

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10)

PL 243195 B1

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **436954**

(22) Data zgłoszenia: **2021.02.14**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2022.08.16 BUP 33/2022**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.07.17 WUP 29/2023**

(51) MKP:

A61K 35/74 (2015.01)

A61K 9/00 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

**BIOMED-LUBLIN WYTWÓRNIĄ SUROWIC
I SZCZEPIONEK SPÓŁKA AKCYJNA, Lublin, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:

**ARTUR BIELAWSKI, Lublin, PL
MAŁGORZATA ZAGAJSKA, Lublin, PL
MAŁGORZATA SOBOŃ-PRUCHNIAK,
Oleśniki, PL
KATARZYNA KONARSKA,
Piłuszowice Kolonia, PL**

(74) Pełnomocnik:

Anna Cieniuch-Kokowicz, Lublin, PL

(54) Tytuł:

**Sposób wytwarzania kompozycji farmaceutycznej zawierającej prątki szczepu BCG
należące do Mycobacterium bovis BCG podszczepu Moreau**

PL 243195 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania kompozycji farmaceutycznej zawierającej prątki szczepu BCG należące do *Mycobacterium bovis* BCG podszczepu Moreau, przeznaczonej do leczenia nowotworów pęcherza moczowego nie naciekających warstwy mięśniowej (NMIBC) u ludzi.

Rak pęcherza moczowego jest czwartym pod względem częstości występowania nowotworów złośliwych w Polsce. Stanowi on 3% wszystkich nowotworów złośliwych oraz około 70% raków narządów układu moczowego. Najczęściej stosowana metoda leczenia nowotworów pęcherza moczowego nie naciekających mięśniówki właściwej (NMIBCE) jest chirurgicznie usunięcie zmiany nowotworowej w pęcherzu moczowym (transurethral resection of the bladder tumor – TURB), a następnie miejscowa chemioterapia lub immunoterapia. Obecnie za najskuteczniejszą metodę leczenia i zapobiegania nawrotom choroby uważa się immunoterapię żywymi prątkami BCG podawanymi dopęcherzowo. Powszechnie uznano, że immunoterapia prątkami BCG jest skuteczniejsza niż chemioterapia. Jest to metoda uznana i stosowana na całym świecie, zalecana między innymi przez Międzynarodowe Towarzystwa Urologiczne oraz FDA. Wszystkie stosowane aktualnie na świecie podszcypy BCG Bacille Calmette-Guerin zarówno do produkcji szczepionki przeciwgruźliczej jak i preparatów BCG przeznaczonych do immunoterapii, zawierają jako substancję aktywną atenuowany szczep *Mycobacterium bovis* (BCG). Szczep BCG uzyskany w 1921 r. przez Calmette'a i Guerina w wyniku wieloletniego pasażowania wirulentnego szczepu *M. bovis* na pożywcze ziemniaczano-glicerynowej z dodatkiem żółci, został następnie przekazany do wielu laboratoriów na świecie w celu wytwarzania szczepionki przeciwgruźliczej. Liczne pasáže szczepu *M. bovis* BCG przeprowadzane w tych laboratoriach w różnych warunkach hodowli doprowadziły do licznych mutacji i powstania wielu podszcypów BCG różniących się nieco pod względem skuteczności i bezpieczeństwa. Jednak w opinii Światowej Organizacji Zdrowia wszystkie aktualnie istniejące podszcypy BCG nadają się do wytwarzania szczepionki przeciwgruźliczej oraz preparatów BCG do immunoterapii i nie ma podstaw do zalecania jakiegokolwiek podszcypu BCG jako skuteczniejszego od pozostałych. W Polsce brazylijski podszczep Moreau został wprowadzony do produkcji szczepionki przeciwgruźliczej w 1955 r. i jest dotychczas stosowany. Podszczep Moreau należy do grupy I podszcypów BCG, które zostały wcześniej wyizolowane z oryginalnego szczepu BCG (Bacille Calmette-Guerin). Należy do szczepów charakteryzujących się średnim poziomem immunogenności oraz dość wysokim poziomem bezpieczeństwa. Dopęcherzowa terapia powierzchniowych nowotworów pęcherza moczowego prątkami BCG została zapoczątkowana w 1976 r. przez Moralesa. Mechanizmy oddziaływania prątków BCG na komórki nowotworowe nie zostały dokładnie poznane. Badania mające na celu poznanie biologii guza i zagadnień związanych z jego immunologią mogą być pomocne w podwyższeniu skuteczności immunoterapii, a co za tym idzie zapobieganiu nawrotom choroby.

Immunoterapia opiera się na założeniu, że własny system immunologiczny chorego może zniszczyć komórki rakowe. Aby zmobilizować system immunologiczny do wzmożonego działania w obrębie pęcherza moczowego podaje się dopęcherzowo prątki BCG. Niektóre publikacje sugerują, że w ten sposób wywołuje się sztucznie zapalenie pęcherza moczowego. „Zaalarmowany” system immunologiczny walczy z zapaleniem pęcherza niszcząc jednocześnie komórki rakowe w tym rejonie. Mechanizm działania tej metody leczenia nie jest jednak do końca wyjaśniony. Wiadomo, że miejscowe stymulowanie komórek układu immunologicznego wywołuje mechanizmy przeciwnowotworowe organizmu. Nadzór immunologiczny zjawisk nowotworowych wiąże się z limfocytami T. Komórki nowotworowe mają własne zmienione antygeny transplantacyjne. Krążące limfocyty T rozpoznają antygenową inność komórek nowotworowych i niszczą je, między innymi na drodze efektu cytotoksycznego. W zwalczaniu nowotworów zaangażowane są w dużym stopniu również limfocyty NK, które stanowią komórkową straż chroniącą organizm przed nowotworem. W niszczeniu komórek nowotworowych biorą również udział inne komórki układu odpornościowego, takie jak makrofagi i komórki tuczne. W tym bardzo złożonym procesie obronnym organizmu ważną rolę spełniają różne cytokiny produkowane przez limfocyty, spośród których ogromną rolę odgrywają interferon gamma i czynnik martwicy nowotworu wydzielany przez limfocyty Th1. Po podaniu zawiesiny prątków BCG do pęcherza moczowego obserwuje się infiltrację komórek T, NK oraz makrofagów do ściany pęcherza. W moczu chorego pojawiają się duże ilości cytokin oraz liczne komórki odpornościowe jak makrofagi, neutrofile, komórki T. Zaobserwowano, że istotną rolę w immunoterapii prątkami BCG odgrywa długotrwały bezpośredni kontakt pomiędzy komórkami odpornościowymi znajdującymi się w ścianie pęcherza moczowego z prątkami BCG. W Polsce stosowanie wlewk dopęcherzowych zawierających zawiesinę prątków BCG w leczeniu nowotworów pęcherza moczowego nie naciekających warstwy mięśniowej (NMIBC) rozpoczęto w połowie lat 80. Polskie preparaty Onko

BCG do immunoterapii (100 mg/amp i 50 mg/amp) zawierają podobnie jak szczepionka BCG żywe, atenuowane prątki BCG podszczeptu Moreau. Wszystkie podszczepty BCG charakteryzują się zmiennością materiału genetycznego (genomu) w porównaniu do szczepu macierzystego *M. bovis* i na tej podstawie można wnioskować iż każdy z nich stanowi inny unikalny podszczept prętka gruźlicy. Obecność nawet niewielkich zmian w genomie może determinować różnice w cechach fenotypowych i aktywności przeciwnowotworowej. Z analizy wynika że szczep Moreau tak jak pozostałe odmiany BCG utracił zdolność do wywoływania choroby (brak regionu RDI). Inne zmiany w materiale genetycznym charakterystyczne dla szczepu Moreau ukazujące jego odmienną mikroewolucję dotyczą obecności 2 kopii IS6110, rodzaju duplikacji DU2-1, dodatkowej delecji RD16 oraz obecność i ekspresji białek antygenowych MPB64, MPB70. Odrębność szczepu BCG-Moreau jest dobrze widoczna w przypadku budowy ściany komórkowej tych prętków. W obrębie porównywanych szczepów jedynie u BCG-Moreau zaobserwowano obecność kwasów metoksymykolowych co wiąże się z silniejszą modulacją układu immunologicznego poprzez produkcję szeregu czynników prozapalnych (IL, TMF), co przekłada się na wyższą aktywność przeciwnowotworową. Z kolei brak dimykolanów trehalozy oraz glikolipidów fenolowych w ścianie komórkowej prętków BCG-Moreau skorelowany jest z mniejszą liczbą wywoływanych zdarzeń niepożądanych i zwiększonym profilem bezpieczeństwa stosowania tego podszczeptu. Podsumowując szczep BCG-Moreau charakteryzuje się silną aktywnością przeciwnowotworową oraz zwiększonym profilem bezpieczeństwa w odniesieniu do porównywanych szczepów BCG. Z opisu wynalazku Nr PL235706 znany jest sposób wytwarzania kompozycji farmaceutycznej zawierającej prętka szczepu BCG należące do *Mycobacterium bovis* BCG podszczeptu Moreau, polegający na ożywianiu prętków na podłożu zawierającym asparaginę, kwas cytrynowy, dwupotasowy fosforan bezwodny, siarczan magnezu, siarczan cynku, glicerol, selenian sodu, kwas foliowy, chlorek wapnia oraz inkubacji i przepasazowaniu uzyskanej hodowli prętków BCG a także przepłukaniu otrzymanej masy bakteryjnej zbuforowanym roztworem chlorku sodu i dwufosforanu potasu.

Nieoczekiwanie okazało się, że kompozycja farmaceutyczna wytworzona na bazie prętków szczepu BCG jest bardziej stabilna i wolna jest od szeregu niebezpieczeństw i niedogodności w przypadku szczelnego zamykania produktu w oranżowych fiolkach szklanych w procesie liofilizacji w warunkach próżni, wysokiego podciśnienia o wartości od 0,8 do 1,2 Pa abs.

Istotą sposobu wytwarzania kompozycji farmaceutycznej zawierającej prętka BCG należące do *Mycobacterium bovis* BCG brazylijskiego podszczeptu Moreau, według wynalazku jest to, że masę bakteryjną zawiesza się w nośniku stanowiącym co najwyżej 5% glutaminianu sodu, do otrzymania stężenia co najmniej 10×10^6 jtk/mg *Mycobacterium bovis* BCG brazylijskiego podszczeptu Moreau, po czym prowadzi się proces homogenizacji poprzez intensywne rozcieranie kulkami stalowymi o średnicy 4 mm na mieszadzie elektrycznym przez 5–10 minut przy obrotach 20 rpm/min i kącie nachylenia mieszadła 45°C , a następnie dozuje się do jednostkowych opakowań szklanych z korkami, po czym poddaje się trzyetapowemu procesowi liofilizacji, gdzie w pierwszym etapie produkt umieszczony w jednostkowych opakowaniach zamraża się do temperatury od -30°C do -40°C w czasie co najmniej 120–150 minut, po czym obniża się ciśnienie do wartości od 5 Pa abs do 15 Pa abs przy temperaturze płyt w zakresie 18°C – 28°C i temperaturze wymrażacza poniżej -50°C w czasie co najmniej 12,0–13,5 godzin, a następnie prowadzi się proces ogrzewania do temperatury produktu od 35°C do 39°C , przy temperaturze płyt od 36°C do 46°C i temperaturze wymrażacza poniżej -50°C oraz przy ciśnieniu 0,5 do 2 Pa abs w czasie 25–30 godzin, po czym jednostkowe opakowania zamyka się szczelnie utrzymując w nich podciśnienie o wartości od 0,8 Pa abs do 1,2 Pa abs.

Korzystnym rozwiązaniem wynalazku jest to, że kompozycja farmaceutyczna wytworzona sposobem według wynalazku na bazie inaktywowanych prętków szczepu BCG jest bardziej stabilna niż szczepionka uszczelniona azotem czy argonem. Sposób według wynalazku pozwala na utrzymanie koncentracji bakterii na poziomie 3×10^6 jtk/mg *Mycobacterium bovis* BCG brazylijskiego podszczeptu Moreau.

Przedmiot wynalazku ilustruje szczegółowo podany przykład.

Przykład:

Szczep siewny BCG ożywia się na podłożu składającym się z asparaginy jednowodnej w ilości 4,0%, kwasu cytrynowego jednowodnego w ilości 2,0%, dwupotasowego fosforanu bezwodnego w ilości 0,5%, siarczanu magnezu siedmiowodnego w ilości 0,5%, amonu żelaza cytrynian w ilości 0,05%, siarczan cynku siedmiowodnego w ilości 0,002%, glicerolu w ilości 60%, przy czym roztwór soli rozpuszczono w 1 litrze wody do wstrzykiwań podgrzewając do całkowitego rozpuszczenia. Kulturę bakteryjną inkubuje się następnie w temp. $36\text{--}38^\circ\text{C}$ w okresie 20 dni. Uzyskana hodowla prętków BCG jest następnie dwukrotnie przepasazowana na podłożu zawierającym asparaginę, kwas cytrynowy, amon żelaza

cytrynian, dwupotasowy fosforan bezwodny, siarczan magnezu, siarczan cynku, glicerol, roztwór amoniaku. Cały proces wzrostu hodowli prątków BCG trwał 30 dni. Następnie w prasce Birkhauga wyhodowana kultura prątków zostaje oddzielona od podłoża Sautona i przepłukana zbuforowanym roztworem chlorku sodu zawierającym chlorek sodu, dwuwodorofosforan potasu w celu usunięcia pozostałości podłoża. Całość homogenizuje się w celu uzyskania jednorodnej zawiesiny i masę bakteryjną zawiesza się w nośniku stanowiącym 4,5% glutaminianu sodu do otrzymania stężenia co najmniej 10×10^6 jtk/mg *Mycobacterium bovis* BCG brazylijskiego podszczeptu Moreau, po czym prowadzi się proces homogenizacji poprzez intensywne rozcieranie kulkami stalowymi o średnicy 4 mm na mieszadło elektrycznym przez 5–10 minut przy obrotach 20 rpm/min i kącie nachylenia mieszadła 45°C i dozuje do opakowań jednostkowych z gumowymi korkami, które stanowią fiolki szklane, po czym poddaje się trzyetapowemu procesowi liofilizacji, gdzie w pierwszym etapie produkt umieszczony w jednostkowych opakowaniach zamraża się do temperatury -35°C w czasie 130 minut, po czym obniżono ciśnienie do wartości 9 Pa abs przy temperaturze płyt 23°C i temperaturze wymrażacza -51°C w czasie 12,5 godzin. Następnie prowadzono proces ogrzewania produktu do temperatury 37°C , przy temperaturze płyt 39°C i temperaturze wymrażacza -51°C oraz przy ciśnieniu 1,2 Pa abs w czasie 27 godzin, po czym jednostkowe opakowania zamknięto szczelnie utrzymując w nich podciśnienie o wartości od 1.0 Pa abs. Uzyskano koncentrację bakterii na poziomie 3×10^6 jtk/mg *Mycobacterium bovis* BCG brazylijskiego podszczeptu Moreau.

Zastrzeżenie patentowe

1. Sposób wytwarzania kompozycji farmaceutycznej zawierającej kulturę bakteryjną szczepu BCG należące do *Mycobacterium bovis* BCG brazylijskiego podszczeptu Moreau, polegający na ożywianiu prątków na podłożu, zawierającym kwas cytrynowy, asparaginę, dwupotasowy fosforan bezwodny, magnezu siarczan, amonu żelaza cytrynian, siarczan cynku, glicerol oraz inkubacji i przepasażowaniu uzyskanej hodowli prątków BCG, a także przepłukaniu otrzymanej masy bakteryjnej zbuforowanym roztworem chlorku sodu i dwufosforanu potasu, **znamienny tym**, że masę bakteryjną zawiesza się w nośniku stanowiącym co najwyżej 5% glutaminianu sodu, do otrzymania stężenia co najmniej 10×10^6 jtk/mg *Mycobacterium bovis* BCG brazylijskiego podszczeptu Moreau, po czym prowadzi się proces homogenizacji poprzez intensywne rozcieranie kulkami stalowymi o średnicy 4 mm na mieszadło elektryczne przez 5–10 minut przy obrotach 20 rpm/min i kącie nachylenia mieszadła 45°C , a następnie dozuje się do jednostkowych opakowań szklanych z korkami, po czym poddaje się trzyetapowemu procesowi liofilizacji, gdzie w pierwszym etapie produkt umieszczony w jednostkowych opakowaniach zamraża się do temperatury od -30°C do -40°C w czasie co najmniej 120–150 minut, po czym obniża się ciśnienie do wartości od 5 Pa abs do 15 Pa abs przy temperaturze płyt w zakresie 18°C – 28°C i temperaturze wymrażacza poniżej -50°C w czasie co najmniej 12,0–13,5 godzin, a następnie prowadzi się proces ogrzewania do temperatury produktu od 35°C do 39°C , przy temperaturze płyt od 36°C do 46°C i temperaturze wymrażacza poniżej -50°C oraz przy ciśnieniu 0,5 do 2 Pa abs w czasie 25–30 godzin, po czym jednostkowe opakowania zamyka się szczelnie utrzymując podciśnienie o wartości od 0,8 Pa abs do 1,2 Pa abs.