlősök fogszuvasodását gátló antigén preparátumok előállítására Streptococcus mutans specieshez tartozó baktériumok tenyésztésével sejtenyészet előállítására szolgáló tenyészközegben, a tenyészetből legalább a sejtfalak eltávolításával és a kapott fehérjeoldatból az antigén preparátum elkülönítésével.

A találmány szerinti eljárást oly módon végzik, hogy az antigén-preparátumot a fehérjeoldatból – kívánt esetben tisztítás céljából ammónium-szulfátos kicsapás után – affinitás kromatográfián nyerik ki

immobilizált antitesten, ahol az immobilizált antitest egy vagy több antigénre specifikus és ezek az antigének (I) 29 000-es molekulásúlyúak és izoelektromos pontjuk 4,1–4,5, és I genetikai típusú Streptococcus mutans – kivéve a Streptococcus NC IB 11516 mikroorganizmust – sejtfalain maradnak 10 g/l nátrium-dodecil-szulfát vízzel készített forrásban lévő oldatával 20 percig tartó extrahálás után vagy (II) olyan fehérjék, amelyek szerológiaiilag reagálnak a fenti (I) csoportba tartozó antigén fehérjék antitestjeivel.

A találmány tárgya eljárás a fogszuvasodást gátló, fehérje jellegű antigén preparátumok előállítására, és a preparátumokat vagy antitestjeiket tartalmazó készítmények előállítására.

Általánosan ismert, hogy a fogszuvasodást a fogak felületén élő baktériumok által termelt sav okozza; a baktériumok elsősorban a *Streptococcus mutans* fajba tartoznak. Ennek a felismerésnek a következményeképp számos kísérletet tettek a fogszuvasodás megelőzésére vagy legalább csökkentésére a *Streptococcus mutans* teljes sejtjeinek vagy sejtalkotóinak felhasználásával történő immunizálással. Ilyen kísérleteket írnak le például a következő cikkekben: Bowen és munkatársai *British Dental Journal*, 139, 45–48 (1975) és Cohen és munkatársai *British Dental Journal*, 147, 9–14 (1979). A kísérletek során a majmok fogszuvasodását sikerült csökkenteni teljes sejtekkel vagy centrifugálással felbontott sejtekből nyert, sejtfalban gazdag anyaggal végrehajtott immunizálással. (A glukoziltranszferáz enzimpreparátumokkal való immunizálás nem nyújtott védelmet.) Bár kimutatták, hogy az ilyen immunizálás immunválasz – a *Streptococcus mutans* baktériumok antitestjeinek termelődése – kiváltása révén hat, nem tudjuk biztosan, hogy a keletkezett antitestek hogyan jutnak el a szájban levő baktériumtelephez. A szájban, a nyálkahártya alatt és a lábszáron, bőr alatt alkalmazott immunizálás egyaránt védelmet nyújtott. Egy lehetséges, bár valószínűleg drágább eljárás az antitest preparátumok helyi alkalmazása például a *Streptococcus mutans* antigének antitestjeit tartalmazó tej formájában (1 505 513. számú nagy-britanniai szabadalmi leírás).

Bár úgy látszik, hogy a teljes *Streptococcus mutans* sejtekkel vagy azokból készített sejtfal-preparátumokkal végrehajtott immunizálás védelmet nyújt a fogszuvasodás ellen, a módszer alkalmazása – különösen élő, teljes sejtek felhasználása esetén – bizonyos kockázattal jár. A *Streptococcus*okról ismert, hogy szerepük van egyes betegségek, például a reumatikus szívfájdalmak keletkezésében, és a teljes sejtekkel, de még a sejtalkotókkal végrehajtott immunizálás is a nemkívánatos mellékhatások növekedését okozhatja. Ezért a legnagyobb biztonság és a legnagyobb hatékonyság érdekében egyaránt az a legkedvezőbb, ha a fogszuvasodás elleni vakcina csak a védelem biztosításához szükséges specifikus antigént vagy antigéneket tartalmazza.

Azonosítottunk két antigén fehérjét (a továbbiakban antigén A-nak és antigén B-nek nevezzük őket), melyek jelen vannak a fent említett sejtfal-preparátumokban és melyeknek valószínűleg szerepük van a fogszuvasodás gátlásában.

Az antigén B-ről már korábban kimutatták, hogy olyan antitestek képződését serkenti, melyek reagálnak az emberi szív szövétével (Hughes: *Pathogenic Streptococci*, 222–223, kiadta M. T. Parker, Reedbooks, Chertsey, Anglia, 1979). Az a veszély, hogy antigén B tartalmú vakcinák alkalmazása a szívre káros autoimmun-választ váltana ki, lehetetlenné teszi az antigén B alkalmazását jelenleg ismert formájában vakcinák hatóanyagaként.

A találmány szerinti módon előállított antigén készítmény a *Streptococcus mutans* antigénfehérjei közül csak – az alábbiakban definiálandó – antigén

A-t tartalmazza. A találmány szerinti eljárással továbbá olyan gyógyszerkészítmények is előállíthatók, melyek egy ilyen antigén készítményt vagy annak antitestjeit tartalmazzák gyógyászatiilag elfogadható segédanyagokkal kombinálva. A „gyógyszerkészítmény” kifejezés alatt a megelőzésre alkalmas, profilaktikus szereket, például vakcinákat, és a fertőzést követően, a fertőzés hatásának csökkentésére beadott szereket értjük.

Az antigén A molekulásúlya 29000 ± 3000 és izoelektromos pontja 4,1–4,5. A *Streptococcus mutans* „c” szerotípusának (Bratthall: *Odont Revy*, 20, 231–243 [1969] szerint), melybe például az NCTC törzs is tartozik, sejtfalából nyerhető oly módon, hogy a sejteket nátrium-dodecil-szulfát (NDS) 10 g/l koncentrációjú vizes oldatával extraháljuk szobahőmérsékleten 1 óra hosszat vagy forralás közben 20 percig. Az antigén A a sejtfalban visszamarad. Lényegében azonos fehérjéket találtak más, az I genetikai csoportba tartozó *Streptococcus mutans* törzsek sejtjeiben is (Coykendall: *J. Gen. Mikrobiol.*, 83, 327–338); idetartoznak az „e” és „f” szerotípusok, például a Russell által leírt törzsek is (*Microbiol. Letters*, 2, 55–59, 1976). Hasonló antigén fehérjéket találtak más genetikai csoportba tartozó, például „b” szerotípusú törzsekben is. Jelen találmány ilyen antigén fehérjékre vonatkozik, és ezeket foglalja magában a leírásban és az igénypontokban alkalmazott „antigén A” kifejezés. Így a találmány szerinti megoldás nincs bizonyos speciális törzsekre korlátozva.

Az antigén A-t nem könnyű elválasztani az NDS-sel extrahált sejtfalakból, de nyulak immunizálása az extrahált sejtfal-preparátummal két fehérje, az antigén A és az antigén B antiszérumának keletkezését eredményezi; ezáltal ezek kimutathatók és elválaszthatók a teljes sejtből extrahálással készített anyagból vagy a sejtmentesített szűrletből. Az antigén így egyszerűen előállítható tenyészetek szűrletéből vagy magukból a tenyészetekből előzetes sejtbontás után.

A találmány szerint az antigén A-t úgy állítjuk elő, hogy *Streptococcus mutans* baktériumokat megfelelő tápközegen tenyésztünk, a kapott tenyészetből legalább a baktériumok sejtfalát eltávolítjuk, és a kapott fehérjeoldatból elválasztjuk az antigén A-t.

Tápközegként bármely, a *Streptococcus mutans* tenyésztésére alkalmas tápközeget használhatunk, például Todd-Hewitt tápközeget (Todd, E. W., Hewitt, L. F.: *J. Path. and Bacteriol.*, 35, 973–974 [1932]), vagy tripton/élesztő extraktot vagy kémiaiilag előállított, ismert összetételű táptalajt. Ez utóbbi alkalmazása megkönnyíti a termék tisztítását. A tenyésztés folyamán az antigén A folyamatosan keletkezik és a táptalajba jut. A sejteket előnyösen a korai stacionárius fázisban dolgozzuk fel (15–25 óra, 37 °C-on). A sejteket folyamatosan is tenésztethetjük.

A fehérjeoldat tartalmazhatja egyszerűen a tenyészet szűrletét, melyet a teljes sejtek eltávolításával nyerünk vagy tartalmazhat a sejtfalaktól és sejttöredékektől megtisztított sejtextraktumot, vagy lehet ezek keveréke, melyet úgy állítunk elő, hogy a tenyészet sejtjeit megbontjuk, majd eltávolítjuk a sejtfalakat és sejttöredékeket. A sejtfalakat eltávolíthatjuk a sejtek egészben való eltávolításával, vagy töredéként a sejt felbontása után, ismert módszerekkel, például centrifugálással vagy szűréssel.

Az antigén A-t ismert módszerekkel, előnyösen ammónium-szulfátos lecsapással, majd azt követő kromatografálással nyerhetjük ki a fehérjeoldatból. Az ammónium-szulfátos lecsapást végrehajthatjuk egy lépésben, az oldatot célszerűen 65%-ra telítve, de ennél előnyösebb két lépésben való végrehajtása, az első fázisban 45%-ra, a másodikban pedig 65%-ra telítve az oldatot. Az első lépésben kapott csapadék kis mennyiségű antigén A-t tartalmaz, a második lépésben kapott csapadék tartalmazza az antigén A túlnyomó részét, emellett kisebb mennyiségben más fehérjéket is, például antigén B-t is tartalmaz. Az antigén A-t kromatográfias módszerrel nyerhetjük ki a második lépésben nyert csapadékból vagy mindkét lépés csapadékából, a gazdaságosságtól függően.

A kromatográfias elválasztást bármely alkalmas anyagon végrehajthatjuk; alkalmazhatunk például térhálóított dextrán vagy agaróz gélt vagy dextránnal szubsztituált triazin-festéket agaróz gélen immobilizált formában. Különösen előnyös a dietilamino-ettel térhálóított dextrán alkalmazása. A fehérjét a szokásos módon, a pH vagy az ionerősség fokozatos változtatásával eluálhatjuk; előnyös az ionerősség nátriumkloriddal való változtatása, mely esetben az antigén A-t 0,1–0,2 molaritású nátrium-kloriddal eluáljuk. Ezen kívül alkalmazhatunk affinitás-kromatográfiát vagy immunadszorbens-kromatográfiát is az antigén A kinyerésére; kromatografálhatjuk az ammónium-szulfátos lecsapással nyert csapadékot vagy a nyers sejtextraktumot és/vagy a felülúszót.

A legelőnyösebb módszer az antigén A elválasztására a fehérjeoldatból az immobilizált anti-antigén A antitestek alkalmazásával végrehajtott affinitás-kromatográfia. Az antitestek lehetnek valamely megfelelő állatban, például nyúlban termelődött immunoglobulin G (IgG) antitestek, melyeket szokásos módszerrel, például térhálóított agaróz gyöngyökön immobilizálunk, majd brómcíánnal aktivizálunk.

A tisztított antigén A preparátumot a gyógyászatban szokásos hordozó- és segédanyagokkal vakcinává alakíthatjuk; ilyen segédanyagok például az adjuvánsok (például az alumínium-hidroxid), a stabilizáló anyagok és a bakteriosztatikumok. A vakcina a Streptococcus mutáns egy vagy több törzséből származó fehérjét tartalmaz és embereknek, valamint emlős állatoknak beadható szubkután, intramuszkulárisan, intravénásan vagy nyálkahártya alatt, általában 1–50, legelőnyösebben 10 Mg testsúlykilogramm dózisban. Több injekció beadására is szükség lehet a megfelelő antitest-válasz kiváltásához. Védettséget lehet elérni az orálisan, például az antigént tartalmazó kapszulák lenyelésével végrehajtott immunizálással is.

A találmány szerinti, az emlősök fogszuvasodásának megelőzésére vagy gátlására szolgáló készítmény másik formája az antigén A antitestjeit tartalmazza a gyógyászatban szokásos valamilyen formában. A készítmény lehet injekció, vagy formulázható helyi alkalmazásra megfelelő formában, például fogpaszta vagy szájvíz alakjában. A készítmény vagy csak az antigén A antitestjeit, vagy más Streptococcus mutáns antigének antitestjeit is tartalmazza. Az antitesteket szokásos módon, Streptococcus mutáns antigén készítményeket – beleértve az antigén A-t is – megfelelő állatokba, például tehenekbe vagy nyulakba

fecskendezve állíthatjuk elő. Az alkalmazható antigén készítmények közé tartozik elsősorban az NDS-sel mosott sejtfal-preparátum és a fent leírt módon előállított tisztított antigén A.

A leírt találmány szerinti készítmények hatása az antigén A antitestjeinek köszönhető, akár jelen vannak azok a beadott készítményben, akár pedig kezelt szervezetben képződnek immunválasz révén. A fogszuvasodást megelőző antitestek hatásmechanizmusa nem teljesen tisztázott, de ez nem gátolja a találmány gyakorlati alkalmazását. Lehetséges, hogy a szóbanforgó antitestek a baktériumsejtek anyagcseréjét befolyásolják, és a glukán vagy a sav képződését gátolják. A hatásmechanizmusukra vonatkozó egyes feltevések azonban semmiképpen nem befolyásolják a találmány oltalmi körét. Az oltalmi kör továbbá nem korlátozódik a leírásban felsorolt és a példákban említett Streptococcus mutans törzsekre.

Az alábbiakban példákkal szemléltetjük a találmány szerinti jellegzetes eljárásokat és készítményeket.

Az 1. ábra az immunizált („a” görbe) és a kontroll („b” görbe) állatok antigén A-val kiváltott IgG válaszait mutatja. A 2. ábra az antigén A által kiváltott IgG válaszokat mutatja egyetlen állat esetében.

1. példa

NDS-sel extrahált sejtfalak antiszérumának előállítása

A jól ismert Ingbritt Streptococcus mutáns törzset használjuk. A törzs leírása megtalálható Krasse, B.: Archs. Oral Biol., 11, 429–436, és Coykendal rendszere szerint az I genetikus csoportba (J. Gen. Microbiol., 83, 327–338, 1974), Bratthall osztályozása szerint pedig a „c” szerotípusba (Odont, Revy, 20, 231–243, 1969) tartozik. A törzs deponálva van az NCIB-nél, Aberdeen-ben, Skóciában, az NCIB 11516 deponálási számon.

A baktériumokat Todd-Hewitt tápközegen tenyésztjük (Todd, E. W., Hewitt, L. F.: J. Path. and Bacteriol., 35, 973–974, (1932), a stacionárius fázis eléréséig (16 óra). Ezután a sejteket centrifugálással kinyerjük és forró vízfürdőn 20 percig szuszpendáljuk nátrium-dodecil-szulfát (NDS) szolubilizáló pufferben (Laemmli: Nature, 227, 680–685, [1970]). Ezután a sejteket centrifugálva vízzel mossuk, fagyaszttva szárítjuk és vízzel 10 mg/ml koncentrációjú szuszpenziót készítünk belőlük. Ezekkel az NDS-sel extrahált sejtekkel nyulat immunizálunk úgy, hogy a szuszpenzió 1 ml-ét 0,1 ml alumínium-hidroxid adjuvánssal keverjük. Ilyen keveréket adunk be a nyulaknak intramuszkulárisan a nulladik, huszonegyedik és negyvennyolcadik napon. Az ötvenötödik napon a nyulat szívpunkcióval elvéreztetjük.

Hasonló eredményt kapunk akkor is, ha a sejteket NDS 10 g/l koncentrációjú vizes oldatával extraháljuk forralva 20 percig vagy szobahőmérsékleten 1 óra hosszat.

2. példa

Az antigén A és antigén B jellemzése

Az 1. példában leírt módon előállított antiszérum hatását immunodiffúziós módszerrel vizsgáljuk az Ingbritt-féle törzs sejtalkotóin (a teljes sejtekből ultrahangos bontással előállított extrakt formájában) és

az Ingbritt-féle törzs tenyésztésének szűrlésében található fehérjéken; a szűrlést előzőleg ammónium-szulfátos kicsapással koncentráljuk. Két csapadék vonalat kapunk, melyek megfelelnek az ultrahanggal kezelt anyag és a felülúszó antigénjeinek. Bármelyik antigén preparátum nem-specifikus proteolitikus enzimmel való kezelése (Pronase, Sigma Chemical Co. gyártmány) azt eredményezi, hogy az antiszérum hozzáadás után csapadék nem képződik. Ez utóbbi kísérlet bizonyítja az antigének fehérjetermészetét.

Az antiszérum hatását az ultrahanggal bontott sejtre és a tenyésztet szűrlésére térhálósított anyagon végrehajtott immunoelektroforézissel vizsgálva – mely módszer érzékenyebb, mint az immundiffúziós – szintén csak két, az antigén/antitest kicsapási reakciónak megfelelő vonalat kapunk. Ugyanezt a két antigént mutathatjuk ki, ha más „c” szerotípusú törzset extrahálunk és abból állítunk elő a fent leírt módon antiszérumot. Ilyen törzs például az NCTC 10449-es számon az Országos Törzsgyűjteményben letétbe helyezett törzs (Colindale, Anglia).

A két antigén fizikai tulajdonságairól térhálósított anyagon végrehajtott immunoelektroforézissel kaphatunk képet; az első térirányban az elválasztást poliakrilamid gélen, izoelektromos tulajdonságok szerint (így a fehérjéket töltéskülönbségeik alapján választjuk szét), vagy NDS-poliakrilamid gélelektroforézissel (így a fehérjéket molekulásúlyuk alapján szeparáljuk) hajtjuk végre. Azt az eredményt kapjuk, hogy az antigén A izoelektromos pontja 4,3 és molekulásúlya $29\,000 \pm 3\,000$, míg az antigén B izoelektromos pontja 5,4 és molekulásúlya közel $200\,000$. A pontosabb NDS-poliakrilamid gradiens gélelektroforézissel az antigén A molekulásúlyára $29\,000$ -et, az antigén B-jére pedig $190\,000$ -et kapunk. A molekulásúly meghatározásához standardként használt fehérjék a következők voltak: nyúl miozin, $M = 200\,000$; β -galaktozidáz, $M = 116\,000$; foszforiláz A, szarvasmarha szérum albumin, $M = 68\,000$; ovalbumin, $M = 43\,000$; kimotripsinogén A, $M = 25\,700$. Az antigén B molekulásúlyára kapott érték még nem tekinthető véglegesnek, mert a különböző futtatásos módszerekkel ki lehetett mutatni, hogy ez az anyag szénhidrártól és glikoproteinekkel is tartalmaz, melyekről ismeretes, hogy gélelektroforézis során rendellenesen vándorolnak.

Az Ingbritt-féle törzs NDS-sel extrahált sejtjei hatására termelődött antiszérumot felhasználtuk annak bizonyítására is, hogy az antigén A-nak és B-nek megfelelő antigéneket termel 6 másik, a „c” szerotípusba tartozó törzs (ezek közé tartozik az FW293, a C67-1, a GS-5 és az OMZ-70, melyek leírása megtalálható: Russell RRB, Microbios Letters, 2, 55–59, [1976]), valamint egyes, az „e” (P4 törzs) és az „f” (151 törzs) szerotípusba tartozó törzsek is. Ez utóbbi két szerotípus ugyanabba a genetikai csoportba tartozik, mint a „c” szerotípus (a Coykendall szerinti osztályozás I genetikai csoportja, melyre a Streptococcus mutans Clarke nevet javasolták, [Coykendall. Int. J. Syst. Bacteriol., 27, 26–30m [1977]], és kimutatták, hogy antigén szempontból igen hasonlóak (Bratthall és munkatársai: J. Dent. Res., 55A, 60–64, [1976] és Perch és munkatársai: Acta Path. Microbiol. Scand. Sec., B82, 357–370, [1974]) és hasonló fehérje összetételük van (Russell: Microbios Letters,

2, 55–59, [1976]). A „b” szerotípusba tartozó törzsek egy olyan antigént tartalmaznak, mely reakcióba lép az antigén A-val, míg az antigén B-vel reakcióba lépő antigének találhatók az „a”, „d” és „g” szerotípusba tartozó törzsekben és a Streptococcus sanguis törzsekben

3. példa

Tisztított antigén A előállítás

Az antigén A-nak és B-nek tenyészetek szűrléséből való kimutatását követő kísérletek azt bizonyították, hogy mindkét antigén a sejtnövekedés során termelődik, akár Todd-Hewitt tápközeget, akár tripton/élesztő extraktot, akár pedig ismert kémiai összetételű (IKÖ) tápközeget használtunk, melyet Janda és Kuramitsu szerint állítottunk elő (Infect. Immun., 14, 191–202, [1976]). Mivel az IKÖ tápközeget kevesebb, a tisztítást megnehezítő anyagot tartalmaz, a kísérletek céljára ezt választottuk ki. Ingbritt-féle Streptococcus mutans törzset IKÖ tápközegen tenyészünk a korai stacionárius fázis eléréséig, majd a sejteket eltávolítjuk centrifugálással és üvegszűrőn való szűréssel. Ha elő akarjuk állítani a tiszta antigén B-t, a szűrlést oldhatatlan mutan glükózpólimerrel és poliakrilamid gél gyöngyökkel (BioGel P2) töltött kromatográfiás oszlopon engedjük át a glükózilranszferáz enzimek eltávolítása céljából, melyek hajlamosak a tisztítás során is együtt maradni az antigén B-vel. Az oszlopot McCabe és Smith szerint készíthetjük el (Infect. Immun., 16, 760–765, [1977]). Az oldathoz lassan szilárd ammónium-szulfátot adunk a 45%-os telítettség eléréséig, majd egy éjszakán át 4°C -on állni hagyjuk és a képződött csapadékot centrifugálással elkülönítjük. Az előzetes kísérletek azt mutatták, hogy az antigén B legjobban a 45%-ra telített ammónium-szulfát oldatban csapódik ki, míg az antigén A kicsapódásához legelőnyösebb a 65%-ra telített ammónium-szulfát oldat. Az oldathoz ezért további ammónium-szulfátot adunk a 65%-os telítettség eléréséig, és újra összegyűjtjük a csapadékot. Mindkét frakciót $7,5\text{ pH}$ -jú 50 mM trisz-sósav pufferrel szemben dializáljuk a következő lépés, a DEAE térhálósított dextránon való kromatografálás előtt (DEAE Sephadex A 25). Végig a tisztítás során ugyanezt a puffert használjuk. A mintákat előzetesen trisz pufferrel ekvilibrált külön oszlopokra visszük fel. Az eluálást úgy hajtjuk végre, hogy az oszlopon keresztül engedünk egy térfogatnyi trisz puffert, majd fokozatosan 0 -tól $0,3\text{ M}$ -os trisz pufferes nátrium-klorid oldatot. A frakciókat összegyűjtjük és NDS-poliakrilamid lemez gélelektroforézissel és kombinált immunoelektroforézissel analizáljuk NDS-sel extrahált sejtekkel előállított antiszérummal szemben.

A 45%-ig telített ammónium-szulfátos oldatból származó antigén B körülbelül $0,8\text{ M}$ nátrium-kloriddal eluálódik, míg az antigén A körülbelül $0,13\text{ M}$ nátrium-kloriddal eluálódik. Mindkét esetben 90%-ra becsültük az antigén fehérjék tisztaságát. Az antigént tartalmazó frakciókat összegyűjtjük, trisz pufferrel szemben dializáljuk és ultraszűréssel töményítjük. A részlegesen tisztított antigéneket ezután agaróz gél oszlopra visszük (Sephacrose CL-6B) és trisz pufferrel eluáljuk. A frakciókat összegyűjtjük és elemezzük az antigének és a fehérjeösszetétel szempontjából.

A fenti eljárással olyan antigén A és B fehérje preparátumot kapunk, melyek NDS-poliakrilamid gélelektroforézissel és poliakrilamid gélen végrehajtott izoelektromos elválasztással tisztának bizonyultak.

Ha ezeket a preparátumokat adjuvánsokkal együtt nyulakba fecskendezzük, az NDS-sel extrahált sejtekkel fentebb leírt immunizálási módszert követve, monospecifikus antiszérum termelődik, melynek hatását gélen való lecsapásos módszerrel nyers antigén készítményeken vizsgálva csak a homológ antigén csapódik ki.

Az antigén A-val és B-vel szemben termelődött monospecifikus antiszérumokat felhasználhatjuk az antigének immunoszorbciós affinitás-kromatográfiás tisztítására. Egy tipikus eljárás szerint a szérum immunoglobulin G frakcióját térhálósított agaróz gyöngyökhöz kapcsoljuk (brómiánnal aktivált Sepharose, Pharmacia) a gyártó által javasolt módon. Az oszlopon az Ingbritt-féle Streptococcus mutáns törzs tenyészetének töményített szűrletét engedjük át, 0,05 M-os 7,5 pH-jú trisz sósav pufferben, mely 1% Triton X-100-at tartalmaz. Ezután az oszlopot néhány térfogat trisz pufferrel mossuk, majd 3M nátrium-tiocianátot tartalmazó trisz pufferrel vagy 2,8 pH-jú 0,1 M glicint tartalmazó sósav pufferrel eluáljuk (más eluálószer is megfelelő lehetnek.) Így a kívánt antigének tiszta készítményeit kapjuk. Ha az oszlopról az IgG egy része is eluálódna, ez könnyen elválasztható az antigénektől a már leírt ioncserélő kromatográfiás módszerrel.

Az affinitás-kromatográfiás módszerrel tisztított antigént 48 óráig 105 °C hőmérsékleten 6N sósavban hidrolizáltuk és meghatároztuk aminosav-összetételét. Az eredményeket az 1. táblázatban tüntettük fel.

1. táblázat

Fehérjehidrolizátumok aminosav összetétele

	Az egyes aminosavgyökök száma(%)	
	antigén A	antigén B
Aszparaginsav	101	103
Treonin	56	60
Szerin	91	61
Glutaminsav	106	111
Prolin	65	44
Glicin	190	212
Alanin	89	117
Cisztin	-	-
Valin	53	58
Metionin	-	-
Izoleucin	38	38
Leucin	61	53
Fenilalanin	28	25
Tirozin	-	-
Hisztidin	50	18
Lizin	46	64
Arginin	27	26
Aminocukor	-	4

4. példa

Az antigén és védőhatás vizsgálata

Az antigén A és B kijutnak a baktériumok felszínére és immunogénként hatnak. Az olyan kísérletek, melyeket néhány tucat nyúl és majom immunizálásával hajtottak végre, megmutatták, hogy az antigén A és B által kiváltott antitest válaszok sokkal erő-

sebbek, mint a más antigének által kiváltottak. Az a hatás még erősebb akkor, ha az állatokat sejtfalban gazdag készítménnyel immunizálják. Mint fentebb leírtuk, az NDS-sel extrahált sejtfalak hatására csak az antigén A és B antitestjei képződnek, míg a kevésbé szelektív extrakciónak alávetett sejtfalak hatására szintén az antigén A és B antitestjeinek képződése a legintenzívebb, de két másik jelenlevő antigén is kivált – gyengébb – immunválaszt.

Az antitestek a szokásos módszerekkel, például térhálósított anyagon végrehajtott immuno-elektroforézissel vagy „reversed-rocket line” elektroforézissel mutathatók ki.

Az antitest válasz erőssége meghatározható enzim immunoszorbens vizsgálattal (ELISA). Voller, Bidwell és Bartlett mikrolemezes módszere szerint (Flowline Publications, 1977). Műanyagból készült Microtiter tálcákat az immunoaffinitásos módszerrel tisztított antigén A-t és B-t körülbelül 1 µg/ml koncentrációban tartalmazó anyaggal vontuk be.

Az antigéneken megkötődött majom antitest mennyiségét úgy határoztuk meg, hogy alkáli-foszfátázhoz kapcsolt emberi anti-IgG-vel (Don Whitley Ltd.) inkubáltuk. Az eredményeket vagy úgy fejeztük ki, mint egy titrálás végpontjának értékét (azaz egy hígítási sorozatnak az a tagja, mely egy bizonyos szint mutat), vagy pedig egy bizonyos hígítású szérum minta 405 nm-nél mutatott abszorbanciájának megméréseivel.

5. példa

A teljes sejtek immunogenitása

Fentebb már említettünk leírásokat, melyek majmok sikeres immunizálásáról számolnak be Streptococcus mutáns teljes sejteivel (Bowen és munkatársai: Brit. Dent. J., (1975), és Cohen és munkatársai: Brit. Dent. J. [1979]). A fogszuvasodás csökkenésének mértéke 50%-os vagy még jobb volt.

Az egyik kísérlet során 4 kísérleti és 2 kontroll állatot kezeltek megölt teljes sejtekkel (Cohen és munkatársai: Brit. Dent. J., 147, 9–14 [1979] 14-es állatcsoport). Az injekciókat a nulladik, második, ötödik, hatodik, tizenkettedik és tizenharmadik hónapban adták. Az átlagos antitest (IgG) szint a kísérleti és a kontroll csoportban az 1. ábrán látható. Tizenkét hónap után az antigén A-val szemben termelt antitest szintje legalább harmincszorosa volt a kontrollénak, bár ezt a szintet két injekció közti időben mértük. Hangsúlyozni kell, hogy valószínűtlen, hogy ilyen sok injekció kell a védetség eléréséhez, de ebben az irányban még nem folytak kutatások.

Négy évvel a kísérlet megkezdése után a kontrollcsoport állatainak átlagban 5 maradandó foguk volt szuvas, míg az immunizált állatoknak általában kettő.

Az eredményekből látható, hogy nyilvánvaló összefüggés van az antigén A antitestjeinek szintje és a fogszuvasodás elleni védelem között. Nem immunizált egyedekben az antigén A antitestjei csak ritkán és kis mennyiségben vannak jelen. Ilyen „természetes antitestje” az antigén B-nek is van és azt néhány esetben kimutatták. Nem ismeretes, hogy ezek az antitestek mikor keletkeznek, hogy a fogakon levő Streptococcus mutáns antigénje hatására jönnek-e létre, szisztémikus Streptococcus mutáns fertőzés

eredményezi-e vagy más baktériumok antigénjeivel való keresztreaktivitás révén képződnek-e, mely baktériumokkal szemben az állatnak van immunválasza.

Egy másik kísérletben egy nyolc majomból álló csoportot immunizáltak a lábszárbá adott, teljes sejteket és alumínium-hidroxid adjuvánst tartalmazó szubkután injekcióval (Cohen és munkatársai: Brit. Dent. J., az ezen példában már hivatkozott cikk szerinti 11. csoport), a kontrollcsoport is 8 állatból állt. Ebben az állatcsoportban az antigén A antitestjeinek szintje az összes kontrollállatban emelkedett, az átlagos titer 1/520 volt. (Megjegyezzük, hogy az eljárás változtatása miatt a különböző csoportoknál kapott titerek nem hasonlíthatók össze.) A teljes baktériumsejtekkel immunizált állatoknál az átlagos titer hat hónappal az injekció után 1/2830 volt – kontrolléknak csaknem ötszöröse. Az immunizált állatokban az antigén B antitestjei is jelen voltak. A kontrollhoz képest az immunizált állatoknál a fogszuvasodás 55%-os csökkenését észlelték.

6. példa

Az elválasztott sejtfalak immunogenitása

A korábban leírt immunizálás az Ingbritt-törzs külválasztott sejtfalaival (Bowen és munkatársai: Brit. Dent. J., 45–48, [1975]) védettséget biztosított ennek a törzsnek az újabb fertőzése ellen. A tripszinnel kezelt sejtfalakkal végrehajtott immunizálás nem eredményezett védettséget, ami azt bizonyítja, hogy a védekezés kiváltásában fehérjetermészetű anyag játszik szerepet. Szérumot vettek 4, az Ingbritt-féle törzs sejtfalpreparátumával immunizált, majd ugyanezzel a törzssel fertőzött C csoportba tartozó majomtól (Bowen és munkatársai). Öt kontroll állatot hasonlóan kezeltek immunizálás nélkül.

A kontroll állatok antigén A antitest titerje 3 állat esetében 1/20-nál kisebb volt, egy állatnál 1/80-ad és egy állatnál 1/1280-ad volt, míg az immunizált és védett állatok esetében a titer 1/80-ad és 1/640-ed között volt; átlagértéke 1/220-ad. Ezeket az értékeket az utolsó injekció beadása után 20 hónappal vett szérum mintákból állapítottuk meg. A szintek természetesen közvetlenül az injekció után magasabbak is lehetnek.

Öt évvel a kísérlet megkezdése után a négy kísérleti állatnál összesen négy fogszuvasodás esetet tapasztaltak. Az öt kontroll állatnál összesen hatvannégy fogszuvasodás esetet tapasztaltak, és a fogszuvasodások száma fordított arányban állt a szérumban levő antitest mennyiségével, a legnagyobb fokú szuvasodás annál a két állatnál következett be, melyek egyáltalán nem mutattak antitest választ.

Kilenc évvel a kísérlet megkezdése után öt állat volt életben, miután kettő-kettő az immunizált és a kontrollcsoportból elpusztult. A három élő kontroll állat mindegyikénél erősen fokozódott a fogszuvasodás, 56, 69, 93 megtámadott fogfelületük volt. Az egyik immunizált állatnál egyetlen fog romlott el kismértékben, míg a másiknál fogszuvasodás egyáltalán nem következett be.

7. példa

A tiszta antigén A immunogenitása

A fenti eredményekből látható, hogy a teljes sejttel vagy baktérium sejtfallal a szervezetbe juttatott antigén A és B alkalmas immunválasz kiváltására adjuváns nélkül (C csoport) vagy alumínium-hidroxid adjuváns egyidejű hozzáadásával (11. kísérlet). A tiszta antigénnel való immunizáláskor azonban gyors és tartós hatás kiváltásához szükséges adjuváns jelenléte is. Egyetlen majom immunválaszai (testsúlya körülbelül 5 kg), melyet 50 Mg antigén A-val immunizáltunk (az antigént a fenti leírt ammónium-szulfátos kicsapással készítettük), alumínium-hidroxid hozzáadása mellett, a 2. ábrán láthatók.

Szabadalmi igénypontok

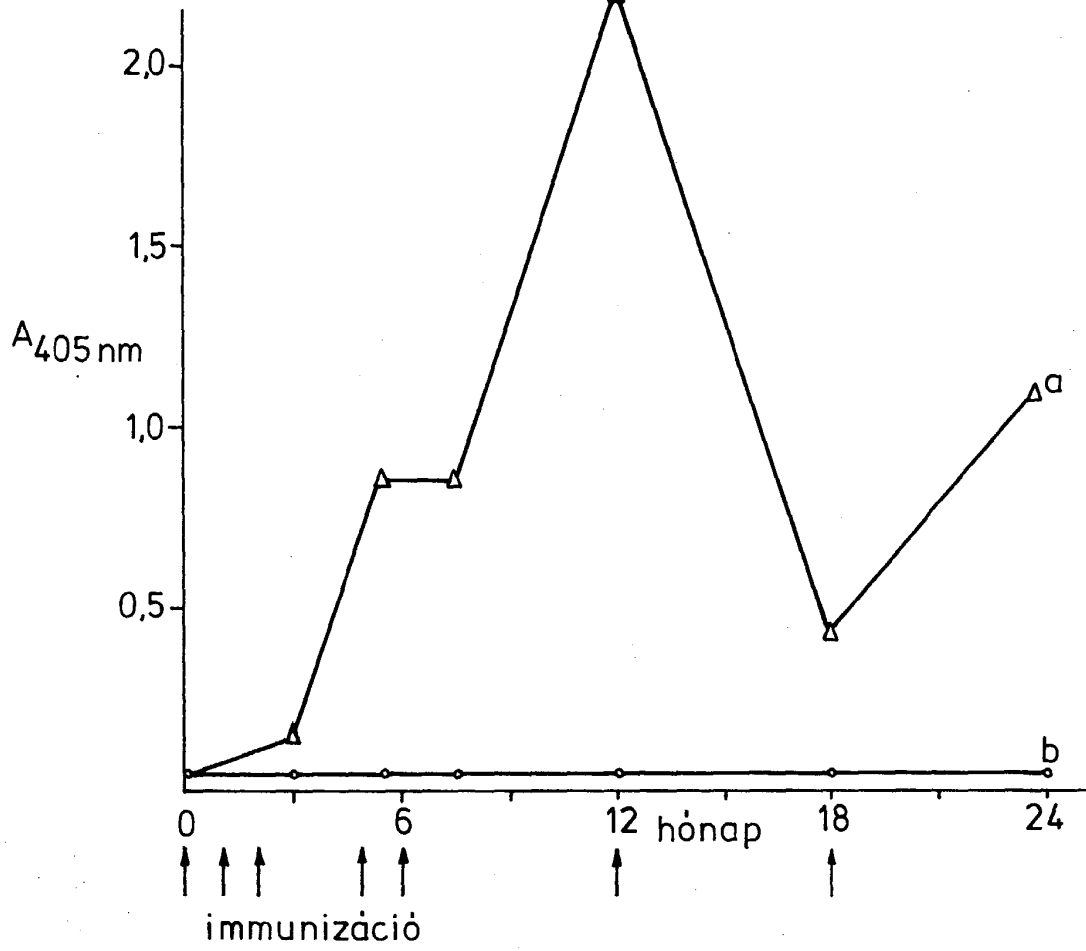
1. Eljárás emlősök fogszuvasodását gátló antigén preparátumok előállítására Streptococcus mutans specieshez tartozó baktériumok tenyésztésével sejtenyészet előállítására szolgáló tenyészkezegekben, a tenyészetből legalább a sejtfalak eltávolításával és a kapott fehérjeoldatból az antigén preparátum elkülönítésével, *azzal jellemezve*, hogy az antigén-preparátumot a fehérjeoldatból – kívánt esetben tisztítás céljából ammónium-szulfátos kicsapás után – affinitás kromatográfiával nyerjük ki immobilizált antitesten, ahol az immobilizált antitest egy vagy több antigénre specifikus és ezek az antigének (I) 29 000-es molekulasúlyúak és izoelektromos pontjuk 4,1–4,5, és I genetikai típusú Streptococcus mutans – kivéve a Streptococcus NC IB 11516 mikroorganizmust – sejtfalain maradnak 10 g/l nátrium-dodecil-szulfát vízzel készített forrásban lévő oldatával 20 percig tartó extrahálás után vagy (II) olyan fehérjék, amelyek szero-lógiailag reagálnak a fenti (I) csoportba tartozó antigén fehérjék antitestjeivel.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a fehérjeoldatot az affinitáskromatográfiás kezelés előtt 45–65%-ig telítjük ammónium-szulfáttal, a kicsapódott szilárd részt elválasztjuk és újra feloldjuk, és az így kapott második fehérjeoldatot kezeljük affinitáskromatográfiával az immobilizált antitestekkel.

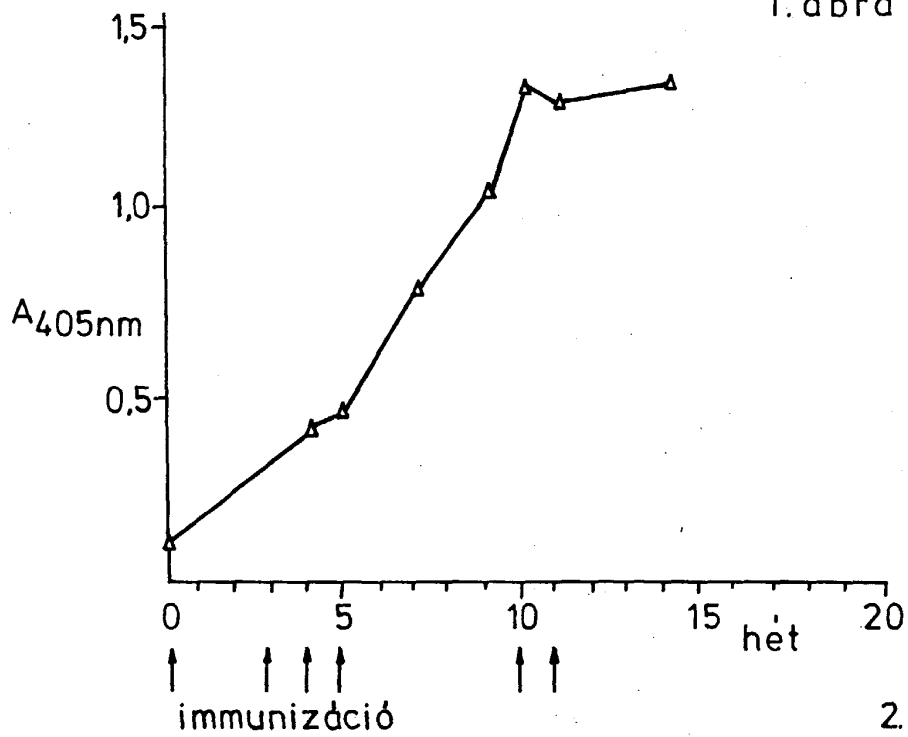
3. Az 1. igénypont szerinti eljárás foganatosítási módja, *azzal jellemezve*, hogy a fehérjeoldatot az affinitáskromatográfiás kezelés előtt körülbelül 45%-ig telítjük ammónium-szulfáttal, a kicsapódott szilárd részt elválasztjuk, a visszamaradt fehérjeoldatból további ammónium-szulfát adagolással újabb szilárd anyagot csapunk le, amelyet elválasztunk és újra feloldunk, és az így kapott második fehérjeoldatot kezeljük affinitáskromatográfián az immobilizált antitestekkel.

4. Eljárás fogszuvasodást gátló készítmény, (első sorban vakcina, fogpaszta, vagy szájvíz) előállítására, *azzal jellemezve*, hogy az 1–2. igénypontok bármelyike szerinti eljárással előállított antigén preparátumot az egészségre ártalmatlan hordozó- és/vagy segédanyagokkal keverjük össze, és a keveréket készítménnyé szereljük ki.

1 db rajz



1. ábra



2. ábra