

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

304 337

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/122 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61K 9/06 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2012-266**
(22) Přihlášeno: **18.04.2012**
(30) Právo přednosti: **18.04.2012 CZ**
(40) Zveřejněno: **30.10.2013**
(Věstník č. 44/2013)
(47) Uděleno: **29.01.2014**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **12.03.2014**
(Věstník č. 11/2014)

(56) Relevantní dokumenty:

Vacek J. et al: Cytotoxicity and Pro-Apoptotic Activity of 2,2'-Bis[4,5-bis(4-hydroxybenzyl)-2-(4-hydroxyphenyl)cyclopent-4-en-1,3-dione], ...; *Molecules*, 2011, 16, str. 4254-4263, tabulka 1, 2. odst. str. 4256; Zelik P. et al: Nostotrebin 6, a bis(cyclopentenedione) with cholinesterase inhibitory activity isolated from *Nostoc* sp. str. Lukseova 27/97; *J. Enz. Inh. Med. Chemistry*; 2010, 225(3): 414-420; Noble M et al: G2201-C, a new cyclopentenedione antibiotic, isolated from the fermentation broth of *Streptomyces cattleya*. *The Journal of antibiotics*; 1978, 31(1), str.15-18; Lukowski G. et al: Inhibition of Dermal MRSA Colonization by Microalgal Micro- and Nanoparticles. *Skin Pharmacology and Physiology* 2008; 21: 98-105.
CZ 299567 B6; 65517.

(73) Majitel patentu:

Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, CZ
Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., Praha 4, CZ

(72) Původce:

Ing. Jan Vacek, Ph.D., Brno, Nový Lískovec, CZ
prof. RNDr. Jitka Ulrichová, CSc., Olomouc, CZ
prof. MUDr. Milan Kolář, Ph.D., Olomouc, CZ
Mgr. Kateřina Bogdanová, Ph.D., Olomouc, CZ
Ing. Jiří Kopecký, CSc., Třeboň, CZ

(74) Zástupce:

Inventia s.r.o., RNDr. Kateřina Hartvichová, Na
Bělidle 3, 150 00 Praha 5

(54) Název vynálezu:

**Použití nostotrebinu 6 pro léčbu
bakteriálních infekcí**

(57) Anotace:

Předkládané řešení se týká použití nostotrebinu 6 (2,2'-bis[4,5-bis(4-hydroxybenzyl)-2-(4-hydroxyfenyl)-cyklopent-4-en-1,3-dionu]) pro výrobu léčiva pro léčbu bakteriálních infekcí, s výhodou pro léčbu infekcí způsobených zlatým stafylokokem. Dále řešení poskytuje vhodnou topickou formulaci nostotrebinu 6.

CZ 304337 B6

Použití nostotrebinu 6 pro léčbu bakteriálních infekcí

Oblast techniky

Vynález se týká antibakteriálního činidla s baktericidním účinkem, zejména vhodného proti bakteri *Staphylococcus aureus* (zlatý stafylokok). Látka je účinná i proti rezistentním kmenům *S. aureus* (methicillin rezistentní zlatý stafylokok – MRSA) a je zejména použitelná pro topické aplikace ve formě mastí, krému a pasty.

Dosavadní stav techniky

Bakteriální infekce byly, jsou a s velkou pravděpodobností nadále budou jedním z nejzávažnějších problémů v medicíně. K hlavním důvodům patří skutečnost, že velká část těchto onemocnění má endogenní charakter a vychází z vlastního terapeutického a diagnostického přístupu k pacientům. V odborné literatuře je k dispozici řada prací poukazujících na vyšší mortalitu pacientů, u nichž došlo k rozvoji komplikující bakteriální infekce v průběhu hospitalizace. Například Alberti et al. (Alberti C, Brun–Buisson C, Burchardi H, et al. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. Intensive Care Med 2002;28:108–121) dokumentují vyšší mortalitu pacientů v intenzivní péči, u nichž došlo k rozvoji nozokomiální infekce, v porovnání s pacienty bez této komplikace.

Závažnost bakteriálních infekcí je významně ovlivněna stoupající odolností patogenních bakterií k antibiotické léčbě (Neu HC. The crisis in antibiotic resistance. Science 1992;257:1064–1073). Je nutné zdůraznit aktuální zdravotnický problém, počet bakteriálních infekcí s etiologickou rolí multirezistentních bakterií se neustále zvyšuje, přičemž se však nezvyšuje ve stejném poměru počet nových a účinných antibiotik. Tento narůstající rozpor má významné klinické dopady, především zvyšující se morbiditu a mortalitu pacientů se závažnými bakteriálními infekcemi. V současné odborné literatuře je k dispozici řada studií, dokladujících příčinnou souvislost mezi bakteriální rezistencí a selháním antibiotické léčby. Například Luna et al. (Luna CM, Vujacich P, Niederman MS, et al. Impact of BAL data on the therapy and outcome of ventilator–associated pneumonia. Chest 1997;111:676–685) uvádějí u pacientů s ventilátorovou pneumonií 38% mortalitu v případě adekvátní antibioterapie a 91% u pacientů léčených antibiotiky, proti kterým byly vyvolávající bakterie odolné. Tumbarello et al. (Tumbarello M, Sanguinetti M, Montuori E, et al. Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by extended–spectrum–beta–lactamase–producing *Enterobacteriaceae*: importance of inadequate initial antimicrobial treatment. Antimicrob Agents Chemother 2007;51:1987–1994) popisují mortalitu pacientů s infekcemi krevního řečiště způsobenými enterobakteriemi s pozitivní produkcí širokospektrých beta–laktamáz, která v případě neadekvátní antibiotické léčby dosáhla 60 % v porovnání s 19 %, pokud antibiotická léčba byla účinná. Micek et al. (Micek ST, Lloyd AE, Ritchie DJ, et al. *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection: importance of appropriate initial antimicrobial treatment. Antimicrob Agents Chemother 2005;49:1306–1311) uvádějí 31% mortalitu infekcí krevního řečiště s etiologickou rolí *Pseudomonas aeruginosa* u pacientů s neadekvátní antibiotickou léčbou v porovnání s 18% mortalitou pacientů, u nichž antibioterapie byla adekvátní, resp. účinná na patogenní kmeny *Pseudomonas aeruginosa*. Nelze opomenout methicilin–rezistentní kmeny *Staphylococcus aureus* (MRSA). Rello et al. (Rello J, Torres A, Ricart M, et al. Ventilator–associated pneumonia by *Staphylococcus aureus*. Comparison of methicillin–resistant and methicillin–sensitive episodes. Am J Respir Crit Care Med 1994;150:1545–154) popisují 86% mortalitu u pacientů s ventilátorovou pneumonií s etiologickou rolí MRSA v porovnání s 12% v případě izolátů *Staphylococcus aureus* citlivých na methicilin/oxacilin.

Současný stav lze tedy charakterizovat jako „krizi antibiotické účinnosti“ způsobenou celosvětovým růstem bakteriální rezistence v humánní i animální populaci, stoupající četností multi– a panrezistentních kmenů, snižováním klinické účinnosti antimikrobiálních léčiv a souvisejícím

selháváním léčby. Nedílnou součástí řešení tohoto problému je izolace a syntéza nových látek a jejich následné uplatnění v klinické praxi jako účinných antimikrobních přípravků.

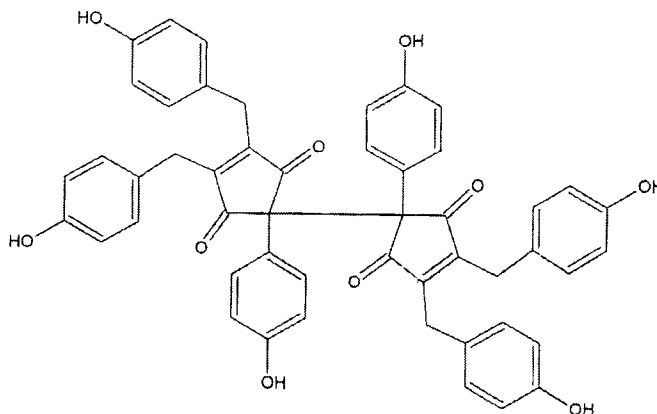
Látka 2,2'-bis[4,5-bis(4-hydroxybenzyl)-2-(4-hydroxyfenyl)-cyklopent-4-en-1,3-dion] (takéž označována jako: nostotrebin 6) byla popsána v roce 2010 (Zelik P, Lukesova A, Cejka J; et al. Nostotrebin 6, a bis(cyclopentenedione) with cholinesterase inhibitory activity isolated from *Nostoc* sp str. Lukesova 27/97. J. Enz. Inhib. Med. Chem. 2010;25: 414–420). Nostotrebin 6 je ve vodě rozpustný a za standardních podmínek stabilní plně substituovaný bis-cyklopentendion. Cytotoxicita nostotrebinu 6 byla studována na *in vitro* modelu potkaních fibroblastů (BALB/c). IC₅₀ pro nostotrebin 6 určená pomocí MTT testu byla asi 10-ti násobně nižší ve srovnání s cytotoxickým účinkem antracyklinového antibiotika – doxorubicinu (Vacek J, Hrbac J, Kopecky J, Vostalova J. Cytotoxicity and Pro-Apoptotic Activity of 2,2'-Bis[4,5-bis(4-hydroxybenzyl)-2-(4-hydroxyphenyl)cyclopent-4-en-1,3-dione], a Phenolic Cyclopentendione Isolated from the Cyanobacterium Strain *Nostoc* sp. str. Lukesova 27/97. Molecules 2011;16:4254–4263).

15

Podstata vynálezu

Podstatou předkládaného vynálezu je antimikrobiální účinek nostotrebinu 6 (2,2'-bis[4,5-bis(4-hydroxybenzyl)-2-(4-hydroxyfenyl)-cyklopent-4-en-1,3-dionu]), jehož strukturní vzorec je:

20



Předmětem předkládaného vynálezu je použití nostotrebinu 6 pro přípravu antibakteriálního léčiva, zejména pro léčbu infekcí způsobených bakterií *Staphylococcus aureus*, s výhodou *Staphylococcus aureus* MRSA.

25

Vzhledem k poměrně nízké toxicitě je nostotrebin 6 vhodný pro farmakologické využití jako antibakteriální léčivo, především ve formě vhodné pro topickou aplikaci. Látku lze s výhodou opticky aplikovat ve formě polotuhé lékové formy. Topickou aplikací je myšleno nanesení přípravku obsahujícího nostotrebin 6 na povrch kůže nebo sliznice.

30

Topický přípravek obsahující nostotrebin 6 je s výhodou, ve formě masti, gelu, krému či pasty. Tento přípravek obsahuje kromě nostotrebinu 6 obvykle také masťový, krémový či pastový základ. Tyto základy obvykle obsahují parafin, vazelínu, talek či oxid zinečnatý.

35

K supresi či úplnému odstranění infekcí způsobených bakterií *S. aureus* lze použít topické aplikace nostotrebinu 6 ve formě masti, krému a pasty. Aplikovatelný obsah nostotrebinu 6 v jednotlivých formulacích byl nastaven s ohledem na inhibiční efekty substance na *S. aureus* MRSA 4591 pozorovatelné v průběhu 24 h. Minimální množství s farmakologickým účinkem je 0,2 mg/100 g přípravku. Ve výhodném provedení vynálezu se pohybuje množství účinné látky nostotrebinu 6 v přípravku v rozmezí 0,2 mg až 2 g/100 g přípravku.

40

Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1 znázorňuje růstové křivky *S. aureus* MRSA 4591 v přítomnosti různých koncentrací nostotrebinu 6. Koncentrace nostotrebinu 6 (v pravém rámečku) jsou uváděny v mg.ml^{-1} .

5

Příklady provedení vynálezu

Antimikrobiální účinky nostotrebinu 6 byly testovány na bakterii *Staphylococcus aureus* (zlatý stafylokok), která představuje důležitého původce tzv. nozokomiálních infekcí. Nejprve byly standardním postupem připraveny bakteriální kmeny *Staphylococcus aureus* CCM 3953, *S. aureus* CCM 4223 a *S. aureus* MRSA 4591 (MRSA: methicilin–rezistentní kmen), což je detailně rozvedeno v příkladu 1. Testování antimikrobiálního účinku bylo provedeno pomocí diluční metody (příklad 2), za použití mikrotitračních destiček (tab. 1). Minimální inhibiční koncentrace (MIC) nostotrebinu 6 byla $15,6 \mu\text{g.ml}^{-1}$ (tj. $19,5 \mu\text{M}$), a to ke všem testovaným kmenům *S. aureus* (tab. 2). Parametr MIC odpovídá nejnižší koncentraci agens, která prokazatelně inhibuje růst testovaných mikroorganismů. Účinek nostotrebinu 6 je baktericidní (tab. 2), což znamená, že při $\text{MIC}=15,6 \mu\text{g.ml}^{-1}$ nedochází pouze k potlačení růstu a množení bakterií (bakteriostatický efekt), ale bakteriální buňky jsou nevratně destruovány. Antibakteriální efekt různých koncentrací nostotrebinu 6 (tab. 3) byl dokumentován také pomocí sledování růstových křivek. Vzhledem k tomu, že MIC jsou stejné pro všechny testované kmeny *S. aureus*, je růstová charakteristika ukázána pouze v případě kmene *S. aureus* MRSA 4591. Ke konstrukci růstových křivek (24 h) byla použita fotometrická analýza a mikrodiluční metoda (příklad 3). K potlačení růstu a množení bakterií docházelo již při použití $1,95 \mu\text{g.ml}^{-1}$ (tj. $2,4 \mu\text{M}$) nostotrebinu 6 (obr. 1).

25

Příklad 1

Příprava bakteriálních suspenzí pro naočkování

30

Bakteriální suspenze pro naočkování byly připraveny následujícím způsobem. Bakteriální kmeny *Staphylococcus aureus* CCM 3953, *Staphylococcus aureus* CCM 4223 a *Staphylococcus aureus* MRSA 4591 byly naočkovány na krevní agar a inkubovány 24 h při 37°C . Při přípravě bakteriální suspenze bylo sterilní bakteriální kličkou přeneseno 4 až 5 dobře izolovaných kolonií do 2 ml tekuté kultivační půdy a inkubováno 2 h při 37°C . Bujón s bakteriální suspenzí byl poté ředěn v Petriho misce v 10 ml sterilní destilované vody. Do mikrotitračních destiček bylo pomocí očkovačeho ježka inokulováno standardní množství testovaného mikroba – hustota inokula v jamce odpovídala 10^5 až 10^6 CFU/ml (colony forming units).

40

Příklad 2

Určení MIC a baktericidního/bakteriostatického účinku nostotrebinu 6

Před vlastním pokusem byla testována antimikrobní aktivita DMSO a byl stanoven postup pro ředění DMSO, které nijak neovlivnilo růst testovaných bakteriálních kmenů. Roztok pro testování antimikrobiální účinnosti byl připraven rozpuštěním nostotrebinu 6 v DMSO (koncentrace zásobního roztoku: 50mg.ml^{-1}). Zásobní roztok byl ředěn v tekutém kultivačním médiu ve sterilní zkumavce na pracovní roztok o koncentraci 1mg.ml^{-1} . Objem $200 \mu\text{l}$ pracovního roztoku byl pipetován do první řady 96–ti jamkové mikrotitrační destičky s výjimkou jamek, které sloužily jako pozitivní kontrola růstu bakterie. Do zbylých jamek destičky bylo pipetováno $100 \mu\text{l}$ tekutého kultivačního média. Z první jamky obsahující testovanou látku o koncentraci 1mg.ml^{-1} bylo přepipetováno $100 \mu\text{l}$ do jamky v nižší řadě, promícháno a přeneseno do následující a opakováno až do poslední řady destičky. Pro použitý postup se používá název diluční mikrometoda. Výsled-

50

né koncentrace jsou uvedeny v tab. 1, která zároveň schematicky znázorňuje rozložení pokusu na mikrotitrační destičce. Suspenze použitých bakterií pak byly očkovány do 4 sloupců mikrotitrační destičky, 3 sloupce s řaděnými vzorky a jeden sloupec sloužící jako kontrola růstu. Naočkované mikrotitrační destičky se inkubovaly 24 h při 37 °C a podle přítomnosti/nepřítomnosti viditelného zákalu média nebo sedimentu na dně jamek se hodnotila minimální inhibiční koncentrace (MIC) jako nejnižší koncentrace testované látky – nostotrebinu 6, která inhibovala viditelný růst bakterie.

Dále byl testován baktericidní/bakteriostatický účinek nostotrebinu 6. Pomocí očkovacího ježka byla přeočkována část obsahu jamek destičky na krevní agar, který byl kultivován 24 h při 37 °C. Negativní/pozitivní růst po 24 h značí baktericidní/bakteriostatický účinek testované látky, tj. jestli látka bakterie v suspenzi usmrcuje, nebo pouze inhibuje jejich růst a množení. Koncentrace, při kterých k tomuto dochází, se pak označí jako MIC/MBS v případě bakteriostatického účinku a MIC/MBC v případě baktericidního účinku. Výsledky testování nostotrebinu 6 jsou uvedeny v tab. 2.

Tabulka 1: Schematické znázornění mikrotitrační destičky při testování antimikrobiálního účinku nostotrebinu 6 na vybraných kmenech *Staphylococcus aureus*.

<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953			<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4223			<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA 4591					
1	1	1	Kontrola růstu	1	1	1	Kontrola růstu	1	1	1	Kontrola růstu
0,5	0,5	0,5		0,5	0,5	0,5		0,5	0,5	0,5	
0,25	0,25	0,25		0,25	0,25	0,25		0,25	0,25	0,25	
0,125	0,125	0,125		0,125	0,125	0,125		0,125	0,125	0,125	
0,0625	0,0625	0,0625		0,0625	0,0625	0,0625		0,0625	0,0625	0,0625	
0,0312	0,0312	0,0312		0,0312	0,0312	0,0312		0,0312	0,0312	0,0312	
0,0156	0,0156	0,0156		0,0156	0,0156	0,0156		0,0156	0,0156	0,0156	
0,0078	0,0078	0,0078		0,0078	0,0078	0,0078		0,0078	0,0078	0,0078	

Koncentrace nostotrebinu 6, mg.ml⁻¹

Tabulka 2: MIC (minimální inhibiční koncentrace) pro nostotrebin 6 na vybraných kmenech *Staphylococcus aureus*.

Testovaná látka	<i>Bis</i> -cyklopentendion – nostotrebin 6		
Bakteriální kmeny	<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953	<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4223	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA 4591
MIC mg/ml	0,0156	0,0156	0,0156
účinek	MIC/MBC	MIC/MBC	MIC/MBC

MIC/MBC – minimální inhibiční koncentrace je rovna minimální baktericidní koncentraci

Příklad 3

Měření růstových křivek *Staphylococcus aureus* MRSA 4591 v přítomnosti nostotrebinu 6

Roztok pro testování antimikrobiální účinnosti byl připraven rozpuštěním nostotrebinu 6 v DMSO (koncentrace zásobního roztoku 50 mg.ml⁻¹). Zásobní roztok byl naředěn v tekutém kultačním médiu ve sterilní zkumavce, na pracovní roztok o koncentraci 0,125 mg.ml⁻¹. Objem 200 µl pracovního roztoku byl pipetován do první řady 96-ti jamkové mikrotitrační destičky. Do

zbylých jamek destičky bylo pipetováno 100 μl tekutého kultivačního média. Z první jamky obsahující testovanou látku o koncentraci 0,125 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ bylo přepipetováno 100 μl do jamky v nižší řadě, promícháno a přeneseno do následující a opakováno až do předposlední řady destičky. Poslední řada jamek sloužila jako pozitivní kontrola růstu bakterie. Pro použitý postup se používá název diluční mikrometoda. Výsledné koncentrace jsou uvedeny v tab. 3, která zároveň schematicky znázorňuje rozložení pokusu na mikrotitrační destičce. Suspenze *Staphylococcus aureus* MRSA 4591 pak byla očkovaná do 3 sloupců mikrotitrační destičky. Destička byla přelepena fólií, aby se zabránilo vysychání a umístěna do spektrofotometru se zabudovaným inkubátorem nastaveným na 37 °C. Pomocí nastaveného programu pak probíhalo měření (vlnová délka: 610 nm) každou hodinu po dobu 24 h. Naměřené a zprůměrované hodnoty byly použity k sestavení růstových křivek (obr. 1).

Tabulka 3: Schematické znázornění mikrotitrační destičky použité pro získání růstových křivek *Staphylococcus aureus* MRSA 4591 v přítomnosti nostotrebinu 6.

<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA 4591		
0,125	0,125	0,125
0,0625	0,0625	0,0625
0,03125	0,03125	0,03125
0,0156	0,0156	0,0156
0,0078	0,0078	0,0078
0,0039	0,0039	0,0039
0,00195	0,00195	0,00195
Kontrola růstu		

Koncentrace nostotrebinu 6, $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$

20

Příklad 4

Přípravky s nostotrebinem 6 ve formě krému, masti a pasty (vyjádřeno na 100 g přípravku)

25

Krém: Pro přípravu krému byl použit nostotrebin 6: 0,2 mg až 2 g/100 g přípravku, jehož základem je: tekutý parafin (paraffinum liquidum, 8 g), tvrdý parafin (paraffinum solidum, 12 g), cetylstearylalkohol (2 g), dodecylpolyethylenglykolether (Laureth-9, 2 g), carbomer 980 (0,42 g), triethanolamin (trolaminum, 0,53 g), methylparaben (0,2 g), propylparaben (0,05 g), propylenglykol (5 g), doplněno čistou vodou (aqua purificata) do 100 g.

30

Mast: Pro přípravu masti byl použit nostotrebin 6: 0,2 mg až 2 g/100 g přípravku, jehož základem je: tekutý parafin (paraffinum liquidum, 29 g), tvrdý parafin (paraffinum solidum, 4 g), lanolin (adeps lanae, 20 g), bílý vosk (cera alba, 1,5 g), cholesterol (3 g), polysorbát – polyoxyethylen-(20)sorbitan monooleát (0,17 g), doplněno žlutou vazelinou (vaselinum flavum) do 100 g.

35

Pasta: Pro přípravu pasty byl použit nostotrebin 6: 0,2 mg až 2 g/100 g přípravku, jehož základem je: oxid zinečnatý (ZnO), pšeničný škrob (tritici amyllum) a žlutá vazelína (vaselinum flavum) (25:25:50; w/w/w; %).

Průmyslová využitelnost

5 Nostotrebin 6 (2,2'-bis[4,5-bis(4-hydroxybenzyl)-2-(4-hydroxyfenyl)-cyklopent-4-en-1,3-dion]) může být využit jako antimikrobiální agens vhodné k léčbě infekcí způsobených bakterií *Staphylococcus aureus*.

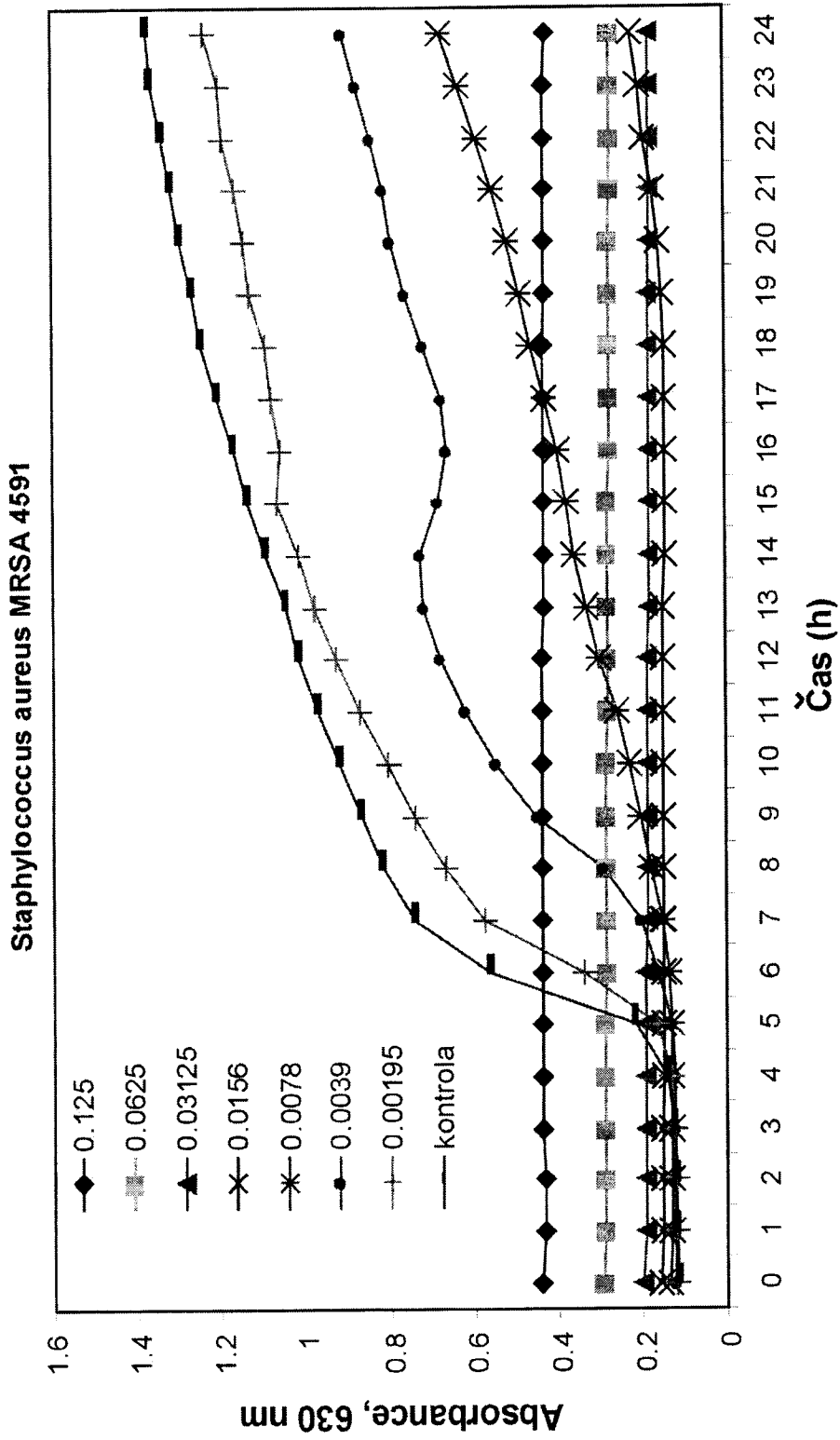
10

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Použití nostotrebinu 6 pro výrobu léčiva pro léčbu bakteriálních infekcí.
- 15 2. Použití nostotrebinu 6 pro výrobu léčiva pro léčbu bakteriálních infekcí způsobených bakterií *Staphylococcus aureus*.
- 20 3. Použití podle nároku 1 nebo 2, kde vyráběné léčivo je přípravek pro topickou aplikaci, obsahující nostotrebin 6 v množství alespoň 0,2 mg/100 g přípravku, a tento přípravek je ve formě masti, gelu, krému či pasty.
4. Použití podle nároku 3, kde vyráběné léčivo je přípravek pro topickou aplikaci, obsahující nostotrebin 6 v množství v rozmezí 0,2 mg až 2 g/100 g přípravku.
- 25 5. Použití podle nároku 3 nebo 4, kde vyráběné léčivo je přípravek pro topickou aplikaci, dále obsahující parafin, vazelínu a/nebo oxid zinečnatý.

30

1 výkres



Obr. 1

Konec dokumentu