

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

32 606

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

A61K 35/76 (2015.01)
A61K 47/36 (2006.01)
A61K 47/38 (2006.01)
A61K 9/10 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2019-35809**
(22) Přihlášeno: **08.01.2019**
(47) Zapsáno: **22.02.2019**

- (73) Majitel:
Bentley Czech s.r.o., Praha 10, Malešice, CZ
Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha 6,
Vokovice, CZ
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.,
Brno, Medlánky, CZ
Masarykova univerzita, Brno, CZ
- (72) Původce:
Mgr. Jan Říha, Ph.D., Maletín, CZ
doc. Marcela Vyletěllová- Klimešová, Ph.D.,
Šumperk, CZ
doc. MVDr. Renáta Karpíšková, Ph.D., Brno,
Veveří, CZ
MVDr. Ivana Koláčková, Ph.D., Moravské
Knínice, CZ
prof. RNDr. Jiří Doškař, CSc., Brno, Bohunice, CZ
doc. RNDr. Roman Pantůček, Ph.D., Brno,
Řečkovice, CZ
Mgr. Martin Benešik, Ph.D., Strání, CZ
- (74) Zástupce:
NEOLEGAL - advokátní a patentová kancelář, Ing.
Jaroslav Novotný, Římská 2135/45, 120 00 Praha 2,
Vinohrady

- (54) Název užitého vzoru:
**Neantibiotický přípravek pro léčbu
stafylokokových infekcí hospodářských
zvířat**

CZ 32606 U1

Neantibiotický přípravek pro léčbu stafylokokových infekcí hospodářských zvířat

Oblast techniky

5

Technické řešení se týká přípravku s využitím fágového lyzátu, který je vhodný k léčbě bakteriálních infekcí u hospodářských zvířat, má vhodnou lékovou a aplikační formu.

10 Dosavadní stav techniky

Pro léčbu bakteriálních infekcí hospodářských zvířat se v současné době využívá převážně antibiotická léčba. V souvislosti s požadovaným snížením spotřeby antibiotik, jak ve veterinární, tak humánní medicíně je snaha o vývoj alternativních léčebných postupů. Antibiotická léčba bakteriálních infekcí hospodářských zvířat má navíc řadu nedostatků, zejména neúčinnost na existující rezistentní kmeny způsobujících infekce hospodářských zvířat nebo vznik takových bakteriálních kmenů rezistentních vůči antibiotikům, nutnost stanovení citlivosti původců bakteriálních infekcí vůči antibiotikům a nemožnost využít suroviny – mléko a maso poskytovaných zvířaty s antibiotickou léčbou a mnohé další.

20

V případě využití podpůrných léčebných postupů při léčbě bakteriálních infekcí je problémem jejich omezená účinnost, omezené aplikační možnosti a specifická (např. baktericidní látky mohou být účinné i proti bakteriím přítomným v žaludku či jinde v organismu hospodářských zvířat, a tím negativně ovlivnit jejich metabolismus v případě orální či jiné aplikace).

25

V prostředí zemědělské prvovýroby se vyskytuje přirozeně velké množství bakterií, které způsobují infekční onemocnění hospodářských zvířat, v řadě případů přenositelných i na člověka. Fágová terapie se proto v současné době jeví jako vhodná alternativa pro léčbu bakteriálních infekcí. Odstraňuje zejména problém vzrůstající rezistence bakteriálních kmenů vůči antibiotickým léčivům, např. u meticilin rezistentních kmenů *Staphylococcus aureus* (MRSA), za zachování vhodné specifity působení, kdy bakteriofág působí lyticky pouze za předpokladu existence vhodného hostitele.

30

Problémem využití fágové terapie u hospodářských zvířat je neexistence vhodné lékové formy, specifická vůči bakteriím vyskytujícím se v prostředí zemědělské prvovýroby a postup vhodné aplikace. Vhodné lékové formy a specifická jsou proto předmětem vývoje. Ve formě tzv. fágového lyzátu jsou komerčně dostupné prostředky – např. PyoPhage (Eliava Institute), StaphylococcusPhage (Microgen), Stafal (Bohemia Pharmaceuticals). Aplikační forma – fágový lyzát – je náročná na skladování – nutnost chlazení, omezená doba použitelnosti, i na samotnou aplikaci – jedná se typicky o málo viskózní tekutinu – filtrát fágového lyzátu v pufrovaném roztoku vhodný pro lokální kožní aplikace. Aplikaci takové lékové formy však může být omezená např. v případě nasálních infekcí hospodářských zvířat, ale také vnitřní infekce – orální aplikace způsobí letální reakci fága působením žaludečních šťáv či funkcí trávicího traktu. Navíc bakteriofágy používané pro terapii infekcí člověka nemusí být účinné na bakteriální kmeny v prostředí zemědělské prvovýroby.

45

Podstata technického řešení

Uvedené nedostatky odstraňuje neantibiotický přípravek pro léčbu stafylokokových infekcí hospodářských zvířat podle tohoto technického řešení, jehož podstata spočívá v tom, že obsahuje alespoň 15 % obj. purifikovaného či nepurifikovaného fágového lyzátu bakteriofága 812h1 (= CAPM V-689), ve výsledném titru alespoň 10^8 PFU/ml, s účinností proti meticilin rezistentním kmenům *Staphylococcus aureus* (MRSA) v prostředí zemědělské prvovýroby, a kde zbytek do 100 % objemu tvoří pomocné látky pro úpravu viskozity přípravku a/nebo konzervační

55

a stabilizující látky. Přípravek je ve formě gelu perzistujícím na místě aplikace nebo je ve formě spreje. Jedná se o lyzát stafylokokového bakteriofága 812h1, z čeledi *Myoviridae*, rodu *Kayvirus*, charakterizovaný sekvencí genomové DNA dostupnou pod přístupovým kódem v databázi GenBank MH844529, pomnožený na bakteriálním kmeni *Staphylococcus aureus* CAPM 6630 (= SAV456), který je deponován ve Sbírce zoopatogenních mikroorganismů (CAPM) pod číslem CAPM V-689. Purifikovaný či nepurifikovaný bakteriofág 812h1 v titru alespoň 10^8 PFU/ml vykazuje účinnost proti 89 % z 92 testovaných kmenů MRSA v prostředí zemědělské prvovýroby. Přípravek je ve formě gelu perzistujícím na místě aplikace nebo je ve formě spreje, kteréžto formy umožňují jeho snadnou aplikaci, skladování a nabízí specifitu vůči patogenům vyskytujícím se v prostředí zemědělské prvovýroby.

Jako optimální forma pro začlenění fágového lyzátu, za předpokladu zachování jeho lytických schopností u vybraných bakteriálních kmenů, do lékové formy vhodné pro lokální aplikaci u hospodářských zvířat (např. v případě nasální infekce) se jeví forma gelu. Gel je schopen vytvořit a uchovat podmínky pro přežití fága v aktivní formě a zároveň poskytnout vhodné aplikační vlastnosti – perzistence na místě aplikace, prodloužení účinku díky pomalejší degradaci prostředí pro přežití fága – dehydrataci gelové struktury. Stejně výhody jsou pak zjevné při skladování takového přípravku. Gel může být proveden s využitím různých substancí – např. hydroxyethylcelulosa, agar-agar a proveden v různé výsledné hustotě. To rozšiřuje možnosti aplikačních forem – např. aplikace hustého gelu na nasální sliznici, lokální infekční místo, či použití méně viskózní formy gelu např. ve formě spreje.

Pro skladování popsaných přípravků, využívajících fágového lyzátu na gelové bázi je nutné využít chemicky inertní materiály – např. sklo (nikoliv plast – polypropylen, atd.).

Jako vhodné konzervační látky jsou stanoveny nízké obsahy kyseliny citronové – 0,01 % hmotn. případně stejné množství směsi metyl- a propyl- parabenu. Vyšší dávky konzervantů vedou k inhibici fágové aktivity.

V rámci výzkumného projektu NAZV QJ1510216 proběhlo testování účinků přípravků s obsahem 15 % obj. fágového lyzátu fága 812h1 *in vitro* a ve formě gelové lékové formy u prasat. V jedné terapeutické dávce o objemu 1 ml bylo obsaženo minimálně 10^8 bakteriofágových částic tvořících plaky na pomnožovacím kmeni *S. aureus* CAPM 6630.

In vitro testy:

A. metoda na principu fágové typizace

Gelové přípravky s obsahem 15 % obj. purifikovaného nebo nepurifikovaného lyzátu byly testovány *in vitro* na 11 kmenech *S. aureus*. Výsledky testování vykazaly mírné rozdíly mezi oběma přípravky. U přípravku s obsahem purifikovaného fágového lyzátu byly zjištěny pozitivní reakce s testovacími kmeny i v ředění 10^{-4} , a to u 72 % sledovaných kmenů. U přípravku s obsahem nepurifikovaného lyzátu byly v tomto ředění pozitivní reakce zaznamenány pouze u 2 kmenů (18 %) (Tabulka 1 a 2).

Tabulka 1. Výsledky *in vitro* testování přípravku s obsahem purifikovaného fága

Označení kmene	MLST/ <i>spa</i> typ	Původ	Ředění fágového přípravku						Poz. kontrola pur. Fág 15%
			1E+00	1E-01	1E-02	1E-03	1E-04	1E-05	
SAV113	ST398/t011	prase	+++	+++	+++	++	+	-	SCL
SAV139	ST398/t011	prase	CL	+++	++	+	+	-	CL
SAV337	ST398/t034	skot	CL	CL	+++	+	-	-	CL
SAV342	ST398/t034	prase	CL	CL	+++	+	-	-	CL
SAV719	ST398/t2346	prase	CL	+++	+++	+	+	-	CL
SAV721	ST398/t1255	skot	SCL	+++	+++	++	+	-	SCL
SAV729	ST398/t034	prase	SCL	+++	+++	++	+	-	CL
SAV753	ST398/t011	skot	SCL	+++	+++	+	+	-	SCL
SA1098	ST8/t064	koza	CL	CL	SCL	+	-	-	CL
SA2094	ST361/t315	skot	CL	CL	+++	++	+	-	CL
SA2171	ST398/t011	skot	SCL	+++	+++	+	+	-	CL

CL (konfluentní lýza), SCL (semi-konfluentní lýza), +++ (více než 10 plaků), ++ (5 až 10 plaků), + (2 až 5 plaků), - negativní reakce

5

Tabulka 2. Výsledky *in vitro* testování přípravku s obsahem nepurifikovaného fága

Označení kmene	MLST/ <i>spa</i> typ	Původ	Ředění fágového přípravku						Poz. kontrola nepur. Fág 15%
			1E+00	1E-01	1E-02	1E-03	1E-04	1E-05	
SAV113	ST398/t011	prase	+++	+++	++	+	-	-	SCL
SAV139	ST398/t011	prase	SCL	+++	++	+	-	-	SCL
SAV337	ST398/t034	skot	CL	SCL	++	+	-	-	CL
SAV342	ST398/t034	prase	CL	CL	+++	+	-	-	CL
SAV719	ST398/t2346	prase	CL	+++	+++	+	-	-	CL
SAV721	ST398/t1255	skot	SCL	+++	+++	+	-	-	SCL
SAV729	ST398/t034	prase	SCL	+++	+++	++	+	-	CL
SAV753	ST398/t011	skot	SCL	+++	+++	+	-	-	SCL
SA1098	ST8/t064	koza	CL	CL	+++	++	-	-	CL
SA2094	ST361/t315	skot	CL	CL	+++	+	+	-	CL
SA2171	ST398/t011	skot	CL	SCL	+++	+	-	-	CL

CL (konfluentní lýza), SCL (semi-konfluentní lýza), +++ (více než 10 plaků), ++ (5 až 10 plaků), + (2 až 5 plaků), - negativní reakce

10

B. metoda sledování účinku fága v reálném čase s využitím osobních bioreaktorů

Sledování růstu kmene *S. aureus* (SAV342) a účinku přípravků s obsahem fágového lyzátu bakteriofága 812h1 na tuto kulturu v reálném čase bylo provedeno také s využitím bioreaktorů RTS01 (Biosan, LVA), a to ve 4 paralelně běžících jednotkách, kdy jednotka 1 obsahovala pozitivní kontrolu 1 (bakteriální suspenze v živném bujónu o koncentraci 10^4 KTJ/ml a 1/10 objemu přidaného fyziologického roztoku); jednotka 2 pozitivní kontrolu 2 (bakteriální suspenze v živném bujónu o koncentraci 10^4 KTJ/ml a 1/10 objemu přidané báze přípravku);

15

jednotka 3 vlastní přípravek s obsahem fágového lyzátu (bakteriální suspenze v živném bujónu o koncentraci 10^4 KTJ/ml a 1/10 objemu přidaného přípravku s fágovým lyzátem) a jednotka 4 negativní kontrolu (živný bujón).

- 5 Po celou dobu sledování (24 h) nedošlo ve vzorku obsahujícím fágový lyzát ke zvýšení optické denzity resp. k pomnožení bakteriálního kmene. V pozitivních kontrolách (Nutrient bujón, bakteriální kultura a fyziologický roztok nebo báze) došlo k nárůstu bakteriální kultury na měřitelnou hodnotu po 6 h (Obr. 1).

10

Objasnění výkresů

Obr. 1: Graf 1. Sledování účinku gelového přípravku s obsahem purifikovaného fágového lyzátu na kulturu kmen *S. aureus* v reálném čase.

15

In vivo test:

Testování probíhalo v souladu se schváleným projektem pokusu č. 34786/2015-MZE-17214 v experimentálních stájích Výzkumného ústavu veterinárního lékařství, v.v.i.

20

K testování byla použita odstavená selata o hmotnosti 6 až 12 kg. Po příjmu do experimentálních stájí byla zvířata označena a rozdělena do skupin. U všech zvířat byl proveden nasální a rektální výtěr k průkazu přítomnosti bakterií *S. aureus*/MRSA s negativním výsledkem.

25

Skupiny zvířat v testu:

- KONEG – selata bez infekce MRSA (7 ks)
- KOPOZ – selata s infekcí bez aplikace přípravku (6 ks)
- 30 • TEST 1 – selata s infekcí MRSA a aplikací přípravku na bázi purifikovaného fágového lyzátu (6 ks)
- TEST 2 – selata s infekcí MRSA a aplikací přípravku na bázi nepurifikovaného fágového lyzátu (6 ks)

35

Infekce čelenžním kmenem MRSA *S. aureus* SAV342 byla provedena u příslušných skupin na začátku pokusu (v den 0) intranazálně aplikací 1 ml bakteriální suspenze z kmene SAV342 o denzitě (2×10^5 KTJ/ml) a byla opakována až do 13 dne.

40

Úroveň kolonizace byla sledována v kontrolních nazálních výtěrech odebíraných 4., 7., 11. a 13. den, kdy byla zjištěna průměrná denzita MRSA 5×10^3 KTJ/ml ve skupině pozitivní kontrola a test 2, 3×10^2 KTJ/ml ve skupině test 1.

45

Od 14. dne pokusu byl zvířatům ve skupinách test 1, 2 aplikován intranazálně příslušný přípravek (lehký gel) s obsahem nepurifikovaného fágového lyzátu (test1) nebo purifikovaného fágového lyzátu (test 2) v dávce 2,5 ml do každé nozdry. Denzita MRSA na sliznicích byla sledována v kontrolní výtěrech odebíraných 14., 15., 16., 18., 19., 20., 21., 22. den pokusu. Bylo zjištěno, že ve skupině pozitivní kontrola došlo k navýšení počtu MRSA na finálních 1×10^4 KTJ/ml. Ve skupině test 1 (přípravek s obsahem nepurifikovaného fágového lyzátu) došlo také k navýšení MRSA o 1 řád tj. 5×10^3 KTJ/ml. U skupiny test 2, kde byl aplikován přípravek s obsahem purifikovaného fágového lyzátu, došlo ke snížení počtu MRSA na 5×10^2 KTJ/ml.

50

Současně byla také sledována schopnost přežívání bakteriofágů na nazální sliznici testovaných prasat a bylo prokázáno, že fágy je možné zpětně izolovat z nazálních výtěrů testovaných prasat za 24 h od aplikace obou přípravků.

- 5 Pokus na zvířatech potvrdil schopnost přípravků s obsahem purifikovaných fágů omezit výskyt kmenů *S. aureus*/MRSA, i když nedochází k jejich úplné eliminaci.

Příklad uskutečnění technického řešení

10

Přípravek ve formě gelu či spreje obsahuje alespoň 15 % obj. purifikovaného či nepurifikovaného fágového lyzátu bakteriofága 812h1 (= CAPM V-689), ve výsledném titru min. 10^8 PFU/ml, s účinností proti meticilin rezistentním kmenům *Staphylococcus aureus* v prostředí zemědělské prvovýroby.

15

1. Gel k aplikaci do nosální dutiny a postup jeho přípravy:

- navážka (0,3 až 0,6 % hmotn. agaru (agar-agar, bakteriologický (Carl Roth)));
- 20 • přidání demineralizované vody - ad 100 % hmotn.;
- rozmíchání agaru v roztoku;
- bobtnání agaru v roztoku, 15 minut;
- 25 • rozvaření v autoklávu 121 °C, 20 minut.
- vychladnutí na pokojovou teplotu, rozšlehání na homogenní hmotu bez hrudek – min 600 ot./min po dobu 20 min;
- 30 • vmíchání fágového lyzátu fága 812h1 (= CAPM V-689), purifikovaného či nepurifikovaného, ve výsledném titru min. 10^8 PFU/ml, do výsledné koncentrace 15 % obj. v roztoku;
- 35 • případně vmíchání konzervačních/stabilizujících látek (kys. citronová nebo směs metylparabenu a propylparabenu) – max. 0,01 % hmotn.

2. Sprej k plošné aplikaci a postup jeho přípravy

- 40 • navážka (0,3 až 0,4 % hmotn. hydroxyethylcelulosity);
- přidání demineralizované vody s obsahem 0,1 % hmotn. NaCl - ad 100 % hmotn.;
- rozmíchání roztoku při 40 °C;
- 45 • sterilizace roztoku v autoklávu 121 °C, 5 minut;
- vychladnutí roztoku na teplotu 37 °C;
- 50 • míchání roztoku při 600 ot./min po dobu 10 min;
- vmíchání fágového lyzátu fága 812h1 (= CAPM V-689), purifikovaného či nepurifikovaného, ve výsledném titru min. 10^8 PFU/ml, do výsledné koncentrace 25 % obj. v roztoku;

55

- případně vmíchání konzervačních/stabilizujících látek (kys. citronová nebo směs metylparabenu a propylparabenu) – max. 0,01 % hmotn.

5 Skladování ve sterilní skleněné nádobě a v temnu. Doba použitelnosti až 6 měsíců při skladování v lednici – při 4 °C.

Průmyslová využitelnost

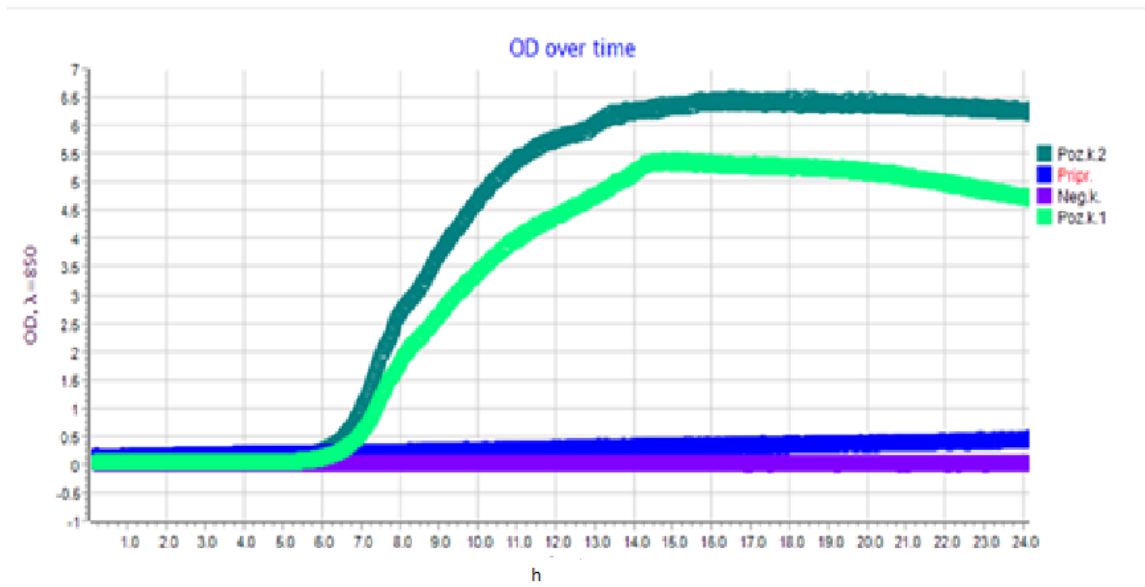
10 Technické řešení a je možno využít přímo k produkci veterinárního léčiva, resp. jeho lékové formy.

15

NÁROKY NA OCHRANU

1. Neantibiotický přípravek pro léčbu stafylokokových infekcí hospodářských zvířat, **vyznačující se tím**, že obsahuje alespoň 15 % obj. purifikovaného či nepurifikovaného fágového lyzátu bakteriofága 812h1 (= CAPM V-689), ve výsledném titru alespoň 10^8 PFU/ml, s účinností proti meticilin rezistentním kmenům *Staphylococcus aureus* v prostředí zemědělské prvovýroby, a kde zbytek do 100 % objemu tvoří pomocné látky pro úpravu viskozity přípravku a/nebo konzervační a stabilizující látky.
20
2. Přípravek podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že je ve formě gelu perzistujícím na místě aplikace nebo je ve formě spreje.
25

1 výkres



Obr. 1: Graf 1. Sledování účinku gelového přípravku s obsahem purifikovaného fágového lyzátu na kulturu kmen *S. aureus* v reálném čase.