



FUNKČNÍ VZOREK

**Karboxymethylcelulózový hydrogel obohacený o enzym
lysostafin vykazující antimikrobiální aktivitu vůči
meticilin-resistentní bakterii *Staphylococcus aureus***

**Mgr. Šárka Kobzová
Ing. Katarína Kacvinská
Mgr. Lukáš Vacek
MUDr. Filip Raška
Mgr. Adam Norek Ph.D.
Doc. Ing. Lucy Vojtová, Ph.D.
Doc. MUDr. Břetislav Lipový Ph.D.
RNDr. Lubomír Janda, Ph.D.**

**5076
2022**

Funkční vzorek 5076/2022

**Karboxymethylcelulózový hydrogel obohacený o enzym
lysostafin vykazující antimikrobiální aktivitu vůči meticilin-
resistentní bakterii *Staphylococcus aureus***

Autoři:

**Mgr. Šárka Kobzová¹
Ing. Katarína Kacvinská²
Mgr. Lukáš Vacek^{1,3}
MUDr. Filip Raška⁴
Mgr. Adam Norek Ph.D.¹
Doc. Ing. Lucy Vojtová, Ph.D.²
Doc. MUDr. Břetislav Lipový Ph.D.^{2,4}
RNDr. Lubomír Janda, Ph.D.¹**

¹ Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Brno

² Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně, Brno

³ Mikrobiologické oddělení Fakultní nemocnice u sv. Anny Brno a LF MU

⁴ Klinika popálenin a plastické chirurgie FN Brno a LF MU

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu: Studium terapeutické aplikace antibakteriálního krytí rány pro infekce kůže a měkkých tkání u epidemiologicky relevantních kmenů *S. aureus* - rezistentních na meticilin (NV19-05-00214).

ISBN 978-80-7672-030-5

2022

Obsah

1. Úvod	3
2. Cíl	4
3. Příprava rekombinantního lysostafinu	4
3.1 Kultivační média	4
3.2 Pufry	4
3.3 Příprava bakteriálních konzerv	5
3.4 Expres v LB médiu	5
3.5 Desintegrace bakterií	5
3.6 Purifikace	6
3.7 Dialýza	6
3.8 Lyofilizace	6
3.9 SDS-PAGE elektroforéza	6
4. Příprava CMC gelu s lysostafinem	7
5. Ověření antimikrobiální aktivity	7
6. Srovnání novosti postupů	7
7. Uplatnění funkčního vzorku	8
8. Ekonomické aspekty	8
9. Seznam použité literatury	8
10. Dedikace	9

1. Úvod

Vzhledem k narůstající rezistenci bakterií vůči antibiotikům je potřeba hledat nové možnosti v léčbě bakteriálních infekcí. Jednou z možností je využití enzybiotik, tedy enzymů s antimikrobiální aktivitou. Mezi tyto enzymy řadíme také enzym lysostafin. Lysostafin (EC 3.4.24.75) je monomerní enzym patřící do skupiny peptidů a proteinů známých jako bakteriociny. Jedná se o extracelulární enzym produkovaný bakterií *Staphylococcus simulans*. Lysostafin hydrolyticky štěpí peptidovou vazbu mezi 3. a 4. glycinovým zbytkem pentaglycinového linkru peptidoglykanu v buněčných stěnách bakterií *Staphylococcus aureus*. Struktura aktivní formy lysostaphinu je tvořena katalytickou doménou a vazebnou doménou, která interaguje s peptidoglykanem buněčných stěn. Obě domény jsou spojeny linkerem, což je řetězec asi 15 aminokyselin[1].

Současný výzkum se zaměřuje na vývoj nových forem kombinujících antimikrobiální látky včetně enzybiotik s vhodným nosičem umožňujícím aplikaci v místě postižení. Tyto systémy s řízeným uvolňováním mohou být zvláště zajímavé pro budoucí vývoj, protože umožňují dodávání neporušených enzybiotik na místo infekce v závislosti na parametrech vyvolávajících zánět [7]. Nabízí se možnosti jako enkapsulace do lipozoómů, využití sférických nanočástic a nanoemulzí, přidávání enzybiotik do adheziv, vlákenných systémů (nano-mikro) a v neposlední řadě zabudování do hydrogelů (ve vysušené formě xerogelů, lyofilizovaných aerogelů nebo filmů) [8]. Hydrogelové obvazové materiály na bázi chitosanu a kolagenu s imobilizovaným lysostafinem vyvinuli Cui a kol. [9]. Vyrobený materiál vykazoval výhodné fyzikálně-chemické parametry, antistafylokokovou aktivitu a byl úspěšně použit při léčení ran u králíků. Důležité je, že hydrogely dodávající enzybiotikum lysostafin jsou účinné proti bakteriím rezistentním na antibiotika. Ve srovnání se systémovým dodáním, místně cílené dodání antimikrobiálních léčiv umožňuje dosáhnout vyšších koncentrací léčiva v místě infekce po delší časové období s nižším rizikem toxicity. Způsob aplikace pomocí dodávání enzybiotik ve formě hydrogelů by mohl být vysoce účinný při léčbě a prevenci bakteriálních infekcí.

Jednou z možností aplikace lysostafinu je jeho inkorporace do karboxymethylcelulóзовého gelu. Karboxymethylcelulóza (CMC) známá také jako karmelóza se vyrábí chemickou modifikací celulózy, kdy v chemické struktuře CMC dominují karboxymethylové skupiny ($-\text{CH}_2-\text{COOH}$). Jedná se o biopolymer rostlinného původu s velmi dobrou vazebnou schopností k široké škále biologických povrchů, jako jsou sliznice, kůže nebo kosti [10]. Hydrogely na bázi CMC se připravují technikami chemického nebo fyzikálního zesíťování.

V případě funkčního vzorku je hydrogel vytvořen fyzikálním síťováním ze sodné soli karboxymethylcelulózy (NaCMC), která se používá pro své vazební, stabilizační, zahušťovací a botnající vlastnosti v široké škále produktů pro farmaceutické, kosmetické či potravinářské aplikace. Její použití je enormní v aplikacích tkáňového inženýrství a jako nosiče léčiv. Díky své vysoce hygroskopické povaze se CMC rychle hydratuje [11]. Aplikační laboratorní teplota pak umožňuje použití vysoce viskózního gelu a jednoduchou aplikaci na ránu. Hydrogel na bázi CMC je levný, netoxický, bioresorbovatelný a obnovitelný materiál.

CMC samotná nemá dostatečné antimikrobiální vlastnosti, nicméně pro posílení tohoto účinku se přidává mnoho dalších složek. Antimikrobiální peptidy nebo enzymy (jako např. lysostafin) jsou perspektivní skupinou komponent, které umožňují použití CMC i v případě prevence či terapie infekčních komplikací u akutních či chronických ran.

2. Cíl

Cílem bylo vytvořit antimikrobiální karboxymethylcelulóзовý hydrogel modifikovaný lysostafinem s baktericidní aktivitou vůči *S. aureus* v takové formě, aby byl injekčně aplikovatelný na rány pacientů (Obr. 1).



Obr. 1: Připravený CMC hydrogel aplikovaný na hřbet ruky (vlevo) a na infekční ránu animálního modelu prasete (vpravo).

3. Příprava rekombinantního lysostafinu

3.1 Kultivační média

LB médium [g/L]

Objem	1000 ml	500 ml	100 ml
Tryptone	10	5	1
Yeast extract	5	2,5	0,5
NaCl	10	5	1
Glucose	1	0,5	0,1

Ztužené LB médium [g/L]

Objem	1000 ml	500 ml	100 ml
Tryptone	10	5	1
Yeast extract	5	2,5	0,5
NaCl	10	5	1
Agar	30	15	3
Glucose	1	0,5	0,1

3.2 Pufry

Desintegrační pufr pH 7,5

	[Da]	[mM]	[g/L]
Tris HCl	121,14	100	12,1
NaCl	58,44	300	17,53
Triton-X-100			1
Imidazol	68,07	10 mM	0,68
β-merkapt ethanol			0,1

Nanášecí pufr pH 7,5

[Da]	[mM]	[g/L]
------	------	-------

Tris HCl	121,14	100	12,1
NaCl	58,44	500	29,22
Imidazol	68,07	10 mM	0,68
β-merkapt ethanol			0,1

Eluční pufr pH 7,5

	[Da]	[mM]	[g/L]
Tris HCl	121,14	100	12,1
NaCl	58,44	500	29,22
Imidazol	68,07	300	20,42
β-merkapt ethanol			0,1

Lyofilizační pufr pH 5,5

	[Da]	[mM]	[g/L]
Octan amonný	77,08	100	7,7
Kyselina octová			1,03 ml

3.3 Příprava bakteriálních konzerv

Bakteriální konzervy jsou suspenze expresních buněk s vloženým plasmidem pUbEx100 nesoucím gen kódující lysostafin. 10 ml LB média s přídavkem kanamycinu (10 µl) se inokulje čerstvě narostlými koloniemi na ztuženém LB médiu (cca 10 kolonií). Následuje kultivace přes noc při 37 °C. 1 ml buněčné suspenze je použit pro inokulaci 100 ml LB média s kanamycinem (50 µg/ml), který je kultivován do OD₆₀₀ = 1. Kultura je zchlazena na ledu a sterilně centrifugována (6000 g/15 min./4 °C). Následně je supernatant slit a pelet rozpuštěn v 10 ml sterilního 10% glycerolu. Suspenze je rozdělena po 1 ml do zkumavek a šokově zamražena v tekutém dusíku. Poté ihned přenesena do -80°C.

3.4 Expres v LB médiu

Kultivace buněk probíhá v Erlenmayerových baňkách. Podle objemu kultivačního média je zvolen objem bakteriálních konzerv, 1 ml bakteriálních konzerv na 1L LB média. Dále je médium obohaceno o sterilní glukózu (10 g/l) a kanamycin (50 µg/ml). Buňky jsou ponechány na třepačce (200 ot./min.) při 37 °C do dosažení optické hustoty (OD = 0,6 – 0,8). Po dosažení optické hustoty je přídavkem IPTG (0,4 mM) indukována tvorba proteinu. Kultura je ponechána 16-18 hod při 22 °C (200 ot./min.). Další den jsou buňky stočeny (4000 ot./min. 10 min, 4 °C), a následuje desintegrace buněk a purifikační proces.

3.5 Desintegrace bakterií

Čerstvý nebo zamražený pelet je na ledu šetrně rozpuštěn v dezintegračním pufru pipetováním (na 10 g bakteriálního peletu 50 ml dezintegračního pufru). K rozpuštěnému peletu je přidáno 5% objemu sonikačních silika-zirkonových kuliček o průměru 0,1 mm. Roztok je umístěn na mokrý led a je do něj zanořena sonikační sonda. Poté byl spuštěn program s celkovým sonikačním časem 15 min při amplitudě 30, pulsu 2 sekundy, pauze 3 sekundy. Po skončení programu je suspenze promíchána pipetováním a nechána 5 minut na ledu. Postup je opakován celkem 4 krát. Sonikovaná suspenze se naje do kyvet a centrifuguje při 15000 g po dobu 1 hodiny. Supernatant je slit a filtrován přes 0,22 µm filtr.

3.6 Purifikace

K purifikaci je využit přístroj pro proteinovou kapalinovou chromatografii (AZURA® BIO PURIFICATION). K purifikaci se využívá 5 ml Ni-NTA kolony (GE Health Care) pro zachycení proteinů s histidinovou kotvou. Všechny použité roztoky jsou filtrovány přes 0,22 µm filtr, odvzdušněny a schlazeny na 4 °C.

Kolona je nejprve promyta 25 ml sterilní vody a následně ekvilibrována 25 ml ekvilibračního pufru (průtok 5 ml/min), dále je nanesen vzorek (průtok 3 ml/min). Poté je kolona promyta ekvilibračním pufrem dokud absorbance neklesla na úroveň pozadí. Následně je kolona proplachována 25 ml směsí pufru o finální koncentraci imidazolu cca 40 mM, tzv. WASH (10 % elučního pufru, 90 % ekvilibračního pufru). Cílový protein je uvolněn elučním pufrem. Po ukončení purifikace je vzorek ihned dialyzován.

3.7 Dialýza

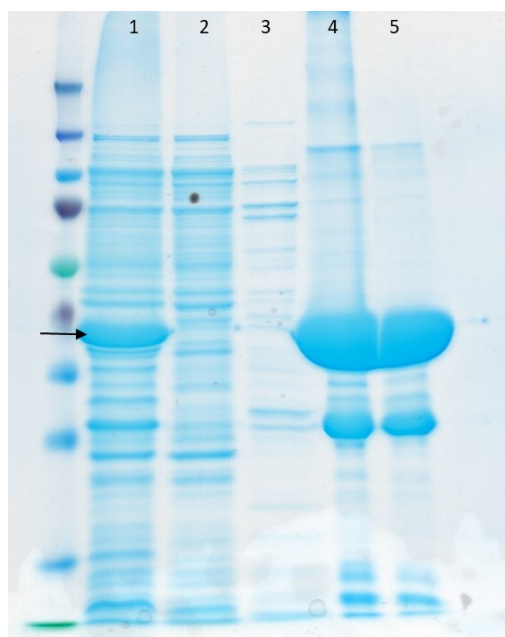
Výměna pufru probíhá s využitím přístroje pro proteinovou kapalinovou chromatografii AZURA® BIO PURIFICATION na koloně HiPrep 26/10 Desalting GE Health Care. Kolona je nejprve promyta 50 ml (průtok 5 ml/min), ddH₂O, poté ekvilibrována 100 ml lyofilizačního pufru, následně je nanesen vzorek a opět je kolona promývána pufrem. Frakce s cílovým proteinem jsou sbírány. U získaných frakcí proteinu je stanovena koncentrace proteinů a zkontrolována čistota pomocí SDS-PAGE elektroforézy.

3.8 Lyofilizace

Frakce obsahující lysostaphin jsou zamrazeny v kapalném dusíku. Otevřené zkumavky obsahující lysostaphin jsou překryty perforovaným parafilmem a zamrazeny v kapalném dusíku. Poté jsou umístěny do laboratorního lyofilizátoru a lyofilizovány. Lyofilizované proteiny jsou být uchovávány při -20 °C.

3.9 SDS-PAGE elektroforéza

Postupně odebrané frakce nanášeny na SDS-PAGE (12,5 % akrylamidový gel – Obr. 2).



Obr. 2: Gel znázorňuje průběh purifikace.

- 1 – celkový obsah proteinů před přechištěním;
- 2 – kolonou nezachycená frakce;
- 3 – 10% WASH;
- 4 – purifikovaný lysostafin po afinitní chromatografii;
- 5 – lysostafin po odsolení v octanu amonném

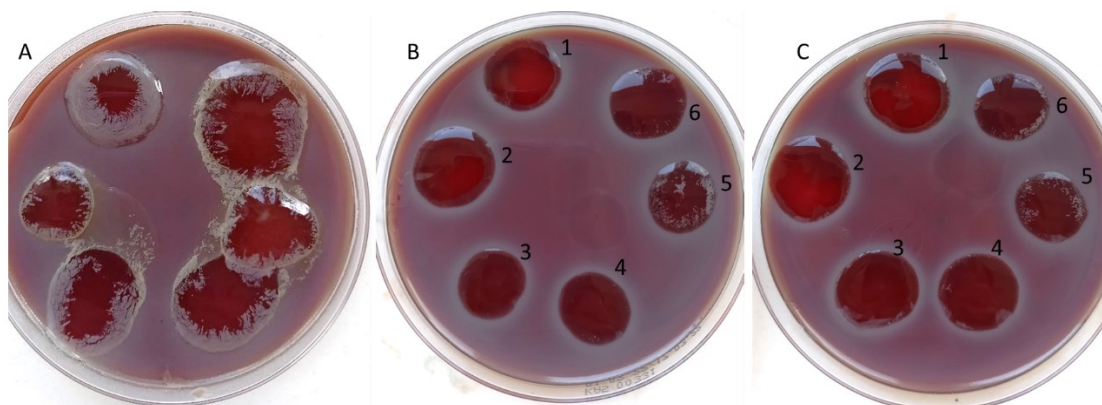
4. Příprava CMC hydrogelu s lysostafinem

Vypočtené množství (6 - 8 %) práškové sodné soli karboxymethylcelulózy (Holzbecher, Zlích, Česká republika) – o průměrné molekulové hmotnosti $MW = 250\,000\text{ g/mol}$ – je naváženo do 500 ml baňky a doplněno ultračistou MILIQ vodou. Baňka je umístěna pod refluxní zařízení, roztok je mírně míchán a zahříván, dokud se karboxymethylcelulóza nerozpustí. Rozpuštěná celulóza je nalita do sterilní nádoby a před použitím uložena v chladničce. Na 100 ml gelu je potřeba 8 g CMC, což odpovídá při 2,5 ml gelu potřebu 0,2 g CMC rozpuštěnou ve sterilní vodě.

Do hotového gelu je zamíchán lysostafin 5 mg do objemu 2,5 ml gelu. Výsledná koncentrace lysostafinu v gelu je 2 mg/ml. Gel je aplikován do injekční stříkačky (obr. 1) Na jednu ránu o velikosti 5x5 cm je nanášeno 2,5 ml antistafylokokového gelu.

5. Ověření antimikrobiální aktivity

Testování probíhalo na miskách s krevním agarem. Nejprve byla zamražená bakteriální suspenze *S. aureus* (sekvenční typ 22, původ - Národní referenční laboratoř pro antibiotika) rozetřena křížovým roztěrem na misku s krevním agarem, inkubována přes noc při 37 °C. Další den byly bakteriální kolonie setřeny sterilní kličkou a rozmíchány v roztoku PBS, tak aby optická denzita dosáhla 0,5 McFarland (cca $1,5 \cdot 10^8$ buněk). Poté byla kultura nalita na misku s agarem a následně pipetou odsáta. Na přichystané agarové plotny s inokulem byly nanášeny vzorky gelů s lysostafinem. Připravené misky byly inkubovány v termostatu při teplotě 37 °C přes noc. Následující den byl pozorován vznik inhibičních zón (Obr. 3).



Obr. 3: Výsledek miskového lysačního testu. A – CMC gel bez lysostafinu; B – CMC gel s lysostafinem; C – CMC gel s lysostafinem skladovaný 10 dnů v lednici, Koncentrace lysostafinu: 1 - 300 $\mu\text{g/ml}$; 2 – 150 $\mu\text{g/ml}$; 3 – 75 $\mu\text{g/ml}$; 4 – 37,5 $\mu\text{g/ml}$; 5 – 18,8 $\mu\text{g/ml}$; 6 – 9,4 $\mu\text{g/ml}$.

Při aplikaci samotného gelu nedocházelo ke vzniku čistých zón (obr. 2A) – gel byl přerůstán bakteriemi. Při aplikaci gelu společně s lysostafinem došlo k tvorbě čistých zón při koncentraci 37,5 $\mu\text{g/ml}$ a vyšší. Ukázalo se, že enzymy skladovaný v gelu po dobu 10 dní je stále aktivní.

6. Srovnání novosti postupů

Enzym lysostafin je komerčně dostupný a také je předmětem mnoha studií, ale v kombinaci s karboxymethylcelulóзовým gelem se jedná o unikátní výrobek. Není nám známo, že by

podobný výrobek byl na trhu dostupný. Lysostafin si v CMC gelu zachovává svou antimikrobiální aktivitu a gel umožňuje snadnou aplikaci enzymu.

7. Uplatnění funkčního vzorku

In vitro testy prokázaly antimikrobiální vlastnosti gelu s lysostafinem vůči bakterii *S. aureus*. Budoucí uplatnění je předpokládáno v prevenci rozvoje nebo terapii infekčních komplikací v oblasti kůže a měkkých tkání způsobených kmeny *S. aureus*. Využití bude u širokého spektra typů ran, od akutních (popáleniny, traumatické kožní defekty) po rány chronické (diabetické defekty, bérkové ulcerace, dekubity, postradiační defekty apod.). Zavedení enzymové antimikrobiální terapie do komplexní strategie v případě infekčních komplikací v oblasti kůže a měkkých tkání může vést k redukci spotřeby etablovaných antimikrobiálních látek (antibiotik) a snížit tak jejich selekční tlak a riziko dalšího růstu prevalence rezistentních kmenů bakterií.

8. Ekonomické aspekty

Aktivní složka, kterou v tomto produktu používáme, obsahuje rekombinantně připravený lysostaphin, jehož obvyklá cena pro laboratoř se pohybuje kolem 4700 Kč/mg (Sigma Aldrich). Cena jednoho krytu o rozměrech 5x5 cm, kdy je potřeba na 2,5 ml gelu 5 mg enzymu tak vychází na 23 500 Kč. Díky naší optimalizované heterologní expresi v *E. coli* se náklady na množství použitého enzymu (5 mg) pohybují v relaci 75 Kč za enzym a 2 Kč za CMC = 77 Kč antibakteriální gel. Enzymy produkované v GMP režimu budou mít násobně vyšší náklady, přesto cena antibakteriálního gelu se selektivním účinkem proti *S. aureus* MRSA se bude pohybovat v ekonomicky únosné relaci. Potenciálním partnerem pro výrobu, je firma Holzbecher, spol. s r.o. barevna a bělidlo Zlích, Zlích 104, Česká Skalice, Česká republika (IČ: 45537933).

9. Seznam použité literatury

1. Kumar JK. Lysostaphin: an antistaphylococcal agent. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2008 Sep;80(4):555-61. doi: 10.1007/s00253-008-1579-y. Epub 2008 Jul 8. PMID: 18607587.
2. QUICKEL, Kenneth E., Richard SELDEN, Jacques R. CALDWELL, Nedo F. NORA a William SCHAFFNER. Efficacy and Safety of Topical Lysostaphin Treatment of Persistent Nasal Carriage of Staphylococcus aureus. *Applied Microbiology* [online]. 1971, **22**(3), 446-450 ; ISSN 0003-6919. doi:10.1128/am.22.3.446-450.1971
3. Stark, F. R., C. Thornsvar, E. P. Flannery A M. S. Artenstein. Systemic lysostaphin in man - apparent antimicrobial activity in a neutropenic patient. *The New England journal of medicine* [online]. 1974, **291**(5), 239-40. ISSN 00284793. doi:10.1056/NEJM197408012910507
4. Szweda, Piotr, Marta Schielmann, Roman Kotlowski, Grzegorz Gorczyca, Magdalena Zalewska A Slawomir Milewski. Peptidoglycan hydrolases-potential weapons against Staphylococcus aureus. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2012, **96**(5), 1157-1174. ISSN 01757598. doi:10.1007/s00253-012-4484-3
5. Vacek L, Kobzová Š, Čmelík R, Pantůček R, Janda L. Enzybiotics LYSSTAPH-S and LYSDERM-S as Potential Therapeutic Agents for Chronic MRSA Wound Infections. *Antibiotics (Basel)*. 2020 Aug 15;9(8):519. doi: 10.3390/antibiotics9080519. PMID: 32824115; PMCID: PMC7459665
6. Jayakumar J, Kumar VA, Biswas L, Biswas R. Therapeutic applications of lysostaphin against Staphylococcus aureus. *J Appl Microbiol*. 2021 Sep;131(3):1072-1082. doi: 10.1111/jam.14985. Epub 2021 Jan 18. PMID: 33382154.

7. Haddad Kashani H, Schmelcher M, Sabzalipoor H et al. Recombinant Endolysins as Potential Therapeutics against Antibiotic-Resistant *Staphylococcus aureus*: Current Status of Research and Novel Delivery Strategies. *Clinical Microbiology Reviews*, 2017; 31 (1): e00071-17.
8. Kobzová, Š.; Vacek, L.; Lipový, B.; Hanslianová, M.; Vojtová, L.; Janda, L. Enzymová léčba infekcí kůže a měkkých tkání. *Epidemiologie, Mikrobiologie, Imunologie*, 2021, roč. 1, č. 70, s. 52-61. ISSN: 1210-7913.
9. Cui H, Yuan L, Lin L. Novel chitosan film embedded with liposome-encapsulated phage for biocontrol of *Escherichia coli* O157: H7 in beef. *Carbohydrate Polymers*; 2017; 177, 156-164.
10. V. Kanikireddy, K. Varaprasad, T. Jayaramudu, C. Karthikeyan, and R. Sadiku, 'Carboxymethyl cellulose-based materials for infection control and wound healing: A review', *Int J Biol Macromol*, vol. 164, pp. 963–975, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.07.160.
11. ERGUN, R., J. GUO a B. HUEBNER-KEESE, 2016. *Cellulose*. Encyclopedia of Food and Health. Elsevier, 2016, 694-702. ISBN 9780123849533. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-384947-2.00127-6.

10. Dedikace

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu: Studium terapeutické aplikace antibakteriálního krytí rány pro infekce kůže a měkkých tkání u epidemiologicky relevantních kmenů *S. aureus* - rezistentních na meticilin (NV19-05-00214).



Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
Hudcova 296/70
621 00 Brno
Czech Republic
Tel.: +420 5 3333 1111; www.vri.cz; e-mail: vri@vri.cz