

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **21.07.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **23.07.1997**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/053470**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17.01.2001**
(Věstník č. 1/2001)

(86) PCT číslo: **PCT/US98/15257**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/04809**

(21) Číslo dokumentu:

2000 -144

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 38/46

A 61 P 31/00

A 61 P 31/04

/(A 61 K 38/46, A 61 K 31:43, A 61 K 38/46,
A 61 K 31:70, A 61 K 38/46, A 61 K 35:74)

(71) Přihlašovatel:

AMBI INC., Purchase, NY, US;

(72) Původce:

Goldstein Beth P., Weth Islip, NY, US;
Climo Michael W., Richmond, VA, US;
Novick Richard P., New York, NY, US;
Archer Gordon L., Richmond, VA, US;

(74) Zástupce:

Čermák Karel Dr., Národní třída 32, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Farmaceutické kompozice obsahující lysostafin,
samotné nebo v kombinaci s antibiotikem, pro
léčbu stafylokokových infekcí**

(57) Anotace:

Použití lysostaphinu nebo jeho varianty, která si zachovává
schopnost lysostaphinu proteolyticky štěpit glycin-obsahující
můstky s peptidoglykanu buněčné stěny stafylokoků, pro
výrobu léčiva pro léčení stafylokokových infekcí, které jsou
alespoň částečně resistantní vůči vankomycinu.

Léčivo pro léčení stafylokokových infekcí, které jsou alespoň částečně resistantní vůči vankomycinu

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká podání lysostaphinu pro léčbu stafylokokových infekcí u savců, včetně lidí, stejně jako farmaceutických prostředků použitých v takové léčbě. Předkládaný vynález se také způsobů léčby některých onemocnění, včetně stafylokokové endokarditidy; stafylokokové bakteriemie; a stafylokokových infekcí ledvin, plic, kůže, kostí, spálenin, ran a protetických prostředků. Vynález zahrnuje použití lysostaphinu obecně, jak přirozeného lysostaphinu, tak rekombinantního lysostaphinu; variant lysostaphinu, jejichž aminokyselinová sekvence se liší od publikované přirozené sekvence zralého proteinu (U.S. patent č. 4931390) z důvodů genetických mutací (jako jsou substituce, adice a delece), posttranslačního zpracování, genetického zpracování chimerických fúsních proteinů a kombinací takových úprav.

Dosavadní stav techniky

Lysostaphin je enzym, který byl poprvé identifikován v *Staphylococcus simulans* (dříve známý jako *S. staphylolyticus*), který má antimikrobiální aktivitu díky své proteolytické aktivitě na glycin-obsahující můstky v peptidoglykanech buněčné stěny bakterií (Zygmunt et al., Progr. Drug Res. 16: 309-333 (1972)).

In vitro je lysostaphin aktivní zejména proti *Staphylococcus aureus*, protože můstky buněčné stěny tohoto kmenu obsahují velké množství glycinu, i když byla také prokázána aktivita proti jiným kmenům *Staphylococcus* (ibid).

Aktivita lysostaphinu byla také vyšetřována na zvířecích modelech infekce. Studie, ve kterých byla po intraperitoneální infekci provedena intraperitoneální léčba jsou podobné in vitro pokusům a nejsou zde brány v úvahu. Existují dvě studie popisující přežívání 50% léčených myší, které byly infikovány intraperitoneálně a potom jim byla podána jedna nebo více podkožních dávek lysostaphinu v celkovém množství přibližně 1 mg/kg (Schuhardt et al., J. Bacteriol. 88: 815-816 (1964); Harrison et al., Can. J. Microbiol. 13: 93-97 (1967)). Bylo popsáno, že celková dávka 6 mg/kg chránila 100% myší v jedné z těchto studií (Harrison et al., výše). Zdá se, že virulence bakteriální infekce použité v obou studiích byla dosti nízká, protože neléčené myši nezemřely všechny během krátkého časového období.

Několik pokusů použilo myší subakutní model měřící obsah bakterií v ledvinách po infekci Giorgio kmenem *S. aureus* (Dixon et al., Yale J. Biol. Med. 41: 62-68 (1968); Schaffner et al., Yale J. Biol. Med. 39: 230-244 (1967); Harrison et al., J. Bacteriol. 93: 520-524 (1967)). Při podání prostředku obsahujícího lysostaphin intravenosně během 6 hodin po infekci bylo při dávkách 1,5 mg/kg nebo vyšších pozorováno významné snížení počtu bakterií v ledvinách. Nicméně, rozvinuté infekce byly více resistantní; pouze mírné snížení počtu bakterií bylo pozorováno tehdy, když byla léčba zahájena až za 24 hodin nebo za delší období, i při podání dávek 125 nebo 250 mg/kg prostředku obsahujícího lysostaphin. Efekt opakovaných podání nebyl studován.

Jedna studie, Goldberg et al., Antimicrob. Ag. Chemother. 1967, 45-53 (1967), použila omezeného počtu psů v neobvyklém modelu endokarditidy. Psí model nebyl dále vyvíjen. Pokus Goldberga et al. nebyl srovnávací a proto má omezený význam pro

hodnocení podávání lysostaphinu. Nicméně, vysoké dávky lysostaphinu (alespoň 50 mg/kg/léčbu) byly pouze středně účinné, jak bylo prokázáno zdravotním stavem psů a snížením počtu bakterií v srdečních chlopních a ledvinách.

Data dostupná v oboru pocházející z dřívějších studií provedených na zvířecích modelech neukazují na výhodnost a praktičnost použití lysostaphinu pro léčbu rozvinutých infekcí různých orgánů.

Byly provedené omezené studie na lidech, jejichž cílem byla eradikace nasálních nosičů *S. aureus* pomocí lokální aplikace lysostaphinu do nosních dírek (Martin et al., J. Lab. Clin. Med. 70: 1-8 (1967); Martin et al., J. Lab. Clin. Med. 71: 791-797 (1968); Quickel et al., Appl. Microbiol. 22: 446-450 (1971)). Nasální nosičství není samo o sobě nemocí. Představuje rizikový faktor infekce pacientů léčených kolonizovanými zdravotnickými pracovníky nebo riziko samo-infikování v případě kolonizovaných pacientů.

V oboru je popsána léčba velmi nemocného pacienta jednou dávkou parenterálně podaného lysostaphinu, po kterém následovala antibiotická léčba gentamicinem, o tři dny později. Pacient zemřel, ale byla u něj prokázána redukce bakteriémie (Stark et al., N. Engl. J. Med. 291: 239-240 (1974)).

Imunogenní fenomen pozorovaný v průběhu studií na lidech a na zvířatech má značný význam. Kontaminace lysostaphinu cizorodými substancemi může být odpovědná alespoň za část tohoto fenomenu.

Neproběhl další vývoj enzymu jako terapeutického činidla, z důvodů chybění požadované účinnosti v popsáných studiích. Dalším důvodem může být obtížná produkce a přečištění lysostaphinu.

Nyní byl sekvenován a klonován stafylokokový gen pro lysostaphin (U.S. patent č. 4931390). Lysostaphin pro použití jako laboratorní činidlo byl připraven fermentací nepatogenního rekombinantního kmene *Bacillus sphaericus*, ze kterého může být snadno přečištěn.

V oboru přetrvává potřeba terapeutického činidla, které může být podáno parenterálně a které může být použito pro léčbu stafylokokových infekcí obecně, stejně jako infekcí určitých tkání, jak je tomu například u endokarditidy.

Podstata vynálezu

Parenterální podání relativně nízkých dávek lysostaphinu (pod 50 mg/kg) je dramaticky účinnou terapií stafylokokových infekcí, zejména těch infekcí, které jsou resistantní na léčbu a/nebo těch infekcí, které jsou spojeny s významnou morbiditou a mortalitou. Dále, je prokázáno, že lysostaphin je účinným činidlem proti stafylokokovým bakteriím, které jsou alespoň částečně resistantní na dostupná antimikrobiální činidla, jako jsou beta-laktamová antibiotika včetně penicilinasa-stabilních penicilinů, vankomycinu atd.

Vynález dále obsahuje kombinovanou terapii obsahující alternativní nebo simultání podání lysostaphinu a jednoho nebo více dalších antimikrobiálních činidel. Zejména výhodnými antibiotiky pro podání s lysostaphinem ve způsobu podle předkládaného vynálezu jsou rifamyciny (izolované z mikroorganismů nebo připravené synteticky nebo semi-synteticky, jako je například rifampin) a glykopeptidy (skupina molekul, kde přirozené molekuly obvykle obsahují heptapeptid a jednu nebo více cukerných skupin), jak přirozené, tak izolované (jako je vankomycin, teicoplanin atd.) nebo semisyntetické prostředky.

Dostupnost klonovaného, rekombinantního a variantního lysostaphinu dále rozšiřuje předkládaný vynález. Byly identifikovány příbuzné enzymy a tyto enzymy mohou být dále použity s lysostaphinem nebo místo lysostaphinu.

Klonování a sekvenování genu pro lysostaphin umožňuje izolaci variantních enzymů, které mají vlastnosti podobné nebo odlišné od lysostaphinu. Byl charakterizován jeden takový enzym, který obsahuje jednu aminokyselinovou změnu a který je výsledkem naší práce, a bylo prokázáno, že má silnou anti-stafylokokovou aktivitu in vitro a ve zvířecím modelu infekce.

Další analogy lysostaphinu, včetně přirozených enzymů s homologií sekvence k sekvenci lysostaphinu a s endopeptidasovou aktivitou, nebo i chimerické enzymy získané fúzí vazebné domény jednoho enzymu na katalytickou doménu jiného enzymu, budou účinnými činidly schopnými léčby obtížně léčitelných bakteriálních onemocnění způsobených stafylokoky nebo jinými patogenními bakteriemi.

Popis obrázků na připojených výkresech

Obr. 1 je grafické znázornění baktericidní aktivity lysostaphinu proti kmenu *S. aureus* resistantnímu na meticilin, ve srovnání s vankomycinem.

Obr. 2 je graf znázorňující baktericidní aktivitu lysostaphinu proti různým kmenům *S. aureus* s různou resistantní na antibiotika.

Definice

Termíny použité v předkládaném vynálezu jsou použity, pokud je

to možné, ve svém obvyklém významu. Některé termíny jsou použity pro popis mechanismu působení nebo sloučenin, pro dosažení generického popisu prvků nebo vědeckého fenomenu, které jsou logicky v jedné skupině.

Analog lysostaphinu - jakýkoliv enzym, včetně lysostaphinu (přírozeného), jakékoliv mutanty nebo varianty lysostaphinu, jakékoliv rekombinantní nebo příbuzné enzymy, které mají proteolytickou aktivitu, in vitro a in vivo, působení na můstky obsahující glycin v peptidoglykanech buněčné stěny stafylokoků. Varianty mohou být připraveny posttranslačním zpracováním proteinu (jak pomocí enzymu přítomného v kmenu vyrábějícím variantu, tak pomocí enzymů nebo činidel použitých v jakémkoliv stadiu zpracování) nebo mutací strukturálního genu. Mutace zahrnují místní delece, inserce, odstranění domény a substituce. Anylogy lysostaphinu podle předkládaného vynálezu mohou exprimovány rekombinantně nebo jinak.

Parenterální podání - podání injekcí, včetně intravenosního, intramuskulárního, subkutáního, intraorbitálního, intraspinálního, intraperitoneálního podání a přímé perfuse nebo injekčního podání přímo do tkáně nebo orgánu (například intramedulárně).

Staphylococcus aureus je vysoce virulentní lidský patogen. Způsobuje mnoho lidských onemocnění, od lokalizovaných kožních infekcí až po život ohrožující bakteriemi a infekci vitálně důležitých orgánů. Pokud není rychle kontrolována, může se infekce *S. aureus* rychle šířit z prvotního místa infekce do jiných orgánů. Ačkoliv prvotní ložisko infekce nemusí být zřejmé, patří mezi orgány zejména citlivé na infekci srdeční chlopně, ledviny, plíce, kosti, mozkové pleny a kůže u pacientů s popáleninami. Chirurgické a traumatické rány a jakákoliv oblast, ve které je

přítomno cizí těleso, jsou také často infikovány. Tyto infekce, které mohou vznikat v kolektivu nebo během hospitalisace, jsou příčinou významné morbidity a mortality, která může dosahovat až 60% u vážných infekcí v určité populaci, i při použití nejlepší dostupné terapie. Jiné kmeny stafylokoků, koagulasa negativní stafylokoky jako je *S. epidermidis*) jsou méně virulentní, ale mohou kolonizovat katetry a protetické prostředky; to může mít vážné důsledky, například tehdy, je-li prostředkem implantovaná srdeční chlopeč.

Zdá se, že resistance na dostupná antimikrobiální činidla vzniká zvláště snadno u stafylokoků, od resistance na penicilin u *S. aureus*; tato resistance se objevila brzy po nástupu éry antibiotik. V podstatě všechny stafylokokové infekce, ať vznikající v kolektivu, nebo za hospitalisace, již nejsou citlivé na první generaci penicilinů z důvodů produkce penicilinasy; nyní jsou významným problémem kmeny resistantní také na penicilinasa-stabilní peniciliny (jako je methicillin), zejména u nosokomiálních infekcí. (Center for Disease Control and Prevention, 1997. Reduced susceptibility of *Staphylococcus aureus* to vancomycin -- Japan, 1996. Morbidity and mortality. Weekly report 46: 624-626 (1997)).

Vankomycin se stal lékem první linie pro stafylokokové infekce, zejména v nemocnicích. Nicméně, jak je zjevné z mortality, žádná dostupná léčba není ideální pro určitá onemocnění, jako je endokarditida a bakteriemie způsobená *S. aureus*, které vyžadují rychlé snížení počtu bakterií pro zabránění nevratného poškození srdce a jiných orgánů, do kterých se infekce často šíří krevním tokem. Jedním důvodem pro selhání dostupných terapií je to, že působí relativně pomalu, zejména in vivo, i v případech, kdy je žádoucí rychlá sterilizace infikovaných míst pro kompletní a rychlou úzdravu pacienta. U

takových život-ohrožujících infekcí, a u některých jiných infekcí (například u těch infekcí, které vyžadují dlouhodobou léčbu (například u osteomyelitidy)) mohou nová terapeutická činidla a nové kombinace terapeutických činidel značně zlepšit vyhlídky pacienta.

Bylo zjištěno, že lysostaphin je vysoce aktivní, při středních dávkách. Toto bylo prokázáno, jak je uvedeno dále, v dobře charakterizovaném zvířecím modelu vážné infekce, kterou je endokarditida králíků způsobená *S. aureus* resistantním *methicillin* (MRSA). Přesněji, prokázali jsme kompletní sterilizaci vegetací srdečních chlopní u téměř všech zvířat léčených jedním z dávkových režimů, což je bezprecedentní výsledek, který nebyl dosažen při léčbě dostupnými antimikrobiálními činidly. Dále jsme prokázali, že kombinace nižších denních dávek lysostaphinu se standardním terapeutickým činidlem potencuje antimikrobiální aktivitu složek v tomto modelu.

Použité dávky lysostaphinu byly významně nižší než dávky, u kterých byl v minulosti prokázán pouze omezený účinek na eliminaci bakterií z orgánů ve zvířecích modelech (Zygmunt et al., *Progr. Drug Res.* 16: 309-333 (1972); Goldberg et al., *Antimicrob. Ag. Chemother.* 1967, 45-53 (1967)).

Také jsme prokázali, jak je uvedeno dále, aktivitu alterované formy lysostaphinu proti stafylokokům, *in vitro* a v myším modelu akutní infekce, kde tato alterovaná forma lysostaphinu byla připravena mutagenesí rekombinantního kmene *Bacillus sphaericus* nesoucího gen pro lysostaphin. Dalším aspektem vynálezu je proto podání farmaceutického prostředku obsahujícího analog lysostaphinu, buď lysostaphin nebo jiné enzymy s peptidoglykanovou endopeptidasovou aktivitou, včetně geneticky

modifikovaných enzymů obsahujících jednu až pět aminokyselinových substitucí; enzymů s delecemi a insercemi až 10 aminokyselin, včetně delecí a insercí na N-konci; nebo včetně chimerických enzymů, které vznikají v důsledku fúze katalytické a vazebné domény různých enzymů, kde uvedený prostředek je podán jako terapeutické činidlo pro léčbu infekcí u lidí nebo zvířat.

Například, byla popsána jiná glycyglycin endopeptidasa (ALE-1 ze *Staphylococcus capitis* EPK1). ALE-1 je odlišná od lysostaphinu, ačkoliv mají tyto dva enzymy významnou homologii aminokyselin (Sugai et al., J. Bacteriol. 179: 1193-1202 (1997)). Jiná peptidoglykanová hydrolasa s nižším stupněm homologii k lysostaphinu mající také endopeptidasovou aktivitu je zoocin A produkovaný *Streptococcus zooepidemicus* 4881 (Simmonds et al., Applied and Environmental Microbiology 62: 4536-4541 (1996); Simmonds et al., Gene 189: 255-261 (1997)). Chimerické proteiny mohou být připraveny fúzí domény těchto nebo podobných enzymů na doménu analogu lysostaphinu.

Ačkoliv ve dřívějších studiích byly pozorovány některé imunologické vedlejší účinky, při použití vhodně přečištěných prostředků lysostaphinu, které jsou získány fermentací neškodných rekombinantních kmenů bakterií, se neočekává indukce imunogenních nebo jiných nežádoucích účinků.

Mezi použitelné farmaceutické prostředky obsahující tyto antimikrobiální enzymy patří vodné roztoky nebo suché prostředky (například lyofilizované, krystalické nebo amorfní, s nebo bez dalších solutů pro dosažení osmotické rovnováhy) vhodné pro rekonstituci s kapalinami, vhodné pro parenterální podání aktivního činidla. Podání je výhodně provedeno intravenózně (i.v.), intramuskulárně (i.m.), subkutánně (s.c.) nebo intraperitoneálně (i.p.) nebo intrathekálně nebo inhalací nebo

přímou instilací do postiženého místa tak, že mohou být dosaženy vyšší než minimální inhibiční koncentrace (MIC) aktivního činidla v krvi nebo ve tkáních a tím může být dosaženo redukce počtu bakterií, což vede k vyléčení nebo zmírnění infekce.

Dále, aktivní analog lysostaphinu může být podán současně, simultánně nebo sekvenčně, s jiným antimikrobiálním činidlem, takže je dosaženo účinnější léčby infekčního onemocnění. Prostředky mohou být v malých objemech kapaliny (nebo mohou být rekonstituovány v malých objemech kapaliny pro bolusové i.v. nebo periferní injekce nebo po přidání většího objemu i.v. infusního roztoku (nebo po rekonstituci ve větším objemu) mohou být podány pomalou i.v. infusí. Činidla, která jsou podána současně s lysostaphinem nebo jiným antimikrobiálním enzymem mohou být formulována společně s uvedeným enzymem jako fixní kombinace, nebo mohou být použita improvizovaně v jakémkoliv prostředku, který je dostupný a který je vhodný a mohou být podána jakýmkoliv způsobem, při kterém je dosaženo příslušných hladin těchto činidel v místě infekce.

Vhodné dávky a režimy podání lysostaphinu se mohou lišit podle závažnosti infekce a citlivosti infekčního organismu, a v případě kombinované terapie mohou záviset na použitém typu dalšího antimikrobiálního činidla. Dávky mohou být v rozmezí od 3 do 25-50 mg/kg/den, podaných v jedné dávce nebo v dělených dávkách, výhodně podaných v kontinuální infusi nebo rozdělených do dvou až čtyřech dávek za den.

Příklady provedení vynálezu

Všechny pokusy byly provedeny za použití analogů lysostaphinu připravených fermentací rekombinantních kmenů *B. sphaericus* upravených tak, že obsahují gen pro lysostaphin popsany Rescei

(U.S. patent č. 4931390) nebo jeho mutant. Přesněji, analogy lysostaphinu připravené fermentací *B. sphaericus* se liší od publikované sekvence v tom, že mají až o dvě méně nebo až o dvě více aminokyselin na N-konci.

Zde uvedená data jsou získána z pokusů využívajících přípravky rekombinantně produkovaných analogů lysostaphinu, kde hlavní složkou je analog, který nemá dvě N-koncové aminokyseliny publikované sekvence. Nicméně, objevy nejsou omezené na tyto přípravky. Podobné výsledky mohou být získány za použití jakéhokoli přípravku, který má vhodnou čistotu a aktivitu.

Příklad 1: Aktivita lysostaphinu in vitro

Jak ukazuje tabulka 1a, pokusy prokázaly, že přípravek lysostaphinu byl aktivní a baktericidní in vitro proti několika klinickým izolátům *S. aureus*; pomocí standartních mikrodilučních metod ředění v bujonu byly stanoveny minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC), které byly $\leq 1,0 \mu\text{g/ml}$ (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1993, Approved Standard M7-A3. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically - 3.vydání. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, PA; National Committee for Clinical Laboratory Standards, 192. Tentative Guideline M26-T. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, PA).

Dále bylo prokázáno, že lysostaphin je aktivní proti mnoha izolátům *Staphylococcus epidermidis* (koagulasa-negativní kmen) s $\text{MIC} \leq 8 \mu\text{g/ml}$ pro 11 ze 13 testovaných klinických izolátů. MIC byla definována jako nejnižší testovaná koncentrace, která

kompletně inhibovala viditelný růst bakterií a MBC byla definována jako nejnižší koncentrace, která usmrtila 99,9% bakterií počátečního inokula během 24 hodin po expozici. Jak ukazuje tabulka 1a, není citlivost na lysostaphin ovlivněna resistencí nebo sníženou citlivostí na methicillin a/nebo vankomycin. Kmeny *S. aureus*, které jsou resistantní na methicillin a které mají také pouze omezenou citlivost na vankomycin, se nově objevují v USA (Centers for Disease Control and Prevention, Morbidity and Mortality Weekly Report 1997, 46: 813 - 815).

Tabulka 1: Předběžná studie in vitro citlivosti *S. aureus* na lysostaphin

Kmen	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	MBC ($\mu\text{g/ml}$)
1573 ^{c,m}	0,5	1
27619 ^{c,m}	0,25	0,25
COL ^{c,m}	0,13	0,5
450M ^{c,m}	0,25	0,5
402 ^c	0,5	0,5
404 ^{c,m}	0,5	0,25
414	0,25	0,25
412	0,25	0,5
27286 ^{c,m}	0,25	0,5
27698 ^{c,m}	0,25	0,25
27222 ^{c,m}	0,25	0,25
27287 ^{c,m}	0,25	0,25
27295 ^{c,m}	0,13	0,25
29293 ^{c,m}	0,06	0,25
27621 ^{c,m}	0,06	0,25
27622 ^{c,m}	0,06	0,25
27619VR*	0,5	0,5
HP5827 ^{c,m,v}	0,5	0,5
HP5836 ^{c,m,v}	0,5	1

^c klinický izolát; ^m resistantní na methicillin; ^v VISA kmen (střední citlivost na vankomycin; * kmen se střední citlivostí na vankomycin laboratorně odvozený od klinického izolátu resistantního na methicillin.

Lysostaphin adhezuje na plastové materiály a může být takto ztracen z roztoku; tato skutečnost může ovlivnit jeho viditelnou aktivitu. Proto byla některá stanovení MIC provedena s přidáním 0,1% hovězího sérového albuminu (BSA) k ředidlu. Jinak byla technika stejná jako technika uvedená výše. Jak je uvedeno v tabulce 1b, in vitro aktivita lysostaphinu proti testovaným kmenům se zlepšila 8- až 64-krát při testování v přítomnosti BSA. Proto toto pozorování souvisí s afinitou lysostaphinu k plastovým materiálům, lze očekávat, že stafylokokové kmeny jsou citlivější k lysostaphinu, než bylo pozorováno dříve.

Tabulka 1b: Aktivita lysostaphinu proti *S. aureus* s a bez BSA

Kmen	MIC	
	s BSA	bez BSA
417	0,03	
414	0,03	0,25
404 ^{c,m}	0,008	0,5
401 ^c	0,015	0,5
27619 ^{c,m}	0,008	0,25
27295 ^{c,m}	≤0,004	0,13
27287 ^{c,m}	0,03	0,25
25756 ^{c,m}	0,008	

^c klinický izolát; ^m resistantní na methicillin

Tato data demonstrují velmi silnou aktivitu lysostaphinu proti současným klinickým izolátům *Staphylococcus aureus* s resistencí na více antibiotik.

Baktericidní aktivita lysostaphinu proti *S. aureus* byla také studována pomocí pokusů závislosti usmrcení bakterií na čase. V jednom pokusu tohoto typu byl *S. aureus* kmene AG461, klinický izolát resistantní na methicillin z Genoa, Italy, inokulován na

Mueller-Hinton bujon (Difco) a byla provedena kultivace při 37 °C s mírným třepáním, dokud nebylo dosaženo přibližně 10^8 živých buněk na ml (CFU/ml), jak bylo stanoveno absorbancí kultury při 600 nm. Kultura byla potom ředěna do čerstvého bujonu na přibližně 10^6 CFU/ml a 5 ml alikvoty byly umístěny do několika různých zkumavek, ve kterých byly vystaveny působení různých koncentrací antibakteriálních činidel. Inkubace pokračovala, za jemného třepání, při 37 °C a v pravidelných intervalech byly odebírány vzorky pro stanovení počtu živých buněk. Seriová 10-násobná ředění vzorků byla provedena ve sterilním salinickém roztoku (0,9% NaCl v destilované vodě) a 0,1 ml alikvoty (dvakrát) připravených roztoků byly umístěny na Tryptic Soy agarové plotny (Remel) za použití techniky inkluze v agaru. (V tomto způsobu je alikvota přidána do 2,5 ml vrchního agaru, který je promísen a nalit na plotnu. Vrchní agar se skládá z rozpuštěného Tryptic Soy agaru (Difco) ředěného 2-krát Difco Tryptic Soy bujonem na konečnou koncentraci agaru 0,75%, hmot./obj.). Plotny se inkubují po dobu 24-48 hodin při 36 °C a kolonie se počítají manuálně. Všechna ředění lysostaphinu byla provedena v přítomnosti 0,1 až 0,2% BSA, pro zabránění adsorpce lysostaphinu na plastové materiály. Vankomycin (Sigma Chemical Co.) byl ředěn ve sterilní destilované vodě.

Jak ukazuje obr. 1, měl lysostaphin v koncentracích 0,004 a 0,032 $\mu\text{g/ml}$ rychlou baktericidní aktivitu, při které usmrtil alespoň 99,9% bakterií během jednohodinového kontaktu. Při srovnání byl baktericidní účinek vankomycinu snížený a mnohem pomalejší, kdy během prvních třech hodin kontaktu bylo pozorováno usmrcení velmi malého počtu bakterií, i při použití mnohem vyšších koncentrací vankomycinu (2 a 16 $\mu\text{g/ml}$). Použité koncentrace lysostaphinu a vankomycinu byly jednonásobek a osminásobek příslušných MIC.

V jiném pokusu (obr. 2) byly tři různé klinické izoláty *S. aureus* resistantní na methicillin a čtvrtý kmen, 27619VR, labortárně získaný z VISA kmene (t.j. kmene se střední resistencí na vankomycin) odvozeného z klinického izolátu resistantního na methicillin, inokulovány na kationtově upravený Mueller-Hinton bujon (Becton Dickinson) a byly kultivovány při 37 °C přes noc. Tyto kultury byly potom ředěny do čerstvého bujonu a byla provedena kultivace při 37 °C s mírným třepáním, dokud kultury nedosáhly logaritmické fáze růstu. Jak ukazuje obr. 2, titry bakterií byly v této fázi v rozmezí od 2×10^6 do 9×10^7 CFU/ml. Do každé kultury byl přidán lysostaphin v koncentraci 1 µg/ml. V pravidelných intervalech byly odebírány vzorky, které byly seriově ředěny v 0,9% NaCl a které byly potom umístěny na Mueller-Hinton agar (Becton Dickinson). Agarové plotny byly inkubovány po dobu 48 hodin při 37 °C a kolonie byly počítány manuálně. Jak ukazuje obr. 2, všechny tyto kmeny byly rychle usmrceny lysostaphinem.

Tato data ukazují, že lysostaphin má silnou a rychlou baktericidní aktivitu proti současným klinickým izolátům *S. aureus*, včetně kmenů resistantních na methicillin a kmenů resistantních jak na methicillin, tak se střední resistencí na vankomycin.

Studie na zvířecím modelu

Příklad 2: Komparativní účinnost lysostaphin v myším modelu infekce *S. aureus*

Účinnost lysostaphinu byla srovnávána s účinností vankomycinu v myším modelu akutní infekce. *S. aureus* Smith byl kultivován přes noc, s mírným třepáním, ve Veal Infusion bujonu (Difco) a byl ředěn v bujonu obsahujícím 5% prasečí žaludeční mucin

(Difco). Samci Swiss-Webster myši (Taconic Farms, Germantown, NY) p hmotnosti přibližně 20 g byly infikovány intraperitoneálně 10^5 - 10^6 živými buňkami, což je přibližně desetinasobek inokula, které reprodukovatelně zabíjí všechna neléčená zvířata během 48 hodin. V každé léčebné skupině bylo 6 myši. Lysostaphin byl podán intravenosně (v 0,1 ml 5% dextrosy pro injekce) nebo subkutánně (v 0,2 ml), během 10 minut od infekce. Vankomycin byl podán podkožně.

Jak ukazuje tabulka 2, lysostaphin chránil 100% infikovaných myši při dávce 0,16 mg/kg intravenosně nebo v dávce 2,5 mg/kg podkožně. Vankomycin, který je u myši při podkožním podání úplně biologicky dostupný a který má podobnou aktivitu při podkožním i nitrožilním podání, byl 100% účinný v dávce 2,5 mg/kg. Všechny neléčené myši pošli do 24 hodin.

Tabulka 2: Účinnost lysostaphinu proti infekci *S. aureus* u myši

Dávka (mg/kg)	% přežití		
	lysostaphin i.v.	lysostaphin s.c.	vankomycin
0	0	0	0
0,08	33		
0,16	100		
0,31	100		
0,63	100		0
1,25		67	83
2,5		100	100
5		100	100
10		100	
20		100	

Tento příklad ukazuje, že lysostaphin je účinný proti infekci *S. aureus* v myším modelu akutní infekce využívajícím vysoce virulentní infekční dávky bakterií. Při intravenosním podání byly účinné mimořádně nízké dávky přečištěného rekombinantního

lysostaphinu. Podle hmotnostního srovnání byl lysostaphin 16-krát účinnější než vankomycin; podle molárního srovnání byl lysostaphin přibližně 200-krát účinnější než vankomycin.

Příklad 3: In vitro a in vivo aktivita varianty lysostaphinu

Kmen *B. sphaericus* obsahující klonovaný gen pro lysostaphin popsáný v U.S. patentu č. 4931390 byl podroben mutagenesi za použití N,N-nitrosoguanidinu. Přežívající kolonie byly vyšetřovány na přítomnost lytické aktivity tak, že byly umístěny na vrstvu teplem usmrcených buněk *S. aureus* kmene RN4880 a byla provedena inkubace přes noc při 32 °C. Byly vybrány ty kolonie, které produkovaly významné jasné zony.

Jeden z těchto klonů byl dále charakterizován. Gen pro lysostaphin byl sekvenován a bylo zjištěno, že obsahuje jednu G-na-A mutaci v kodonu odpovídající pozici 218 zralého lysostaphinu, která vedla ke změně kodonu z GGT (glycin) na GAT (kyselina asparagová). Fermentací tohoto mutantního kmenu bylo získáno dostatečné množství materiálu pro in vivo a in vitro testování.

Jak ukazuje tabulka 3, byl variantní enzym vysoce aktivní proti *S. aureus* in vitro, ačkoliv přirozený lysostaphin byl o něco více aktivní. V tomto pokusu byly MIC stanoveny makroředěním bujony v 1 ml konečných objemech ve skleněných zkumavkách. Jinak byl postup stejný jako postup popsáný výše.

Tabulka 3: Aktivita variantního lysostaphinu proti *S. aureus* in vitro

	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			
	AG417	AG404 ^{c, m}	AG402 ^c	AG414
Gly218Asp přirozený lysostaphin	0,03	0,06	0,06	0,03
	0,004	0,008	0,008	0,004

^c klinický izolát; ^m resistantní na methicillin

Jak ukazuje tabulka 4, byl variantní lysostaphin také vysoce aktivní proti *S. aureus* v myším modelu akutní infekce. Opět byl variantní lysostaphin o něco méně aktivní než přirozený lysostaphin, ale byl aktivnější než vankomycin.

Tabulka 4: Aktivita variantního lysostaphinu proti *S. aureus* v myším modelu infekce

Dávka (mg/kg)	% přežití			
	kontrola	lysostaphin	Gyl218Asp	vankomycin
0	0			
0,04		0		
0,08		17	0	
0,16		83	17	
0,31			33	
0,63			83	0
1,25				83
2,5				100

Příklad 4: Antimikrobiální aktivita v séru králíků léčených lysostaphinem

Bílím králíkům New Zealand o hmotnosti přibližně 5 kg bylo intravenosní infusí podáno 125 mg lysostaphinu. Vzorky krve byly

odebírány v intervalech do 4 hodin a bylo připraveno sérum; byla připravena dvojnásobná seriová ředění a byl stanoven baktericidní titr séra proti kmenu *S. aureus* resistantnímu na methicillin (MRSA 27619). Baktericidní titr séra je nejvyšší ředění, které zabíjí 99,9% inokula během 24 hodin. V tomto testu je přežívání bakterií hodnoceno v podstatě způsobem použitým při stanovení minimální baktericidní koncentrace s tou výjimkou, že mikrotitrační jamky obsahují různá ředění séra místo různých koncentrací roztoku přečištěného antimikrobiálního činidla.

Jak ukazuje tabulka 5, obsahovalo sérum vysoce baktericidní koncentrace lysostaphinu během celého období. Konkrétně, v období od 30 minut do 120 minut byl titr vyšší než 1:256 (nejvyšší testované ředění), což naznačuje, že 256-násobné ředění bylo stále schopno usmrtit 99,9% bakterií. V nejzašší testované dobu, ve 240 minutách, byl titr 1:64.

Tabulka 5: Sérový baktericidní titr lysostaphinu po podání 125 mg 5 kg králíkům

Doba po podání infuse (min)	Sérový baktericidní titr
0	1:128
30	>1:256
60	>1:256
90	>1:256
120	>1:256
240	1:64

Tento příklad ukazuje, že lysostaphin si zachovává baktericidní aktivitu v séru králíků a že zůstává přítomný a aktivní v cirkulaci po dobu alespoň 4 hodin po injekci.

Příklad 5: Účinnost lysostaphinu při experimentální endokarditidě u králíků

Endokarditida aortální chlopně byla vyvolána u New Zealand bílých králíků o hmotnosti přibližně 3 kg. Králíci byli uvedeni do anestezie a byla obnažena pravá arteria carotis a byla kanylována polyethylenovým katetrem, který byl zasunut do levé srdeční komory. Po alespoň 24 hodinách byli králíci intravenosně infikováni 10^6 až 10^7 buněk *S. aureus* resistantního na methicillin (MRSA 27619). O dvacet čtyři hodin později byla zvířata náhodně rozdělena do různých léčebných skupin: neléčené kontroly (9 králíků); pozitivní kontroly, vankomycin 30 mg/kg dvakrát denně (15); lysostaphin 5 mg/kg třikrát denně (11); lysostaphin 5 mg/kg jednou denně (10); lysostaphin 5 mg/kg jednou denně + vankomycin 30 mg/kg dvakrát denně (11). Králíci, jejichž infekce nebyla potvrzena předléčebnou hemokulturou, byly vyloučeny. Kromě toho, u všech králíků v testu bylo při pitvě potvrzeno, že měly rozvinutou endokarditidu, jak bylo potvrzeno přítomností aortálních vegetací, které ukazují na probíhající nebo v minulosti přítomné onemocnění.

Veškerá léčba byla intravenosní a byla prováděna po dobu 3 dnů. Zdravotní stav králíků byl hodnocen v pravidelných intervalech. Králíci byly utraceni 18 hodin po poslední léčbě. Aortální vegetace byly odstraněny a zváženy a analyzovány na počet živých bakterií, který byl vyjádřen jako $\log_{10}$ CFU/gram. Limit detekce je 10^2 CFU/gram ($\log_{10}$ CFU/gram = 2,0). Průměrné titry bakterií na gram byly porovnávány jednocestnou analýzou variance. Student-Newman-Keulsův test byl použit pro úpravu pro mnohočetná srovnání. Srovnání rychlosti sterilizace bylo provedeno za použití Fisherova exaktního testu. Statistická významnost byla definována jako $p \leq 0,05$.

Jak ukazuje tabulka 6, režim 5 mg/kg lysostaphin tři-krát denně byl nejúčinnější léčbou. Významné je, že tato léčba kompletně sterilizovala vegetace srdeční chlopně u všech králíků

kromě jednoho. Toto byl mnohem lepší výsledek, než je výsledek dosažený při použití standardního režimu, který byl v tomto modelu infekce použit jako pozitivní kontrola. Režim 5 mg/kg lysostaphinu jednou denně byl méně účinný než režim obsahující podání třikrát denně, ale byl téměř stejně účinný jako vankomycin v redukci počtu bakterií ve vegetacích; tento efekt nebyl statisticky významně odlišný od efektu při podání vankomycinu. Při použití režimu podání lysostaphinu jednou denně bylo také u některých zvířat dosaženo kompletní sterilizace některých zvířat. Při přidání lysostaphinu jednou denně ke standardnímu režimu obsahujícímu podání vankomycinu došlo k výraznému snížení průměrného počtu bakterií, téměř na úroveň pozorovanou při podávání lysostaphinu třikrát denně. Nicméně, v počtu kompletně sterilizovaných vegetací bylo podávání lysostaphinu třikrát denně jasně lepší než jiné režimy.

Tabulka 6: Účinnost lysostaphinu proti endokarditidě způsobené *S. aureus* u králíků

Léčba	Průměr $\log_{10}$ CFU/gram vegetace $\pm$ standardní odchylka	Počet sterilních vegetací/celkový počet léčených zvířat
neléčená kontrola	10,73 $\pm$ 1,58	0/9
vankomycin 30 mg/kg dvakrát denně	5,91 $\pm$ 1,67 ^a	0/15
lysostaphin 5 mg/kg jednou denně	7,08 $\pm$ 3,74 ^a	2/10
lysostaphin 5 mg/kg třikrát denně	2,26 $\pm$ 0,85 ^{a, b}	10/11 ^c
lysostaphin 5 mg/kg jednou denně + vankomycin 30 mg/kg dvakrát denně	3,23 $\pm$ 1,41 ^{a, b}	3/11

^a $p < 0,05$ při srovnání s neléčenou kontrolou;

^b $p < 0,05$ při srovnání s vankomycinem;

^c $p = 0,008$ vs lysostaphin jednou denně + vankomycin

Ledvinné abscesy byly také hodnoceny na přítomnost stafylokoků. Podávání lysostaphinu třikrát denně výrazně redukovalo obsah bakterií ve srovnání s neléčenou kontrolní skupinou na těsně nad 10^2 CFU/gram tkáně ve skupině léčené lysostaphinem ve srovnání s o něco méně než 10^8 CFU/ gram tkáně u kontrol.

Pozorování zvířat prokázalo, že králíci léčení lysostaphinem třikrát denně byli všichni v dobrém zdravotním stavu brzy po zahájení léčby.

Tyto výsledky nemohly být předvíhány na základně předešlých studií. Konkrétně, sterilizace v podstatě všech vegetací nebyla nikdy předtím popsána pro žádné antimikrobiální činidlo v tomto modelu infekce. Skutečnost, že ke sterilizaci došlo během relativně krátké léčby, 3 dnů, naznačuje, že lysostaphin účinkuje velmi rychle in vivo a naznačuje také, že analogy lysostaphinu s antimikrobiální účinností mohou značně zlepšit vyhlídky pacientů s vážnými stafylokokovými infekcemi, které vyžadují rychlé snížení počtu bakterií.

Výše uvedená data dokazují účinnost analogů lysostaphinu proti *S. aureus*, včetně MRSA (*S. aureus* resistantní na methicillin). Kmeny, které jsou resistantní jak na methicillin, tak na vankomycin, jsou novým problémem. Různé kmeny tohoto typu byly vybrány po cyklech kultivace na mediu obsahujícím glykopeptid. MIC vankomycinu pro vybraný kmen byla 8 $\mu\text{g/ml}$, jak je popsáno také pro přirozené VISA kmeny izolované od pacientů v USA a Japonsku (Centers for Disease Control and Prevention, Morbidity and Mortality Weekly Report 1997, 46: 813 - 815). Stafylokokové izoláty se považují za citlivé na vankomycin tehdy, je-li MIC nižší nebo rovna 4 $\mu\text{g/ml}$ a považují se za zcela resistantní na vankomycin, je-li MIC vyšší nebo rovna 32 $\mu\text{g/ml}$ (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1993, Approved

Standard M2-A5. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests - 5. vydání. (National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, PA).

Jak ukazuje tabulka 7, lysostaphin byl účinný při léčbě králíků s infekční endokarditidou způsobenou VISA kmenem resistantním na methicillin.

Tabulka 7: Účinnost lysostaphinu při endokarditidě u králíků způsobené VISA kmene *S. aureus* resistantním na methicillin

Léčba	CFU/g vegetace*	sterilní vegetace/ vegetace celkem
kontrola	10,3	0/10
vankomycin 30 mg/kg dvakrát denně	6,95	0/13
lysostaphin 5 mg/kg třikrát denně	6,29	2/10
lysostaphin 15 mg/kg dvakrát denně	4,0**	0/5

* vyjádřeno jako $\log_{10}$ průměru

** signifikantně lepší než vankomycin nebo nižší dávka lysostaphinu ($p < 0,05$).

V případě VISA kmenu byl lysostaphin v dávce 5 mg/kg třikrát denně stejně účinný jako vankomycin ve snížení počtu bakterií v aortálních vegetacích. Dávka lysostaphinu 15 mg/kg dvakrát denně byla účinnější než standardní režim podávání vankomycinu (statisticky významně) a také byla statisticky významně lepší než lysostaphin v dávce 5 mg/kg podávaný třikrát denně. Dále, při podávání vankomycinu, i v dávce 30 mg/kg dvakrát denně, nebylo dosaženo kompletní sterilizace vegetací srdeční chlopně u žádného testovaného zvířete. Naopak, kompletní sterilizace byla dosažena u některých zvířat při podávání lysostaphinu třikrát denně.

Model králičí endokarditidy je v současnosti velmi dobře standardizován a je přijímán jako rigorosní test schopnosti antimikrobiální činidel vyléčit závažné infekce u lidí. Předešlé práce týkající se lysostaphinu v léčbě rozvinutých infekcí ukázaly omezené snížení počtu bakterií v ledvinách v myším modelu a v srdečních chlopních a jiných orgánech v modelu endokarditidy u psů, při použití dávek od 50 do 250 mg/kg/léčbu. I přes vysoké dávky použité v těchto studiích nebyla pozorována účinnost dostatečná pro léčbu závažných stafylokokových infekcí. Výsledky předešlých studií nemohly vést k předpokladu rychlé, úplné sterilizace prakticky všech vegetací srdeční chlopně, jak bylo pozorováno nyní při použití nízkých dávek lysostaphinu v modelu endokarditidy u králíků.

Výsledky zde uvedené dokazují nejen neočekávanou účinnost lysostaphinu při endokarditidě způsobené *S. aureus*, ale také ukazují, že tato účinnost je mnohem lepší než účinnost očekávaná při standardní léčbě. Současné dostupné léčby nejsou často účinné v léčbě život ohrožujících infekcí, které mohou vést k nevratnému poškození tkání a které proto vyžadují rychlé snížení počtu bakterií, aby se zabránilo takovému postižení, stejně jako šíření infekce do jiných vitálních orgánů. Výše uvedené výsledky naznačují, že analoga lysostaphinu, samostatně nebo v kombinaci s jinými činidly, mají potenciál účinnosti pro léčbu takových infekcí. Dále, podle těchto výsledků a podle in vitro aktivity lysostaphinu proti stafylokokům je možno očekávat, že analogy lysostaphinu, samostatně nebo v kombinaci s jinými činidly, budou použitelné proti jiným kmenům stafylokoků než je *S. aureus*. Mezi činidla, která jsou vhodná pro použití spolu s lysostaphinem, patří vankomycin a jiné glykopeptidy, rifampin a jiné rifamyciny a jiná anti-infekční činidla, která mají aktivitu proti stafylokokům.

Analogy lysostaphinu mohou být použity nejen při léčbě stafylokokové endokarditidy, ale také jiných potenciálně letálních stafylokokových onemocnění, jako je bakteriemie a infekce jiných vitálních orgánů, jako jsou ledviny, plíce kůže a kosti. Způsoby podle předkládaného vynálezu jsou také použitelné pro léčbu infekcí při popáleninách, infekce ran a protetických prostředků. Stejně metody mohou být použity konkrétně při léčbě onemocnění jako je osteomyelitida, která je infekcí vyžadující dlouhodobou léčbu současnými antimikrobiálními činidly. Předkládaný vynález dále zahrnuje použití analogů lysostaphinu infekcí a onemocnění, které jsou způsobeny stafylokoky resistantními na běžně používaná antibiotika.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Použití lysostaphinu nebo jeho varianty, která si zachovává schopnost lysostaphinu proteolyticky štěpit glycin-obsahující můstky v peptidoglykanu buněčné stěny stafylokoků, pro výrobu léčiva pro léčení stafylokokových infekcí, které jsou alespoň částečně resistantní vůči vankomycinu.

2. Použití podle nároku 1, kde léčení zahrnuje podávání dávky 3 až 50 mg/kg/den.

3. Použití podle nároku 2, kde léčení zahrnuje podávání dávky 3 až 25 mg/kg/den.

4. Použití podle nároku 1, 2 nebo 3, kde léčení zahrnuje podávání lysostaphinu nebo jeho varianty spolu s alespoň jedním jiným antimikrobiálním činidlem.

5. Použití podle nároku 4, kde jiným antimikrobiálním činidlem je rifamycin nebo glykopeptid.

6. Použití podle nároku 1, 2, 3, 4 nebo 5, kde infekce sídlí v srdečních chlopních, krvi, ledvinách, plicích, kostech nebo měkkých plenách mozkových nebo je spojena s použitím katetru nebo protetického zařízení.

7. Použití podle nároku 6, kde infekcí je endokarditida, osteomyelitida nebo bakteriemie.

8. Použití podle nároku 1, 2, 3, 4, 5, 6 nebo 7, kde léčená infekce je lidská.

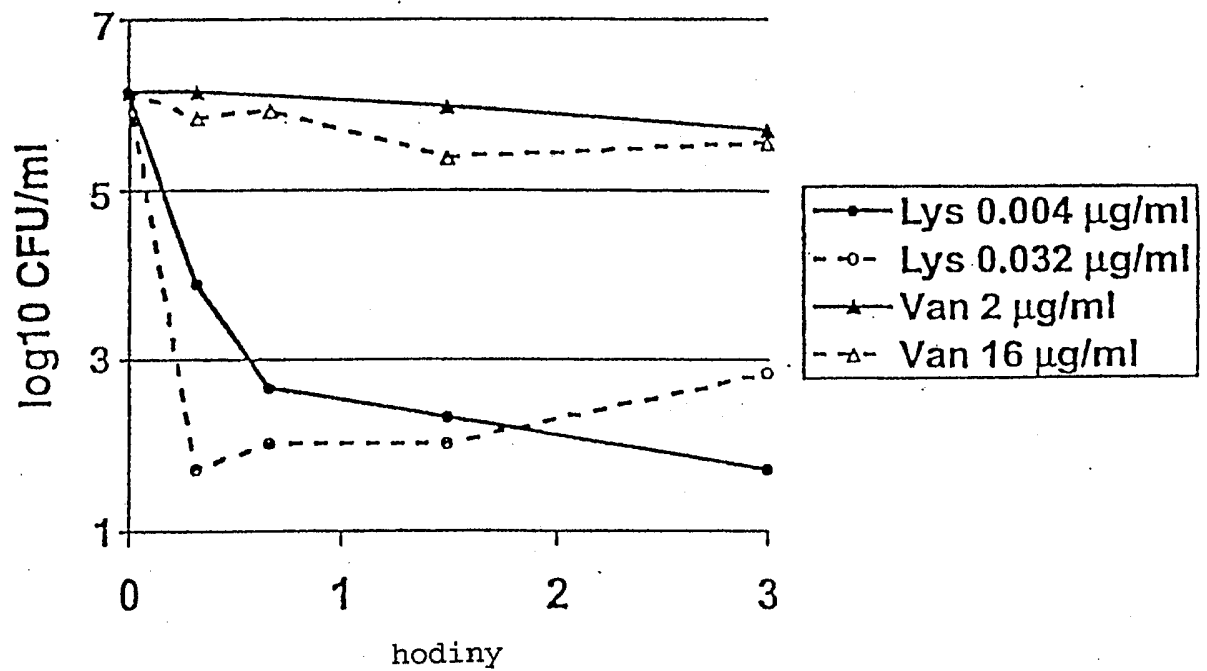
30.10.00

9. Použití podle nároku 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 nebo 8, kde lysostaphin nebo jeho varianta je vyrobena rekombinantně.

10. Použití podle nároku 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 nebo 9, kde infekce je vyvolána kmenem Staphylococcus aureus, který je methicillin-resistentní a vykazuje střední susceptibilitu k vankomycinu.

~~01-100-00-če~~

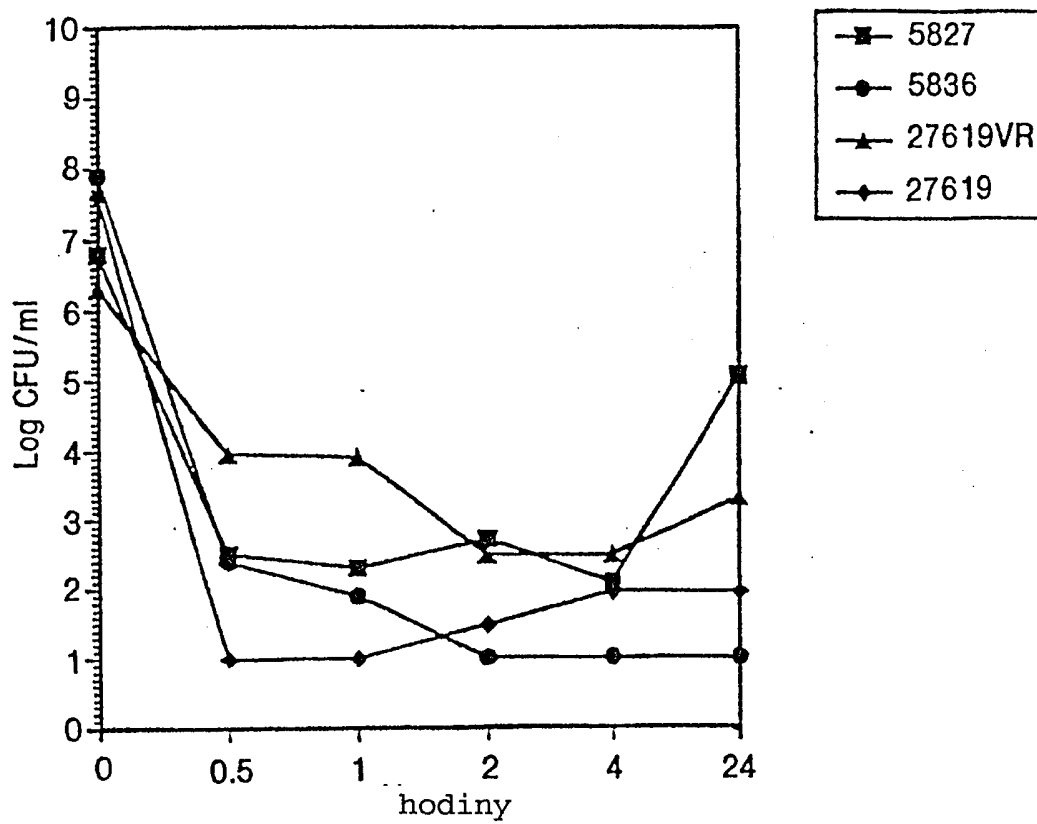
Baktericidní aktivita lysostaphinu proti MRSA



Obr. 1

22.02.00

2/2



Obr. 2