

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

32 436

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

A61K 35/76 (2015.01)

C12N 7/01 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2018-35369**
(22) Přihlášeno: **18.09.2018**
(47) Zapsáno: **18.12.2018**

- (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 Vyletělová- 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:
**Přípravek s antibakteriálním účinkem proti
stafylokokům vyskytujícím se v prostředí
zemědělské prvovýroby**

CZ 32436 U1

Přípravek s antibakteriálním účinkem proti stafylokokům vyskytujícím se v prostředí zemědělské prvovýroby

5 Oblast techniky

Technické řešení se týká přípravku – tzv. fágového lyzátu, který vykazuje antibakteriální účinky proti některým stafylokokům, včetně jejich variant rezistentních k antibakteriálním látkám, přítomným v prostředí zemědělské prvovýroby – produkce mléka a masa (chov skotu, prasat, 10 koz).

Dosavadní stav techniky

15 V prostředí zemědělské prvovýroby se běžně vyskytují patogenní mikroorganismy, včetně bakterií rodu *Staphylococcus*. Významným zástupcem tohoto rodu je druh *Staphylococcus aureus* – původce mastitid, kožních infekcí a abscesů zvířat i lidí. K terapii těchto onemocnění jsou tradičně využívány antimikrobiální látky, ovšem s různým efektem. Situaci také komplikuje fakt, že dochází k nárůstu kmenů *S. aureus* rezistentních jak k beta-laktamovým antibiotikům 20 (MRSA), tak i k dalším skupinám léčiv a možnosti terapie jsou tak omezené. Bakterie *S. aureus* se navíc nevyznačují hostitelskou specifitou, jsou odolné vůči podmínkám vnějšího prostředí, a tedy i snadno přenosné, jak mezi zvířaty, tak na ošetřující personál, případně spotřebitele s možnými závažnými dopady na jejich zdravotní stav. Je nutné poznamenat, že v případě aplikace antibiotické léčby jsou produkty živočišné výroby nevhodné k potravinářskému 25 zpracování a dochází tak k ekonomickým ztrátám. Kmeny stafylokoků rezistentní vůči běžně používaným antibiotikům tak mnohdy způsobují infekce, jejichž jediným řešením je brakace infikovaného zvířete, což představuje také značnou ekonomickou ztrátu pro prvovýrobce.

Rezistence bakterií k antimikrobiálním látkám je závažným celosvětovým problémem. 30 V současné době je proto možné registrovat tlak na snížení používání antibiotik ve veterinární i humánní medicíně a zvýšenou snahu o využití léčiv na jiné než antibiotické bázi. Problémem těchto přípravků bývá jejich účinnost, specifita vůči původci onemocnění a omezení při aplikaci v případě rozsáhlé infekce v těle zvířete.

35 Tyto přípravky tak své uplatnění nachází především v prevenci infekcí, případně podpoře léčby. Jedná se o:

40 - přípravky na chemické bázi, které fungují baktericidně – využívající např. jód, chlorhexidindiglukonát, kyselinu mléčnou apod. Tyto přípravky se používají především k desinfekci prostředí, případně míst možných průniků bakteriální infekce do těla zvířete – ošetření mléčného kanálku apod. Nevýhodou použití těchto přípravků je především způsob jejich použití a aplikace, která většinou omezuje jejich použití na povrchové zdroje infekce, případně místa výskytu infekce samotné.

45 - přípravky založené na doplňcích výživy, případně podpůrné přípravky s antimikrobiální složkou – tyto přípravky slouží k podpoře léčby bakteriálních infekcí, případně k lokální aplikaci v případě infekcí na povrchu těla zvířete. Jedná se o různé masti, krémy, emulze, případně doplňky stravy s prokázaným antibakteriálním účinkem, jejichž nevýhodou je 50 podobně jako v předchozím případě především omezená aplikace, účinnost a také specifita vůči původcům stafylokokových infekcí.

Vhodnou alternativu antibiotické léčby představuje i fágová terapie. Bakteriofágy jsou již k léčbě 55 a prevenci nejruznějších infekcí využívány v humánní medicíně. Výhodou jejich aplikace oproti antibiotikům je velmi malá pravděpodobnost vzniku rezistence, vysoká specifita k cílovému

kmeni hostitele a nízké riziko pro přirozenou mikroflóru pacienta. Komerčně dostupných je několik preparátů – např. (PyoPhage, Eliava Institute; StapPhage, Microgen; Stafal, Bohemia Pharmaceuticals). V případě využití těchto preparátů v prostředí zemědělské prvovýroby však jejich využití naráží na fakt jiného spektra bakteriálních původců infekcí než v případě humánní medicíny, pro kterou jsou tyto přípravky určeny.

Podstata technického řešení

Uvedené nedostatky odstraňuje přípravek – fágový lyzát – s antibakteriálním účinkem proti stafylokokům vyskytujícím se v prostředí zemědělské prvovýroby, podle tohoto technického řešení, jehož podstata spočívá ve využití mutanty standardního fága 812 – 812h1. Tato mutanta vykazuje antibakteriální účinky proti kmenům *S. aureus* včetně MRSA (meticylin rezistentní *S. aureus*) z prostředí zemědělské prvovýroby chovu hospodářských zvířat (skot, prase, koza), zároveň požadovanou specifickostu hostitelských bakteriálních buněk vyskytujících se v prostředí zemědělské prvovýroby a umožňuje potenciálně různé možnosti aplikace k léčbě stafylokokových infekcí hospodářských zvířat.

Léčba specifických infekčních onemocnění pomocí bakteriofágů (virů) využívá skutečnosti, že popsané fágy využívají k replikaci hostitelské bakteriální buňky, přičemž replikace viru vede k lýze těchto hostitelských buněk. V případě specifického typu hostitelských buněk daného fága tak postupně dochází k redukci populace těchto bakteriálních buněk, resp. k léčbě samotné infekce. Samotná populace viru vzniklá v průběhu tohoto procesu je pak redukována (v případě správné funkce imunitního systému a zvoleného typu fága) v důsledku absence hostitelských buněk umožňujících její replikaci.

V rámci výzkumného projektu NAZV QJ1510216 bylo otestováno několik variant fágů za účelem zjištění jejich lytického účinku u bakteriálních původců infekcí hospodářských zvířat. U kmenů *S. aureus* izolovaných z prostředí zemědělské prvovýroby (chov skotu, prasat a koz) byly otestovány lytické účinky fágů – standardní fág 812 a jeho mutanty (812a, 812JK2, 812h1), dále fágu K, SK311, U16 a komerčně dostupných fágů (PyoPhage, Eliava Institute; StapPhage, Microgen; Stafal, Bohemia Pharmaceuticals) ve formě tzv. fágového lyzátu.

Fágový lyzát 812h1 vznikající po lytické fázi replikační kultury byl otestován na panelu MRSA kmenů *S. aureus*. Sledování účinku bylo provedeno na souboru 11 kmenů *S. aureus* izolovaných od zvířat nebo z prostředí farem s různou vnímavostí ke standardnímu fágu 812, ale citlivých k nové mutantě 812h1. Bakteriofág je deponován ve Sbírce zoopatogenních mikroorganismů (Collection of Animal Pathogenic Microorganisms, CAPM) pod číslem CAPM V-689.

Metodika testování byla založena na principu fágové typizace. Testovací kmeny stafylokoků byly naočkovány do 5 ml BHI bujonu a inkubovány 4 hodiny při 37 °C na třepačce. Touto kulturou byly přelity misky s CaCl₂ agarem, přebytek kultury odstraněn a misky ponechány zaschnout 20 min při laboratorní teplotě. Na takto připravené půdy byl aplikován fágový lyzát, a to v rozsahu ředění 10⁰ až 10⁻⁵. Hodnocení bakteriolýzy bylo prováděno po 24 h inkubaci ploten při 37 °C. Výsledky byly odečítány jako CL (confluent lysis - úplná splývající lýza), SCL (semiconfluent lysis), a dále dle počtu plaků +++ (více než 10 plaků), ++ (5 až 10 plaků), + (2 až 5 plaků) a negativní reakce, kdy nebyl růst stafylokoků v místě. Výsledky tohoto testování uvádí Tabulka 1.

Tabulka 1: Účinek fágových lyzátů na vybrané kmeny *S. aureus*.

Kmen (MRSA)	MLST/spa typ	Druh zvířete	Fág 812	Fág 812a	FágJK2 (812K1/420)	Fág 812h1
SAV113	ST398/t011	prase	R	C	C	C
SAV139	ST398/t011	prase	C	C	C	C
SAV0719	ST398/t2346	skot	R	R	C	C
SAV337	ST398/t034	prase	C	C	C	C
SAV342	ST398/t034	prase	C	C	C	C
SAV0721	ST398/t1255	skot	R	R	C	C
SAV0729	ST398/t034	prase	R	R	C	C
SAV0753	ST398/t011	skot	R	R	C	C
SA1098	ST8/t064	koza	R	R	R	C
SA2094	ST361/t315	skot	R	C	C	C
SA2171	ST398/t011	skot	R	R	C	C

R – rezistentní, C – citlivý

- 5 Jako fág s největší účinností na tyto vybrané bakteriální kmeny byla identifikována mutanta standardního fágu 812 – 812h1. Genomy všech mutantů phi812 byly prověřeny na přítomnost genů typických pro temperované bakteriofágy a faktory bakteriální virulence a rezistence. Vzhledem k tomu, že tyto geny u nich nebyly detekovány, lze fágy odvozené od phi812 považovat za bezpečné pro využití ve fágové terapii. Standardní fág 812 i jeho mutanta byly dále testovány s využitím 94 humánních a 92 veterinárních bakteriálních izolátů MRSA kmenů.

Zatímco k původnímu fágu 812 bylo citlivých 64 % humánních, resp. 71 % veterinárních MRSA kmenů, mutanta 812h1 (Obrázek 1, Obrázek 2) vykazovala výrazné rozšíření spektra citlivých kmenů, a to na 82 % humánních a 97 % veterinárních MRSA kmenů.

- 15 Genomy fágu 812 a 812h1 byly podrobně anotovány a byla provedena komparativní analýza genomů. Bylo zjištěno, že vzájemné rozdíly spočívají zejména v bodových mutacích a různých rozsáhlých delecích. Fág 812h1 se vyznačuje významnými změnami v terminálních oblastech a vykazuje vysokou podobnost s myoviry A5W, Fi200W a fRuSau02. Sekvenční data ukázala, že se u něj nevyskytují tandemové repetice v terminálních oblastech, typické pro phi812 a od něj odvozené mutanty. Přes tyto zjevné rekombinační změny 812h1 obsahuje i geny shodné s původním fágem 812, např. nezkrácený gen pro endolysin. Z výrazného zvýšení počtu kmenů citlivých k 812h1 vyplývá, že terminální tandemové repetice mohou hrát roli ve fágové rezistenci, tj. rozpoznání genomu fágu obranným mechanismem bakterie.

Objasnění výkresů

- 30 Technické řešení bude blíže objasněno pomocí obrázků, kde obr. 1 představuje *S. aureus* a bakteriofágy 812h1 v nutrient bujónu po 4 h společné inkubace (elektronová mikroskopie) a obr. 2 představuje bakteriolyzu kmene SA1098 přípravkem s přidavkem purifikovaného fágového lyzátu 812h1 v různém ředění.

Příklad uskutečnění technického řešení

Přípravek s antibakteriálním účinkem proti stafylokokům vyskytujícím se v prostředí zemědělské prvovýroby obsahuje fága 812h1. Jedná se o purifikovaný či nepurifikovaný fágový lyzát.

Složení médií a pufrů:

Standardní médium, masopeptonový bujón (MPB): Nutrient broth 13 g/l, kvasnicový extract (Yeast extract) 3 g/l, Pepton 5 g/l, pH 7,4 (Oxoid)

5

Optimalizované médium: Trypton 5 g/l, kvasnicový extract (Yeast extract) 2 g/l, NaCl 5 g/l, pH 7,4

10 Fágový pufr: 50 mM Tris-Cl, 10 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, pH 8

Příprava fágového lyzátu:

15 1. Propagační kmen *Staphylococcus aureus* CAPM 6630 (Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Brno) kultivujeme na krevním agaru (Labmediaservis, ČR) při 37 °C po dobu 18 h. Následně naočkujeme plnou baktetriologickou kličku (1 µl) do 20 ml tryptonového média (Trypton 5 g/l, Yeast extract 2 g/l, NaCl 5 g/l, pH 7,4) a kultivujeme staticky při 37 °C po dobu dalších minimálně 18 hodin.

20 2. Do dvoulitrové Erlenmeyerovy baňky připravíme tryptonové médium o objemu 500 ml (tj. ¼ objemu baňky) a inokulujeme 20 ml připravené kultury z bodu 1.

25 3. Kultivujeme za intenzivní aerace na třepačce (150 RPM) při 37 °C do OD₆₀₀= 0,3 až 0,4. Při použití optimalizovaného minimálního média může dojít k prodloužení času kultivace.

4. Po dosažení požadované OD přidáme k rostoucí bakteriální kultuře 50 ml 0,02M CaCl₂ a 50 ml fágového lyzátu 812h1 o minimálním titru 5×10⁸ (ideálně však 5×10⁹).

30 5. Pokračujeme v kultivaci za intenzivní aerace při 37 °C do pročeření bakteriální kultury na OD₆₀₀<0,09. Pokud po 3 hodinách nedojde k pročeření, kultura se umístí do lednice a nechá se stát 12 hodin. Po této době by měla být již pročeřená.

35 6. Takto připravený fágový lyzát se centrifuguje při 6000×g po dobu 30 minut a supernatant se poté přefiltruje přes 0,45 µm filtr s polyethersulfonovou (PES) membránou.

7. U filtrovaného fágového lyzátu se stanoví titr fága na dvouvrstevném agaru.

Pro získání purifikovaného fágového lyzátu je možno aplikovat následující postup:

40 Purifikace fágového lyzátu pomocí tangenciální průtokové filtrace (TFF):

45 Pro zkoncentrování fágových částic a odstranění bakteriálních zbytků a růstového média se využívá ultrafiltrace (tangenciální průtoková filtrace) na ultrafiltračních kazetách millipore Pellicon XL 50 s využitím peristaltické pumpy Thermo scientific FH100. Pro fágy z čeledi *Myoviridae* je vhodné kvůli jeho velikosti používat membránu s porozitou 500 kDa, kdy fág zůstává v retentátu a částice s velikostí nižší než 100 kDa jsou odstraněny. Na ultrafiltrační kazetku připojíme adekvátní silikonové hadičky dle návodu výrobce.

50 1. Ultrafiltrační kazetu Pellicon XL 50 (cut off 500 kDa) promyjeme od hydroxidu sodného vodou a ekvilibrujeme kultivačním médiem.

55 2. Fágový lyzát (500 až 1000 ml) nalijeme do sterilní GL lahve s průchodkou na silikonovou hadičku, která směřuje do peristaltické pumpy a je napojena na ultrafiltrační kazetku do vstupu označeného "feed".

3. Hadička vedoucí z kazetky pellicon XL50 z výstupu “perm“ je vyvedena do GL lahve s odpadem a hadička z výstupu “ret“ je zavedena přes průchodku zpět do lahve fágovým lyzátem.
- 5 4. Po zapojení systému se spustí peristaltická pumpa, kdy je rychlost průtoku nastavena na 40 až 50 ml/min.
5. Po zakoncentrování lyzátu na $\frac{3}{4}$ původního objemu doplníme na původní objem fágovým pufrem, tento krok provedeme 3×.
- 10 6. Poté lyzát koncentrujeme na $\frac{1}{2}$ objemu a znovu doplníme na původní objem, tento krok opakujeme 2×.
7. Lyzát zkoncentrujeme na $\frac{1}{10}$ objemu a doplníme fágovým pufrem na $\frac{1}{2}$ původního objemu. Tento krok opakujeme 2x.
- 15 8. Pokračujeme v koncentrování do finálního požadovaného objemu. Vzorek se poté přefiltruje přes 0,45 μm filtr s polyethersulfonovou (PES) membránou. Koncentrace fága se ustanoví titrací na dvouvrstevném agaru a sterilita se ověří výsevem na miskou.
- 20 9. Uskladnění lyzátu pro následné použití nebo distribuci v lednici při teplotě 4 °C. Maximální doba expirace nebo použitelnosti byla ověřena na 6 měsíců od data výroby.

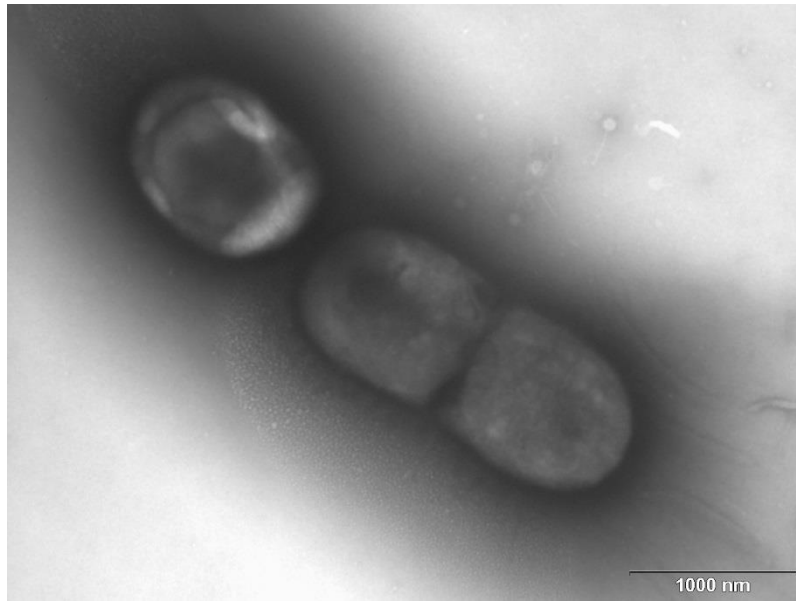
Průmyslová využitelnost

- 25 Přípravek – fágový lyzát – s antibakteriálním účinkem proti stafylokokům vyskytujícím se v prostředí zemědělské prvovýroby podle tohoto technického řešení je možno využít pro produkci veterinárních léčiv s prokázaným účinkem na MRSA bakteriální kmeny vyskytující se v prostředí zemědělské prvovýroby. Konzistence (neviskózní kapalina) fágového lyzátu jej
- 30 umožňuje výrobně začlenit do široké škály preparátů s různým způsobem aplikace.

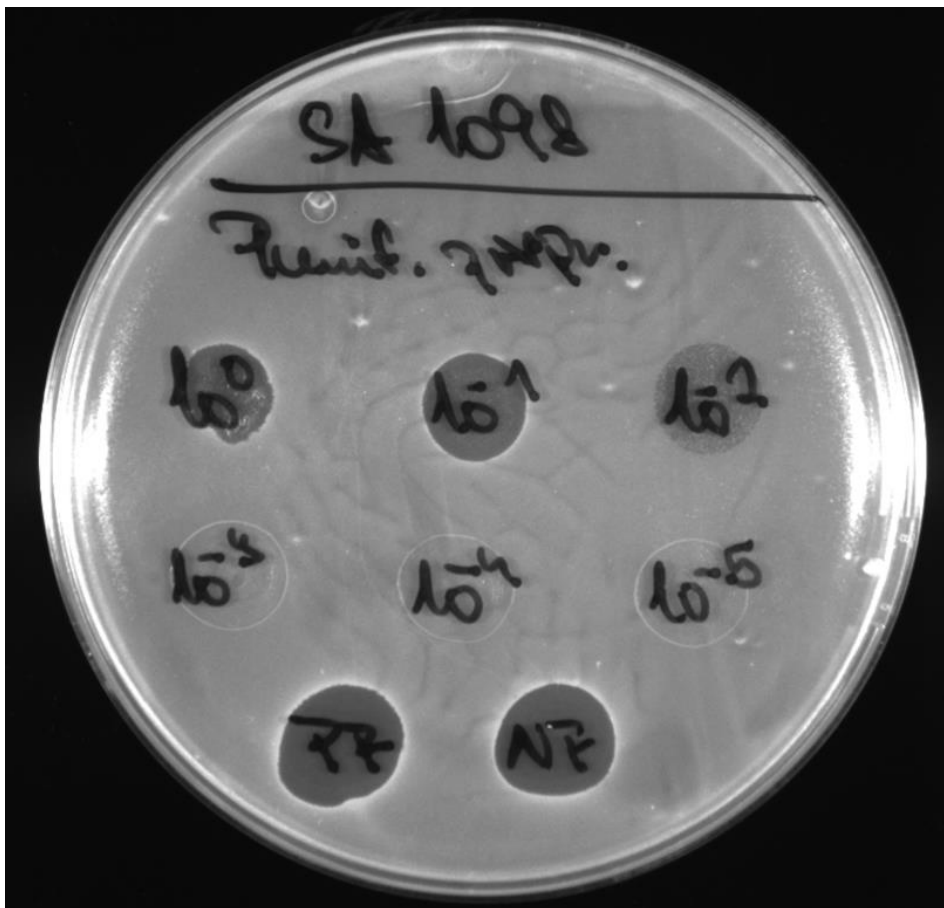
NÁROKY NA OCHRANU

- 35
1. Přípravek s antibakteriálním účinkem proti stafylokokům vyskytujícím se v prostředí zemědělské prvovýroby, **vyznačující se tím**, že obsahuje fágový lyzát fága 812h1.
- 40 2. Přípravek podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že fágový lyzát je ve formě purifikované či nepurifikované.

1 výkres



Obr. 1.



Obr. 2.