



## OVĚŘENÁ TECHNOLOGIE

---

**Příprava mutantního enzybiotika LYSSTAPH T2  
z plazmidové DNA**

**RNDr. Lubomír Janda, Ph.D.  
Mgr. Šárka Kobzová  
Mgr. Adam Norek Ph.D.  
Mgr. Lukáš Vacek**

5031  
2022

Ověřená technologie 5031/2022

# **Příprava mutantního enzybiotika LYSSTAPH T2 z plazmidové DNA**

RNDr. Lubomír Janda, Ph.D.

Mgr. Šárka Kobzová

Mgr. Adam Norek Ph.D.

Mgr. Lukáš Vacek

ISBN: 978-80-7672-041-1

Vydal: Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i., Brno

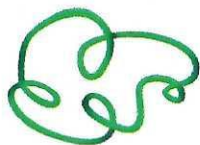
Ověřená technologie byla vytvořena v rámci projektu: Studium terapeutické aplikace antibakteriálního krytí rány pro infekce kůže a měkkých tkání u epidemiologicky relevantních kmenů *S. aureus* - rezistentních na meticilin (NV19-05-00214).

## **Účel použití**

Enzymová terapie je jednou z možností, jak vyřešit problém bakteriální rezistence. Enzym lysostafin se už před padesáti lety používal k léčení pacientů se stafylokokovou infekcí. Vysoké náklady a nižší stabilita enzymů však tehdy nemohly konkurovat nástupu levných antibiotik. Rozvoj rekombinantních technologií a nových přístupů dnes nabízí možnosti jak vylepšit stávající enzymy (Biobetter) a zajistit jejich produkci cenově srovnatelnou s výrobou antibiotik.

## **Popis výrobku**

Předkládané řešení si klade za cíl poskytnout genový konstrukt pro efektivní expresi termostabilní varianty lysostafinu (LYSSTAPH T2) s vysokou aktivitou, stabilitou a snadnou expresí. Technologie popisuje postup kultivace *Escherichia coli* buněk BI21 produkujících lysostafin ve fermentoru, desintegraci buněk, přečištění cílového proteinu pomocí afinitní chromatografie a jeho uskladnění.



**Enantis**

## **Příprava mutantního enzybiotika LYSSTAPH T2 z plasmidové DNA dodané objednavatelem**

---

**Dodavatel:**

Enantis s.r.o.  
Kamenice 34  
625 00 Brno

**Příjemce:**

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i  
Hudcova 296/70  
621 00 Brno

### **Popis pracovní činnosti**

Ověření postupu výroby mutantního enzybiotika **LYSSTAPH T2** bylo provedeno na základě dodaného vzorového protokolu výroby, který byl dále upraven pro interní potřeby a plasmidové DNA (plasmid pUBEx nesoucí gen *LYSSTAPH T2*) připravené příjemcem. Práce byla provedena v plném rozsahu dodaného výrobního postupu, tzn. Produkce cílové molekuly fermentací, lýze buněk a následné čištění cílového proteinu za účelem zjištění výtěžku enzybiotika LYSSTAPH T2 ze získané bakteriální suspenze. Finální protokol popisující pracovní postup je součástí technologického transferu zadavateli.

### **Dosažený výsledek**

Lze konstatovat, že technologie výroby mutantního enzybiotika **LYSSTAPH T2** byla úspěšně ověřena. Mutantního enzybiotikum **LYSSTAPH T2** bylo pomocí rekombinantní technologie získáno s výtěžky v řádu 7-8 mg<sub>protein/g</sub>biomasa, což je v souladu s podkladovým protokolem. Použitý výrobní protokol bude zaslán příjemci (221212\_LysstaphT2\_Protkol\_Enantis.pdf).

V Brně, dne 12.12.2022

Manažer produkce rekombinantních proteinů

Mgr. Jan Vilím, Dr.

Výkonný ředitel

Mgr. Roman Badík, MPA

### **Enantis s.r.o.**

INBIT Kamenice 34  
625 00 Brno, Czech Republic

T: +420 736 773 135

E: enantis@enantis.com

[www.enantis.com](http://www.enantis.com)



**Enantis**

# Příprava mutantního enzybiotika LYSSTAPH T2 z plazmidové DNA dodané objednavatelem

Výrobní protokol

---

Vypracoval: Mgr. Jan Vilim, Dr.

## Obsah

1.	Úvod	2
2.	Materiál	2
3.	Postup přípravy roztoků	5
4.	Příprava inokula	6
5.	Fermentace	6
6.	Sběr biomasy	6
7.	Purifikace	6
8.	Analytické ověření vlastností enzybiotika LYSSTAPH T2	8
9.	Přílohy	9

## 1. Úvod

Protokol pro přípravu enzybiotika **LYSSTAPH T2** produkovaného v *E. coli* BL21 z expresního vektoru pUbEx, podle zadání Výzkumného ústavu veterinárního lékařství, v. v. i. Protokol je upravenou verzí výrobního protokolu poskytnutého zadavatelem.



**Enantis**

## 2. Materiál

### 2.1 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

#### Autoindukční médium [g/L]

	[Da]	[mM]	[g]
Tryptone	-----	-----	10
Yeast extract	-----	-----	5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	132,14	25	3,3
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136,0	50	6,8
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	141,96	50	7,1
Glucose	180,15	2,8	0,5
Lactose	342,3	8,8	3
MgSO <sub>4</sub>	120,36	1,25	0,15



**Enantis**

## 2.2 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	0,68
β-merkaptoethanol			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-merkaptoethanol			0,1

### Lyofilizační pufr pH 5,5

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

## 2.3 Další chemikálie

Kanamycin 50 mg/ml

Anfigoam 204 Sigma

Sterilní 10% glycerol

20% Etanol – filtrovaný (0,22 um filtr), odplyněný

MilliQ voda - filtrovaná (0,22 um filtr), odplyněná

20% (m/m) Glukóza - sterilní

SDS-nanášecí pufr

12,5 % SDS-PAGE gel

1 M NaOH

1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>



**Enantis**

BCA kit na měření proteinové koncentrace/Bradford

#### **2.4 Přístrojové vybavení**

Laboratorní váhy

Analytické váhy

Zařízení pro sterilizaci roztoků filtrací

Sonikační lázeň pro odvzdušnění roztoků

Automatický Ultrazvukový Sonikátor Q500-220

Autokláv

Flow box s dekontaminací UV

Inkubátor 37 °C s rotační třepačkou (200 rpm)

Míchaný fermentor se vzdušněním, úpravou pH a kyslíkovou sondou (BioFlo415 New Brunswick)

Centrifuga min. 20000g

Sonikační lázeň na odplynění kapalin

FPLC Akta Azura

pH metr

Třepaný termoblok – 0 – 95 °C





**Enantis**

### 3. Sběr biomasy

#### 3.1 LB médium

1L LB média připravíme navážením 20 g práškového LB média do 0,8 L demineralizované vody a rozmícháme. Médium přelijeme do uzavíratelné lahve, doplníme na 1 L a s povoleným víčkem přetaženým alobalem autoklávuujeme při 121 °C 20 minut. Po vyjmutí víčko lahve dotáhneme. Do vychladlého média přidáme ve sterilním laminárním boxu 5 ml sterilní 20% glukózy a 1 ml roztoku kanamycinu (50 mg/ml).

#### 3.2 Ztužené LB médium

Do 0,8 L demineralizované vody odvážíme 30 g práškového LB média s agarem, rozmícháme a přelejeme do uzavíratelné lahve. Roztok doplníme na 1 L s povoleným víčkem přetaženým alobalem autoklávuujeme při 121 °C 20 minut. Po vyjmutí víčko lahve dotáhneme. Do vychladlého média přidáme ve sterilním laminárním boxu 5 ml sterilní 20% glukózy a 1 ml roztoku kanamycinu (50 mg/ml).

#### 3.3 Autoindukční médium

Médium je složeno ze tří roztoků. První roztok, zdroj uhlíku připravíme rozpuštěním glukózy a laktózy (dle tabulky autoindukční médium) v 180 ml demineralizované vody. Přelejeme do uzavíratelné lahve, doplníme na 200 ml a s povoleným víčkem přetaženým alobalem autoklávuujeme při 121 °C 20 minut. Po vyjmutí víčko lahve dotáhneme. Druhý roztok, fosfátový pufr, připravíme rozpuštěním solí fosfátu (dle tabulky autoindukční médium) ve 200 ml demineralizované vody a sterilizujeme filtrací přes 0,22 µm filtr v laminárním boxu. Živný bujon z kvasničního extraktu a tryptonu rozpustíme (dle tabulky autoindukční médium) rozmícháme v 2800 ml demineralizované vody a přelejeme do fermentoru, kde proběhne sterilizace autokláfováním. Po vychladnutí se sterilně přidají zbývající roztoky cukrů, antibiotikum a fosfátů (cca 10% objemu je odpařeno v průběhu autokláfování).

#### 3.4 Příprava pufrů

Všechny použité pufrы se připravují stejným postupem: v 600 ml milliQ vody rozmícháme všechny složky pufru dle výše uvedených rozpisů a upravíme pH. Roztok doplníme na 950 ml, překontrolujeme pH (popřípadě upravíme titrací) a znovu doplníme vodou do 1000 ml, opět ověříme pH. Namíchaný roztok filtrujeme přes 0,22 µm filtr a odzdušníme v sonikační lázni.



## 4. Příprava inokula

Jako inokulum byla použita suspenze expresních buněk s vloženým plasmidem pUbEx nesoucím gen kódující rekombinantní protein LYSSTAPH T2.

10 ml LB média s přidavkem kanamycinu (10 ul) inokulujeme čerstvě narostlými koloniemi na ztuženém LB médiu (cca 10 kolonií). Kultivujeme přes noc při 37 °C. 1 ml buněčné suspenze použijeme pro inokulaci 100 ml LB média s kanamycinem (50 ug/ml) a kultivujeme do OD600 = 1. Kulturu zchladíme na ledu, sterilně centrifugujeme (6000 g/15 min./4 °C), supernatant slijeme a pelet opatrně na ledu rozpustíme v 10 ml sterilního 10% glycerolu. Suspenzi necháme odpočívat na ledu 10 min., následně alikvotujeme po 1 ml (na ledu) a necháme odpočívat na -4 °C do použití pro inokulaci (max 4 h). Inokulum je možné šokově zamrazit v tekutém dusíku a ihned přenést do -80°C. 1 ml výsledného inokula slouží pro inokulaci 1L autoindukčního média.

Dle potřeby laboratoře je možné použít i alternativních inokulačních metod.

## 5. Fermentace

Ke kultivaci je využíván míchaný bioreaktor BioFlow 415 New Brunswick s pracovním objemem 6 L. Příprava fermentoru: polarografickou kyslíkovou sondou je třeba nabíjet 12 a více hodin. Kalibrace je provedena relativně odpojením sondy (0% kyslíku). Po autoklávování a doplnění média provzdušněním (5 L vzduchu za minutu) za stálého míchání (500 ot. Min.) minimálně 15 minut nebo do ustálení odečtu je nastavena hodnota 100% hladiny rozpuštěného kyslíku. pH sonda je kalibrována proti pufru pH 4,01 a pH 7. Přesnost čtení je ověřena proti pufru o pH 9. Do sterilizovaného fermentoru jsou připevněny sondy a nalito autoindukční médium (2,8 L) bez fosfátů, cukrů a antibiotik. Za stálého míchání 200 rpm je spuštěn program sterilizace. Po vychladnutí na kultivační teplotu 26 °C (včetně obalu fermentoru a sond) jsou sterilně přes 0,22 um filtr přidány roztoky cukrů, fosfátů a kanamycinu. Fermentor je provzdušněn a dokončena kalibrace kyslíkové sondy.

Po ustálení odečítaných hodnot je fermentor inokulován 3 ml buněčné suspenze z bakteriálních konzerv.

Kultivace probíhá v řízeném režimu s nastavením DO kaskády (200 – 700 rpm, 2 – 8 AirFlow) při udržení hladiny rozpuštěného kyslíku na 30%. Doba kultivace je 32 hodin.

Kultivace je ukončena zchlazením fermentoru na 10°C . Typické OD<sub>600</sub> je 10 – 15 po ukončení fermentace.



**Enantis**

## 6. Sběr biomasy

Po ukončení kultivace je ochlazená bakteriální suspenze vypuštěna z fermentoru a dále chlazená inkubací na mokřém ledu cca 10 minut. Kulturu stáčíme při 10000 g/4°C/20 minut. Supernatant slijeme a pelet je buď ihned zpracován procesem popsáným v kapitole 7. a nebo zamražen při -20°C pro pozdější zpracování.

## 7. Purifikace

### 7.1 Desintegrace bakterií

Všechny kroky provádíme na ledu nebo v zařízeních vychlazených na 4°C.

Čerstvý nebo zamražený pelet inkubujeme na ledu a přidáme Sonikační pufr (na 10g bakteriálního peletu 50 ml desintegračního pufru). Pelet důkladně rozsuspendujeme šetrným pipetováním. Roztok umístíme na mokřý led a zanoříme sonikační sondu. Spustíme program s celkovým sonikačním časem 10 min. při amplitudě 50, puls 10 sekundy, pauza 15 sekundy (přístroj má výkon 500W).

Sonikovanou suspenzi nalijeme do kyvet. Kyvety centrifugujeme při 15000 g po dobu 1 hodiny. Supernatant slijeme a přefiltrujeme přes 0,22 µm filtr.

Po sonikaci ihned přistoupíme k purifikaci.

### 7.2 Purifikace

K purifikaci se využívá přístroj pro proteinovou kapalinovou chromatografii s ventilem pro změnu nasávaného roztoků. Purifikaci provádíme s využitím 5 ml Ni-NTA kolonou (použita 1 ml His-Trap FF, Cytiva) pro zachycení proteinů s histidinovou kotvou. Všechny použité roztoky jsou filtrovány přes 0,22 µm filtr odvzdušněny a schlazeny na 4°C.

K přístroji ekvilibrovaném nanášecím a elučním pufrem připojíme kolonou o objemu 5 ml a hadičky pump ponoříme do roztoků:

Hadice 1: MilliQ voda

Hadice 2: Sonikační pufr

Hadice 3: Eluční pufr

Hadice 6: 20% etanol



Hadice 0: vzorek po sonikaci

Do sběrače frakcí umístíme stojánek s 1 ml zkumavkami. Po zadání odpovídající držáku zkumavek v ovládacím softwaru spustíme program ..... (viz. Příloha 1). Potvrdíme provedení všech přípravných kroků. Purifikace probíhá automaticky. HisTrap kolona je promyta 25 objemy vody pro FPLC a ekvilibrována 25 ml nanášecího pufru. Vzorek je nanášen pomocí automatické pumpy rychlostí 3 ml/minutu. Odmytí nespecificky navázaných proteinů je dosaženo propláchnutím kolony 100 ml nanášecího pufru, nebo dokud absorbance A280 neklesne po 25 A jednotek. Následně je kolona propláchnuta směsí nanášecího a elučního pufru v poměru 1:9 s výslednou koncentrací imidazolu 40 mM. Uvolnění čistého proteinu je dosaženo zvýšením koncentrace imidazolu na finálních 300 mM. Souběžně začíná sběr frakcí obsahujících rekombinantní protein LYSSTAPH T2.

Program obsahuje mimo purifikačních a ekvilibračních kroků i krok pro regeneraci kolony a její konzervaci v 20% etanolu.

Po ukončení purifikace vzorek ihned dialyzujeme.

### **7.3 Dialýza**

Výměna pufru probíhá s využitím přístroje pro proteinovou kapalinovou chromatografii za použití odsolovací kolony (použita HiPrep 26/10 Desalting GE Health Care).

Všechny použité roztoky jsou filtrovány přes 0,22 um filtr odvzdušněny.

K přístroji ekvilibrovaném Dialyzačním pufrům připojíme kolonou a hadičky pump ponoříme do roztoků:

Hadice 1: MilliQ voda

Hadice 2: Lyofilizační pufr

Hadice 6: 20% etanol

Hadice 0: vzorek proteinu LYSSTAPH T2 po purifikaci

Do sběrače frakcí umístíme stojánek s 1 ml zkumavkami. Po zadání odpovídajícího držáku zkumavek v ovládacím softwaru spustíme program. Potvrdíme provedení všech přípravných kroků. Purifikace probíhá automaticky.



Enantis

Frakce obsahující enzybiotikum LYSSTAPH T2 jsou zamraženy v kapalném dusíku. Otevřené zkumavky obsahující enzybiotikum LYSSTAPH T2 jsou překryty perforovaným parafilmem a zamraženy v kapalném dusíku. Poté jsou umístěny do laboratorního lyofilizátoru a lyofilizovány. Lyofilizované proteiny uchováváme při -20 °C.

Obrazový doprovod pro zhodnocení purifikace je obsahem přílohy (Obrázek A1-A3, sekce Appendix).

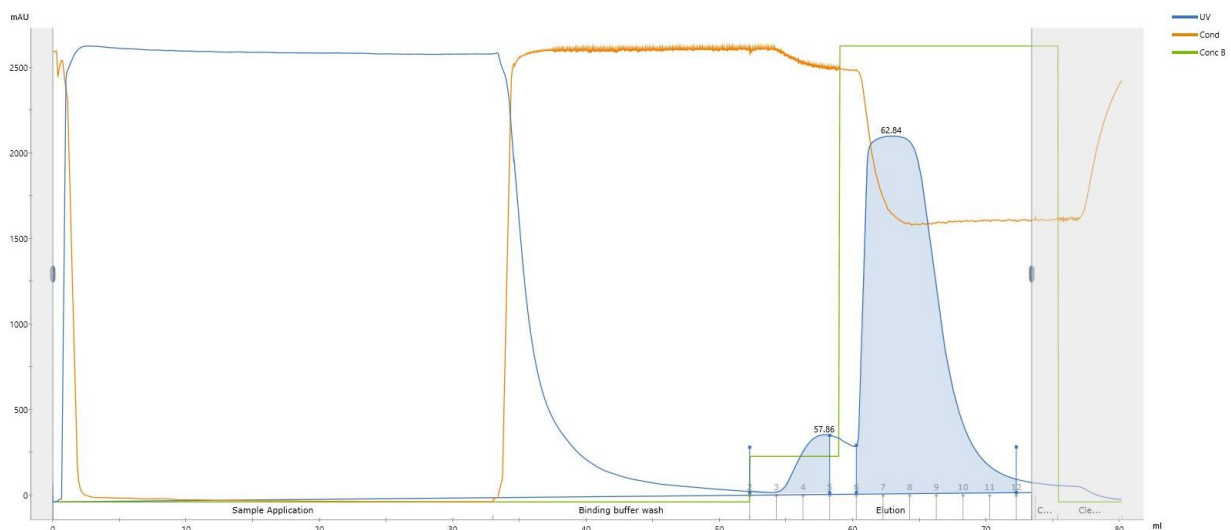
## 8. Zhodnocení fermentace

Hodnocení fermentace je provedeno pomocí polyakrylamidové gelové elektroforézy a stanovení koncentrace získaného proteinu a vypočítáním výtěžku získaného z gramu biomasy.

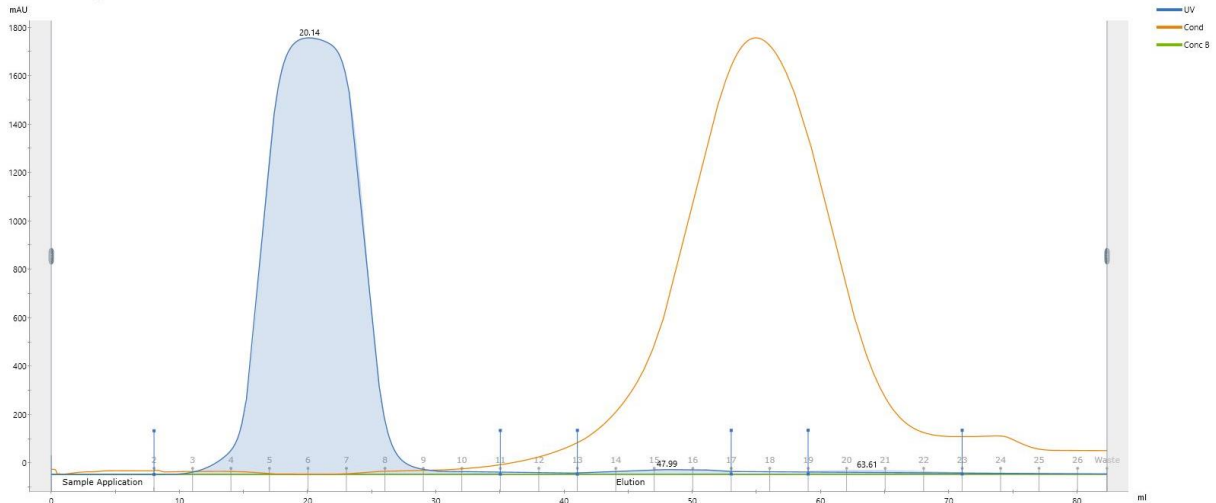
Z jedné kultivace z fermentoru byly přečištěny dvě šarže proteinu, které poskytly průměrný výtěžek v řádu **7-8 mg<sub>protein</sub>/g<sub>biomasa</sub>**.

## Appendix

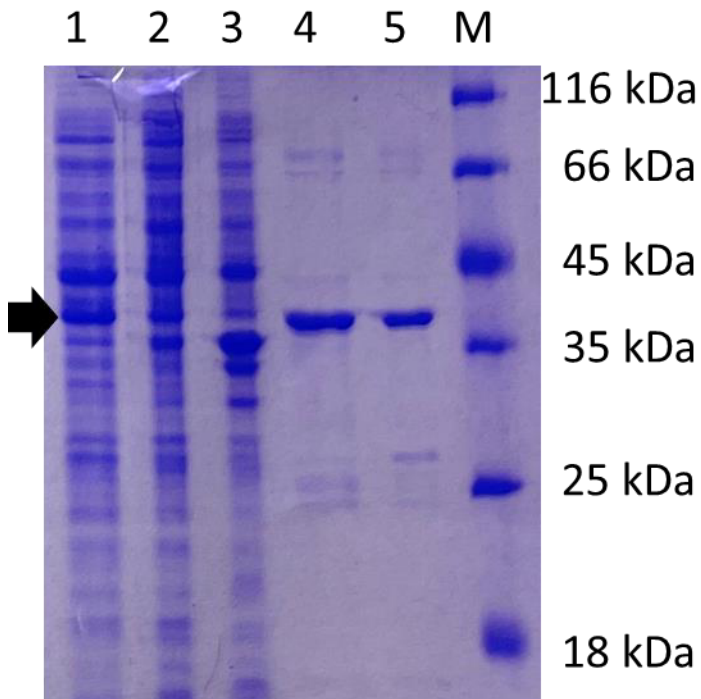
Obrazová příloha ilustrující proces purifikace LysstaphT2 ze získané biomasy.



Obrázek A1. Ilustrativní chromatogram znázorňující purifikaci LysstaphT2 ze solubilní frakce za použití afinitní chromatografie.



Obrázek A2. Ilustrativní chromatogram znázorňující odsolení purifikovaného LysstaphT2 za použití nízkotlakové kapalinové chromatografie.



Obrázek A3. Gel znázorňující průběh purifikace. 1, Celkový obsah proteinů po fermentaci; 2, Solubilní frakce biomasy po fermentaci; 3, Nesolubilní frakce biomasy po fermentaci; 4, Purifikovaný LysstaphT2 po afinitní chromatografii; 5, Čistý protein po odsolení; M, Proteinový marker (Pierce Unstained Protein MW Marker, Thermofisher Scientific).

## SMLOUVA O VYUŽITÍ VÝSLEDKU

### Ověřená technologie s názvem: Příprava mutantního enzybiotika LYSSTAPH T2, DOSAŽENÉHO V RÁMCI ŘEŠENÍ PROJEKTU VÝZKUMU A VÝVOJE Č. NV19-05-00214“ (dále jen „smlouva“)

Smluvní strany:

#### **Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.**

Hudcova 296/70

621 00 Brno

IČ: 00027162

DIČ: CZ00027162

Zastoupená: MVDr. Martinem Faldynou, Ph.D., ředitelem

(dále jen "poskytovatel")

a

#### **Enantis, s.r.o.**

Se sídlem: INBIT, Kamenice 34, 625 00 Brno

IČO: 27676013,

DIČ: CZ 27676013

společnost zapsaná v obchodním rejstříku vedeném KS v Brně, oddíl C, vložka 51150

Jednající: Mgr. Roman Badík, MPA.

(dále jen „zhotovitel“, též jako "uživatel")

(společně též jako „smluvní strany“)

uzavřely níže uvedeného dne, měsíce a roku tuto Smlouvu podle ustanovení § 1746 zákona 89/2012 Sb., občanský zákoník, v platném znění.

### I. Úvodní ustanovení

- 1.1. Poskytovatel bude jednat jako zástupce partnerů projektu dle bodu 1.2 čl. I. této smlouvy a v této roli bude zodpovídat za dodržení požadavků projektu a závazků dle této smlouvy.
- 1.2. Poskytovatel v rámci projektu Agentury pro zdravotnický výzkum České republiky (AZV ČR) „Studium terapeutické aplikace antibakteriálního krytí rány pro infekce kůže a měkkých tkání u epidemiologicky relevantních kmenů *S. aureus* – rezistentních na meticilin“ vyvinul a ověřil technologii: „Příprava mutantního enzybiotika LYSSTAPH T2 z plazmidové DNA dodané objednavatelem“. Tento poznatek označený jako know-how poskytovatel prohlašuje za své obchodní tajemství ve smyslu § 504 zákona č. 89/2012 Sb. Občanský zákoník. Souhrn těchto poznatků umožňuje zavést výrobu tohoto enzybiotika.
- 1.3. Uživatel má zájem o uplatnění tohoto způsobu výroby a akceptuje závazkové vztahy upravené dále v této smlouvě. S nabytými poznatky bude zacházet tak, aby nebylo narušeno obchodní tajemství poskytovatele. Uživatel před uzavřením této smlouvy posoudil kladně vlastnosti know-how.

## **II. Předmět smlouvy**

- 2.1. Předmětem této Smlouvy je využití výše výsledku uvedeného projektu č. NV19-05-00214 - ověřené technologie, specifikovaného v bodě 1. 2. čl. I.
- 2.2. Obsahem ověřené technologie je Know-how pro technologii výroby preparátu. Popis a konkrétní Know-how jsou uvedeny v příložené Ověřené technologii.

## **III. Způsob a doba využití**

- 3.1. Uživatel ověřené technologie je oprávněn využívat veškeré poznatky Know-how pro vlastní potřebu, včetně komerčního využití.
- 3.2. Smluvní strany se při komercializaci Výsledku zavazují postupovat souladně s ust. § 16 zákona č. 130/2002 Sb., o podpoře výzkumu, experimentálního vývoje a inovací z veřejných prostředků a o změně některých souvisejících zákonů, ve znění pozdějších předpisů a v souladu s Rámcem společenství pro státní podporu výzkumu, vývoje a inovací č. 2014/C 198/01.
- 3.3. Smluvní strany se dohodly, že případná komercializace know-how bude ujednána zvláštní smlouvou mezi Smluvními stranami.

## **IV. Úprava vlastnictví a sjednaný rozsah práva povinnosti**

- 4.1. Vlastníkem know – how vytvořeného v rámci projektu dle bodu 1. 2. čl. I. je Poskytovatel.
- 4.2. Uživatel má v souladu s touto Smlouvou následující povinnosti:
  - a) učiní veškeré kroky k utajení Know-how předaných poznatků;
  - b) neposkytne právo k výrobě třetí osobě;
  - c) povede evidenci o produkci a umožní poskytovateli do této evidence nahlížet;
  - d) uživatel poskytne informace o využívání ověřené technologie a jejím ekonomickém přínosu potvrzené statutárním zástupcem;
  - e) uživatel ověřené technologie je povinen postupovat při nakládání s ověřenou technologií v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

## **V. Záruky a odpovědnosti**

- 5.1. Poskytovatel je oprávněn poskytovat uvedené Know-how a prohlašuje, že v den nabytí platnosti této Smlouvy mu není nic známo o právech třetí osoby k předmětnému Know-how, uvedeném v ověřené technologii.
- 5.2. Uživatel ručí za přípravu výrobků a za technologický postup tak, jak je uvedeno v ověřené technologii.

## **VI. Závěrečná ujednání**

- 6.1. Tato smlouva je v souladu s ustanoveními Ministerstva zdravotnictví a Smlouvy o poskytnutí účelové podpory na řešení projektu č. NV19-05-00214.



- 6.2 Poskytovatel a partneři dodají údaje o ověřené technologii pro evidenci v RIV. Tato smlouva bude uvedena ve zprávě o řešení výzkumného projektu NV19-05-00214 za rok 2022.
- 6.3 Tato Smlouva nabývá platnosti a účinnosti dnem podpisu smluvních stran.
- 6.4 Změny a doplňky této smlouvy lze činit pouze formou písemných dodatků podepsaných všemi smluvními stranami.
- 6.5 V případě jakéhokoliv porušení bodů uvedených ve smlouvě je strana, která Smlouvu porušila, povinna ostatním stranám pokutu ve výši 50 tis. Kč a náhradu škody v prokazatelné výši ztrát.
- 6.6 Tato Smlouva se uzavírá na dobu neurčitou.
- 6.7 Každá ze stran je oprávněna smlouvu vypovědět. Výpovědní lhůta činí 3 měsíce a začíná plynout od prvního dne měsíce následujícího po doručení výpovědi.
- 6.8 Pokud je tato smlouva uzavírána elektronickými prostředky, je vyhotovena v jednom originále. Pokud je tato Smlouva uzavírána v písemné formě, je sepsána ve dvou vyhotoveních s platností originálu, z nichž každá strana obdrží po 1 vyhotovení.
- 6.9 Smluvní strany prohlašují, že si tuto Smlouvu před podpisem přečetly, porozuměly jejímu obsahu, s obsahem souhlasí, a že je tato Smlouva projevem jejich svobodné vůle.

Za poskytovatele:

MVDr. Martin Faldyna, Ph.D.  
Výzkumný ústav veterinárního lékařství v. v. i.

**MVDr. Martin Faldyna Ph.D.**  
Digitálně podepsal  
MVDr. Martin Faldyna  
Ph.D.  
Datum: 2022.12.21  
11:08:52 +01'00'

V Brně dne:

Za uživatele:

Mgr. Roman Badík, MPA.  
Enantis, s.r.o.

**Mgr. Roman Badík**  
Digitálně podepsal Mgr. Roman  
Badík  
DN: c=CZ,  
2.5.4.97=NTRCZ-27676013,  
o=Enantis s.r.o., ou=1, cn=Mgr.  
Roman Badík, sn=Badík,  
givenName=Roman,  
serialNumber=PS17650  
Datum: 2022.12.19 11:16:10 +01'00'

V Brně dne: 19.12.2022

VÚVeL 

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.  
Hudcova 296/70  
621 00 Brno  
Czech Republic

Tel.: +420 5 3333 1111; [www.vri.cz](http://www.vri.cz); e-mail: [vri@vri.cz](mailto:vri@vri.cz)