

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

33 381

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/70 (2006.01)
C12N 7/02 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2019-36608**
(22) Přihlášeno: **09.09.2019**
(47) Zapsáno: **12.11.2019**

- (73) Majitel:
Masarykova univerzita, Brno, Brno-město, CZ
- (72) Původce:
doc. RNDr. Roman Pantůček, Ph.D., Brno,
Řečkovice, CZ
Mgr. Dana Štveráková, Písek, Budějovické
Předměstí, CZ
Mgr. Ondřej Šedo, Ph.D., Brno, Bystrc, CZ
doc. RNDr. Zbyněk Zdráhal, Dr., Kuřim, CZ
- (74) Zástupce:
PatentCentrum Sedlák & Partners s.r.o., Okružní
2824, 370 01 České Budějovice, České Budějovice
3

- (54) Název užitého vzoru:
**Systém pro přípravu vzorku a identifikaci
alespoň jednoho kmene bakteriofága
prostřednictvím hmotnostní spektrometrie**

CZ 33381 U1

Systém pro přípravu vzorku a identifikaci alespoň jednoho kmene bakteriofága prostřednictvím hmotnostní spektrometrie

5 Oblast techniky

Technické řešení se týká oblasti mikrobiologie, konkrétně systému pro přípravu vzorku a identifikaci alespoň jednoho kmene bakteriofága prostřednictvím hmotnostní spektrometrie.

10

Dosavadní stav techniky

Bakteriální infekce jsou vlivem narůstající rezistence k antibiotikům dlouhodobým závažným problémem v nemocničním i v komunitním prostředí. Jednou z možných variant pro boj s rezistentními bakteriemi je využití bakteriofágů, jakožto alternativy k antibiotikům nebo jako doplňku antibiotické léčby. Pro správné využití bakteriofágů je nutné vyvinout rychlé a efektivní metody pro jejich detekci a identifikaci. Je nutné vyvinout metody, které by byly využitelné při klasifikaci nových izolátů bakteriofágů i při kontrole kvality produktů, které obsahují bakteriofágy.

20

Viry bakterií, tzv. bakteriofágy, zkráceně fágy, jsou všudypřítomné a uplatňují se v regulaci mikrobiální rovnováhy ve všech ekosystémech. Lytické fágy způsobují lyzi bakteriálních buněk a jsou využitelné ve fágové terapii. Temperované fágy rovněž lyzují bakteriální buňky, ale jsou také schopné integrovat svůj genom do bakteriálního chromozomu. Po začlenění fágového genomu do bakteriálního chromozomu vzniká profág, který nezasahuje do životních funkcí bakterie a replikuje se jako součást chromozomu. Bakteriofágy také umožňují horizontální přenos genů a podílejí se na variabilitě bakteriálních genomů.

25

Purifikace bakteriofágů je nezbytná pro výrobu antimikrobiálních, terapeutických i kosmetických přípravků. V dnešní době je nutné dodržovat standardy farmaceutických autorit, které vyžadují výrobu fágových produktů v režimu správné výrobní praxe a kladou tak důraz na purifikaci, sterilizaci a prokázání identity a účinnosti. Mezi standardní techniky purifikace fágů patří centrifugace, filtrace, ultrafiltrace, precipitace, chromatografie a zonální ultracentrifugace. Pokud lytická infekce probíhá v tekutém médiu s narostlými buňkami hostitelského bakteriálního kmene, dojde po určité době k vyčerení a dostaneme tzv. fágový lyzát, což je kultivační prostředí obsahující aktivní virové částice, zbytky membrán a vylitý buněčný obsah. Zbytky bakteriálních buněk jsou běžně odstraňovány centrifugací a následnou filtrací přes filtry s velikostí pórů 0,22 μm nebo 0,45 μm . Zvláště u gramnegativních bakterií jsou však v lyzátech přítomny prozánětlivé endotoxiny, a proto je třeba purifikovat je důkladněji, zejména pokud má výsledný produkt sloužit k terapeutickému využití. Po odstranění zbytků buněk z lyzátu tedy přichází na řadu sofistikovanější purifikační techniky. Upřednostňovanou metodou purifikace a zakoncentrování fágů je ionexová chromatografie využívající monolitické kolony z konvektivního interakčního média. Pro účely základního výzkumu poskytuje suspenzi fágových částic o vysoké čistotě ultracentrifugace v gradientu CsCl, ale je finančně i časově náročná a také nevhodná pro purifikaci velkých objemů v průmyslové výrobě.

30

35

40

45

50

55

Identifikace bakteriofágů je obvykle založena na morfologické charakterizaci pomocí elektronové mikroskopie a na sekvenování fágového genomu. Dobře charakterizované bakteriofágy s definovanými konzervovanými geny, typickými pro určité skupiny, lze identifikovat pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Mozaicismus a modulární struktura genomu bičíkatých fágů však komplikuje jejich detekci. Profilování prostřednictvím desorpce a ionizace laserem za účasti matrice, tzv. MALDI neboli Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, v kombinaci s analyzátozem doby letu, tzv. TOF neboli Time-of-Flight, je založeno na rychlé detekci ionizovaných molekul proteinů vzorku bakteriofága. Tato metoda hmotnostní spektrometrie, tzv. MS neboli Mass Spectrometry, je dnes úspěšně využívána

k rutinní identifikaci bakterií v klinických laboratořích po celém světě. Kromě bakterií lze pomocí MALDI-TOF MS profilovat i jiné typy vzorků, například plísňe nebo viry. V současné době však není tato metoda využívána k rutinní identifikaci bičíkatých fágů.

- 5 Úkolem tohoto technického řešení je proto odstranění výše uvedených nedostatků a vytvoření nového systému pro identifikaci kmenů bakteriofágů, který by byl univerzální pro různé druhy bakteriofágů z různých čeledí a který by byl vhodný pro rutinní purifikaci a identifikaci při průmyslovém zpracování.

10

Podstata technického řešení

Vytčený úkol je vyřešen díky systému pro identifikaci alespoň jednoho kmene bakteriofága podle tohoto technického řešení, jehož podstata spočívá v tom, že sestává ze soupravy pro přípravu
15 vzorku bakteriofága včetně kónické zkumavky s nízkou schopností vázat proteiny umožňující minimalizování ztráty vzorku bakteriofága během manipulace a současně jeho zakoncentrování, z optimalizované matrice pro desorpci a ionizaci laserem MALDI – TOF MS, ze zkumavky pro smíchání vzorku bakteriofága a matrice a z vyhodnocovací jednotky, která má datové úložiště, na kterém je uložen softwarový prostředek pro analýzu dat. Profilování prostřednictvím desorpce
20 a ionizace laserem za účasti matrice nazývaná MALDI neboli Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization v kombinaci s analyzátozem doby letu, tzv. TOF, je založeno na rychlé detekci ionizovaných molekul proteinů ze vzorku bakteriofága. Tato metoda hmotnostní spektrometrie je systémem pro identifikaci alespoň jednoho kmene bakteriofága. Podle tohoto řešení je využita pro rutinní identifikaci bakteriofágů. Jedná se o systém využívající
25 mikrometodu, která vyžaduje pouze malý objem bakteriofágové suspenze, tedy vzorku bakteriofága, což umožňuje i analýzu přímo z terapeutických preparátů. Díky tomu je systém zajímavý zejména pro farmaceutické společnosti zabývající se vývojem bakteriofágové terapie.

Souprava pro přípravu vzorku bakteriofága určeného na identifikaci zahrnuje 3 až 10 ml
30 fágového lyzátu, 10 až 50 µl fágového pufru a kónickou zkumavku pro zakoncentrování bakteriofága. Fágový lyzát je výchozí vzorek a je připravený pomnožením bakteriofága na propagačním bakteriálním kmeni v tekutém živném médiu nebo metodou dvouvrstvého agaru a je následně zbavený bakteriálních buněk centrifugací 30 min při 4 500 g. Může být použit i purifikovaný fágový lyzát ve formě léčivého přípravku. Fágový lyzát s výhodou obsahuje
35 1×10^8 až 1×10^{10} plaky tvořících jednotek neboli PFU/ml bakteriofágů bez bakteriálních buněk. Detekční limit metody je tedy 1×10^7 PFU/ml, ale pro spolehlivou identifikaci je nutný titer bakteriofága 1×10^8 PFU/ml, což odpovídá koncentracím fágů používaným v terapeutických preparátech. Objem kónické mikrozkuavky do centrifugy, resp. fágového lyzátu, je ve výhodném uspořádání 3 ml. Běžně známé postupy pro přípravu vzorku bakteriofága vychází
40 z objemu 250 ml, což není vhodné pro rutinní použití. Malý objem fágového lyzátu, resp. vzorku bakteriofága poskytuje významnou výhodu oproti stávajícímu stavu techniky.

Resuspendování zkoncentrovaného fágového lyzátu probíhá pomocí fágového pufru. Fágový pufr pro bakteriofágy grampozitivních bakterií ve výhodném uspořádání obsahuje 5 mM Tris.HCl,
45 pH 8,0; 10 mM CaCl₂; 10 mM NaCl. Fágový pufr pro bakteriofágy gramnegativních bakterií obsahuje 50 mM Tris.HCl, pH 7,5; 100 mM NaCl; 8 mM MgSO₄. Pro rozpuštění peletu z 3 ml vzorků lyzáatů je nutné přidat 30 µl příslušného fágového pufru a nechat samovolně resuspendovat přes noc při 4 °C. Pro zvýšení citlivosti lze zvolit menší objem, za předpokladu, že dojde k vytvoření suspenze z peletu.

50

Následně probíhá příprava vzorku bakteriofága pro MALDI MS, při které se použije ocelová
vzorkovací deska pro MALDI MS, matrice pro desorpci a ionizaci laserem MALDI – TOF MS neboli matrice pro MALDI MS, která obsahuje 12,5 mg/ml kyseliny ferulové ve směsi
55 vody:acetonitrilu:kyseliny mravenčí v objemovém poměru 50:33:17. Jedná se doposud o nepoužívanou matici v rutinním MALDI MS profilování. Pro hmotnostní kalibraci je použit

lysozym z vaječného bílku - roztok 1 mg/ml ve vodě. Vzorek bakteriofága se následně smíchá s roztokem matrice v objemovém poměru 1:4 a tato směs se nanese v objemu 0,6 µl na pozici vzorkovací desky. Stejným postupem je nutné nanést na vzorkovací desku referenční soubor relevantních bakteriofágů pro vytvoření identifikační databáze. Při každé sérii měření se pak nanáší na vzorkovací desku roztok lysozymu ve směsi s matricí.

Poté probíhá MALDI MS analýza, před kterou je potřeba provést externí kalibraci hmotnostních spekter v lineárním pozitivním módu detekce s použitím lysozymu ionizovaném ve formě monomeru, dimeru a několikanásobně protonovaných iontů. Dochází k zaznamenávání hmotnostních spekter v rozmezí $m/z = 2$ až 100 kDa. Škála detekovatelných hmot (m/z) je v porovnání rutinním postupem MALDI MS profilování pro bakterie významně širší, neboť v případě rutinního postupu jsou u bakterií detekovány signály pouze v rozsahu 2 až 15 kDa.

Vyhodnocení dat probíhá díky vyhodnocovací jednotce, která má datové úložiště, na kterém je uložen softwarový prostředek pro porovnání vzorku bakteriofága s referenčními vzorky. Při vyhodnocování je nutné vytvořit tabulku obsahující hodnoty (m/z) detekovaných iontů a jejich intenzity, porovnat tyto hodnoty s referenčními vzorky relevantními vzhledem k analyzované skupině bakteriofágů a na základě posouzení podobnosti identifikovat daný kmen bakteriofága. Vedle vizuálního posouzení podobnosti jsou k dispozici nástroje pro statistické zpracování dat.

Výhody systému pro identifikaci kmenů bakteriofágů podle tohoto technického řešení spočívají zejména v tom, že je univerzální pro různé druhy bakteriofágů z různých čeledí a je vhodný pro rutinní purifikaci a identifikaci při průmyslovém zpracování.

Objasnění výkresů

Uvedené technické řešení bude blíže objasněno na následujících vyobrazeních, kde:

obr. 1 znázorňuje tabulku se seznamem bakteriofágů a bakteriálních kmenů,

obr. 2 znázorňuje reprezentativní hmotnostní spektrum bakteriofága z rodu *Kayvirus*.

Příklad uskutečnění technického řešení

Bakteriální kmene a bakteriofágy použité v tomto technickém řešení jsou popsány v tabulce na obr. 1. Bakteriofágy byly pomnoženy na uvedených propagačních bakteriálních kmenech. Byly kultivovány při 37 °C v maso-peptonovém bujónu (MPB), který se skládá z 13 g standardního živného bujónu (Nutrient Broth), 3 g kvasničného extraktu (Yeast extract) a 5 g peptonu (Peptone Bacteriological) rozpuštěných v 1000 ml destilované vody (pH 7,4). Aby nedošlo k získání falešně pozitivních MALDI – TOF MS signálů, byly fágy se známou sekvencí genomu pomnoženy na bezprofágových kmenech *Staphylococcus aureus* CCM 4890, RN4220 a CCM 8428. Fágy 29, 42E a 79 byly pomnoženy na dvouvrstevném masopeptonovém agaru s 0,7 % (w/v) agaru ve svrchní vrstvě a 1,5 % (w/v) agaru ve spodní vrstvě. K testování vlivu živného média na kvalitu MALDI – TOF hmotnostních spekter byla využita další dvě média: BHI (Brain Heart Infusion; pH 7,4) a 2YT (2× Yeast-Tryptone broth), které se skládá z 16 g tryptonu, 10 g kvasničného extraktu a 5 g NaCl rozpuštěných v 1000 ml vody (pH 7,4).

Za účelem stanovení titru fágů byla připravena desítková řada ředění fágů v MPB. Do 18 hodinové kultury propagačního kmene *S. aureus* byla přidána 1/10 objemu 0,02M CaCl₂. Suspenze bakterií o objemu 0,1 ml byla přidána do 3 ml 0,7% maso-peptonového agaru (MPA) o teplotě 45 °C, kterým byl následně převrstven 1,5% MPA na Petriho miskách. Misky s agarem byly ponechány v pokojové teplotě po dobu 10 min. Naředěné fágy byly nakapány na svrchní vrstvu agaru a po zaschnutí byly inkubovány v 37 °C přes noc.

Zakoncentrování fágů centrifugací proběhlo tak, že fágový lyzát byl centrifugován 30 min při 4500×g při 4 °C a následně byl přefiltrován přes polyethersulfonové filtry s póry o velikosti 0,45 μm. Takto byly odstraněny zbytky bakterií. Fágy byly peletovány centrifugací při 54 000×g při teplotě 4 °C po dobu 2,5 hodin. Pro přípravu peletů ze 3 ml fágového lyzátu byly použity kónické zkumavky a adaptéry. Pelet byl rozpuštěn přes noc ve 30 μl fágového pufru, který obsahoval 5 mM Tris.HCl pH 8,0, 10 mM CaCl₂, 10 mM NaCl ve 4 °C. Pro rozpuštění peletu z 3 ml vzorků lyzátů bylo použito vždy 30 μl fágového pufru.

Vzorky bakteriofágů byly smíchány s roztokem matrice pro desorpci a ionizaci laserem MALDI – TOF MS v objemovém poměru 1:4. Výsledné směsi byly nanášeny v objemu 0,6 μl na tři pozice ocelové vzorkovací destičky pro MALDI a po zaschnutí při pokojové teplotě byly analyzovány. Jako matrice pro desorpci a ionizaci laserem MALDI – TOF MS byla použita kyselina ferulová (12,5 mg/ml ve směsi vody:acetonitrilu:kyseliny mravenčí v objemovém poměru 50:33:17).

Analýzy byly provedeny na MALDI-TOF hmotnostním spektrometru Ultraflextreme (Bruker Daltonics). Externí kalibrace hmotnostních spekter v lineárně pozitivním módu detekce byla provedena s použitím lysozymu ionizovaném ve formě monomeru, dimeru a několikanásobně protonovaných iontů. Výkon laseru byl nastaven na 120 % prahové hodnoty pro konkrétní typ vzorku. Z každé pozice byla získána tři spektra akumulující 1 000 pulsů laseru. V rámci jednotlivých pozic bylo aplikováno 200 až 400 pulsů laseru do jednoho bodu. Hmotnostní spektra byla zaznamenána v rozmezí $m/z = 2$ až 100 kDa a byla zpracována s použitím vhodného softwarového prostředku, konkrétně programu FlexAnalysis (Bruker Daltonics). Dendrogram založený na MALDI-TOF hmotnostních spektrech byl sestaven s použitím Pearsonova korelačního koeficientu jako měřítka podobnosti a s použitím metody nevážených párových průměrných skupin (UPGMA) jako metody shlukování v softwaru Biotyper 3.1 (Bruker Daltonics). Proteinová spektra fágů se známou sekvencí genomu byla podrobněji analyzována a hodnoty m/z byly porovnány s predikovanými molekulovými hmotnostmi (MW) strukturních proteinů fágů z databáze NCBI Protein nebo z anotací vytvořených programem RAST. Při srovnávání hodnot m/z s MW strukturních proteinů fágů byly tolerovány chyby do 500 ppm. Pomocí programu TermiNator byla identifikována první aminokyselina proteinu. Molekulová hmotnost proteinu byla vypočítána programem ExPASy ProtParam.

Dle uvedeného optimálního postupu přípravy vzorků bylo purifikováno a následně analyzováno 37 bakteriofágů. Hmotnostní spektra bakteriofágů z čeledí *Myoviridae* a *Siphoviridae* obsahovala více píků než u bakteriofágů z čeledi *Podoviridae*. Je to způsobeno vyšším počtem strukturních proteinů, jejichž molekulové hmotnosti jsou detekovatelné pomocí MALDI-TOF MS v daném uspořádání, právě u čeledi *Myoviridae* a *Siphoviridae*. Dendrogram sestavený pomocí shlukové analýzy hmotnostních spekter ukázal výrazně oddělené skupiny fágů. Nejvýraznější skupina odpovídala fágům z rodu *Kayvirus*. Tento výsledek byl potvrzen vizuální kontrolou hmotnostních spekter těchto fágů, které sdílí signály s identickými hodnotami m/z . Tyto charakteristické rysy hmotnostních spekter umožňují jednoznačnou identifikaci kayvirů, jak je znázorněno na obr. 2. Fágy patřící do rodu *Kayvirus* byly opakovaně použity k úspěšné léčbě stafylokokových infekcí u lidí i u zvířat.

Průmyslová využitelnost

Systém pro identifikaci alespoň jednoho kmene bakteriofága podle tohoto technického řešení lze využít zejména ve fágové terapii používané proti rezistentním bakteriím, ale také pro verifikaci složení hotových fágových preparátů v laboratorních podmínkách.

5

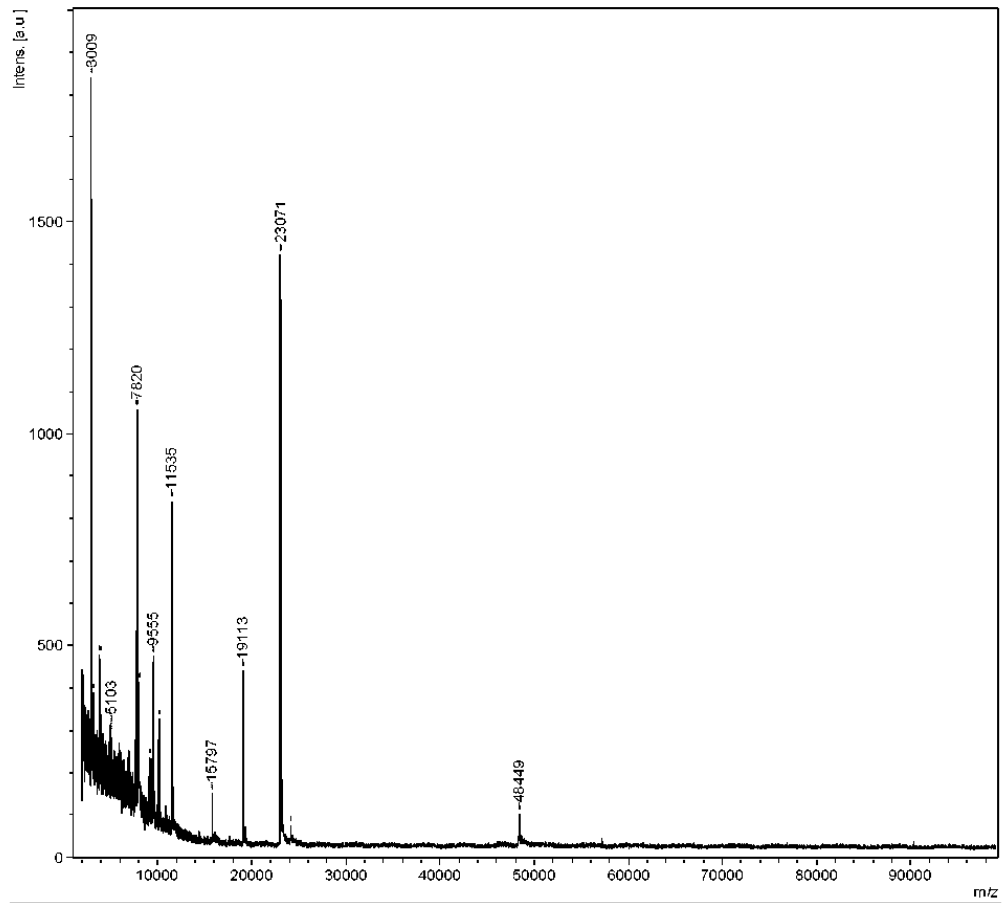
NÁROKY NA OCHRANU

- 10 1. Systém pro identifikaci alespoň jednoho kmene bakteriofága, **vyznačující se tím**, že sestává ze soupravy pro přípravu vzorku bakteriofága z 3 až 10 ml fágového lyzátu a 10 až 50 μ l fágového pufru, z kónické zkumavky pro zakoncentrování bakteriofága, z matrice pro desorpci a ionizaci laserem MALDI – TOF MS, ze zkumavky pro smísení vzorku bakteriofága a matrice, kde poměr vzorku bakteriofága a matrice je 1:4, a z vyhodnocovací jednotky, která má datové
- 15 úložiště, na kterém je uložen softwarový prostředek pro porovnání vzorku bakteriofága s referenčními vzorky.
2. Systém podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že fágový lyzát obsahuje 1×10^8 až 1×10^{10} plaky tvořících jednotek PFU/ml bakteriofágů bez bakteriálních buněk.
- 20 3. Systém podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že fágový lyzát má objem 3 ml.
4. Systém podle některého z nároků 1 až 3, **vyznačující se tím**, že fágový pufr pro bakteriofágy grampozitivních bakterií obsahuje 5 mM Tris.HCl, 10 mM CaCl₂ a 10 mM NaCl
- 25 a má pH 8.
5. Systém podle některého z nároků 1 až 3, **vyznačující se tím**, že fágový pufr pro bakteriofágy gramnegativních bakterií obsahuje 50 mM Tris.HCl, 100 mM NaCl, 8 mM MgSO₄ a má pH 7,5.
- 30 6. Systém podle některého z nároků 1 až 5, **vyznačující se tím**, že matrice pro desorpci a ionizaci laserem obsahuje 12,5 mg/ml kyseliny ferulové ve směsi vody:acetonitrilu:kyseliny mravenčí v objemovém poměru 50:33:17.

2 výkresy

Čeleď	Serologická skupina/rod	Virus	Propagační kmeny (<i>S. aureus</i>)	
<i>Siphoviridae</i>	<i>A/Triavirus</i>	3A	PS 3A, CCM 4890	
		3C	PS 3C	
		6	PS 6	
		42E	PS 42E	
		47	RN4220, PS 47, PS 47 [53*], PS 47 [77*]	
		54	PS 54	
		75	PS 75	
		79	PS 52A	
		81	PS 81	
		94	PS 94	
		<i>B/Phietavirus</i>	11	CCM 4890
			29	RN4220
			52	PS 52
	52A		PS 52A, RN4220	
	53		CCM 4890	
	55		RN4220	
	71		PS 71, CCM 4890	
	80		PS 80	
	80α		RN4220	
	83A		PS 83A	
	<i>L/Phietavirus</i>	85	PS 85, RN4220	
		95	PS 95	
		96	PS 96, RN4220	
B166		CCM 4890		
B236		CCM 4890		
X2		CCM 4890		
187		PS 187		
<i>F/Biseptimavirus</i>	77	PS 77, CCM 4890		
	84	PS 84		
<i>Myoviridae</i>	<i>D/Kayvirus</i>	131	CCM 8428	
		812	CCM 4028	
		K	RN4220	
		K1/420	CCM 8428	
		PYO	CCM 8428	
<i>Podoviridae</i>	<i>D/Twortvirus</i>	Twort	HER 1048	
	<i>G/Rosenblunvirus</i>	44AHJD	RN4220 $\Delta tarM$	
		P68	RN4220 $\Delta tarM$	

Obr. 1



Obr. 2