

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

33 428

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2019-36812**
(22) Přihlášeno: **28.10.2019**
(47) Zapsáno: **03.12.2019**

(73) Majitel:
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.,
Brno, Medlánky, CZ

(72) Původce:
MVDr. Josef Krejčí, Brno, Královo Pole, CZ
Hana Kudláčková, Dolní Kounice, CZ
MVDr. Monika Zouharová, Ph.D., Sentice, CZ
Eva Audová, Brno, Slatina, CZ
Mgr. Radek Tesařík, Ph.D., Tišnov, CZ
Mgr. Jan Gebauer, Ph.D., Opava, Kateřinky, CZ
MVDr. Zora Smržová, Brno, Řečkovice, CZ
MVDr. Petra Ondráčková, Ph.D., Brno, Židenice,
CZ
Ing. Lenka Levá, Brno, Staré Brno, CZ
MVDr. Martin Faldyna, Ph.D., Velešovice, CZ

(74) Zástupce:
HARBER IP s.r.o., Dukelských hrdinů 567/52,
170 00 Praha 7, Holešovice

(54) Název užitného vzoru:
**Léčebně-preventivní přípravek pro léčbu a
prevenci pacientů postižených infekcí
Clostridium difficile**

CZ 33428 U1

Léčebně-preventivní přípravek pro léčbu a prevenci pacientů postižených infekcí *Clostridium difficile*

5 Oblast techniky

Předkládané technické řešení poskytuje léčebně-preventivní přípravek obsahující specifické IgY protilátky použitelné k léčbě a prevenci lidí postižených infekcí *Clostridium difficile*.

10

Dosavadní stav techniky

Klostridiové enterokolitidy pacientů léčených antibiotiky (postantibiotická diarrhoe) se stávají stále častějším problémem současné medicíny. Pokud mají tyto kolitidy těžší průběh a jsou
15 doprovázeny pseudomembranózními záněty spojenými s nekrotickými změnami (pseudomembranózní kolitida), mohou mít až letální vyústění. Nejčastější příčinou těchto onemocnění jsou klostridiové infekce, z nich pak největší podíl tvoří infekce vyvolané anaerobní bakterií druhu *Clostridium difficile*.

Léčba, případně prevence, těchto infekcí není jednoduchá a zatím neexistuje postup, který by daný problém spolehlivě řešil. S dílčím úspěchem se setkalo podávání probiotik, protizánětlivá léčba, případně transplantace normální střevní mikroflóry (Curry S.R., Clin. Lab. Med. 2017,37,341). Jedním z nadějných postupů je rovněž perorální podávání antisér s obsahem specifických protilátek proti vyvolávajícím bakteriálním agens (zejména *C. difficile*
25 a *C. perfringens*). Většinou se jedná o séra, jejichž specifita je namířena proti bakteriálním toxinům, které jsou hlavními patogenními faktory vyvolávajícími poškození střevní stěny. Protilátky těchto specifit neutralizují bakteriální toxiny tím, že jim brání interagovat se stěnou střeva, a tím blokuje rozvoj patologického procesu (Kelly C.P., Antimicrob. Agents Chemother., 1996, 40, 373). Většinou se jedná o séra nebo imunoglobulinové frakce připravené z krve skotu imunizovaného toxiny příslušných patogenních mikroorganismů. Vedle bovinních antisér bylo
30 v poslední době s úspěchem použito i perorálně podávané kolostrum (případně kolostrální syrovátka nebo izolovaná imunoglobulinová frakce) získané od krav cíleně imunizovaných hlavními toxiny klostridiových patogenů (Sponseller, J.K. aj., J. Infect. Dis. 2015, 211,1334). Tento postup se ukázal jako slibný, a to jak v experimentech na zvířatech, tak i v klinických
35 studiích. V nich se však většinou jednalo jen o experimentální léčebnou aplikaci menším souborům pacientů. V těchto případech popsany postup nenarazil na hlavní problém, vlastní všem přípravkům vyráběným z kravského kolostra. Tím je skutečnost, že hladina imunoglobulinů v kravském kolostru po porodu neobvykle rychle klesá. Kravské kolostrum je proto velmi omezený zdroj imunoglobulinů, nehledě na to, že logistika jeho sběru, uchovávání a dalšího
40 zpracování je velmi obtížná. Výše uvedené okolnosti jsou asi důvodem, proč se tento, jinak slibný, přístup k léčbě klostridiových kolitid příliš nerozšířil.

Obdobou kolostra savců jsou vaječné žloutky ptáků, obsahující rovněž specifické imunoglobuliny chránící vylíhnutá mláďata proti infekcím z vnějšího prostředí. Protilátky
45 nacházející se ve žloutcích jsou podobné savčím protilátkám izotypu IgG a mají též podobné vlastnosti (vaječné žloutky ptáků jsou obdobou savčího kolostra a plní rovněž podobnou funkci). Vzhledem k tomu, že se nacházejí ve žloutcích (anglicky yolk), nazývají se IgY imunoglobuliny. Jejich specifita je namířena proti všem mikroorganismům vnějšího prostředí, s nimiž se dospělí ptáci setkali. V průběhu vývoje vajec ve vejcovodu pronikají do nově se tvořících žloutků
50 z mateřské krve specifické IgY protilátky. V případě kura domácího lze slepice cíleně imunizovat jakýmkoliv antigenem; protilátky proti němu pak budou ve vysoké koncentraci přítomny ve žloutcích jejich vajec. Tento způsob přípravy specifických protilátek je již využíván v celé řadě jiných odvětví (IgY technologie). Na rozdíl od výše zmíněných koloster jsou vaječné žloutky téměř neomezeným, dobře skladovatelným a manipulovatelným zdrojem protilátek libovolné
55 specifity. Skutečnost, že perorální aplikace imunoglobulinů je spojena s jejich částečnou

degradaci v průběhu trávicího procesu, nemusí být vážnou překážkou jejich použití. Podle našich dřívějších zjištění, a i podle jiných autorů, část protilátek zůstává nedotčena, a to i ve výkalech. Nadto i štěpy IgY protilátek (Fab fragmenty) zachovávají své vazebné aktivity, které mohou plnit funkce intaktních molekul (Kelly C.P., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1996, 40, 373).

5

Podstata technického řešení

Předmětem předkládaného technického řešení je léčebně-preventivní přípravek pro prevenci a léčbu lidí postižených infekcí vyvolanou bakteriálním druhem *Clostridium difficile* (*C. difficile*). Podstata tohoto řešení spočívá v tom, že obsahuje vaječnou hmotu, v níž jsou přítomny specifické IgY protilátky proti *C. difficile*.

Léčebně-preventivní přípravek může být například ve formě potravinářsky upravené vaječné hmoty, přísady do dietetického přípravku nebo koncentrátu, který může být podáván samostatně, případně s dalšími nutričními komponentami. Zejména může být ve formě prášku, granulátu, pasty nebo emulze.

Vaječnou hmotou (někdy je též nazývána vaječnou melanží) je zde rozuměn celý obsah slepičího vejce, tedy žloutek i bílek, a to zejména ve formě homogenizovaného obsahu slepičího vejce, nebo vysušeného homogenizovaného obsahu slepičího vejce. Sušení zvyšuje trvanlivost, zlepšuje skladovatelnost a usnadňuje další manipulaci s přípravkem.

Imunoglobuliny IgY představují třídu imunoglobulinů, jejichž specifita je namířena proti *C. difficile*, která infikují střevní stěnu. Děje se tak prostřednictvím povrchových bakteriálních struktur, jimiž adhezuje k buňkám střevního epitelu. Specifické protilátky proti těmto povrchovým bakteriálním strukturám zabraňují jejich adhezi k povrchu střevního epitelu a tím zamezují vlastní infekci.

Vaječná hmota není jen zdrojem specifických protilátek proti infekčním původcům onemocnění, ale navíc obsahuje celou řadu dalších antibakteriálních, protizánětlivých a imunomodulačních látek, které se v procesu prevence a léčby rovněž mohou významně uplatnit. Vejce vedle antibakteriálního lysozymu obsahují i vysoké množství ovotransferinu, který je ptačí obdobou polyfunkčního laktoferinu savců. Podobných látek je ve vejcích celá řada; většina z nich se může uplatnit jak v procesu léčby, tak i v prevenci výše zmíněných infekcí.

Podstatou navrhovaného přípravku je přítomnost specifických IgY protilátek proti *C. difficile* ve vaječné hmotě, která je připravena cílenou imunizací kuřic tímto antigenem. Jejich přítomnost v přípravku a pak následně i ve střevním obsahu, má dvojí účinek:

40

- shlukuje (aglutinuje) ve střevě přítomné *C. difficile*, brání jim v adhezi na střevo a spolu se střevní peristaltikou je eliminuje ze střeva;

- vazbou na adhezivní povrchové struktury *C. difficile* jim brání ve vazbě na povrchy střevního epitelu a tím znemožňuje první a nejdůležitější krok vlastní infekce. Teprve adhezí *C. difficile* na povrch epitelálních buněk začíná vlastní onemocnění. Samotná přítomnost *C. difficile* ve střevě ještě nemusí vést k infekci a tvorbě toxinů. Pokud jsou v imunizační dávce přítomny i toxiny, výsledné IgY protilátky mají i antitoxickou aktivitu.

Ve výhodném provedení je vaječná hmota obsahující imunoglobuliny třídy IgY připravená homogenizací obsahu vajec slepic cíleně imunizovaných *C. difficile*.

IgY, hlavního sérového imunoglobulinu slepičího vejce (při průměrném obsahu IgY 60 až 100 mg/žloutek a při průměrné roční snášce 300 vajec), je jednou slepicí vyprodukováno 20 až 30 g IgY za rok. Cílenou imunizací nosnic lze zvýšit množství specifických protilátek,

55

rozpoznávajících příslušné patogenní mikroorganismy a bránící jim v jejich adhezi na povrch střevní sliznice a v pronikání do hlubších vrstev střevní stěny a tvorbě specifických toxinů.

5 Léčebně-preventivní přípravek obsahuje 0,1 až 100 % hmotnostních vaječné hmoty, s výhodou 20 až 60 % hmotnostních vaječné hmoty. Léčebně-preventivní přípravek může dále zahrnovat další pomocné aktivní látky, např. antibiotika, probiotika, prebiotika, pomocné aktivní látky zahrnují látky podporující regeneraci a ochranu střeva, vitamíny, minerály; a farmaceuticky přijatelné pomocné látky, jako jsou nutriční doplňky, plniva, rozpouštědla.

10 Přípravek může být vyráběn v různých aplikačních formách, zejména v pevné, polotuhé, nebo v tekuté formě, například ve formě prášku, granulátu, pasty nebo emulze.

Léčebně-preventivní přípravek podle předkládaného technického řešení je vhodný pro léčbu a prevenci klostridiových infekcí vyvolaných bakteriálním druhem *C. difficile*.

15 Většina dosavadních řešení využívajících IgY protilátky k léčbě nebo prevenci klostridiové infekce byla zaměřena na vazbu a inaktivaci toxinů (Xing p. aj. AAPS PharmSciTech, 2017, 18, 1095). Dva hlavní toxiny produkované bakteriemi *C. difficile* jsou skutečně hlavními faktory odpovědnými za vznik patologických lézí na napadené sliznici. Produkce toxinů je však vázána
20 na jejich přemnožení následované sporulací. Tomuto vyústění klostridiové infekce by měly zabránit protilátky, které budou bakterie přítomné ve střevě shlukovat (aglutinace) a bránit jim v adhezi na buňky střevního epitelu. Pouze bakterie adherované na povrch sliznice mohou produkovat toxiny schopné poškozovat membrány střevního epitelu. Toxiny uvolňované do
25 střevního obsahu mají jen minimální patogenní potenciál, neboť nejsou odolné vůči tryptickému trávení (Lyerly D.M. aj. Microb. Ecol. Health and Dis. 1989, 2, 219). Přípravek podle předkládaného technického řešení založený na imunizaci celými bakteriemi naopak cílí na tvorbu IgY tedy protilátek namířených zejména proti adhesivním molekulám nacházejícím se na
30 povrchu bakterií (IgY protilátky proti toxinům jsou však také v menší míře přítomny). V případě *C. difficile* byl jako hlavní adhesivní faktor identifikován surface layer protein (SLP), známý i u jiných bakteriálních druhů vykazujících adhesivní vlastnosti. Předpokládaná účinnost předloženého přípravku je proto demonstrována především přítomností specifických IgY protilátek proti SLP (*C. difficile*) a zabráněním adhezi bakterií na povrch střevních buněk buněčné kultury.

35 Příklad uskutečnění technického řešení

Příprava antigenů pro imunizaci slepic

40 Pro imunizaci slepic byl použit bakteriální kmen *Clostridium difficile* DSM 1296, pořízený ve Sbírce zoopatogenních mikroorganismů VUVeL Brno. Kmen produkuje toxin A (tcdA) a toxin B (tcdB).

Kultivace C. difficile

45 Vybraný kmen byl vyočkován na Columbia agar s 5% ovčí krví. Inkubace probíhala za anaerobních podmínek při 37 °C 24 hodin. Bakteriální nárůst byl poté setřen z agaru a resuspendován v pufrovaném fyziologickém roztoku (PBS, Sigma-aldrich). Koncentrace bakterií byla upravena na 1×10^8 CFU/ml.

Inaktivace

50 Inaktivace klostridií byla provedena v 8% formaldehydu po dobu 1 hodiny.

Promytí

Centrifugace bakteriální suspenze při 5 000 g/15 minut; sediment byl resuspendován v PBS. Tento proces byl zopakován ještě 2x. Konečná resuspendace v PBS byla provedena tak, aby konečná koncentrace byla 1×10^8 CFU/ml.

5

Příprava antigenů pro imunizaci

Narostlá kultura *CD* o koncentraci 7,5 McF, tj. cca $1,8 \times 10^7$, byla sonikována na přístroji Bandelin, 90n % výkonu, 30 min. pulzně. Suspenze bakterií byla průběžně chlazená.

10

Zvířata, jejich imunizace

5 šestnáct týdnů starých kuřic bylo vakcinováno bakteriemi *C. difficile* o koncentraci $1,8 \times 10^7$ časový harmonogram:

15

den 0 imunizace *C. difficile* s 50% FCA (Freundovo kompletní adjuvans), odběr krve

den 21 revakcinace *C. difficile* s 50% FIA (Freundovo inkompletní adjuvans)

den 28 odběr krve

den 45 revakcinace *C. difficile* s 50% FIA

Sběr vajec od 47. dne.

20

Detekce imunitní odpovědi

Intenzita imunitní odpovědi byla sledována metodou ELISA (capture ELISA) pomocí celých inaktivovaných bakterií *C. difficile* adherovaných na povrch polystyrenových mikroploten.

25

Postup ELISA testu:

• vazba antigenu – antigen *C. difficile* v koncentraci 1×10^7 /ml ve vazném karbonátovém pufru pH 9,6 (100 μ l/jamku) byl navázán na polystyrenové destičky Maxisorp (Nunc). Vazba se uskutečnila přes noc v lednici. Nenavázaný antigen byl vypláchnut a opakovaně 5x promyt PBS + 0,05% Tween 20. Blokace volných vazebných míst na povrchu ploten probíhala 30 min (0,5% kasein + 10% sacharóza);

30

• ředění vzorků a kontrol – vyšetřované vzorky a kontroly byly nejprve ředěny 100x a dále pak sériově vždy v trojnásobném ředění ředicím roztokem – PBS + 0,05% Tween 20 + 0,5% kaseinový hydrolyzát. Naředěné vzorky byly dále inkubovány 60 min, při pokojové teplotě. Nenavázané protilátky byly odstraněny pětinasobným promytím v PBS + 0,05% Tween 20;

35

• specificky navázané IgY protilátky byly označeny konjugátem anti-chicken IgY s křenovou peroxidázou (Bethyl) ředěným 20 000 \times (PBS + Tween 20 + kaseinový hydrolyzát), (100 μ l/jamku). Inkubace probíhala 60 min při pokojové teplotě. Nenavázaný konjugát byl odstraněn pětinasobným promytím v PBS + 0,05% Tween 20;

40

• pro enzymatickou reakci byl použit substrát - TMB (Test-line) 100 μ l na jamku. Doba vzájemné reakce se pohybovala mezi 0 až 30 minutami. Reakce byla zastavena 2M H_2SO_4 v množství 50 μ l/jamku. Výsledná barevná reakce byla měřena při 450 nm.

45

Výsledky ELISA:

U imunizovaných zvířat došlo k výraznému vzestupu hladin sérových i vaječných protilátek v sušené vaječné melanži proti *C. difficile* již od 28. dne po začátku imunizace (Tabulka 1).

50

Tabulka 1: Výsledky ELISA testu s použitím celých bakterií jako antigenu vyjadřující pozitivní reakci sériově ředěných testovaných látek: negativní sérum, pozitivní sérum (den 28 po zahájení

imunizace), pozitivní sušená vaječná melanž (den 28 po zahájení imunizace). Výsledky jsou vyjádřeny jako optická denzita.

ředění	negativní sérum	pozitivní sérum	sušená vaječná melanž
10x	0,050	1,640	0,911
30x	0,046	1,049	0,398
100x	0,074	0,548	0,223
300x	0,049	0,307	0,117
1 000x	0,049	0,192	0,079
3 000x	0,047	0,118	0,059
10 000x	0,052	0,083	0,054
30 000x	0,081	0,061	0,052

5 Sušení vaječné melanže

Vaječná hmota byla připravena homogenizací vaječných obsahů (bílek + žloutek). Před samotnou homogenizací byla odstraněna vaječná poutka (chalázie) filtrací přes gázu. Na základě výsledků ELISA testů (stanovení titrů protilátek) byla vybrána vejce s obsahem protilátek odpovídajícím optické denzitě 0,2 a více při ředění 100x. Z nich byla připravena vaječná melanž, která byla následně zamrazena a později sušena s využitím sprejového sušení (teplota vstupního vzduchu 170 °C / teplota v komoře 70 °C).

15 Průkaz přítomnosti specifických IgY protilátek proti SLP

Úspěšnost imunizace ve smyslu tvorby specifických protilátek proti SLP byla stanovena ELISA metodou. Jejich koncentrace byla prokazována v sérech a v sušené vaječné hmotě získané z vajec imunizovaných slepic.

20 Příprava - izolace povrchového SLP (Surface layer protein)

Bakterie *Clostridium difficile* byly kultivovány v BHI mediu 24 hodin. Po jejich inaktivaci byly odstředěny při 4 000 g/5 min při pokojové teplotě. Peleta buněk byla poté promyta ve 20 ml PBS a znovu centrifugována. Výsledná peleta byla resuspendována ve 200 µl 0,2 M glycinu (Serva), pH 2,2 a za stálého třepání inkubována při pokojové teplotě 30 minut. Poté byl vzorek centrifugován při 20 000 g/10 minut při pokojové teplotě. Supernatant obsahující SLP protein byl odebrán a pH upraveno pomocí 1M TRIS (Serva), pH 9,0 na pH přibližně 7,5. Koncentrace proteinu byla stanovena pomocí kitu PierceBCA Protein Assay (Thermo Scientific).

30 Postup ELISA testu

• vazba antigenu – antigen SLP v koncentraci 3 µg/ml ve vazném karbonátovém pufru pH 9,6 (100 µl/jamku) byl navázán na polystyrenové destičky. Vazba se uskutečnila přes noc v lednici. Nenavázaný antigen byl vypláchnut a opakovaně 5x promyt PBS + 0,05% Tween 20. Blokace volných vazebních míst na povrchu ploten probíhala 30 min (0,5% kasein + 10% sacharóza);

• vyšetřované vzorky:
 negativní kontrola - negativní sérum: slepičí sérum před imunizací
 - vodná frakce z vajec neimunizovaných slepic
 40 testované vzorky - pozitivní sérum: směsné sérum z 5 imunizovaných slepic 28. den

- sušená vaječná melanž po rehydrataci 1 díl sušiny + 3 díly H₂O;

- ředění - vyšetřované vzorky byly předředěny: 30x sérum, 3x sušina a vodná frakce (vodní výluh SVH 10:1) a dále pak sériově vždy v trojnásobném ředění ředicím roztokem – PBS + 0,05% Tween 20 + 0,5% kaseinový hydrolyzát. Reakce mezi antigenem a protilátkami při pokojové teplotě trvala 60 min. Nenavázané protilátky byly odstraněny pětinasobným promytím v PBS + 0,05% Tween 20;
- specificky navázané IgY protilátky byly označeny konjugátem anti-chicken IgY s křenovou peroxidázou (Bethyl) ředěným 20 000× (PBS + Tween 20 + kaseinový hydrolyzát), (100 µl na jamku). Inkubace probíhala 60 min při pokojové teplotě. Nenavázaný konjugát byl odstraněn pětinasobným promytím v PBS + 0,05% Tween 20;
- pro enzymatickou reakci byl použit substrát - TMB (Test-line) 100 µl na jamku. Doba vzájemné reakce se pohybovala mezi 0 až 30 minutami. Reakce byla zastavena 2M H₂SO₄ v množství 50 µl/jamku. Výsledná barevná reakce byla měřena při 450 nm.

Výsledek vyšetření koncentrace specifických IgY protilátek proti SLP

- 20 Sérum a vaječné žloutky imunizovaných slepic obsahují specifické IgY protilátky proti SLP – hlavnímu adhesivnímu faktoru bakterií *C. difficile* (tabulka 2)

25 Tabulka 2: Výsledky ELISA testu s použitím SLP jako antigenu vyjadřující pozitivní reakci sériově ředěných testovaných látek: negativní sérum, pozitivní sérum (den 28 po zahájení imunizace), pozitivní sušená vaječná melanž (SVM, den 28 po zahájení imunizace). Výsledky jsou vyjádřeny jako optická denzita.

ředění sérum	negativní sérum	pozitivní sérum	ředění vejce	negativní kontrola	pozitivní SVM
30x	2,079	2,304	3x	1,379	2,654
100x	1,187	2,873	10x	0,734	2,355
300x	0,494	3,078	30x	0,257	1,676
1 000x	0,188	3,009	100x	0,110	0,943
3 000x	0,094	2,756	300x	0,067	0,455
10 000x	0,063	2,363	1 000x	0,052	0,233
30 000x	0,052	1,237	3 000x	0,048	0,109
100 000x	0,045	0,512	10 000x	0,052	0,068

- 30 *Inhibice adheze bakterií C. difficile specifickými IgY protilátkami*

Tímto testem je prokazována schopnost specifických IgY protilátek inhibovat adhezi bakterií *C. difficile* na povrch buněčné kultury prasečího střevního epitelu (IPEC).

- 35 • *Buněčná linie*: IPEC J2 (původ ECCAC);
- *Kultivační médium*: DMEM High Glucose (Biosera)+ 2% FBS (PAA) + L-glutamin 2 mmol/l;
- 40 • *Kultivace buněk*
Buněčná linie o hustotě 1x10⁵ buněk v 1 ml média byla kultivována po dobu 72 h na 12 jamkové desce (TPP) při 37 °C v 5% atmosféře CO₂. Výměna média za čerstvé byla provedena po 2 dnech;

- *Clostridium difficile*

K pokusu byl použit bakteriální kmen *Clostridium difficile* DSM 1296, pořízený ve Sbírcce zoopatogenních mikroorganismů VUVeL Brno. Kmen produkuje toxin A (tcdA) a toxin B (tcdB);

5

- *Kultivace C. difficile* Kmen *C. difficile* byl vyočkován na Columbia agar s 5% ovčí krví. Inkubace probíhala za anaerobních podmínek při 37 °C 24 hodin. Jedna bakteriologická klička narostlé kultury byla přenesena do 200 ml BHI (Brain Heart Infusion). Inokulovaný bujón byl inkubován za anaerobních podmínek při 37 °C 72 hodin;

10

- *Promytí bakterií*

Narostlá bakteriální suspenze byla 2x promyta v PBS: Centrifugace bakteriální suspenze při 5 000 g po dobu 15 minut. Po odstranění supernatantu byl sediment resuspendován v PBS. Tento proces byl opakován 2x. Nakonec byly bakterie resuspendovány v kultivačním médiu (DMEM High Glucose + 2% FBS + Glutamine). Konečná koncentrace bakterií byla upravena na optickou denzitu 5°McF, odpovídající 1×10^7 CFU/ml;

15

- *Inkubace C. difficile s protilátkami*

Specifické protilátky proti *C. difficile* byly použity v následujících formách:

20

- sérum imunizovaných slepic,
- rehydratovaná sušená vaječná melanž (SVM) připravená z vajec imunizovaných slepic,
- vodní frakce – žloutky vajec neimunizovaných slepic, další příprava viz výše
- kontrola – kultivační medium

Uvedené vaječné protilátky a příslušné kontroly byly inkubovány spolu s bakteriální suspenzí v anaerobním prostředí při 37 °C 2 hodiny;

25

- *Adherence protilátkami ošetřených bakterií k buňkám IPEC*

Protilátkami ošetřené bakterie byly přidány k 3denní buněčné kultuře IPEC a nechaly se v anaerobním prostředí 2 hodiny při 37 °C adherovat k těmto buňkám;

30

- *Odmytí neadherovaných C. difficile a uvolnění adherovaných buněk IPEC*

Volné neadherované bakterie byly odstraněny promytím v PBS (3x). Poté byl k buňkám s navázanými bakteriemi přidán 1% Triton X a inkubován 5 minut při 37 °C;

35

- *Rekultivace*

Suspenze buněk a bakterií byla dále ředěna a inokulována na selektivní agar *Clostridium difficile* agar (CDA, LabMediaServis). Po inkubaci za anaerobních podmínek při 37 °C 48 hodin byly spočítány narostlé kolonie v jednotlivých ředěních a byla spočítána koncentrace kolonie tvořících jednotek CFU/ml.

40

Tabulka 3: Inhibice adheze *C. difficile* vyvolaná přítomností specifických IgY protilátek v různých koncentracích a v různých matricích (K – Kontrola, VF – Vodní frakce, SVM – Sušená vaječná melanž, % jsou obj. %). Výsledky jsou vyjádřeny jako CFU/ml adherovaných bakterií

	pokus č. 1	pokus č. 2	pokus č. 3	pokus č. 4
výchozí inokulum	1×10^7	1×10^7	6×10^7	6×10^7
K1	340	310	2300	1200
K2	200	530	4000	1140
VF1 10%	100	520	1920	
VF2 10%	80	480	860	
SVM1 5%				360

	pokus č. 1	pokus č. 2	pokus č. 3	pokus č. 4
východí inokulum	1x10 ⁷	1x10 ⁷	6x10 ⁷	6x10 ⁷
SVM2 5%				650
SVM1 10%	0	80	150	
SVM2 10%	20	10	550	
Sérum1 10%		10	60	
Sérum2 10%		0	0	

Testování protizánětlivých účinků vaječné melanže

Protizánětlivé účinky vaječné melanže byly testovány *in vitro* na modelu prasečích makrofágů derivovaných z monocytů stimulovaných lipopolysacharidem. Monocyty byly z periferní krve 3 prasat získány na základě jejich schopnosti adherovat k plastovým povrchům. Po 6denní derivaci byly makrofágy vystaveny účinku 4 různých koncentrací vaječné melanže a následně stimulovány lipopolysacharidem (1 µg/ml) po dobu 4 hodin. Jejich odpověď na tuto stimulaci byla stanovena na základě tvorby prozánětlivých cytokinů. Tvorba prozánětlivých cytokinů IL-1beta, IL-8 a TNFalfa byla stanovena na základě relativní kvantifikace obsahu mRNA. Jako referenční sloužil gen HPRT. Z výsledků je patrný tlumivý efekt vaječné melanže na zánětlivou odpověď, a to v závislosti na dávce (Tabulka 4).

Tabulka 4: Relativní exprese mRNA pro TNF alfa, IL-1 beta a IL-8 jako odpověď makrofágů derivovaných z monocytů po stimulaci lipopolysacharidem po předchozím ošetření čtyřmi koncentracemi vaječné melanže (průměr ze čtyř pokusů). Výsledky jsou vztaženy k reakci kontrolních buněk neošetřených melanží a vyjádřeny v %.

Koncentrace vaječné melanže v médiu (%)	TNFα	IL1β	IL8
0	100	100	100
0,02	101,6	106,5	97,6
0,2	76,5	94,7	86,2
2	62,6	76,1	80,4
20	51,7	61,7	66,2

20 Příklad složení přípravku 1

Byly připraveny tři varianty složení přípravku. Přípravek obsahoval obohacený perorální rehydratační roztok (WHO), do kterého byla vmíchána sušená vaječná melanž v objemu 5, 10, resp. 20 objemových procent. Vaječná melanž byla připravena homogenizací obsahu slepičích vajec obsahujících IgY protilátky proti *C.difficile*.

Příklad složení přípravku 2

30 Byla připravena sušená vaječná melanž, která slouží jako sušená směs pro přípravu léčebně preventivních nápojů. Vaječná melanž připravená homogenizací obsahu slepičích vajec obsahujících IgY protilátky proti *C.difficile* byla vysušena sprejovým sušením (teplota vstupního vzduchu 170 °C / teplota v komoře 70 °C). Výsledný suchý produkt byl zabalen do vodonepropustných obalů.

NÁROKY NA OCHRANU

- 5 1. Léčebně-preventivní přípravek pro léčbu a prevenci lidí postižených infekcí *Clostridium difficile*, **vyznačený tím**, že obsahuje 0,1 až 100 % hmotn. vaječné hmoty obsahující specifické IgY protilátky proti *Clostridium difficile* a zbytek do 100 % hmotn. farmaceuticky přijatelných pomocných látek a pomocných aktivních látek.
- 10 2. Léčebně-preventivní přípravek podle nároku 1, **vyznačený tím**, že vaječná hmota je ve formě homogenizovaného obsahu slepičího vejce, nebo vysušeného homogenizovaného obsahu slepičího vejce.
- 15 3. Léčebně-preventivní přípravek podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačený tím**, že vaječná hmota obsahující specifické IgY protilátky proti *C. difficile* je připravená homogenizací obsahu vajec slepic imunizovaných výše uvedeným inaktivovaným patogenním mikroorganismem.
- 20 4. Léčebně-preventivní přípravek podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačený tím**, že pomocné aktivní látky zahrnují látky podporující regeneraci a ochranu střeva, vitamíny, minerály, antibiotika, probiotika, prebiotika; a farmaceuticky přijatelné pomocné látky zahrnují nutriční doplňky, plniva, rozpouštědla.
- 25 5. Léčebně-preventivní přípravek podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačený tím**, že je ve formě prášku, granulátu, pasty nebo emulze.