



OVĚŘENÁ TECHNOLOGIE

**Příprava lyofilizovaných biopolymerních pěn
obohacených o enzybiotikum LYSSTAPH T2**

**RNDr. Janda Lubomír, Ph.D.
Mgr. Šárka Kobzová
Doc. Ing. Lucy Vojtová, Ph.D.
Ing. Katarína Kacvinská
Ing. Marian Sedlář
Mgr. Veronika Pavliňáková, Ph.D.**

**5032
2022**

Ověřená technologie 5032/2022

Příprava lyofilizovaných biopolymerních pěn obohacených o enzybiotikum LYSSTAPH T2

RNDr. Janda Lubomír, Ph.D.

Mgr. Šárka Kobzová

Doc. Ing. Lucy Vojtová, Ph.D.

Ing. Katarína Kacvinská

Ing. Marian Sedlář

Mgr. Veronika Pavliňáková, Ph.D.

ISBN: 978-80-7672-042-8

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

Protokol o dosažení výsledku Ověřená technologie (Ztech)

Název výsledku: Příprava lyofilizovaných biopolymerních pěn obohacených o enzybiotikum LYSSTAPH T2

DOSAŽENÉHO V RÁMCI ŘEŠENÍ PROJEKTU VÝZKUMU A VÝVOJE MZ Č. NV19-05-00214

Název projektu: „Studium terapeutické aplikace antibakteriálního krytí rány pro infekce kůže a měkkých tkání u epidemiologicky relevantních kmenů *S. aureus* – rezistentních na methicilin“

Vývoj enzybiotika LYSSTAPH T2:

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i. (VÚVeL)

RNDr. JANDA Lubomír, Ph.D.

Mgr. Šárka Kobzová



Vývoj pěnového nosiče:

Středoevropský technologický institut Vysokého učení technického v Brně (CEITEC VUT)

Doc. Ing. Lucy Vojtová, Ph.D.

Ing. Katarína Kacvinská

Ing. Marian Sedlář

Mgr. Veronika Pavliňáková, Ph.D.



Plánovaný výrobce pěn a ověřitel technologie:

Collado s.r.o.

Marcela Dohnalová



Součástí ověřené technologie je i SMLOUVA O OVĚŘENÍ TECHNOLOGIE mezi VÚVeL, CEITEC VUT a Collado s.r.o. podepsaná 28.11.2022

Úvod

Tento dokument popisuje opakovanou výrobu biopolymerních pěn obohacených o enzymbiotikum LYSSTAPH T2 pomocí technologie sušení mrazem (lyofilizace). Cílem je doložit velmi dobrou reprodukovatelnost parametrů vyrobených pěn při opakované výrobě za identických výrobních podmínek. Všechny výrobní testy byly provedeny pomocí průmyslového pilotního lyofilizátoru validovaného pro medicínské aplikace ve výrobních prostorách společnosti Collado s.r.o. v Hovoranech v roce 2022.

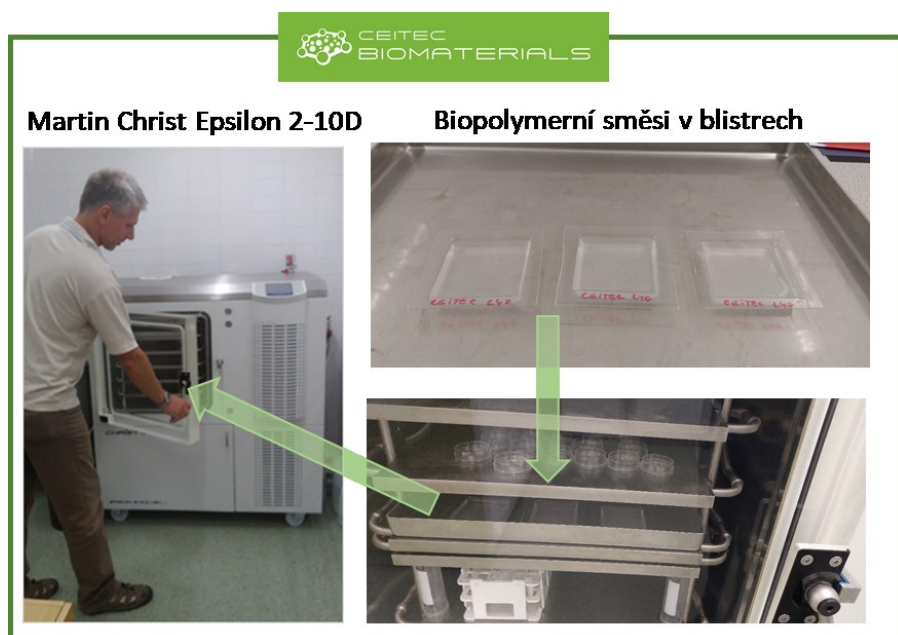
Popis výroby

Příprava funkčního vzorku biopolymerní pěny obohacené o enzymbiotikum LYSSTAPH T2 pro hojení ran infikovaných epidemiologicky relevantními kmeny *Staphylococcus aureus* – rezistentních na methicilin (MRSA).

Do 50 ml kádinky bylo přidáno 30 g vody, 0,15 g bovinního kolagenu typu I a 0,15 g karboxymethylované celulózy (CMC). Po dezintegraci obou polymerů ve vodě byl přidán LYSSTAPH T2 o koncentraci 100 µg/ml a vše bylo homogenizováno a vylito (20 g) do blistru o velikosti 5x5 cm.

Proces lyofilizace, který poskytuje definované póry výsledných pěn, byl prováděn jak na **lyofilizátoru Martin Christ Epsilon 2-10D** umístěném ve skupině „Pokročilé biomateriály“ v CEITEC VUT v Brně, tak i na **lyofilizátoru SP-VirTis-Genesis 35L** pracujícím na principu sušení mrazem při vakuu. Lyofilizace při mrazení v zařízení probíhala při -35 °C (CEITEC VUT) nebo při -40 °C (Collado) pod tlakem 1 mBar po dobu 15 hodin, poté následovalo sekundární sušení při 25 °C pod tlakem 0,01 mBar až do snížení Δp (změna tlaku) až o 10 %. V jednom případě byly vzorky předmrazeny v šokovém mrazícím zařízení při -40 °C. Celkové sušení trvalo cca 24h.

Níže jsou uvedeny fotografie příprav vzorků lyofilizací jak v CEITEC VUT v Brně (Obrázek 1), tak i v Collado s.r.o. v Brně (Obrázek 2) včetně rozpisu vzorků (Tabulka 1).



Obrázek 1. Výroba biopolymerní pěny obohacené enzybiotikem LYSSTAPH T2 na laboratorním zařízení v CEITEC VUT v Brně.



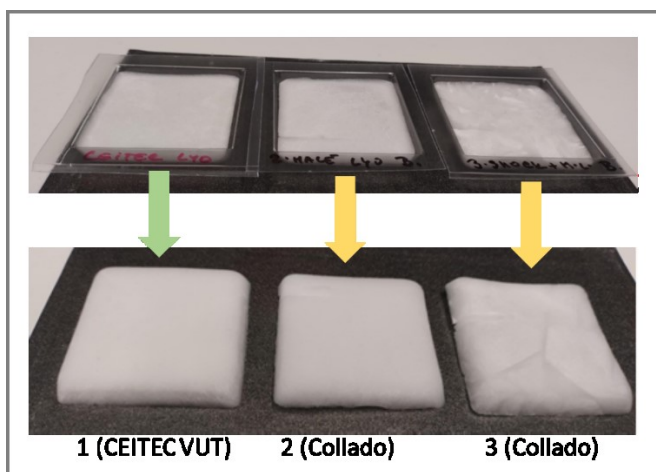
Obrázek 2. Výroba biopolymerní pěny obohacené enzybiotikem LYSSTAPH T2 na průmyslovém zařízení ve společnosti Collado s.r.o. v provozovně Hovorany.

Tabulka 1 Přehled a popis připravených vzorků

Označení vzorku	Datum přípravy	Mrazení vzorků
1 (CEITEC VUT)	29.12.2022	Přímo v lyofilizátoru
2 (Collado)	30.12.2022	Přímo v lyofilizátoru
3 (Collado)	30.12.2022	V šokovém mrazícím zařízení

Fotografie připravených vzorků

Na Obrázku 3 jsou fotografie vybraných vzorků všech šarží. Zatímco vzorky 1 a 2 mrazené přímo v lyofilizátoru (CEITEC i Collado) jsou na první pohled identické, vzorek 3 mrazený šokově má značně jinou morfologii povrchu způsobenou mrazem.



Obrázek 3. Příklad vyrobené biopolymerní pěny 1, 2 a 3 obohacené enzymem LYSSTAPH T2.

Vyhodnocení

Pro potvrzení kvality vyrobených pěn, které byly původně připravené na laboratorním lyofilizátoru Martin Christ Epsilon 2-10D v CEITEC VUT (Vzorek 1) bylo provedeno několik různých testů (vždy v triplikátu) na průmyslovém pilotním zařízení SP-VirTis-Genesis 35L ve vlastnictví společnosti Collado s.r.o. (Vzorek 2 a Vzorek 3) v rámci realizace ověřené technologie. V Tabulce 2 je uveden přehled vzorků (1, 2, 3) a jejich měřitelné vlastnosti.

Tabulka 2 Přehled vzorků a výsledků velikostí pórů

Označení vzorku	Šířka (mm)	Délka (mm)	Výška (mm)	Sorpce (g vody/g sušiny)	Velikost pórů (μm)
1 (CEITEC)	50,83 ± 0,39	50,64 ± 0,19	5,57 ± 0,30	16,99 ± 2,07	230 ± 85
2 (Collado)	50,96 ± 0,22	50,59 ± 0,48	5,64 ± 0,22	16,91 ± 0,52	230 ± 75
3 (Collado)	50,95 ± 0,65	50,85 ± 0,41	5,62 ± 0,23	17,24 ± 0,92	120 ± 70

Z Tabulky 2 je patrné, že velikost (šířka, délka a výška) připravených vzorků 1, 2 a 3 byla velmi srovnatelná a liší se pouze v desetínách milimetrů, což je ze statistického hlediska vzhledem k jejich odchylce zanedbatelné. Sorpce tekutiny (fyziologický roztok, pH = 7,3) měřená dle ČSN EN 13726-1 byla vypočtená dle vzorečku:

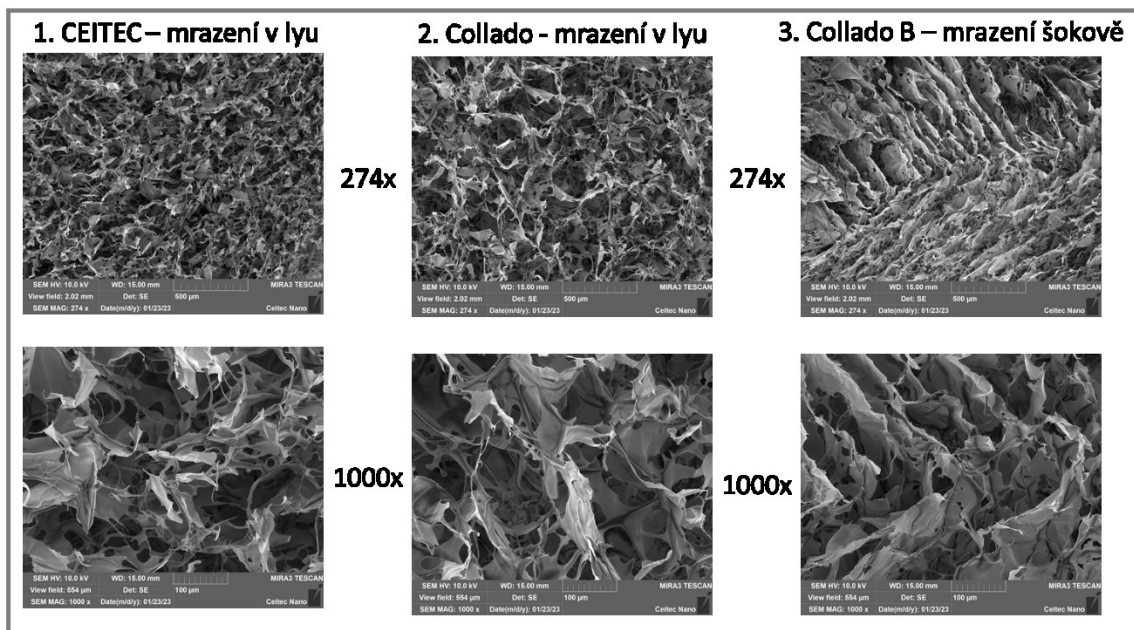
$$\text{Sorpce } \left(\frac{g}{g}\right) = \frac{\text{hmotnost (mokrý)} - \text{hmotnost (suchý)}}{\text{hmotnost (suchý)}}$$

Z hodnot je zřejmé, že vzorečky 1 a 2 mají sorpci kolem 16,9 g tekutiny/g sušiny, zatímco vzorek 3 měl sorpci jen malinko vyšší (17,2 = cca 2% rozdíl). Nicméně, všechny hodnoty jsou velmi podobné bez výraznějšího rozdílu.

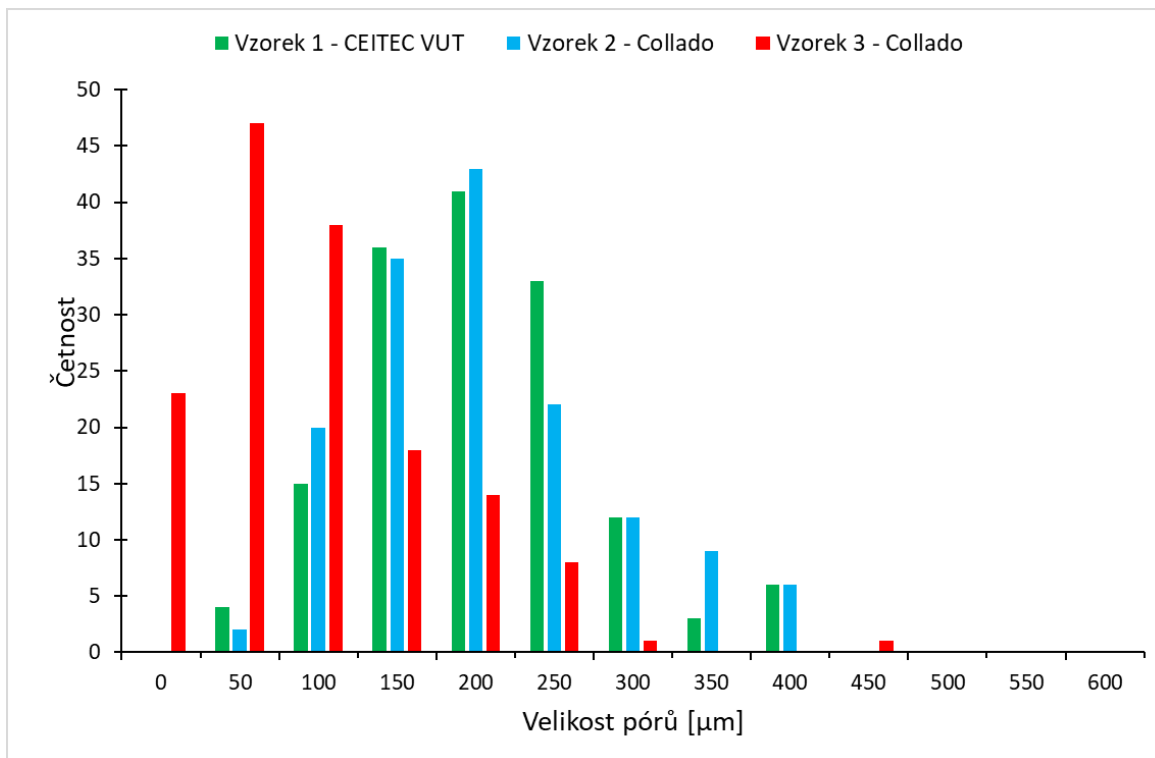
Morfologické složení

Připravené pěny byly nejprve charakterizovány z hlediska morfologie (struktury) pomocí elektronové mikroskopie (MIRA 3, Tescan) a podrobeny detailní analýze velikosti pórů (program ImageJ). Jak je patrné z Obrázku 4, vyrobené pěny č. 1 a 2 měly ve všech případech velmi pěknou a pravidelnou pórovitou strukturu na rozdíl od vzorku 3, který měl různě orientované póry vytvořené v důsledku prudkého zamrazení.

Velikost jednotlivých pórů vypočtená ze snímků SEM (minimálně ze 100 pórů, 3x opakováno) byla u vzorků 1 a 2 naprosto identická, a to 230 μm , jak je patrné jak z Tabulky 2 tak i z grafu distribuce (četnosti zastoupení jednotlivých pórů) na Obrázku 5 (zelená a modrá barva sloupců). Oproti tomu vzorek 3 má póry téměř poloviční, jen kolem 120 μm jak dokazuje i distribuce pórů, z nichž nejvíce pórů je pouze kolem 80 μm . Toto je dáno prudkým zamrazením vzorečků v šokeru, kdy se udělají pouze malé krystalky vody, které následně vysublímují. U vzorků 1 a 2 pozvolné zamrazování vytvoří homogenní mnohem větší krystalky vody, které následně po sublimaci vytvoří póry. Porozita všech vzorečků byla shodná - 98 %.



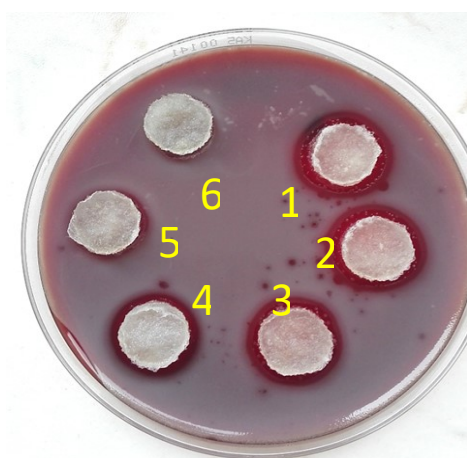
Obrázek 4. Morfologie biopolymerní pěny obohacené enzybiotikem LYSSTAPH T2 vyrobené v lyofilizátoru v CEITEC VUT (vzorek 1) a v lyofilizátoru Collado (vzorek 2 a 3) vyfocené pomocí SEM - skenovacího elektronového mikroskopu MIRA 3 (Tescan, Brno).



Obrázek 5. Distribuce pórů biopolymerních pěn 1, 2 a 3 obohacených enzymem LYSSTAPH T2.

Mikrobiální testy

Antibakteriální účinky byly testovány (VÚVeL Brno) na krevním agaru pro pěny určené na léčbu ran infikovaných kmeny *Staphylococcus aureus*. Z Obrázku 5 je patrné, že i po přenesení technologie na průmyslové zařízení, se tvořily na těchto vzorcích inhibiční zóny, které vznikly potlačením růstu již zmíněného bakteriálního kmenu.



Obrázek 5 Krevní agar + *S. aureus* kmen 244(ST 8) + pěny s LYSSTAPH-T2 (1 – 6 konc. = 65; 43; 26; 10; 5 and 3 μg).

Závěr: Z výsledků je patrné, že použitá technologie umožňuje dosahovat reprodukovatelných výsledků - parametry pěn jsou výborné, přičemž rozptyl parametrických hodnot je z průmyslového hlediska akceptovatelný a statisticky nevýznamný především u pěn mrazených přímo v lyofilizátorech (ať už v CEITEC VUT nebo Collado s.r.o.).

Přílohy:

1. SMLOUVA O OVĚŘENÍ TECHNOLOGIE mezi VÚVeL, CEITEC VUT a Collado s.r.o. podepsaná 28.11.2022
2. Validace využití lyofilizátoru SP-VirTis-Genesis 35L pro medicínské aplikace umístěného ve firmě Collado s.r.o. (provozovna Hovorany).

V Brně, 30. 12. 2022

RNDr. JANDA Lubomír, Ph.D. (VÚVeL, Brno)

Doc. Ing. Lucy Vojtová, Ph.D. (CEITEC VUT v Brně)

Marcela Dohnalová (Collado s.r.o., Brno)

VU^{Ve}L 

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