



POLSKIEJ RZECZYPOSPOLITEJ LUDOWEJ

OPIS PATENTOWY

Nr 44918

Kl. 30 H, 6

Biogena, narodni podnik *)

Praga, Czechosłowacja

Sposób wytwarzania preparatów bakteriofagów w postaci stałej i suchej

Patent trwa od dnia 6 marca 1958 r.

Pierwszeństwo: 20 marca 1957 r. (Czechosłowacja).

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania pewnego i skutecznego preparatu do celów leczniczych i profilaktycznych w chorobach infekcyjnych, wywoływanych przez różne rodzaje patogenicznych mikroorganizmów (na przykład wszystkie rodzaje mikrobów dezynterii i innych mikrobów z grupy *Salmonella*, *Vibrio cholerae*, *E. coli* i *coli* 111 B 4, 55 B 5 i 26 B 6, gronkowce, *Proteus* itd.). Mikroby te zwalczano dotychczas za pomocą środków chemoterapeutycznych i antybiotyków. Okazało się jednak, że środki te nie są dostatecznie skuteczne głównie w przypadkach schorzeń chronicznych lub nosicieli bakterii.

W przeciwieństwie do tych sposobów leczenia fagoterapia stanowi szczególnie odpowiednią drogę dla tych przypadków.

*) Właściciel patentu oświadczył, że współtwórcami wynalazku są: Miroslav Meracek, Ernest Petera, Vaclav Houba, Jaroslav Mach i Antonin Stajskal.

W dotychczasowej literaturze fachowej nie ma wzmianek dotyczących sposobu wytwarzania wysuszonych, oczyszczonych i działających terapeutycznie bakteriofagów na drodze hodowli głębinowej.

Dotychczasowy sposób wytwarzania preparatów bakteriofagów polega na prowadzeniu w ciekłej pożywce hodowli statycznej, przy czym postać leczniczą stanowi ciekły bakteriofag. Sposób ten wykazuje wiele wad, ponieważ nie pozwala na: wytworzenie większej ilości preparatu w krótkim czasie, przy czym preparat posiada niskie miano bakteriofagów i słabe działanie w organizmie. Ponadto otrzymuje się preparat w niedogodnej postaci ciekłej, w której jest nietrwały i łatwo ulega zakażeniu obcą florą bakteryjną. Dozowanie tego preparatu nąstręcza również szereg trudności.

Sposób według wynalazku pozwala na otrzymanie preparatu w czasie krótszym i przy mniejszym nakładzie pracy aniżeli dotychczas,

przy czym preparat ten odznacza się dużą skutecznością działania i trwałością.

Stosowanie preparatów otrzymanych sposobem według wynalazku umożliwia skrócenie czasu trwania choroby i rekonwalescencji o około 75%. Zaletą ich jest jeszcze to, że przewyższają w działaniu terapeutycznym antybiotyki i środki chemoterapeutyczne, przy czym nie wykazują one ujemnych cech tych ostatnich.

Preparaty bakteriofagów (w myśl dotychczasowych doświadczeń epidemiologicznych) czynią zadość wszystkim założeniom, stawianym skutecznej fagoterapii w odniesieniu do zakaźnych chorób u ludzi.

Przykład epidemicznej dysenterii: typ Sonne
Terapia za pomocą:

	Bakterio- fagów	Chlor- amfeni- kolu	Środków chemo- terapeu- tycznych
Liczba leczonych osobników	27	24	16
Liczba osobników wyleczonych po 24 godzinach	21	19	—
Liczba osobników wyleczonych po 48 godzinach	6	—	—
		Osobnicy dodatkowo traktowani bakteriofagami i wyleczeni	

Sposobem według wynalazku głębinową hodowlę wybranych szczepów bakteryjnych prowadzi się na ciekłych pożywkach, wytwarzanych z hydrolizatów ciał białkowych (mięsa, kazeiny, soi itp.), przygotowanych w specjalnych naczyniach do hodowli i przewietrza za pomocą tlenu, mieszaniny tlenu z powietrzem lub powietrza mieszając przy tym w warunkach ściśle sterylnych.

Kulturę matkę szczepów bakteryjnych wytworzonej w odpowiedni sposób, w ciekłej pożywce, przenosi się do naczynia hodowlanego, w którym następuje rozmnożenie się bakteryjnej zawiesiny. Czas trwania rozmnażania jest charakterystyczny dla każdego rodzaju bakterii. Z zawiesiną rozmnożonych bakterii miesza się bakteriofag w ilości odpowiadającej jego mianu. Następujący potem proces lityczny przebiega w warunkach podobnych do warunków dotychczasowego rozmnażania bakteryjnej biomasy. Zakończeniu procesu litycznego towarzyszy obniże-

nie liczby mikroobów biomasy i sklarowanie pożywki, którą dopiero po inaktywizacji i przesączeniu zagęszcza się za pomocą odpowiedniej soli nieorganicznej, na przykład siarczanu amonowego. Wytrącanie bakteriofagów przeprowadza się w niskiej temperaturze, najczęściej w pobliżu temperatury 0°C, za pomocą stałego siarczanu amonowego, aż do całkowitego nasycenia roztworu. Wartość pH nastawia się na 6,9 i całość pozostawia przez noc w lodówce w temperaturze 4°C. Otrzymany osad odwirowuje się, następnie miesza z glukonianem wapniowym i suszy w próżni w temperaturze pokojowej. Wysuszoną mieszaninę przeprowadza się w lek o odpowiedniej postaci, na przykład dodaje się środków wypełniających i tabletkuje, a tabletki powleka warstewką odporną na kwasy, lub wysuszoną mieszaniną napelnia się kapsułki odporne na kwasy. Do ewentualnego parenteralnego stosowania usuwa się sól z koncentratu pożywki przez dializę i liofilizuje.

Preparaty bakteriofagów w postaci stałej i suchej odznaczają się wybitnym, właściwym i szybkim działaniem w organizmie, nie wywołują niepożądanych działań ubocznych, nie niszczą potrzebnej flory jelit i nie powodują rozwoju trwałych szczepów. Preparaty zachowują swoją biologiczną aktywność przez długi czas.

Dużą korzyść dla chorych przedstawia niekłopotliwy i wygodny sposób zażywania i dozowania tych preparatów, nie wymagający ścisłej kontroli lekarskiej.

Wysuszone preparaty z bakteriofagów można poza tym użyć zawsze do dalszej hodowli bakteryjnej.

Przykład. Wytwarzanie bakteriofagów dysenterii, szczep Sonne: Do 8000 ml sterylnej pożywki (pH = 7,6) w naczyniu do prowadzenia hodowli dodaje się 350 — 400 ml zawiesiny dysenterijnego szczepu Sonne, który rozmnożono metodą statyczną, w czasie 5-godzinnej hodowli w temperaturze 37°C. Hodowlę prowadzi się w temperaturze 37°C mieszając i przewietrzając. Próbkę kontrolną pobiera się po 90 — 120 minutach od zaszczepienia. W próbkach oznacza się wartość pH i ewentualnie nastawia na 7,6. Po trzech godzinach prowadzenia hodowli przy liczbie mikroobów wynoszącej około 2,5 miliarda/1 ml dodaje się 400 — 500 ml właściwych bakteriofagów dysenterii typu Sonne, otrzymanych przez statyczną lub zanurzoną fagolizę szczepu Sonne w ciekłej pożywce. Fagolizę sprawdza się w dwugodzinnych odstępach. Końiec fagolizy określa się z jednej strony wizual-

nie ze sklarowania się pożywki hodowlanej, z drugiej strony z obniżenia liczby mikrobów w 1 ml, a także przez biochemiczne sprawdzenie zawartości azotu w 1 ml. Następnie kulturę bakteriofagów spuszcza się z naczynia zachowując warunki aseptyczne, inaktywuje w łaźni wodnej w temperaturze 56°C i odsacza przez filtr Seitz'a. Z kolei przeprowadza się próbę na działanie rodzimych bakteriofagów według obowiązujących norm. Rodzimą pożywkę stęży się i oczyszcza. Otrzymany koncentrat pożywki oziębia się do temperatury 0°C i strąca za pomocą stałego siarczanu amonowego (dodawanego do całkowitego nasycenia). Wartość pH nastawia się za pomocą 4 n kwasu solnego na 6,9 i całość pozostawia w lodówce w temperaturze 4°C przez noc. Utworzony osad odwirowuje się w niskiej temperaturze. Do osadu dodaje się 10% (na wagę wilgotnego osadu) glukonianu wapniowego i mieszaninę suszy się w próżni w temperaturze pokojowej. Wysuszoną masę po dodaniu środków wypełniających tabletkuje się i powleka kwasoodporną warstwą lub wypełnia się nią kwasoodporne kapsułki. Optymalną liczbę bakteriofagów, zawartych w jednej tabletce oznacza się w każdej wyprodukowanej partii przez miareczkowanie. Zależnie od liczby bakteriofagów w tabletce można odpowiednio regulować dawkowanie.

W ten sam sposób można prowadzić hodowlę i przerób bakteriofagów także innych odmian

mikrobów jak na przykład dezynтерии, tyfusu, paratyfusu i pozostałych mikrobów *Salmonella*, *Vibrio cholerae*, *E coli* 111 B4, 55 B5 i 26 B6 gronkowców, *Proteus* itp.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania preparatów bakteriofagów w postaci stałej i suchej, znamieny tym, że prowadzi się hodowlę głębinową bakteriofagów w pożywce, wytworzonej z hydrolizatów ciał białkowych (mięsa, kazeiny, soi itp), przy czym podłoże zawiera odpowiednie mikroby, a otrzymaną kulturę inaktywuje się przez łagodne ogrzewanie i przesączenie przez filtr bakteriologiczny, a bakteriofagi wytrąca się za pomocą nieorganicznej soli, korzystnie siarczanu amonowego, po czym osad oddziela się i suszy.
2. Sposób według zastrz. 1, znamieny tym, że wytrącanie bakteriofagów przeprowadza się w niskiej temperaturze, korzystnie w pobliżu temperatury 0°C.
3. Sposób według zastrz. 1-2, znamieny tym, że wytrącone bakteriofagi przed suszeniem miesza się z glukonianem wapniowym.

Biogena, narodni podnik

Zastępca: mgr Józef Kamiński,
rzecznik patentowy