

(19)



URZĄD  
PATENTOWY  
RZECZYPOSPOLITEJ  
POLSKIEJ

(10) **PL 245810 B1**

(12)

## Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **442387**

(22) Data zgłoszenia: **2022.09.28**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2024.04.02 BUP 14/2024**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2024.10.14 WUP 42/2024**

(51) MKP:

**C12N 7/00** (2006.01)

**C12R 1/92** (2006.01)

**A61K 35/76** (2015.01)

**A61K 9/62** (2006.01)

**A61P 31/04** (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

UNIWERSYTET RZESZOWSKI, Rzeszów, PL  
PODKARPACKIE CENTRUM INNOWACJI  
SPÓŁKA Z OGRANICZONĄ  
ODPOWIEDZIALNOŚCIĄ, Rzeszów, PL

(72) Twórca(-y) wynalazku:

LESZEK POTOCKI, Raniżów, PL  
MARIUSZ WOREK, Rzeszów, PL  
BERNADETTA OKLEJEWICZ, Rzeszów, PL  
ALEKSANDRA BARAN, Kamień, PL  
KRZYSZTOF PAWLIK, Wrocław, PL  
DARIUSZ MARTYNOWSKI, Wrocław, PL  
NORBERT ŁODEJ, Żąbkowice Śląskie, PL  
DOROTA KUJAWA, Ratowice, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Joanna Dargiewicz, Warszawa, PL

(54) Tytuł:

**Nowe szczepy bakteriofagów specyficzne wobec bakterii z gatunku *Klebsiella pneumoniae* do zastosowania w zwalczaniu infekcji bakteryjnych**

**PL 245810 B1**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są nowe szczepy bakteriofagów specyficzne wobec bakterii z gatunku *Klebsiella pneumoniae* do zastosowania w zwalczaniu infekcji bakteryjnych. Przedmiotem wynalazku są cztery bakteriofagi **vB\_Kp-4M**, **vB\_Kp-12M**, **vB\_Kp-12SM**, **vB\_Kp-36L** specyficzne wobec bakterii z gatunku *Klebsiella pneumoniae* jako modulatora wzrostu wpływającego na aktywność biologiczną szczepów tego gatunku zdolnych do wytwarzania  $\beta$ -laktamaz o rozszerzonym spektrum działania (ESBL), a także zdolnych do wytwarzania karbapenemaz ( $\beta$ -laktamaz hydrolizujących karbapenemy), w tym do ich zwalczania w warunkach środowiskowych, medycznych, weterynaryjnych i innych. Izolat **vB\_Kp-36L** zdolny jest do zwalczania szczepu *Klebsiella pneumoniae* o zdolności do wytwarzania karbapenemazy klasy D OXA-48 (tzw. „superbakterii”).

*Klebsiella pneumoniae* jest gram ujemną bakterią należącą do rodziny *Enterobacteriaceae*. Bakteria ta jest patogenem oportunistycznym, który dotyka głównie osoby z osłabionym układem odpornościowym i ma tendencję do powodowania infekcji szpitalnych. Podzbiór hiperwirulentnych serotypów *K. pneumoniae* o podwyższonej zdolności do produkcji otoczek polisacharydowych może wpływać na zdrowe osoby i powodować zagrażające życiu zakażenia pozaszpitalne, takie jak ropień wątroby, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, martwicze zapalenie powięzi, zapalenie wnętrza gałki ocznej, ciężkie zapalenie płuc.

W patogenezie zakażeń bakterie te wykorzystują szereg czynników wirulencji, do których zalicza się otoczki polisacharydowe, lipopolisacharyd ściany komórkowej, fimbrie, białka błony zewnętrznej, determinanty pozyskiwania żelaza (siderofory) i wykorzystania źródeł azotu, które mają na celu utrzymanie komórek bakterii przy życiu i unikania ich niszczenia przez układ odpornościowy podczas infekcji [Li, B., et al., *Molecular pathogenesis of Klebsiella pneumoniae*. *Future Microbiol*, 2014. **9**(9): p. 1071–81]. Pomimo wzrostu zakażeń wywoływanych przez szczepy o wysokim potencjale patogennym tzw. hvKP obserwuje się znaczny wzrost wysokiego poziomu oporności na leki przeciwbakteryjne pierwszego rzutu. Szczepy MDR *K. pneumoniae* w ostatnich latach zostały zaklasyfikowane jako główne zagrożenie dla zdrowia publicznego przez amerykańskie Centrum Kontroli i Prewencji Chorób. Dodatkowo Światowa Organizacja Zdrowia wskazuje enterobakterie (zwłaszcza szczepy NDM-1, MBL, KPC, AmpC, ESBL) w tym bakterie z rodzaju *Klebsiella*, jako szczególne zagrożenie dla zdrowia i wskazuje na konieczność szybkiego opracowania nowych strategii zwalczania tych bakterii, mające na celu ograniczenie krzyżowego przekazywania genów oporności między drobnoustrojami. Obecnie pałeczki Gram-ujemne (*Enterobacteriaceae*) wytwarzające enzymy beta-laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym (ESBL) lub odporne na karbapenemy wpisane są na listę patogenów alarmowych (Załącznik do Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 11 marca 2005 r. w sprawie rejestrów zakażeń zakładowych oraz raportów o występowaniu tych zakażeń). W tym samym okresie liczba szczepów hvKP o wysokim potencjale patogennym również wzrosła. W przeszłości szczepy MDR i hvKP ewoluowały oddzielnie w odrębnych grupach klonalnych, ale niedawne pojawienie się szczepów hvKP niosących geny MDR budzi nowe obawy w skutecznej ich eliminacji [Surgers, L., et al., *ESBL-Producing Strain of Hypervirulent Klebsiella pneumoniae K2, France*: *Emerg Infect Dis*. 2016 September; **22**(9):1687-8. doi: 10.3201/eid2209.160681]. Pojawienie się bakterii wielolekoopornych – MDR, a także brak perspektyw na wytwarzania nowych związków o aktywności przeciwdrobnoustrojowej zmusza do poszukiwania alternatywnych strategii ich eliminacji. Badania wskazują, że wirusy bakteryjne mogą być stosowane jako alternatywa dla antybiotyków, a także innych związków przeciwdrobnoustrojowych do ograniczania populacji mikroorganizmów środowiskowych, a także o fenotypach patogennych.

Międzynarodowe zgłoszenie patentowe WO18106135 A2 dotyczy kompozycji bakteriofagowych zawierających nowe szczepy bakteriofagów oraz sposobów ich stosowania w leczeniu i zapobieganiu infekcjom bakteryjnym, w tym infekcjom dróg oddechowych powodowanych przez np. *Pseudomonas aeruginosa* i/lub *Klebsiella pneumoniae*.

Chińskie zgłoszenie patentowe CN115029322 A dotyczy bakteriofaga wielolekoopornej *Klebsiella pneumoniae* i jego zastosowania.

Międzynarodowe zgłoszenie patentowe WO21125988 A1 dotyczy kompozycji koktajlowych zawierających oddechowe fagi antibakteryjne i sposobów ich stosowania w leczeniu i zapobieganiu infekcjom bakteryjnym, w tym infekcjom dróg oddechowych powodowanych przez np. *Pseudomonas aeruginosa* i/lub *Klebsiella pneumoniae*.

Chińskie zgłoszenie patentowe CN113583973 A dotyczy wysokolizowego bakteriofaga *Klebsiella pneumoniae* RDP-KP-20007 i jego zastosowania.

Międzynarodowe zgłoszenie patentowe WO22157776 A1 dotyczy bakteriofaga *Klebsiella* i jego zastosowania.

Chińskie zgłoszenie patentowe CN113025582 A dotyczy bakteriofaga *Klebsiella pneumoniae* i zastosowania medycznego.

Chińskie zgłoszenie patentowe CN112708600 A dotyczy bakteriofaga litycznego *Klebsiella pneumoniae* RDP-KP-20005 i jego zastosowania.

Chińskie zgłoszenie patentowe CN113201506 A dotyczy bakteriofaga *Klebsiella pneumoniae* efektywnie rozdzielającego odporność na karbapeny i zastosowanie bakteriofaga *Klebsiella pneumoniae*.

Chińskie zgłoszenie patentowe CN113174372 A dotyczy nowego bakteriofaga oddzielonego przez przyjęcie zmutowanego bakteriofaga szczepu *Klebsiella pneumoniae* typu K2 jako bakterii gospodarza, a bakteriofag ma węższe spektrum bakteriobójcze, może infekować i zabijać *Klebsiella pneumoniae*, a co ważniejsze ma działanie bakteriobójcze na opisane szczepy odporne na bakteriofagi.

Koreańskie zgłoszenie patentowe KR20180137814 A dotyczy bakteriofagów litycznych *Klebsiella* specyficznych dla typu *Klebsiella* odpornego na antybiotyki.

Koreańskie zgłoszenie patentowe KR20190079573 A dotyczy nowego bakteriofaga specyficznego dla rodzaju *Klebsiella* KP12 i kompozycji antybakteryjnej obejmującej ten bakteriofag.

Koreańskie zgłoszenie patentowe KR102193101 B1 dotyczy nowych bakteriofagów specyficznych dla bakterii z rodzaju *Klebsiella* odpornych na antybiotyki.

Chińskie zgłoszenie patentowe CN106754745 A dotyczy bakteriofaga *Klebsiella pneumoniae* i jego zastosowania.

Koreańskie zgłoszenie patentowe KR20180137813 A dotyczy bakteriofaga litycznego specyficznego dla *Klebsiella* odpornego na antybiotyki.

Koreańskie zgłoszenie patentowe KR20180137815 A dotyczy bakteriofaga litycznego specyficznego dla *Klebsiella* odpornego na antybiotyki.

Koreańskie zgłoszenie patentowe KR20180073449 A dotyczy nowych specyficznych dla *Klebsiella* KP1 bakteriofagów i kompozycji antybakteryjnej obejmującej te bakteriofagi.

Koreańskie zgłoszenie patentowe KR20190000944 A dotyczy bakteriofaga litycznego specyficznego dla *Klebsiella* odpornego na antybiotyki.

W dziedzinie wciąż istnieje zapotrzebowanie na nowe leki do zwalczania bakterii z gatunku *Klebsiella pneumoniae*. Celem niniejszego wynalazku było znalezienie bakteriofagów specyficznych wobec bakterii z gatunku *Klebsiella pneumoniae*.

Cel ten został zrealizowany przez opisane w niniejszym zgłoszeniu patentowym bakteriofagi **vB\_Kp-4M**, **vB\_Kp-12M**, **vB\_Kp-12SM**, **vB\_Kp-36L** pozyskane ze ścieków komunalnych.

A zatem, przedmiotem niniejszego wynalazku są nowe bakteriofagi specyficzne wobec bakterii z gatunku *Klebsiella pneumoniae* zdeponowane w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów pod numerami depozytowymi F/00192; F/00193; F/00194; F/00195, z których każdy ma potwierdzoną naturę lityczną i charakteryzuje się wysoką wirulencją.

Wynalazek dotyczy także powyższego szczepu bakteriofaga do zastosowania w leczeniu infekcji wywołanych przez bakterie z gatunku *Klebsiella pneumoniae*.

Korzystnie, szczep bakteriofaga do zastosowania w leczeniu infekcji wywołanych przez bakterie z gatunku *Klebsiella pneumoniae* stosuje się jako mieszanek fagów zdeponowanych w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów pod numerami depozytowymi F/00192; F/00193; F/00194; F/00195, wykazujących się brakiem interferencji.

Korzystnie, szczep bakteriofaga jest do zastosowania w leczeniu infekcji szpitalnych i pozaszpitalnych, takich jak ropień wątroby, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, martwicze zapalenie powięzi, zapalenie wnętrza gałki ocznej, ciężkie zapalenie płuc.

Korzystnie, bakteriofagi są immobilizowane w kapsułkach alginianowych, korzystniej kapsułki alginianowe są opłaszczane chitozanem.

Przedstawione w zgłoszeniu patentowym bakteriofagi **vB\_Kp-4M**, **vB\_Kp-12M**, **vB\_Kp-12SM**, **vB\_Kp-36L** pozyskane ze ścieków komunalnych mogą być wykorzystywane jako aktywne biologicznie modulatory wzrostu mikroorganizmów z gatunku *Klebsiella pneumoniae*, przyczyniając się tym samym do ograniczenia liczebności szczepów klinicznych wytwarzających enzymy  $\beta$ -laktamazy (fenotypy oporności ESBL), a także wytwarzających karbapenemazy w tym szczepu typu: OXA-48 („superbakteria”).

*Klebsiella pneumoniae* CPE o fenotypie lekooporności OXA-48 to groźna „superbakteria”, na którą nie działają powszechnie stosowane w lecznictwie antybiotyki, nawet te tzw. ostatniej szansy.

Z punktu widzenia wykorzystania technologicznego, czy też terapeutycznego wyizolowane bakteriofagi scharakteryzowano pod względem cykli replikacyjnych przy użyciu metody one-step growth, określając ich czas latencji na około 10 minut w przypadku **vB\_Kp-4M**, **vB\_Kp-12SM**, **vB\_Kp-36L** oraz 20 minut w przypadku **vB\_Kp-12M**, co w praktyce zwiększa szansę na ich komercyjne zastosowanie. Plon fagowy z hodowli w przypadku **vB\_Kp-4M** po 10 minutach replikacji wirusa wynosił około 118 fagów potomnych z jednej komórki bakteryjnej, w izolacie **vB\_Kp-12M** około 130 fagi potomne po 20 minutach replikacji wirusa, a w przypadku pozostałych izolatów **vB\_Kp-12SM**, **vB\_Kp-36L** po 10 minutach replikacji plon wynosił odpowiednio 100 i 97 fagów potomnych. Wskazuje się, że parametry określające proces replikacji wirusów tj. współczynnik adsorpcji, czas latencji, plon fagowy – z ang. „burst size” są ważne w określeniu dynamiki przeprowadzanej infekcji przez wirusy i tym samym jej skuteczności. Wymagania dotyczące bakteriofagów wykorzystywanych terapeutycznie zostały umieszczone w opisie patentowym PL 228 848 B1, gdzie wskazano, że w leczeniu wybiera się fagi o stosunkowo wysokich plonach fagowych tj. (<100 pfu lub więcej) i niskich czasach latencji (>1–1,5 h), a które w przypadku zastosowania technologicznego izolaty fagowe będące przedmiotem wynalazku również spełniają. Uzyskane wartości tych parametrów dla poszczególnych izolatów fagowych wskazują na ich wysoki potencjał do zwalczania zakażeń bakteryjnych i czynią je potencjalnie atrakcyjnym narzędziem w zwalczaniu komórek wchodzących w skład biofilmów bakteryjnych.

Dodatkowo w trakcie testów stopnia wirulencji (tzw. „bacterial challenge”) badanych bakteriofagów obserwowano spadek liczby komórek gospodarzy bakteryjnych (*Klebsiella pneumoniae* o oporności typu ESBL+) odpowiednio o 4 log podczas 6 h trwania infekcji dla **vB\_Kp-4M**, **vB\_Kp-12M** i **vB\_Kp-12SM**. W przypadku izolatu **vB\_Kp-36L** spadek liczby komórek bakteryjnych o 4 log obserwowano podczas 4 h infekcji. Efekt bakteriobójczy wobec wybranych szczepów *Klebsiella pneumoniae* ESBL+, CPE, w tym o fenotypie lekooporności OXA-48 występował już przy niskich wartościach MOI = 0,01, co jest istotne z punktu technologicznego ich wykorzystania.

Przeprowadzona analiza infekcyjności izolatów **vB\_Kp-4M**, **vB\_Kp-12M** i **vB\_Kp-12SM**, **vB\_Kp-36L** potwierdziła lityczną naturę w stosunku do wybranych szczepów klinicznych *Klebsiella pneumoniae* innych niż szczepy-gospodarze. Dla **vB\_Kp-4M** MOI na poziomie 0,01 był wystarczający do redukcji komórek bakteryjnych w zakresie od 0 do 93,29% po 8 godzinach od infekcji. Przy zastosowaniu innych MOI redukcja utrzymywała się w następujących zakresach: MOI 0,1 redukcja w zakresie od 0 do 94,79%; MOI 1 w zakresie od 0 do 94,21%; MOI 10 od 0 do 96,27%, MOI 100 od 0 do 95,17%. Dla bakteriofaga **vB\_Kp-12M** zwiększoną aktywność lityczną obserwowano przy niższych zakresach MOI, gdzie redukcja procentowa wynosiła od 0 do 62,51% dla MOI 0,01 oraz od 0 do 69,34% dla MOI 0,1 w przypadku szczepów *Klebsiella pneumoniae* wrażliwych na badanego bakteriofaga. Zastosowanie bakteriofaga **vB\_Kp-12SM** przy MOI na poziomie 0,01 był wystarczający do redukcji komórek bakteryjnych w zakresie od 0% do 88,14%. W przypadku MOI 1 obserwowana redukcja procentowa była w zakresie od 0% do 91,90%. MOI na poziomie 10 redukował liczbę komórek w zakresie od 0% do 91%, przy MOI 100 w zakresie 0% do 50,35%. W przypadku niższych MOI tj. 0,01; 0,1; 1 lub 10 zwiększała się liczba szczepów bakteryjnych o wyższej procentowej redukcji komórek. Należy podkreślić, że różnice w aktywności nie są jednak zbyt duże, co świadczy o tym, iż wirusy nawet w niskich stężeniach mogą osiągać zadowalające właściwości lityczne. W przypadku faga **vB\_Kp-36L** przy najniższym badanym MOI 0,01 obserwowano 90,83% redukcję liczby komórek w stosunku do kontroli, utrzymująca się przy pozostałych zastosowanych MOI: od 0 do 94,16% przy MOI 0,1; od 2,02–95,21% przy MOI 1; od 0–87,44% przy MOI 10 oraz redukcja w zakresie od 0 do 94,66% przy MOI 100.

Dodatkowo badanie aktywności litycznej „koktajli fagowych” otrzymanych po zmieszaniu wirusów **vB\_Kp-4M**, **vB\_Kp-12SM**, **vB\_Kp-36L**, **vB\_Kp-12M** w stosunku 1 : 1 : 1 na wzrost klinicznych gatunków *Klebsiella pneumoniae* wykazało spadek populacji komórek bakteryjnych w zakresie od 2,01 do 98,36% przy MOI 0,01; od 5,65 do 95,70% przy MOI 0,1; od 2,34 do 97,72% przy MOI 1; od 0,41 do 96,94% przy MOI 10, oraz w zakresie od 3,31 do 96,02% przy zastosowaniu MOI 100, co świadczy o braku wzajemnej interferencji w infekowaniu bakterii czy też hamowaniu swoich właściwości litycznych przez badane bakteriofagi. Otrzymane wyniki pozwalają przypuszczać, że terapeutyczne wykorzystanie badanych fagów przy niższych stężeniach, umożliwi osiągnięcie równie zadowalających efektów leczniczych/bakteriobójczych, jak przy podaniu ich wyższych stężeń. Ponadto stanowi to pozytywny aspekt pod względem wykorzystania technologicznego badanych wirusów, ponieważ pozwoli to na ominięcie etapu otrzymywania hodowli o wysokim mianie wirusów w trakcie procesu produkcji preparatów leczniczych.

W celu określenia aktywności litycznej badanych bakteriofagów będących przedmiotem wynalazku wykonano „spot test” w stosunku do 43 izolatów klinicznych bakterii z rodzaju *Klebsiella*. Bakteriofagi

**vB\_Kp-4M, vB\_Kp-12M i vB\_Kp-12SM, vB\_Kp-36L** wykazywały lityczność odpowiednio w stosunku do 11,6%, 9,3%, 18,6%, 41,86% przebadanych izolatów klinicznych bakterii z rodzaju *Klebsiella*, co świadczy o zwiększonym zakresie gospodarzy dla badanych wirusów oraz ich potencjale terapeutycznym w ich zwalczaniu. W tym celu wykonano posiewy badanych izolatów klinicznych *Klebsiella pneumoniae*, gdzie 100 µl hodowli bakteryjnej w fazie logarytmicznego wzrostu zmieszano z 5 ml agaru miękkiego (0,7%) i wylano na szalki Petriego z podłożem LB agar. Przygotowane szalki z hodowlami bakteryjnymi inkubowano w temperaturze 37°C przez 30 minut. Na tak przygotowane hodowle nakropiono po 10 µl danego lizatu fagowego. Test aktywności litycznej „host range” wykonano na 43 szczepach klinicznych zidentyfikowanych gatunkowo.

Wskazuje się również, że na skuteczność infekcji fagów mają wpływ różne zewnętrzne czynniki fizyczne i chemiczne, takie jak pH, temperatura, stabilność wirusów w soku żołądkowym i jelitowym, które mogą doprowadzać do uszkodzeń elementów strukturalnych wirionów (główka, ogon, otoczka), utraty lipidów otoczek, a także prowadzić do zmian strukturalnych materiału genetycznego wirusów (Ackermann HW, Tremblay D, Moineau S. Long-term bacteriophage preservation. WFCC Newslett. 2004;38:35–40; Jończyk E, Kłak M, Międzybrodzki R, Górski A., The influence of external factors on bacteriophages--review. FoliaMicrobiol (Praha), 2011 May; 56(3):191–200). Termostabilność infekcyjną **vB\_Kp-4M, vB\_Kp-12M i vB\_Kp-12SM, vB\_Kp-36L** określono w zakresie temperatur 37°C, 50°C, 60°C, 70°C przez 1 h; 80°C przez 30 minut, 90°C przez 15 minut w stosunku do kontroli 21°C. Stabilność infekcyjna **vB\_Kp-4M, vB\_Kp-12M i vB\_Kp-12SM, vB\_Kp-36L** utrzymywała się w temperaturach w 37°C, 50°C. W przypadku wszystkich fagów zaobserwowano niewielki spadek aktywności biologicznej wirusów o jeden rząd wielkości w temperaturze 60°C po 1 h inkubacji. W przypadku 70°C spadek o dwa rzędy wielkości w mianie dla **vB\_Kp-36L**, cztery rzędy wielkości w mianie dla faga **vB\_Kp-12M** oraz o pięć rzędów wielkości **vB\_Kp-4M, vB\_Kp-12SM** obserwowano po 1 h inkubacji. Natomiast w temperaturze 80°C po 30 minutach obserwowano redukcję aktywności wirusów **vB\_Kp-4M, vB\_Kp-12M i vB\_Kp-12SM** odpowiednio o 6 rzędów wielkości oraz o 3 rzędy wielkości dla **vB\_Kp-36L**. Po 15 minutach inkubacji w 90°C zanotowano redukcję aktywności badanych fagów odpowiednio o 3 rzędy wielkości dla **vB\_Kp-36L**, 5 rzędów wielkości dla **vB\_Kp-4M** oraz o 8 rzędów wielkości dla **vB\_Kp-12M i vB\_Kp-12SM**. Przeprowadzona analiza wykazała zwiększoną tolerancję na wyższą temperaturę białek kapsydowych **vB\_Kp-4M, vB\_Kp-12M, vB\_Kp-12SM, vB\_Kp-36L**. Dodatkowo w zakresie pH 3–11 nie zanotowano wpływu pH na aktywność biologiczną fagów po 1 h inkubacji, co wskazuje, że wirusy **vB\_Kp-4M, vB\_Kp-12M, vB\_Kp-12SM, vB\_Kp-36L** cechuje odporność na działanie czynników fizykochemicznych tj. pH i temperaturę.

Zdolność infekcyjna **vB\_Kp-4M, vB\_Kp-12M, vB\_Kp-12SM, vB\_Kp-36L** w niskim zakresie PH < 6 to cecha biologiczna umożliwiająca szersze ich zastosowanie technologiczne w przeciwieństwie do opisanego już w literaturze naukowej faga ZCKP1, którego aktywność biologiczna spadała wraz z zakwaszeniem środowiska. (Taha OA, Connerton PL, Connerton IF, El-Shibiny A. Bacteriophage ZCKP1: A Potential Treatment for *Klebsiella pneumoniae* Isolated From Diabetic Foot Patients. Front Microbiol. 2018 Sep 11;9:2127. doi: 10.3389/fmicb.2018.02127. PMID: 30254618; PMCID: PMC6141743.)

Istnieją dane literaturowe wskazujące, że fagi należące do rodziny *Siphoviridae* ze wszystkich rodzin *Caudovirales* są zazwyczaj najbardziej odporne na niekorzystne warunki środowiskowe (mogą przeżyć duże wahania temperatur, są stabilne w szerokim zakresie pH 3–11 przez 24 godziny) (Lasobras J, Muniesa M, Lucena F, Jofre J. Relationship between the morphology of bacteriophages and their persistence in the environment. Water Sci Tech. 1997;35:129–132.; Jepson CD, March JB. Bacteriophage lambda is highly stable DNA vaccine delivery vehicle. Vaccine. 2004;22:3413–1419. doi: 10.1016/j.vaccine.2003.11.065.). Natomiast fagi z rodziny *Podoviridae* wykazują stabilność w szerokim zakresie temperatur, a także w pH bardziej alkalicznym (w zakresie 5–9,2) (Prigent M, Leroy M, Confalonieri F, Dutertre M, DuBow MS., A diversity of bacteriophage forms and genome scan be isolated from the surface sands of the Sahara Desert., Extremophiles. 2005 Aug; 9(4):289–96., Tsutsaeva AA, Visekantsev IP, Mikulinskiy YE, Butenko AE. Effect of low temperatures of the survival and intracellular multiplication of *Escherichia coli* bacteriophages (in Russian) Mikrobiologija. 1981;50:292–244., Jończyk E, Kłak M, Międzybrodzki R, Górski A. The influence of external factors on bacteriophages--review. Folia Microbiol (Praha). 2011;56(3):191–200. doi:10.1007/s12223-011-0039-8.).

Dodatkowo badane **vB\_Kp-4M, vB\_Kp-12M, vB\_Kp-12SM, vB\_Kp-36L** wykazywały odporność przed proteolityczną aktywnością pepsyny w niskim pH w symulowanym środowisku żołądka, a także przed działaniem trzech głównych enzymów trawiennych: lipazy, amylazy i proteazy wchodzących

w skład pankreatyny w symulowanych warunkach jelitowych podczas 1 h inkubacji, co może mieć praktyczne zastosowanie przy immobilizacji wirusów w postaci kapsulek, a także co jest istotne przy wykorzystaniu fagów z innymi preparatami, które mogą mieć niskie lub wysokie pH.

Wpływ temperatury na przeżywalność fagów jest niezwykle istotny, jeśli chodzi o zapewnienie prawidłowej aktywności fagów w trakcie ich przechowywania. Bakteriofagi **vB\_Kp-4M**, **vB\_Kp-12M**, **vB\_Kp-12SM**, **vB\_Kp-36L** charakteryzowały się zwiększoną odpornością na niskie temperatury tj.  $-21^{\circ}\text{C}$  i  $-86^{\circ}\text{C}$  przez 1, 7, 14 i 30 dni ich przechowywania. Dodatkowo analiza wpływu powszechnie stosowanych w biologii krioprotektorów (glicerol, DMSO) na aktywność biologiczną badanych izolatów fagowych nie wykazała wzrostu inaktywacji wirusów podczas ich przechowywania do 30 dni. Brak istotnych różnic w mianach **vB\_Kp-4M**, **vB\_Kp-12M**, **vB\_Kp-12SM**, **vB\_Kp-36L** pomiędzy badanymi punktami czasowymi, pozwala przypuszczać, iż wirusy te pozostają stabilne przez dłuższy okres czasu, a to z kolei sprzyja możliwości ich wykorzystania w przemyśle, ze względu na łatwość przechowywania i transportu.

Przykład 1

#### Przynależność taksonomiczna i charakterystyka morfologiczna wirionów **vB\_Kp-4M**, **vB\_Kp-12M**, **vB\_Kp-12SM**, **vB\_Kp-36L**

Przynależność taksonomiczną fagów otrzymanych z próbek ścieków komunalnych oraz ich charakterystykę morfologiczną przeprowadzono z zastosowaniem transmisyjnego mikroskopu elektronowego. W badaniach wykorzystano technikę kontrastowania negatywowego wg. następującej metodyki. Lizat fagowy zagęszczano i oczyszczano metodą ultrawierowania ( $25\ 000 \times g$ ) z użyciem 0,1 M roztworu octanu amonu. Otrzymany roztwór nakrapiano na siatki miedziane 400 mesh z pokryciem formwar/węgiel (AgarScientific) i kontrastowano negatywowo za pomocą 2% octanu uranylu. Po wyschnięciu preparaty z poszczególnymi izolatami fagowymi analizowano za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego Jeol-F200 z cyfrową rejestracją obrazu.

Wiriony **vB\_Kp-4M**, **vB\_Kp-12M** zaklasyfikowano do rzędu bakteriofagów ogoniastych *Caudovirales*, reprezentujących rodzinę *Siphoviridae*, natomiast **vB\_Kp-12SM**, **vB\_Kp-36L** do rodziny *Podoviridae*. Do obydwu rodzin przynależą bakteriofagi lityczne, co jest istotne w aspekcie ich technologicznego zastosowania. W szczegółowej klasyfikacji uwzględniono analizę morfometryczną, gdzie wyznaczono średnicę głowy (hd; szerokość prostopadła do ogona), długość głowy (wzdłuż osi ogona; hl), średnicę ogona (td) i długość ogona (tl) zgodnie z wytycznymi zawartymi w publikacji – Hans-W. Ackermann – Tailed Bacteriophages: The Order Caudovirales.

Jedną z pożądanych cech wyizolowanych ze środowiska bakteriofagów jest ich przynależność taksonomiczna, klasyfikująca dane izolaty do bakteriofagów ogoniastych rząd *Caudovirales*. Ackermann i in. (2004) wykazali, że fagi ogoniaste są najbardziej stabilne w niekorzystnych warunkach środowiskowych, a także nie istnieją istotne różnice we wrażliwości na czynniki fizykochemiczne między fagami z kurczliwymi, niekurczliwymi lub z krótkimi ogonkami. Dodatkowo wskazuje się, że fagi z dużym kapsydem (o średnicy 100 nm) są stabilniejsze od fagów z mniejszym kapsydem (o średnicy 60 nm) (Ackermann HW, Tremblay D, Moineau S. Long-term bacteriophage preservation. WFCC Newslett. 2004;38:35–40).

Tabela 1

Nazwa faga	Przynależność taksonomiczna	Morfortyp	Wymiary w nm				
			szerokość kapsydu	długość kapsydu	przekrój kapsydu	długość ogona	szerokość ogona
vB_Kp-4M	<i>Caudovirales</i> , <i>Siphoviride</i>	B1	61,1322 ±	64,6326 ±	60,6289±	160,1966 ±	9,68±
			4,180234	4,764205	3,751671	12,39742	0,634119
vB_Kp-12M	<i>Caudovirales</i> , <i>Siphoviride</i>	B1	59,0365±	63,7462 ±	59,8926±	180,4083 ±	10,867 ±
			2,831362	3,597532	3,56683	9,724063	0,86077

vB_Kp-12SM	<i>Caudovirales</i> ,	-	62,3601 ±	62,1283 ±	59,6899 ±	22,3402 ±	7,6276 ±
	<i>Podoviridae</i>		1,84309	1,4957	1,104201	3,831723	0,717006
vB_Kp-36L	<i>Caudovirales</i> ,	-	53,3627 ±	54,354 ±	52,7882 ±	16,0942 ±	7,9457 ±
	<i>Podoviridae</i>		1,996388	3,055976	2,162572	1,78913	1,058769

### Przykład 2

Badane bakteriofagi wykazywały różnorodną morfologię łysinki:

Łysinki bakteriofaga **vB\_Kp-4M** charakteryzowały się klarownymi strefami przejaśnień o  $\phi$  w zakresie od 0,5 do 1,5 mm. Łysinki bakteriofaga **vB\_Kp-12M** charakteryzowały się środkową klarowną strefą o  $\phi$  w zakresie od 2 do 3 mm oraz zewnętrzną mętną strefą „halo”, której promień zwiększał się wraz z czasem inkubacji o  $\phi$  w zakresie od 7,5 do 8 mm. Podobnie łysinki bakteriofaga **vB\_Kp-12SM** charakteryzowały się środkową klarowną strefą o  $\phi$  w zakresie od 1 do 2 mm oraz otaczających stref „halo” o  $\phi$  w zakresie od 6 do 8 mm. Łysinki bakteriofaga **vB\_Kp-36L** charakteryzowały się środkową klarowną strefą o  $\phi$  w zakresie 1–2 mm oraz otaczających je stref przejaśnień o  $\phi$  w zakresie od 1,5 do 3 mm. Badane bakteriofagi formują na murawie bakteryjnej łysinki charakterystyczne dla fagów litycznych, a powstające strefy „halo” to efekt działania depolimeraz polisacharydowych.

Aby określić rozmiar łysinek, przygotowano seryjne dziesięciokrotne rozcieńczenia mieszaniny fagów w pożywce LB lub buforze SM (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,1 M NaCl, 8 mM MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O i 0,01% (w/v) żelatyny). W kolejnym etapie 0,2 ml hodowli szczepu gospodarza zmieszano z 10  $\mu$ l odpowiedniego rozcieńczenia mieszaniny bakteriofagów i dodano do 5 ml górnego agaru LB 0,7%. Mieszaninę wylano na płytkę z agarem podstawowym. Szalki Petriego inkubowano w temperaturze 37°C i po 24 godzinach oceniano morfologię i średnicę „łysinek” poszczególnych bakteriofagów.

*K. pneumoniae* jest również znana ze swojej zdolności do tworzenia biofilmu, które są zbiorowiskami bakterii osadzonych w macierzy zewnątrzkomórkowej. Ta macierz składa się z białek, egzopolisacharydów, DNA i lipopeptydów. Dodatkowo wskazuje się, że *K. pneumoniae* wykorzystuje czynniki wirulencji (otoczki polisacharydowe, LPS lipopolisacharyd, fimbrie typu 1, 3; białka błony zewnętrznej, siderofory) nie tylko do przeżycia i unikania odpowiedzi ze strony układu odpornościowego podczas infekcji, ale również do formowania struktury biofilmu. *K. pneumoniae* może wytwarzać grubą warstwę biofilmu zewnątrzkomórkowego, który wspiera przyczepność bakterii do żywych lub nieożywionych powierzchni, chroniąc tym samym penetrację antybiotyków i zmniejszając ich działanie. Zastosowanie bakteriofagów vB\_Kp-4M, vB\_Kp-12M, vB\_Kp-12SM, vB\_Kp-36L w badaniach *in vitro* jako czynników biokontroli powodowało eradykację liczby komórek biofilmu wśród szczepów gospodarza *Klebsiella pneumoniae*, przy czym najbardziej skuteczny był nierozcieńczony 100% lizat fagowy. Największy spadek gęstości optycznej biofilmów odnotowano po 48 godzinach inkubacji. W tym punkcie czasowym liczba komórek bakteryjnych w biofilmie dla lizatu fagowego vB\_Kp-4M zastosowanego w najwyższej koncentracji została zmniejszona o blisko 73%. W przypadku vB\_Kp-12M, vB\_Kp-12SM, vB\_Kp-36L spadek gęstości komórek biofilmu obserwowano w zakresie 65,03%; 41%; 50%. Traktowanie biofilmów lizatem fagowym vB\_Kp-4M przez 24 godziny wywołało również znaczną jego degradację. Dla tego punktu czasowego przy zastosowaniu stężenia 100%, 75%, 50% i 25% lizatu fagowego redukcja biomasy biofilmu była w zakresie od 83,59 do 63,56%. W przypadku vB\_Kp-12M obserwowano redukcję w zakresach od 37,03 do 67,07%, vB\_Kp-12SM od 51 do 69%, vB\_Kp-36L od 41 do 59%. W przypadku 2 h traktowania wykształconych biofilmów lizatami fagowymi przy stężeniach 100%, 75%, 50% i 25%, redukcja biomasy biofilmu dochodziła do 20% dla vB\_Kp-4M, od 19 do 29% dla vB\_Kp-12M, od 11,95 do 23,89% dla vB\_Kp-12SM oraz od 40 do 44% vB\_Kp-36L.

Aktywność metaboliczną biofilmów *K. pneumoniae* zbadano przy użyciu testu z resazuryną, który potwierdził śmiertelność komórek bakteryjnych o 31,22% już po 2 h od zastosowania 100% (nierozcieńczonego) lizatu fagowego vB\_Kp-4M. Również pozostałe rozcieńczenia lizatu vB\_Kp-4M do stężeń 75%, 50%, 25%, 12,5%, 0,5% wykazywały efekt lityczny odpowiednio w zakresie 22,74%, 23,87%, 25,87%, 27,71%, 26,82%. Efekt bakteriobójczy utrzymywał się po 12 h inkubacji odpowiednio dla stężeń 100% o 28,19%; dla 75% o 30,15%, 50% o 23,80%; 25% o 17,08%, 12,5% o 19,57% oraz dla stężenia 0,5% o 7,27%. Najsilniejszy spadek aktywności metabolicznej komórek biofilmu obserwowano po 24 h

odpowiednio o 40,26% dla 100% lizatu, o 41,70% dla 75% rozcieńczenia lizatu, o 41,18% dla 50% lizatu; o 36,74% dla 25% lizatu; 29,63% dla 12,5% lizatu oraz o 20,71% dla lizatu o stężeniu 0,5%.

Spadek aktywności metabolicznej komórek biofilmu *K. pneumoniae* infekowanego przy użyciu izolatu fagowego vB\_Kp-12M po 2 h obserwowano odpowiednio o 28,21%, 30,70%, 33,58%, 30,40%, 30,60%, 32,16% dla stężeń 100%, 75%, 50%, 25%, 12,5%, 0,5% lizatu fagowego. Spadek aktywności metabolicznej komórek biofilmu po 12 h inkubacji z fagiem vB\_Kp-12M obserwowano o 31,95%, 32,42%, 31,60%, 28,27%, 21,03%, 17,57% odpowiednio dla stężeń 100%, 75%, 50%, 25%, 12,5%, 0,5%. Spadek aktywności metabolicznej komórek biofilmu *K. pneumoniae* obserwowano również po 24 h inkubacji odpowiednio o 22,81%, 23,94%, 24,83%, 22,24%, 24,79%, 14,99% odpowiednio dla stężeń zastosowanego lizatu fagowego 100%, 75%, 50%, 25%, 12,5%, 0,5%.

W obecności faga vB\_Kp-12SM po 2 h inkubacji aktywność metaboliczna komórek bakteryjnych w biofilmie zmalała odpowiednio o 16,18%, 14,99%, 13,89%, 7,59%, 5,84%, 4,22% przy stężeniach lizatu 100%, 75%, 50%, 25%, 12,5%, 0,5%. Podczas 12 h inkubacji spadek przeżywalności komórek bakteryjnych w uformowanym biofilmie po infekcji bakteriofagiem vB\_Kp-12SM zwiększył się odpowiednio o 28,87%, 25,62%, 27,18%, 21,85%, 14,69%, 4,75%. Najsilniejszy efekt bakteriobójczy komórek biofilmu obserwowano po 24 h odpowiednio o 47,75%, 48,65%, 42,95%, 45,07%, 48,20%, 38,28% przy stężeniach lizatu 100%, 75%, 50%, 25%, 12,5%, 0,5%.

W przypadku bakteriofaga vB\_Kp-36L największy spadek aktywności metabolicznej komórek biofilmu obserwowano po 2 h i 12 h inkubacji odpowiednio o 33,88%, 33,36%, 32,15%, 32,05%, 29,33%, 0% / po 2 h oraz o 21,20%, 25,93%, 17,24%, 21,17%, 22,61%, 3,9% / po 12 h przy stężeniach roboczych lizatu 100%, 75%, 50%, 25%, 12,5%, 0,5%. Po 24 h inkubacji biofilmu z fagiem nie obserwowano zwiększenia aktywności litycznej bakteriofaga, w wyniku czego malała śmiertelność komórek odpowiednio o 7,49%, 5,12%, 8,96%, 14,64%, 13,19%, 0% dla badanych stężeń lizatu 100%, 75%, 50%, 25%, 12,5%, 0,5%.

Wykazana skuteczność przeciwbiofilmowa badanych fagów vB\_Kp-4M, vB\_Kp-12M, vB\_Kp-12SM, vB\_Kp-36L (spadek biomasy biofilmów, spadek aktywności metabolicznej komórek biofilmów) może wskazywać na ich potencjalne zastosowanie w walce z biofilmami bakteryjnymi stanowiącymi problem w usuwaniu zakażeń bakteryjnych w medycynie przy użyciu dostępnych antybiotyków.

Degradację uformowanego biofilmu bakteryjnego *Klebsiella pneumoniae* przeprowadzono w 96-studzienkowej płytce przez 2, 12, 24, 48 h w temperaturze 37°C. W celu zainicjowania wzrostu biofilmu hodowlę bakteryjną *Klebsiella pneumoniae* (250 µl) dodano do 96-studzienkowej płytki hodowlanej i inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 godziny bez wytrząsania. Redukcję otrzymanego biofilmu po odplukaniu komórek planktonowych przeprowadzono metodą fioletu krystalicznego (CV) po 2, 12, 24, 48 h przy użyciu zawiesiny fagowej o różnych stężeniach tj. stężony 100% roztwór i cztery rozcieńczenia lizatu wyjściowego w buforze SM- 75%, 50%, 25%, 12,5%. Ilość wyekstrahowanego barwnika CV (odpowiadającego biomasy biofilmu) zmierzono za pomocą pomiaru gęstości optycznej przy 595 nm (OD595) w czytniku płytek Infinite 200 PRO TECAN. Jako kontrolę negatywną zastosowano podłoże wzrostowe (bulion LB) z zawiesiną bakterii. Względęną masę biofilmu określono poprzez porównanie absorbancji z kontrolą negatywną -100%.

Badanie aktywności metabolicznej komórek biofilmu przeprowadzono z wykorzystaniem testu żywotności komórek Alamar Blue (resazuryna). W tym celu przygotowano 24 h hodowle bakteryjne *Klebsiella pneumoniae* w 96-studzienkowej płytce hodowlanej w celu zainicjowania wzrostu biofilmu. Otrzymane biofilmy przemyto PBS, a następnie potraktowano zawiesiną fagową o różnych stężeniach tj. stężony 100% roztwór i cztery rozcieńczenia lizatu wyjściowego w buforze SM- 75%, 50%, 25%, 12,5% przez 2, 12, 24 h. Po odpowiednim czasie inkubacji biofilmów z bakteriofagami do każdej studzienki 96-dołkowej płytki dodano 10 µl roztworu resazuryny (0,8 µg/ml w PBS) i inkubowano przez 2 godziny (aż kontrola negatywna zmieniła kolor z niebieskiego na czerwony/różowy). Aby ocenić wpływ analizowanych fagów na aktywność metaboliczną komórek bakteryjnych biofilmów wykonano pomiar absorbancji przy 570 nm.

#### **Sekwencjonowanie genomowe bakteriofagów vB\_Kp-4M, vB\_Kp-12M, vB\_Kp-12SM, vB\_Kp-36L**

Sekwencjonowanie genomowego DNA vB\_Kp-4M, vB\_Kp-12M, vB\_Kp-12SM, vB\_Kp-36L pozwoliło na uzyskanie 4 kontigów odpowiednio o wielkości 49 691pz, 50595pz, 73 276pz, 40886pz, które wykorzystano do przeszukania bazy danych NCBI narzędziem BLAST (dla wirusów) w celu potwierdzenia znalezienia najbliższego podobnego faga.

Tabela 2

Oznaczenie faga	Długość kontigu	Genom referencyjny (Blast)	Stopień pokrycia [%]	% Identyczności	Długość referencyjna	Numer dostępu	Cykl życia	Prawdopodobieństwo cyklu życia	Pokrycie (Quast)
vB_Kp-4M	49691	Fag Klebsiella KOX1	90	96,28	50526	NC_047825,1	lityczny	0,973	2285
vB_Kp-12M	50595	Fag Klebsiella KpS4	87	95,75	49674	OL674249,1	lityczny	0,999	1665
vB_Kp-12SM	73276	Fag Klebsiella KP8	88	94,34	73679	NC_048700,1	lityczny	0,978	1003
vB_Kp-36L	40886	Wirus Klebsiella KP32 izolat 192	97	94,55	40635	NC_047968,1	lityczny	0,999	2490

Przeprowadzona analiza otrzymanych kontigów **vB\_Kp-4M**, **vB\_Kp-12M**, **vB\_Kp-12SM**, **vB\_Kp-36L** pozwoliła zaklasyfikować je jako nowe na podstawie zasady: < 95% podobieństwa i < 95% pokrycia dla najbardziej podobnego genomu. Dodatkowo w genomach badanych bakteriofagów wykluczono obecności genów toksyn bakteryjnych, integraz, genów konwersji lizogennej, mogących zmienić fenotyp bakterii na patogenny, co potwierdza lityczny cykl rozwojowy badanych bakteriofagów, a tym samym spełnia główne wymagania stawiane wirusom terapeutycznym w fagoterapii.

Sekwencje genomowe fagów **vB\_Kp-4M**, **vB\_Kp-12M**, **vB\_Kp-12SM**, **vB\_Kp-36L** zdeponowano na czas zgłoszenia patentowego w bazie GenBank pod numerami akcesyjnymi:

Dla **vB\_Kp-4M**: OP442078

Dla **vB\_Kp-12M**: OP442079

Dla **vB\_Kp-12SM**: OP442080

Dla **vB\_Kp-36L**: OP459304

Bakteriofagi **vB\_Kp-4M**, **vB\_Kp-12M**, **vB\_Kp-12SM**, **vB\_Kp-36L** będące przedmiotem wynalazku zostały zdeponowane zgodnie z traktatem budapeszteńskim o międzynarodowym uznawaniu depozytu drobnoustrojów dla celów postępowania patentowego, w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu (53-114 Wrocław, ul. R. Weigla 12) w dniu 03.08.2022 r. i otrzymały numery akcesyjne depozytu F/00193 dla **vB\_Kp-4M**, F/00195 dla **vB\_Kp-12M**, F/00194 dla **vB\_Kp-12SM** oraz F/00192 dla **vB\_Kp-36L**.

**Immobilizacja fagów vB\_Kp-4M, vB\_Kp-12M, vB\_Kp-12SM, vB\_Kp-36L przy użyciu alginianu/CaCO<sub>3</sub> – modyfikacje zapewniające utrzymanie stabilności infekcyjnej (pokrycie otrzymanych kapsulek alginianowych otoczką chitozanową, mokre mikrosfery, a także poprzez ich wysuszenie w obecności 10% trehalozy)**

Bakteriofagi **vB\_Kp-4M**, **vB\_Kp-12M**, **vB\_Kp-12SM**, **vB\_Kp-36L** będące przedmiotem wynalazku utrzymywały lityczny charakter pod kątem specyficzności gatunkowej atakowanych bakterii, wpływu czynników fizykochemicznych, a także stabilności w symulowanym soku żołądkowym, jelitowym po zastosowaniu procedury enkapsulacji z wykorzystaniem alginianu/CaCO<sub>3</sub>.

Otrzymane kapsułki z immobilizowanymi fagami poddano modyfikacjom zapewniającym utrzymanie stabilności infekcyjnej, poprzez pokrycie otrzymanych kapsulek alginianowych otoczką chitozanową tzw. mokre mikrosfery, a także poprzez ich wysuszenie w obecności 10% trehalozy. Wysuszone mikrosfery w obecności 10% trehalozy to przykład taniej technologii otrzymywania blistrowanego preparatu fagowego o dużej skuteczności ochronnej badanych fagów. Wskazuje się, że trehaloza minimalizuje wpływ stresu termicznego na wiriony fagowe, a także działa stabilizacyjnie na białka kapsydowe. Przedstawiony sposób suszenia enkapsulowanych fagów to przykład taniego, a tym samym skutecznego ich wykorzystania technologicznego w porównaniu do innych ekonomicznie nieopłacalnych metod tj. liofilizacji czy suszenia rozpyłowego [González-Menéndez, E., Fernández, L., Gutiérrez, D., Rodríguez, A., Martínez, B. i García, P. (2018). Comparative analysis of different preservation techniques for the storage of Staphylococcus phages aimed for the industrial development of phage-based antimicrobial products. PLoS ONE, 13(10), e0205728. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205728>.]

Analiza stabilności termicznej immobilizowanych w alginianie/CaCO<sub>3</sub> **vB\_Kp-4M**, **vB\_Kp-12M**, **vB\_Kp-12SM**, potwierdziła ich zdolność do przeprowadzania cyklu litycznego w stosunku do *Klebsiella pneumoniae* w zakresie temperatur 21°C – 90°C; natomiast **vB\_Kp-36L** w zakresie 21°C – 60°C, wskazując tym samym na przydatność kapsułkowanych fagów pod względem zastosowań terapeutycznych i technologicznych. Wykazano, że proces immobilizacji fagów, a następnie powlekania otrzymanych kapsulek alginianowych naturalnym polimerem-chitozanem nie wywierały szkodliwego wpływu na biologię badanych bakteriofagów. Otrzymany kapsułkowany biopreparat zawierający **vB\_Kp-4M**, **vB\_Kp-12M**, **vB\_Kp-12SM**, **vB\_Kp-36L** cechował się stabilnością infekcji w pH 3, 7, 11, gdzie miana wirusów po godzinnej inkubacji utrzymywały się na stałym poziomie. Dodatkowo przeprowadzone analizy kapsułkowanych wirusów wykazały utrzymanie mian **vB\_Kp-4M**, **vB\_Kp-12M**, **vB\_Kp-12SM**, **vB\_Kp-36L** na stałym poziomie w stosunku do kontroli zarówno w symulowanym płynie żołądkowym, jak i jelitowym, co potwierdza stabilność kapsułkowanych bakteriofagów w tych warunkach.

Badanie właściwości bakteriobójczych **vB\_Kp-4M**, **vB\_Kp-12M**, **vB\_Kp-12SM**, **vB\_Kp-36L** w stosunku do bakterii gospodarzy potwierdziły efektywność przeciwdrobnoustrojową kapsulek w zakresie od 49,53 do 53,32% dla **vB\_Kp-4M**; od 69,55 do 75,56% dla **vB\_Kp-12M**; od 17,88 do 75,71% dla **vB\_Kp-12SM**; od 17 do 19,14% dla **vB\_Kp-36L** po 8 h prowadzenia infekcji. Dodatkowo obserwowano

właściwości stabilizacyjne w uwalnianiu fagów przy wykorzystaniu kapsułek opłaszczonych chitozanem, a także kapsułek otoczonych chitozanem i wysuszonych w obecności 10% trehalozy w przypadku bakteriofaga vB\_Kp-12SM odpowiednio o 57,83% i 51,34% w stosunku do nieopłaszczonych kapsułek alginianowych. W przypadku pozostałych izolatów vB\_Kp-4M, vB\_Kp-12M, vB\_Kp-36L właściwości stabilizacyjne chitozanu, a także modyfikacji chitozanu i 10% trehalozy były mniejsze i wynosiły od 1,03% do 6% w stosunku do nieopłaszczonych kapsułek alginianowych.

### Zastrzeżenia patentowe

1. Nowy szczep bakteriofaga specyficzny wobec bakterii z gatunku *Klebsiella pneumoniae* wybrany ze szczepów zdeponowanych w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów pod numerami depozytowymi F/00192; F/00193; F/00194; F/00195, z których każdy ma potwierdzoną naturę lityczną i charakteryzuje się wysoką wirulencją.
2. Szczep bakteriofaga wybrany ze szczepów zdeponowanych w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów pod numerami depozytowymi F/00192; F/00193; F/00194; F/00195, do zastosowania w leczeniu infekcji wywołanych przez bakterie z gatunku *Klebsiella pneumoniae*.
3. Szczep bakteriofaga według zastrz. 2, do zastosowania w leczeniu infekcji wywołanych przez bakterie z gatunku *Klebsiella pneumoniae*, przy czym stosuje się mieszanę fagów zdeponowanych w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów pod numerami depozytowymi F/00192; F/00193; F/00194; F/00195, wykazujących się brakiem interferencji.
4. Szczep bakteriofaga według zastrz. 2 albo 3, do zastosowania w leczeniu infekcji szpitalnych i pozaszpitalnych, takich jak ropień wątroby, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, martwicze zapalenie powięzi, zapalenie wnętrza gałki ocznej, ciężkie zapalenie płuc.
5. Szczep bakteriofaga według któregośkolwiek z zastrz. 2–4, **znamienny tym**, że bakteriofagi zdefiniowane w zastrz. 1 są immobilizowane w kapsułkach alginianowych.
6. Szczep bakteriofaga według zastrz. 5, **znamienny tym**, że kapsułki alginianowe są opłaszczone chitozanem.