

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

308 157

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)
C12N 1/38 (2006.01)
C12R 1/145 (2006.01)
C12N 9/52 (2006.01)
A61K 35/39 (2015.01)
A61P 3/10 (2006.01)
C12N 5/071 (2010.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2017-537**
(22) Přihlášeno: **13.09.2017**
(40) Zveřejněno: **10.10.2018**
(Věstník č. 41/2018)
(47) Uděleno: **18.12.2019**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **29.01.2020**
(Věstník č. 5/2020)

(56) Relevantní dokumenty:

Igarashi Kazuhiko et al.: Synergistic Effect of Neutral Protease and Clostripain on Rat Pancreatic Islet Isolation 2015 Transplantation 99, 1349-1355, ISSN: 0041-1337; Paul de Vos: Enzymes for Pancreatic Islet Isolation Impact Chemokine-Production and Polarization of Insulin-Producing β -Cells with Reduced Functional Survival of Immunoisolated Rat Islet-Allografts as a Consequence, 2016, PLoS ONE 11, E-ISSN: 1932-6203; GenBank Q46085.1, KUNIKO YOSHIHARA, et al.: Cloning and Nucleotide Sequence Analysis of the colH Gene from Clostridium histolyticum Encoding a Collagenase and a Gelatinase, 1994, JOURNAL OF BACTERIOLOGY 176, 6489-6496; UniProtKB/Swiss-Prot: Q9X721.1, RecName: Full=Collagenase ColG; AltName: Full=Class I collagenase; AltName: Full=Gelatinase ColG; AltName: Full=Microbial collagenase; Flags: Precursor. Matsushita, O., et al.: Gene duplication and multiplicity of collagenases in Clostridium histolyticum, JOURNAL J. Bacteriol. 181 (3), 923-933 (1999).

(73) Majitel patentu:

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

(72) Původce:

RNDr. Marek Moša, Ph.D., Mečeříž, CZ

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

(74) Zástupce:

Rott, Růžička & Guttman

Patentové, známkové a advokátní kanceláře, JUDr.

Ing. Michal Guttman, patentový zástupce,

Vyskočilova 1566, 140 00 Praha 4, Michle

(54) Název vynálezu:

**Kmen bakterie Clostridium histolyticum,
kolagenáza připravená s použitím tohoto
kmene a její použití**

(57) Anotace:

Kmen bakterie *Clostridium histolyticum* uložený v CCM
- České sbírce mikroorganismů Masarykovy univerzity
Přírodovědecké fakulty, pod depozitním č. CCM 8656,
produkující za anaerobních podmínek při teplotě od
25 °C do 45 °C proteolytické enzymy včetně kolagenázy,
elastinázy, neutrálních proteáz a clostripainu. Použití
tohoto kmene k produkci směsi dvou kolagenáz col 1 a
col 2 o molekulové hmotnosti 116 kDa a 126 kDa a
případně clostripainu. Použití směsi uvedených kolagenáz
a případně clostripainu získané z uvedeného kmene pro
izolaci Langerhansových ostrůvků.

Kmen bakterie *Clostridium histolyticum*, kolagenáza připravená s použitím tohoto kmene a její použití

5 Oblast techniky

Vynález se týká nového kmene bakterie *Clostridium histolyticum*, jeho použití pro výrobu kolagenázy s vysokou výtěžností, enzymu kolagenázy připraveného s použitím tohoto kmene a použití tohoto enzymu kolagenázy pro izolaci Langerhansových ostrůvků.

10

Dosavadní stav techniky

Kolagenáza je proteáza schopná rozkládat bílkovinu kolagen (základní složku mezibuněčné hmoty, např. ve vazivu). Kolagenázy se běžně používají ve výzkumu, a to zejména v případě, kdy je potřeba rozrušit mezibuněčnou hmotu a uvolnit z ní buňky. V tomto ohledu se osvědčila clostridiopeptidáza A izolovaná z bakterie *Clostridium histolyticum* (název této bakterie, *histolyticum*, odráží právě její schopnost rozkládat tkáně). Enzym kolagenáza se používá nejen pro vědecké účely, ale našel své místo při léčení lidí i zvířat, zvláště pokud jde o léčení onemocnění kůže. Ve spojení s některými nespecifickými proteinázami urychluje hojení rány odstraňováním odumřelé tkáně a v důsledku toho zlepšuje epitelizaci. Kolagenáza se používá v případech transplantace tkáně a pro dezintegraci tkáně. Používá se při léčbě spálenin (poleptání) různých stupňů, proleženin, kožních vředů, strupů atd. Epitelizace a vyléčení kůže pomocí kolagenázy je kromě toho více účinné a rychlé, také zabraňuje tvoření koloidů (zbytnělých jizev nádorovitěho vzhledu) a hypertrofickému růstu jako výsledek utvoření rozpadlého kolagenu za působení kolagenázy.

Pro syntetizování kolagenázy jsou známy rozmanité druhy mikroorganismů, kultivovaných za definovaných podmínek. Bylo zjištěno, že mezi všemi organizmy, které dokáží syntetizovat kolagenázu, je nejlepším jejím producentem bakterie *Clostridium histolyticum*. MacLennan J.D., Mandl I. A Howes E.I.: J. Clin. Inv. 32, 1317 (1953) popsali podmínky pro růst *Clostridium histolyticum*. Zkoumali složení kapalného prostředí, které sestává hlavně z proteozového-peptonu, anorganických solí a roztoku vitamínů. Bakterie se kultivují při teplotě od 37 °C a při hodnotě pH 7,2. Berman S., Lewenthal J.P., Webster M. E., Altieri P.L. a Gochenour R.B.: J. Bact. 82, 582 (1961) rovněž zkoumali podmínky pro růst *Clostridium histolyticum* s cílem produkovat kolagenázu. Měli úspěch při kultivování *Clostridium histolyticum* v živném prostředí, neobsahujícím žádné anorganické soli, ale pouze proteozový pepton, enzymaticky hydrolyzované proteinu kaseinu a sóji (sójovou živnou půdu) a roztok vitamínu. Takové složení živného prostředí také podmiňuje další hodnoty podmínek, vyžadované pro uspokojivý růst a biosyntézu kolagenázy, jako je hodnota pH 8,5 a teplota od 30 °C.

Clostridium histolyticum je anaerobní bakterie a pro její kultivaci v kapalném prostředí musí být zabezpečeny anaerobní podmínky. Takahashi S., a Seifert S.: J. Appl. Bact. 35, 47 (1972) použili při svých výzkumech redukční činidla thioglykolát sodný a bisulfit sodný pro získání anaerobních podmínek, nezbytných pro bakteriální růst. Optimální výsledky, tj. nejvyšší výtěžek kolagenázy, byl získán při použití uvedených redukčních činidel v poměru 1:1.

Pro extrakci kolagenázy z různých zdrojů (jak bakteriálních, tak jiných) bylo doposud popsáno větší množství postupů využívajících nejrozličnější pufrací systémy a většinou zahrnující precipitaci k izolaci funkčního proteinu. Tyto postupy jsou však prováděny ve fyziologickém pH 7,4 až 7,6, které není optimální pro produkci bakteriální kolagenázy a za nízké teploty, která brání degradaci enzymu. Podstatou je, že se využívá fyziologické pH, které není pro *Clostridium* nejvhodnější. Např. Yoshida, E. and H. Noda, 1965. Isolation and characterization of collagenase I and II from *Clostridium histolyticum*. Biochem. Biophys. Acta, 10593: 562–574. DOI: 10.1016/S0926-6593(65)80239-9; nebo Sakamoto, S., P. Goldhaber and M.J. Glimcher, 1972.

The further purification and characterization of mouse bone collagenase. *Calcified Tissue Res.*, 10: 142–151. DOI: 10.1007/BF02012544; nebo Bond, M.D. and H.E. Van Wart, 1984. Characterization of the individual collagenases from *Clostridium histolyticum*. *Biochemistry*, 19: 3085–3091. DOI: 10.1021/bi00308 a036; nebo Matsushita, O., K. Yoshihara, S.I. Katayama, J. Minami and A. Okabe, 1994. Purification and characterization of a *Clostridium perfringens* 120–Kilodalton collagenase and nucleotide sequence of the corresponding gene. *J. Bacteriol.*, 176:149–156. PMID: PMC205026.

Také se využívají pro purifikaci kolagenázy jiné pufrů než Tris–HCl jako např. bikarbonát sodný, který by měl také napomáhat stabilitě kolagenázy. U použití bikarbonátu se užívá již vyšší pH, které–by je v našem případě vhodné pro kolagenázu z *Clostridium histolyticum*, ale kolagenáza je izolovaná z plžů. Indra, D., K. Ramalingam and M. Babu, 2005. Isolation, purification and characterization of collagenase from hepatopancreas of the land snail *Achatina fulica*. *Comparative Biochem. Phys.*, 142:1–7. DOI: 10.1016/J.CBPC.2005.02.004.

Také množství použitých iontů vhodných pro stabilitu a účinné působení enzymů degradujících extracelulární komponenty se u jednotlivých přístupů liší. Klímová, O.A., S.I. Borukhov, N.I. Solovyeva, T.O. Balaevskaya and A.Y. Strongin, 1990. The isolation and properties of collagenolytic proteases from crab hepatopancreas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 166:1411–1420. DOI: 10.1016/0006–291x(90)91024–M.

Kombinací použití specifického produkčního kmene ze sbírky MB Pharma a vhodných kultivačních podmínek dochází k dostatečné produkci požadovaných enzymů. Unikátní je kombinace kolagenázy produkované bakterií *Clostridium histolyticum* a zavedení optimálních podmínek pro její purifikaci. Nejdříve totiž stabilizujeme enzym dialýzou do pufru o vyšším pH (8), které je více přirozené pro kolagenázu *Clostridium histolyticum* než fyziologické pH ve výše uvedených postupech. Až postupnou dialýzou do pufrů o nižším pH se zajišťuje pozvolný přechod do fyziologických podmínek vhodnějších pro klinickou praxi.

Cílem tohoto vynálezu je poskytnout přípravek enzymu kolagenázy, který ve své finální podobě bude určen ke štěpení vazivových struktur pankreatu za účelem získání vitálních Langerhansových ostrůvků, které pak mohou být použity k transplantační léčbě diabetu. Kolagenáza je směsí 12 proteolytických enzymů a jiných proteinů získaných z filtrátu kultur *Clostridium histolyticum*. Digeste pankreatu probíhá v izolační komoře, která byla navržena Dr. Ricordim a spol. a používá se v téměř všech izolačních centrech Berková Z., Zacharovová K., Kříž J., Jiráček D., Girman P., Dovolilová E., Koblas T., Hájek M., Saudek F.: The impact of islet labeling with superparamagnetic nanoparticles for magnetic resonance imaging on islet vitality; 10th world congress of IPITA, Geneva, Switzerland, 4.–7.5.2005. Jedná se o uzavřený systém, ve kterém cirkuluje roztok kolagenázy a za mírného třepání dochází k postupnému uvolňování ostrůvků.

Podstata vynálezu

Podstatou řešení je kmen bakterie *Clostridium histolyticum* CCM 8656 produkující kolagenázu. Kolagenáza produkovaná uvedeným kmenem má následující charakteristiku:

Jedná se o směs dvou kolagenáz col 1 a col 2, které produkuje kmen bakterie *Clostridium histolyticum* (CCM 8656) o molekulové hmotnosti 116 kDa a 126 kDa. Ve směsi proteinů je kolagenáza a její přirozené degradované části, které tvoří většinu sušiny ve finálním produktu. Na gelu SDS–PAGE musí být patrné oba dva pruhy a je zde možnost i výskytu proužků o nižší molekulové hmotnosti, které mají stále katalytickou aktivitu. Oba druhy kolagenáz se skládají ze dvou peptidických domén, které jsou samy o sobě schopny rozkládat kolagen. Zbytek proteinu tvoří vazebná doména, která váže celý enzym k substrátu, a i když zvyšuje jeho aktivitu vazbou na kolagen, není pro aktivitu nezbytná. Menší molekuly samotných katalytických domén tak díky

- lepší difúzi v substrátu doplňují aktivitu poměrně velké molekuly kompletních enzymů. Kolagenáza musí mít specifickou aktivitu vyšší než 200 PZS/g. Tato jednotka (PZS/g) je definována, jako počet mikromolů substrátu rozložených jedním gramem enzymu za jednu minutu při teplotě 25 °C. Žádoucí může být i clostripainová aktivita, která však není nezbytně
 5 nutná. Clostripain může být žádoucí příměsí výsledné kolagenázové směsi. Jednotka U/mg je taková enzymová aktivita clostripainu, která katalyzuje hydrolýzu 1 μmol substrátu (BAEE) za 1 minutu při teplotě 25 °C, pH 7,6 a za přítomnosti 2,5 mmol/l DTT. Optimální hodnota aktivity by měla ležet mezi 1,2 až 1,45 U/mg.
- 10 Dalším předmětem vynálezu je použití kolagenázy pro izolaci Langerhansových ostrůvků.

Příklady uskutečnění vynálezu

- 15 Kmen bakterie *Clostridium histolyticum* s pracovním označením MB204 byl uložen ve sbírce mikroorganismů CCM – Česká sbírka mikroorganismů, Kamenice 5, 625 00 Brno dne 20.1.2016 pod č. CCM 8656. Kmen mikroorganismu *Clostridium histolyticum* CCM 8656, který byl námi vyšlechtěn (selektce dlouhotrvajícím pasážováním), byl získán ze směsi 3 kmenů, které byly získány z německé sbírky mikroorganismů kmenů jako kmeny DSM 627, 1126 a 2158.
- 20 Kultivace obecně probíhá v tryptonové půdě, vhodné pro dostatečnou produkci kolagenázy: (Trypton 60 g/l, pepton 1,5 g/l, NaCl 2,5 g/l, glukóza 1,25 g/l, Na₂HPO₄ 3,4 g/l) pH 8,4 před zaočkováním se do kultivačního média přidává 100 μl vitamínu K o zásobní koncentraci 1% a 100 μl L-cysteinu o zásobní koncentraci 0,5 g/ml. Kultura se kultivuje 24 hodin při 37 °C ±1 °C
 25 bez třepání. U kmenu došlo pomocí řízené evoluce a dlouhodobého pasážování (adaptivní laboratorní evoluce) (Dragonits, 2013. Dragonits M, Mattanovich D. Adaptive laboratory evolution – principles and applications for biotechnology. Microbial Cell Factories. 2013;12:64. doi:10.1186/1475–2859–12–64.) k delecí jedné kopie genu pro kolagenázu. Pomocí selekčního tlaku a dlouhodobé kultivace v laboratoři došlo k této selektivně výhodné delecí. I přes tuto
 30 delecí je kmen schopný produkovat velké množství obou typů kolagenázy. To může být způsobeno silným promotorem, který vynahradí produkci genů ze dvou míst v genomu. Do kultivačního média byl přidáván jako substrát kolagen, který selektivně podporoval tvorbu enzymu, jež jej má degradovat. Tím došlo k přirozené selekci kmenu, který je používán pro produkci bakteriální kolagenázy. Složení tryptonové půdy vhodné pro dostatečnou produkci
 35 kolagenázy s kolagenem: (Trypton 60 g/l, pepton 1,5 g/l, NaCl 2,5 g/l, glukóza 1,25 g/l, Na₂HPO₄ 3,4 g/l, kolagen 50 g/l) pH 8,4 před zaočkováním se do kultivačního média přidává 100 μl vitamínu K o zásobní koncentraci 1% a 100 μl L-cysteinu o zásobní koncentraci 0,5 g/ml. Kultura se kultivuje 72 hodin při 37 °C ±1 °C bez třepání ideálně v anaerobních podmínkách.
- 40 Charakteristika kmene *Clostridium histolyticum* CCM 8656: *Clostridium histolyticum* je anaerobní, gram–pozitivní bakterie. Bakterie jsou pohyblivé, peritrichální rovné tyčky o velikosti 0,5 až 0,9 x 1,3 až 9,2 μm a formují se do párů nebo krátkých řetězků. Buňky jsou schopny sporulace, za anaerobních podmínek jejich buněčná stěna obsahuje meso–DAP, glutamovou kyselinu a alanin. Při kultivaci na krevních plotnách jsou kolonie velké v průměru 0,5 až 2 mm,
 45 cirkulárního až nepravidelného tvaru, ploché až mírně konvexní, barvy bílošedé lesklé s granulami povrchovou mozaikou. Podobné kolonie lze také kultivovat i za aerobních podmínek, ale kolonií vzniká výrazně méně a jsou mnohem menší. Kultivace je tedy vhodná hlavně za anaerobních podmínek, kdy se produkuje velké množství požadované kolagenázy. Bakterie jsou schopny růstu při teplotě od 25 °C do 45 °C, ale optimální teplota růstu je 37 °C. Kmen
 50 *Clostridium histolyticum* CCM 8656 je silně proteolytický a produkuje značné množství různých proteolytických enzymů včetně kolagenázy, elastinázy, neutrálních proteáz a clostripainu. Kmeny této bakterie jsou citlivé k chloramfenikolu, penicilinu, erytromycinu a tetracyklinu. Kmeny jsou toxické, ale při dlouhé kultivaci jejich prokurzované proteázy mohou degradovat vlastní toxiny. Specifická 16S RNA (GenBank accession number 16S rRNA genu: M59094)

ukazuje, že tento druh je podobný druhům *Clostridium limosum* (97,2 %) a *Clostridium proteolyticum* (96,1 %).

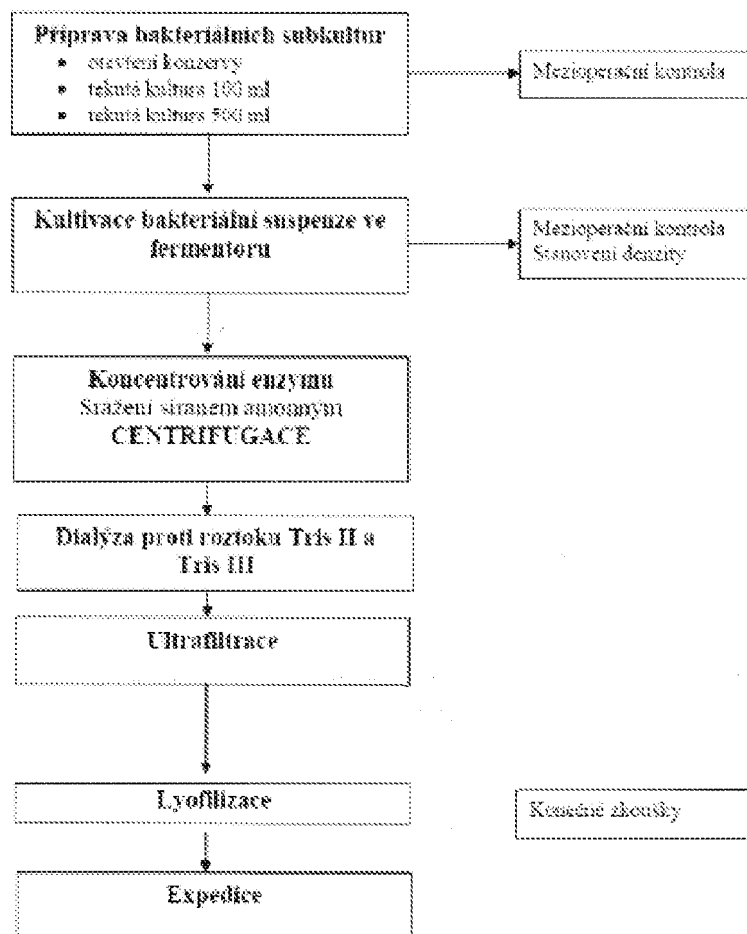
5 Kolagenáza pro izolaci Langerhansových ostrůvků je získávána jako metabolit bakterie *Clostridium histolyticum*. Tento enzym působí synergicky při procesu degradace kolagenu a jiných mezibuněčných komponent. Kolagenáza pro izolaci Langerhansových ostrůvků je obecně vhodná pro izolaci buněk z mnoha typů živočišných tkání. Přípravek je opatřen základní informací o enzymatické aktivitě. Optimální koncentraci enzymu a konkrétní podmínky pro použití degradací různých tkání je třeba určit empiricky. Enzym není animálního původu.

10 Kolagenáza pro izolaci Langerhansových ostrůvků je vhodná pro buněčné separace např. nádorových buněk, separace buněk myších ledvin, buněk plicních a různé epiteliální tkáně. Enzym lze použít i pro izolaci hepatocytů. Vzhledem k selektivní kolagenolytické aktivitě, která primárně nepoškozuje buněčné membrány, může být tento enzym použit jako obecně disperzní buněčný prostředek, a to i v podmínkách buněčných kultur. Obecně platí to, že orgány s vyšším obsahem kolagenu lze inkubovat s kolagenázou pro izolaci Langerhansových ostrůvků delší dobu a při vyšších koncentracích než při práci s jinými proteolytickými enzymy, aniž by buňky ztratily svoji viabilitu.

20 Alternativní aplikace kolagenázy podle vynálezu jsou při přípravě různých buněčných kultur, dále při výzkumu léčivých přípravků na bázi enzymatické aktivity kolagenázy a v různých transplantačních programech.

3 Schéma technologického postupu

25



Příklad 1:

Otevření a vyočkování konzervy:

- 5 Bakteriální kultura *Clostridium histolyticum* kmen č. CCM 8656 je uchovávána v zamrazovacím médiu při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebo formou lyofilizátu ve skleněné ampuli při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. 100 μl rozmražené kultury se vyočkuje do 100 ml tekutého média, které je těsně před vyočkováním sterilizováno a poté vytemperováno na teplotu $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dochází tak k odvzdušnění kultivační pudy vhodné pro kultivaci anaerobních bakterií. Složení tryptonové pudy vhodné pro dostatečnou produkci kolagenázy: (Trypton 60 g/l, pepton 1,5 g/l, NaCl 2,5 g/l, glukóza 1,25 g/l, Na_2HPO_4 3,4 g/l) pH 7,8 před zaočkováním se do kultivačního média přidává 100 μl vitamínu K o zásobní koncentraci 1% a 100 μl L-cysteinu o zásobní koncentraci 0,5 g/ml. Kultura se kultivuje 24 hodin při $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ bez třepání.
- 10
- 15 Po kultivaci je prověřena čistota bakteriálních kmenů výsevem na pevných půdách (kultivace anaerobně) a posoudí se morfologie buněk mikroskopicky.

Příprava kultivace ve velkém objemu:

- 20 Bakteriální kultura *Clostridium histolyticum* km. č. CCM 8656 nakultivovaná ve 100 ml média se odebere ze spodní části lahve. 5 ml kultury se zaočkuje do 500 ml tekutého média, které je těsně před vyočkováním sterilizováno a poté vytemperováno na teplotu $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dochází tak k odvzdušnění kultivační pudy vhodné pro kultivaci anaerobních bakterií. Složení tryptonové pudy vhodné pro dostatečnou produkci kolagenázy: (Trypton 60 g/l, pepton 1,5 g/l, NaCl 2,5 g/l, glukóza 1,25 g/l, Na_2HPO_4 3,4 g/l) pH 7,8 před zaočkováním se do kultivačního média přidává 100 μl vitamínu K o zásobní koncentraci 1% a 100 μl L-cysteinu o zásobní koncentraci 0,5 g/ml. Kultura se kultivuje 24 hodin při $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ bez třepání.
- 25

Kultivace ve fermentoru:

- 30 Ve fermentoru se připraví 19 litrů kultivační pudy (Trypton 60 g/l, pepton 1,5 g/l, NaCl 2,5 g/l, glukóza 1,25 g/l, Na_2HPO_4 3,4 g/l) pH 7,8 před zaočkováním se přidá 20 ml vitamínu K (zásobní 1%) a 20 ml L-cysteinu (zásobní 0,5 g/ml). Fermentor se zaočkuje 500 ml bakteriální kultury z předchozího kroku kultivace. Do takto připraveného kultivačního média se asepticky přesaje směsné inokulum. Po naočkování se provede odběr 0. vzorku. Kultivace probíhá při $+37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Podmínky kultivace se upravují dle nárůstu bakterií. Od zahájení kultivace se provádí úprava pH kontinuálním způsobem 2M roztokem NaOH na hodnoty $7,8 + 0,5$. Kultivace se provádí bez míchání a vzdušnění!
- 35
- 40 Kultivace se ukončí, jestliže 2 po sobě následující odběry nevykazují výrazný přírůstek a zároveň se nemění pH. Pokud se alespoň pH mění, kultivace probíhá 40 až 48 hodin.

Zpracování enzymu:

- 45 Po kultivaci se 20 litrů kultivačního média obsahujícího, jak bakterie, tak surovou kolagenázu, stočí do vhodné nádoby s 9,46 kg síranu amonného. Celá směs se rozmíchá, aby došlo k rozpuštění síranu amonného, poté je upraveno pH na hodnotu 6,8 až 7,6. Směs se nechá sedimentovat 4 až 7 dnů při teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po 4 až 7 dnech, je pomocí peristaltické pumpy odsán supernatant, při zachování co největšího objemu sedimentu bez jeho rozčeření. Sediment obsahující sraženou kolagenázu se přenese do dialyzačních hadic (cca 0,3 až 1 litr sedimentu). Dialyzační hadice se umístí do 10 l pufru Tris–Cl (Tris 0,75 g/l, CaCl_2 0,484 g/l, pH 10) a nechá se dialyzovat 3 hodiny. Poté se pufr vymění za dalších 10 l TRIS–HCl na 24 hodin. Dále se pufr vymění za 10 l Tris–HCl o jiném pH (Tris 0,36 g/l, CaCl_2 0,242 g/l, pH 7,5 až 8,5) na 24 hodin. Po této době znovu proběhne výměna za čerstvý Tris III. Pokud by se jevil dialyzát příliš hustý, může výměna Tris pufru proběhnout ještě 2 x za dalších 24 hodin.
- 50
- 55

- Po dialýze se obsah dialyzačních hadic rozlije do kyvet a stočí na centrifuze (3500 x G) po dobu 45 minut. Supernatant se slije do sterilní nádoby a přefiltruje přes filtr 0,45 µm. Následuje ultrafiltrace na kazetách millipore 50 kDa. Po použití této metody dojde k zakoncentrování a snížení objemu lyzátu. Po zakoncentrování kolagenázy na objem 120 ml se provede filtrace přes 0,45 µm filtr. Následuje rozplnění do lahvíček a lyofilizace produktu.

Příklad 2:

- Vyočkování a kultivace bakteriálního kmene *Clostridium histolyticum* CCM 8656 je stejné jako v příkladu 1. Po ukončení kultivace ve fermentoru však dojde k odstranění bakterií *C. histolyticum* centrifugací (7000 x G) a srážení kolagenázy síranem amonným se provádí pouze v supernatantu. Sraženina obsahující síran se sraženým proteinem se nechá sedimentovat 4 až 6 dnů při teplotě 4 °C. Po dialýze proti tlumivým roztokem Tris-HCl pufrů (stejně pufrů jako v příkladu 1) pak následuje opět ultrafiltrace na kazetách millipore s "cut off" 50 kDa. Po zahuštění proteinu se vzorek rozplní po 10 ml do lahvíček a lyofilizuje.

Příklad 3:

- Vyočkování a kultivace bakteriálního kmene *Clostridium histolyticum* CCM 8656 je stejné jako v příkladu 1. Po dialýze však nastává ultrafiltrace přes ultrafiltrační kazety nejprve s "cut off" 300 kDa pro odstranění balastních proteinů o velké molekulové hmotnosti. Takto se zvětší objem, jelikož se zachovává flow trough a poté se roztok ultrafiltruje na kazetě s "cut off" 50 kDa pro odstranění menších proteinů a degradovaných částí. Při tomto zakoncentrování se neustále dodává Tris-HCl pufr (Tris 0,36 g/l, CaCl₂ 0,242 g/l pH 7,5 až 8,5). Po zahuštění proteinu se vzorek rozplní po 10 ml do lahvíček a lyofilizuje.

Příklad 4:

- Vyočkování a kultivace bakteriálního kmene *Clostridium histolyticum* CCM 8656 je stejné jako v příkladu 1. Po ukončení kultivace ve fermentoru však dojde k odstranění bakterií *Clostridium histolyticum* centrifugací (7 000 x G). V tomto případě však nedochází ke srážení síranem amonným, ale dojde rovnou k zhušťování proteinu. Přes ultrafiltrační kazety nejprve s "cut off" 300 kDa se odstraní balastní proteiny o velké molekulové hmotnosti. Takto se zvětší objem, jelikož se zachovává flow trough a poté se roztok ultrafiltruje na kazetě s "cut off" 50 kDa pro odstranění menších proteinů a degradovaných částí a dojde ke snížení objemu. Po zahuštění proteinu se vzorek rozplní po 10 ml do lahvíček a lyofilizuje.

Metoda:

- Je popsáno několik metod purifikace kolagenázy, za použití srážení síranem amonným. Využíváme však jiné koncentrace pro optimální odstranění nežádoucích balastních proteinů a zachování enzymaticky aktivních proteinů (clostripain a neutrální proteázy) pro podporu vlastností finální kolagenázy, pro její využití při izolaci Langerhansových ostrůvků. Metoda využívá pouze srážení síranem amonným, dialýzu a systém ultrafiltrací, což je jednoduchá dobře proveditelná metoda na rozdíl od nákladné a velmi náročné metody purifikace pomocí chromatografie. Navíc jde tímto způsobem zpracovat velké objemy kolagenázy na rozdíl od chromatografických metod. Při této metodě zůstávají zachovány jiné proteiny, které ve správném poměru podporují aktivitu kolagenázy. Jelikož je při výrobě zpracována i bakteriální kultura, dostávají se tyto intracelulární proteiny do finálního přípravku. V jiných případech se zpracovává pouze supernatant po kultivaci a zde dochází ke ztrátám podpůrných enzymů. Metoda je také inovativní v použití dvou hodnot pH, kdy nejdříve sraženinu dialyzujeme proti pufru o vysokém pH. Toto je zavedeno pro zvýšení stability proteinu a vyššímu výtěžku.

- Sekvenace a PCR genu pro kolagenázu:

Před přípravou samotné DNA pro sekvenaci bylo potřeba ověřit, který z možných druhů kolagenázy produkuje kmen používaný pro výrobu. Na základě podobnosti a původu kmenů byl vytipován gen pro kolagenázu o velikosti 3967 bp. Na vytipovanou sekvenci byl navržen pár primerů pro PCR (KG Up: GGGATTATCTATGAAAAAAAAA, KG Low: AATTATTTATTTACCCTTAACTCA) a byla provedena PCR pro potvrzení přítomnosti genu v genomu bakterie. Reakce potvrdila přítomnost právě vytipovaného genu, což nám umožnilo identifikovat i proteinový produkt genu pro další analýzy proteinu. Důležitá byla hlavně sekvence aminokyselin a velikost proteinu (126 kDa).

Sbírka přihlašovatele MB PHARMA s.r.o. disponuje v současnosti třemi kmeny bakterie *Clostridium histolyticum*, které produkují nejen bakteriální kolagenázu, ale také v signifikantním množství clostripain a neutrální proteázy. Ty mohou, ale také nemusí, být potřebné pro výrobu finálního produktu. Při jejich absenci je však nutné je pro izolaci ostrůvků následně odděleně přidávat.

Jedná se o kmeny s pracovním označením MB 201, MB 202 a MB 204 (CCM 8656), kdy se pro účely hromadné výroby vybral kmen *Clostridium histolyticum* MB 204 (CCM 8656). U tohoto produkčního kmene byl sice gen pro kolagenázu potvrzen pomocí PCR, ale pro lepší charakterizaci bylo lepší stanovit celou sekvenci genomové DNA. Tím lze najít i geny pro clostripain a potenciální neutrální proteázy. Pro úspěšnou sekvenaci se proto musí připravit DNA ve velmi dobré kvalitě a koncentraci. Po sekvenování se musí zpracovat velké množství dat a hotové sekvence kontigů se poté musí anotovat. Sekvenovány byly všechny tři kmeny *C. histolyticum* a po anotaci jejich genomů se ukázalo, že kódují geny pro dva typy kolagenázy. Jak pro kolagenázu prokázanou pomocí PCR (col 2) tak i druhý typ kolagenázy o molekulové hmotnosti 116 kDa (col 1). Kmen MB 201 obsahoval gen pro col 1 ve dvou kopiích a gen pro col 2 pouze v jedné kopii, kmen MB 202 má naopak gen col 1 v jedné kopii a gen col 2 ve dvou kopiích. V produkčním kmenu MB 204 byly oba geny col 1 a col 2 pouze v jedné kopii.

V genomu všech kmenů se nachází gen pro clostripain. Tento enzym může napomáhat kolagenáze k lepšímu rozkladu tkání při izolaci Langerhansových ostrůvků. Ve finální směsi kolagenázy by měla tvořit hlavní složku kolagenáza a clostripain by měl být složkou minoritní. To se prokázalo.

Všechny kmeny *Clostridium histolyticum* disponují genem pro produkci clostripainu, ale alternativně by bylo výhodnější pro správný poměr kolagenázy a clostripainu produkovat oba enzymy zvlášť a směs vytvářet ve vhodném poměru až před aplikací. Clostripain má molekulovou hmotnost 43,4 kDa, takže by bylo možné jej poměrně snadno produkovat i jako rekombinantní protein např. v *E. coli*.

Jedná se o směs dvou kolagenáz col1 a col2, které produkuje bakterie *Clostridium histolyticum* CCM 8656 o molekulové hmotnosti 116 kDa a 126 kDa.

Col1, Mw: 116,3 kDa, pl: 5,82

Sekvence:

MKRKCLSKRLMLAITMATIFTVNSTLPIYAAVDKNNATAAVQNESKRYTVSYLKT LNYYDLVDLLVKTEIEN
LPDLFQYSSDAKEFYGNKTRMSFIMDEIGRRAPQYTRIDHKGIPTLVEVVVRAGFYLGPHNKELNEINKRSEK
ERVIPSILAIQKNPNFKLGTVEVQDKIVSATGLLAGNETAPPEVVMNFTPLQDCIKNIDRYALDDLKSKALFN
VLAAPTYDITEVLRATKEKPENTPWYGGIDGFINELKKLALYKINDNNSWIHDNGIYHIAPLGKLSNNKIG
IETLTEVMKVYPYLSMQHLQSADQIKRHYDSKDAEGNKIPLDKFKKEGKEKYCPKTYTFDDGKVIKAGAR
VEEEKVKRLYWASKEVNSQFFRVYGDKPLEEGNPDDILTMVYVNSPEEYKLNSVLYGYDTNNGGMYIEPE
GTFFTYEREAQESTYTLLEELFRHEYTHYLQGRYAVPGQWGRTKLYDNDRLTWYEEGGAELFAGSTRTSGIL
PRKSVSNIHNTTRNNRYKLSDTVHSKYGASFEFYNYACMFMDYMYNKMGMILNKLNDLAKNNDVGGY
DNYIRDLSNYALNDKYQDHMQERIDNYENLTVPFVADDYLVRHAYKNPNEIYSEISEVAKLDAKSEVKK
SQYFSTFTLRGSYTGGAASKGKLEDDQKAMNKFIDDSLKKLDTYSWSGYKTLTAYFTNYKVDSNNRVTYDVVF
HGYLPNEGDSKNSLPYKINGTYKGTKEKEKIFSSSEGSFDPDGKIVSYEWDGFGDNKSNEENPEHSYDKV
GTYTVKLVKVTDDKGESSVSTTTAEIKDLSENKLPVIYMHVPKSGALNQKVVIFYGKGTYPDGSAGYQWD
FGDGSDFSSEQNPESHVYTKGEYTVTLRVMDSGQMSEKTMKIKITDPVYPIGTEKEPNNSKETASGPIVP
GIPVSGTIENTSDQDYFYFDVITPGEVKIDINKLGYGGATWVVYDENNNNAVSYATDDGQNLSGKFKADKP
GRYYIHLYMFNGSYMPYRINIEGSGVR

5 Col 2, Mw: 126,2, pl: 5,62

Sekvence:

MKKNILKILMDSYSKESKIQTVRRTVSLLAVYLTMTNTSSLVLAKPIENTNDTSIKNVEKL RNAPNEENSKK
VEDSKNDKVEHVKNIEEAKVEQVAPEVKSKSTLRASIANNTNSEKYDFEYLNGLSYTELTLNIKNIKWNQIN
GLFNYSTGSQKFFGDKNRVQAIINALQESGRITYTANDMKGIETTFEVLRAFGYLGYYNDGLSYLNDRNFO
DKCIPAMIAIQKNPNFKLGTAVQDEVITSLGKLIGNASANAEEVNNCVPVLKQFRENLNQYAPDYVKGT
VNELIKGIEFDFSGAAYEKDVKTM PWYGGIDPFINELKALGLYGNITSATEWASDVGIYYLSKFGLYSTNRN
DIVQSLEKAVDMYKYGKIAFVAMERITWDYDGIGSNGKKVDHDKFLDDAEKHYPKTYTFDNGTFIIRAG
DKVSEEKIKRLYWASREVKSQFHRVVGNDKALEVGNADDVLTMKIFNSPEEYKFNNTNINGVSTDNGLVI
EPRGTFYTYERTPQQSIFSLEELFRHEYTHYLQARYLVDGLWGQGPFEKNRLTWFEDEGTAELFFAGSTRTS
GVLPRKSILGYLAKDKVDHRYSLKKTLSGYDDSDWMFYNYGFAVAHYLYEKDMPTFIKMNKAILNTDVK
SYDEIKKLSDDANKNTEYQNHQELADKYQGAGIPLVSDDYLDHGYKKASEVYSEISKAASLTNTSVTAE
KSQYFNTFTLRGTYTGETSKGEFKDWDEMSSKLDGTLES LAKNSWSGYKTLTAYFTNYRVTS DNKVQYD
VVFHGVLT DNADISNNKAPIAKVTGPSTGAVGRNIEFSKDSKDEDGKIVSYDWDFGDGATSRGKNSVH
AYKKAGTYNVTLKVTDDKGATATESFTIEKNEDTTTPTKEMEPND DIKEANGPIVEGVTVKGD LNSDD
ADTFYFDVKEDGDVTIELPYSGSSNFTWL VYKEGDDQNHASGIDKNN SKVGTGKSTKGRHYVFIYKHD SA
SNISYSLNIKGLGNEKLKEKENNDSSDKATVIPNFNTTMOGSLGDDSRDYYSFEVKEEGEVNIELDKKDEF
GVTWTLHPESNINDRITYGQVDGNKVSNKVKLRPGKYLLVYKYS GSGNYELRVNK

10

Ve směsi proteinů kolagenáza a její přirozené degradované části tvoří většinu sušiny ve finálním produktu. Obsahovat mohou také clostripain, případně neutrální proteázy zjištělné vhodnou metodou měření aktivity těchto příměsí. Podstatná je však přítomnost jak nedegradovaných kolagenáz, tak případně jejich částí. Na gelu 12% SDS-PAGE musí být patrné oba dva pruhy odpovídající velikosti 116 kDa a 126 kDa a je zde možnost i výskytu proužků o nižší molekulové hmotnosti, které mají stále katalytickou aktivitu. Pokud je použitý zymogram, mohou být tedy patrné lytické zóny i proteinů s nižší mol. hmotností. Menší molekuly samotných katalytických domén tak díky lepší difúzi v substrátu doplňují aktivitu poměrně velké molekuly kompletních enzymů. Kolagenáza musí mít specifickou aktivitu vyšší než 200 PZS/g. Tato jednotka je definována, jako počet mikromolů substrátu rozložených jedním gramem enzymu za jednu minutu při teplotě 25 °C. Žádoucí může být i clostripainová aktivita, která není nutná. Clostripain může být žádoucí příměsí výsledné kolagenázové směsi. Jednotka U/mg je taková enzymová aktivita clostripainu, která katalyzuje hydrolýzu 1 μmol substrátu (BAEE) za 1 minutu při teplotě 25 °C, pH 7,6 a za přítomnosti 2,5 mmol/l DTT. Optimální hodnota aktivity by měla ležet mezi 1,2 až 1,45 U/mg.

Kmen *Clostridium histolyticum* MB 204 uložený ve sbírce jako CCM 8656 měl mnohem vyšší výtěžnost kolagenázy než ostatní testované kmeny běžně použité pro produkci kolagenázy. Tento kmen sice na rozdíl od komerčně používaných bakterií obsahuje pouze po jedné kopii genu pro kolagenázu typu I a pro kolagenázu typu II, ale její produkce je zvýšená, pravděpodobně díky expresi způsobené silným promotorem. Navíc kmen produkuje minimální množství toxických proteinů, a během způsobu přípravy dochází k degradaci nežádoucích proteinů, což je velká výhoda pro praktické použití v transplantační medicíně.

Novým postupem v kombinaci s novým kmenem dochází k produkci stabilní kolagenázy z *Clostridium histolyticum*. Ve finálním produktu jsou při kultivaci relativně malého objemu dostatečné výtěžky obou typů kolagenáz. Dochází u ní sice k částečné degradaci, ale ta je spíše prospěšná v kombinaci s dostatečnou přítomností nedegradované části enzymu, jelikož degradované části si zachovávají stále proteolytickou aktivitu.

Enzym kolagenáza se používá k digesci tkáně slinivky břišní, při které dochází k uvolnění Langerhansových ostrůvků (LO), které mohou být použity k léčbě diabetes. Izolované LO pomocí kolagenázy musí splňovat přísná kritéria, aby mohly být transplantovány pacientům s diabetem. Nejdůležitějšími sledovanými parametry u izolace jsou: délka digesce, kvalita digesce, kvalita oddělení ostrůvků od exokrinní tkáně a kvalita získaných ostrůvků po izolaci a kultivaci. Kvalita ostrůvků je hodnocena pomocí barvení živých a mrtvých buněk, pomocí glukózou stimulované sekrece inzulínu beta buňkami LO (vyjádřena jako stimulační index) a pomocí měření spotřeby kyslíku. Pomocí kolagenázy podle vynálezu bylo dosaženo času digesce 15 min, a výtěžnosti v průměru 1000 LO, které si zachovávají dostatečnou vitalitu (více jak 95%). Tato kolagenáza je tedy vhodná pro izolaci LO pro transplantační účely.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Kmen bakterie *Clostridium histolyticum* uložený v CCM – České sbírce mikroorganismů Masarykově univerzity Přírodovědecké fakulty, Kamenice 5, 625 00 Brno pod depozitním číslem CCM 8656, produkující za anaerobních podmínek při teplotě od 25 °C do 45 °C proteolytické enzymy včetně kolagenázy, elastinázy, neutrálních proteáz a clostripainu.

2. Použití kmene bakterie *Clostridium histolyticum* CCM 8656 podle nároku 1 k produkci směsi dvou kolagenáz col 1 a col 2 o molekulové hmotnosti 116 kDa a 126 kDa.

3. Použití kmene bakterie *Clostridium histolyticum* CCM 8656 podle nároku 1 k produkci směsi dvou kolagenáz col 1 a col 2 o molekulové hmotnosti 116 kDa a 126 kDa a clostripainu.

4. Použití směsi dvou kolagenáz col 1 a col 2 získané z kmene bakterie *Clostridium histolyticum* CCM 8656 podle nároku 2 pro izolaci Langerhansových ostrůvků.
- 5 5. Použití směsi dvou kolagenáz col 1 a col 2 a clostripainu získané z kmene bakterie *Clostridium histolyticum* CCM 8656 podle nároku 3 pro izolaci Langerhansových ostrůvků.