

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL** (11) **235706**
(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **426164**

(22) Data zgłoszenia: **02.07.2018**

(51) Int. Cl.
C12N 1/20 (2006.01)
A61K 35/74 (2015.01)
A61P 35/00 (2006.01)

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

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
13.01.2020 BUP 02/20

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
05.10.2020 WUP 15/20

(73) Uprawniony z patentu:

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

(72) Twórca(y) wynalazku:

**WIESŁAWA JANASZEK-SEYDLITZ,
Warszawa, PL
BOŻENA BUCHOLC, Warszawa, PL
ANNA KOŁODZIEJ, Wrocław, PL
ARTUR BIELAWSKI, Lublin, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Cieniuch-Kokowicz

PL 235706 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania kompozycji farmaceutycznej zawierającej prątki szczepu BCG należące do *Mycobacterium bovis* BCG podszczepu Moreau.

Rak pęcherza moczowego jest czwartym pod względem częstości występowania nowotworów złośliwych w Polsce. Stanowi on 3% wszystkich nowotworów złośliwych oraz około 70% raków narządów układu moczowego. Najczęściej stosowana metoda leczenia nowotworów pęcherza moczowego nienaciekających mięśniówki właściwej (NMIBECE) jest chirurgicznie usunięcie zmiany nowotworowej w pęcherzu moczowym (TUR), a następnie miejscowa chemioterapia lub immunoterapia. Obecnie za najskuteczniejszą metodę leczenia i zapobiegania nawrotom choroby uważa się immunoterapię żywymi prątkami BCG podawanymi dopęcherzowo. Powszechnie uznano, że immunoterapia prątkami BCG jest skuteczniejsza niż chemioterapia. Jest to metoda uznana i stosowana na całym świecie, zalecana między innymi przez Międzynarodowe Towarzystwa Urologiczne oraz FDA. Wszystkie stosowane aktualnie na świecie podszcypy BCG Bacille Calmette-Guerin zarówno do produkcji szczepionki przeciwgruźliczej, jak i preparatów BCG przeznaczonych do immunoterapii, zawierają jako substancję aktywną atenuowany szczep *Mycobacterium bovis* (BCG). Szczep BCG uzyskany w 1921 r. przez Calmette'a i Guerina w wyniku wieloletniego pasażowania wirulentnego szczepu *M. bovis* na pożywce ziemniaczano-glicerynowej z dodatkiem żółci, został następnie przekazany do wielu laboratoriów na świecie w celu wytwarzania szczepionki przeciwgruźliczej. Liczne pasáže szczepu *M. bovis* BCG przeprowadzane w tych laboratoriach w różnych warunkach hodowli doprowadziły do licznych mutacji i powstania wielu podszcypów BCG różniących się nieco pod względem skuteczności i bezpieczeństwa. Jednak w opinii Światowej Organizacji Zdrowia wszystkie aktualnie istniejące podszcypy BCG nadają się do wytwarzania szczepionki przeciwgruźliczej oraz preparatów BCG do immunoterapii i nie ma podstaw do zalecania jakiegokolwiek podszcypu BCG jako skuteczniejszego od pozostałych. W Polsce brazylijski podszcyp Moreau został wprowadzony do produkcji szczepionki przeciwgruźliczej w 1955 r. i jest dotychczas stosowany. Podszcyp Moreau należy do grupy I podszcypów BCG, które zostały wcześniej wyizolowane z oryginalnego szczepu BCG (*Bacille Calmette-Guerin*). Należy do szczepów charakteryzujących się średnim poziomem immunogenności oraz dość wysokim poziomem bezpieczeństwa. Dopęcherzowa terapia powierzchniowych nowotworów pęcherza moczowego prątkami BCG została zapoczątkowana w 1976 r. przez Moralesa. Mechanizmy oddziaływania prątków BCG na komórki nowotworowe nie zostały dokładnie poznane. Badania mające na celu poznanie biologii guza i zagadnień związanych z jego immunologią mogą być pomocne w podwyższeniu skuteczności immunoterapii, a co za tym idzie zapobieganiu nawrotom choroby. Immunoterapia opiera się na założeniu, że własny system immunologiczny chorego może zniszczyć komórki rakowe. Aby zmobilizować system immunologiczny do wzmożonego działania w obrębie pęcherza moczowego, podaje się dopęcherzowo prątki BCG. Niektóre publikacje sugerują, że w ten sposób wywołuje się sztucznie zapalenie pęcherza moczowego. „Zaalarmowany” system immunologiczny walczy z zapaleniem pęcherza niszcząc jednocześnie komórki rakowe w tym rejonie. Mechanizm działania tej metody leczenia nie jest jednak do końca wyjaśniony. Wiadomo, że miejscowe stymulowanie komórek układu immunologicznego wyzwala mechanizmy przeciwnowotworowe organizmu. Nadzór immunologiczny zjawisk nowotworowych wiąże się z limfocytami T. Komórki nowotworowe mają własne zmienione antygeny transplantacyjne. Krążące limfocyty T rozpoznają antygenową inność komórek nowotworowych i niszczą je, między innymi na drodze efektu cytotoksycznego. W zwalczaniu nowotworów zaangażowane są w dużym stopniu również limfocyty NK, które stanowią komórkową straż chroniącą organizm przed nowotworem. W niszczeniu komórek nowotworowych biorą również udział inne komórki układu odpornościowego, takie jak makrofagi i komórki tuczne. W tym bardzo złożonym procesie obronnym organizmu ważną rolę spełniają różne cytokiny produkowane przez limfocyty, spośród których ogromną rolę odgrywają interferon gamma i czynnik martwicy nowotworu wydzielany przez limfocyty Th1. Po podaniu zawiesiny prątków BCG do pęcherza moczowego obserwuje się infiltrację komórek T, NK oraz makrofagów do ściany pęcherza. W moczu chorego pojawiają się duże ilości cytokin oraz liczne komórki odpornościowe jak makrofagi, neutrofile, komórki T. Zaobserwowano, że istotną rolę w immunoterapii prątkami BCG odgrywa długotrwały bezpośredni kontakt pomiędzy komórkami odpornościowymi znajdującymi się w ścianie pęcherza moczowego z prątkami BCG. W Polsce stosowanie wlewk dopęcherzowych zawierających zawiesinę prątków BCG w leczeniu nowotworów pęcherza moczowego nienaciekających warstwy mięśniowej (NMIBC) rozpoczęto w połowie lat 80. Pol-

skie preparaty Onko BCG do immunoterapii (100 mg/amp i 50 mg/amp) zawierają podobnie jak szczepionka BCG żywe, atenuowane prątki BCG podszczepu Moreau. Stosowanie żywych prątków powoduje szereg niebezpieczeństw i niedogodności. Część chorych ze względu na obniżoną odporność nie może być leczona żywymi prątkami BCG. Prątki atenuowane pomimo obniżonej zjadliwości pozostają żywymi bakteriami, posiadającymi ograniczoną zdolność do namnażania się w organizmie. W przypadku osób z obniżoną odpornością może to być niebezpieczne. Stosowanie wlewek dopęcherzowych zawierających żywe atenuowane prątki BCG może powodować szereg niepożądanych odczynów. Większość z nich wiąże się z podrażnieniami i zaostrzonymi stanami zapalnymi w obrębie układu moczowego. W niewielkim jednak odsetku dopęcherzowe podanie zawiesiny prątków może powodować ciężkie niepożądane odczyny tzw. uogólniony rozsiew prątków BCG, do którego zaliczany jest rozsiew wielonarodowy BCG, itis, zapalenie kości i szpiku kostnego, oseitis, oraz toczeń układowy, które zagrażają życiu chorego. Uogólniony rozsiew BCG występuje niezmiernie rzadko i w przypadku stosowania podszczepu BCG Moreau jest głównie uzależniony od stanu układu immunologicznego leczonej osoby. Ponadto stosowanie zawiesiny żywych atenuowanych prątków BCG wiąże się z potrzebą szczególnej ostrożności, jaką musi zachowywać personel wykonujący zabiegi. Z zawiesiną żywych prątków BCG należy postępować tak jak z materiałem zakaźnym. Osoba wykonująca zabieg musi być zabezpieczona (rękawiczki i maseczka). Sprzęt użyty do zabiegu oraz mocz osoby poddanej zabiegowi muszą być poddane autoklawowaniu w celu zabicia pozostałości żywych prątków.

Dotychczas znana jest z opisu wynalazku US 2015240201 jest kompozycja farmaceutyczna do leczenia lub profilaktyki raka pęcherza u ssaka zawierająca zmodyfikowany na żywo szczep *Mycobacterium bovis* BCG.

Z opisu wynalazku EP 2620159 znana jest mykobakteryjna kompozycja immunologiczna, z których każda zawiera co najmniej *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG) antygenowo spokrewniony niepatogenny prątek lub jeden lub więcej immunogeny składnik do stosowania w leczeniu raka przez podawanie pozajelitowe lub doustne pierwszej kompozycji pacjentowi z rakiem przed miejscowym podaniem drugiej kompozycji w miejscu nowotworu.

Istotą sposobu wytwarzania kompozycji farmaceutycznej zawierającej prątki BCG należące do *Mycobacterium bovis* BCG brazylijskiego podszczepu Moreau, według wynalazku jest to, że dokonuje się najpierw ożywianie prątków na podłożu zawierającym asparaginę w ilości 2,5%–5,5%, kwas cytrynowy w ilości 1,5%–2,5%, dwupotasowy fosforan bezwodny w ilości 0,2%–0,8%, siarczan magnezu w ilości 0,2%–0,8%, amonu żelaza w ilości 0,02%–0,07%, siarczan cynku w ilości 0,001%–0,004%, glicerol w ilości 54%–65% oraz selenian sodu w ilości 0,006%–0,009%, kwas foliowy w ilości 0,02%–0,06% oraz chlorek wapnia w ilości 0,001%–0,003%, a następnie inkubuje się w temperaturze 36–38°C w czasie 15–21 dni, po czym dokonuje się dwukrotnego przepasażowania uzyskanej hodowli prątków BCG, a otrzymaną masę bakteryjną przepłukuje się zbuforowanym roztworem chlorku sodu i dwufosforanu potasu, a następnie zawiesza się w nośniku stanowiącym 6% glutaminian sodu.

Korzystnym rozwiązaniem wynalazku jest to, że kompozycja farmaceutyczna wytworzona sposobem według wynalazku na bazie prątków szczepu BCG jest stabilna i wolna od szeregu niebezpieczeństw i niedogodności.

Przedmiot wynalazku ilustruje szczegółowo podany przykład.

Przykład

Szczep sienny BCG ożywia się na podłożu składającym się z asparaginy jednowodnej w ilości 4,0%, kwasu cytrynowego jednowodnego w ilości 2,0%, dwupotasowy fosforan bezwodny w ilości 0,5%, siarczanu magnezu siedmiowodnego w ilości 0,5%, amonu żelaza w ilości 0,05%, siarczan cynku siedmiowodnego w ilości 0,002%, glicerol w ilości 60%, selenian sodu w ilości 0,009%, kwasu foliowego w ilości 0,004%, oraz bezwodnego chlorku wapnia w ilości 0,002%, przy czym roztwór soli rozpuszczono w 1 litrze wody do wstrzykiwań podgrzewając do całkowitego rozpuszczenia. Kulturę bakteryjną inkubuje się następnie w temp 36–38% w okresie 20 dni. Uzyskana hodowla prątków BCG jest następnie dwukrotnie przepasażowana na podłożu zawierającym asparaginę, kwas cytrynowy, dwupotasowy fosforan bezwodny, siarczan magnezu, siarczan cynku, glicerol, roztwór amoniaku. Cały proces wzrostu hodowli prątków BCG trwa 32 dni. Następnie w prasce Birkhauga wyhodowana kultura prątków zostaje oddzielona od podłoża Sautona i przepłukana zbuforowanym roztworem chlorku sodu zawierającym chlorek sodu, dwuwodorofosforan potasu w celu usunięcia pozostałości podłoża. Otrzymaną w ten sposób masę bakteryjną zawiesza się w nośniku stanowiącym glutaminian sodu 6%. Całość homogenizuje się w celu uzyskania jednorodnej zawiesiny prątków.

Zastrzeżenie patentowe

1. Sposób wytwarzaniu kompozycji farmaceutycznej zawierającej kulturę bakteryjną szczepu BCG należące do *Mycobacterium bovis* BCG brazylijskiego podszczepu Moreau, przeznaczonej do leczenia nowotworów pęcherza moczowego nienaciekających warstwy mięśniowej (NMIBC) u ludzi, **znamienny tym**, że dokonuje się najpierw ożywiania prątków na podłożu zawierającym asparaginę w ilości 2,5%–5,5%, kwas cytrynowy w ilości 1,5%–2,5%, dwupotasowy fosforan bezwodny w ilości 0,2%–0,8%, siarczan magnezu w ilości 0,2%–0,8%, siarczan cynku w ilości 0,001%–0,004%, glicerol w ilości 54%–65% oraz, selenian sodu w ilości 0,006%–0,009%, kwas foliowy w ilości 0,02%–0,06% oraz chlorek wapnia w ilości 0,001%–0,003%, a następnie inkubuje się w temperaturze 36–38°C w czasie 15–21 dni, po czym dokonuje się dwukrotnego przepasażowania uzyskanej hodowli prątków BCG, a otrzymaną masę bakteryjną przepłukuje się zbuforowanym roztworem chlorku sodu i dwufosforanu potasu, a następnie zawiesza się w nośniku stanowiącym 6% glutaminian sodu.