

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

37 779

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

A61K 35/15 (2015.01)
A61P 29/00 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2024-41728**
(22) Přihlášeno: **24.01.2024**
(47) Zapsáno: **19.03.2024**

(73) Majitel:
Mendelova univerzita v Brně, Brno, Černá Pole, CZ
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.,
Brno, Medlánky, CZ

(72) Původce:
doc. Ing. Petr Sláma, Ph.D., Hustopeče, CZ
doc. Ing. Aleš Pavlík, Ph.D., Níhov, CZ
MVDr. Monika Zouharová, Ph.D., Sentice, CZ

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

(54) Název užitého vzoru:
**Veterinární přípravek pro prevenci a/nebo
lčzení mastitidy u skotu**

CZ 37779 U1

Veterinární přípravek pro prevenci a/nebo léčení mastitidy u skotu

Oblast techniky

5

Předkládané technické řešení se týká veterinárního přípravku, obsahujícího dendritické buňky skotu prezentující antigen *Streptococcus uberis*. Uvedený veterinární přípravek lze použít při prevenci a/nebo léčení mastitidy u skotu, vyvolané bakteriemi *Streptococcus uberis*.

10

Dosavadní stav techniky

Záněty mléčné žlázy (mastitidy) skotu jsou onemocněními, která způsobují obrovské ekonomické ztráty farmářům po celém světě. Toto onemocnění je multifaktoriální a je způsobeno mnoha bakteriemi nebo jinými mikroorganismy. Jedny z hlavních patogenů, které způsobují mastitidy, jsou bakterie *Streptococcus uberis*.

15

Nejčastější přístup léčby spočívá ve využívání antibiotik, nicméně časté až nadbytečné používání antibiotik vede k celosvětovému problému, kterým je antibiotická rezistence. Při léčbě mastitid skotu se také běžně používají různá antibiotika. Proto je nezbytné, aby byla vyvinuta nová metoda léčby či prevence mastitid, která by omezila používání antibiotik. Byly vyvinuty vakcíny proti některým patogenům mastitid, ale jejich efektivita není uspokojivá. Většinou se jedná pouze o snížení klinických projevů mastitidy.

20

Dendritické buňky jsou antigen prezentující buňky, které předávají informaci o antigenech T lymfocytům. Dendritické buňky jsou vlastně propojením mezi vrozenou a získanou imunitou. Jedná se o buňky, které pohlcují antigen (například zmíněné bakterie), poté antigen rozloží a prezentují část antigenu na cytoplazmatické membráně, a to již zmíněným T lymfocytům. Pomocné T lymfocyty produkují cytokiny, kterými aktivují B lymfocyty k produkci protilátek nebo makrofágy k efektivní fagocytóze. Cytotoxické T lymfocyty jsou zodpovědné za zabíjení buněk infikovaných intracelulárními patogeny, jako jsou viry nebo bakterie. Dále mají schopnost ničit rakovinné a poškozené buňky. Aktivace dendritických buněk je principem, který je využíván pro vytváření vakcín, které jsou namířené na ničení rakovinných buněk (van Willigen, W.W., Bloemendal, M., Gerritsen, W.R., Schreibeit, G., de Vries, J.L.M. & Bol, K.F. (2018). Dendritic Cell Cancer Therapy: Vaccinating the Right Patient at the Right Time. *Frontiers in Immunology*, 9, 2265. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2018.02265>). Tento princip však může být využit pro vývoj vakcín nebo imunoterapií namířených i proti jiným chorobám.

25

30

35

Při vývoji vakcín proti mastitidám však existuje mnoho překážek, které doposud způsobují nízkou efektivitu vakcín. Ve stavu techniky tedy stále přetrvává potřeba vakcín pro léčbu mastitidy, zejména způsobené bakteriemi *Streptococcus uberis*.

40

Podstata technického řešení

45

Navrhované technické řešení se týká veterinárního přípravku ke stimulaci imunitní odpovědi mléčné žlázy v souvislosti se záněty (mastitidami), které jsou vyvolané bakteriemi *Streptococcus uberis*, jako jednoho z hlavních činitelů, který vyvolává mastitidy. Tento přístup k léčbě mastitid výrazně sníží používání antibiotik, která jsou běžnou metodou pro léčbu mastitid. Proto může tato metoda také přispět ke snížení antibiotické rezistence, která je celosvětovým problémem nejen ve veterinární, ale také humánní medicíně.

50

Předmětem předkládaného technického řešení je veterinární přípravek, který obsahuje dendritické buňky skotu prezentující antigen *Streptococcus uberis*. Dendritické buňky skotu prezentující antigen *Streptococcus uberis* se připraví z monocytů izolovaných z krve skotu. Následně jsou

55

monocyty kultivovány s růstovými faktory, čímž se dosáhne vývoje uvedených buněk v dendritické buňky. Těmto dendritickým buňkám jsou předloženy bakterie *Streptococcus uberis*, které jsou fagocytovány. Dendritické buňky s fagocytovanými bakteriemi potom prezentují antigen bakterie *Streptococcus uberis* a jsou pak použity k výrobě veterinárního přípravku (vakcíny), určeného pro aplikaci zejména do mizních uzlin mléčné žlázy skotu. Dendritické buňky prezentující antigen *Streptococcus uberis* předávají informaci o bakteriích (jejich fragment) T lymfocytům, které se podílejí na likvidaci uvedených bakterií.

V jednom provedení obsahuje veterinární přípravek $0,7 \times 10^6$ až $1,3 \times 10^6$ dendritických buněk v 1 ml přípravku, a dále alespoň jednu farmaceuticky přijatelnou pomocnou látku.

Farmaceuticky přijatelná pomocná látka může být vybraná ze skupiny zahrnující buněčná kultivační média (běžně používaná pro kultivaci savčích buněk, například RPMI médium) a bovinní séra, například fetální bovinní sérum (FBS). Buněčná kultivační média jsou odborníkovi v oboru známá, například mohou být použita média vybraná ze skupiny zahrnující: RPMI a DMEM.

V jednom provedení je farmaceuticky přijatelnou pomocnou látkou buněčné kultivační médium s 10 % obj. bovinního séra, s výhodou FBS.

Veterinární přípravek je s výhodou v tekuté formě, určený pro injekční aplikaci.

Předmětem předkládaného užitného vzoru je dále veterinární přípravek definovaný výše pro použití při prevenci a/nebo léčení mastitidy u skotu, vyvolané bakteriemi *Streptococcus uberis*.

Způsob přípravy dendritických buněk prezentujících antigen bakterie *Streptococcus uberis* je s výhodou následující:

Nejprve se izolují monocyty z periferní krve skotu (s využitím odstředivky se získá tzv. buffy coat, což jsou leukocyty, a pomocí gradientové centrifugace se z těchto leukocytů získají mononukleární buňky, tedy lymfocyty a monocyty). Z mononukleárních buněk jsou monocyty izolovány metodou adherence (monocyty mají schopnost přilnout ke stěně kultivační lahve nebo stěny jamek kultivačních ploten) nebo magnetickou separací pomocí CD14 značených magnetických mikrokuliček (Kratochvilova, L., Coufalova, K., Zouharova, M., Szczotka, M. & Slama, P. (2019). Isolation of monocytes from bovine blood for purposes of culture of dendritic cells. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 9(s), 727 až 430. <http://dx.doi.org/10.15414/jmbfs.2019.9.special.427-430>). Izolované monocyty se následně kultivují s růstovými faktory, s výhodou s IL-4 a/nebo GM-CSF, po dobu 5 až 6 dní. Uvedené růstové faktory jsou komerčně dostupné. Růstové faktory nasměrují vývoj monocytů v dendritické buňky. Vzniklé dendritické buňky jsou následně kokultivovány s bakteriemi *Streptococcus uberis*, které jsou dendritickými buňkami fagocytovány. Výsledkem jsou dendritické buňky prezentující antigen bakterie *Streptococcus uberis*. Takto připravené dendritické buňky mohou být následně smíchány s buněčným kultivačním médiem a/nebo bovinním sérem za vzniku veterinárního přípravku, vhodného pro použití k vakcinaci skotu pro prevenci a/nebo léčbu mastitidy.

Výhodné je aplikovat veterinární přípravek injekčně, výhodněji lokálně do regionálních lymfatických uzlin mléčné žlázy, kde stimuluje její specifickou imunitní odpověď.

Takto připravené dendritické buňky jsou schopné prezentovat fragmenty bakterií *Streptococcus uberis* T lymfocytům. Kontakt mezi dendritickými buňkami a T lymfocyty je zajištěn molekulami hlavního histokompatibilního komplexu (na straně dendritických buněk) a receptory T lymfocytů. Aktivace naivních T lymfocytů dendritickými buňkami vede k jejich klonální expanzi a diferenciaci v efektorové nebo paměťové buňky. Tyto T lymfocyty mohou přímo ničit buňky napadené bakteriemi (cytotoxické T lymfocyty). Dále v případě pomocných T lymfocytů mohou aktivovat B lymfocyty ke změně v plazmatické buňky (produkce protilátek) nebo aktivovat

makrofágy k efektivní fagocytóze. Tyto procesy vedou k eliminaci bakterie *Streptococcus uberis*, jako jednoho z hlavních patogenů, který je schopen vyvolat zánět mléčné žlázy u skotu. Výše popsany veterinární přípravek je tedy alternativou k antibiotické léčbě mastitid dojného skotu.

5

Objasnění výkresů

Obr. 1 zobrazuje využití technického řešení.

10 Obr. 2 zobrazuje histogram, získaný při analýze v průtokovém cytometru, který ukazuje % dendritických buněk z Příkladu 1 s MHCII molekulami („count“ na ose y značí počet buněk).

Obr. 3 zobrazuje histogram, získaný při analýze v průtokovém cytometru, který ukazuje % dendritických buněk prezentujících antigen bakterie *Streptococcus uberis* z Příkladu 2 s MHCII molekulami („count“ na ose y značí počet buněk).

15

Příklady uskutečnění technického řešení

20 *Zkratky a definice*

fosfátem pufrovaný fyziologický roztok (PBS) = solný roztok na vodní bázi s následujícím složením: KCl 2,0 g/l; NaCl 70,1 g/l; Na₂HPO₄, 12H₂O 12,8 g/l; NaH₂PO₄, 2H₂O 4,4 g/l. pH 6,9 až 7,3.

25

pracovní roztok trypsinu = Trypsin je enzym pocházející z prasečí slinivky břišní, který se běžně používá pro disociaci a disagregaci savčích buněk a tkání závislých na ukotvení. Pracovní roztok trypsinu se připravuje rozmícháním koncentráту trypsinu 20x v roztoku PBS. Koncentrát obsahuje 25 g prasečího trypsinu na litr roztoku s 0,9 % chloridu sodného.

30

MHCII molekuly = MHC glykoprotein II. třídy; MHC = major histocompatibility complex.

RPMI médium = buněčné kultivační médium, obsahující glukózu, pH indikátor, soli, aminokyseliny a vitamíny; varianta RPMI 1640 obsahuje v jednom litru 2 g glukózy, 5 mg indikátoru phenol red, 6 g NaCl, 2 g NaHCO₃, 1,512 g Na₂HPO₄, 400 mg KCl, 100 mg MgSO₄, 100 mg Ca(NO₃)₂, 300 mg glutaminu; 200 mg argininu; 50 mg každého z asparaginu, cysteinu, leucini, isoleucinu; 40 mg lysin hydrochloridu; 30 mg serinu; 20 mg každého z kyseliny asparagové, glutamové, hydroxyprolinu, prolinu, threoninu, tyrosinu a valinu; 15 mg každého z histidinu, methioninu a fenylalaninu; 10 mg glycinu; 5 mg tryptofanu, 1 mg redukovaného glutathionu, 35 mg i-inositolu; 3 mg cholin chloridu; 1 mg každého z kyseliny para-aminobenzoové, listové, nikotinamidu, pyridoxin hydrochloridu, thiamin hydrochloridu; 0,25 mg calcium pantothenátu; 0,2 mg biotinu, 0,2 mg riboflavinu a 0,005 mg kyanokobalaminu

40

DMEM = Dulbecco Modified Eagle Medium, buněčné kultivační médium, obsahující 4,5 g/l glukózy, neobsahuje L-glutamin a pyruvát.

45

Příklad 1: Příprava dendritických buněk

Dendritické buňky byly připraveny z monocytů. Monocyty byly izolovány následujícím způsobem:

50

a) Odebraná nesrážlivá krev skotu (50 ml) byla odstředěna 40 minut při teplotě 12 °C, 2300 rpm.

b) Po odstředění krve byl odebrán tzv. buffy coat (leukocyty).

55

- c) Buffy coat byl rozmíchán ve fosfátem pufrovaném fyziologickém roztoku (PBS, pH 7,2), a to na objem 30 ml.
- 5 d) Tento objem byl rozdělen na dvě části. Každá pak byla navrstvena na 15 ml roztoku pro gradientovou centrifugaci.
- e) Následovalo odstředění 1 hodinu, při teplotě 10 °C a 2000 rpm.
- f) Po odstředění byl odebrán „proužek“ mononukleárů (lymfocyty a monocyty).
- 10 g) Buňky byly promyty v pufrovaném fyziologickém roztoku, tzn. odstředěny při teplotě 10 °C, 2000 rpm.
- h) Z mononukleárů byly vyizolovány monocyty pomocí magnetické separace, a to při použití 2 x 15 10⁷ buněk (mononukleárů), ke kterým jsou přidány komerčně dostupné magnetické mikrokuličky s anti-CD14 protilátkami (20 µl).
- ch) Tento roztok byl inkubován 15 minut v lednici (4 až 8 °C).
- 20 i) Následně byl roztok s buňkami promyt v pufrovaném fyziologickém roztoku – odstředění 10 minut při 300 g, 10 °C. Dále byl odstraněn supernatant a buňky byly rozmíchány v 500 µl pufrovaného fyziologického roztoku.
- 25 j) Následovala magnetická separace, kdy vložíme kolonku pro magnetickou separaci do magnetu a pod něj 50 ml zkumavku. Propláchneme kolonku 3 ml pufrovaného fyziologického roztoku. Napipetujeme suspenzi buněk označených mikrokuličkami a necháme protéct kolonkou. Vytáhneme kolonku z magnetu a dáme pod ni další zkumavku. Do kolonky napipetujeme 5 ml pufrovaného fyziologického roztoku a následně pístem vytlačíme buňky, které ulpěly v kolonce.
- 30 k) Získané monocyty (CD14 pozitivní buňky) promyjeme v pufrovaném fyziologickém roztoku, tzn. odstředění při 1500 rpm, 10 minut, 23 °C.
- l) Následuje rozmíchání buněk (10⁶) v kultivačním mediu RPMI s 10 % obj. fetálního bovinního séra a růstovými faktory IL-4 (40 pg/ml) a GM-CSF (10 ng/ml).
- 35 m) Takto byly buňky inkubovány 2,5 dne v kultivačních lahvích v CO₂ inkubátoru při 37 °C a atmosféře s 5 % CO₂.
- o) Po uvedené době následovala výměně kultivačního media (viz přechozí bod).
- 40 p) Po 5 dnech inkubace jsou získány dendritické buňky, které se vyvinuly z monocytů.
- Příklad 2: Příprava veterinárního přípravku, obsahujícího dendritické buňky z Příkladu 1, prezentující antigen bakterie *Streptococcus uberis*
- 45 V návaznosti na Příklad 1 byly k dendritickým buňkám (10⁶) přidány bakterie *Streptococcus uberis* (10⁶).
- a) Dendritické buňky z Příkladu 1 byly kokultivovány s bakteriemi v kultivačních lahvích při 50 teplotě 37 °C a atmosféře s 5 % CO₂.
- b) Po 6 hodinách inkubace byly dendritické buňky deadherovány z povrchu kultivačních lahví pomocí trypsinu (20 ml pracovního roztoku).

c) Po 10 minutách působení trypsinu bylo přidáno kultivační medium RPMI s 10 % obj. bovinního fetálního séra

5 d) Následně byly vzorky promyty pufovaným fyziologickým roztokem – odstředění 10 minut, 1500 rpm, 23 °C.

10 e) Takto získané buňky byly rozmíchány v 1 ml kultivačního media RPMI s 10 % obj. fetálního bovinního séra a umístěny do lednice. Výsledná koncentrace takto připraveného přípravku byla 10^6 dendritických buněk prezentujících antigen *Streptococcus uberis* v 1 ml přípravku.

Příklad 3: Průkaz účinnosti dendritických buněk/přípravku vůči bakterii *Streptococcus uberis*

15 V návaznosti na Příklad 2 byl připravený veterinární přípravek, obsahující dendritické buňky prezentující antigen *Streptococcus uberis*, podroben analýze exprese MHCII molekul, které jsou zodpovědné za prezentaci antigenů T lymfocytům.

20 a) Dendritické buňky z Příkladu 1 (kontrola) a dendritické buňky z Příkladu 2 byly označeny anti-MHCII protilátkami. Jednalo se o 10^6 buněk v obou případech. K označení MHCII byla použita jako primární protilátka monoklonální protilátka mouse anti bovine MHC Class II (klon CC108, izotyp IgG1, 200x naředěná v PBS, 10 μ l), jako sekundární protilátka byl použita polyklonální protilátka rabbit anti mouse IgG: FITC (100x naředěná v PBS, 50 μ l).

25 b) Analyzované vzorky (10^6 dendritických buněk z Příkladu 2) a kontrolní vzorky (10^6 dendritických buněk z Příkladu 1) byly změřeny v průtokovém cytometru. Jednalo se o dvoulaserový cytometr (modrý laser, 488nm, 43mW; červený 638nm, 55mW) vybavený detektory FSC, SSC, FITC.

30 c) Byla porovnána exprese MHCII molekul u kontrolních vzorků (dendritické buňky bez bakterií připravené v Příkladu 1) a dendritických buněk získaných viz Příklad 2.

35 Výsledky ukazují na zvýšenou expresi MHCII molekul u dendritických buněk z Příkladu 2 (obr. 2), oproti dendritickým buňkám z Příkladu 1 (obr. 3), což je rozhodující při prezentaci antigenu T lymfocytům. Na obr. 2 a 3 jsou histogramy, získané při analýze v průtokovém cytometru, které ukazují na % dendritických buněk s MHCII molekulami.

Průmyslová využitelnost

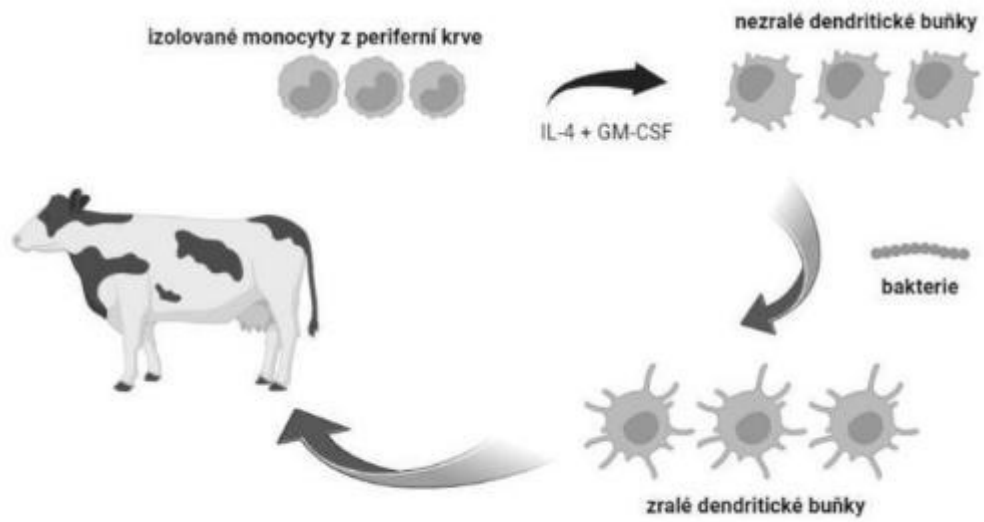
40 Vzhledem k nezbytnosti nahrazení léčby mastitid pomocí antibiotik léčbou jinou, je toto technické řešení předurčeno k použití v našich chovech, a to v souvislosti s výraznými problémy, které způsobuje patogen *Streptococcus uberis*. Tato bakterie je do značné míry rezistentní vůči běžně používaným antibiotikům. Poptávka po nové léčbě v souvislosti s uvedenou bakterií přichází přímo od chovatelů, kteří by ocenili nový přístup k léčbě mastitid.

NÁROKY NA OCHRANU

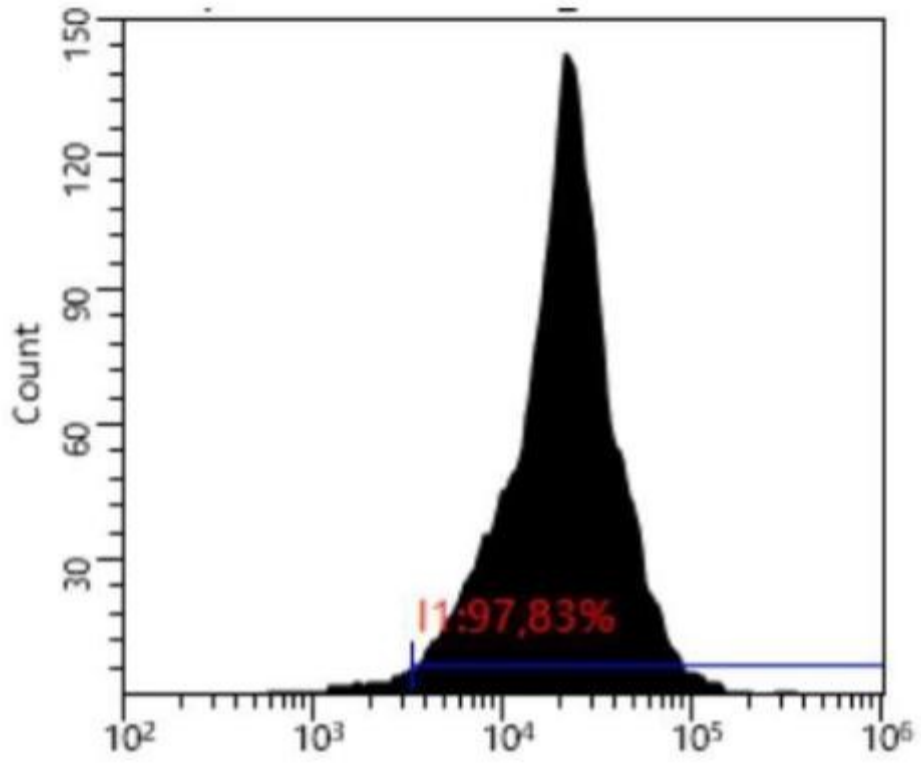
1. Veterinární přípravek, **vyznačený tím**, že obsahuje dendritické buňky skotu prezentující antigen *Streptococcus uberis*.
- 5 2. Veterinární přípravek podle nároku 1, **vyznačený tím**, že obsahuje
0,7 x 10⁶ až 1,3 x 10⁶ dendritických buněk v 1 ml přípravku a alespoň jednu farmaceuticky přijatelnou pomocnou látku.
3. Veterinární přípravek podle nároku 2, **vyznačený tím**, že farmaceuticky přijatelná pomocná látka je vybraná ze skupiny zahrnující buněčná kultivační média a bovinní séra.
- 10 4. Veterinární přípravek podle nároku 3, **vyznačený tím**, že farmaceuticky přijatelnou pomocnou látkou je buněčné kultivační médium s 10 % obj. bovinního séra.
5. Veterinární přípravek podle kteréhokoliv z předchozích nároků 1 až 4 pro použití při prevenci a/nebo léčení mastitidy u skotu, vyvolané bakteriemi *Streptococcus uberis*.

15

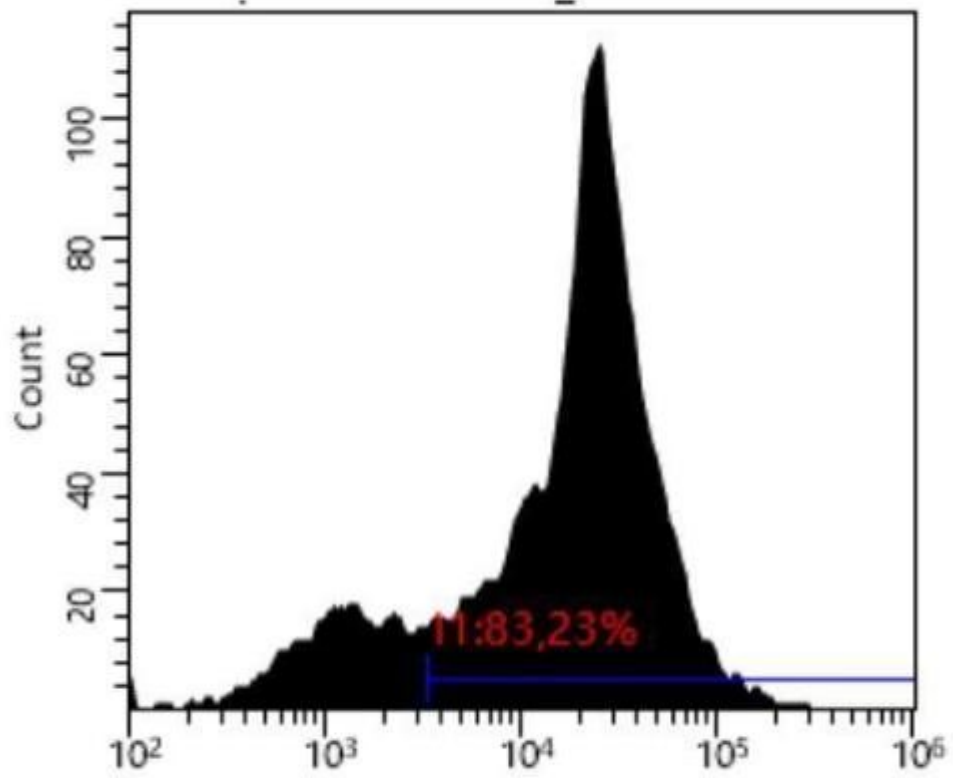
3 výkresy



Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3