

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2012-668

(13) Druh dokumentu: **A3**

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **27.09.2012**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **07.08.2013**
(Věstník č. 32/2013)

(51) Int. Cl.:

C12N 7/00 (2006.01)
A61K 35/76 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
C12R 1/445 (2006.01)
C12R 1/92 (2006.01)

(71) Přihlašovatel:

IMUNA s.r.o., Praha 10, CZ
Masarykova univerzita, Brno, CZ

(72) Původce:

Moša Marek RNDr. Ph.D., Mečeříž, CZ
Boštik Josef RNDr. CSc., Praha 2, CZ
Pantůček Roman Doc. RNDr. Ph.D., Brno, CZ
Doškař Jiří Prof. RNDr. CSc., Brno, CZ

(74) Zástupce:

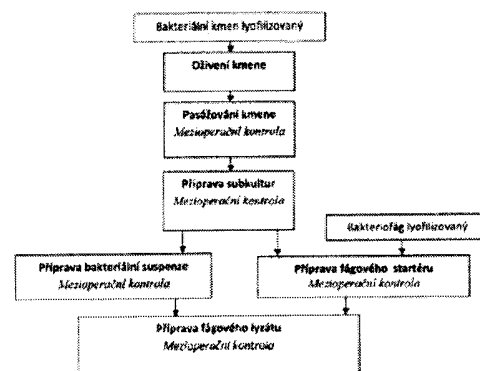
VYNÁLEZ, s.r.o., Vinohradská 1107/45, Praha 2, 12000

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Léčivo ve formě antistafylokokového
fágového lyzátu, způsob jeho výroby a použití**

(57) Anotace:

Způsob výroby léčiva ve formě antistafylokokového fágového lyzátu, zahrnující následující po sobě jdoucí kroky: oživení bakteriálního kmene, pasážování bakteriálního kmene, příprava buněčných subkultur, příprava fágového startéru metodou dvouvrstevného agaru, příprava fágového startéru v tekuté půdě, příprava bakteriální suspenze, příprava fágového lyzátu, filtrace fágového lyzátu nebo směsi lyzátů, rozplnění filtrovaného lyzátu nebo směsi lyzátů do lahvíček, lyofilizace lahvíček s lyzátem nebo se směsí lyzátů, kde hotový léčivý přípravek je lyofilizovaný prášek pro přípravu roztoku (lyofilizát) vyrobený sterilní filtrací a lyofilizací směsi antistafylokokového fágového lyzátu obsahující účinné fágové částice polyvalentního stafylokokového bakteriofága. Léčivo pro lokální použití obsahuje vysoce účinné virulentní fágové částice s polyvalentním účinkem.



Léčivo ve formě antistafylokového fágového lyzátu, způsob jeho výroby
a použití

PV2012-668

2065413

Oblast techniky

Vynález se týká léčiva s účinnou látkou ve formě antistafylokokového fágového lyzátu, který obsahuje vysoce virulentní a specificky účinné fágové částice, které mají velmi rychlý, silný a polyvalentní lytický účinek na původce stafylokokových infekcí. Buněčné složky vzniklé destrukcí bakteriálních buněk při lyzi po uvolnění fágových virionů mohou působit také imunomodulačně a stimulovat navození nespecifické imunity. Vynález rovněž zahrnuje způsob výroby léčiva a jeho použití.

Dosavadní stav techniky

Infekční choroby způsobované patogenními bakteriemi jsou v celosvětovém měřítku jednou z hlavních příčin úmrtí člověka. Mezi vůbec nejčastěji se vyskytující patogenní bakterie patří stafylokoky, způsobující celou řadu onemocnění, běžnými kožními infekcemi počínaje, přes závažná onemocnění orgánů jako jsou osteomyelitidy, endokarditidy a pneumonie až k těžkým sepsím končícím smrtí pacienta (jedinci s oslabenou imunitou, po léčbě nádorů, s implantáty, starší jedinci, pacienti s cystickou fibrózou). Mimořádnou důležitost má druh *Staphylococcus aureus*, který patří mezi hlavní původce komunitních a nemocničních (nozokomiálních) infekcí. Závažným problémem, který komplikuje léčbu pacientů, je vznik a šíření kmenů rezistentních k antimikrobiálním preparátům (zejména antibiotikům) jako důsledek neracionálního používání těchto látek k léčbě často banálních onemocnění. Problém zvyšujícího se počtu bakteriálních kmenů rezistentních na antibiotika může být řešen zavedením racionální fágové terapie, tzn. využitím bakteriofágů k léčbě bakteriálních infekcí jako alternativy nebo náhrady léčby antibiotiky, zejména proto, že je časově a finančně značně obtížné získávat nová účinná antibiotika (Gill and Hyman 2010, Curr. Pharm. Biotechnol. 11:2-14).

Polyvalentní stafylokokové bakteriofágy čeledi Myoviridae se v posledních letech staly předmětem zájmu s ohledem na jejich možné praktické využití při fágové terapii, která představuje vhodnou alternativu antibiotikové léčby stafylokokových infekcí (Mann 2008,

Res. Microbiol. 59:400-405). K nejlépe prostudovaným fágům z této skupiny patří fág K, u něhož je známa kompletní sekvence genomu (O'Flaherty et al. 2004, J. Bacteriol. 186: 2862-2871, Kwan et al. 2005, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:5174-5179). V naší dřívější práci (Pantůček et al. 1998, Virology 246:241-252) jsme podrobně charakterizovali fága 812, který se vyznačuje širokým rozmezím hostitele v rámci r. *Staphylococcus*. Testováním lytického účinku fága 812 a jeho mutant v rozmezí hostitele provedeným na rozsáhlém počtu kmenů *S. aureus* různé provenience bylo zjištěno, že 95 % kmenů je citlivých alespoň k jedné mutantě v rozmezí hostitele polyvalentního fága 812. Ze studia restriktivně deficientních mutant *S. aureus* vyplynulo, že rezistence kmenů *S. aureus* k polyvalentnímu fágu 812 je podmíněna specifickými restriktivně modifikačními systémy (Doškař 1989, Scripta Fac. Sci. Nat. Univ. Purk. Brun. 19:391-401).

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu je antistafylokokový fágový lyzát pro lokální použití, je určen výhradně pro místní aplikaci u infekcí vyvolaných stafylokokovými kmeny. Může se použít v humánní i veterinární medicíně u všech forem stafylokokových infekcí. Slouží k destrukci stafylokokových buněk v místě probíhající infekce.

Popis biologického materiálu je následující.

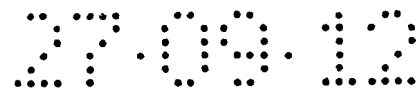
Polyvalentní stafylokokový bakteriofág

Označení: Bakteriofág DSM 26144 (směs několika subtypů polyvalentního bakteriofága, izolovaných genetickou selekcí na klinických izolátech *Staphylococcus aureus*)

Taxonomické zařazení: Řád Caudovirales, čeleď Myoviridae, rod SP01-like viruses

Typ nukleové kyseliny: lineární dvouřetězcová DNA bez kohezních konců; velikost 138,7 kbp; molární obsah G+C 30,42 %; genetická odlišnost subtypů 0,2% sekvence DNA zahrnuje 27 sekvenčních variací (krátké inserce, delece a záměny) a 287 bodových mutací popsanych v sekvenci formou degenerovaných bází dle nomenklatury IUPAC

Sekvence genomu: doloženo na CD



Rozmezí hostitele: kmeny různých druhů rodu *Staphylococcus*, zejména *Staphylococcus aureus*

Životní cyklus: výhradně virulentní bakteriální virus, nepodléhá lyzogennímu cyklu, v sekvenci DNA neprokázány geny pro integrázy nebo antirepresory, jež jsou **charakteristické pro temperované bakteriofágy**

Struktura virionu: Hlavička a bičík s kontraktilní pochvou, bazální destička s hroty, velikost hlavičky 80 - 100 nm, délka bičíku 200 - 250 nm (příloha elektronmikroskopický snímek bakteriofága).

Uložení ve sbírce: Biologický materiál byl uložen dle Budapeštské smlouvy v DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstraße 7B, 38124 Braunschweig, Germany s prioritou k 3. 7.2012 (číslo v databázi DSM 26144)

Pomnožovací kmen *Staphylococcus aureus* pro bakteriofága

Označení: *Staphylococcus aureus* CCM 8428

Taxonomické zařazení: Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Staphylococcaceae

Koncept sekvence genomu: sekvence genomu o délce 2446 kb představující 87% celkové délky genomové DNA a je **doložena na CD** ve formě kontigů

Klonální zařazení: Sekvenční typ ST30 , spa-typ t021

Fenotypová charakteristika: G+ koky, průměr 0,8-1 µm, jednotlivé, dvojice, hrozníčky, hloučky. Na krevním agaru nebo na tryptonovém agaru tvoří kolonie 1-2 mm, okraje rovné, povrch hladký, vypouklý, barva béžová, neprůhledná. Na krevním agaru produkuje hemolysin alfa a beta. Clumping-faktor pozitivní, hyaluronidáza pozitivní. Metodou RPLA nebyla prokázána produkce enterotoxinů SEA - SEE, TSST-1, ETA a ETB.

Citlivost k bakteriofágům: vysoce citlivý k temperovaným bakteriofágům 29, 52, 52A, 79, 80, 6, 42E, 47, 53, 54, 75, 77, 83A, 84, 85, 81 a 95.

Genotypová charakteristika: Kmen bez profágů, bez plazmidů, metodou PCR nebyly prokázány geny enterotoxinů (sea - see, seh - sen, sep - seu) a geny pro PVL, TSST-1, ETA, ETB, ETD, dále nebyly prokázány geny pro rezistence k antibiotikům mecA, blaZ, tetK, tetM, ermA, ermB a ermC.

Uložení ve sbírce: Biologický materiál byl uložen dle Budapeštské smlouvy v CCM-České sbírce mikroorganismů v Brně s prioritou k 21.6.2012 (číslo v databázi CCM 8428)

Výchozím materiálem pro výrobu lyzátu jsou subtypy polyvalentního bakteriofága, které jsou uchovávány v lyofilizovaném stavu za dodržení systému jednotné inokulace (seed lot systém). Tyto bakteriofágy jsou při výrobě fágového lyzátu pomnoženy na nepatogenním pomnožovacím kmeni *Staphylococcus aureus* do vysokého titru ($10^8 - 10^9$ PFU/ml) a zpracovány do finálního preparátu, přičemž jednotka PFU (Plaque forming units) je měřítkem množství infekčních virových částic.

Používá se hlavně k eliminaci původců stafylokokových infekcí z ložisek infekce (hnisavé procesy kůže, podkoží a kožních adnex) i potenciálních rezervoárů (především nosohltanu, střevního a močového traktu). Představuje významný prostředek při komplexní léčbě chronických forem stafylokokových infekcí (hnisavé afekce, abscesy, píštěle, infekce postihující hluboko uložené měkké tkáně), který zabraňuje jejich vyústění v septický stav. Je též důležitou součástí preventivních opatření v předoperační přípravě s cílem zabránit vzniku superponovaných pyogenních komplikací po operativních intervencích.

Alternativním využitím preparátu je uplatnění při konzervaci a uchovávání potravin, při výrobě krmiv pro hospodářská zvířata a využití při dekontaminaci povrchů (nemocniční prostředí, lékařské pomůcky).

Princip výrobního procesu

Bakteriální hostitelská kultura se kultivuje v tekutém tryptonovém médiu. Po dosažení růstu blížího se hodnotě 1×10^9 PFU/ml se přidá aktivní fágový kmen v přibližném poměru MI 1 (MI = multiplicita infekce), což znamená, že fágová částice připadá na 1 bakteriální buňku. Po proběhlé lýze bakteriální kultury se fágový lyzát uloží do lednice, kde je uchováván do dalšího zpracování. Léčivá látka je připravena jako směs obsahující vysoce účinné virulentní fágové částice s polyvalentním účinkem připravené kultivací subtypů bakteriofágů a standardizována ve své účinnosti podle koncentrace specifických fágových částic v 1 ml.

1. Oživení bakteriálního kmene

Lyofilizovaný kmen se po rozpuštění vyočkuje na 1,5% tryptonový agar a kultivuje se 24 hodin při teplotě $+37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Pasážování kmene

Narostlý bakteriální kmen se přeočkuje na potřebný počet ploten s 1,5 % tryptonovým agarem a kultivuje se 24 hodin při teplotě + 37 °C ± 1 °C. Narostlá kultura se použije pro zaočkování tekuté tryptonové půdy. *Mezioperační kontrola:* Kultivační a mikroskopická kontrola čistoty kmene.

2. Příprava subkultur

Bakteriální kultura se z pevné půdy přeočkuje do Erlenmayerovy baňky se 100 ml tryptonové půdy. Množství zaočkových Erlenmayerových baněk závisí na potřebném množství subkultur pro výrobu (1 - 3 ks), kultivace probíhá 24 hodin při teplotě + 37 °C ± 1 °C.

Mezioperační kontrola: Mikroskopická kontrola čistoty subkultur.

3. Příprava fágového startéru

Rozpuštěný fágový kmen se nejprve oživí a pomnoží metodou dvouvrstevného agarů a dále se kultivuje v tekuté půdě.

Metoda dvouvrstevného agarů

Petriho misky s 1,5 % tryptonovým agarem, který slouží jako základ, se přelijí 3 ml 0,36% tryptonového agarů, který obsahuje bakteriální suspenzi příslušné hostitelské bakterie *Staphylococcus aureus* a suspenzi bakteriofága, získaného resuspendováním lyofilizovaného fágového kmene v izotonickém roztoku. Následuje inkubace 24 h při teplotě +37 °C ± 1 °C. Poté se povrch každé plotny přelije tryptonovým tekutým médiem. Po 30 minutách se měkký povrch s 0,36% tryptonovým agarem smyje a centrifuguje 3 x 1 hodinu při 5000 RPM. Bakteriofág je obsažen v supernatantu.

Mezioperační kontrola: Stanovení počtu fágových částic.

4. Příprava v tekuté půdě

Subkulturou hostitelské bakterie *Staphylococcus aureus* se inokuluje tryptonová půda. Kultivace probíhá v termostatu při teplotě +37 °C ± 1 °C tak dlouho, až je dosažena optická denzita biomasy 0,3 - 0,4 (měřeno na spektrofotometru při vlnové délce 500 nm). Do stafylokokové suspenze se přidá 15 - 20 ml fágového lyzátu (připraveného dle předchozího bodu, o min. titru 1×10^{10} PFU/ml).

Probíhá pomnožení bakteriofága při pokojové teplotě 18 - 20 hodin za stálého třepání. Následuje centrifugace 1 hodinu při 5000 RPM. Bakteriofág je obsažen v supernatantu.

Mezioperační kontrola: Kontrola denzity bakteriální suspenze a během bakteriolýzy, stanovení počtu fágových částic fágového startéru.

5. Příprava bakteriální suspenze

Bakteriální suspenze z Erlenmayerových baněk se zaočkuje do 3000 ml tryptonové půdy v 5 l lahvi.

Kultivace při + 37 °C ± 1°C probíhá tak dlouho, než se dosáhne požadované denzity (optická denzita 0,25 - 0,35). Doba kultivace se pohybuje zpravidla v rozmezí 4 až 5 hodin. První vzorek na kontrolu denzity je odebrán po 3 hodinách kultivace, další vzorky jsou odebírány v závislosti na nárůstu bakterií.

Mezioperační kontrola: Provozní kontrola provádí během kultivace měření denzity a po ukončení kultivace mikroskopickou **kontrolou**.

6. Příprava fágového lyzátu

K bakteriální suspenzi se přidá fágový startér o min. titru 1×10^{10} PFU/ml v množství cca 50 - 60 ml. Startér je asepticky přidán v okamžiku, kdy je hodnota optické denzity vzorku v intervalu (0,25 - 0,35).

Bakteriolýza probíhá při pokojové teplotě 20 - 30 hodin. Během bakteriolýzy dochází k projasňování tekuté kultury. Optická denzita lyzované bakteriální suspenze musí poklesnout pod hodnotu 0,1.

Mezioperační kontrola: Provozní kontrola provádí měření denzity.

Kultivační média pro výrobu fágového lyzátu:

Tryptonová půda

- suroviny Trypton Oxoid, Yeast extract Oxoid, chlorid sodný, purifikovaná voda

Tryptonový agar

- tryptonová půda, Agar Oxoid № 1

Sterilizace připraveného tryptonového agaru i tryptonové půdy probíhá v parním sterilizátoru při teplotě 121 °C pro dobu 30 minut.

Kontrola kultivačních půd je založena na ověření růstových vlastností pomocí kmene *Staphylococcus aureus*.

Kontrola kritických kroků a meziproductů

Krok	Metoda	Požadavky
1. Oživení a pasážování bakteriálního kmene	Mikroskopická čistota	G+ koky, průměr 0,8 - 1 μm , jednotlivé, dvojice, hrozníčky, hloučky. Nesmí obsahovat cizí mikroorganismy
	Kultivační čistota	Kolonie 1-2 mm, okraje rovné, povrch hladký, vypouklý, barva zlatožlutá (bílá, béžová), neprůhledná, konzistence mazlavá. Nesmí obsahovat kolonie jiného mikrobiálního druhu.
2. Příprava bakteriálních subkultur	Mikroskopická čistota	G+ koky, průměr 0,8 - 1 μm , jednotlivé, dvojice, hrozníčky, hloučky. Nesmí obsahovat cizí mikroorganismy
3. Příprava fágového startéru - dvouvrstevný agar	Stanovení počtu fágových částic	min. 1 . 10 ¹⁰ PFU/ml
4. Příprava fágového startéru - tekutá půda	Měření denzity spektrofotometricky	Nárůst hostitelské bakterie na OD 0,3 - 0,4
	Stanovení počtu fágových částic	min. 1 . 10 ¹⁰ PFU/ml
5. Příprava bakteriální suspence	Mikroskopická čistota	G+ koky, průměr 0,8 - 1 μm , jednotlivé, dvojice, hrozníčky, hloučky. Nesmí obsahovat cizí mikroorganismy
	Měření denzity	Nárůst hostitelské bakterie na

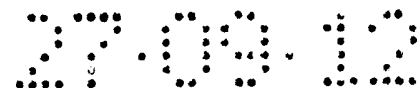
	spektrofotometricky	OD 0,25,-0,35
6.Příprava fágového lyzátu	Měření denzity spektrofotometricky	Kontrola nárůstu bakteriofága pokles OD pod 0,1

Použití k:**Rozšíření spektra účinnosti preparátu na aktuálně se vyskytující kmeny***Účinnost preparátu*

Preparát je v současnosti účinný na 85 % prověřovaných kmenů (n=100) včetně nemocničních a komunitních kmenů ze závažných infekcí a MRSA shromážděných z nemocničních zařízení a klinických laboratoří z několika regionů. Většina citlivých kmenů *Staphylococcus aureus* je klasifikována do klonálních linií ST1, ST5, ST8, ST20, ST22, ST30, ST36, ST111, ST154, ST225, ST228, ST247, ST624. Genotypy a vlastnosti stafylokokových kmenů však podléhají poměrně rychlé evoluci a v budoucnosti se dá očekávat výskyt necitlivých kmenů. Pro rozšíření spektra účinnosti na základě testování citlivosti aktuálně se vyskytujících kmenů *Staphylococcus aureus* je navrženo použít pro přípravu inovovaného přípravku směs více fágových lyzátu obsahujících několik subtypů bakteriofágů (fágových mutant s rozšířeným rozmezím hostitele).

Izolace nových subtypů bakteriofága a inovace preparátu

Subtypy bakteriofága s širším rozmezím hostitele jsou izolovány z plaků vyrostlých po výsevu výchozího fága na necitlivé bakteriální kmeny *Staphylococcus aureus*. Izolace nových účinných subtypů je prováděna výsevem lyzátu fágů o vysokém titru na nárůst rezistentních kmenů. Jednotlivé plaky, které na těchto kmenech vyrostou s velmi nízkou frekvencí (10^{-9} - 10^{-6}), jsou pak použity k založení lyzátu obsahujících mutantní fágy. Pro dosažení širokého lytického spektra může být selekce prováděna v několika stupních, během nichž jsou fágové mutanty získané na jednom rezistentním kmeni následně vysévány na další (jiné) rezistentní kmeny. Během tohoto procesu probíhají ve fágových genomech mutace, které ovlivňují lytické schopnosti fága a vedou k rozšíření jeho rozmezí hostitele. Eventualita, že selektované fágy mohou být výsledkem modifikace indukované hostitelským kmenem použitým pro jejich selekci, je ověřena stanovením hodnoty účinnosti výsevu (eop) na testovaných kmenech a jejich schopnosti udržet si široké rozmezí hostitele po opakovaném pomnožení na propagačním kmeni



(testování reverze). Na základě vlastních dlouholetých zkušeností má však většina takto získaných bakteriofágových subtypů charakter mutant, které si rozšířené rozmezí hostitele trvale udržují.

Výroba konečného přípravku

Popis a složení konečného přípravku

Hotový léčivý přípravek je lyofilizovaný prášek pro přípravu roztoku (lyofilizát) vyrobený sterilní filtrací a lyofilizací směsi antistafylokokového fágového lyzátu obsahující účinné fágové částice polyvalentního stafylokokového bakteriofága.

Léčivo pro lokální použití obsahuje vysoce účinné virulentní fágové částice s polyvalentním účinkem. Je standardizován ve své účinnosti podle koncentrace specifických fágových částic po rekonstituci prášku pro přípravu roztoku v rozpouštědle (voda na injekci) na 1 ml.

V jedné terapeutické dávce je obsaženo **minimálně 10^6 částic.**

Výrobní proces konečného léčivého přípravku

Výroba šarže konečného přípravku kontinuálně navazuje na výrobu fágových lyzátů jednotlivých subtypů fágového kmene. Šarže konečného přípravku je vyrobena smícháním stejného množství fágových lyzátů jednotlivých subtypů bakteriofága, připravená směs je sterilně zfiltrována, rozplněna do lahviček a lyofilizována. Po ukončení lyofilizace jsou lahvičky s hotovým přípravkem uzavřeny zátkou, zajištěnou pertlí.

Filtrace

Směs lyzátů se po odebrání vzorku pro mikrobiální zátěž (100 ml) filtruje přes filtrační vrstvu o porositě 0,22 μm .

Mezioperační kontrola:

Stanovení mikrobiální zátěže přípravku - max. 10 **PFU**/100 ml.

Rozplňování

Filtrovaný lyzát se rozplňuje po 10 ml do lahviček PNC 20 ml.

Mezioperační kontrola: Kontrola plněného objemu pomocí kalibrovaného odměrného válce.

Lyofilizace

Naplněné lahvičky překryté lyofilizační zátkou jsou lyofilizovány ve vakuu z hlubokého namražení (-45 °C) zahříváním na deskách do stanovené teploty (+30 °C).

Popis lyofilizačního cyklu:

I. Fáze: namražení desek na -50 °C, založení materiálu, namražení materiálu do vyrovnání teploty desek a materiálu na stejnou hodnotu (doba trvání fáze 1 hod.)

II. Fáze: Je udržována zmrazovací teplota desek na -50 °C a zahřívána vývěva (doba trvání fáze 30 min.)

III. Fáze: hlavního sušení - evakuace sušicího prostoru do nastaveného vakua (30-80 Pa). Po dosažení hodnoty tlaku, začíná ohřívání desek nastavené na teplotu +30 °C dle časového režimu. Tato fáze lyofilizačního procesu představuje přibližně 90 % celkového času a trvá přibližně 24 hodin.

IV. Fáze: Finální sušení za maximálního vakua (2 - 0,5 Pa) a maximální teploty +30 °C. Pokud je dosaženo teploty produktu shodné s teplotou topných desek a hodnoty vakua se při testu ukončení sušení nemění, je lyofilizace ukončena zrušením vakua.

Po ukončení lyofilizace jsou zátky zajištěny pertlí.

Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1 znázorňuje schéma přípravy fágového lyzátu

Obr. 2 znázorňuje schéma výroby konečného přípravku

Příklad provedení vynálezu

Příklad 1

Způsob výroby léčiva ve formě antistafylokokového fágového lyzátu zahrnuje následující po sobě jdoucí kroky:

- oživení bakteriálního kmene;
- pasážování bakteriálního kmene;
- příprava buněčných subkultur;
- příprava fágového startéru metodou dvouvrstevného agaru;
- příprava fágového startéru v tekuté půdě;
- příprava bakteriální suspenze;
- příprava fágového lyzátu;
- filtrace fágového lyzátu nebo směsi lyzátů;
- rozplnění filtrovaného lyzátu nebo směsi lyzátů do lahvíček;
- lyofilizace lahvíček s lyzátem nebo se směsí lyzátů.

Krok oživení bakteriálního kmene zahrnuje vyočkování lyofilizovaného bakteriálního kmene po jeho rozpuštění na 1,5% tryptonový agar a jeho následnou kultivaci po dobu 24 hodin při teplotě $+37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Krok pasážování bakteriálního kmene zahrnuje přeočkování narostlého bakteriálního kmene na potřebný počet ploten s 1,5 % tryptonovým agarem a jeho kultivace po dobu 24 hodin při teplotě $+37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Krok přípravy buněčných subkultur zahrnuje přeočkování bakteriální kultury z pevné půdy do Erlenmayerovy baňky se 100 ml tryptonové půdy, přičemž množství zaočkovaných Erlenmayerových baněk závisí na potřebném množství subkultur pro výrobu a kultivace probíhá 24 hodin při teplotě $+37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Krok přípravy fágového startéru metodou dvouvrstevného agaru zahrnuje oživení rozpuštěného fágového kmene a jeho pomnožení, přičemž Petriho misky s 1,5 % tryptonovým agarem, který slouží jako základ, se přelije 3 ml 0,36% tryptonového agaru, který obsahuje bakteriální suspenzi příslušné hostitelské bakterie *Staphylococcus aureus* a suspenzi bakteriofága, získaného resuspendováním lyofilizovaného fágového kmene v izotonickém roztoku, následuje inkubace 24 h při teplotě $+37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, poté se povrch každé plotny přelije tryptonovým agarem, po 30 minutách se měkký povrch s 0,36% tryptonovým agarem smyje a centrifuguje 3krát 1 hodinu při 5000 RPM, přičemž bakteriofág je obsažen v supernatantu.

Krok přípravy fágového startéru v tekuté půdě zahrnuje inokulaci tryptonové půdy subkulturou hostitelské bakterie *Staphylococcus aureus*, kultivace probíhá v termostatu při teplotě $+37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ tak dlouho, až je dosažena optická denzita biomasy 0,3 - 0,4, měřeno na spektrofotometru při vlnové délce 500 nm, do stafylokokové suspenze se přidá 15 - 20 ml fágového lyzátu připraveného dle předchozího bodu, o min. titru 1×10^{10} PFU/ml, probíhá pomnožení bakteriofága při pokojové teplotě 18 - 20 hodin za stálého třepání, následuje centrifugace 1 hodinu při 5000 RPM, přičemž bakteriofág je obsažen v supernatantu.

Krok přípravy bakteriální suspenze zahrnuje zaočkování bakteriální suspenze z Erlenmayerových baněk do 3000 ml tryptonové půdy v 5 l lahvi, přičemž kultivace při $+37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ probíhá tak dlouho, než se dosáhne požadované denzity v rozmezí 0,25 - 0,35, doba kultivace probíhá v rozmezí 4 až 5 hodin, první vzorek na kontrolu denzity je odebrán po 3 hodinách kultivace a další vzorky jsou odebírány v závislosti na nárůstu bakterií.

Krok přípravy fágového lyzátu nebo směsi fágových lyzátů zahrnuje přidání fágového startéru startér o min. titru 1×10^{10} PFU/ml v množství o objemu 50 - 60 ml k bakteriální suspenzi, přičemž startér je asepticky přidán v okamžiku, kdy je hodnota optické denzity vzorku v intervalu 0,25 - 0,35, bakteriolýza probíhá při pokojové teplotě 20 - 30 hodin, během bakteriolýzy dochází k projasňování tekuté kultury a optická denzita lyzované bakteriální suspenze musí poklesnout pod hodnotu 0,1.

Po odebrání vzorku pro mikrobiální zátěž o obsahu vzoru 100 ml se fágový lyzát nebo směs lyzátů filtruje přes filtrační vrstvu o porositě $0,22\text{ }\mu\text{m}$, přičemž mikrobiální zátěž přípravku odpovídá max. 10 PFU/100 ml.

Filtrovaný lyzát se rozplňuje po 10 ml do lahviček PNC 20 ml.

Lahvičky s lyzátem nebo se směsí lyzátů překryté lyofilizační zátkou jsou lyofilizovány ve vakuu z hlubokého namražení ($-45\text{ }^{\circ}\text{C}$) zahříváním na deskách do stanovené teploty ($+30\text{ }^{\circ}\text{C}$), přičemž krok lyofilizace sestává z následujících fází a po ukončení lyofilizace jsou zátky zajištěny pertlí:

I. Fáze: namražení desek na $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$, založení materiálu, namražení materiálu do vyrovnání teploty desek a materiálu na stejnou hodnotu (doba trvání fáze 1 hod.)

II. Fáze: Je udržována zmrazovací teplota desek na $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ a zahřívána vývěva (doba trvání fáze 30 min.)

III. Fáze: hlavního sušení - evakuace sušícího prostoru do nastaveného vakua (30-80 Pa). Po dosažení hodnoty tlaku, začíná ohřívání desek nastavené na teplotu $+30\text{ }^{\circ}\text{C}$ dle časového režimu. Tato fáze lyofilizačního procesu představuje přibližně 90 % celkového času a trvá přibližně 24 hodin.

IV. Fáze: Finální sušení za maximálního vakua (2 - 0,5 Pa) a maximální teploty $+30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pokud je dosaženo teploty produktu shodné s teplotou topných desek a hodnoty vakua se při testu ukončení sušení nemění, je lyofilizace ukončena zrušením vakua.

Při výrobě byla použita tryptonová půda vytvořená ze souboru látek zahrnujícího Trypton Oxoid, Yeast extract Oxoid, chlorid sodný a purifikovanou vodu, a dále byl použit tryptonový agar sestávající z kombinace tryptonové půdy a Agar Oxoid № 1. Sterilizace připraveného tryptonového agaru a tryptonové půdy probíhala v parním sterilizátoru při teplotě $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro dobu 30 minut.

Příklad 2

Léčivo ve formě antistafylokového fágového lyzátu obsahující účinné fágové částice polyvalentního stafylokokového bakteriofága, které je připravené způsobem podle příkladu 1. V jedné terapeutické dávce je **minimálně 10^6 částic** bakteriofága.

Průmyslová využitelnost

Vynález je průmyslově využitelný v oblasti humánní i veterinární medicíny u všech forem stafylokokových infekcí. Slouží k destrukci stafylokokových buněk v místě probíhající infekce.

27.09.12
PV 1012-668
1) 061413

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob výroby léčiva ve formě antistafylokokového fágového lyzátu, **vyznačující se tím, že** zahrnuje následující po sobě jdoucí kroky:

- oživení bakteriálního kmene;
- pasážování bakteriálního kmene;
- příprava buněčných subkultur;
- příprava fágového startéru metodou dvouvrstevného agaru;
- příprava fágového startéru v tekuté půdě;
- příprava bakteriální suspenze;
- příprava fágového lyzátu;
- filtrace fágového lyzátu nebo směsi lyzátů;
- rozplnění filtrovaného lyzátu nebo směsi lyzátů do lahvíček;
- lyofilizace lahvíček s lyzátem nebo se směsí lyzátů.

nebo zahrnuje následující po sobě jdoucí kroky:

- oživení bakteriálního kmene;
- pasážování bakteriálního kmene;
- příprava buněčných subkultur;
- příprava bakteriální suspenze;
- příprava fágového startéru metodou dvouvrstevného agaru;
- příprava fágového startéru v tekuté půdě;
- příprava fágového lyzátu;
- filtrace fágového lyzátu nebo směsi lyzátů;
- rozplnění filtrovaného lyzátu nebo směsi lyzátů do lahvíček;
- lyofilizace lahvíček s lyzátem nebo se směsí lyzátů.

2. Způsob výroby léčiva podle nároku 1, **vyznačující se tím, že** krok oživení bakteriálního kmene zahrnuje vyočkování lyofilizovaného bakteriálního kmene po jeho rozpuštění na 1,5% tryptonový agar a jeho následnou kultivaci po dobu 24 hodin při teplotě $+37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

3. Způsob výroby léčiva podle nároku 1, **vyznačující se tím, že** krok pasážování bakteriálního kmene zahrnuje přeočkování narostlého bakteriálního kmenu na potřebný počet ploten s 1,5 % tryptonovým

agarem a jeho kultivace po dobu 24 hodin při teplotě $+ 37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.

4. Způsob výroby léčiva podle nároku 1, **vyznačující se tím, že** krok přípravy buněčných subkultur zahrnuje přeočkování bakteriální kultury z pevné půdy do Erlenmayerovy baňky se 100 ml tryptonové půdy, přičemž množství zaočkovaných Erlenmayerových baněk závisí na potřebném množství subkultur pro výrobu a kultivace probíhá 24 hodin při teplotě $+ 37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.
5. Způsob výroby léčiva podle nároku 1, **vyznačující se tím, že** krok přípravy fágového startéru metodou dvouvrstevného agaru zahrnuje oživení rozpuštěného fágového kmene a jeho pomnožení, přičemž Petriho misky s 1,5 % tryptonovým agarem, který slouží jako základ, se přelijí 3 ml 0,36% tryptonového agaru, který obsahuje bakteriální suspenzi příslušné hostitelské bakterie *Staphylococcus aureus* a suspenzi bakteriofága, získaného resuspendováním lyofilizovaného fágového kmene v izotonickém roztoku, následuje inkubace 24 h při teplotě $+37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, poté se povrch každé plotny přelije tryptonovým agarem, po 30 minutách se měkký povrch s 0,36% tryptonovým agarem smyje a centrifuguje 3krát 1 hodinu při 5000 RPM, přičemž bakteriofág je obsažen v supernatantu.
6. Způsob výroby léčiva podle nároku 1, **vyznačující se tím, že** krok přípravy fágového startéru v tekuté půdě zahrnuje inokulaci tryptonové půdy subkulturou hostitelské bakterie *Staphylococcus aureus*, kultivace probíhá v termostatu při teplotě $+37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ tak dlouho, až je dosažena optická denzita biomasy 0,3 - 0,4, měřeno na spektrofotometru při vlnové délce 500 nm, do stafylokokové suspenze se přidá 15 - 20 ml fágového lyzátu připraveného dle předchozího bodu, o min. titru 1×10^{10} PFU/ml, probíhá pomnožení bakteriofága při pokojové teplotě 18 - 20 hodin za stálého třepání, následuje centrifugace 1 hodinu při 5000 RPM, přičemž bakteriofág je obsažen v supernatantu.
7. Způsob výroby léčiva podle nároku 1, **vyznačující se tím, že** krok přípravy bakteriální suspenze zahrnuje zaočkování bakteriální suspenze z Erlenmayerových baněk do 3000 ml tryptonové půdy v 5 l

lahvi, přičemž kultivace při + 37 °C ± 1°C probíhá tak dlouho, než se dosáhne požadované denzity v rozmezí 0,25 - 0,35, doba kultivace probíhá v rozmezí 4 až 5 hodin, první vzorek na kontrolu denzity je odebrán po 3 hodinách kultivace a další vzorky jsou odebírány v závislosti na nárůstu bakterií.

8. Způsob výroby léčiva podle nároku 1, **vyznačující se tím, že** krok přípravy fágového lyzátu nebo směsi fágových lyzátů zahrnuje přidání fágového startéru startér o min. titru 1×10^{10} PFU/ml v množství o objemu 50 - 60 ml k bakteriální suspenzi, přičemž startér je asepticky přidán v okamžiku, kdy je hodnota optické denzity vzorku v intervalu 0,25 - 0,35, bakteriolyza probíhá při pokojové teplotě 20 - 30 hodin, během bakteriolyzy dochází k projasňování tekuté kultury a optická denzita lyzované bakteriální suspenze musí poklesnout pod hodnotu 0,1.
9. Způsob výroby léčiva podle nároku 1, **vyznačující se tím, že** po odebrání vzorku pro mikrobiální zátěž o obsahu vzoru 100 ml se fágový lyzát nebo směs lyzátů filtruje přes filtrační vrstvu o porositě 0,22 μm , přičemž mikrobiální zátěž přípravku odpovídá max. 10 PFU/100 ml.
10. Způsob výroby léčiva podle nároku 1, **vyznačující se tím, že** filtrovaný lyzát se rozplňuje po 10 ml do lahviček PNC 20 ml.
11. Způsob výroby léčiva podle nároku 1, **vyznačující se tím, že** lahvičky s lyzátem nebo se směsí lyzátů překryté lyofilizační zátkou jsou lyofilizovány ve vakuu z hlubokého namražení (-45 °C) zahříváním na deskách do stanovené teploty (+30 °C), přičemž krok lyofilizace sestává z následujících fází a po ukončení lyofilizace jsou zátky zajištěny pertlí:
 - I. Fáze: namražení desek na -50 °C, založení materiálu, namražení materiálu do vyrovnání teploty desek a materiálu na stejnou hodnotu (doba trvání fáze 1 hod.)
 - II. Fáze: Je udržována zmrazovací teplota desek na -50 °C a zahřívána vývěva (doba trvání fáze 30 min.)

III. Fáze: hlavního sušení - evakuace sušícího prostoru do nastaveného vakua (30-80 Pa). Po dosažení hodnoty tlaku, začíná ohřívání desek nastavené na teplotu +30 °C dle časového režimu. Tato fáze lyofilizačního procesu představuje přibližně 90 % celkového času a trvá přibližně 24 hodin.

IV. Fáze: Finální sušení za maximálního vakua (2 - 0,5 Pa) a maximální teploty +30 °C. Pokud je dosaženo teploty produktu shodné s teplotou topných desek a hodnoty vakua se při testu ukončení sušení nemění, je lyofilizace ukončena zrušením vakua.

12. Způsob výroby léčiva podle některého z nároků 1 až 7, **vyznačující se tím, že** zahrnuje použití tryptonové půdy vytvořené ze souboru látek zahrnujícího Trypton Oxoid, Yeast extract Oxoid, chlorid sodný a purifikovanou vodu.
13. Způsob výroby léčiva podle některého z nároků 1 až 7 a 10, **vyznačující se tím, že** zahrnuje použití tryptonového agaru sestávajícího z kombinace tryptonové půdy a Agar Oxoid № 1.
14. Způsob výroby léčiva podle nároku 1, **vyznačující se tím, že** zahrnuje sterilizaci připraveného tryptonového agaru a/nebo tryptonové půdy, která probíhá v parním sterilizátoru při teplotě 121 °C pro dobu 30 minut.
15. Léčivo ve formě antistafylokového fágového lyzátu připravené způsobem podle nároků 1 až 14 obsahující účinné fágové částice více jak jednoho subtypu polyvalentního stafylokokového bakteriofága.
16. Léčivo ve formě antistafylokového fágového lyzátu připravené způsobem podle nároků 1 až 14 obsahující účinné fágové částice z více jak jednoho subtypu polyvalentního stafylokokového bakteriofága a fágových mutant s rozšířeným rozmezím hostitele.
17. Způsob výroby léčiva podle nároku 16, **vyznačující se tím, že** subtypy bakteriofága s širším rozmezím hostitele jsou izolovány z plaků vyrostlých po výsevu výchozího fága na necitlivé bakteriální kmeny *Staphylococcus aureus*, kdy izolace nových účinných subtypů je prováděna výsevem lyzátní fágů o vysokém titru

na nárůst rezistentních kmenů, pak jednotlivé plaky, které na těchto kmenech vyrostou s velmi nízkou frekvencí (10^{-9} - 10^{-6}), jsou následně použity k založení lyzátů obsahujících mutantní fágy, selekce je prováděna v několika stupních, během nichž jsou fágové mutanty získané na jednom rezistentním kmeni následně vysévány na další rezistentní kmeny pro dosažení širokého lytického spektra.

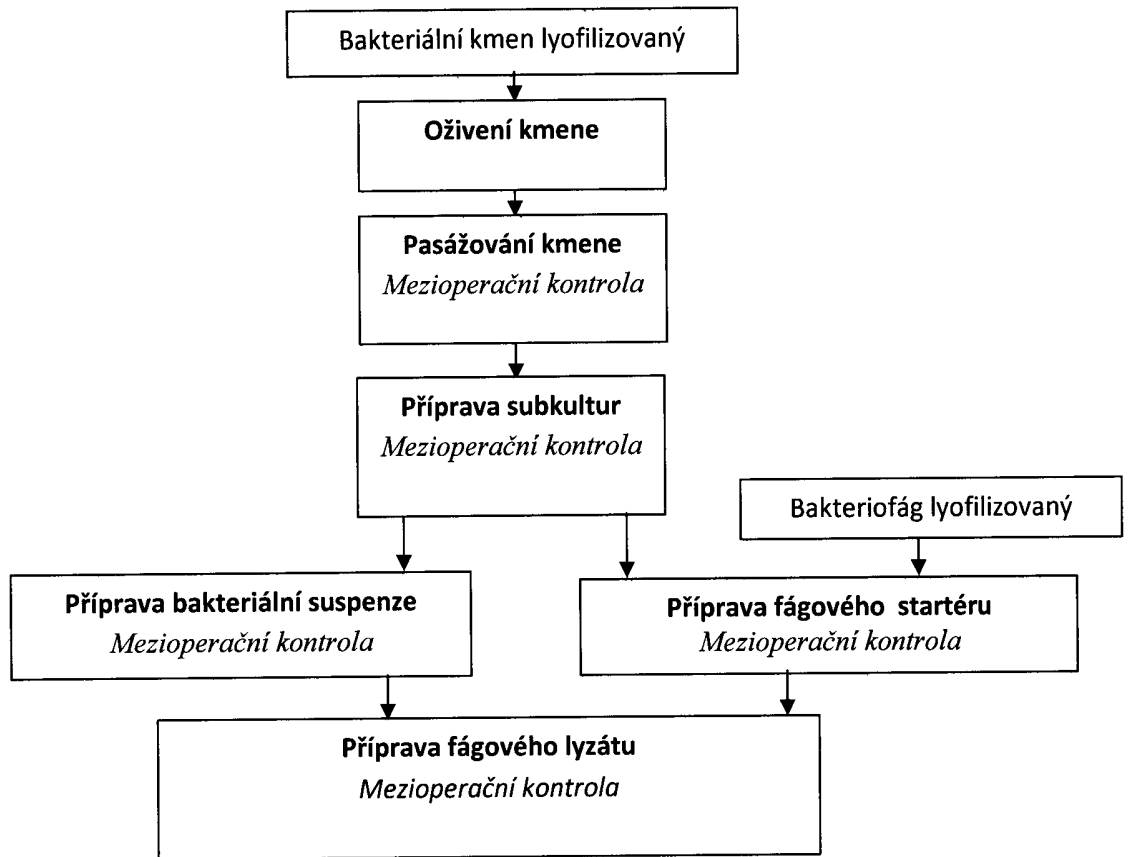
18. Léčivo podle nároku 15 nebo 16 **vyznačující se tím, že** v jedné terapeutické dávce obsahuje minimálně 10^6 částic bakteriofágů.
19. Použití léčiva ve formě antistafylokového fágového lyzátu podle nároků 15 nebo 16 vyrobeného způsobem podle nároků 1 až 14 a nebo 17 pro místní aplikaci k léčbě infekcí vyvolaných stafylokokovými kmeny.
20. Použití léčiva ve formě antistafylokového fágového lyzátu podle nároků 15 nebo 16 vyrobeného způsobem podle nároků 1 až 14 a nebo 17 jako součást preventivních opatření v předoperační přípravě.
21. Použití léčiva ve formě antistafylokového fágového lyzátu podle nároků 15 nebo 16 vyrobeného způsobem podle nároků 1 až 14 a nebo 17 k zabránění vzniku superponovaných pyogenních komplikací po operativních intervencích.
22. Použití léčiva ve formě antistafylokového fágového lyzátu podle nároků 15 nebo 16 vyrobeného způsobem podle nároků 1 až 14 a nebo 17 ke konzervaci a uchovávání potravin a nebo při výrobě krmiv pro hospodářská zvířata.
23. Použití léčiva ve formě antistafylokového fágového lyzátu podle nároku 15 nebo 16 vyrobeného způsobem podle nároků 1 až 14 a nebo 17 využití při dekontaminaci povrchů zejména v nemocničním prostředí anebo při dekontaminaci lékařských nástrojů a pomůcek.

27.09.12

7U 1012-668

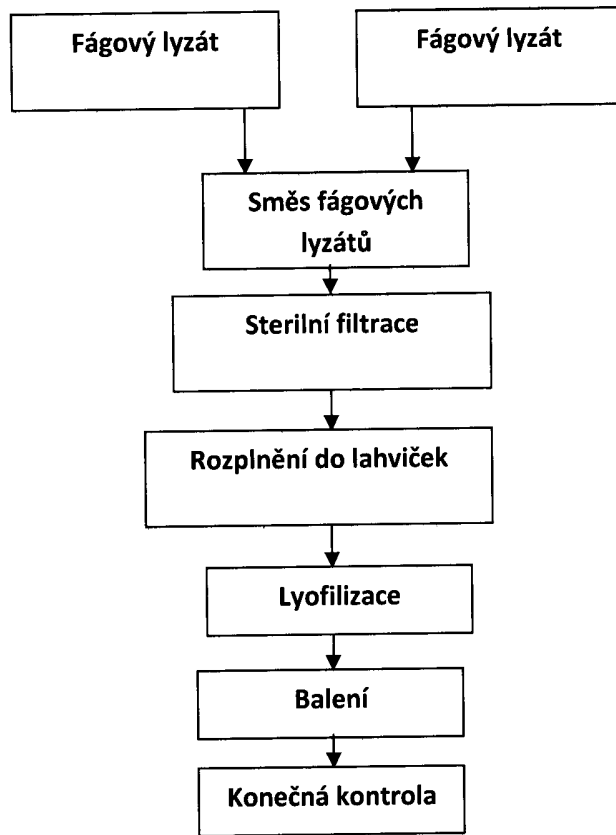
106842

Obr. 1



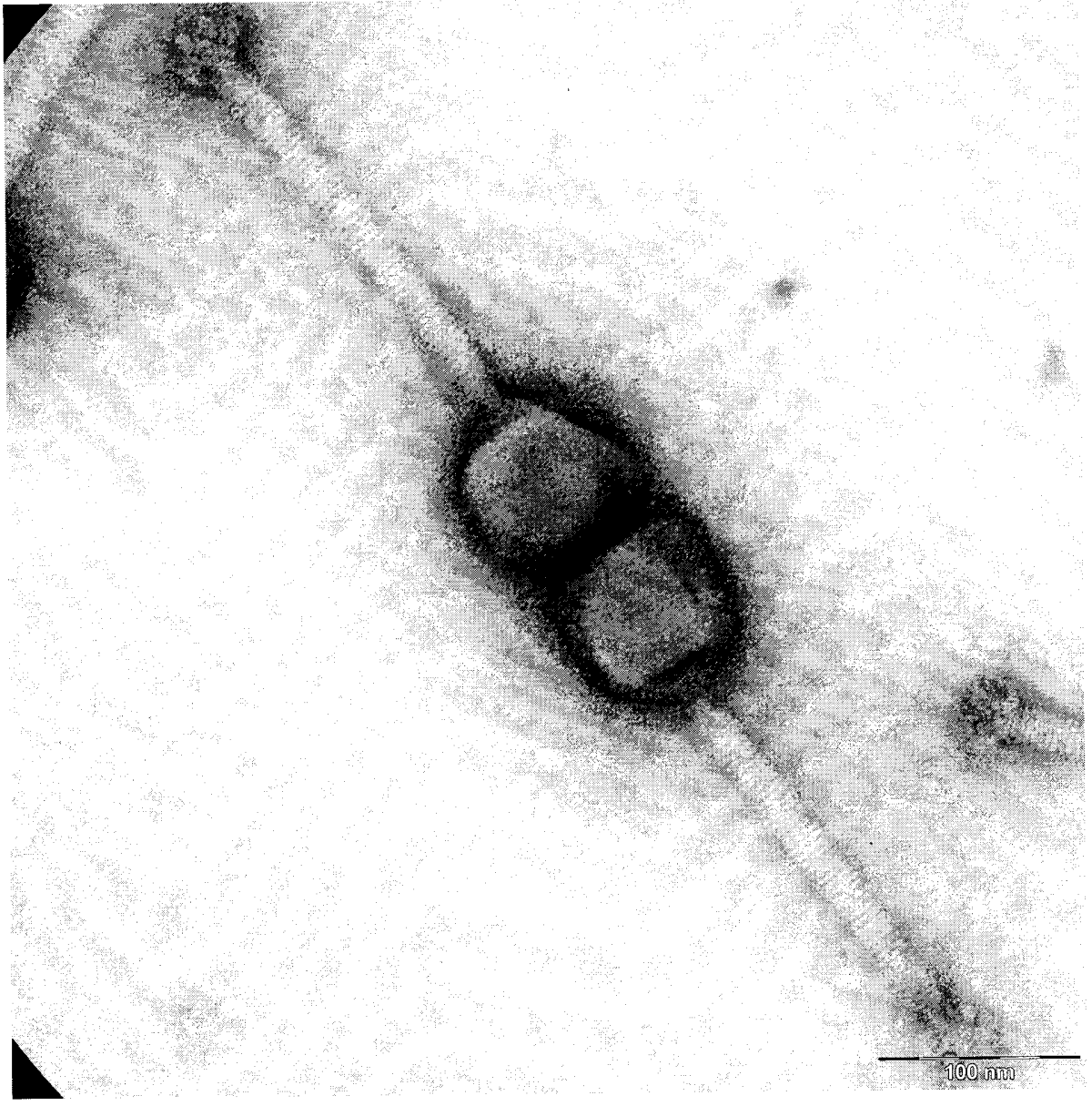
27.09.12
DV 2012 - 668
D 065413

Obr. 2



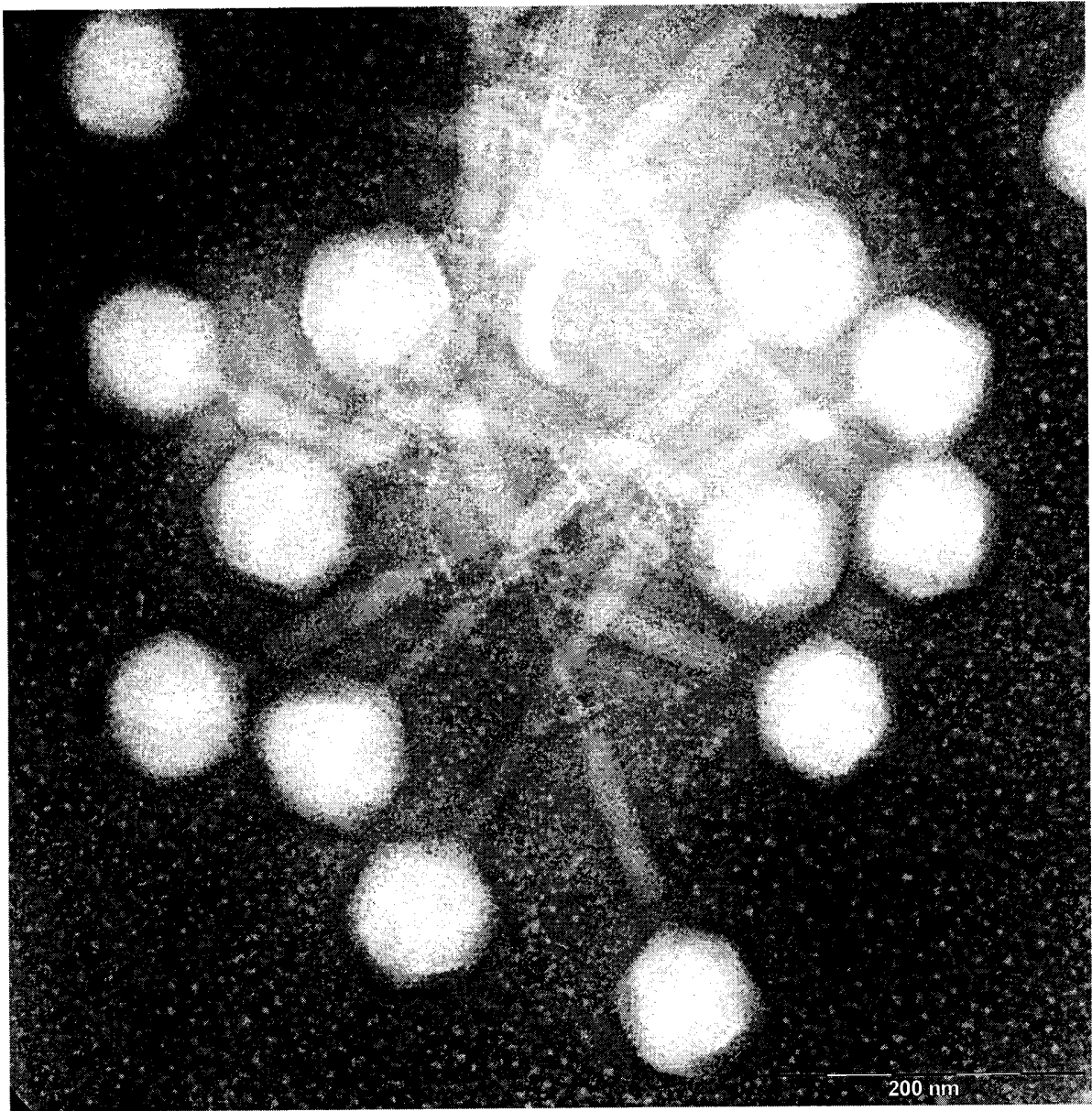
27.09.12
PV1012-668
D 065413

Obr. 3



27.09.12
PV 2012-668
D065413

Obr. 4



27.09.12

PV 2012-668

DO 62913

Obr. 5

