

Záverečná karta projektu

Názov projektu Evidenčné číslo projektu **APVV-16-0168**
Príprava bakteriofágov na terapiu vaginálnych a močových infekcií

Zodpovedný riešiteľ **doc. RNDr. Hana Drahovská, PhD.**
Príjemca **Univerzita Komenského v Bratislave**

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

Katedra molekulárnej biológie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave

Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

Nemali sme zahraničných spolupracovníkov

Udelené patenty/podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory, ktoré sú výsledkami projektu

Patentová prihláška č. PP 50075-2020 v Slovenskej republike a medzinárodná patentová prihláška pod číslom PCT/SK2021/050016

Prihlasovatelia: Ústav molekulárnej biológie SAV, Univerzita Komenského v Bratislave,

Autori: G. Bukovská, L. Bocánová, N. Halgašová, M. Kajsiková, H. Drahovská

Názov: Antimikrobiálny proteín, antimikrobiálny rekombinantný proteín s lytickými vlastnosťami, expresný vektor, spôsob ich prípravy a použitie.

Najvýznamnejšie publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu – uveďte aj publikácie prijaté do tlače

Kajsik, M., Bugala, J., Kadliceckova, V., Szemes, T., Turna, J., Drahovska H.:

Characterization of Dev-CD-23823 and Dev-CT57, new Autographivirinae bacteriophages infecting Cronobacter spp. Arch. Virol. 164 (5) 1383-1391, rok 2019 (2.2 - IF2019).

Tkacova, A., Orieskova, M., Halgasova, N., Bocanova, L., Bukovska, G. Identification of Brevibacterium flavum genes related to receptors involved in bacteriophage BFK20 adsorption. Virus Res. 274, 19775, rok 2019 (2.7 - IF2018).

Madurkay, M., Kadličeková, V., Turňa, J., Drahovská H.: Bacteriophage application for control of Cronobacter in liquid media and in biofilms. JFNR 58 (1), 85-91, rok 2019 (0,75 – IF2019).

Lichvarikova, A., Soltys, K., Szemes, T., Slobodnikova, L., Bukovska, G., Turna, J., Drahovska, H. Characterization of clinical and carrier Streptococcus agalactiae and prophage contribution to the strain variability. Viruses, 12 (11), 1323, rok 2020. (5.0 - IF2020)

Slobodnikova, L., Markuskova, B., Kajsik, M., Andrezal, M., Straka, M., Liptaková, A., Drahovska, H. Characterization of anti-bacterial effect of the two new phages against uropathogenic Escherichia coli. Viruses, 13 (7), 1348, rok 2021. (5.0 - IF2020)

Liptakova A. a kol. Lekárska mikrobiológia, Herba, 2019, ISBN 978-80-89631-91-9. Počet strán 952:

Uplatnenie výsledkov projektu

Výsledkom riešenia projektu je súbor bakteriofágov s definovanými vlastnosťami, ktoré bude možné použiť na terapiu vaginálnych a močových infekcií vyvolaných uropatogénnymi kmeňmi *E. coli*. Zostavený fágový koktail obsahujúci fágy s najlepšimi lytickými vlastnosťami má dobrú účinnosť na inhibíciu rastu kmeňov *E. coli* v tekutej kultúre a bude možné ho použiť pre liečbu infekcií vyvolaných kmeňmi rezistentnými na antibiotickú liečbu a pri opakovaných infekciách. Endolýzíny, enzýmy degradujúce bunkové steny, predstavujú jednu z možností ako nahradiť bežné antibiotiká. V rámci riešenia projektu sme pripravili tri rekombinantné endolýzíny z temperovaných bakteriofágov zo *Streptococcus agalactiae*, ktoré lyzujú široké spektrum kmeňov tohto druhu. Rekombinantné endolýzíny zo *S. agalactiae* majú perspektívu využitia v terapii urogenitálnych infekcií spôsobených týmto patogénom ako aj v profylaktickej dekolonizácii tehotných žien pri prevencii ochorení novorodencov. Produkcia a možnosti využitia endolýzínu EN534 sú súčasťou patentovej prihlášky PP 50075-2020.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v slovenskom jazyku (max. 20 riadkov)

Hlavným cieľom riešenia projektu bola príprava koktailu bakteriofágov, ktoré sú špecifické pre najčastejšie bakteriálne patogény zapríčiňujúce urogenitálne infekcie. V rámci projektu sme charakterizovali 19 fágov pre kmene *E. coli*, ktoré sú najčastejšími pôvodcami močových infekcií. Fágy sme na základe genómovej sekvencie zaradili do ôsmich taxonomických skupín. Zistili sme, že najširší okruh hostiteľov mali fágy z čeľadi Tevenvirinae a Autographiviridae. Zároveň blízko príbuzné fágy sa nanviac líšili v géne pre fágový adhezín a z tohto dôvodu mali odlišnú hostiteľskú špecificitu. Z fágov s najlepšimi lytickými vlastnosťami sme zostavili fágový koktail a overili sme dobrú účinnosť koktailu pri inhibícii kmeňov *E. coli* v tekutej kultúre, v simulovanom moči a v biofilme. Fágové koktaily sme enkapsulovali do alginátových kapsúl a zistili sme, že obalené fágy sú odolné voči kyslému pH žalúdka, ale účinne inhibujú rast bakteriálnej kultúry v simulovanej intestinálnej tekutine. V rámci riešenia projektu sme tiež študovali profágy prítomné v genómoch *Streptococcus agalactiae*, patogénu, ktorý spôsobuje závažné novorodenecké infekcie. Zistili sme, že väčšina kmeňov obsahovala 1-3 profágy a približne v polovici kmeňov bolo možné fágy indukovať mitomycínom C. Fágové endolýzíny majú schopnosť lyzovať bakteriálne bunky na konci lytického cyklu, tieto enzýmy sa vyznačujú vysokou aktivitou a širokou substrátovou špecificitou. V rámci riešenia projektu sme pripravili konštrukty, nadprodukovali a izolovali rekombinantné endolýzíny EN534-C, EN533-N a EN572-5-C z troch kmeňov *S. agalactiae*. Testovali sme podmienky pre optimálnu lytickú aktivitu a hostiteľské spektrum endolýzínov vzhľadom na prítomnosť baktérií vo vaginálnom prostredí. Získané endolýzíny preukázali sľubnú antibakteriálnu aktivitu voči cieľovým baktériám.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v anglickom jazyku (max. 20 riadkov)

The main goal of the project was to prepare phage cocktails that are specific to common bacterial pathogens causing urogenital infections. We characterized 19 phages specific for *E. coli* strains, the most common agents causing UTI. Based on the genomic sequences, we classified the phages into eight taxonomic groups. We found that phages from the Tevenvirinae and Autographiviridae families possessed the broadest host range. We observed that closely related phages mostly differed in the phage adhesin gene and hence they had different host specificities. We prepared a phage cocktail consisting of phages with the best lytic properties and verified the good performance of the cocktail in *E. coli* inhibition in liquid culture, simulated urine and in biofilm. We encapsulated the phage cocktails into alginate capsules and found that the coated phages were resistant to the stomach acidic pH and efficiently inhibited the bacterial growth in the simulated intestinal fluid. We also studied prophages present in *Streptococcus agalactiae* genomes, a pathogen that causes serious neonatal infections. We found that strains contained 1-3 prophages and it was possible to induce phages with mitomycin C in about half of the strains. Phage endolysins are able to lyse bacterial cells at the end of the lytic cycle, these enzymes are characterized by high activity and broad substrate specificity. In the project, we prepared expression plasmids, overproduced and isolated recombinant endolysins EN534-C, EN533-N and EN572-5-C

from three *S. agalactiae* strains. We tested conditions for optimal endolysin lytic activity and the host spectrum in a collection of vaginal bacterial strains. The prepared endolysins showed promising antibacterial activity against the target bacteria.