



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(21) Numer zgłoszenia: **409330**

(22) Data zgłoszenia: **31.08.2014**

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/445 (2006.01)

C12N 7/02 (2006.01)

A61K 35/76 (2015.01)

(54) **Szczepki Staphylococcus aureus do produkcji monoklonalnych preparatów fagowych
pozbawionych zanieczyszczeń plazmidowym DNA**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

14.03.2016 BUP 06/16

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

25.01.2021 WUP 02/21

(73) Uprawniony z patentu:

**INSTYTUT BIOCHEMII I BIOFIZYKI
POLSKIEJ AKADEMII NAUK, Warszawa, PL
INSTYTUT IMMUNOLOGII
I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
POLSKIEJ AKADEMII NAUK, Wrocław, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**MSAŁGORZATA ŁOBOCKA, Warszawa, PL
MONIKA HEJNOWICZ, Warszawa, PL
KAMIL DĄBROWSKI, Sulejów, PL
DARIUSZ IZAK, Pruszków, PL
AGNIESZKA GOZDEK, Warszawa, PL
ALEKSANDRA GŁOWACKA, Warszawa, PL
JAN GAWOR, Warszawa, PL
JAROSŁAW KOSAKOWSKI, Warszawa, PL
ROBERT GROMADKA, Warszawa, PL
BEATA WEBER-DĄBROWSKA, Wrocław, PL
ANDRZEJ GÓRSKI, Warszawa, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Rafał Witek

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest szczep *Staphylococcus aureus* do otrzymywania monoklonalnych preparatów bakteriofagów litycznych o wysokim mianie, pozbawionych zanieczyszczeń niepożądanymi bakteriofagami oraz plazmidowym DNA. Będący efektem wynalazku szczep gwarantuje produkcję bezpiecznych w stosowaniu preparatów bakteriofagowych nie będących źródłem rozsiewu genów związanych z wirulencją bakterii.

W obliczu kryzysu skuteczności antybiotykoterapii zakażeń bakteryjnych obserwuje się w ostatnich latach powrót do badań nad fagoterapią jako alternatywną metodą leczenia zakażeń (Górski i in., 2009; Golka i in., 2014). Czynnikiem leczniczym w fagoterapii są bakteriofagi – wirusy selektywnie infekujące bakterie i nieszkodliwe dla organizmów eukariotycznych. Bakteriofagi jako bezwzględne pasożyty bakterii możliwe są do pozyskania jedynie przez namnażanie w komórkach bakteryjnych. Wydoścanie się z zainfekowanych komórek namnożonych w nich bakteriofagów skorelowane jest z lizą komórek i wylaniem do środowiska ich treści. Otrzymane w ten sposób lizaty zawierają bakteriofagi zawieszone w mieszaninie zawartości komórek oraz pożywki, w której hodowano bakterie. Bezpieczeństwo terapii fagowej wymaga by były one wolne zarówno od czynników szkodliwych dla organizmów leczonych bakteriofagami jak i od czynników mogących zwiększać patogenność bakterii. Dotychczasowe metody produkcji preparatów fagów terapeutycznych, w tym m. in. fagów przeciwko *Staphylococcus aureus*, nie zapewniają w pełni takiego bezpieczeństwa, z uwagi na brak odpowiednich szczepów bakterii do namnażania fagów.

Bakteriofagi efektywne w zwalczaniu infekcji powodowanych przez bakteryjne patogeny typowo nie namnażają się w komórkach niepatogennych bakterii. Co więcej preparaty o wysokim mianie efektywne litycznie w stosunku do określonego patogena najczęściej można pozyskać tylko przez namnażanie danego faga w bakteriach tego samego gatunku reprezentujących szczepy o cechach genetycznych podobnych do zwalczanego patogena (D'Herelle, 1938; Balogh i in., 2010). Zawierają więc one zanieczyszczenia pochodzące z komórek bakterii patogennych. Bakterie te kodują liczne czynniki wirulencji takie jak np. toksyny bakteryjne. Co więcej geny kodujące te czynniki są zwykle częścią obecnych w ich komórkach ruchomych elementów genetycznych zdolnych do przemieszczania się różnymi sposobami z jednych komórek bakterii do innych.

Najtrudniejsze do usunięcia z preparatów fagowych są zanieczyszczenia bakteriofagami innymi niż namnażane. Bakteriofagi te należą do tzw. bakteriofagów łagodnych, będących szczególnym typem ruchomych elementów genetycznych (Guttman i in., 2005). W odróżnieniu od bakteriofagów obligatoryjnie litycznych zalecanych do zastosowań terapeutycznych i namnażających się jedynie drogą rozwoju litycznego, bakteriofagi łagodne mogą namnażać się drogą rozwoju litycznego lub pozostawać w komórce w postaci tzw. profaga – cząsteczki DNA najczęściej wbudowanej w chromosom bakteryjny. W tej formie mogą pozostawać latami, replikując jako integralna część chromosomu. W obronie przed ich utratą przez bakterie nabyły w procesach ewolucji geny pozwalające na lepsze przystosowanie zawierających je bakterii do zajmowanych środowisk. Dlatego większość bakteriofagów łagodnych bakteryjnych patogenów koduje czynniki wirulencji, takie jak m. in. toksyny bakteryjne, adhezyny czy czynniki chroniące bakterie przed odpowiedzią immunologiczną gospodarza (Cheetham i in., 1995). Spontaniczne wycinanie profagów z chromosomów w niektórych komórkach populacji w procesie tzw. indukcji prowadzi do zapoczątkowania ich rozwoju litycznego. Namnożone w rozwoju litycznym fagi łagodne infekując kolejne komórki bakterii mogą integrować jako profagi do ich DNA, stając się w ten sposób przenośnikami genów związanych z wirulencją bakterii. Szereg szczególnie trudnych do zwalczania epidemicznych szczepów bakterii powstało dzięki nabyciu przez nie nowych profagów (Canchaya i in., 2003). Z tego powodu konieczne jest wykorzystywanie w terapii fagowej tylko monoklonalnych preparatów fagowych, które zawierają wyłącznie wiriony faga terapeutycznego i nie są zanieczyszczone innymi fagami (Łobocka i in., 2014). Jednocześnie koktajle składające się z kilku rodzajów fagów powinny być otrzymywane tylko drogą mieszania monoklonalnych preparatów.

Innym rodzajem ruchomych elementów genetycznych mogących zanieczyszczać preparaty fagowe są plazmidy – pozachromosomalne cząsteczki DNA zdolne do autonomicznej replikacji. Plazmidy bakterii patogennych, podobnie jak fagi łagodne, nabyły w ewolucji geny związane z wirulencją ich bakteryjnych gospodarzy. Ponadto, podczas namnażania bakteriofagów w komórkach bakteryjnych, plazmidy mogą wbudowywać się do DNA fagowego i jako część tego DNA być pakowane do wirionów (Masters, 1996). Zastępując w ten sposób fragmenty fagowego DNA powodują powstawanie fagów

defektywnych, niezdolnych do namnażania. Fagi te wprowadzają jednak do infekowanych komórek zawierające plazmid DNA i w ten sposób mogą rozsiewać geny wirulencji bakterii. Dlatego bakterie do namnażania fagów terapeutycznych nie powinny zawierać plazmidów.

Celem wynalazku jest dostarczenie szczepów *Staphylococcus aureus* do produkcji preparatów bakteriofagów terapeutycznych o wysokim mianie pozbawionych zanieczyszczeń fagami łagodnymi oraz plazmidowym DNA. Nieoczekiwanie tak określony cel został osiągnięty dzięki rozwiązaniu zaproponowanemu w niniejszym wynalazku.

Przedmiotem wynalazku jest szczep *Staphylococcus aureus* pozbawiony profagów oraz plazmidów, który jest szczepem *Staphylococcus aureus* 80wphwpl zdeponowanym w PCM jako B/00072.

Przedmiotem wynalazku jest także szczep *Staphylococcus aureus*, który posiada chromosom bakteryjny zawierający DNA o sekwencji wybranej spośród Sekw. Nr. 1.

Przedmiotem wynalazku jest także sposób otrzymywania preparatu bakteriofagowego, zwłaszcza terapeutycznego charakteryzujący się tym, że szczep bakteriofaga specyficznego wobec *Staphylococcus aureus* namnaża się w hodowli szczepu *Staphylococcus aureus* pozbawionego profagów oraz plazmidów według wynalazku określonego powyżej, a następnie izoluje się namnożone fagi z uzyskanego lizatu, przy czym otrzymywane preparaty bakteriofagowe są pozbawione zanieczyszczeń fagami łagodnymi oraz plazmidowym DNA.

Efektem wynalazku jest otrzymanie szczepu 80wphwpl *S. aureus* o sekwencji genomowego DNA określonej jako SEQ ID NO.1 charakteryzującego się brakiem sekwencji odpowiadających sekwencjom genomowym aktywnych profagów.

Dodatkowym efektem wynalazku jest brak w komórkach szczepu 80wphwpl plazmidów.

Korzystnym efektem wynalazku jest zachowanie przez szczep 80wphwpl tych właściwości szczepu rodzicielskiego, które pozwalają na efektywne namnażanie w jego komórkach bakteriofagów *Staphylococcus aureus*, w tym w szczególności bakteriofagów P4W, Staph 1N, A5W lub Fi200W należących do gatunku Twtort-like.

Dodatkowym korzystnym efektem wynalazku jest możliwość otrzymywania w wyniku namnażania w komórkach szczepu 80wphwpl, bakteriofagów P4W, Staph1N, A5W lub Fi200W, lizatów zawierających w/w bakteriofagi o mianie przynajmniej 10^9 pfu/ml.

Dotychczasowym standardem uznawanym za wystarczający dla wykluczenia obecności niepożądanych bakteriofagów w preparatach bakteriofagów terapeutycznych były obserwacje w mikroskopie elektronowym (Merabishvili i in., 2009). Można tą drogą przejrzeć około kilkudziesięciu do kilkuset wirionów w polu widzenia weryfikując ich jednorodność morfologiczną. Na obecność plazmidów w komórkach do namnażania fagów terapeutycznych nie zwracano uwagi, mimo doniesień literaturowych o licznych przypadkach przenoszenia plazmidów pomiędzy komórkami przez bakteriofagi (podsumowane w Łobocka i in., 2014).

Autorzy obecnego wynalazku niespodziewanie stwierdzili, że wszystkie badane przez nich preparaty bakteriofagów obligatoryjnie litycznych typu Twtort-like *Staphylococcus aureus* namnażanych w komórkach izolatów *S. aureus* pozwalających na otrzymanie lizatów tych bakteriofagów o wysokim mianie są zanieczyszczone niepożądanymi bakteriofagami, i że źródłem tych bakteriofagów są profagi wintegrowane w chromosomy szczepów wykorzystywanych do namnażania fagów (Fig. 1). Mimo, że wyniki ostatnich badań wskazywały na obecność profagów w genomach niemal wszystkich klinicznych lub środowiskowych izolatów *S. aureus*, badania pozwalające na oszacowanie częstości spontanicznej indukcji różnych profagów *S. aureus* i na ocenę ryzyka zanieczyszczenia hodowli *S. aureus* fagami powstającymi w wyniku indukcji profagów nie były prowadzone (Kahankova i in., 2013). Co więcej nie opisano pozbawionych profagów szczepów *S. aureus* do namnażania bakteriofagów typu Twtort-like – najcenniejszych z punktu widzenia terapeutycznego.

Z zamiarem pozbawienia profagów dwóch szczepów *Staphylococcus aureus* do wydajnego namnażania fagów terapeutycznych, autorzy określili sekwencję ich genomowego DNA. W ten sposób zidentyfikowali miejsca integracji profagów w genomach tych szczepów oraz geny, których ciągłość została przerwana przez integrację profagów. Dzięki powiązaniu fenotypu z utratą funkcji tych genów autorzy po zaindukowaniu wycięcia profagów z genomów badanych szczepów zidentyfikowali kolonie komórek, które utraciły profagi (Fig. 2). Utratę profagów potwierdzili poprzez analizę sekwencji DNA genomowego wyleczonych szczepów (wyspecyfikowanych na potrzeby prezentowanego wynalazku jako SEQ ID NO. 1 i SEQ ID NO. 2). Dodatkowo analizując sekwencję totalnego DNA badanych szczepów, autorzy niespodziewanie stwierdzili, że komórki tych szczepów zawierają plazmidy mogące kodować m. in. oporność na sole kadmu. Szukając komórek badanych szczepów, które nabyły wrażliwość na

kadm w warunkach mogących stymulować utratę plazmidu, wyizolowali bezplazmidowe pochodne obu szczepów i potwierdzili brak plazmidów w ich komórkach poprzez analizę totalnego DNA wyizolowanego z tych komórek.

W opisanych w literaturze przykładach wynika, że zawarte w komórkach bakteryjnych pofagi, mogą kodować funkcje niezbędne dla rozwoju określonych fagów obligatoryjnie litycznych, uniemożliwiając namnażanie tych bakteriofagów w wyleczonych z profagów szczepach (Nirmal Kumar i in., 2012). Dlatego niespodzianką było wykazanie, że będące efektem prezentowanego wynalazku szczepy 80wphwpl i 6409wphwpl *Staphylococcus aureus*, mimo pozbawienia ich profagów i plazmidów, nadal mogą służyć jako bakteryjni gospodarze do namnażania bakteriofagów litycznych. Co więcej, miano bakteriofagów w lizatach otrzymanych po infekcji tych szczepów fagami terapeutycznymi nie odbiega od miana w lizatach otrzymanych po infekcji fagami szczepów rodzicielskich.

Jest więc oczywiste, że otrzymane szczepy 80wphwpl i 6409wphwpl *S. aureus* są szczepami z wyboru do namnażania bakteriofagów stosowanych w celach profilaktycznych, terapeutycznych lub dezynfekcyjnych w zwalczaniu *S. aureus*, poprzez gwarancję, że preparaty fagowe otrzymane przez namnażanie bakteriofagów obligatoryjnie litycznych w komórkach tych szczepów są wolne od zanieczyszczeń niepożądanym materiałem biologicznym stwarzającym zagrożenie rozsiewania genów związanych z wirulencją bakterii. Wyklucza to możliwość pogorszenia stanu pacjentów lub zwierząt leczonych takimi preparatami w wyniku nieplanowanego nabycia przez infekujące szczepy *S. aureus* dodatkowych genów związanych z wirulencją, czego nie można wykluczyć w przypadku dotychczas stosowanych preparatów.

Sposób wykonania wynalazku zilustrowano następującymi figurami:

Figura 1. przedstawia wykrycie zanieczyszczeń preparatów bakteriofagów obligatoryjnie litycznych bakteriofagami powstałymi na skutek spontanicznej indukcji profagów w szczepach bakterii wykorzystywanych do namnażania fagów. (A) Górny żel przedstawia produkty amplifikacji otrzymane w reakcjach multiplex PCR z wykorzystaniem jako matrycy DNA wyizolowanego z wirionów zawartych w preparatach fagów obligatoryjnie litycznych (Fagi) lub DNA chromosomalnego szczepów *S. aureus* użytych do namnażania fagów (*S. aureus*), oraz starterami specyficznymi dla DNA bakteriofagów łagodnych następujących serogrup: A (oczekiwana długość produktu PCR – 744 p.z.), B (oczekiwana długość produktu PCR – 405 p.z.), Fa (oczekiwana długość produktu PCR – 548 p.z.), Fb (oczekiwana długość produktu PCR – 147 p.z., p.z.). Dolny żel przedstawia produkty amplifikacji z w/w matrycami i starterami specyficznymi dla bakteriofagów łagodnych serogrupy L (oczekiwana długość produktu 648 p.z.) i dla namnażanych bakteriofagów litycznych serogrupy D (oczekiwana długość produktu 331 p. z.). Sekwencje starterów wykorzystanych do detekcji bakteriofagów poszczególnych serogrup, oraz warunki reakcji multiplex PCR odpowiadały opisanym poprzednio (Pantucek i in., 2004). Fragmenty DNA otrzymane w reakcjach PCR rozdzielano elektroforetycznie w 1% żelu agarozowym. Ścieżka oznaczona jako M zawiera rozdzielone fragmenty markera wielkości DNA (GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder, Fermentas), o wielkości odpowiednio (w parach zasad): 75, 200, 300, 400, 500, 700, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000, 7000, 10000 i 20000. W ścieżkach oznaczonych jako K(-) rozdzielano mieszaniny kontrolne nie zawierające matrycowego DNA. (B) Produkty amplifikacji otrzymane z wykorzystaniem jako matrycy DNA wyizolowanego z wirionów zawartych w preparatach fagów obligatoryjnie litycznych (Fagi) lub DNA chromosomalnego szczepu *S. aureus* 6409 (użytych w części A) oraz starterami specyficznymi dla chromosomalnego genu koagulazy *S. aureus*.

Figura 2 przedstawia selekcję pochodnych szczepu 6409, które uzyskały zdolność do hemolizy po traktowaniu mitomycyną C. Komórki traktowane mitomycyną C wysiewano na podłoże Columbia agar z krwią baranią. Strefy hemolizy widać jako przejaśnienia wokół kolonii.

Figura 3 przedstawia negatywny wynik reakcji PCR z wykorzystaniem jako matrycy DNA wybranych pochodnych szczepów 80 i 6409, które po traktowaniu mitomycyną C odzyskały zdolność do hemolizy erytrocytów krwi baraniej (ścieżki oznaczone jako MitC) oraz ze starterami specyficznymi dla profagów serogrupy Fa, obecnych w genomach szczepów rodzicielskich (ścieżki oznaczone jako wt). Zastosowane warunki rozdziału amplikonów, startery specyficzne dla profagów serogrupy Fa oraz rodzaj markera wielkości DNA, są takie same jak podano w opisie Fig. 1.

Figura 4 przedstawia wyniki potwierdzające brak plazmidu w pochodnej szczepu 80wph oznaczonej jako 80wphwpl. (A) Rozdziału w żelu agarozowym metodą PFGE DNA szczepu 80wph oraz jego pozbawionej plazmidu pochodnej 80wphwpl. Strzałkami oznaczono nietrawione i trawione nukleazą S1 DNA plazmidowe obecne w komórkach szczepu 80wphwpl. Zastosowane warunki trawienia preparatów

DNA nukleazą S1 oraz rozdziału metodą PFGE były analogiczne do opisanych poprzednio (Barton i in., 1995).

W ścieżkach żelu oznaczonych jako S1- i S1+ rozdzielano DNA nietrawione i trawione nukleazą S1, w ścieżkach oznaczonych jako K+ i M rozdzielano odpowiednio oczyszczone DNA plazmidu kontrolnego wyizolowanego z innego szczepu oraz fragmenty wzorca wielkości DNA (Lambda Ladder PFGE Marker, New England Biolabs). (B) Rozdział produktów amplifikacji otrzymanych z wykorzystaniem jako matrycy totalnego DNA szczepu 80wph lub 80wphwpl oraz starterów: 5'-TTCAGTAATAAA-CATTTGTGCGA i 5'-CATGTTTTTACGGCGCATAT, specyficznych dla plazmidów obecnych w komórkach szczepu 80wph oraz 6409wph. Ścieżki oznaczone jako – nie zawierały DNA matrycy. W ścieżkach oznaczonych jako L rozdzielano fragmenty wzorca wielkości DNA (GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder, Fermentas). Amplifikację prowadzono stosując gradient temperatur hybrydyzacji startera z matrycą w zakresie 49–59°C.

Dla lepszego zrozumienia istoty wynalazku został on zilustrowany poniższymi przykładami, które przedstawiają sposób detekcji zanieczyszczeń preparatów fagowych niepożądanymi bakteriofagami łagodnymi, sposób usunięcia profagów i plazmidów ze szczepów do namnażania fagów terapeutycznych oraz wydajne namnażanie bakteriofagów terapeutycznych w pozyskanych szczepach pozbawionych plazmidów i profagów. Poprzez ujawnienie sekwencji DNA genomowego otrzymanych szczepów oraz wykazanie braku w ich komórkach plazmidów dokumentują też, że szczepy te nie mogą być źródłem zanieczyszczeń namnażanych w ich komórkach bakteriofagów litycznych, bakteriofagami łagodnymi i plazmidami. We wszystkich przykładach, o ile nie napisano inaczej, zastosowano standardowe metody biologii molekularnej opisane przez Sambrook i in. (1989).

P r z y k ł a d 1 Obecność zanieczyszczeń niepożądanymi bakteriofagami w preparatach bakteriofagów obligatoryjnie litycznych namnażanych w komórkach *Staphylococcus aureus*.

Sprawdzono, czy preparaty fagów obligatoryjnie litycznych wykorzystywanych w fagoterapii i namnożonych w komórkach szczepów *Staphylococcus aureus* używanych standardowo do namnażania tych fagów (Łobocka i in., 2012) są zanieczyszczone innymi fagami. Lizaty otrzymane po infekcji komórek szczepów 6409, 80, R19930, Ż11788, i PS80 fagami A3R (szczep R19930), Fi200W lub P4W (szczep 6409), Staph 1N (szczep 80), 676Ż (szczep Ż11788) i A5W (szczep PS80) oczyszczono z bakteryjnego DNA i RNA przez trawienie DNazą i RNazą, a następnie wyizolowano z nich wiriony i ich DNA wg opisanej poprzednio procedury (Łobocka i in., 2004). Równolegle, z komórek niezainfekowanych szczepów używanych do namnażania fagów wyizolowano chromosomalne DNA. Oczyszczone DNA wirionów oraz oczyszczone DNA chromosomalne szczepów do namnażania fagów wykorzystano jako matryce do amplifikacji fragmentów reprezentatywnych dla bakteriofagów łagodnych *S. aureus* reprezentujących różne serotypy (Fig. 1 A), stosując opisane sekwencje starterów (Pantucek i in., 2004). Niespodziewanie okazało się, że wszystkie badane preparaty bakteriofagów obligatoryjnie litycznych są zanieczyszczone DNA reprezentującym genomy fagów łagodnych, których profagi były wintegrowane do chromosomów szczepów do namnażania fagów. Ponieważ preparaty fagowe przed izolacją wirionowego DNA, oczyszczono z wolnego DNA resztek chromosomów bakteryjnych w lizatach, tak, że w reakcjach kontrolnych PCR ze starterami dla chromosomalnego genu koagulazy *S. aureus* nie otrzymywano produktów reakcji PCR (Fig. 1B), jedynym źródłem wykrytego w tych preparatach DNA bakteriofagów łagodnych mogły być wiriony tych bakteriofagów powstałe w wyniku spontanicznej indukcji profagów wintegrowanych w chromosomy szczepów do namnażania fagów litycznych.

P r z y k ł a d 2 Identyfikacja rejonów integracji profagów w szczepach *S. aureus* 80 i 6409.

Do leczenia z profagów wybrano szczepy 80 i 6409. Lizaty fagów obligatoryjnie litycznych namnażanych w komórkach tych szczepów zanieczyszczone były fagami reprezentującymi typ serologiczny Fa (Fig. 1). W celu identyfikacji rejonów integracji profagów w genomach szczepów 80 i 6409 z komórek tych szczepów wyizolowano DNA chromosomalne i przygotowano z niego biblioteki fragmenów, które następnie zostały zsekwencjonowane (z wykorzystaniem Roche 454 Genome Sequencer GS FLX), a ich sekwencje złożone w większe fragmenty. Analiza bioinformatyczna otrzymanych fragmentów pod kątem rejonów homologicznych do rejonów DNA profagów ujawniła obecność profagów reprezentujących grupę serologiczną Fa w genie *hly* zarówno w szczepie 80 jak i 6409. Zidentyfikowane profagi przerywały ciągłość genu *hly*, w który były wintegrowane. Rejony integracji profagów zweryfikowano poprzez analizę fenotypową badanych szczepów. Szczepy 80 i 6409 okazały się niezdolne do hemolizy erytrocytów krwi baraniej w podłożu Columbia agar, co potwierdziło nefunkcjonalność genu *hly* w genomach tych szczepów.

P r z y k ł a d 3. Pozbawienie szczepów *S. aureus* 80 i 6409 aktywnych profagów zawartych w ich chromosomach.

Profagi zawarte w chromosomach szczepów 80 i 6409 indukowano mitomycyną C wg standardowej procedury. Komórki po indukcji wysiewano na podłoże stałe Columbia agar z krwią baranią (Fig. 2). Otrzymane pochodne szczepów 80 i 6409 (oznaczone jako 80wph i 6409wph), z zaznaczoną wokół strefą hemolizy przeczyszczano kilkakrotnie przez posiew redukcyjny na takim samym podłożu. Niespodziewanie tylko kilka zachowało fenotyp świadczący o trwałym odzyskaniu funkcji genu *hly*. Po jednej kolonii każdego szczepu wykorzystywano do izolacji genomowego DNA. Reakcje multiplex PCR z wyizolowanym DNA każdego ze szczepów oraz starterami specyficznymi dla bakteriofagów łagodnych serogrupy Fa wykazały brak produktów amplifikacji fragmentów DNA profagów, które w przypadku szczepów wyjściowych zanieczyszczały przygotowane w ich komórkach preparaty fagów obligatoryjnie litycznych (Fig. 3.). W celu potwierdzenia usunięcia profagów z genomów w/w szczepów ich totalne DNA zsekwencjonowano zgodnie z opisaną wcześniej procedurą dla genomów fagowych (Łobocka i in., 2012). Otrzymane sekwencje genomowe szczepów 80wph i 6409wph (oznaczone na potrzeby tego wynalazku kolejno jako SEQ ID NO 1 i SEQ ID NO 2) przeanalizowano pod kątem obecności w nich fragmentów DNA reprezentujących aktywne profagi. Analiza potwierdziła brak takich rejonów.

P r z y k ł a d 4 Usunięcie plazmidów z komórek szczepów 80wph i 6409 wph.

Analiza totalnego DNA wyizolowanego z komórek szczepów 80wph i 6409wph pozwoliła na wyróżnienie w obu tych szczepach oprócz DNA chromosomalnego dodatkowych homologicznych w stosunku do siebie, kolistych, cząsteczek DNA o wielkości 20 tys. p. z., reprezentujących plazmidy mogące kodować oporność na sole kadmu. Oporność szczepów 80wph i 6409wph na sole kadmu potwierdzono w testach fenotypowych i wykorzystano do selekcji komórek, które utraciły plazmid. Częstość spontanicznej utraty plazmidu zwiększano przez hodowlę komórek w podwyższonej temperaturze. Hodowle nocne szczepów 80wph i 6409wph rozcieńczano czterokrotnie w pożywce LB, inkubowano przez 1,5 godziny z wytrząsaniem w 37°C, po czym hodowlę rozcieńczano ponownie około 100 razy w świeżej pożywce LB i inkubowano przez 5,5 godz. z wytrząsaniem w 43°C. Bakterie z hodowli rozcieńczano 10⁻⁴ i wysiewano na podłoże stałe LB, tak by otrzymać pojedyncze kolonie. Płytki inkubowano przez noc w 37°C. Wyrosłe kolonie przemazywano na podłoże LB z octanem kadmu (67 µg/ml) oraz bez octanu kadmu i inkubowano przez noc w 37°C. Kolonie niezdolne do wzrostu na podłożu z octanem kadmu czyszczono kilkakrotnie przez posiew redukcyjny. Brak plazmidu w otrzymanych izolatach, nazwanych odpowiednio 80wphpl i 6409wphpl weryfikowano po izolacji z nich totalnego DNA, po rozdzieleniu DNA w żelu agarozowym metodą elektroforezy pulsacyjnej (PFGE) lub poprzez weryfikację obecności w otrzymanym DNA sekwencji charakterystycznych dla plazmidów metodą amplifikacji ze starterami specyficznymi dla plazmidowego DNA (Fig. 4).

Uzyskane szczepy *Staphylococcus aureus* pozbawione profagów oraz plazmidów zdeponowane zostały w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM), Wrocław, Polska, działającej zgodnie z traktatem budapesztańskim.

Oznaczenie szczepu <i>Staphylococcus aureus</i>	Polska Kolekcja Mikroorganizmów (PCM) Numer Dostępu Depozytu
80wphwpl	B/00072
6409wphpl	B/00073

P r z y k ł a d 5 Weryfikacja przydatności szczepów 80wphwpl i 6409wphwpl do wydajnego namnażania fagów obligatoryjnie litycznych.

W celu weryfikacji, czy pozbawione profagów i plazmidów szczepy 80wphwpl i 6409wphwpl mogą służyć jako szczepy gospodarzy do namnażania obligatoryjnie litycznych bakteriofagów gronkowcowych, i czy bakteriofagi namnażają się w komórkach tych szczepów z wydajnością wystarczającą do stosowania ich dla celów profilaktyki, terapii i dezynfekcji, komórki otrzymanych szczepów zainfekowano takimi samymi bakteriofagami, które wydajnie namnażały się w komórkach szczepów rodzicielskich, zawierających plazmidy i profagi. W celu przygotowania lizatów hodowlę nocną każdego szczepu rozcieńczano w stosunku 1:100 w 50 ml świeżej pożywki LB i inkubowano w temperaturze 37°C z wytrząsaniem do osiągnięcia gęstości optycznej OD_{600nm} ≈ 0,3. Następnie do hodowli dodawano jonów MgSO₄ i CaCl₂ (do stężenie końcowego 10 mM) oraz lizat zawierający fagi, tak by współczynnik infekcji (M.O.I.) wynosił 0,1. Mieszaniny pozostawiano na 5 minut w temperaturze pokojowej w celu adsorpcji fagów na powierzchni komórek bakterii, a następnie inkubowano w temperaturze 37°C z wytrząsaniem

do momentu zaobserwowania wyraźnych oznak lizy. Lizat wirowano (20 min., 4°C, 9000 g), a uzyskany supernatant filtrowano przez filtry 0,22 PVDF (firmy MILLEX® GS). W celu zmianowania fagów w oczyszczonym lizacie do 0,1 ml nocnej hodowli bakterii prowadzonej na pożywce LB dodawano 0,1 ml 25mM roztworu CaCl₂ i MgSO₄ oraz 0,1 ml rozcieńczonego lizatu fagowego (10⁻², 10⁻⁴, 10⁻⁶, 10⁻⁸). Mieszaninę pozostawiano na 5 minut w temperaturze pokojowej, a następnie dodawano 1 ml pożywki LB oraz 4 ml rozpuszczonego i schłodzonego do 55°C podłoża LCA (LB, 5mM CaCl₂, 0,7% agar) i wylewano na powierzchnię płytek z podłożem LB. Po nocnej inkubacji w temperaturze 37°C zliczano łyśinki na warstwie komórek bakterii i na tej podstawie określano liczbę infekcyjnych cząstek faga w 1 ml lizatu. We wszystkich przypadkach miana otrzymanych fagów w lizatach szczepów pozbawionych plazmidów i profagów były porównywalne z ich mianami w lizatach szczepów rodzicielskich (Tabela 1). Jednocześnie były one zgodne z zakresem mian bakteriofagów gronkowcowych w lizatach stosowanych terapeutycznie (Merabishvili i in., 2009), co jednoznacznie wskazuje na przydatność szczepów otrzymanych w ramach prezentowanego wynalazku do przygotowywania preparatów fagowych dla celów terapeutycznych.

T a b e l a 1
Miana fagów w lizatach zainfekowanych komórek szczepów pozbawionych profagów i plazmidów
oraz szczepów rodzicielskich

Bakteriofag	Szczep do namnażania	Miano faga w lizacie
A5W	80wphwpl	5,5 x 10 ⁹
	80	3,4 x 10 ⁹
Staph1N	80wphwpl	3,0 x 10 ⁹
	80	1,5 x 10 ¹⁰
Fi200W	6409wphwpl	1,8 x 10 ⁹
	6409	1,1-5,0 x 10 ⁹
P4W	6409wphwpl	3,3 X 10 ⁹
	6409	1,5 x 10 ¹⁰

Literatura:

- Balogh, B.; Jones, J. B.; Iriarte, F. B.; Momol, M. T. Phage therapy for plant disease control. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 2010, 11: 48–57.
- Barton BM, Harding GP, Zuccarelli AJ. 1995. A general method for detecting and sizing large plasmids. *Anal. Biochem.* 226: 235–240.
- Canchaya C, Proux C, Fournous G, Bruttin A, Brüssow H. 2003. Prophage genomics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67: 238–276,
- Cheetham BF, Katz ME. 1995. A role for bacteriophages in the evolution and transfer of bacterial virulence determinants. *Mol Microbiol.* 18: 201–208.
- D'Herelle. Preparation of Therapeutic Bacteriophages, Appendix 1 from: *Le Phenomene de la Guérison dans les maladies infectieuses*. 1938. Masson et Cie, 1938, Paris-OCLC 5784382. (translation from *Bacteriophages* 2011; 1,55–65).
- Gill, J.J., and Hyman, P. 2010. Phage choice, isolation, and preparation for phage therapy. *Curr Pharm Biotechnol.* 11: 2–14.
- Golkar Z, Bagasra O, Pace DG. 2014. Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis. *J Infect Dev Ctries.* 2014 Feb 13;8(2):129–36.
- Guttman, B., Raya, P., and Kutter, E. 2005. Basic phage biology. In *Bacteriophages: biology and application*, E.B., Kutter, and A., Sulakvelidze, eds. (Boca Raton (FL): CRC Press), pp. 29–66.

Kahankova, J., Pantucek, R., Goerke, C., Ruzickova, V., Holochova, P., Doskar, J. 2010. Multi-locus PCR typing strategy for differentiation of *Staphylococcus aureus* siphoviruses reflecting their modular genome structure. *Environ. Microbiol.* 12: 2527–2538.

Łobocka, M.B., Rose, D.J., Plunkett, G. 3rd, Rusin, M., Samojedny, A., Lehnher, H., Yarmolinsky, M.B., and Blattner, F.R. 2004. Genome of bacteriophage P1. *J. Bacteriol* 186, 7032–7068.

Łobocka, M., Hejnowicz, M.S., Dąbrowski, K., Gozdek, A., Kosakowski, J., Witkowska, M., Ulatowska, M.I., Weber-Dąbrowska, B., Kwiatek, M., Parasion, S., Gawor, J., Kosowska, H., Głowacka, A. 2012. Genomics of staphylococcal Twort-like phages-potential therapeutics of the post-antibiotic era. *Adv Virus Res.* 83, 143–216.

Łobocka M., Hejnowicz M. S., Gągała U., Weber-Dąbrowska B., Węgrzyn G., Dadlez M. 2014. The first step to bacteriophage therapy – how to choose the correct phage. In.: *Phage Therapy. Current Research and Applications*. Borysowski J., Międzybrodzki R., Górski, A. (ed.). Caister Academic Press, pp. 23–69.

Masters, M. 2004. Transduction: host DNA transfer by bacteriophages. In *The Desk Encyclopedia of Microbiology*, M. Schaechter, eds. (London, UK: Elsevier Academic Press), pp. 1000–1012.

Merabishvili, M., Pirnay, J.P., Verbeken, G., Chanishvili, N., Tediashvili, M., Lashkhi, N., Glonti, T., Krylov, V., Mast, J., Van Parys, L., Lavigne, R., Volckaert, G., Mattheus, W., Verween, G., De Corte, P., Rose, T., Jennes, S., Zizi, M., De Vos, D., and Vanechoutte, M. 2009. Quality controlled small-scale production of a well-defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials. *PLoS One.* 4, e4944.

Nirmal Kumar GP, Sundarajan S, Paul VD, Nandini S, Saravanan RS, Hariharan S, Sriram B, Padmanabhan S. 2012. Use of prophage free host for achieving homogenous population of bacteriophages: new findings. *Virus Res.* 169: 182–187.

Pantucek R, Doskar J, Ruzickova V, Kaspárek P, Oráčová E, Kvardová V, Rosypal S. 2004. Identification of bacteriophage types and their carriage in *Staphylococcus aureus*. *Arch Virol.* 149: 1689–1703.

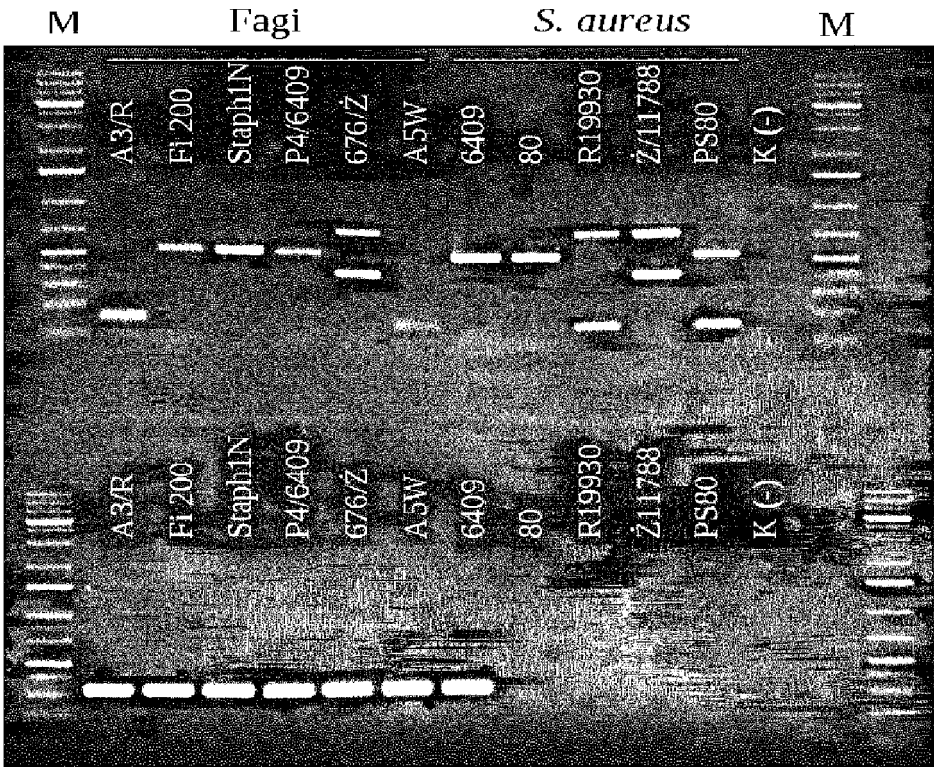
Zastrzeżenia patentowe

1. Szczep *Staphylococcus aureus* pozbawiony profagów oraz plazmidów, przy czym jest on szczepem *Staphylococcus aureus* 80wphwpl zdeponowanym w PCM jako B/00072.
2. Szczep *Staphylococcus aureus* **znamienny tym**, że posiada chromosom bakteryjny zawierający DNA o sekwencji Sekw. Nr. 1.
3. Sposób otrzymywania preparatu bakteriofagowego, zwłaszcza terapeutycznego, **znamienny tym**, że szczep bakteriofaga specyficznego wobec *Staphylococcus aureus* namnaża się w hodowli szczepu *Staphylococcus aureus* pozbawionego profagów oraz plazmidów określonego w zastrz. 1 lub 2, a następnie izoluje się namnożone fagi z uzyskanego lizatu, przy czym otrzymywane preparaty bakteriofagowe są pozbawione zanieczyszczeń fagami łagodnymi oraz plazmidowym DNA.

Rysunki

Fig. 1

A.



B.

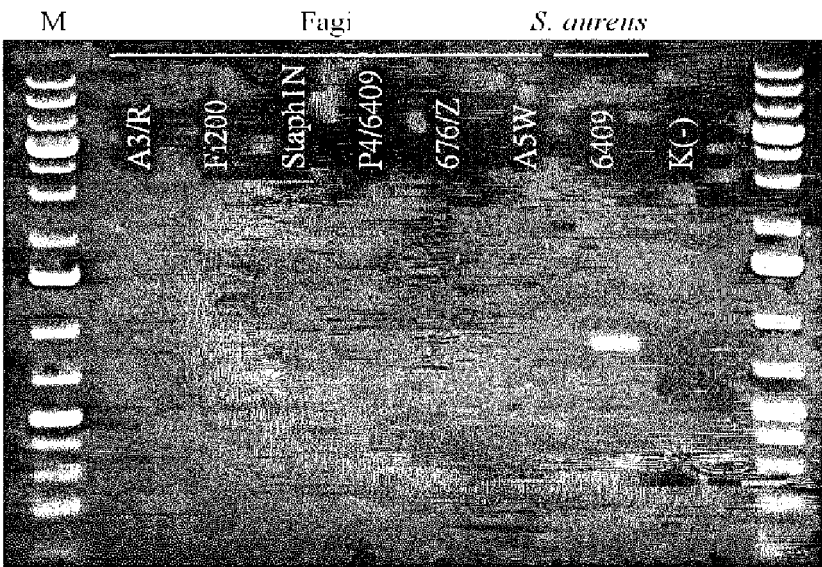


Fig. 2

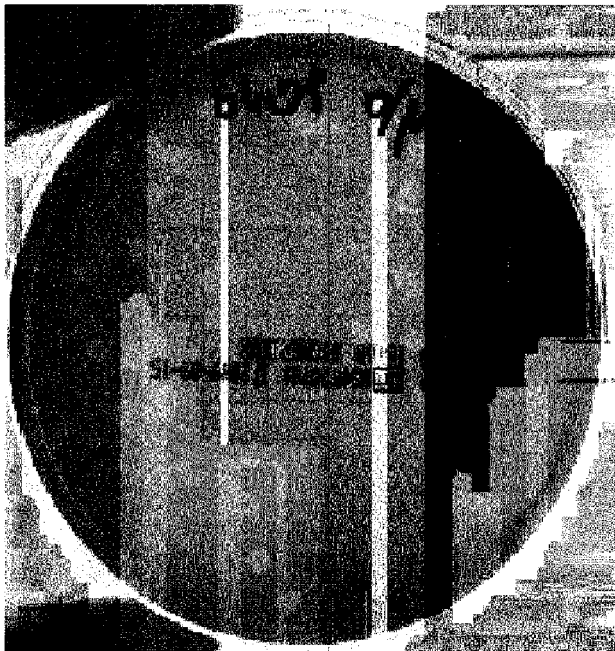


Fig. 3

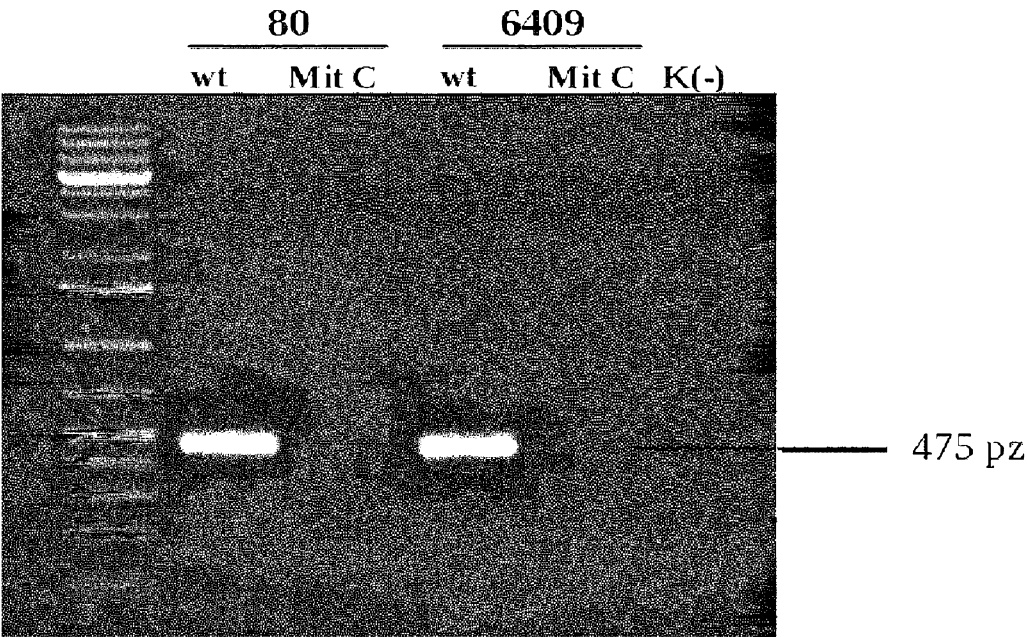
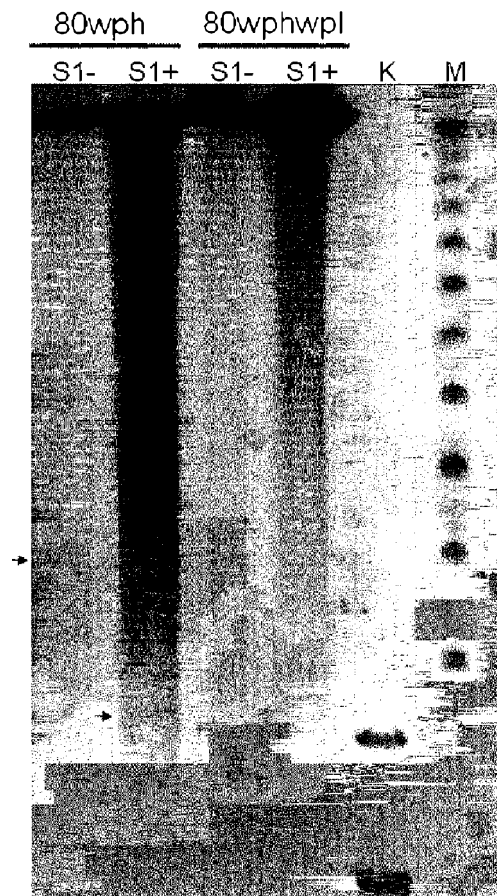


Fig. 4

A.



B.

