

# UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

## 37 365

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

*A61K 35/76* (2015.01)

*A61K 9/20* (2006.01)

*A61P 31/04* (2006.01)

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2023-41187**

(22) Přihlášeno: **31.07.2023**

(47) Zapsáno: **17.10.2023**

(73) Majitel:  
MB PHARMA s.r.o., Praha 2, Vinohrady, CZ  
Masarykova univerzita, Brno, Brno-město, CZ

(72) Původce:  
RNDr. Marek Moša, Ph.D., Mečeříž, CZ  
Mgr. Martin Benešik, Ph.D., Strání, CZ  
Mgr. Marie Komárková, Hlučín, CZ  
prof. RNDr. Roman Pantůček, Ph.D., Blansko, CZ

(74) Zástupce:  
Rott, Růžička & Guttman a spol., Vyskočilova  
1566, 140 00 Praha 4, Míchle

(54) Název užitého vzoru:  
**Antibakteriální lyofilizovaná tableta**

CZ 37365 U1

## Antibakteriální lyofilizovaná tableta

### Oblast techniky

5

Technické řešení se týká lyofilizovaných tablet s antimikrobiálním účinkem proti bakteriím *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa* s obsahem bakteriofágů s optimální stabilitou a efektivitou.

10

Konkrétně se technické řešení týká lyofilizovaných jednodávkových forem (tablet), jejichž aktivní složkou jsou bakteriální viry (bakteriofágy anebo zkráceně fágy) ať už ve formě fágových lyzátů nebo purifikátů. Složení této formy balancuje vyváženou kompozici jednotlivých složek, zajišťující vhodné technické parametry pro lékovou/aplikační formu, při zachování maximální stability aktivních látek a zachování jejich dlouhodobé stability. Aktivní složkou jsou dva specificky působící fágy proti bakteriím *S. aureus* a *P. aeruginosa*. Tuto aplikační formu tak lze uplatnit při léčbě bakteriálních infekcí způsobených patogenními kmeny *S. aureus* a *P. aeruginosa* v klinické praxi.

15

20

### Dosavadní stav techniky

Světová zdravotnická organizace (WHO) zařadila rezistenci patogenních bakterií vůči antibiotikům mezi největší hrozby pro lidské zdraví v 21. století, způsobující nejen ztráty na životech, ale i značnou finanční zátěž zdravotnického systému (WHO Team 2023).

25

Mezi nejnebezpečnější patogeny rezistentními k antibiotikům spadají bakterie *S. aureus* a *P. aeruginosa*. Zástupci *S. aureus* jsou původci celé řady vážných infekcí např. osteomyelitidy, sepse, taktéž infekcí ran a kůže. Podobně i *P. aeruginosa* zapříčiňuje širokou škálu onemocnění například infekce ran a pneumonie (obzvláště nebezpečné u pacientů s cystickou fibrózou). Oba výše zmíněné patogeny jsou oportunní, tudíž ohrožují především imunokompromitované jedince, často v nemocničním prostředí (Barer 2018). Rezistence těchto patogenů tak komplikuje poskytování zdravotní péče, zejména omezuje možnosti antibiotické léčby infekcí a vede k nutnosti vyhledávat alternativy mezi které spadá i fágová terapie (Abedon et al. 2011).

30

35

Bakteriofágy (zkráceně fágy) jsou viry bakterií, způsobující bakteriální lyzi. Fágová terapie využívá tuto vlastnost pro léčbu bakteriálních infekcí. Tento terapeutický přístup je zkoumán již od první poloviny 20. století, nicméně po objevu a rozšíření antibiotik byl zejména v západních zemích opomíjen. Důvodem této situace byl hlavně objev antibiotik.

40

Fágová terapie má ale řadu výhod jako je např. menší riziko nežádoucích účinků (oproti antibiotikům), zejména v důsledku minimálního vlivu na přirozenou mikroflóru pacienta, dále jsou fágy schopny adaptace vůči obranným mechanismům bakterie (Loc-Carrillo and Abedon 2011). Původní nedostatečná znalost fágové biologie vedla k rozporupným výsledkům během terapeutické aplikace fágů. S rozvojem moderních metod molekulární biologie, celogenomového sekvenování, genomiky a proteomiky již dostatečně rozumíme fágovou biologii a jejich interakci s hostitelskými bakteriemi. S velkým rozsahem těchto znalostí ohledně bakteriofágů a také kvůli zvyšující se antibiotické rezistenci se zájem o fágovou terapii celosvětově zvyšuje (Heselpoth 2018).

45

50

Každý bakteriofág se liší spektrem bakterií, které je schopen úspěšně infikovat a posléze lyzovat. Fágy mohou být polyvalentní s širokým spektrem bakterií na které působí, ale na druhou stranu také vysoce specializované na omezený počet kmenů patogenního mikroorganismu. Právě kombinace různých fágů (koktejl) může vést k rozšíření spektra antibakteriálního účinku. Navíc izolace specifických naturálních mutantů může vést k antimikrobiálnímu působení na jinak rezistentní bakterie. V případě zde uvedených bakteriofágů se jedná o specifické fágy, které byly

izolovány jako kmeny fágů účinné na rezistentní bakterie. Rozšiřují tak spektrum antimikrobiální aktivity na bakterie jak rezistentní antibiotikům, tak necitlivé k jiným fágům.

Použití fágů v tekuté formě je běžné, ale velkou výzvou pro současnou vědu je příprava aplikačních/lékových/skladovacích forem. Dle dostupné literatury byly fágy zpracovány do tekutých, polotuhých i tuhých forem (Jault et al., 2019, Brown et al., 2018, Khanal et al., 2021). Tekuté formy jsou na přípravu finančně i časově nenáročné, nicméně mají větší náchylnost k mikrobiální kontaminaci a vyšší nároky na skladovací prostory, kdy je problém zachovat stabilitu jejich antibakteriálního účinku při vyšších teplotách (Malik et al. 2017). Navíc tekuté formy na rozdíl od polotuhých a tuhých lékových forem jsou spojeny s řadou problémů během jejich aplikace pacientům. U polotuhých forem je hlavní výhodou snazší aplikace, nicméně se k ní jinak vztahují stejné komplikace jako u forem tekutých. V obou případech lze pro udržení mikrobiologické jakosti využít konzervační látky a antioxidanty, ale ty mohou mít negativní dopad na antimikrobiální efekt a jakost výsledného produktu (Subils et al., 2012). Tuhé formy mají obecně nižší riziko mikrobiální kontaminace, tudíž aplikace konzervantů není nutná. Navíc zajišťují vyšší stabilitu antibakteriálního účinku, přesnější dávkování a menší nároky na podmínky skladování. Hlavními nevýhodami je složitější optimalizace a vyšší finanční náročnost jejich přípravy (Komárek 2006). Ověřené metody pro zpracování fágů do pevné formy jsou sprejové sušení a lyofilizace (Malik et al. 2017).

Ke zpracování bakteriofágů do pevné formy se standartně využívá lyofilizace (mrazové sušení). Tento proces zahrnuje zmrazení vzorku, následuje primární sušení, kdy dochází k sublimaci ledu, a nakonec se během sekundárního sušení při vyšších teplotách odpařuje zbytek vody (Malik et al. 2017). Fágy v lyofilizátu jsou schopny udržet efektivitu v rámci několika měsíců, dokonce i let (Clark 1962). Nicméně tato stabilita je ovlivněna mnoha faktory jako jsou podmínky procesu lyofilizace, použité pomocné látky (tj. zejména plniva a kryoprotektiva), nebo skladování a rozpouštění výsledného lyofilizátu (Malik et al. 2017). Navíc na rozdíl od chemických látek se stabilita a efektivita fága liší u každého kmene, je tedy nutné experimentálně optimalizovat proces lyofilizace a najít nejlepší složení média, vhodné pro uchování maximální aktivity daného fága.

Je potřeba zdůraznit, že fágy jsou standartně lyofilizovány v uzavřených vialkách do tzv. lyofilizačního koláče. Ten má však komplikovanější aplikaci a dávkování např. každý koláč se skladuje odděleně ve vialce, což zabírá více prostoru a před další manipulací je nezbytné jej převést do roztoku, čímž se redukuje výhody lyofilizace. Řešením tohoto je příprava jednodávkových lyofilizátů na kovové formě, na kterou se nanese směs plniva a kryoprotektiva s fágovými lyzáty (případně purifikáty) a s roztokem fágových enzymů, ještě před zahájením lyofilizace. Je tak dosažena vysoká stabilita jejich antibakteriálního efektu. Navíc vzniklé jednodávkové formy lze poté skladovat v jednom primárním obalu a snížit tak nároky na skladovací prostory a zároveň zjednodušit a upřesnit aplikaci jedné dávky.

Doposud existuje omezené množství studií týkající se jednodávkových tuhých forem s obsahem fágů a jejich enzymů, které umožňují upřesnit jejich dávkování a zvýšit stabilitu jejich účinku (Khanal et al., 2021). Předkládané řešení se zaměřuje na metodiku přípravy lyofilizovaných jednodávkových forem s obsahem bakteriofágů, která usnadňuje aplikaci fágů v terapii infekcí, způsobených patogenními kmeny *P. aeruginosa* a *S. aureus*.

#### Literatura

Abedon, Stephen T., Sarah J. Kuhl, Bob G. Blasdel, and Elizabeth Martin Kutter, 2011, Phage Treatment of Human Infections, *Bacteriophage*, 1(2), 66 až 85, <https://doi.org/10.4161/bact.1.2.15845>.

Anany, H., Chen, W., Pelton, R., & Griffiths, M. W., 2011, Biocontrol of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in meat by using phages immobilized on modified cellulose membranes, *Applied and Environmental Microbiology*, 77(18), 6379 až 6387,

<https://doi.org/10.1128/AEM.05493-11>.

- Barer a Irving. Medical Microbiology, 19th Edition: A Guide to Microbial Infections: Pathogenesis, Immunity, Laboratory Investigation and Control. 19. United Kingdom: Elsevier, 2018, ISBN 978-0-7020-7200-0.
- Brown, T. L., Petrovski, S., Chan, H. T., Angove, M. J., & Tucci, J., (2018), Semi-solid and solid dosage forms for the delivery of phage therapy to epithelia, *Pharmaceuticals*, 11(1), 1 až 12, <https://doi.org/10.3390/ph11010026>.
- Carlson, K., 2005, Working with bacteriophages: Common techniques and methodological approaches In: Kutter, E., Sulakvelidze, A., (ed.) Bacteriophages: Biology and Application, str. 437 až 494, CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Clark, William A., 1962, Comparison of Several Methods for Preserving Bacteriophages. *Applied Microbiology*, 10(5): 466 až 471, doi: 10.1128/am.10.5.466-471.1962.
- Fulgione, A., Ianniello, F., Papaianni, M., Contaldi, F., Sgamma, T., Giannini, C., Pastore, S., Velotta, R., Ventura, B. Della, Roveri, N., Lelli, M., Capuano, F., & Capparelli, R., (2019), Biomimetic hydroxyapatite nanocrystals are an active carrier for salmonella bacteriophages, *International Journal of Nanomedicine*, 14, 2219 až 2232, <https://doi.org/10.2147/IJN.S190188>.
- Garbe, Julia, Andrea Wesche, Boyke Bunk, Marlon Kazmierczak, Katherina Selezska, Christine Rohde, Johannes Sikorski, Manfred Rohde, Dieter Jahn, and Max Schobert, 2010, Characterization of JG024, a Pseudomonas aeruginosa PB1-like Broad Host Range Phage under Simulated Infection Conditions, *BMC Microbiology* 10, 1 až 10, <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-301>.
- Heselpoth, R.D., Swift, S.M., Linden, S.B., Mitchell, M.S., Nelson, D.C., 2018, Enzybiotics: Endolysins and Bacteriocins. In: Harper, D., Abedon, S., Burrowes, B., McConville, M. (eds.) Bacteriophages, Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-40598-8\\_34-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-40598-8_34-1).
- Hoe, Susan, James W. Ivey, Mohammed A. Boraey, Abouzar Shamsaddini-Shahrbabak, Emadeddin Javaheri, Sadaf Matinkhoo, Warren H. Finlay, and Reinhard Vehring, 2014, Use of a Fundamental Approach to Spray-Drying Formulation Design to Facilitate the Development of Multi-Component Dry Powder Aerosols for Respiratory Drug Delivery, *Pharmaceutical Research*, 31(2): 449 až 465, <https://doi.org/10.1007/s11095-013-1174-5>.
- Jault, P., Leclerc, T., Jennes, S., Pirnay, J. P., Que, Y. A., Resch, G., Rousseau, A. F., Ravat, F., Carsin, H., Le Floch, R., Schaal, J. V., Soler, C., Fevre, C., Arnaud, I., Bretaudeau, L., & Gabard, J., (2019), Efficacy and tolerability of a cocktail of bacteriophages to treat burn wounds infected by Pseudomonas aeruginosa (PhagoBurn): a randomised, controlled, double-blind phase 1/2 trial, *The Lancet Infectious Diseases*, 19(1), 35 až 45, [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30482-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30482-1).
- Khanal, D., Chang, R. Y. K., Hick, C., Morales, S., & Chan, H.-K., (2021), Enteric-coated bacteriophage tablets for oral administration against gastrointestinal infections, *International Journal of Pharmaceutics*, 609, 121206, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.121206>.
- Komárek, Pavel a Miloslava Rabišková, Technologie léků: galenika, 3., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Galén, 2006, ISBN 80-726-2423-7.
- Kropinski, A.M., Mazzocco, A., Waddell, T.E., Lingohr, E., Johnson, R.P., 2009, Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay, In: Clokie M.R., Kropinski A.M. (ed.)

Bacteriophages: Methods and Protocols, sv 1: Isolation, Characterization, and Interactions. str. 69 až 67, doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6\_7.

- 5 Loc-Carrillo, Catherine, and Stephen T. Abedon, 2011, Pros and Cons of Phage Therapy, *Bacteriophage*, 1(2), 111 až 114, https://doi.org/10.4161/bact.1.2.14590.
- 10 Malik, Danish J., 2021, Approaches for Manufacture, Formulation, Targeted Delivery and Controlled Release of Phage-Based Therapeutics, *Current Opinion in Biotechnology*, 68, 262 až 271, https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.02.009.
- 15 Malik, Danish J., Ilya J. Sokolov, Gurinder K. Vinner, Francesco Mancuso, Salvatore Cinquerrui, Goran T. Vladislavjevic, Martha R.J. Clokie, Natalie J. Garton, Andrew G.F. Stapley, and Anna Kirpichnikova, 2017, Formulation, Stabilisation and Encapsulation of Bacteriophage for Phage Therapy, *Advances in Colloid and Interface Science*, 249, 100 až 133, https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.05.014.
- 20 Mathias, J. R., Dodd, M. E., Walters, K. B., Yoo, S. K., Erik, A., & Huttenlocher, A., (2010), Phage-Bacterium War on Polymeric Surfaces-Anchored Eliminate Micobial Infections, *Biomacromolecules*, 33(11), 1212 až 1217, https://doi.org/10.1021/bm400290u.
- Merabishvili M., Production of bacteriophages using bacterial suspension cultures for phage-therapy, In: Meyer HP, Schmidhalter DR, editors. Industrial scale suspension culture of living cells, 2014, Wiley VCH Verlag, Weinheim, Germany; 2014, str. 537 až 543.
- 25 Meyer HP, Schmidhalter DR, editors, Industrial scale suspension culture of living cells, 2014, WileyVCH Verlag, Weinheim, Germany; 2014, str. 537 až 543.
- 30 Subils, T., Aquili, V., Ebner, G., & Balagué, C., (2012), Effect of preservatives on Shiga toxigenic phages and Shiga toxin of Escherichia coli O157:H7, *Journal of Food Protection*, 75(5), 959 až 965, https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-332
- WHO Team (2023), Antimicrobial Resistance (AMR), World Health Organization, Geneva, Switzerland, ISBN 9789240047655, https://www.who.int/publications/i/item/9789240047655.

35

#### Podstata technického řešení

40 Výše zmíněné problémy se stabilizací aktivních složek v průběhu přípravy lyofilizovaných forem a spektra působení řeší jedinečné složení směsi na tablety s obsahem specifických antimikrobiálních složek (fágů). Složení základu na tablety je optimalizováno tak, aby napomáhalo stabilizaci fágů a nedochází k redukci jejich koncentrace i aktivity. Tím je zajištěna optimální efektivita působení. Fágy DSM 34648 i DSM 34647 byly izolovány *de novo* z prostředí nebo připraveny selektivní laboratorní evolucí a jsou ojedinělé z hlediska lytického spektra.

45

Předmětem technického řešení je složení lyofilizovaných tablet, jehož podstata spočívá v tom, že obsahuje specifické bakteriofágy působící proti *S. aureus* a *P. aeruginosa*, o výsledném titru  $10^6$  až  $10^{11}$  PFU/ml směsi, 5 až 50 g plniva a 4 až 13 g kryoprotektiva na 100 ml směsi.

50 V rámci tohoto technického řešení je pro přípravu jednodávkové tuhé formy (lyofilizované tablety) s obsahem fágového lyzátu využit specifický proces lyofilizace směsi s optimalizovaným složením, které zajišťuje stabilitu a vysokou aktivitu antimikrobiálních složek. Definovaná směs aktivních antimikrobiálních látek (fágové lyzáty), plniva (rybí želatina, maltodextrin, nebo polyvinylpyrrolidon zkr. PVP) a kryoprotektiva (manitol) se po nanesení na speciální kovovou formu (český užitný vzor č. PUV 31295), lyofilizuje při definovaných podmínkách. Tento postup

55

zvyšuje stabilitu efektu aktivních složek zejména při vyšších teplotách, umožňuje výhodnější skladování a zvyšuje mikrobiologickou jakost výsledného produktu, který lze využít v léčbě bakteriálních infekcí způsobených bakteriemi *S. aureus* a *P. aeruginosa*. Specifické fágy obsažené v tabletě mají ojedinělé lytické spektrum zahrnující patogenní kmeny izolované z nemocničního prostředí.

#### Popis provedení technického řešení

Směs fágového lyzátu s hodnotou titru minimálně  $1 \times 10^7$  PFU/ml lze zpracovat do příslušného množství pevných dávek (tablet). Při tomto zpracování dochází ke zmrazení aktivních složek s plnivem a kryoprotektivem na speciální formě, tak, aby došlo k tvorbě oddělených pevných dávek, které se následně v této formě lyofilizují. Výsledný lyofilizovaný produkt si zachovává strukturu tablety a lze jej uchovávat chráněný před světlem a vzdušnou vlhkostí pomocí vhodného obalu při teplotě 4 °C alespoň po dobu minimálně tří měsíců. U těchto vzniklých dávek je nutné zabezpečit titer fága, který dosahuje minimálně  $10^6$  až  $10^7$  PFU/ml, což je obecně uznávaná minimální hodnota titru fága pro terapeutické použití (Merabishvili 2014), vhodnou metodou purifikace.

Pro přípravu lze použít nepurifikovaný fágový lyzát, nebo purifikát s hodnotou titru alespoň v řádu  $1 \times 10^7$  PFU/ml. Fágový lyzát je purifikován a převeden do SM pufru (složení SM pufru: 100 mM NaCl, 8 mM MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 50 mM Tris-Cl (pH 7,5) do 1000 ml destilované vody), který se využívá pro uchovávání fágů a zároveň je vhodný pro lyofilizační proces, jelikož u něj během lyofilizace nedochází ke změně pH. Pro purifikaci fágů lze aplikovat standardně využívané metody purifikace proteinů jako např. ultracentrifugace, tangenciální průtoková filtrace, chromatografie, či přečištění pomocí centrifugačních zkumavek s filtračním nástavcem.

Bakteriofágy byly izolovány na kmenech, které nebyly citlivé k jiným testovaným bakteriofágům. Dva použité bakteriofágy DSM 34648 a DSM 34647, jsou uloženy v souladu s požadavky Budapeštské smlouvy ve sbírce kultur DSMZ v Německu jako patentové úložky, mají unikátní spektrum, které rozšiřuje možnosti použití terapeutických fágů na další patogenní klinické izoláty. Jejich základní vlastnosti jsou uvedeny v následující tabulce 1. Příklady složení tablet jsou uvedeny v tabulce 2.

bakteriofág	hostitel	rod	G+C (%)	velikost genomu (kbp)
DSM 34647	<i>S. aureus</i>	<i>Rosenblumvirus</i>	29,24	18,00
DSM 34648	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Septimatrevirus</i>	53,74	42,97

Tabulka 1: Souhrn vlastností fágů

Testování antimikrobiálního efektu fágů v dané dávce probíhá pomocí kapkové metody na dvouvrstevném agaru (Garbe et al. 2010). U bakteriofágů se jedna dávka před testováním rozpustí v 50 ml sterilní destilované vody, při pokojové teplotě a 150 rpm po dobu 3 až 5 minut. Vzniklý roztok se naředí a proběhne vykapání daných ředění. Měření se provede u několika dávek a zjistí se tak stejnoměrnost jejich efektu a zároveň stabilita antimikrobiálního účinku aktivních složek v čase, v ideálním případě minimálně po třech měsících.

Objasnění výkresů

Obrázek 1: Detailní snímek skenovací elektronové mikroskopie povrchu dávky

5 Obrázek 2: Detailní snímek skenovací elektronové mikroskopie povrchu dávky

Obrázek 3: Detail vrchní části dávky

Obrázek 4: Detail spodní části dávky

10

Obrázek 5: Detail boční strany dávky

Obrázek 6: Ukázka primárního obalu

15

Příklady uskutečnění technického řešení

Složení lyofilizovaných tablet a způsob jejich přípravy jsou uvedeny v příkladech 1 až 3, kdy se u každého příkladu liší složení směsi kryoprotektiva a plniva, která jsou vhodná pro stabilizaci bakteriofágů. Poměr jednotlivých složek je blíže specifikován v tabulce 2.

20

<b>Plnivo [g]</b>	<b>Kryoprotektivum - manitol [g]</b>	<b>Fág DSM 34648 [PFU/ml]</b>	<b>Fág DSM 34647 [PFU/ml]</b>
Maltodextrin 35 až 50	4 až 6	$1 \times 10^7$ až $1 \times 10^{11}$	$1 \times 10^7$ až $1 \times 10^{11}$
Želatina 10 až 15	11 až 13	$1 \times 10^7$ až $1 \times 10^{11}$	$1 \times 10^7$ až $1 \times 10^{11}$
PVP 5 až 10	4 až 6	$1 \times 10^7$ až $1 \times 10^{11}$	$1 \times 10^7$ až $1 \times 10^{11}$

Tabulka 2: Složení 100 ml směsi na přípravu 200 tablet s obsahem bakteriofága

25

Příklad 1:

V 90 ml směsi fágových lyzátů/purifikátů o koncentraci minimálně  $1 \times 10^7$  PFU/ml se za stálého míchání při pokojové teplotě po dobu 30 minut rozpustí 43,75 g maltodextrinu a 5,00 g manitolu. Po rozpuštění pomocných látek se nastaví pH směsi pomocí roztoků HCl a NaOH na hodnotu 7,5. Množství směsi se připraví dle požadovaného počtu dávek, jedna dávka odpovídá 0,5 až 1 ml směsi, tzn. ze 100 ml směsi se připraví 100 až 200 dávek.

30

Směs je nanášena na sterilní hliníkovou formu, vychlazenou na  $-80$  °C. Forma je během nanášení udržována při teplotě  $-60$  až  $-80$  °C. Poté probíhá lyofilizace v daných krocích:

35

1. Namrazení vzorku v  $-30$  °C po dobu 20 minut
2. Primární sušení při teplotě  $-30$  °C po dobu 960 minut (tj. 16 hodin) a tlaku 150 mTorr (1 mTorr je 0,13332 Pa)

40

3. Sekundární sušení probíhá z -30 °C do 20 °C při stoupaní teploty 0,1 °C/min a tlaku 150 mTorr

5 Vzniklé dávky (tablety) se po vyjmutí z lyofilizátoru a z formy přenesou do primárního obalu a skladují se ve tmě optimálně při teplotě 4 °C (případně při pokojové teplotě).

Příklad 2:

10 Jako plnivo lze využít taktéž rybí želatinu, kdy v 50 ml vody se za stálého míchání zahřeje 12 g manitolu a 12 g rybí želatiny přibližně na teplotu 70 °C. Tato směs se následně vytemperuje na 50 °C a po vytemperování se do ní vmíchají fágové lyzáty/purifikáty (Tabulka 3) do celkového objemu 90 ml. Koncentrace fágů je minimálně  $1 \times 10^7$  PFU/ml. Směs se míchá při pokojové teplotě po dobu 30 minut. Po rozpuštění pomocných látek se nastaví pH směsi pomocí roztoků HCl  
15 a NaOH na hodnotu 7,5. Množství směsi se připraví dle požadovaného počtu dávek, jedna dávka odpovídá 0,5 až 1 ml směsi, tzn. ze 100 ml směsi se připraví 100 až 200 dávek.

Směs je nanášena na sterilní hliníkovou formu, vychlazenou na -80 °C. Forma je během nanášení udržována při teplotě -60 až -80 °C. Poté probíhá lyofilizace v daných krocích:

20

1. Namražení vzorku v -30 °C po dobu 20 minut

2. Primární sušení při teplotě -30 °C po dobu 960 minut (tj. 16 hodin) a tlaku 150 mTorr

25

3. Sekundární sušení probíhá z -30 °C do 20 °C při stoupaní teploty 0,1 °C/min a tlaku 150 mTorr

Vzniklé dávky (tablety) se po vyjmutí z lyofilizátoru a z formy přenesou do primárního obalu a skladují se optimálně ve tmě při teplotě 4 °C (případně při pokojové teplotě).

30

Příklad 3:

Jako plnivo lze využít polyvinylpyrolidon K90 (PVP90). Ve 90 ml směsi fágových lyzátů/purifikátů o koncentraci minimálně  $1 \times 10^7$  PFU/ml se za stálého míchání při pokojové  
35 teplotě po dobu 30 minut rozpustí 7,5 g PVP90 a 5,00 g manitolu. Po rozpuštění pomocných látek se nastaví pH směsi pomocí roztoků HCl a NaOH na hodnotu 7,5. Množství směsi se připraví dle požadovaného počtu dávek, jedna dávka odpovídá 0,5 až 1 ml směsi, tzn. ze 100 ml směsi se připraví 100 až 200 dávek.

40

Směs je nanášena na formu, vychlazenou na -80 °C. Forma je během nanášení udržována při teplotě -60 až -80 °C. Poté probíhá lyofilizace v daných krocích:

1. Namražení vzorku v -30 °C po dobu 20 minut

45

2. Primární sušení při teplotě -30 °C po dobu 960 minut (tj. 16 hodin) a tlaku 150 mTorr

3. Sekundární sušení probíhá z -30 °C do 20 °C při stoupaní teploty 0,1 °C/min a tlaku 150 mTorr

50

Vzniklé dávky (tablety) se po vyjmutí z lyofilizátoru a z formy přenesou do primárního obalu a skladují se optimálně ve tmě při teplotě 4 °C (případně při pokojové teplotě).



## Příklad 4:

V 90 ml směsi fágových lyzátů/purifikátů o koncentraci minimálně  $1 \times 10^7$  PFU/ml se za stálého míchání při pokojové teplotě po dobu 30 minut rozpustí 43,75 g maltodextrinu a 5,00 g manitolu.  
5 Po rozpuštění pomocných látek se nastaví pH směsi pomocí roztoků HCl a NaOH na hodnotu 7,5. Množství směsi se připraví dle požadovaného počtu dávek, jedna dávka odpovídá 0,5 až 1 ml směsi, tzn. ze 100 ml směsi se připraví 100 až 200 dávek.

Směs je nanášena na formu, vychlazenou na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Forma je během nanášení udržována  
10 při teplotě  $-60$  až  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Poté probíhá lyofilizace v daných krocích:

1. Namražení vzorku v  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 20 minut
2. Primární sušení při teplotě  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 960 minut (tj. 16 hodin) a tlaku 150 mTorr  
15
3. Sekundární sušení probíhá z  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  do  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  při stoupání teploty  $0,1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  a tlaku 150 mTorr

Vzniklé dávky (tablety) se po vyjmutí z lyofilizátoru a z formy přenesou do primárního obalu  
20 a skladují se optimálně ve tmě při teplotě  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  (případně při pokojové teplotě).

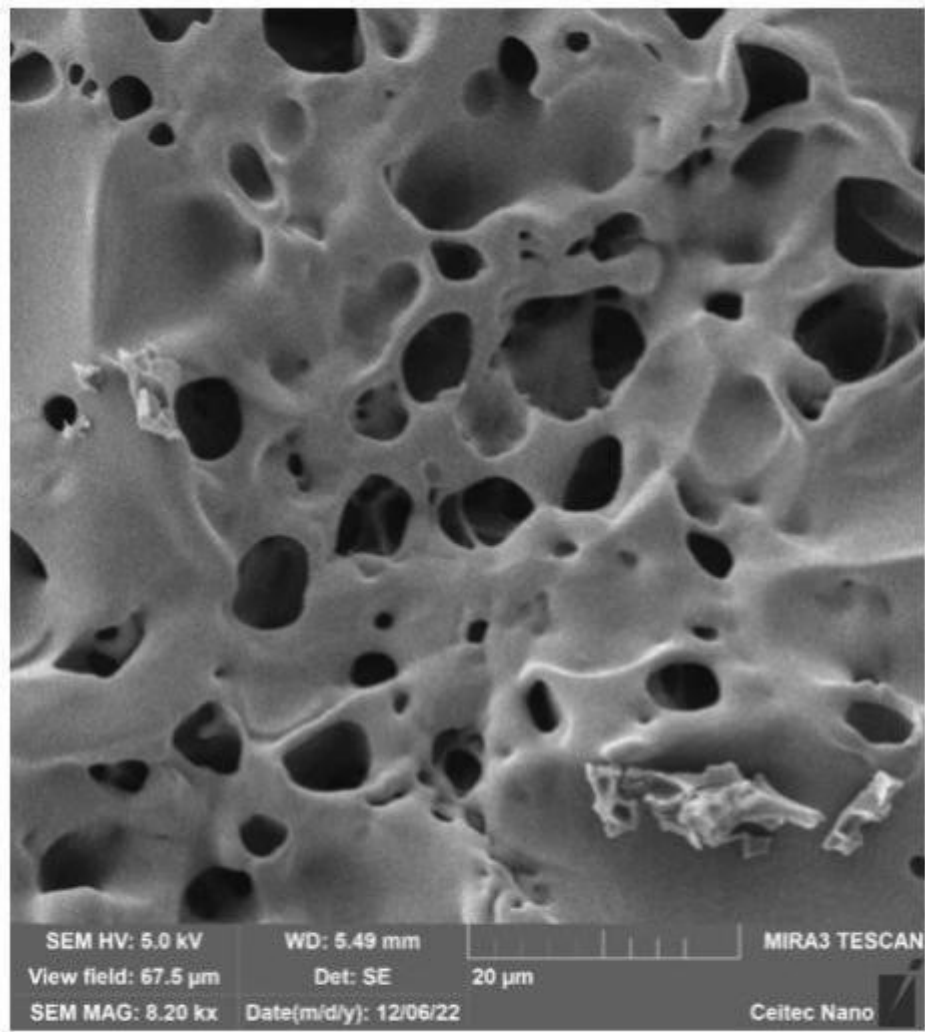
Průmyslová využitelnost

25 Lyofilizované jednodávkové formy (tablety) s obsahem fágového lyzátu/purifikátu lze aplikovat při fágové terapii infekcí způsobené širokým spektrem antibioticky rezistentních kmenů patogenních bakterií *S. aureus* a *P. aeruginosa*, které jsou vůči těmto aktivním složkám prokazatelně citlivé.

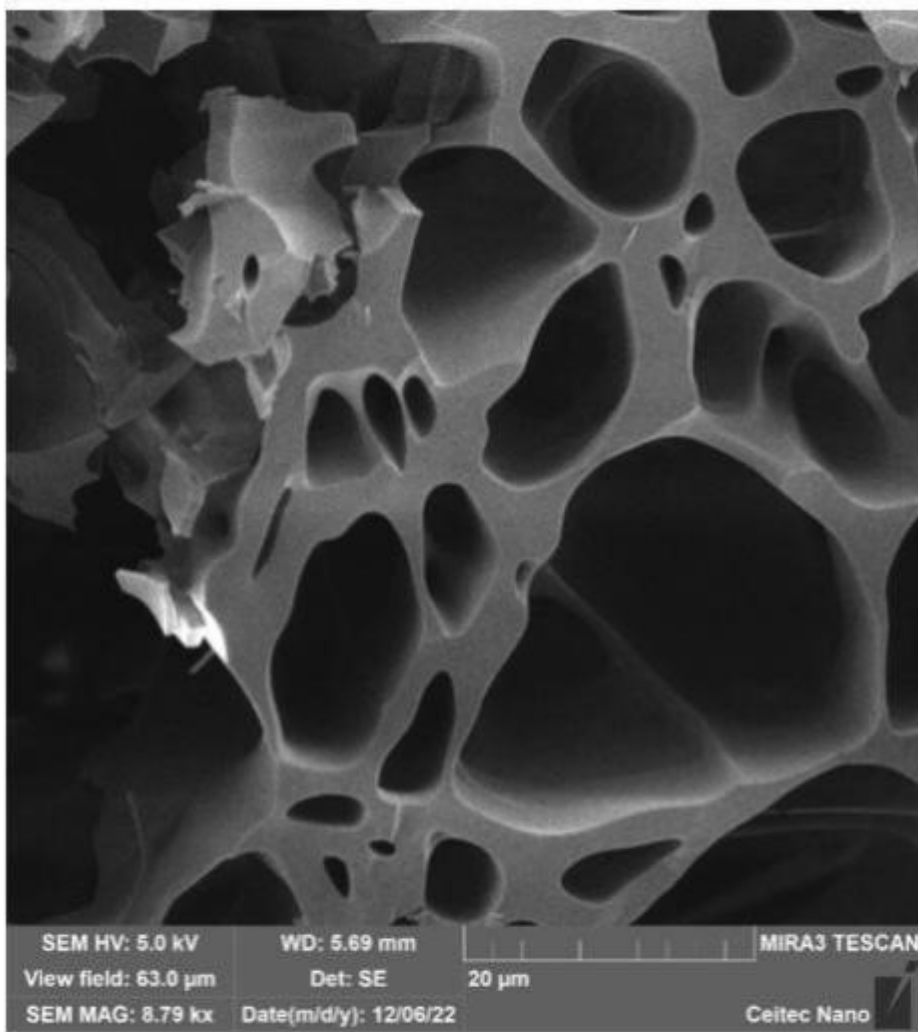
**NÁROKY NA OCHRANU**

- 5 1. Antibakteriální tableta proti Staphylococcus aureus a Pseudomonas aeruginosa, **vyznačující se tím**, že obsahuje specifické fágy uložené pod čísla DSM 34647 a DSM 34648 s titrem fága 107 až 1011 PFU/ml, 5 až 50 g plniva a 4 až 13 g kryoprotektiva na 100 ml směsi.
2. Tableta podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že plnivo je vybráno ze skupiny zahrnující maltodextrin, rybí želatinu a polyvinylpyrrolidon.
3. Tableta podle kteréhokoli z nároků 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že kryoprotektivem je manitol.
- 10 4. Tableta podle kteréhokoli z nároků 1 až 3 pro použití při léčení infekcí způsobených patogenními kmeny Staphylococcus aureus a Pseudomonas aeruginosa v humánní i veterinární oblasti.

5 výkresů



Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3



Obr. 4



Obr. 5



Obr. 6