

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUBOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY PATENTU TYMCZASOWEGO

70 632

Patent tymczasowy dodatkowy
do patentu _____

Zgłoszono: 25.02.1971 (P. 146 482)

Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 05.04.1973

Opis patentowy opublikowano: 03.06.1974

Kl. 30h, 6

MKP C12d 9/22

CZYTELNIA

Urzędu Patentowego
Polskiej Rzeczypospolitej 1974

Twórca wynalazku: Tadeusz Lachowicz

Uprawniony z patentu tymczasowego: Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii
im. Gen. Karola Kaczkowskiego, Warszawa (Polska)

Sposób wytwarzania substancji bakteriobójczej stafilocokcyny A

Wynalazek dotyczy sposobu wytwarzania substancji bakteriobójczej nazwanej stafilocokcyną A. Wykazuje ona silne działanie bakteriobójcze na komórki gronkowca złocistego chorobotwórczego oraz inne Gram-dodatnie bakterie i rzesistki. Przy tym wśród szczepów wrażliwych na stafilocokcynę A przeważają szczepy odporne na penicylinę i inne znane antybiotyki.

Znane jest zastosowanie bakterii *Staphylococcus staphylolyticus* (opis patentowy RFN 1.228.756) dla wytwarzania substancji litycznej, której działanie polega na rozpuszczaniu komórek szczepu wrażliwego.

Znane jest także wytwarzanie szczepionki gronkowcowej, otrzymanej z nietkniętych komórek bakteryjnych rodzaju *Staphylococcus* drogą ekstrakcji fenolem (opis patentowy RFN 1154234). Odmienny jest jednak mechanizm działania stafilocokcyny A od mechanizmu działania substancji, otrzymanych według wyżej przytoczonych opisów patentowych.

Stafilocokcynę A zaliczyć możemy do bakteriocyn – jest ona produktem pozakomórkowym, nielitycznym. Jako typowa bakteriocyna nie rozpuszcza komórek szczepu wrażliwego, lecz zabija je bez wywoływania lizy. Odmienna jest technika otrzymywania, uzyskiwane miana, a także cechy chemiczne izolowanej substancji – stafilocokcyny A, od znanych bakteriocyn. Znane jest wysalanie siarczanem amonowym lub wytrącanie kwasem tróchlorooctowym (Jones i Edwards: J. Dairy Res. 1966, 33, 271, Hsu and Wiseman Cand. J. Microbiol. 13, 967, 1967, 1971, 17, 1223, 1972, 18, 121, Gagliano and Hinsdill J. Bacteriol. 1970, 104, 117, Dajani, Gray, Wannamaker J. Exp. Med. 1970, 131, 1004, Vaci i Mihalyfi Acta Microbiol. Hung. 1954, 1, 459). Stężenia wyjściowe preparatu aktywnego uzyskane w znany sposób sięgają kilku do kilkunastu jednostek/ml.

Według opisu patentowego RFN 1228756 uzyskano 2,5 i 0,5 jednostek/ml, a po preparatyce otrzymano najwyżej 260 jednostek/ml aktywnego czynnika litycznego.

Sposobem według wynalazku substancję – stafilocokcynę A otrzymuje się przez hodowlę bakterii *Staphylococcus epidermidis* nr 1262a (według Kolekcji WIHE w Ośrodku w Krakowie), na znanym podłożu bulionowym wzbogaconym przed posiewem bakterii, 0,2% siarczanem magnezu, 0,2M buforem fosforanowym i N-fenyloglicyną. Następnie po odwirowaniu komórek bakteryjnych wydziela się stafilocokcynę A przez podwójne wytrącania kwasem fosforowolframowym przy pH=4. Sposobem według wynalazku otrzymuje się

stężenia substancji aktywnej w wysokości 5–10.000 jednostek/ml. Uzyskanie wysokiego stężenia oraz prosty sposób wydzielania umożliwiają stosowanie sposobu według wynalazku w skali przemysłowej.

Stafilokokcyna A jest leko żółtawym proszkiem, łatwo rozpuszczalnym w wodzie, nie rozpuszczalnym w alkoholu i rozpuszczalnikach organicznych. Jest kompleksem polipeptydowo-wielocukrowym. Punkt izoelektryczny stafilokokcyny A leży między $pH = 4,0$ a $pH = 4,5$ w odróżnieniu od znanego czynnika litycznego uzyskanego według opisu patentowego RFN 1228756, którego punkt izoelektryczny leży przy $pH = 11$. Zestawienie cech różnicujących stafilokokcynę od czynnika litycznego *Staphylococcus staphylolyticus* przedstawia tabela 1.

Stafilokokcyna jest względnie ciepłoodporna i nie przechodzi przez błony dializacyjne. Nie ulega hydrolizie pod działaniem pepsyny i trypsyny. W zakresie pH kwaśnego i obojętnego jest mało wrażliwa na działanie podwyższonej temperatury, w zakresie pH zasadowego łatwo ulega rozkładowi (od $pH = 8–11$). W przeprowadzonych badaniach stwierdzono, że najniższy ciężar cząsteczkowy waha się od 10.000–30.000. Substancja natomiast może tworzyć w zależności od środowiska mniejsze lub większe agregaty, które są widoczne w obrazach mikroskopowych. To samo wskazuje elektroforeza w żelu poliakrylamidowym wobec SDS i bez SDS. Agregaty mogą sięgać wielkości rzędu 60.000 i ponad 200.000, co wynikałoby z rozdziału przy użyciu rozmaitych sit sefadeksowych.

W ultrafioletcie najwyższy poziom ekstynkcji osiąga dana substancja w zakresie 190–200 milimikronów, co wskazywałoby na obecność wiązań polipeptydowych, występowanie aromatycznych aminokwasów ze względu na lekkie wzniesienie krzywej przy 240–260 milimikronach oraz obecność heksoz po reakcji z dwufenyloaminą (dwa piki przy 525 i 635 milimikronach w świetle widzialnym). Zawartość heksoz przed hydrolizą wynosi 0,5%. Skład aminokwasowy i amoniak po hydrolizie kwaśnej przedstawiono w tabeli 2.

Roztwory preparatów stafilokokcyny A wykazują w stosunku do wody zwiększoną lepkość 1,95 (1%, 23°).

Drobnoustrój wytwarzający stafilokokcynę A został izolowany w toku badań nad nosicielstwem gronkowcowym. Po przeprowadzeniu badań klasyfikacyjnych okazał się przynależnym do rodzaju *Staphylococcus*, a po uwzględnieniu stosunku do koagulazy i rozkładu cukrów i alkoholi do gatunku *Staphylococcus epidermidis*.

Cechą zasadniczą odróżniającą go od innych tego gatunku drobnoustrójów, jest szeroka strefa zahamowania wzrostu szczepu kontrolnego gronkowca złocistego *Staphylococcus aureus* Oxford 209P po uprzednim 24–o godzinnym okresie inkubacji szczepu aktywnego.

Szczep po izolacji otrzymał numer badawczy katalogowy 1262a i z takim oznaczeniem pozostaje w kolekcji WIHE w Krakowie. Drobnoustrój *Staphylococcus epidermidis* 1262a jest tworem kulistym, nieruchomym, gram dodatnim, nie wytwarzającym zarodników, o wielkości średnicy 1,0–1,5 mikrona, występującym pod postacią komórek pojedynczych lub mniejszych i większych skupisk nieregularnych. Jest to względny beztlenowiec, rozkłada glukozę w warunkach beztlenowych z tworzeniem kwasu bez gazu.

Na 1% wodzie peptonowej z dodatkiem d-fruktozy, laktozy i sacharozy rośnie z wytworzeniem kwasu bez gazu. Nie rozkłada d(+) ksylozy, sorbitolu, mannitolu i dulcytolu. Nie wytwarza barwnika, koagulazy, żelatyny i hemolizyn rozpuszczających krwinki królicze, baranie i ludzkie. Nie jest rozpuszczany przez fagi gronkowca ani podstawowe ani dodatkowe. Pod względem serologicznym poza antygenem wspólnym dla wszystkich gronkowców posiada odrębny antygen, który można stwierdzić po zastosowaniu homologicznej surowicy odpornościowej króliczej, wyabsorbowanej uprzednio szczepem gronkowca złocistego kontrolnego Oxford 209P.

Pośród 9 szczepów aktywnych posiadanej kolekcji *Staphylococcus epidermidis*, a przebadanych serologicznie przy użyciu homologicznych wyabsorbowanych surowic odpornościowych, żaden nie posiada z nim innych wspólnych antygenów. Jest to również pod względem serologicznym ściśle określony typ *Staphylococcus epidermidis* 1262a. Po uwzględnieniu danych taksonomicznych stwierdzono, że jest to drobnoustrój *Staphylococcus*, gatunku *Staphylococcus epidermidis*, którego podstawową cechą odróżniającą jest wytwarzanie bakteriocynty, nazwanej przez nas stafilokokcyną A, działającą bakteriobójczo na inne gronkowce bez wywoływania lizy.

Staphylococcus epidermidis 1262a jest niewrażliwy na fagi gronkowcowe i posiada swoisty antygen typowy, nie występujący u innych badanych szczepów *Staphylococcus epidermidis*. W odróżnieniu od *Staphylococcus staphylolyticus* nie rozpuszcza żelatyny przez 30 dni. Cechy różnicujące drobnoustrój *Staphylococcus staphylolyticus* i *Staphylococcus epidermidis* 1262a, przedstawia tabela 3.

Wytworzona przez szczep *Staphylococcus epidermidis* 1262a stafilokokcyna A, wydzielona sposobem według wynalazku, została poddana badaniom działania na szczepy wrażliwe, a w szczególności na szczep kontrolny. Badania te były prowadzone przy pomocy szeregu metod, na podłożach stałych, płynnych, metodą przesiewów, przeszczepów, dla eliminacji działania litycznego (bakteriofagów), a komórki zabite pod wpływem działania stafilokokcyny A badano w mikroskopie elektronowym. Brak było jakiegokolwiek uszkodzenia błon komórkowych gronkowców niezdolnych do dalszego rozmnażania i nie wykazujących objawów życiowych.

Zawiesina bakteryjna szczepu wrażliwego na stafilocokcynę A mimo wyjąłowienia pod wpływem jej działania, nie ulegała przejaśnieniu, co miało miejsce w wypadku *Staphylococcus staphylolyticus*. Do badań używano szczep gronkowca złocistego *Staphylococcus aureus* Oxford 209P, stosowany jako kontrolny przy oznaczaniu wrażliwości bakterii na antybiotyki metodą krążkową. Dla izolacji i mianowania substancji oraz badania wrażliwości szczepów na stafilocokcynę A przyjęto umowne pojęcie jednostki na mililitr. To największe rozcieńczenie stafilocokcyny zawarte w 1 ml bulionu, które po zadaniu 1 kroplą zawiesiny 5.000 komórek/ml, z 24 godzinnej hodowli bulionowej szczepu kontrolnego *St. aureus* 209P, daje po dalszych 24 godzinach całkowity brak wzrostu, zawiera jedną jednostkę stafilocokcyny A. W następnym już, kolejnym rozcieńczeniu występuje normalny wzrost pod postacią jednolitego zmętnienia.

Stafilocokcyna A działa bakteriobójczo przede wszystkim na gronkowce chorobotwórcze, poza tym na takie bakterie jak: *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae* PW 8, *Streptococcus pyogenes*. Natomiast nie wywiera wpływu na *Streptococcus faecalis*, pałeczki rodzaju *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Proteus* oraz grzyby *Cryptococcus neoformans* i *Candida albicans*. Spektrum działania stafilocokcyny A przedstawia tabela 4.

Wśród 172 szczepów gronkowcowych izolowanych z przypadków chorobowych skórnych 82,56% było wrażliwych na stężenia stafilocokcyny do 40 jedn/ml, a tylko 17,44% było wrażliwych na wyższe wartości 100, 200 i 400 jedn/ml. Nie było w tym zbiorze szczepów opornych na wyższe dawki stafilocokcyny A.

Z 1288 szczepów gronkowcowych izolowanych z przypadków nosicielstwa stwierdzono 89,5% szczepów wrażliwych na różne stężenia stafilocokcyny A do 800 jedn/ml i tylko 10,95% szczepów opornych na 800 jedn/ml. Z 137 szczepów gronkowcowych antagonistycznych izolowanych w czasie prac nad antagonizmem bakteryjnym 80,29% było wrażliwych na różne stężenia stafilocokcyny A od 5–400 jedn/ml i tylko 19,71% było opornych. Wśród szczepów wrażliwych na stafilocokcynę A przeważały szczepy oporne na penicylinę i na inne antybiotyki.

Toksyczność stafilocokcyny A dla myszy po dodaniu dootrzewnowym wynosi LD_{50} 60.000 jedn. na mysz. LD_{50} obliczano metodą Reed-Muencha-Lichtenfelda i Wilcoxona. Preparat stafilocokcyny A badano w rozmaitych stadiach oczyszczania na wywoływanie odczynów uczuleniowych. W największym stopniu oczyszczenia otrzymano aktywność 250.000 jedn/ml. Nie stwierdzono odczynów uczuleniowych.

Badania kliniczne wykazały, że stafilocokcyna A daje dobre wyniki w leczeniu zakażeń tkanek miękkich drobnoustrojami Gram-dodatnimi, szczególnie gronkowcami, a przy miejscowym stosowaniu nie wywołuje żadnych ubocznych zmian chorobowych. Stafilocokcyna A może być stosowana do miejscowego zwalczania procesów gronkowcowych na skórze, na śluzówkach w jamach ropni. Do tego celu można stosować ją pod postacią roztworów, zawiesin, maści, kremów i innych. Niżej podany przykład omawia praktyczny sposób otrzymywania stafilocokcyny A sposobem według wynalazku, nie ograniczając jego zakresu.

Przykład. Szczep *Staphylococcus epidermidis* nr 1262a hoduje się wstępnie w temperaturze 37°C w bulionie zwykłym przez 24 godziny. Następnie dokonuje się przesiewu na flaszki Roux z większą ilością bulionu przygotowanego ze świeżego mięsa wołowego. Bulion ten wzbogaca się dodatkiem 0,2% siarczanu magnezu, 1 ml 0,2 M buforu fosforanowego o pH = 7,2 na 400 ml bulionu i 1 ml roztworu N-fenyloglicyny. Hodowlę wytrząsa się z częstotliwością 100 wahnięć na minutę przez 24 godziny. Następnie odwirowuje komórki bakteryjne przy 3.000 obrotów/minutę w ciągu jednej godziny, płyn z nad osadu zlewa się do flaszek miarowych i oznacza aktywność w stosunku do szczepu kontrolnego *Staphylococcus aureus* Oxford 209P. Płyn rozcieńcza się w 1 ml próbkach bulionu od 1:10 do 1:20.000. Miana uzyskane tym sposobem wynoszą 5–10.000 jedn/ml.

Hodowlę zakwasza się i dodaje roztworu kwasu fosforowowolframowego. Płyn z osadem pozostawia się w chłodni na 12 godz. po czym, płyn z nad osadu dekantuje się i jako nieaktywny odrzuca. Aktywny osad oddziela się przez wirowanie i trzykrotne przepłukanie zakwaszonym roztworem chlorku sodu. Następnie rozpuszcza się go w wodzie przy pH obojętnym i oznacza aktywność.

Tak zagęszczony osad, który stanowi aktywną stafilocokcynę A rozdziela się na kolumnie sefadeskowej G-50. Pobierane frakcje po eliminacji V_0 bada się na aktywność, zlewa razem i ponownie wytrąca kwasem fosforowolframowym. Ponownie wytrącony osad stafilocokcyny A odwirowuje się, przepłukuje trzykrotnie, zakwaszonym roztworem chlorku sodu, roztwarza w wodzie destylowanej przy pH = 7,2, dializuje w worku dializacyjnym i po oznaczeniu aktywności zamraża w porcjach i liofilizuje. Po liofilizacji i rozdrobnieniu ponownie oznacza aktywność, która wypada w granicach 0,3 µg do 0,4 µg jedna jednostka.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób wytwarzania substancji bakteriobójczej stafilocokcyny A przez poddanie hodowli bakterii *Staphylococcus epidermidis*, znamienny tym, że szczep *Staphylococcus epidermidis* 1262a hoduje się na podłożu

bulionowym wzbogaconym 0,2% siarczanem magnezu, 0,2 M buforem fosforanowym i N-fenyloglicyną, a następnie po odwirowaniu bakterii wydziela stafilokokcynę A przez podwójne wytrącanie kwasem fosforowolframowym, przy pH = 4.

Tabela 1

Cechy różnicujące stafilokokcynę A od czynnika litycznego

Cechy charakterystyczne	Stafilokokcyna A	Czynnik lityczny
Skład aminokwasowy	18	17
Cukry	0,5%	—
Wyjściowe stężenie	640 jedn. do 5–10.000 jedn.	2,65 jedn.
Ciepłota	+ (gotowanie)	–(55°)
Wrażliwość na działanie enzymów proteolitycznych	—	+
Maximum ekstynkcji uV przy 278 mμ	—	+
Punkt izoelektryczny	4,0–4,5	11

Tabela 2

Skład aminokwasowy i amoniak po hydrolizie kwaśnej

Aminokwas	Mikromoli na 1 g	Odsetki molowe
Hydroksypolina	281,6	6,34
Asparaginowy kwas	231,5	5,21
Treonina	85,9	1,93
Seryna	148,0	3,33
Kwas glutaminowy	436,7	9,83
Prolina	412,9	9,30
Glicyna	1188,5	26,76
Alanina	417,7	9,40
Cystyna	śląd	śląd
Walina	116,9	2,63
Metionina	19,1	0,43
Izoleucyna	76,4	1,72
Leucyna	136,0	3,06
Tyrozyna	47,7	1,07
Fenylalanina	47,7	1,07
Glukozamina	19,1	0,43
Lizyna	341,3	7,68
Histydyna	33,4	0,75
NH ₃	202,9	4,57
Arginina	198,1	4,46
Razem	4441,4	99,97

Tabela 3

Cechy charakterystyczne	St. epidermidis 1262a	St. staphylo- ticus
1	2	3
Mannitol	—	—
Glukoza beztlenuowo	+	+
Koagulaza	—	—

1	2	3
Barwnik	—	—
Hemolizyny	—	—
Żelatynaza	—	+
Wrażliwość na fagi	—	—
Przechodzenie przez błony Dializacyjne	—	—
Rozpuszczanie komórek	—	+
Zakres działania	Gram-dodatnie w tym również gronkowce	tylko gronkowce

Tabela 4

Szczepy wrażliwe	Stopień wrażliwości	Szczepy odporne na 800 jedn/ml
Staphylococcus aureus Oxford 209 P	1 jedn/ml	Salmonella paratyphi B
Streptococcus o typie hemolizy alfa	200 jedn/ml	Shigella flexneri
Bacillus subtilis	400 jedn/ml	Shigella sonnei
Bacillus anthracis	400 jedn/ml	Klebsiella pneumoniae
Clostridium perfringens	100 jedn/ml	Proteus O _x X ₁₉
Corynebacterium diphtheriae PW 8	50 jedn/ml	Escherichia coli O ₅₅ B ₅
Erysipelothrix rhusiopathiae	400 jedn/ml	Streptococcus faecalis
Cryptococcus neoformans	200 jedn/ml	Candida albicans
Staphylococcus aureus nr 1 oporny na 5 antybiotyków	10 jedn/ml	Staphylococcus epider- midis antagonistyczny nr 933
Staphylococcus aureus nr 2 oporny na 5 antybiotyków	20 jedn/ml	Mycobacterium tubercu- losis BCG