

## Dwuetapowy proces produkcji bakteriofagów

Przedmiotem wynalazku jest dwuetapowy proces produkcji bakteriofagów. Uzyskane bakteriofagi mogą być zastosowane w zwalczaniu infekcji u ludzi i zwierząt hodowlanych, które są wywołane antybiotykoodpornymi szczepami bakterii.

Bakteriofagi można otrzymać na drodze izolacji z dowolnego źródła środowiskowego, w którym występują. Najbardziej efektywnym źródłem są ścieki, szczególnie te pochodzące ze szpitala, ponieważ występują w nich fagi związane z określonymi szczepami bakterii ważnymi klinicznie występującymi w środowisku szpitalnym. W celu wyodrębnienia bakteriofagów z próbki usuwa się niepożądane mikroorganizmy oraz po tym procesie tak przygotowaną próbkę umieszcza się w organizmie gospodarza (wybrany szczep bakterii).

W praktyce proces produkcji bakteriofagów opiera się na zastosowaniu bioreaktorów wyposażonych w mieszadło mechaniczne. Obecnie stosuje się różnego typu reżimy prowadzenia tego typu procesu lub optymalizację procesową polegającą na doborze (za pomocą metod matematycznych) odpowiedniego zestawu parametrów operacyjnych. Takie podejście umożliwia otrzymanie zadawalających parametrów, które pozytywnie wpływają na kinetykę wzrostu gospodarz-fag. Wcześniejsze badania wykazały, że warunki do optymalnej produkcji bakteriofaga nie są takie same jak warunki optymalnego wzrostu żywiciela. Hadas i in. wykazali, że proces produkcji bakteriofagów wymaga dokładnej równowagi między dynamiką wzrost bakteriofaga i gospodarza [Hadas H., Einav M., Fishov I., Zaritsky A. (1997). *Bacteriophage T4 development depends on the physiology of its host Escherichia coli. Microbiology, 143:179-185. DOI: 10.1099/00221287-143-1-179*]. Należy zauważyć, że na dynamikę populacji wpływa wiele czynników, m.in. np.: tempo wzrostu żywiciela, aktywność metaboliczna, temperatura, pH, skład pożywki, szybkość napowietrzania, mieszanie, obecność jonów lub kofaktorów. Należy również zauważyć, że stosowane bioreaktory odgrywają ważną rolę w procesie produkcji bakteriofagów. Bioreaktor do produkcji bakteriofagów pracujący w reżimie okresowym pozwala na uzyskanie wysokich mian bakteriofagów oraz pozwala na prostą obsługę i kontrolę procesu produkcyjnego. Wadami tego typu procesu są: dość długi czas przestoju potrzebny na przygotowanie urządzenia, konieczność przeprowadzenia procesu sterylizacji i czyszczenia bioreaktora.

Alternatywą do wyżej opisanego procesu jest produkcja bakteriofagów w układach pracujących w reżimie ciągłym. Proces ten pozwala na uzyskanie zadawalającej masy bakteriofagów, ale wiąże się również z obecnością zbyt dużej liczby mutantów oraz usuwaniem z objętości reakcyjnej komórek gospodarzy (bakterii) bez infekcji. Usunięcie tych niedogodności jest możliwe prowadząc proces produkcji bakteriofagów z zastosowaniem metody dwuetapowej lub wieloetapowej. Głównym celem tej metody jest oddzielenie wzrostu gospodarza (bakterii) od produkcji bakteriofagów, tzn. w etapie pierwszym prowadzony jest proces produkcji bakterii bez obecności bakteriofaga. Po osiągnięciu zadawalającej ilości biomasy bakterie przenoszone są do drugiego bioreaktora w celu przeprowadzenia drugiego etapu procesu, czyli infekcji komórek gospodarzy bakteriofagiem. Należy podkreślić, że proces ten powinien być prowadzony w sposób ciągły, czyli biomasa bakterii do drugiego bioreaktora powinna być podawana z szybkością proporcjonalną do częstości infekcji (warunek konieczny do utrzymania warunków ustalonych infekcji). Wadą tego procesu jest konieczność podawania dodatkowych składników odżywczych podczas dwóch etapów prowadzonego procesu oraz możliwość wystąpienia problemów ze wzrostem biomasy komórek gospodarza przy zmiennych warunkach prowadzonych dwóch etapów procesu. Korzyścią wynikającą z tego typu prowadzenia procesu jest otrzymanie wyższych mian bakteriofagów oraz zmniejszenie prawdopodobieństwa występowania mutantów.

Oh i in. wykazali, że proces produkcji bakteriofagów prowadzonych w formie dwuetapowej z hodowlą ciągłą pozwolił uzyskać wysoką efektywność [Oh, J.S., Cho, D., Park, T.H. (2005) *Two-stage continuous operation of recombinant Escherichia coli using the bacteriophage  $\lambda$  Q- vector*. *Bioprocess Biosyst Eng* 28:1-7. DOI: 10.1007/s00449-005-0418-0]. Dwuetapowy proces produkcji bakteriofagów został również przetestowany przez Sauvageau i Coopera [Sauvageau D., Cooper D.G. (2010) *Two-stage, self-cycling process for the production of bacteriophages*. *Microb Cell Fact* 9:81-91. DOI: 10.1186/1475-2859-9-81]. Badanie to koncentrowało się na opracowaniu dwuetapowego procesu półciągłego produkcji bakteriofagów (w etapie pierwszym prowadzono proces fermentacji – hodowlę komórek gospodarza; w etapie drugim – wprowadzenie do biomasy bakterii bakteriofaga). Podgórnik i in. opracowali model matematyczny opisujący proces produkcji bakteriofaga w jednoetapowym procesie prowadzonym w reżimie ciągłym [Podgornik, A., Janež, N., Smrekar, F., Peterka, M.

(2014) *Continuous production of bacteriophages in: Continuous Processing in Pharmaceutical Manufacturing, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. DOI:10.1002/9783527673681.ch12*]. Proces dwuetapowy prowadzony w reżymie ciągłym był modelowany przez Krysiak-Baltyn i in. [Krysiak-Baltyn K., Martin G.J.O., Gras S.L. (2018) *Computational modelling of large scale phage production using a two-stage batch process. Pharmaceuticals, 11:E31, DOI: 10.3390/ph11020031*] oraz Park i Park (2000) [Park S.H., Park T.H (2000) *Analysis of two-stage continuous operation of Escherichia coli containing bacteriophage  $\lambda$  vector. Bioprocess Eng, 23:557-563. DOI: 10.1007/s004499900194*].

Proces produkcji bakteriofagów opisany jest w zgłoszeniach patentowych. W opisie patentowym US 8252519 przedstawiono proces produkcji bakteriofagów prowadzony w reżymie ciągłym. Według wynalazku, bakterie gospodarza oraz bakteriofagi wprowadzone są z przepływającym strumieniem do bioreaktora lub systemu połączonych kaskadowo bioreaktorów. W patencie US 20120040329 również przedstawiono proces produkcji bakteriofagów w reżymie ciągłym. W reaktorze łączone są dwa, zawierające bakterie oraz fagi, strumienie przez co zwiększa się liczba fagów i ich stężenie w roztworze. Zastosowane rozwiązanie pozwala na kontrolowanie końcowego stężenia bakteriofagów poprzez sterowanie szybkością przepływu, czasem przebywania oraz początkowym stężeniem bakterii. W opisie patentowym US20140220660 podano sposób produkcji bakteriofagów, który opiera na zastosowaniu fermentora okresowego oraz pożywki o odpowiednio dobranym składzie. W patencie EP1726642 przedstawiono opis procesu fermentacji bakteriofagów prowadzony w skali laboratoryjnej oraz sposób przeniesienia tego procesu na dużą skalę (powyżej 50 dm<sup>3</sup>). Zgodnie z patentem PL 212286 prowadzi się hodowlę szczepu gospodarza bakteryjnego w odpowiedniej dla niego pożywce, hodowlę zaszczepia się bakteriofagami i uzyskuje się lizat bakteriofagowy. Następnie prowadzi się oczyszczanie lizatu bakteriofagowego techniką chromatografii powinowactwa oraz z uzyskanego przesączu przygotowuje się oczyszczony preparat bakteriofagowy. Zgodnie z PL 217019 uzyskuje się kolekcję szczepów bakteriofagowych zawierającą szczep bakteriofaga specyficzny wobec wybranego szczepu bakterii, prowadzi się hodowlę wybranego szczepu bakterii na jałowym medium hodowlanym, próbki hodowli nanosi się na specjalną wielodołkową płytkę pomiarową, dodaje się zawiesiny badanego

szczepu bakteriofaga w różnych stężeniach i inkubuje się w temperaturze około 37°C przez co najmniej 4 godziny. Następnie do próbek hodowli dodaje się resazuryny i kontynuuje się inkubację bez dostępu światła w temperaturze około 37°C przez co najmniej 3 godziny, kontroluje się barwę lub fluorescencję hodowli i szczep bakteriofagowy zawarty w hodowli która zachowała barwę niebieską lub nie wykazała istotnego wzrostu fluorescencji w porównaniu z próbą kontrolną identyfikuje się jako szczep bakteriofaga specyficzny wobec wybranego szczepu bakterii, przy czym jako próbę kontrolną stosuje się jałową próbę poddaną takiej samej inkubacji. Zgodnie z PL 237975 dwuetapowy proces produkcji bakteriofagów, polegają na tym, że w pierwszym etapie przygotowuje się hodowlę bakterii *Escherichia coli* w temperaturze 37°C na podłożu LB suplementowanym 10 mM CaCl<sub>2</sub> oraz 10 mM MgSO<sub>4</sub>, do czasu osiągnięcia ogólnej liczby bakterii  $1 \times 10^8$ , a w drugim etapie dodaje się roztwór bakteriofagów o stężeniu niezbędnym do uzyskania wartości końcowej wielokrotności infekcji 0,001, charakteryzuje się tym, że po pierwszym etapie hodowlę poddaje się oddziaływaniu zmiennego pola magnetycznego o częstotliwości prądu zasilającego uzwojenie 50 Hz przez czas równy połowie czasu podziału komórek bakterii, a po drugim etapie hodowlę poddaje się oddziaływaniu zmiennego pola magnetycznego o częstotliwości prądu zasilającego uzwojenie 50 Hz przez 1 godzinę, po czym hodowlę prowadzi się do uzyskania całkowitej lizy komórek bakterii.

Podsumowując, proces namnażania bakteriofagów prowadzi się zazwyczaj w bioreaktorach, czyli w urządzeniach umożliwiających efektywne prowadzenie procesów mikrobiologicznych i w warunkach maksymalnego ograniczenia możliwości zakażeń. Bioreaktory można z powodzeniem stosować przy produkcji bakteriofagów w procesach jedno- lub dwuetapowych. Szczególnie proces dwuetapowy pozwala na uzyskania zadawalającej ilości biomasy przy uniknięciu wad procesu prowadzonego jednoetapowo. Pomimo kilku metod produkcji bakteriofagów istnieje konieczność poszukiwania nowych sposobów namnażania bakteriofagów, które są podstawą do wytwarzania tzw. „koktajli bakteriofagowych” lub „preparatów fagowych”. Preparaty tego typu z powodzeniem są stosowane w zwalczaniu antybiotykoopornych zakażeń bakteryjnych oraz stanowią alternatywę dla antybiotyków.

Problemem technicznym do rozwiązania jest opracowanie nowej metody namnażania bakteriofagów, poprzez odpowiednie dobranie warunków prowadzenia

procesu, co pozwoli na uzyskanie większej ilości biomasy bakteriofagów w jak najkrótszym czasie.

Dwuetapowy proces produkcji bakteriofagów według wynalazku, polegający na tym, że w pierwszym etapie przygotowuje się hodowlę bakterii *Escherichia coli* w temperaturze 37°C na podłożu LB suplementowanym 10mM CaCl<sub>2</sub> oraz 10mM MgSO<sub>4</sub>, do czasu osiągnięcia ogólnej liczby bakterii ok.  $1 \times 10^8$ , a w drugim etapie po czasie 3 godzin od rozpoczęcia hodowli dodaje się roztwór bakteriofagów o stężeniu niezbędnym do uzyskania wartości końcowej wielokrotności infekcji 0,001, charakteryzuje się tym, że w pierwszym i drugim etapie hodowlę prowadzi się w bioreaktorze z zastosowaniem mieszania z częstością obrotów 300 obrotów/minutę przez okres co najmniej 5 godzin, przy czym hodowlę prowadzi się do uzyskania całkowitej lizy komórek bakterii.

Korzystnie w pierwszym lub drugim etapie hodowle w bioreaktorze wspomaga się, poprzez zastosowanie pola elektromagnetycznego.

Zaletą zastosowania samego mieszania bez obecności pola elektromagnetycznego jest wyrównanie stężeń i temperatury w mieszanym płynie (mediom hodowlanym), co może przełożyć się na zwiększenie efektywności procesu produkcji z udziałem mikroorganizmów. Zastosowanie jednoczesnego mieszania i pola elektromagnetycznego w pierwszym etapie procesu produkcji bakteriofagów pozwala na intensyfikację przyrostu biomasy oraz na wzrost aktywności metabolicznej materii ożywionej. Natomiast zastosowanie jednoczesnego mieszania i pola elektromagnetycznego w drugim etapie procesu produkcji bakteriofagów wpływa na proliferację i aktywność metaboliczną komórek bakterii, co indukuje proces produkcji bakteriofagów.

Proces produkcji bakteriofagów, według wynalazku przedstawiony jest w przykładach wykonania i na rysunkach, na których fig. 1 przedstawia zależność gęstości optycznej (OD<sub>850</sub>) od czasu trwania procesu i częstości obrotów stosowanych w bioreaktorze dla temperatury prowadzenia procesu 35°C (etap pierwszy procesu wzrost komórek gospodarza *E. coli*); fig. 2 przedstawia zależność gęstości optycznej (OD<sub>850</sub>) od czasu trwania procesu i częstości obrotów stosowanych w bioreaktorze dla temperatury prowadzenia procesu 37°C (etap pierwszy procesu wzrost komórek gospodarza *E. coli*); fig. 3 przedstawia zależność gęstości optycznej (OD<sub>850</sub>) od czasu trwania procesu i częstości obrotów stosowanych w bioreaktorze dla temperatury prowadzenia procesu

39°C (etap pierwszy procesu wzrost komórek gospodarza *E. coli*); Fig. 4 przedstawia zależność gęstości optycznej ( $OD_{850}$ ) od czasu trwania procesu dla optymalnych warunków wzrostu komórek gospodarza ( $T = 37^{\circ}\text{C}$  i  $n = 300$  obr./min), dla próbek z dodatkiem roztworu bakteriofagów i próbki kontrolnej (bez dodania bakteriofagów); fig. 5 przedstawia zmianę liczby wirionów w czasie dla optymalnych warunków wzrostu komórek gospodarza ( $T = 37^{\circ}\text{C}$  i  $n = 300$  obr./min; wyniki przeprowadzonego oznaczenia dla wybranych punktów czasowych prowadzonego procesu produkcji bakteriofagów). W przykładzie 1 przedstawiono wyznaczenie optymalnych warunków do hodowli bakterii.

#### Przykład 1

W celu wyznaczenie optymalnych warunków do hodowli bakterii (komórek gospodarza) zbadano kinetykę wzrostu wybranego szczepu bakterii *Escherichia coli* C 600. W celu zapewnienia odpowiedniego środowiska życia i rozwoju dla szczepu bakterii *E. coli* przygotowano pożywkę, w której następnie prowadzono hodowle wykorzystywane do badań kinetyki wzrostu tej bakterii. Wykorzystano płynną pożywkę jaką jest bulion „LB” firmy „Biomaxima” składającą się z pankreatynowego hydrolizatu kazeiny (Trypton), ekstraktu drożdżowego oraz chlorku sodu. W celu odpowiedniego przygotowania podłoża pobrano 6 g pożywki i rozcieńczono z 300 ml wody destylowanej (stosunek 1:50), następnie intensywnie mieszano i poddano sterylizacji w autoklawie w temperaturze 126 °C przez 15 minut. Po przyrządzeniu pożywki dla bakterii *E. coli*, sprawdzono jej gęstość optyczną, która wynosiła około 0,045. Następnie przygotowano hodowlę całonocną poprzez dodanie jednej kolonii tej bakterii do pożywki i inkubowano ją w 37 °C. Następnego dnia sprawdzano zawartość wcześniej przygotowanej hodowli przy użyciu pomiarów gęstości optycznej, która zazwyczaj wyniosła około 0,175. Po weryfikacji czy bakterie nie zostały zakażone i nie obumarły, przygotowywano eksperyment za pomocą rozcieńczenia wystandaryzowanej hodowli całonocnej w stosunku 1:100 w pożywce LB, tak aby gęstość optyczna przygotowanej próbki wynosiła około 0,1. Po spełnieniu wszystkich wyżej wymienionych warunków otrzymaną próbkę przenoszono do bioreaktora i prowadzono proces wzrostu komórek gospodarzy (etap pierwszy procesu produkcji bakteriofagów).

### Przykład 2

Proces produkcji bakteriofagów prowadzony jest dwuetapowo, zarówno w pierwszym jak i drugim etapie hodowlę prowadzi się w bioreaktorze z częstotnością obrotów 300 obr./min.

W pierwszym etapie prowadzona jest hodowla bakterii *Escherichia coli* w temperaturze 37°C i dla częstotności obrotów bioreaktora 300 obr./min na podłożu LB suplementowanym 10mM CaCl<sub>2</sub> oraz 10mM MgSO<sub>4</sub>, do czasu osiągnięcia ogólnej liczby bakterii ok.  $1 \times 10^8$ . Uzyskane warunki prowadzenia procesu wzrostu komórek gospodarza (pierwszy etap prowadzenia procesu produkcji bakteriofagów) są optymalne, czyli krzywa wzrostu charakteryzuje się największą wartością maksymalnego współczynnika szybkości wzrostu. Po rozpoczęciu procesu monitorowano gęstość optyczną w hodowli i po trzech godzinach, gdzie gęstość ta wynosiła 0,25 zatrzymano proces mieszania w bioreaktorze i do hodowli badanej dodano lizat. Po zaszczerpieniu bakteriofagów wznowiono proces mieszania, który prowadzony jest przez 21 godzin, co ma umożliwić uzyskanie całkowitej lizy. Po 4, 5, 6, 7, 8 i 24 godzinie prowadzenia procesu określana jest ilość bakteriofagów z wykorzystaniem techniki miareczkowania „podwójną warstwą” określając ilość nowopowstałych wirionów. Zaobserwowano, że prowadzona w ten sposób hodowla bakteriofagów pozwala na uzyskanie po 8 godzinach liczby wirionów równej  $10^9$  PFU/mL.

### Przykład 3

Analogicznie jak w przykładzie drugim, przy czym w pierwszym etapie proces hodowli bakterii *E. coli* wspomagany jest zastosowaniem w bioreaktorze pola elektromagnetycznego. Obecność tego oddziaływania w pierwszym etapie procesu produkcji bakteriofagów pozwala na intensyfikację przyrostu biomasy oraz na wzrost aktywności metabolicznej materii żywej.

### Przykład 4

Analogicznie jak w przykładzie drugim, przy czym w etapie drugim proces produkcji bakteriofagów wspomagany jest zastosowaniem w bioreaktorze pola elektromagnetycznego. Tego typu oddziaływanie wpływa na proliferację i aktywność metaboliczną komórek bakterii, co indukuje proces produkcji bakteriofagów.