# UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:
**36 626**
(13) Druh dokumentu: **U1**
(51) Int. Cl.:

| | |
|---|---|
| ***A61K 31/424*** | (2006.01) |
| ***A61K 31/43*** | (2006.01) |
| ***A61P 31/04*** | (2006.01) |

(19) ČESKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2022-40435**
(22) Přihlášeno: **04.11.2022**
(47) Zapsáno: **29.11.2022**

(73) Majitel:
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i., Brno, Medlánky, CZ
Tekro, spol. s r.o., Praha 4, Krč, CZ

(72) Původce:
Ing. Kamil Šťastný, Ph.D., Brno, Ivanovice, CZ
MVDr. Kateřina Nedbalcová, Ph.D., Brno, Jundrov, CZ
MVDr. Monika Zouharová, Ph.D., Sentice, CZ
MVDr. Katarína Matiašková, Brno, Lesná, CZ
RNDr. Iva Bartejsová, Brno, Židenice, CZ
Ing. Michaela Charvátová, Ph.D., Vanovice, CZ
Mgr. Kristína Tošnerová, Brno, Líšeň, CZ
Mgr. Michaela Víšková, Šternberk, CZ
Mgr. Michal Petreň, Dlouhá Loučka, CZ
Ing. Martin Jeřábek, Ph.D., Brněnec, CZ
Mgr. Jakub Ondrouch, Přerov, Přerov I-Město, CZ

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

(54) Název užitného vzoru:
**Veterinární léčivý přípravek na bázi amoxicilinu a kyseliny klavulanové určený pro drůbež**

CZ 36626 U1

Úřad průmyslového vlastnictví v zápisném řízení nezjišťuje, zda předmět užitného vzoru splňuje podmínky způsobilosti k ochraně podle § 1 zák. č. 478/1992 Sb.

# Veterinární léčivý přípravek na bázi amoxicilinu a kyseliny klavulanové určený pro drůbež

## Oblast techniky

Předkládané technické řešení poskytuje veterinární léčivý přípravek s optimalizovanou dávkou kombinace antimikrobiálních substancí amoxicilinu s kyselinou klavulanovou pro maximální účinnou prevenci a léčbu bakteriálních infekcí u drůbeže, cílovým druhem zvířete jsou zejména chovná plemena brojlera kura domácího.

## Dosavadní stav techniky

Antimikrobika hrají v humánní i veterinární medicíně nezastupitelnou roli pro léčbu bakteriálních infekcí a v současné době nejsou k dispozici žádná alternativní léčiva, která by zajistila léčbu bakteriálních infekcí. V posledních letech došlo k výraznému poklesu objevů a zavádění nových molekul antimikrobik do klinické praxe. Z tohoto důvodu je klíčovým problémem současné medicíny zachovat účinnost v současnosti využívaných antimikrobik, která je vážně ohrožena zvyšující se prevalencí rezistence mikroorganizmů. K omezení vzniku a rozvoje rezistence zásadní měrou přispívá optimálně definované dávkování antimikrobik, které je vyvozeno na základě znalosti farmakokinetických (PK) a farmakodynamických (PD) vlastností daných látek, které definují potřebné expozice antimikrobiálních látek pro maximální účinek na bakterie.

Farmakokinetika popisuje pohyb léčiva v těle v závislosti na čase, zabývá se procesy absorpce léčiva z místa podání, distribuce v těle, metabolismu, konjugace a eliminace léčiva z organismu. Mezi nejčastěji používané PK parametry patří biologická dostupnost léčiva v krevním séru nebo v místě infekce v závislosti na čase (%) nebo distribuční objem Vd, který představuje intenzitu distribuce léčiva v krevním séru nebo do tělesných tkání. Další důležitý parametr je poločas eliminace (t1/2) – doba, za kterou koncentrace léčiva v organismu klesne na polovinu. Znalost (t1/2) umožňuje predikci času potřebného k eliminaci léčiva z organismu nebo akumulaci léčiva při opakovaném dávkování.

PD parametry jsou definované jako vztahy mezi křivkou koncentrace antimikrobika v séru jako zástupný klinický ukazatel pro koncentrace antimikrobika v místě infekce, poměr vrcholu křivky koncentrace a MIC (minimální inhibiční koncentrace) nebo MPC (mutant preventivní koncentrace) (Cmax/MIC nebo Cmax/MPC), poměr plochy pod křivkou koncentrace a MIC nebo MPC (AUC/MIC nebo AUC/MPC) a doba, po kterou koncentrace antimikrobika překročí MIC nebo MPC (T> MIC nebo T> MPC). Stanovení T> MIC a T> MPC je důležité u antimikrobiálních látek s účinkem závislým na čase (např. beta-laktamová antibiotika nebo makrolidy). U antimikrobik s účinkem závislým na koncentraci (např. fluorochinolony nebo aminoglykosidy) je důležité definovat Cmax/MIC nebo AUC/MIC.

Vědecké a klinické studie a data k určení PK a PD vlastností antimikrobiálních látek, potřebné ve veterinární medicíně k predikci účinných dávkovacích schémat pro všechny typy antimikrobik proti všem běžným infekcím a platné pro všechny druhy zvířat, nejsou v žádných databázích dohledatelné. V současné době jsou ve veterinární medicíně PK a PD vlastnosti u používaných veterinárních antimikrobik definovány v převážné většině jen pro velká hospodářská zvířata. Protože je velmi dobře známo, že se PK a PD parametry velmi liší mezi cílovými druhy zvířat, dokonce i mezi jednotlivými věkovými kategoriemi v rámci druhu, nelze definovaná data zobecnit pro všechna zvířata.

U drůbeže a zejména u brojlerů kura domácího byly PK a PD vlastnosti antimikrobik definovány pouze u omezeného spektra antimikrobiálních látek a dostupná data byla generována před desítkami let, byla měřena jinými, méně přesnými metodami než je požadováno dnes podle směrnic EU. Tehdy chovaná plemena kura domácího měla jiný genetický základ v rámci šlechtění, brojleři

dnes nejčastěji chovaných plemen Ross a Comb jinak utilizují potravu, mají jiné denní přírůstky, což souvisí s množstvím přijímané potravy a tekutin a tím i možností medikovat krmivo nebo pitnou vodu. Z důvodů nedostatku relevantních dat nejsou možné registrace nových povolených veterinárních léčivých přípravků pro drůbež.

Situace je nyní taková, že jsou kuřatům z nutnosti podávána léčiva, která nemají požadovanou účinnost, a tím je umožněn vznik a šíření rezistentních bakteriálních populací původců nejrůznějších onemocnění nebo jsou podávána antimikrobika kategorie „B" (rozdělení antimikrobik podle Evropské lékařské agentury), takzvaná antimikrobika 3. volby, která by měla být podávána jen v krajním případě, kdy ostatní možnosti léčby selžou a jejich možnost použití ve veterinární medicíně je ještě více omezená než v medicíně humánní. Dokonce se vážně uvažuje o jejich zákazu používání k léčbě zvířat. Jsou to účinná antimikrobika s širokým spektrem účinku, ke kterým je třeba zachovat citlivost bakteriálních populací. V případě brojlerových kuřat a drůbeže obecně se jedná především o fluorochinolony, zejména hojně používaný enrofloxacin, který je účinný na většinu vyskytujících se infekcí bakteriálního původu u kuřat, je relativně levný a má krátké ochranné lhůty. Časté používání enrofloxacinu může zvýšit prevalenci bakterií rezistentních na fluorochinolony a snížit účinnost terapie ostatními chinolony u infekcí lidí i zvířat z důvodu možné zkřížené rezistence. Přesto je aplikace enrofloxacinu v chovech drůbeže vzhledem k širokému spektru účinnosti proti infekcím různé etiologie mnohem častější v porovnání s jinými antimikrobiálními látkami. Tyto informace vycházejí z údajů o spotřebách antimikrobiálních látek v ČR, které jsou od roku 2000 v souladu se Zákonem o léčivech a Akčním plánem Národní antibiotické politiky (Usnesení vlády, 2009) shromažďovány a analyzovány v Ústavu pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv v Brně (ÚSKVBL).

Cílem předkládaného technického řešení je poskytnout alternativní veterinární léčivo k enrofloxacinu a dalším fluorovaným chinolonům.

## Podstata technického řešení

Předpokládané technické řešení poskytuje veterinární léčivý přípravek s optimalizovanou dávkou a složení kombinace dvou antimikrobiálních substancí kyseliny klavulanové s amoxicilinem (Acidum clavulanicum, CAS 58001-44-8 a Amoxycillinum, CAS 26787-78-0) pro dosažení maximální účinnosti léčby bakteriálních infekcí u cílového druhu zvířete, zejména chovných plemen brojlerů kura domácího, stanovených na základě provedených nových farmakokinetických studií. Předkládané technické řešení vytváří podmínky k tomu, aby mohla být veterinárním lékařům zaměřeným na problematiku chovu drůbeže nabídnuta alternativní léčiva za účelem omezování spotřeby enrofloxacinu a dalších fluorovaných chinolonů. Moderními metodami hmotnostní spektrometrie byla získána jedinečná data pro definování hodnot PK a PD parametrů kyseliny klavulanové, která je podávána současně s amoxicilinem pro brojlerová kuřata, které by v mnohých případech mohly používání enrofloxacinu u kuřat nahradit. Byla stanovena účinnost těchto antimikrobiálních látek z hlediska závislosti jejich koncentrace v krvi brojlerových kuřat na čase po jednorázovém a opakovaném podání léčiva a byla stanovena jedinečná eliminační křivka těchto látek, která je jedinečná u brojlerových kuřat. Z těchto údajů bylo navrženo nové optimální složení (poměr účinných látek) veterinárního léčiva – kombinace kyseliny klavulanové, která je podávána současně s amoxicilinem, včetně popisu použití, doby léčby a optimálního dávkování.

Amoxicilin je polosyntetické antibiotikum patřící do skupiny penicilinů, tzv. „β-laktamové antibiotikum", která jsou primárně odvozená z aminokyseliny 6-aminopencilanové. Tato základní aminokyselina má ve své molekule v přírodním materiálu velmi vzácně se vyskytující β-laktamový kruh. Amoxicilin se vyznačuje širokým spektrem vysoké účinnosti proti řadě gram pozitivním i gram negativním mikroorganizmům. Mechanizmus účinků amoxicilinu a β-laktamových antibiotik obecně, spočívá v zásahu do biosyntézy mukopeptidu buněčné stěny bakterií. Stěna buňky bakterií je v základě tvořena polymerem mezi substituovanou muramovou kyselinou vázanou na peptid, který tvoří „spojovací můstek" síťové struktury s další substituovanou

muramovou kyselinou. Tato pevně mřížovaná síť buněčné stěny je narušována amoxicilinem, který zabraňuje vzniku příčných vazeb při tvorbě buněčné stěny bakteriální buňky v místech D-alaninu, který se tím vyřazuje z biosyntézy, tedy pevnost buněčné stěny nestačí vnitřnímu tlaku, zejména při růstu buňky, a dochází k její lýze.

Nevýhodou amoxicilinu je jeho významná citlivost vůči enzymům typu β-laktamáz, které v molekule amoxicilinu štěpí β-laktamový kruh. Účinnost amoxicilinu je od samého počátku zavedení jeho používání v medicíně primárně omezena proti původním, přírodním bakteriím (např. stafylokoky), které jsou schopny produkovat tyto typy β-laktamázových enzymů. Dnes ale nabývají na závažnosti i skupiny bakterií, které si postupně během času rezistenci vytvořily a získaly vlastní schopnost produkovat tyto typy enzymů, tzv. rezistentní bakterie.

Kyselina klavulanová je nevratný (ireverzibilní) inhibitor intracelulárních a extracelulárních β-laktamáz, účinný proti celé řadě těchto enzymů, včetně enzymů II. až V. třídy (podle Richmonda a Sykese). Kyselina klavulanová proto účinně chrání amoxicilin před inaktivací mnoha typy β-laktamáz a tím rozšiřuje antibakteriální spektrum amoxicilinu, kdy většinu izolátů produkujících β-laktamázu činí citlivými na toto antimikrobiální léčivo. V provedených klinických studiích jsou amoxicilin/kyselina klavulanová bakteriologicky i klinicky účinnější než samotný amoxicilin a získané publikované výsledky prokazují, že jsou přinejmenším stejně účinné, jako řada jiných srovnávacích látek, jako jsou například perorálně podávané cefalosporiny, kotrimoxazol, doxycyklin, enrofloxacinu a bacampicilin, při léčbě nejběžnějších forem infekcí, se kterými se setkáváme v běžné praxi, tj. infekcí dýchacích cest, infekcích kůže a infekcí měkkých tkání.

Samotná kyselina klavulanová má pouze slabou antibakteriální aktivitu, s výjimkou *Legionella* spp. a určitých kmenů *Branhamella catarrhalis, B. fragilis* a *Neisseria gonorrhoeae*. Přidáním kyseliny klavulanové k amoxicilinu se však zvyšuje citlivost na amoxicilin rezistentních kmenů gramnegativních a grampozitivních aerobních a anaerobních bakterií, kde je rezistence způsobena produkcí β-laktamázy. A v důsledku užití této kombinace léčiv byla antibakteriální aktivita amoxicilinu významně obnovena, a to v době, kdy šíření zvyšující se rezistence na amoxicilin v důsledku rozšiřující se produkce β-laktamáz i rezistentních bakterií, vážně ohrožovalo jakékoli použití tohoto antimikrobika k léčbě infekcí.

Předmětem předkládaného technického řešení je tedy veterinární léčivý přípravek pro léčbu bakteriálních infekcí u drůbeže, vhodný zejména pro podání kuřatům, který obsahuje jako účinnou složku kombinaci látek amoxicilin (amoxycillinum) s kyselinou klavulanovou (acidum clavulanicum) v molárním poměru v rozmezí od 2:1 do 3:1. S výhodou je přípravek určen pro dávkování od 8 do 9 mg účinné látky na 1 kg živé hmotnosti.

Amoxicilin (CAS 26787-78-0) pro přípravu přípravku může být například ve formě trihydrátu (CAS 61336-70-7) a kyselina klavulanová (CAS 58001-44-8) pro přípravu přípravku může být například ve formě své draselné nebo lithné soli (CAS 61177-45-5, resp. CAS 61177-44-4).

Přípravek lze podávat optimálně v pitné vodě nebo krmivu. Pro dosažení homogenního pokrytí celého hejna je však vhodnější aplikace léčiva v pitné vodě.

Veterinární léčivý přípravek může dále obsahovat alespoň jednu pomocnou látku, vybranou ze skupiny zahrnující nosiče, jako jsou přírodní polymery (například chitosan, kyselina alginová, karageny, arabská guma, pektiny) nebo syntetické polymery (například kopolymery na bázi *N*-(2-hydroxypropyl) methakrylamidu, deriváty ply(ethylenglykolu)) nebo látky upravující chuťové vlastnosti (například cukry: laktózu, maltózu, kyselinu citronovou).

V jednom provedení je molární poměr amoxicilinu ku kyselině klavulanové 3:1. S výhodou je v tomto případě dávkování 8 mg kombinace (v kombinaci 3 mol. díly amoxicilinu + 1 mol. díl kyseliny klavulanové) na 1 kg živé hmotnosti.

V jiném provedení je molární poměr amoxicilinu ku kyselině klavulanové 2:1. S výhodou je v tomto případě dávkování 9 mg kombinace (v kombinaci 2 mol. díly amoxicilinu + 1 mol. díl kyseliny klavulanové) na 1 kg živé hmotnosti.

Ve výhodném provedení je amoxicilin ve veterinárním léčivém přípravku použit ve formě ve formě amoxicilin trihydrátu (CAS: 61336-70-7) a kyselina klavulanová ve formě draselné soli (CAS: 61177-45-5, Kalii clavulanas) nebo ve formě lithné soli (CAS: 61177-44-4, Lihtium clavulanas).

Přípravek může být podaný v jedné dávce nebo v opakované dávce po dobu od 2 do 5 dnů, s výhodou po dobu 5 dnů, nejvýhodněji v opakované dávce dvakrát denně po dobu 5 dnů. Takto je poskytnuta přesně definovaná a bezpečná léčivá směs s optimálně stanoveným dávkováním, vhodná pro masné i nosné linie drůbeže, která obsahuje kombinaci léčivých substancí optimalizovaných na kura domácího, která ve vysoké účinnosti dosahuje maximálního synergického antimikrobního účinku vůči řadě grampozitivních i gramnegativních bakterií a zároveň významně snižuje rizika vzniku rezistentních kmenů těchto bakterií.

Veterinární léčivý přípravek je vhodný zejména pro podávání v rané fázi výkrmu drůbeže, optimálně po prvních 14 dnech života drůbeže, ale lze jej podat i v pozdějších dnech v průběhu celého cyklu výkrmu za předpokladu dodržení předepsaných ochranných lhůt. Nejvýhodnější je jeho podání kuřatům bezprostředně v rané fázi výkrmu. Přípravek je proto určen zejména k aplikaci 14denním kuřatům na farmách, v opakované dávce 2 x denně po dobu 5 dnů.

Veterinární léčivý přípravek dle předkládaného technického řešení lze připravit prostým smícháním amoxicilinu a kyseliny klavulanové ve výše uvedeném molárním poměru, popřípadě jejich rozpuštěním ve vodě nebo fyziologickém roztoku. Případně mohou být k účinné složce přidány pomocné látky, jako jsou přírodní polymery (například chitosan, kyselina alginová, karageny, arabská guma, pektiny) nebo syntetické polymery (například kopolymery na bázi *N*-(2-hydroxypropyl) methakrylamidu, deriváty ply(ethylenglykolu)) nebo látky upravující chuťové vlastnosti (například cukry: laktózu, maltózu, kyselinu citronovou).

Veterinární léčivý přípravek podle technického řešení má oproti všem podobným, doposud používaným produktům, tyto technické výhody:

- kombinace antimikrobiálních léčivých látek volně použitelných ve veterinární medicíně bez jakýchkoli restrikcí, částečných omezení či zákazu použití,
- doporučené dávkování je optimalizováno pro kura domácího v závislosti na dosažené hmotnosti a souvisejícím věku a vede k významnému snížení užívání (nadužívání) antimikrobik,
- omezení rozvoje a především účinnému bránění šíření rezistence bakterií produkující různé druhy β-laktamázových enzymů vlivem selekčního tlaku,
- navržené významné snížení účinné dávky antimikrobik vede k celé řadě pozitivních efektů v rámci využívání těchto léčiv ve veterinární medicíně, například: účinnou ochranu kura domácího s minimalizovanou zátěží jeho organismu, zkrácením ochranné lhůty pro použití v potravinovém řetězci, snížení reziduální zátěže životního prostředí po vyloučení zbytků léčiv a jejich metabolitů z organizmu na farmách a jejich okolí, zejména užití u odpadních vod.

Objasnění výkresů

Obrázek 1: Chromatogram a hmotnostní spektrum kyseliny klavulanové v reálném vzorku plazmy a v čase $T_{max}$ farmakokinetické křivky po orální aplikaci brojleru kura domácího. Všechna naměřená chromatografická data byla automaticky integrována a kvantitativní koncentrace byly

stanoveny na základě matricové (sérum) kalibrační křivky s přídavkem interního standardu Tazobactam (IS).

Obrázek 2: Příklad výsledné farmakokinetické křivky antimikrobika (kyselina klavulanová) po perorální aplikaci brojlerovým kuřatům.

Obrázek 3: Grafické vyhodnocení průběhu farmakokinetické křivky, závislosti koncentrace amoxicilinu v plazmě (mg/l) na čase po jednorázové perorální aplikaci brojlerovým kuřatům.

Obrázek 4: Grafické vyhodnocení průběhu farmakokinetické křivky, závislosti koncentrace kyseliny klavulanové v plazmě (mg/l) na čase po jednorázové perorální aplikaci brojlerovým kuřatům.

Příklad uskutečnění technického řešení

V rámci předkládaného technického řešení byla provedena řada PK experimentů s masným plemenem ROSS kura domácího, který má dnes nevětší zastoupení v chovech brojlerů na hospodářských farmách. Prvotním cílem provedených PK studií bylo najít vhodné veterinární léčivo, které by mohlo být minimálně ekvivalentem, případně mohlo úspěšně nahradit dnes nejrozšířeněji používané u brojlerových kuřat a drůbeže obecně enrofloxacin. Hledání vhodné náhrady za enrofloxacin bylo dáno několika důvody. Hlavním důvodem bylo, že antimikrobiální léčiva na chemické bázi fluorochinolonů (nejčastěji používaný u drůbeže, již výše jmenovaný enrofloxacin) patří dle nové legislativy Evropské lékové agentury (EMA) do kategorie antimikrobik kategorie „B“, takzvaná antimikrobika 3. volby, která by měla být podávána jen v krajním případě, kdy ostatní možnosti léčby selžou a jejich možnosti použití ve veterinární medicíně je ještě více omezená než v medicíně humánní. Dokonce se dnes diskutuje a vážně uvažuje o jejich úplném zákazu používání k léčbě zvířat. Dalším důvodem, neméně podstatným, bylo, že v současné době jsou ve veterinární medicíně PK a PD vlastnosti u používaných veterinárních antimikrobik definovány v převážné většině jen pro velká hospodářská zvířata, nikoli však pro drůbež. Dále, PK a PD vlastnosti jsou v převážné většině případů definovány na základě zastaralých analytických metod, používaných před více než 30 lety (především malá citlivost a velmi špatná schopnost identifikace cílené chemické molekuly). A protože je obecně velmi dobře známo, že farmakokinetické a farmakodynamické parametry se podstatně liší mezi cílovými druhy zvířat, dokonce i mezi jednotlivými věkovými kategoriemi v rámci druhu, nelze definovaná data zobecnit pro všechna zvířata.

Na základě znalostí byly vybrány léčivé substance ze skupiny penicilinů, β-laktamová antibiotika v kombinaci s inhibitorem β-laktamáz kyselinou klavulanovou, jako vhodná náhrada. Využitím závislostí mezi chemickou strukturou a účinkem v kombinaci s mikrobiologickým testováním účinnosti *in vitro* byla v konečné fázi vybrána jako nejúčinnější kombinace amoxicilin s kyselinou klavulanovou. V opakovaných uskutečněných farmakokinetických studií provedených na cílovém druhu brojlerech kura domácího při použití aplikační dávky léčiva obecně používané a odvozené od velkých hospodářských zvířat bylo prokázáno, že skutečně dosažené plazmatické koncentrace v bodě $C_{max}$ byly u testovaných brojlerů pro amoxicilin přibližně 2-3 x vyšší a u kyseliny klavulanové byly koncentrace 1,5 x vyšší ve srovnání s obecně uváděnými hodnotami ze stavu techniky.

*Farmakokinetika – amoxicilin a kyselina klavulanová*

Amoxicilin (Registrační číslo CAS: 26787-78-0) byl ve veterinárním léčivém přípravku použit ve formě amoxicilin trihydrátu (CAS: 61336-70-7) a kyselina klavulanová (Registrační číslo CAS: 58001-44-8) ve formě draselné soli (CAS: 61177-45-5, Kalii clavulanas) nebo ve formě lithné soli (CAS: 61177-44-4, Lihtium clavulanas). Pro kvantitativní hodnocení pohybu léčivých substancí v organizmu cílového zvířete v závislosti na čase, který závisí v hlavní míře na daném léčivu, na

cestě podání a na působení organizmu na léčivo, a s použitím matematických přístupů, byly určeny PK parametry, které nám umožnily srovnávat léčivé substance mezi sebou a stanovit optimální dávku. PK experimenty byly provedeny na cílovém zvířeti - testovacím systému brojlerů kura domácího, hybridní linie ROSS 308. Druh hybridní linie neměl na výsledek vliv, hybridní linie ROSS byla zvolena z důvodu snadné dostupnosti brojlerů v chovech v České republice a výhodné standardizaci. Dnes jsou k výkrmu určeny speciální masné hybridy, a to převážně ROSS a COBB, kteří tak patří mezi nejrozšířenější plemena v užitkových chovech. Pro tyto hybridy jsou stanoveny propracované technologické postupy výkrmu a spočítány přesné parametry užitkovosti, které by měli jedinci v daném dni věku při dodržení stanovených podmínek dosahovat, a proto se dal pokus lépe standardizovat. Výběr biologického testovacího systému byl dále založen na získání vzorků o dostatečném objemu. Biologické testovací systémy byly zdraví jedinci cílového druhu, u nichž bylo možno očekávat bezproblémový příjem krmiva a vody, a tím zabezpečit příjem testované položky.

Do provedených studií byli zařazeni jednodenní brojleři obojího pohlaví, poměr pohlaví neměl na studii vliv. Pokusná zvířata byla krmena *ad libitum* standardní krmnou směsí dle receptury BR1 (BIOSTAN), odpovídající dané věkové kategorii bez antikokcidik z důvodu možných interferencí s testovanými léčivými látkami a ovlivnění správnosti výsledků při analýzách biologického materiálu. Krmná směs byla používána po celou dobu studií. Po celou dobu pokusu byl zajišťován welfare jednotlivých brojlerů v souladu se zákonem 246/1992 Sb. Klimatické a světelné podmínky, velikost prostor ustájení, krmení a napájení zvířat bylo nastaveno tak, aby odpovídalo požadavkům na odchov brojlerů, bylo denně kontrolováno a upravováno. Manipulace s brojlery byla šetrná a byla omezena na nejmenší možnou míru. Brojleři byli chováni ve větších skupinách, v počtech odpovídajících prostoru chovného boxu, po dobu 14 dnů potřebných k aklimatizaci. K jejich rozdělení do menších skupin došlo až v den začátku aplikace dávek testovaných léčiv (14. den studie). Průměrná živá hmotnost brojlerů v den aplikace (15. den života) dle technologického postupu činí 535 g, skutečně zvážená hmotnost byla v rozmezí 289,9 až 314,6 g vyjádřeno jako 95% interval spolehlivosti, průměrná živá hmotnost byla 302,2 g. Roztok pro aplikaci byl připraven naředěním veterinárního léčivého přípravku o fixní kombinaci amoxicilinu s kyselinou klavulanovou v molárním poměru 4 : 1 do pitné vody, takto připravený roztok byl kuřatům jednotlivě aplikován v objemu 1 ml *per orálně* pomocí stříkačky se sondou.

Postupně byly uskutečněny dvě PK studie. První studie byla „pilotní“. V obou studiích probíhala v experimentálních stájích VÚVeL experimentální část studie se zvířaty a laboratorní část studie byla provedena v analytických laboratoří VÚVeL v.v.i. Brno.

Kinetika změny plazmatických koncentrací cílových analytů amoxicilinu a kyseliny klavulanové v závislosti na časových intervalech byla měřena na analytických zařízeních využívajících vysoce citlivých a přesných metod na základě kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií typu orbitrap s vysokým rozlišením (LC-MS/MS-HR). Použité analytické metody pro stanovení koncentrací cílových analytů ve vzorcích kuřecích sér byly validovány v plném rozsahu dle mezinárodních standardů pro biochemické metody ve veterinární medicíně: pokynu CVMP/VICH/591/98 VICH GL 2 a pokynu EMEA/CVMP/VICH/463202/2009 VICH GL 49. Základní parametry hmotnostní spektrometrie pro molekuly cílových analytů jsou uvedeny v Tabulce 1 a příklad naměřeného chromatografického spektra s vyznačenými integrovanými plochami píků pro určení koncentrace analytu trimethoprimu a hmotnostního spektra v odpovídajícím retenčním čase analytu pro konfirmační identifikaci molekuly analytu je uveden na Obrázku 1.

Tabulka 1. *Identifikace analytu amoxicilinu a kyseliny klavulanové pomocí parametru MA (mass accuracy) v hmotnostní spektrometrii s využitím vysokého rozlišení RP = 70 000 (FWHM).*

| | Kyselina klavulanová | | | Tazobactam (IS) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Elementární složení** | $[C_8H_8NO_5]^-$ | | | $[C_{10}H_{11}N_4O_5S]^-$ | | |
| **m/z prekursorový iont** | 198.04080 | | | 299.04556 | | |
| **Mass accuracy precursorového iontu (ppm)** | -1.62 | | | 0.10 | | |
| **Fragmentační energie (eV)** | 17 | | | 30 | | |
| **m/z identifikační produktový iont** | 136.0404 | 82.02984 | | 255.05573 | 207.08875 | |
| **m/z kvantifikační produktový iont** | | | 108,04549 | | | 138.05605 |
| **Mass accuracy produktového iontu (ppm)** | -2.65 | -3.41 | -1.20 | 0.74 | 0.29 | 0.65 |
| **ESI mód** | negativní | | | negativní | | |
| **RT (min)** | Acetonitrile | Plasma | Meat | Acetonitrile | Plasma | Meat |
| | 1.34 | 1.26 | 1.29 | 1.38 | 1.27 | 1.38 |
| | **Amoxicilin** | | | **Tazobactam (IS)** | | |
| **Elementární složení** | $[C_{16}H_{19}N_3O_5S]^-$ | | | $[C_{10}H_{11}N_4O_5S]^-$ | | |
| **m/z prekursorový iont** | 419.13623594 | | | 299.04556 | | |
| **Mass accuracy precursorového iontu (ppm)** | -1.27 | | | 0.10 | | |
| **Fragmentační energie (eV)** | 35 | | | 30 | | |
| **m/z identifikační produktový iont** | 136.0404 | 82.02984 | | 255.05573 | 207.08875 | |
| **m/z kvantifikační produktový iont** | | | 108,04549 | | | 138.05605 |
| **Mass accuracy produktového iontu (ppm)** | -2.65 | -3.41 | -1.20 | 0.74 | 0.29 | 0.65 |
| **ESI mód** | negativní | | | negativní | | |
| **RT (min)** | Acetonitril | Plazma | Sval | Acetonitril | Plazma | Sval |
| | 1.34 | 1.26 | 1.29 | 1.38 | 1.27 | 1.38 |

*Poz.: FWHM = full width at half maximum; MA = mass accuracy; MS = mass spectrometry (hmotnostní spektrometrie); RP = resolving power (rozlišovací schopnost); RT = retenční čas; IS = Interní standard.*

Stanovení základních farmakokinetických parametrů ($C_{max}$, $T_{max}$ a AUC) bylo provedeno v souladu s mezinárodními standardy. Vypočtené hodnoty základních PK parametrů veterinárních léčivých substancí trimethoprimu a sulfamethoxazolu v séru brojlerů po jednorázové a opakované orální aplikaci - $C_{max}$, $T_{max}$ a AUC jsou uvedeny v Tabulkách 2 a 3. Příklady grafického vyhodnocení průběhu farmakokinetických křivek je uveden na Obrázcích 2, 3 a 4.

*Farmakokinetické vlastnosti (experimentálně ověřené v provedených studiích)*

Absorpce

Léčivé substance amoxicilin a kyselina klavulanová, které jsou aplikovány ve formě solí, mají podobné fyzikálně-chemické vlastnosti (amoxicilin pKa=2,8; kyselina klavulanová pKa=2,7) a z pohledu farmakokinetiky se chovají velmi podobně. Po perorálním podání brojlerům se obě léčivé substance rychle a velmi dobře absorbují z gastrointestinálního traktu do systémové cirkulace. Amoxicilin i kyselina klavulanová jsou biologicky dostupné z přibližně 65 až 70 %.

Distribuce

Maximální plazmatické koncentrace každé složky bylo u brojlerů dosaženo za krátkou dobu po jednorázovém podání: hodnoty $T_{max}$ se pohybovaly v rozmezí 0,25 až 1 h. Maximální plazmatické koncentrace vykazovaly výrazné rozdíly u každého jednotlivě ošetřeného zvířete, naměřeny byly na hladinách $C_{max}$ = 1,82 až 2,58 mg/l pro kyselinu klavulanovou, resp. $C_{max}$ v rozmezí 6,34 až 11,39 mg/l u amoxicilinu. Obě látky se jen mírně váží na plazmatické proteiny a rychle se distribuují do tělních tekutin a tkání. Nízká vazba na plazmatické proteiny urychluje a usnadňuje vlastní distribuce do všech tkání. Zdánlivý distribuční objem Vd byl okolo 0,3 až 0,4 l/kg pro amoxicilin a okolo 0,2 l/kg pro kyselinu klavulanovou, a to i po opakovaném podání (5 dnů).

Biotransformace

Obě použité léčivé substance byly primárně metabolizovány v játrech, metabolismus amoxicilinu byl v menší míře omezen na hydrolýzu beta-laktamového kruhu a byl transformován na neúčinnou kyselinu penicilanovou v množstvích ekvivalentních až 10 až 25 % počáteční dávky a v této formě vyloučen. Kyselina klavulanová je z menší části (do 10%) metabolizována na 1-amino-4- hydroxybutan-2-on.

Eliminace

Obě léčivé substance a jejich metabolity se vylučují ledvinami, většina podané dávky byla eliminována v aktivní formě a díky jejich fyzikálně-chemickým vlastnostem, byla eliminace z plazmy velmi rychlá. Eliminační poločas $t_{1/2}$ byl u amoxicilinu < 0,8 hodiny, eliminační poločas $t_{1/2}$ kyseliny klavulanové byl 0,4 až 0,8 hodiny. A v souladu s tím byly i odpovídající hodnoty eliminačních konstant: $K_{el}$ = 0,7 $hod^{-1}$ pro amoxicilin a $K_{el}$ = 0,8 $hod^{-1}$ pro kyselinu klavulanovou. Měřitelné plazmatické koncentrační hladiny na úrovni LOQ (Limit kvantifikace daný použitou analytickou metodou) těchto substancí v krvi brojlerů, lze analyzovat ještě v rozmezí 4 až 6 hodin u amoxicilinu, v čase 3 hodin u kyseliny klavulanové, po jednorázové aplikaci odpovídající dávky.

Tabulka 2. *Shrnutí získaných farmakokinetických parametrů kyseliny klavulanové a amoxicilinu v poměru 4: 1 a dávce 10 mg amoxicilinu (ve formě soli trihydrátu) a 2,5 mg kyseliny klavulanové (ve formě draselné soli) na 1 kilogram živé hmotnosti v první „pilotní" studii: $C_{max}$ – maximální koncentrace, $T_{max}$ – čas dosažení maximální koncentrace, $T_{1/2}$ – biologický poločas eliminace, $K_{el}$ – eliminační konstanta, AUC – plocha pod křivkou koncentrací léčiva*

| Parametr | Hodnota | | Jednotka |
|---|---|---|---|
| | Kyselina klavulanová | Amoxicilin | |
| Cmax | 1,82 ± 0,90 | 11,39 ± 2,75 | $mg.l^{-1}$ |
| Tmax | 0,25 | 0,25 | hod |
| T1/2 | 0,80 | 0,98 | hod |
| Kel | 0,87 ± 0,04 | 0,70 ± 0,01 | $hod^{-1}$ |
| $AUC_{0-1440}$ | 2,39 | 13,33 | $mg.hod.l^{-1}$ |
| $AUC_{1440-\infty}$ | 0,01 | 0,01 | $mg.hod.l^{-1}$ |
| $AUC_{0-\infty}$ | 2,40 | 13,40 | $mg.hod.l^{-1}$ |

Tabulka 3. *Shrnutí získaných farmakokinetických parametrů kyseliny klavulanové a amoxicilinu v poměru 4 : 1 a dávce 10 mg amoxicilinu (ve formě soli trihydrátu) a 2,5 mg kyseliny klavulanové (ve formě draselné soli) na 1 kilogram živé hmotnosti v druhé studii: $C_{max}$ – maximální koncentrace, $T_{max}$ – čas dosažení maximální koncentrace, $T_{1/2}$ – biologický poločas eliminace, $K_{el}$ – eliminační konstanta, AUC – plocha pod křivkou koncentrací léčiva*

| PK parametr | Kyselina klavulanová | Amoxicilin | Jednotka |
|---|---|---|---|
| $C_{max}$ | 2,58 | 6,43 | $mg.l^{-1}$ |
| $T_{max}$ | 0,5 | 1 | hod |
| $T_{1/2}$ | 0,41 | 0,86 | hod |
| AUC | 3,52 | 7,69 | $mg.hod.l^{-1}$ |
| Interval spolehlivost 95% AUC | (1,65; 5,39) | (4,59; 10,80) | $mg.hod.l^{-1}$ |
| $K_{el}$ | 1,67 | 0,9 | $hod^{-1}$ |

*Mikrobiologická účinnost*

Inhibiční účinnost kombinace amoxicilinu a kyseliny klavulanové byla hodnocena stanovením minimálních inhibičních koncentrací (MIC) této kombinace u 114 terénních izolátů aviárně patogenní *Escherichia coli* (APEC) provedením bujónové mikrodiluční metody podle mezinárodně závazných metodik vydaných European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) a Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) (Tabulka 4).

V mikrotitračních destičkách byla v ředící řadě 1:2 naředěna kombinace amoxicilinu a kyseliny klavulanové (v molárním poměru 2:1, který je stanoven pro testování citlivosti/rezistence bakterií). Pro testování byl použit trihydrát amoxicilinu a draselná sůl kyseliny klavulanové. Testované koncentrace amoxicilinu byly v rozmezí 0,125 mg/l až 32mg/l. Do každé jamky bylo podle přesně uvedeného postupu (EUCAST, CLSI) inokulováno požadované množství bakteriální kultury o požadované denzitě. Po následné kultivaci 18 hodin při 35 °C byly odečítány výsledky. Jako MIC byla zaznamenána první koncentrace testované kombinace amoxicilinu a kyseliny klavulanové v ředící řadě, která viditelně zabránila růstu bakteriální kultury (čirá jamka bez zákalu). Jako kontrola kvality testování bylo provedeno souběžné testování referenčního kmene *E. coli* ATCC 25922, u kterého je stanoveno odpovídající rozmezí naměřené koncentrace pro kombinaci amoxicilinu a kyseliny klavulanové.

Rozdělení izolátů do kategorií citlivosti (citlivé a rezistentní) bylo provedeno podle interpretačních kritérií (= breakpointů) uvedených pro *E. coli* (Enterobacterales) v EUCAST. Citlivé izoláty mají MIC pro amoxicilin v rozmezí od ≤0,125 mg/l do 8 mg/ml, intermediární izoláty mají hodnotu MIC 16 mg/l a rezistentní izoláty mají hodnotu MIC vyšší než 32 mg/l.

Tabulka 4. Distribuce MIC u izolátů APEC (n = 114)

| **Koncentrace amocixilin/kyselina klavulanová (mg/l)*** | **Počet izolátů** | **Vyjádřeno v %** |
|---|---|---|
| >32 | 1 | 0,9 |
| 16 | 1 | 0,9 |
| 8 | 2 | 1,8 |
| 4 | 49 | 43,0 |
| 2 | 30 | 26,3 |
| 1 | 28 | 24,6 |
| 0,5 | 3 | 2,6 |
| 0,25 | 0 | 0 |
| ≤0,125 | 0 | 0 |

*koncentrace v tabulce platí pro amoxicilin

*Stanovení optimálního účinného dávkování pro cílové zvíře – brojler kura domácího*

Použití klinicky aplikované farmakokinetiky na cílovém druhu zvířete bylo hlavním nástrojem k predikci koncentrace léčiva v ustáleném stavu, druhým nástrojem bylo použití hodnocení antimikrobní účinnosti „in vitro“. Na základě těchto použitých experimentálních přístupů bylo možno optimalizovat a individualizovat poměr léčivých látek a zároveň upravit dávkování za různých podmínek (různá dávka, jednorázová nebo opakovaná aplikace).

Porovnáním Cmax a AUC s mikrobiologickou účinností každé ze zkoumaných účinných látek byla stanovena účinná dávka jejich kombinace a opakovaná dávka. Jako optimální poměry a optimální dávkování bylo pro brojlera kura domácího stanoveno následující:

1) ***V molárním poměru 3:1 (amoxicilin: kyselina klavulanová) to je 8 mg kombinace na 1 kg živé hmotnosti, podané v jedné dávce nebo opakované dávce po dobu 5 dnů,***

2) ***V molárním poměru 2:1 (amoxicilin: kyselina klavulanová) to je 9 mg kombinace na 1 kg živé hmotnosti, podané v jedné dávce nebo opakované dávce po dobu 5 dnů.***

*Dodržování ochrany zvířat*

V provedených PK studiích byl dále uplatněn:

- Zákon č. 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání v platném znění
- Vyhláška č. 419/2012 Sb. o ochraně pokusných zvířat v platném znění
- Experimentální část studie proběhla v prostorách experimentálních stájí VÚVeL na základě oprávnění k používání experimentálních zvířat rozhodnutím Ministerstva zemědělství č.j. 5050/2020-MZE-18134, spisová značka 16OZ15806/2019-18134, jehož platnost je do 24. 3. 2025.
- Experimentální část studie proběhla dle schváleného projektu pokusů VÚVeL 23-2018, č.j. 39317/2019-MZE-18134

Použité postupy získávání dat pro vývoj léčiv byly v souladu s požadovanými mezinárodními standardy na provedení farmakokinetických studií, průkaz účinnosti antibiotik a kombinací léčiv.

## NÁROKY NA OCHRANU

1. Veterinární léčivý přípravek pro drůbež, **vyznačený tím**, že obsahuje jako účinnou složku kombinaci amoxicilinu a kyseliny klavulanové v molárním poměru v rozmezí od 2:1 do 3:1.

2. Veterinární léčivý přípravek pro drůbež podle nároku 1, **vyznačený tím**, že dále obsahuje alespoň jednu pomocnou látku, vybranou ze skupiny zahrnující nosiče a látky upravující chuťové vlastnosti, s výhodou jsou nosiče vybrané ze skupiny zahrnující přírodní a syntetické polymery.

3. Veterinární léčivý přípravek pro drůbež podle nároku 2, **vyznačený tím**, že přírodní polymery jsou vybrané ze skupiny zahrnující chitosan, kyselinu alginovou, karageny, arabskou gumu a pektiny; syntetické polymery jsou vybrané ze skupiny zahrnující kopolymery na bázi N-(2-hydroxypropyl) methakrylamidu, deriváty poly(ethylenglykolu); a látky upravující chuťové vlastnosti jsou vybrané ze skupiny zahrnující laktózu, maltózu a kyselinu citronovou.

4. Veterinární léčivý přípravek pro drůbež podle kteréhokoliv z předchozích nároků 1 až 3 pro použití pro léčbu bakteriálních infekcí u drůbeže, s výhodou u brojlerů kura domácího.

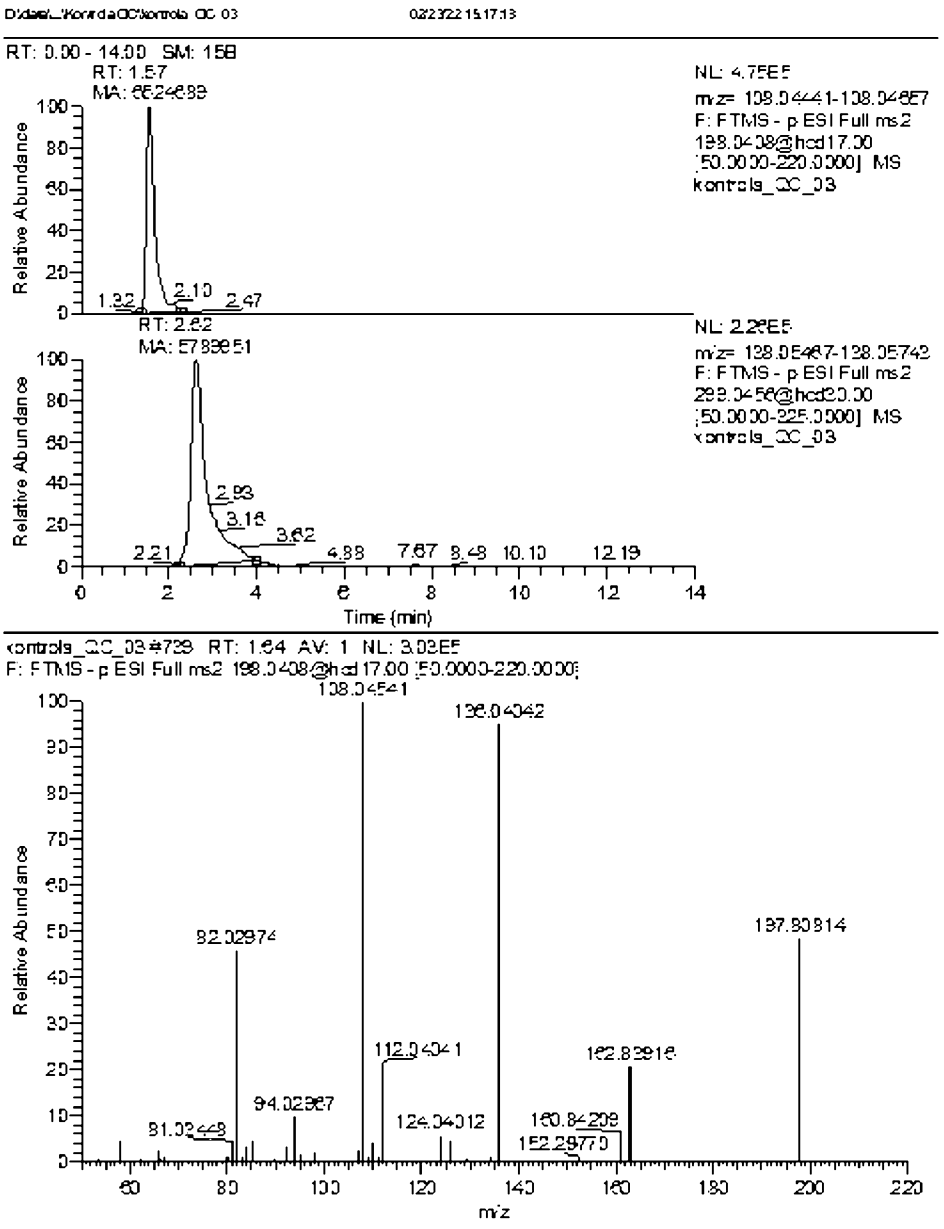
5. Veterinární léčivý přípravek pro drůbež podle kteréhokoliv z předchozích nároků 1 až 3 pro použití pro léčbu bakteriálních infekcí dýchacích cest, infekcích kůže a infekcí měkkých tkání u drůbeže, s výhodou u brojlerů kura domácího.

6. Veterinární léčivý přípravek pro drůbež podle kteréhokoliv z předchozích nároků 1 až 3 pro použití pro léčbu bakteriálních infekcí u drůbeže, s výhodou u brojlerů kura domácího, při dávkování od 8 do 9 mg účinné složky na 1 kg živé hmotnosti v jedné dávce nebo v opakované dávce po dobu v rozmezí od 2 do 5 dnů.

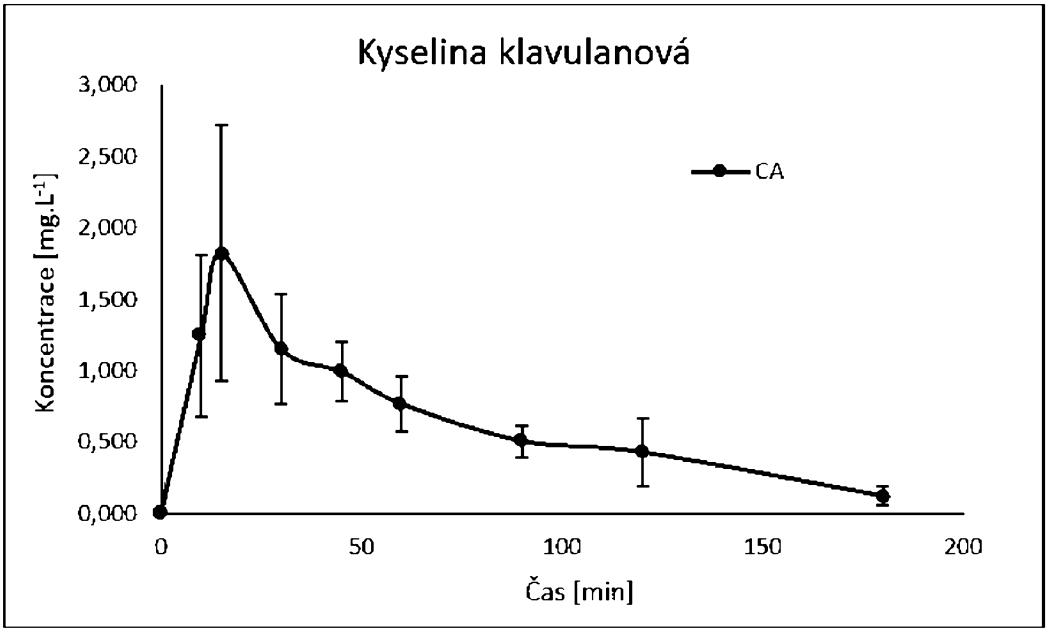
7. Veterinární léčivý přípravek pro drůbež podle kteréhokoliv z předchozích nároků 1 až 3 pro použití pro léčbu bakteriálních infekcí u drůbeže, s výhodou u brojlerů kura domácího, při dávkování 9 mg uvedené kombinace na 1 kg živé hmotnosti, s výhodou v opakované dávce dvakrát denně po dobu 5 dnů, přičemž uvedený přípravek obsahuje jako účinnou složku kombinaci amoxicilinu a kyseliny klavulanové v molárním poměru 2:1.

8. Veterinární léčivý přípravek pro drůbež podle kteréhokoliv z předchozích nároků 1 až 3 pro použití pro léčbu bakteriálních infekcí u drůbeže, s výhodou u brojlerů kura domácího, při dávkování 8 mg uvedené kombinace na 1 kg živé hmotnosti, s výhodou v opakované dávce dvakrát denně po dobu 5 dnů, přičemž uvedený přípravek obsahuje jako účinnou složku kombinaci amoxicilinu a kyseliny klavulanové v molárním poměru 3:1.

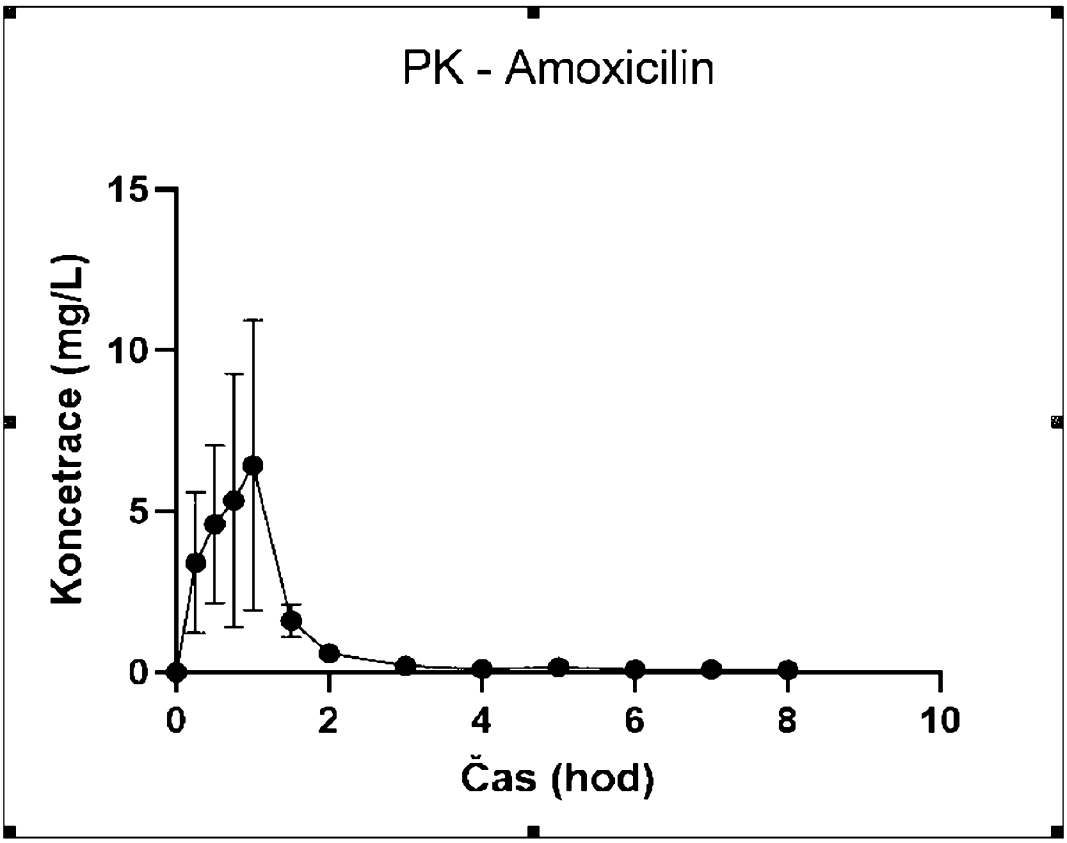
4 výkresy


RT: 0.00 - 14.00 SM: 15B
RT: 1.57
MA: 66246B8
NL: 4.75E5
m/z= 198.04441-198.04867
F: FTMS - p ESI Full ms2
198.0408@hcd17.00
[50.0000-220.0000] MS
kontrols_QC_03
Relative Abundance
1.32
2.10
2.47
RT: 2.62
MA: 5783851
NL: 2.28E5
m/z= 198.05467-198.05742
F: FTMS - p ESI Full ms2
299.0456@hcd20.00
[50.0000-225.0000] MS
kontrols_QC_03
2.93
3.18
3.62
2.21
4.88
7.67
8.48
10.10
12.19
Time (min)
kontrols_QC_03#729 RT: 1.64 AV: 1 NL: 3.03E5
F: FTMS - p ESI Full ms2 198.0408@hcd17.00 [50.0000-220.0000]
198.04541
196.04042
92.02874
197.80814
112.04041
182.82916
94.02867
91.02449
124.04012
160.84208
152.29770
m/z

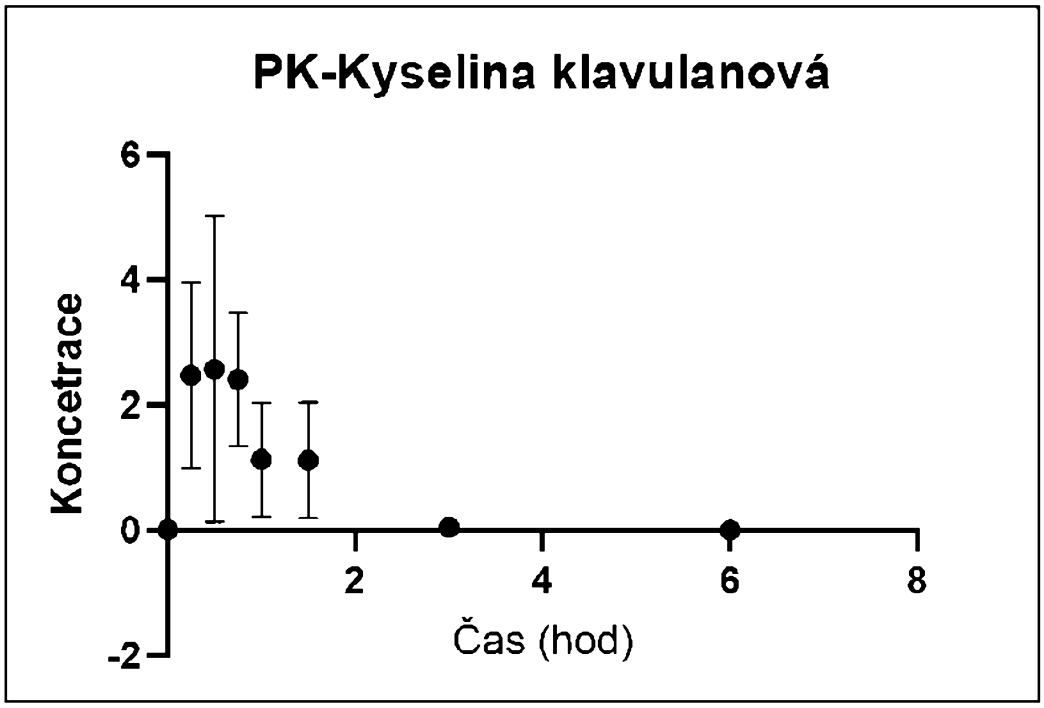
Obr. 1


Kyselina klavulanová
3,000
2,500
2,000
1,500
1,000
0,500
0,000
Koncentrace [mg.L-1]
CA
0
50
100
150
200
Čas [min]

Obr. 2




Obr. 3




Obr. 4