

A61K 38/46 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
C12N 9/50 (2006.01)
A61K 35/76 (2015.01)
A61K 9/20 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2023-293**
(22) Přihlášeno: **31.07.2023**
(40) Zveřejněno: **12.02.2025**
(Věstník č. 7/2025)
(47) Uděleno: **24.04.2025**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **04.06.2025**
(Věstník č. 23/2025)

(56) Relevantní dokumenty:

P. Bárdy et al. Genetically modified bacteriophages in applied microbiology. *Journal of Applied Microbiology*, 01.09.2016, 2016, Vol. 121, No. 3, p. 618-633, ISSN 1365-2672; Rachel Yoon Kyung Chang et al. Novel antimicrobial agents for combating antibiotic-resistant bacteria. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 04.06.2022, 2022, Vol. 187, p. 114378, ISSN 0169-409X.
US 72090805 A; US 10676721 B2.

(73) Majitel patentu:

MB Pharma s.r.o., Praha 2, Vinohrady, CZ

(72) Původce:

RNDr. Marek Moša, Ph.D., Mečeříž, CZ

Mgr. Martin Benešik, Ph.D., Strání, CZ

(74) Zástupce:

Rott, Růžička & Guttman s.r.o., Vyskočilova
1566, 140 00 Praha 4, Michle

(54) Název vynálezu:

Směs pro přípravu lyofilizovaných tablet s antimikrobiálním účinkem proti bakteriím *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa* s obsahem bakteriofágů a lytických enzymů s optimální stabilitou a efektivitou aktivních složek

(57) Anotace:

Antimikrobiální směs pro přípravu lyofilizovaných tablet obsahující bakteriofágy a endolysin, o sekvenci SEQ ID NO: 1, významných patogenů *S. aureus* a *P. aeruginosa* jako aktivní složky v terapeuticky aplikovatelné a stabilní dávce, a které lze uplatnit pro léčbu infekcí způsobených výše zmíněnými patogenními kmeny.

Sekvence nukleotidů / aminokyselin dle ST.26:

<https://isdv.upv.gov.cz/doc/st26/PV2023-293.xml>

SHA-1: 25e32c4c332d49b31058380d72182803318a67a8

Směs pro přípravu lyofilizovaných tablet s antimikrobiálním účinkem proti bakteriím *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa* s obsahem bakteriofágů a lytických enzymů s optimální stabilitou a efektivitou aktivních složek

5

Oblast techniky

Vynález se týká směsi pro přípravu lyofilizovaných jednodávkových forem (tablet), jejichž aktivní složkou jsou bakteriální viry (bakteriofágy anebo zkráceně fágy) ať už ve formě fágových lyzátů nebo purifikátů v kombinaci s jejich antimikrobiálně působícími enzymy (endolyziny). Složení této formy balancuje vyváženou kompozici jednotlivých složek, zajišťující vhodné technické parametry pro lékovou/aplikační formu, při zachování maximální stability aktivních látek (fágů a endolyzinů) a zachování jejich dlouhodobé stability. Tato aplikační forma tak lze uplatnit při léčbě bakteriálních infekcí způsobených patogenními kmeny *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa* v klinické praxi. Konkrétně se jedná o dva specificky působící fágy proti bakteriím *S. aureus* a *P. aeruginosa* a endolyzin LysMB10 s unikátní aminokyselinovou sekvencí.

20

Dosavadní stav techniky

Světová zdravotnická organizace (WHO) zařadila rezistenci patogenních bakterií vůči antibiotikům mezi největší hrozby pro lidské zdraví v 21. století, způsobující nejen ztráty na životech, ale i značnou finanční zátěž zdravotnického systému (URL 1). Mezi nejnebezpečnější patogeny rezistentními k antibiotikům spadají bakterie *S. aureus* a *P. aeruginosa*. Zástupci *S. aureus* jsou původci celé řady vážných infekcí např. osteomyelitidy, sepse, taktéž infekcí ran a kůže. Podobně i *P. aeruginosa* zapříčiňuje širokou škálu onemocnění například infekce ran a pneumonie (obzvláště nebezpečné u pacientů s cystickou fibrózou). Oba výše zmíněné patogeny jsou oportunní, tudíž ohrožují především imunokompromitované jedince, často v nemocničním prostředí (Barer 2018). Rezistence těchto patogenů tak komplikuje poskytování zdravotní péče, zejména omezuje možnosti antibiotické léčby infekcí a vede k nutnosti vyhledávat alternativy mezi které spadá i fágová terapie (Abedon *et al.* 2011).

Bakteriofágy (zkráceně fágy) jsou viry bakterií, způsobující bakteriální lyzi. Fágová terapie využívá tuto vlastnost pro léčbu bakteriálních infekcí. Tento terapeutický přístup je zkoumán již od první poloviny 20. století, nicméně po objevu a rozšíření antibiotik byl zejména v západních zemích opomíjen (část výzkumu dodnes pokračuje v zemích bývalého Sovětského svazu např. v Gruzii). Fágy zůstaly předmětem zájmu pouze v rámci biotechnologie a molekulární biologie (Abedon *et al.* 2011). Důvodem této situace byl hlavně objev antibiotik. Fágová terapie má ale řadu výhod jako je např. menší riziko nežádoucích účinků (oproti antibiotikům), zejména v důsledku minimálního vlivu na přirozenou mikroflóru pacienta, dále jsou fágy schopny adaptace vůči obranným mechanismům bakterie (Loc-Carrillo and Abedon 2011). Původní nedostatečná znalost fágové biologie vedla k rozporupným výsledkům terapeutické aplikace. S rozvojem moderních metod molekulární biologie, celogenomového sekvenování, genomiky a proteomiky již dostatečně rozumíme fágové biologii a jejich interakci s hostitelskými bakteriemi. S velkým rozsahem těchto znalostí ohledně bakteriofágů a také kvůli zvyšující se antibiotické rezistenci se zájem o fágovou terapii celosvětově zvyšuje (Abdelrahman 2021). Stejně tak se rozšiřuje zájem o antibakteriální aplikaci samotných fágových enzymů (tzv. endolyziny), které dovedou lyzovat hostitelskou buňku. Tyto enzymy se uplatňují ve fágovém životním cyklu v poslední fázi, kdy štěpí peptidoglykan buněčné stěny a tím zabíjí bakteriální buňku. U gram pozitivních bakterií, jako je *S. aureus*, lze použít i při aplikaci z vnějšku bakteriální buňky (Abdelrahman 2021). U obou těchto biotechnologických postupů léčby bakteriálních infekcí je důležité, aby byla dosažena co nejdelší stabilita jejich antimikrobiálního účinku v čase a zároveň i stejnoměrné dávkování. Obě výše zmíněné vlastnosti jsou významné pro uplatnění fágů a jejich endolyzinů v praxi (Abdelrahman 2021).

Každý bakteriofág se liší spektrem bakterií, které je schopen úspěšně infikovat a posléze lyzovat. Fágy mohou být polyvalentní s širokým spektrem bakterií na které působí, ale na druhou stranu také vysoce specializované na jeden patogenní mikroorganismus. Podobné je to u endolyzinů, ty však většinou působí na více druhů bakterií v rámci rodu, ale lišit se mohou svou aktivitou (Abdelrahman 2021). Právě kombinace různých fágů (koktejl) může vést k rozšíření spektra působení na bakterie. Navíc izolace specifických naturálních mutantů může vést k antimikrobiálnímu působení na jinak rezistentní bakterie. V případě zde uvedených bakteriofágů se jedná o specifické fágy, které byly izolovány jako kmeny fágů účinné na rezistentní bakterie. Rozšiřují tak spektrum antimikrobiální aktivity na bakterie jak rezistentní antibiotikům, tak necitlivé k jiným fágům.

Použití fágů a endolyzinů v tekuté formě je běžné, ale velkou výzvou pro současnou vědu je příprava aplikačních/lékových/skladovacích forem. Dle dostupné literatury byly fágy zpracovány do tekutých, polotuhých i tuhých forem (Jault *et al.*, 2019, Brown *et al.*, 2018, Khanal *et al.*, 2021). Tekuté formy jsou na přípravu finančně i časově nenáročné, nicméně mají větší náchylnost k mikrobiální kontaminaci a vyšší nároky na skladovací prostory, kdy je problém zachovat stabilitu jejich antibakteriálního účinku při vyšších teplotách (Malik *et al.* 2017). Navíc tekuté formy na rozdíl od polotuhých a tuhých lékových forem mají limitaci při určitých formách aplikací. U polotuhých forem je hlavní výhodou snazší aplikace, nicméně se k ní vztahují stejné komplikace jako u forem tekutých. V obou případech lze pro udržení mikrobiologické jakosti využít konzervační látky a antioxidanty, ale ty mohou mít negativní dopad na antimikrobiální efekt a jakost výsledného produktu (Subils *et al.*, 2012). Tuhé formy mají obecně nižší riziko mikrobiální kontaminace, tudíž aplikace konzervantů není nutná. Navíc zajišťují vyšší stabilitu antibakteriálního účinku, přesnější dávkování a menší nároky na podmínky skladování. Hlavními nevýhodami je složitější optimalizace a vyšší finanční náročnost jejich přípravy (Komárek 2006). Ověřené metody pro zpracování fágů do pevné formy jsou sprejové sušení a lyofilizace (Malik *et al.* 2017).

Během sprejového sušení se roztok pevné látky vystaví horkému a suchému plynu v sušící komoře a dojde k tvorbě prachových částic, které jsou ze sušící komory odsáty. Tento postup se uplatňuje především při přípravě inhalovatelných prachů (Hoe *et al.* 2014). V případě fágů byla tato metoda několikrát testována a bylo dosaženo dobré stability fágového titru (Malik *et al.* 2017). Nicméně, jak je zmíněno výše, výsledkem sprejového sušení jsou pouze prachové částice, které mají komplikovanější dávkování a skladování a vyžadují další zpracování např. lisování, což může mít negativní dopad na efektivitu fágů (Khanal *et al.*, 2021) způsobenou hlavně teplotními výkyvy.

Ke zpracování bakteriofágů do pevné formy se standardně využívá lyofilizace (mrazové sušení). Tento proces zahrnuje zmrazení vzorku, následuje primární sušení, kdy dochází k sublimaci ledu, a nakonec se během sekundárního sušení při vyšších teplotách odpařuje zbytek vody (Malik *et al.* 2017). Fágy v lyofilizátu jsou schopny udržet efektivitu v rámci několika měsíců, dokonce i let (Clark 1962). Nicméně tato stabilita je ovlivněna mnoha faktory jako jsou podmínky procesu lyofilizace, použité pomocné látky (tj. zejména plniva a kryoprotektiva), nebo skladování a rozpouštění výsledného lyofilizátu (Malik *et al.* 2017). Navíc na rozdíl od chemických látek se stabilita a efektivita fága liší u každého kmene, je tedy nutné experimentálně optimalizovat proces lyofilizace a najít nejlepší složení média, vhodné pro uchování maximální aktivity daného fága. Obdobný princip funguje také u enzymů.

Je potřeba zdůraznit, že fágy jsou standardně lyofilizovány v uzavřených vialkách do tzv. lyofilizačního koláče. Ten má však komplikovanější aplikaci a dávkování např. každý koláč se skladuje odděleně ve vialce, což zabírá více prostoru a před další manipulací je nezbytné jej převést do roztoku, čímž se redukuje výhody lyofilizace. Řešením tohoto je příprava jednodávkových lyofilizátů na kovové formě, na kterou se nanese směs plniva a kryoprotektiva s fágovými lyzáty (případně purifikáty) a s roztokem fágových enzymů, ještě před zahájením

lyofilizace. Je tak dosažena vysoká stabilita jejich antibakteriálního efektu. Navíc vzniklé jednodávkové formy lze poté skladovat v jednom primárním obalu a snížit tak nároky na skladovací prostory a zároveň zjednodušit a upřesnit aplikaci jedné dávky.

5 Doposud existuje omezené množství studií týkající se jednodávkových tuhých forem s obsahem fágů a jejich enzymů, které umožňují upřesnit jejich dávkování a zvýšit stabilitu jejich účinku (Khanal *et al.*, 2021). Tento patent se zaměřuje na metodiku přípravy lyofilizovaných jednodávkových forem s obsahem bakteriofágů a jejich enzymů, která usnadňuje aplikaci fágů a jejich enzymů v terapii infekcí, způsobených patogenními kmeny *P. aeruginosa* a *S. aureus*.

10

Výše zmíněné problémy se stabilizací aktivních složek v průběhu přípravy lyofilizovaných forem a spektra působení řeší jedinečné složení směsi na tablety s obsahem specifických antimikrobiálních složek (fágy a endolyzin).

15 Literatura

Abedon, Stephen T., Sarah J. Kuhl, Bob G. Blasdel, and Elizabeth Martin Kutter. 2011. Phage Treatment of Human Infections. *Bacteriophage* 1 (2): 6 až 85. <https://doi.org/10.4161/bact.1.2.15845>.

20

Abdelrahman, F.; Easwaran, M.; Daramola, O.I.; Ragab, S.; Lynch, S.; Oduselu, T.J.; Khan, F.M.; Ayobami, A.; Adnan, F.; Torrents, E.; *et al.* 2021. Phage-Encoded Endolysins. *Antibiotics* 10 (124): <https://doi.org/10.3390/antibiotics10020124>

25 Anany, H., Chen, W., Pelton, R., & Griffiths, M. W. (2011). Biocontrol of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in meat by using phages immobilized on modified cellulose membranes. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(18), 6379 až 6387. <https://doi.org/10.1128/AEM.05493-11>

30 Barer a Irving. Medical Microbiology, 19th Edition: A Guide to Microbial Infections: Pathogenesis, Immunity, Laboratory Investigation and Control. 19. United Kingdom: Elsevier, 2018. ISBN 978-0-7020-7200-0.

35 Brown, T. L., Petrovski, S., Chan, H. T., Angove, M. J., & Tucci, J. (2018). Semi-solid and solid dosage forms for the delivery of phage therapy to epithelia. *Pharmaceuticals*, 11(1), 1 až 12. <https://doi.org/10.3390/ph11010026>.

40 Carlson, K. 2005. Working with bacteriophages: Common techniques and methodological approaches In: Kutter, E., Sulakvelidze, A., (ed.) Bacteriophages: Biology and Application, str. 437 až 494. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

Clark, William A. 1962. "Comparison of Several Methods for Preserving Bacteriophages," no. 1951.

45 Fulgione, A., Ianniello, F., Papaianni, M., Contaldi, F., Sgamma, T., Giannini, C., Pastore, S., Velotta, R., Ventura, B. Della, Roveri, N., Lelli, M., Capuano, F., & Capparelli, R. (2019). Biomimetic hydroxyapatite nanocrystals are an active carrier for salmonella bacteriophages. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 2219 až 2232. <https://doi.org/10.2147/IJN.S190188>.

50

Garbe, Julia, Andrea Wesche, Boyke Bunk, Marlon Kazmierczak, Katherina Selezska, Christine Rohde, Johannes Sikorski, Manfred Rohde, Dieter Jahn, and Max Schobert. 2010. Characterization of JG024, a *Pseudomonas Aeruginosa* PB1-like Broad Host Range Phage under Simulated Infection Conditions. *BMC Microbiology* 10: 1 až 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-301>.

55

- Hoe, Susan, James W. Ivey, Mohammed A. Boraey, Abouzar Shamsaddini-Shahrbabak, Emadeddin Javaheri, Sadaf Matinkhoo, Warren H. Finlay, and Reinhard Vehring. 2014. Use of a Fundamental Approach to Spray-Drying Formulation Design to Facilitate the Development of Multi-Component Dry Powder Aerosols for Respiratory Drug Delivery. *Pharmaceutical Research* 31 (2): 449 až 465. <https://doi.org/10.1007/s11095-013-1174-5>.
- Jault, P., Leclerc, T., Jennes, S., Pirnay, J. P., Que, Y. A., Resch, G., Rousseau, A. F., Ravat, F., Carsin, H., Le Floch, R., Schaal, J. V., Soler, C., Fevre, C., Arnaud, I., Bretaudeau, L., & Gabard, J. (2019). Efficacy and tolerability of a cocktail of bacteriophages to treat burn wounds infected by *Pseudomonas aeruginosa* (PhagoBurn): a randomised, controlled, double-blind phase 1/2 trial. *The Lancet Infectious Diseases*, 19(1), 35 až 45. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30482-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30482-1).
- Khanal, D., Chang, R. Y. K., Hick, C., Morales, S., & Chan, H.-K. (2021). Enteric-coated bacteriophage tablets for oral administration against gastrointestinal infections. *International Journal of Pharmaceutics*, 609(červenec), 121206. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.121206>.
- Komárek, Pavel a Miloslava Rabišková. Technologie léků: galenika. 3., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Galén, c2006. ISBN 80-726-2423-7.
- Kropinski, A.M., Mazzocco, A., Waddell, T.E., Lingohr, E., Johnson, R.P. 2009 Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay. In: Clokie M.R., Kropinski A.M. (ed.) Bacteriophages: Methods and Protocols, Vol 1: Isolation, Characterization, and Interactions. str. 69 až 76. doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_7.
- Loc-Carrillo, Catherine, and Stephen T. Abedon. 2011. Pros and Cons of Phage Therapy. *Bacteriophage* 1 (2): 111 až 114. <https://doi.org/10.4161/bact.1.2.14590>.
- Malik, Danish J. 2021. Approaches for Manufacture, Formulation, Targeted Delivery and Controlled Release of Phage-Based Therapeutics. *Current Opinion in Biotechnology* 68: 262 až 271. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.02.009>.
- Malik, Danish J., Ilya J. Sokolov, Gurinder K. Vinner, Francesco Mancuso, Salvatore Cinquerrui, Goran T. Vladislavljevic, Martha R.J. Clokie, Natalie J. Garton, Andrew G.F. Stapley, and Anna Kirpichnikova. 2017. Formulation, Stabilisation and Encapsulation of Bacteriophage for Phage Therapy. *Advances in Colloid and Interface Science* 249 (květen): 100 až 133. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.05.014>.
- Mathias, J. R., Dodd, M. E., Walters, K. B., Yoo, S. K., Erik, A., & Huttenlocher, A. (2010). Phage-Bacterium War on Polymeric Surfaces-Anchored Eliminate Micobial Infections. *Biomacromolecules*, 33(11), 1212 až 1217. <https://doi.org/10.1021/bm400290u>. Phage-Bacterium.
- Merabishvili M. Production of bacteriophages using bacterial suspension cultures for phage-therapy. In: Meyer HP, Schmidhalter DR, editors. Industrial scale suspension culture of living cells. 2014. Wiley VCH Verlag, Weinheim, Germany; 2014. str. 537 až 543.
- Meyer HP, Schmidhalter DR, editors. Industrial scale suspension culture of living cells. 2014. Wiley VCH Verlag, Weinheim, Germany; 2014. str. 537 až 543.
- Subils, T., Aquili, V., Ebner, G., & Balagué, C. (2012). Effect of preservatives on Shiga toxigenic phages and Shiga toxin of *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Protection*, 75(5), 959 až 965. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-332>.

URL 1: Antimicrobial resistance, 17. 11. 2021,

<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>

5

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu je směs pro přípravu lyofilizovaných tablet, jejíž podstata spočívá v tom, že obsahuje fágový lyzát/purifikát bakteriofágů působících proti *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa* o titru 10^7 až 10^{11} PFU/ml, 0,01 až 0,3 mg/ml endolyzinu LysMB10 produkovaného v *E. coli* o sekvenci SEQ ID NO: 1, dále 5 až 50 g plniva a 4 až 13 g kryoprotektiva na 100 ml směsi.

Pro přípravu tablet se směs lyofilizuje po nanesení na formu opatřenou jamkami majícími tvar zamýšlené tablety.

Složení základu na tablety je optimalizováno tak aby napomáhalo stabilizaci fágů i enzymů a nedochází k redukci jejich koncentrace i aktivity. Tím je zajištěna optimální efektivita působení. Navíc kombinace endolyzinu LysMB10 (produkovaného kmenem *E. coli* CCM 9354) a bakteriofágů DSM 34648 (fág anti *P. aeruginosa*) a DSM 34647 (fág anti *S. aureus*) napomáhá značně rozšířit spektrum běžně užívaných bakteriofágů a endolyzinů působících proti bakteriím *S. aureus* a *P. aeruginosa*. Fág DSM34648 i DSM34647 byly izolovány *de novo* z prostředí nebo připraveny selektivní laboratorní evolucí a jsou ojedinělé z hlediska lytického spektra. Endolyzin LysMB10 je dosud nepopsaným antimikrobiálním enzymem, který působí na široké spektrum bakterií rodu *Staphylococcus*.

V rámci tohoto vynálezu je pro přípravu jednodávkové tuhé formy (lyofilizovaná tableta) s obsahem fágového lyzátu a endolyzinu využit specifický proces lyofilizace směsi s optimalizovaným složením, které zajišťuje stabilitu a vysokou aktivitu antimikrobiálních složek. Definovaná směs aktivních antimikrobiálních látek (fágové lyzáty a endolyzin), plniva (rybí želatina, maltodextrin, nebo polyvinylpyrrolidon (PVP)) a kryoprotektiva (manitol) se po nanesení na speciální kovovou formu (český užitný vzor č. PUV 31295), lyofilizuje při definovaných podmínkách. Tento postup zvyšuje stabilitu efektu aktivních složek zejména při vyšších teplotách, umožňuje výhodnější skladování a zvyšuje mikrobiologickou jakost výsledného produktu, který lze využít v léčbě bakteriálních infekcí způsobených bakteriemi *S. aureus* a *P. aeruginosa*. Specifické fágy obsažené v tabletě mají ojedinělé lytické spektrum zahrnující patogenní kmeny izolované z nemocničního prostředí a působí synergicky s endolyzinem LysMB10 – který nebyl doposud popsán (má jedinečnou aminokyselinovou sekvenci, uvedenou v příloženém seznamu sekvencí jako SEQ ID NO: 1).

Popis uskutečnění vynálezu

Směs fágového lyzátu s hodnotou titru minimálně 1×10^8 PFU/ml a endolyzinu o koncentraci (0,01 až 0,3 mg/ml) lze zpracovat do příslušného množství pevných dávek (tablet). Při tomto zpracování dochází ke zmrazení aktivních složek s plnivem a kryoprotektivem na speciální formě, tak, aby došlo k tvorbě oddělených pevných dávek, které se následně v této formě lyofilizují. Výsledný lyofilizovaný produkt si zachovává strukturu tablety a lze uchovávat chráněný před světlem a vzdušnou vlhkostí pomocí vhodného obalu při teplotě 4 °C alespoň po dobu minimálně tří měsíců. U těchto vzniklých dávek je nutné zabezpečit titer fága, který dosahuje minimálně 10^6 až 10^7 PFU/ml, což je obecně uznávaná minimální hodnota titru fága pro terapeutické použití (Merabishvili 2014) a aktivitu endolyzinu vhodnou metodou purifikace.

Pro přípravu lze použít nepurifikovaný fágový lyzát nebo purifikát s hodnotou titru alespoň v řádu 1×10^7 PFU/ml. Fágový lyzát je purifikován a převeden do SM pufru (složení SM pufru: 100 mM NaCl, 8 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 50 mM Tris-Cl (pH 7,5) do 1000 ml destilované vody), který se využívá pro uchovávání fágů a zároveň je vhodný pro lyofilizační proces, jelikož u něj během lyofilizace nedochází ke změně pH. Pro purifikaci fágů lze aplikovat standardně využívané metody purifikace proteinů jako např. ultracentrifugace, tangenciální průtoková filtrace, chromatografie, či přečištění pomocí centrifugačních zkumavek s filtračním nástavcem. Bakteriofágy byly izolovány na kmenech, které nebyly citlivé k jiným testovaným bakteriofágům. Tyto dva zmíněné bakteriofágy DSM34648 a DSM34647, které jsou uloženy ve sbírce DSMZ v Německu jako patentové úložky, mají tak unikátní spektrum, které rozšiřuje možnosti použití terapeutických fágů na další patogenní klinické izoláty. Jejich nukleotidové sekvence jsou uvedeny v připojeném seznamu sekvencí jako SEQ ID NO: 2 (fág DSM 34647) a SEQ ID NO: 3 (fág DSM 34648). V případě endolyzinu LysMB10, jehož produkci *E. coli* je uložena ve sbírce CCM v Brně jako patentová úložka, se jedná o zcela nový dříve neidentifikovaný protein, u něhož byla prokázána antimikrobiální aktivita proti bakteriím *S. aureus*. Tento enzym podporuje antimikrobiální účinek bakteriofágů a proti bakterii *S. aureus* může být použit i bez bakteriofágů. Sekvence endolyzinu LysMB10 (SEQ ID NO: 1) je uvedena samostatně.

Pro přípravu produktu jsou využity fágy ze sbírky MB Pharma infikující *P. aeruginosa* a *S. aureus* a zároveň lytický enzym působící na *S. aureus*. Bakteriofágy a kmen *E. coli* produkující LysMB10 jsou uloženy podle Budapeštské smlouvy v německé sbírce DSMZ, resp. v CCM (v případě *E. coli*) jako patentové úložky pod čísla CCM 9354, DSM 34648 a DSM 34647. Jejich základní vlastnosti jsou uvedeny v následujících tabulkách 1 a 2:

bakteriofág	hostitel	rod	G+C (%)	velikost genomu (kbp)
DSM 34647	<i>S. aureus</i>	<i>Rosenblumvirus</i>	29,24	18,00
DSM 34648	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Septimatrevirus</i>	53,74	42,97

Tabulka 1: Souhrn vlastností fágů

endolyzin	cílový organismus	velikost sekvence	pI	kDa
LysMB10	<i>Staphylococcus</i>	259 amk	9,77	28,9

Tabulka 2: Souhrn vlastností endolyzinu LysMB10

Testování antimikrobiálního efektu fágů a endolyzinů v dané dávce probíhá pomocí kapkové metody na dvouvrstevném agaru (Garbe *et al.* 2010), případně redukcí OD v tekuté kultuře (konkrétně u endolyzinu). U bakteriofágů se jedna dávka před testováním rozpustí v 50 ml sterilní destilované vody, při pokojové teplotě a 150 rpm po dobu 3 až 5 minut. Vzniklý roztok se naředí a proběhne vykapání daných ředění. Měření se provede u několika dávek a zjistí se tak stejnoměrnost jejich efektu a zároveň stabilita antimikrobiálního účinku aktivních složek v čase, v ideálním případě minimálně po třech měsících.

Vliv endolyzinu se sleduje pomocí úbytku OD_{600} tak, že se do kyvety 1 ml s obsahem kultury bakterie přidá jedna tableta (původně 0,5 ml tekuté směsi). Bakteriální kultura byla 2 x promyta v pufru a její denzita byla nastavena na hodnotu $OD_{600} = 0,5$. Poté byla přenesena do kyvety, do ní byla vložena tableta a poté je měřen úbytek OD.

Objasnění výkresů

5 Obrázek 1: Detailní snímek skenovací elektronové mikroskopie povrchu dávky připravené ze specifické antimikrobiální směsi.

Obrázek 2: Detailní snímek skenovací elektronové mikroskopie povrchu dávky připravené ze specifické antimikrobiální směsi.

10 Obrázek 3: Detail vrchní části dávky připravené ze specifické antimikrobiální směsi.

Obrázek 4: Detail spodní části dávky připravené ze specifické antimikrobiální směsi.

Obrázek 5: Detail boční strany dávky připravené ze specifické antimikrobiální směsi.

15

Obrázek 6: Ukázka primárního obalu.

Obrázek 7: Sekvence 1: Primární sekvence endolyzinu (SEQ ID NO: 1).

20

Příklady uskutečnění vynálezu

25 Složení lyofilizovaných tablet a způsob jejich přípravy jsou uvedeny v příkladech 1 až 3 kdy se u každého příkladu liší složení směsi kryoprotektiva a plniva, které jsou vhodné pro stabilizaci bakteriofágů a endolyzinu. Poměr jednotlivých složek je blíže specifikován v tabulce 3.

Plnivo [g]	Kryoprotektivum - manitol [g]	Fág DSM 34648 [PFU/ml]	Fág DSM 34647 [PFU/ml]	Endolyzin [mg/ml]
Maltodextrin 35-50	4-6	$1 \times 10^7 - 1 \times 10^{11}$	$1 \times 10^7 - 1 \times 10^{11}$	0,01 - 0,3
Želatina 10-15	11-13	$1 \times 10^7 - 1 \times 10^{11}$	$1 \times 10^7 - 1 \times 10^{11}$	0,01 - 0,3
PVP 5-10	4-6	$1 \times 10^7 - 1 \times 10^{11}$	$1 \times 10^7 - 1 \times 10^{11}$	0,01 - 0,3
Maltodextrin 35-50	4-6			0,01 - 0,3
Želatina 10-15	11-13			0,01 - 0,3
PVP 5-10	4-6			0,01 - 0,3

Tabulka 3: Složení 100 ml směsi na přípravu 200 tablet s obsahem bakteriofága/endolyzinu

30 Příklad 1

35 V 90 ml směsi fágových lyzátů/purifikátů o koncentraci minimálně 1×10^9 PFU/ml se za stálého míchání při pokojové teplotě po dobu 30 minut rozpustí 43,75 g maltodextrinu a 5,00 g manitolu. Po rozpuštění pomocných látek se nastaví pH směsi pomocí roztoků HCl a NaOH na hodnotu 7,5. Do směsi se přidá 10 ml roztoku endolyzinu o koncentraci 0,3 mg/ml. Výsledná směs se přefiltruje přes 0,45 μ m PES filtr a následně se uchovává při pokojové teplotě a 150 rpm po dobu

minimálně 20 a maximálně 30 minut. Množství směsi se připraví dle požadovaného počtu dávek, jedna dávka odpovídá 0,5 až 1 ml směsi, tzn. ze 100 ml směsi se připraví 100 až 200 dávek.

Směs je nanášena na sterilní hliníkovou formu, vychlazenou na -80 °C. Forma je během nanášení udržována při teplotě -60 až -80 °C. Poté probíhá lyofilizace v daných krocích:

1. Namražení vzorku v -30 °C po dobu 20 minut.
 2. Primární sušení při teplotě -30 °C po dobu 960 minut (tj. 16 hodin) a tlaku 19,99 Pa (150 mTorr).
 3. Sekundární sušení probíhá z -30 °C do 20 °C při stoupání teploty 0,1 °C/min a tlaku 19,99 Pa (150 mTorr).
- Vzniklé dávky (tablety) se po vyjmutí z lyofilizátoru a z formy přenesou do primárního obalu a skladují se optimálně při teplotě 4 °C (případně při pokojové teplotě).

Příklad 2

Jako plnivo lze využít taktéž rybí želatinu, kdy v 50 ml vody se za stálého míchání zahřeje 12 g manitolu a 12 g rybí želatiny přibližně na teplotu 70 °C. Tato směs se následně vytemperuje na 50 °C a po vytemperování se do ní vmíchají fágové lyzáty/purifikáty (tabulka 3) do celkového objemu 90 ml. Koncentrace fágů je minimálně 1×10^9 PFU/ml. Směs se míchá při pokojové teplotě po dobu 30 minut. Po rozpuštění pomocných látek se nastaví pH směsi pomocí roztoků HCl a NaOH na hodnotu 7,5. Po úpravě pH směsi se přidá 10 ml roztoku endolyzinu, tak aby výsledná koncentrace u endolyzinu byla 0,02 mg/ml. Finální směs se přefiltruje přes 0,45 µm PES filtr a následně se uchovává při pokojové teplotě a 150 rpm po dobu minimálně 20 a maximálně 30 minut. Množství směsi se připraví dle požadovaného počtu dávek, jedna dávka odpovídá 0,5 až 1 ml směsi, tzn. ze 100 ml směsi se připraví 100 až 200 dávek.

Směs je nanášena na sterilní hliníkovou formu, vychlazenou na -80 °C. Forma je během nanášení udržována při teplotě -60 až -80 °C. Poté probíhá lyofilizace v daných krocích:

1. Namražení vzorku v -30 °C po dobu 20 minut.
2. Primární sušení při teplotě -30 °C po dobu 960 minut (tj. 16 hodin) a tlaku 19,99 Pa (150 mTorr).
3. Sekundární sušení probíhá z -30 °C do 20 °C při stoupání teploty 0,1 °C/min a tlaku 19,99 Pa (150 mTorr).

Vzniklé dávky (tablety) se po vyjmutí z lyofilizátoru a z formy přenesou do primárního obalu a skladují se optimálně při teplotě 4 °C (případně při pokojové teplotě).

Příklad 3

Jako plnivo lze využít polyvinylpyrolidon K90 (PVP90). Ve 90 ml směsi fágových lyzátů/purifikátů o koncentraci minimálně 1×10^9 PFU/ml se za stálého míchání při pokojové teplotě po dobu 30 minut rozpustí 7,5 g PVP90 a 5,00 g manitolu. Po rozpuštění pomocných látek se nastaví pH směsi pomocí roztoků HCl a NaOH na hodnotu 7,5. Po úpravě pH směsi se přidá 10 ml roztoku endolyzinu, tak aby výsledná koncentrace u endolyzinu byla 0,02 mg/ml. Finální směs se přefiltruje přes 0,45 µm PES filtr a následně se uchovává při pokojové teplotě a 150 rpm po dobu minimálně 20 a maximálně 30 minut. Množství směsi se připraví dle požadovaného počtu dávek, jedna dávka odpovídá 0,5 až 1 ml směsi, tzn. ze 100 ml směsi se připraví 100 až 200 dávek.

Směs je nanesena na formu, vychlazenou na -80 °C. Forma je během nanášení udržována při teplotě -60 až -80 °C. Poté probíhá lyofilizace v daných krocích:

- 5 1. Namražení vzorku v -30 °C po dobu 20 minut.
2. Primární sušení při teplotě -30 °C po dobu 960 minut (tj. 16 hodin) a tlaku 19,99 Pa (150 mTorr).
- 10 3. Sekundární sušení probíhá z -30 °C do 20 °C při stoupaní teploty 0,1 °C/min a tlaku 19,99 Pa (150 mTorr).

Vzniklé dávky (tablety) se po vyjmutí z lyofilizátoru a z formy přenesou do primárního obalu a skladují se optimálně při teplotě 4 °C (případně při pokojové teplotě).

15

Příklad 4

- V 90 ml směsi fágových lyzátů/purifikátů o koncentraci minimálně 1×10^9 PFU/ml se za stálého míchání při pokojové teplotě po dobu 30 minut rozpustí 43,75 g maltodextrinu a 5,00 g manitolu.
- 20 Po rozpuštění pomocných látek se nastaví pH směsi pomocí roztoků HCl a NaOH na hodnotu 7,5. Po úpravě pH směsi se přidá 10 ml roztoku endolyzinu, tak aby výsledná koncentrace u endolyzinu byla 0,02 mg/ml. Finální směs se přefiltruje přes 0,45 µm PES filtr a následně se uchovává při pokojové teplotě a 150 rpm po dobu minimálně 20 a maximálně 30 minut. Množství směsi se připraví dle požadovaného počtu dávek, jedna dávka odpovídá 0,5 až 1 ml směsi, tzn. ze 100 ml směsi se připraví 100 až 200 dávek.
- 25

Směs je nanesena na formu, vychlazenou na -80 °C. Forma je během nanášení udržována při teplotě -60 až -80 °C. Poté probíhá lyofilizace v daných krocích:

- 30 1. Namražení vzorku v -30 °C po dobu 20 minut.
2. Primární sušení při teplotě -30 °C po dobu 960 minut (tj. 16 hodin) a tlaku 19,99 Pa (150 mTorr).
- 35 3. Sekundární sušení probíhá z -30 °C do 20 °C při stoupaní teploty 0,1 °C/min a tlaku 19,99 Pa (150 mTorr).

Vzniklé dávky (tablety) se po vyjmutí z lyofilizátoru a z formy přenesou do primárního obalu a skladují se optimálně při teplotě 4 °C (případně při pokojové teplotě).

40

Průmyslová využitelnost

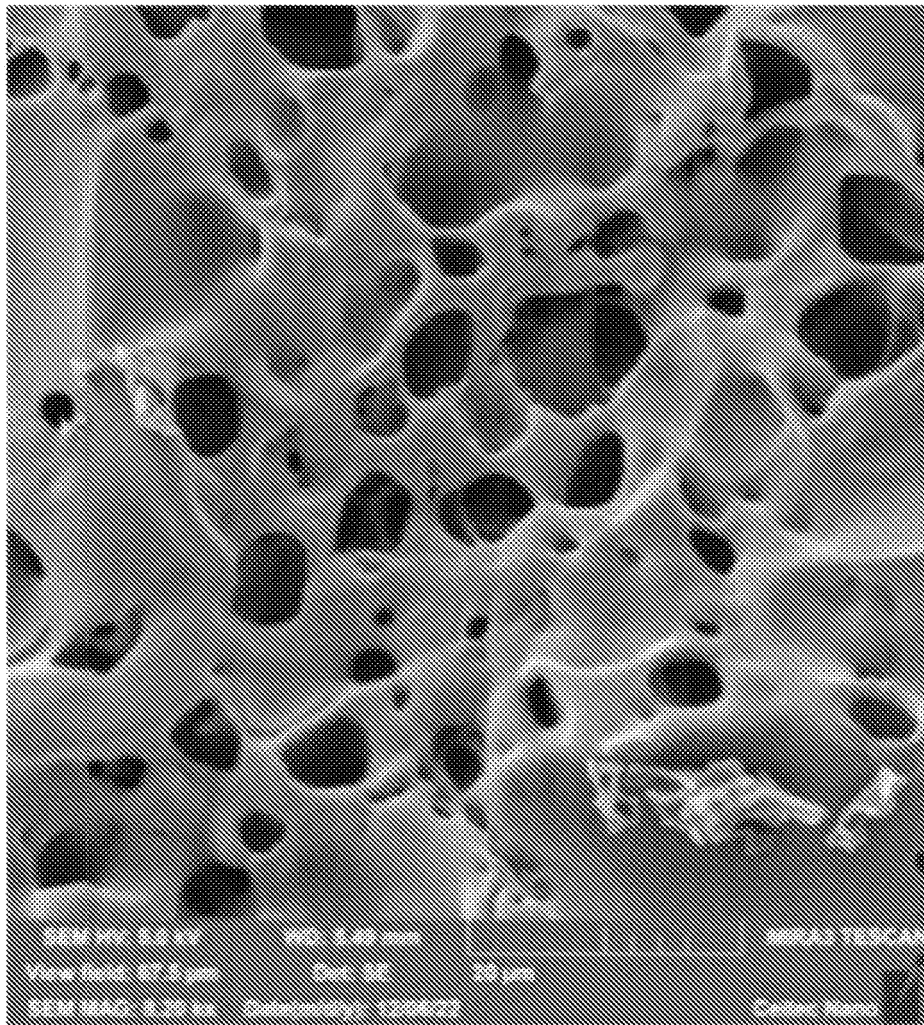
- 45 Lyofilizované jednodávkové formy (tablety) s obsahem fágového lyzátu/purifikátu a endolyzinu připravené z předmětné směsi lze aplikovat při fágové terapii infekcí způsobené širokým spektrem antibioticky rezistentních kmenů patogenních bakterií *S. aureus* a *P. aeruginosa*, které jsou vůči těmto aktivním složkám prokazatelně citlivé.

PATENTOVÉ NÁROKY

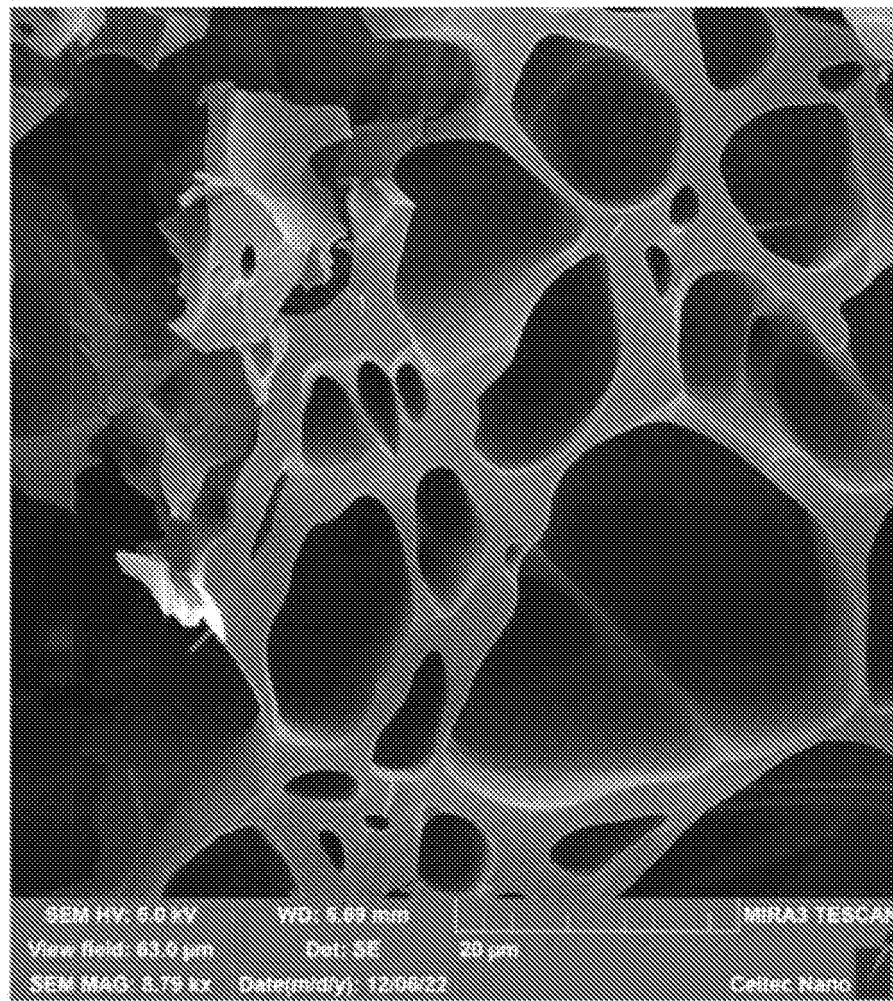
- 5 1. Antimikrobiální směs pro přípravu lyofilizovaných tablet proti bakteriím *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa* s obsahem bakteriofágů a lytických enzymů s optimální stabilitou a efektivitou aktivních složek, **vyznačující se tím**, že obsahuje fágový lyzát/purifikát bakteriofágů působících proti *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa* o titru 10^7 až 10^{11} PFU/ml, 0,01 až 0,3 mg/ml endolyzinu produkovaného v *E. coli* o sekvenci SEQ ID NO: 1, dále 5 až 50 g plniva a 4 až 13 g kryoprotektiva na 100 ml směsi.
- 10 2. Antimikrobiální směs podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že bakteriofágem je alespoň jeden fág ze skupiny zahrnující fága DSM 34647 a fága DSM 34648.
3. Antimikrobiální směs podle kteréhokoliv z nároků 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že plnivo je vybráno ze skupiny zahrnující maltodextrin, rybí želatinu a polyvinylpyrrolidon.
4. Antimikrobiální směs podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, **vyznačující se tím**, že kryoprotektivem je mannitol.
- 15 5. Antimikrobiální směs podle nároku 2 pro použití při léčbě bakteriálních infekcí způsobených patogenními kmeny *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa* v humánní i veterinární oblasti.

4 výkresy

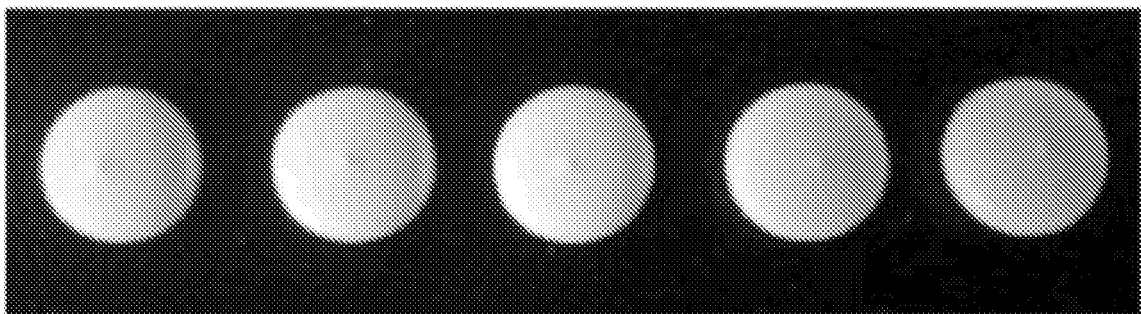
20



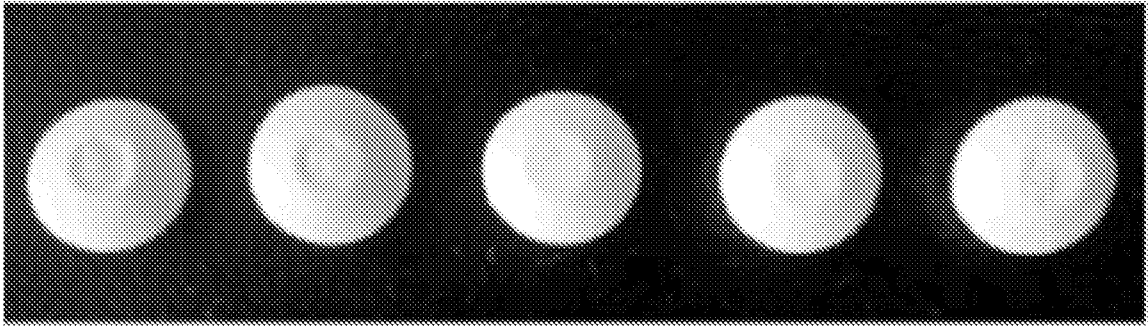
Obr. 1



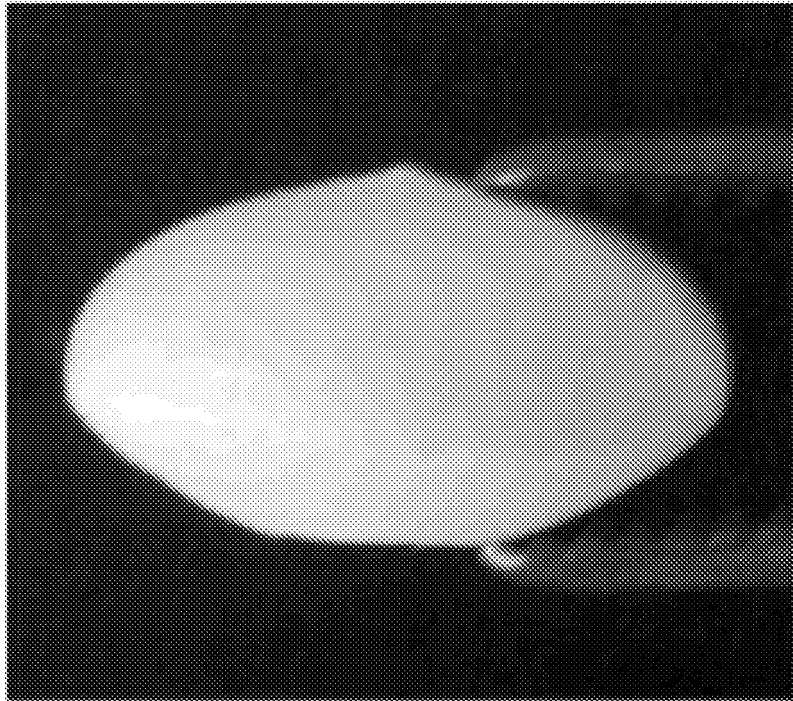
Obr. 2



Obr. 3



Obr. 4



Obr. 5



Obr. 6

Sekvence 1: Aminokyselinová sekvence endolyzimu LysMB10

```
METLKDAENYIKKAIGKGIDFDGQYGYQCADLSVDYMYIITDKKVRMWGNAKDLINN  
DFKGLATVYKNTPSFLAKKGDVFVMGANRGGYGHIGIVTSA TLNSITVIEQNWLG  
GGATFSEVYTKRTHPYDIEMWFIRPKFAKSKTETAKKVAKASAKKVTPKKSW  
SFKVGGEPIIRIGKPSLKA TSGGSVKPNQKMTFNKLVKSEGYEWGKLTNYK  
GQTEYVPIRPLKQEGYWGVLKWNSSSVDKLAAALEHHHHHHH
```

Obr. 7