



Patent tymczasowy dodatkowy
do patentu nr _____

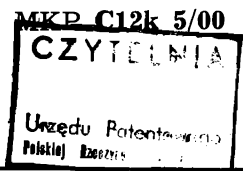
Kl. 30h,6

Zgłoszono 15.06.1971 (P. 148809)

Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 30.04.1973

Opis patentowy opublikowano: 29.03.1975



Twórca wynalazku: Tsuneo Meguro

Uprawniony z patentu tymczasowego: Morishita Pharmaceutical Co. Ltd,
Osaka (Japonia)

Sposób wytwarzania aktywnego preparatu bakterii mlekowych odpornego na działanie różnych leków

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania aktywnego preparatu bakterii mlekowych odpornego na działanie różnych leków, a w szczególności antybiotyków i sulfonamidów.

Ostatnio w związku z rozwojem antybiotyków, chemoterapię zastosowano również do leczenia przewodu pokarmowego i wykazano wyraźne terapeutyczne efekty. Jednakże, nieodpowiednie stosowanie antybiotyków jest przyczyną pojawienia się odpornych bakterii wywołujących czerwonkę, zwiększenia superinfekcji i zmniejszenie się ilości lub niszczenia pożytecznych bakterii w jelitach.

Dlatego w ostatnich latach leczenie preparatami bakterii mlekowych zapoczątkowane przez Miecznikowa jest nadal stosowane w terapii i zapobieganiu zakażeniom przewodu pokarmowego takim jak czerwonka, zakażenie durowe i inne lub w terapii i zapobieganiu superinfekcji. Stosowanie tych preparatów jest szeroko znane.

Jednak, bakterie mlekowe stosowane w znanych preparatach są wrażliwe na antybiotyki, przez co preparat staje się terapeutycznie nieefektywny, gdy jest jednocześnie stosowany w chemoterapii obejmującej antybiotyki.

Tak więc, jednym z celów wynalazku jest wytworzenie preparatu odpornych bakterii mlekowych, zawierającego bakterie mlekowe, które nie tracą aktywności gdy są jednocześnie stosowane z różnymi rodzajami antybiotyków i sulfonamidów.

Ponadto, innym celem wynalazku jest wytworze-

2

nie bakterii mlekowych, które posiadają szerokie zróżnicowanie odporności na różne rodzaje antybiotyków i sulfonamidów.

Z japońskiego opisu patentowego nr 567370 znana jest metoda wytwarzania preparatu zawierającego szczep *Streptococcus faecalis* BIO — SMR należący do bakterii mlekowych odpornych na działanie streptomycyny. Jednakże, ostatnio w chemoterapii spotykane są liczne przypadki, w których stosuje się więcej niż dwa rodzaje antybiotyków i sulfonamidów. Preparat bakterii mlekowych posiadający odporność na działanie tylko jednego rodzaju antybiotyków nie ma w tym przypadku praktycznie korzystnej wartości.

Preparat bakterii mlekowych, który wykazywałby leczniczą wartość, gdy będzie stosowany jednocześnie z różnymi antybiotykami i sulfonamidami musi zawierać bakterie mlekowe odporne na jednoczesną obecność różnych rodzajów antybiotyków i sulfonamidów. Zgodnie z tym konieczne jest wyizolowanie bakterii mlekowych mających cechy stawiania się odpornymi jednocześnie na dwa lub więcej różnych antybiotyków. Należy unikać przypadku, aby bakterie mlekowe były odporne, na przykład na streptomycynę, a trudno byłoby wywołać u nich odporność na działanie innych antybiotyków lub aby bakterie były odporne na inne antybiotyki niż streptomycynę, a posiadały już zmniejszoną w pewnym stopniu odporność na streptomycynę.

Po drugie, konieczne jest by bakterie mlekowe,

posiadające odporność na leki, nie przekazywały tej odporności komórkom potomnym. Jest to uzasadnione tym, że preparat bakterii mlekowych, posiadających zdolność przekazywania odporności na leki komórkom potomnym, podany pacjentowi, wywoływałby także powstawanie odporności na leki u wirusa i u zarodników bakterii powodujących zapalenie okrężnicy, w wyniku czego zaistniałby zły wpływ na terapię u pacjenta.

Po trzecie, konieczne jest, aby bakterie mlekowe posiadające odporność na leki wykazywały odporność stabilną i nie wykazywały uzależnienia od pewnych leków. Jeżeli nawet bakterie mlekowe uzyskały odporność na różne rodzaje antybiotyków i sulfonamidów, tracą one wartość jako preparat leczniczy gdy ich odporność łatwo zanika. Bakterie mlekowe, mające odporność na poszczególne leki takie, jak streptomycyna, wykazują zależność od streptomycyny, w wyniku czego wymagają streptomycyny jako niezbędnej substancji wzrostowej i w ten sposób powodują konieczność dodawania do pożywki podczas hodowli antybiotyków, od których bakterie mlekowe są uzależnione.

Ostatecznie, czwartym punktem jest konieczność otrzymania do hodowli preparatu bakterii mlekowych w postaci stabilnego proszku, tak aby wzrost bakterii mlekowych w pożywce hodowlanej był obfity. Zazwyczaj bakterie mlekowe, które stają się odporne na leki wykazują zmniejszoną obfitość wzrostu w pożywce hodowlanej, jest więc konieczne wyselekcjonowanie bakterii mlekowych, których obfitość wzrostu nie zmniejsza się z powodu odporności na leki.

W wyniku badań związanych z selekcją bakterii mlekowych spełniających wymienione wyżej wymagania i metody wywołania odporności u bakterii mlekowych na różne leki, stwierdzono, że bakterie mlekowe, które spełniają te wymagania i wykazują odporność na antybiotyki i sulfonamidy mogą być wytwarzane sposobem według wynalazku. Sposób ten obejmuje selekcję szczepu odpornego na sulfonamidy spośród szczepów bakterii mlekowych należących do *Streptococcus faecalis* i hodowli tych szczepów w pożywce zawierającej streptomycynę (oznaczoną SM), chloramfenikol (oznaczoną CM), tetracyklinę (oznaczoną TC), erytromycynę (oznaczoną EM) i penicylinę α -aminobenzylową (oznaczoną ABPC), odpowiednio, w taki sposób, że omawiany szczep jest kolejno hodowany w pożywce, zawierającej wyżej wymienione antybiotyki w kolejności SM, CM, TC, EM i ABPC, metodą płytek gradientowych i kolejnych posiewów na pożywki ze zwiększającym się, lecz mniejszym od hamującego stężenia antybiotyku w takim układzie, by wywołać u szczepu odporność na te leki. Wytwarzany tym sposobem szczep uzyskuje odporność na kanamycynę, fradiomycynę, oleandomycynę, lincomycynę, leukomycynę, penicylinę GK, cefalorydynę, gentamycynę, spiramycynę, bacylinę, syncylinę, oracylinę, stafcylinę, stafcylinę V, metacylinę S, stafcylinę A i natacylinę, ponadto, na SM, CM, TC, EM i ABPC.

Macierzysty szczep stosowany zgodnie ze sposobem według wynalazku, od którego pochodzą bakterie mlekowe mające odporność na różne rodzaje

antybiotyków i sulfonamidów, jest odpornym na sulfonamidy szczepem należącym do *Streptococcus faecalis* jak wymieniono wyżej i jest oznaczony BIO (japoński opis patentowy nr 567370).

Metoda pozwalająca by wymieniony szczep BIO stał się odporny na wymienione wyżej różne rodzaje antybiotyków obejmuje następujące czynności. Szczep hoduje się metodą płytek gradientowych na pożywce z laktozą i węglanem wapniowym (oznaczoną jako pożywka Ca LA) zawierającej SM w ciągu 72 godzin w temperaturze 37°C. Wybierano kilka kolonii spośród rosnących punktowo na płycie z największymi stężeniami SM i każdą z tych kolonii posiewano metodą rysową na pożywkę Ca LA zawierającą większe stężenie CM, a następnie hodowano kolejno posiewając 16—17 razy na pożywki ze zwiększającym się lecz mniejszym od hamującego stężenia antybiotyku (SM).

Zgodnie z uprzednio wymienioną metodą może być otrzymany szczep BIO posiadający wysoką odporność na SM. Następnie, takim samym sposobem po przeprowadzeniu poprzednio wymienionych kolejnych posiewów hodowli w kolejności CM, TC, EM i ABPC metodą płytek gradientowych i kolejnych posiewów na pożywki ze zwiększającym się, lecz mniejszym od hamującego, stężeniem antybiotyku można otrzymać bakterie mlekowe mające odporność na wiele leków. Taki szczep bakterii mlekowych oznaczono BIO-4R. Ten szczep zdeponowano pod nr 184 w Agency of Industrial Science and Technology, Fermentation Research Institute, który jest w Japonii instytutem uprawnionym do zdeponowania bakterii.

Wykonując wymienione poprzednio kolejne posiewy hodowli posiewa się w przypadku CM 30—40 razy, w przypadku TC 40—50 razy, w przypadku EM 16—17 razy, w przypadku ABPC 20—30 razy, wówczas otrzymuje się bakterie mające wysoką odporność na każdy lek.

Stopień odporności otrzymanych bakterii mlekowych

Również, w przypadku zastosowania sposobu według wynalazku ze szczepem *Staphylococcus* 209P stopień odporności na sulfonamidy jest większy niż 2000 razy.

Pożywka Ca LA stosowana w metodzie płytek gradientowych w celu wywołania odporności bakterii mlekowych BIO na różnego rodzaju leki przygotowywana jest w następujący sposób:

wyciąg mięsny	10 g
pepton	10 g
NaCl	2 g
laktoza	20 g
wyciąg drożdżowy	20 ml
węglan wapniowy strącony	10 g
agar	14 g

Mieszaninę powyższych składników rozpuszczono w 1000 ml wody destylowanej. Po nastawieniu pH i wyjałowieniu pożywkę nalewano po 10 ml do płytek Petri'ego. Pożywkę zestalano w temperaturze około 10°C, ustawiano poziomo i dodawano 10 ml pożywki o wymaganym stężeniu każdego leku i zestalano w formie warstwy. Przygotowana w ten sposób pożywka do metody płytek gradientowych może być stosowana korzystnie jako pożywka hodowlana do wywoływania odporności na różne rodzaje antybiotyków. Bakterie mlekowe szczepu BIO — 4R, u których wywołano odporność na takiej pożywce wymienioną metodą w kolejności SM, CM, TC, EM i ABPC, posiewano do małej ilości mleka w 10—15 butlach i hodowano w temperaturze 37°C. Zestalone mleko hodowlane oddzielono z hodowli i ponownie posiewano nowe mleko. Po kolejnych więcej niż 10 posiewach tej hodowli wybierano szczep mający zdolność do obfitego wzrostu. Metodą takich kolejnych posiewów hodowli szczep, który wykazywał w pierwszej hodowli tylko 50 do 60% zdolności wzrostu w końcowej wykazuje 100% i okres zestalania mleka jest regularny 2 do 3 dni.

Otrzymany tym sposobem szczep bakterii mlekowych BIO — 4R łatwo wyrasta w pożywce, której głównym składnikiem jest odtłuszczone mleko, przeto może być łatwo suszony metodą rozpyłową. Sposób suszenia rozpyłowego hodowli bakterii mlekowych i przygotowanie stabilnego preparatu w postaci proszku przedstawiono w japońskim opisie patentowym nr 502315. Istotą jego jest metoda suszenia rozpyłowego hodowli, którą przygotowano z wymienionego wyżej szczepu bakterii mlekowych mających odporność na różne leki w pożywce zawierającej wysokie stężenie mleka. Do preparatu bakterii mlekowych dodawany jest zazwyczaj nośnik.

Przeprowadzono następujące badania sprawdzające w celu potwierdzenia odporności na różne leki i działanie preparatu bakterii mlekowych otrzymanych sposobem według wynalazku.

Gdy wymieniony preparat razem z SM podawano co dzień doustnie myszom, nie stwierdzono odbiegającego od normy zwiększania się drożdżopodobnych bakterii w kale. Gdy podawano tylko SM, ilość drożdżopodobnych bakterii w kale zwiększała się znacznie. Ponadto, gdy myszom podawano doustnie szczep *Salmonella enteritidis* nr 11 z SM i EM śmiertelność wynosiła 80% do 100%, jednakże, gdy preparat bakterii mlekowych BIO-4R otrzy-

many sposobem według wynalazku podawano razem lub przed podaniem SM i EM, śmiertelność zmniejszała się do 50%. Można przyjąć, że preparat bakterii mlekowych otrzymanych sposobem według wynalazku na odporność na SM i EM jednocześnie reguluje nienormalne zwiększanie się ilości drożdży (zjawisko nadkażenia) i działa hamująco na zakażenia wywoływane przez *Salmonella enteritidis*.

Poniższy przykład ilustruje sposób według wynalazku nie ograniczając jego zakresu.

Przykład. *Streptococcus faecalis* szczep BIO — 4R posiewano na pożywkę Ca LA przygotowaną jak opisano powyżej, do której dodawano SM. Wymieniony szczep hodowano metodą płytek gradientowych w ciągu 72 godzin w temperaturze 37°C. Po okresie hodowli, spośród kolonii które wyrosły na płytkach wybierano te, które zawierały największe stężenie SM i stosowano je do kolejnych posiewów na pożywkę takiego samego rodzaju. Po kolejnych 16 posiewach otrzymywano bakterie mlekowe mające dużą odporność na SM. Następnie, bakterie mlekowe mające odporność na SM posiewano kolejno 30 razy sposobem wyżej opisanym na pożywkę z dodatkiem CM w wyniku czego otrzymywano bakterie mlekowe mające odporność na SM i CM. Następnie, bakterie mlekowe mające odporność na SM i CM posiewano kolejno 40 razy sposobem wyżej opisanym na pożywkę z dodatkiem TC w wyniku czego otrzymano bakterie mlekowe mające odporność na SM, CM i TC. Następnie, bakterie mlekowe mające odporność na SM, CM i TC posiewano kolejno 16 razy sposobem wyżej opisanym na pożywkę z dodatkiem EM w wyniku czego otrzymano bakterie mlekowe mające odporność na SM, CM, TC i EM. Ostatecznie bakterie mlekowe mające odporność na SM, CM, TC i EP posiewano kolejno 20 razy sposobem wyżej opisanym na pożywkę z dodatkiem ABPC w wyniku czego otrzymywano bakterie mlekowe (BIO — 4R), które miały odporność nie

Do sproszkowanego preparatu ewentualnie dodawano jako nośnik, w zależności od wymagań, enzymy, witaminy i środki zapachowe.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania aktywnego preparatu bakterii mlekowych odpornego na działanie różnych leków, **znamienny tym**, że przeprowadza się kolejne posiewy odpornego na sulfonamidy szczepu bakterii *Streptococcus faecalis* B 10 — 4R metodą płytek gradientowych na pożywkę ze zwiększającym się, lecz mniejszym od hamującego stężeniem antybiotyku, w kolejności streptomycyny, chloramfenikolu, tetracykliny, erytromycyny i penicyliny a-aminobenzyłowej, następnie kolejne posiewy na pożywkę z mlekiem, zawierającym wyżej wymienione pięć rodzajów leków, po czym przeprowadza się hodowlę w postaci proszku metodą suszenia rozpyłowego.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w celu wywołania odporności na streptomycynę kolejne posiewy hodowli przeprowadza się 16—17 razy.

3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w celu wywołania odporności na chloramfenikol kolejne posiewy hodowli przeprowadza się 30—40 razy.

4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w celu wywołania odporności na tetracyklinę kolejne posiewy hodowli przeprowadza się 40—50 razy.

5. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w celu wywołania odporności na erytromycynę kolejne posiewy hodowli przeprowadza się 16—17 razy.

6. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w celu wywołania odporności na penicylinę a-aminobenzyłową kolejne posiewy przeprowadza się 20—30 razy.

7. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że kolejne posiewy hodowli w pożywkę z mlekiem przeprowadza się około 10—15 razy.

