

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2010-933**
(22) Přihlášeno: **15.12.2010**
(40) Zveřejněno: **31.08.2011**
(Věstník č. 35/2011)
(47) Uděleno: **20.07.2011**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **31.08.2011**
(Věstník č. 35/2011)

(11) Číslo dokumentu:

302 683

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. CL:
A61K 35/74 (2006.01)
C12N 1/00 (2006.01)
C12R 1/225 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:
WO 2010/133761; WO 2010/069920; JP 2010031031.

(73) Majitel patentu:
VALOSUN a.s., Brno, CZ
(72) Původce:
Čadová Lenka Mgr. Dr., Kyjov, CZ

(54) Název vynálezu:
Probiotické kmeny *Lactobacillus fermentum* 16A/1 a *Lactobacillus crispatus* 13A a jejich využití k vaginální aplikaci

(57) Anotace:
Řešení se týká probiotických kmenů *Lactobacillus fermentum* 16 A/1 (CCM 7879) a *Lactobacillus crispatus* 13A (CCM 7878), uložených v České sbírce mikroorganismů Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity, Tvrďého 14, 602 00 Brno, a jejich použití k prevenci či terapii vaginálních infekcí a k obnovení a stabilizaci vaginálního prostředí.



Fig. 1: *Lactobacillus fermentum* 16A/1



Fig. 2: *Lactobacillus crispatus* 13A

CZ 302683 B6

Probiotické kmeny *Lactobacillus fermentum* 16A/1 a *Lactobacillus crispatus* 13A a jejich použití k vaginální aplikaci

5 Oblast techniky

Vynález se týká dvou probiotických kmenů *Lactobacillus fermentum* 16A/1 (CCM 7879) a *Lactobacillus crispatus* 13A (CCM 7878), které byly izolovány z vaginy zdravých žen a které jsou určeny k použití ve vaginálních prostředcích určených k prevenci a léčbě vaginálních onemocnění způsobených patogenními bakteriemi. Kmeny se svými vlastnostmi a účinky vzájemně doplňují, jejich kombinace je tudíž unikátní. Oba probiotické kmeny jsou uloženy v České sbírce mikroorganismů Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně.

15 Dosavadní stav techniky

Probiotické bakterie se již po několik desetiletí používají v nejrůznějších výrobcích pro jejich blahodárné účinky na celkový zdravotní stav organismu. Mechanismus jejich působení spočívá v jejich schopnosti kompetice o místa adheze s patogenními mikroorganismy, dále v produkci antimikrobiálních látek a také v modulaci imunitního systému hostitelského organismu. K vaginální aplikaci se nejčastěji používají kmeny rodu *Lactobacillus*, v menší míře pak rod *Streptococcus*. Výrobky jsou obvykle ve formě vaginálních tablet, čípků nebo tobolek a jsou registrovány buď jako zdravotnický prostředek, nebo léčivý přípravek. Jistou nevýhodou těchto výrobků je často nevaginální původ obsažených probiotických kmenů, což může vést k nežádoucím alergickým reakcím (svědění, pálení). Dalším nedostatkem je geografický původ kmenů. Často nelze geografický původ vůbec dohledat, přičemž efektivnost působení probiotických kmenů je na geografickém původu v nemalé míře závislá.

30 Podstata vynálezu

Nové probiotické kmeny *Lactobacillus fermentum* 16A/1 (CCM 7879) a *Lactobacillus crispatus* 13A (CCM 7878) výše uvedené nedostatky překonávají. Byly izolovány z vaginy zdravých českých žen, čili jak zdroj, tak i geografický původ jsou optimální pro jejich potencionální použití k prevenci či terapii poševních infekcí a k obnovení a stabilizaci poševního prostředí. Probiotické kmeny *Lactobacillus fermentum* 16A/1 a *Lactobacillus crispatus* 13A jsou deponovány v České sbírce mikroorganismů a byly u nich stanoveny základní vlastnosti, které zajišťují jejich probiotické působení – vitalita po lyofilizaci, baktericidní a kandidacidní aktivita, produkce kyseliny mléčné, produkce peroxidu vodíku, adherence k vaginálnímu epitelu, odolnost vůči antibiotikům, imunomodulační vlastnosti. Kombinace obou kmenů je stabilní, životaschopná a ve svých účincích výjimečně se doplňující směs splňující přísné požadavky moderní medicíny.

Izolace: poševní stěry žen splňujících podmínky: zcela zdravé, které pravidelně neužívají žádné látky; premenopauzální, věk 20 až 40 let; ženy, které neužívaly v posledních 14 dnech antibiotickou léčbu; ženy neužívající hormonální antikoncepci min. 3 měsíce; doba odběru – uprostřed menstruačního cyklu, tj. těsně po ovulaci; min. 2 dny po nechráněném pohlavním styku.

Kultivační podmínky: médium MRS, CO₂/anaerobně, 36,5 °C

Identifikace: presumptivní identifikace založena na rep-PCR (GTG₅), následné identifikace: biotypizace (API 50CH, apiweb; konvenčně), ribotypizace (RiboPrinter), MALDI-TOF MS.

Stanovení růstových křivek a vitality po lyofilizaci

Metodika: kmeny se kultivují na M.R.S. agaru (24 h v atmosféře 5% CO₂) a naočkují se do tekutého růstového média M.R.S. bujonu. Spektrofotometricky se suspenze nastaví při vlnové délce 540 nm na absorbanci 0,01 oproti čistému M.R.S. bujonu a inkubuje se ve vícero sterilních zkumavkách při teplotě 37 °C v prostředí 5% CO₂. V hodinových časových intervalech se spektrofotometricky měří absorbance v jednotlivých zkumavkách oproti čistému médiu při vlnové délce 540 nm do dosažení vrcholu exponenciálního růstu. V průběhu měření se bakteriální kultura udržuje. Ze získaných hodnot absorbance se sestrojí růstová křivka.

Příprava lyofilizátů: kmeny vykultivované na M.R.S. agaru (v atmosféře 5% CO₂) se naočkují do růstového média M.R.S. a nechají se inkubovat po dobu do dosažení vrcholu exponenciální fáze růstové křivky při vhodné teplotě v prostředí 5% CO₂. Narostlá kultura se centrifuguje při 39 200 m.s⁻² po dobu 30 min v centrifuze s chlazením. Supernatant se oddělí a sediment se promyje sterilní vodou. Tento postup se několikrát opakuje. Získaný sediment se po rozsuspendování ve sterilní vodě lyofilizuje.

Vitalita

Lyofilizáty kmenů se rozsuspendují ve fyziologickém roztoku (pH 7,2). Získaná suspenze se naředí fyziologickým roztokem v geometrické řadě. Z každého ředění se nanese určité množství na desky s M.R.S. agarem a inkubuje se potřebnou dobu při vhodné teplotě v atmosféře 5% CO₂. Po inkubaci se vyberou ředění s počítatelným množstvím kolonií (20 až 200 kolonií). Kolonie se spočítají a vypočítá se počet živých buněk na 1 g lyofilizátu.

kmen	ředění	počet buněk/ ml
13A	10 ⁻⁵	7,60 x 10 ⁷
16A/1	10 ⁻³	2,50 x 10 ⁸

Stanovení imunomodulační aktivity

Fagocytová aktivita a fagocytový index izolovaných lidských leukocytů: k 100 µl suspenze leukocytů (2x10⁶/ml) v mikrozkušavkách se přidá 50 µl usmrcených buněk *Streptococcus faecalis* (1x10⁸ buněk zbarvených 1% methylenovou modří). Zpravidla se dělá 6 paralelních stanovení. Za stálého míchání se vzorky inkubují na vodní lázni při teplotě 37 °C po dobu 1 h. Celý obsah mikrozkušavek se opatrně rozetře pomocí mikropipety na podložní sklíčka a nechají se vysušit na vzduchu při laboratorní teplotě. Preparáty se barví podle Wrighta. Sleduje se počet fagocytů stejně jako množství pohlcených bakterií. Fagocytová aktivita se vypočítá jako % fagocytujících buněk ze 100 monocytů. Fagocytový index se vypočítá jako průměrné množství fagocytových bakterií na jednu fagocytující buňku.

Lysozymová aktivita: Princip stanovení lysozymové aktivity spočívá v tom, že důsledkem působení lysozymu na buněčnou stěnu grampozitivních bakterií je lýze buňky, která se projeví poklesem absorbance. Do otvorů mikrotitrační destičky s plochým dnem se napipetuje 150 µl supernatantu získaného po dezintegraci suspenze jednotlivých vzorků lidských leukocytů po 15 h inkubace a 50 µl suspenze *Micrococcus luteus*. Z každého vzorku se dělá 6 paralelních stanovení. Měří se absorbance při vlnové délce 410 nm oproti vzduchu v čase 0 a 20 min spektrofotometricky (DYNATECH MR 5000).

Peroxidázová aktivita: Na stanovení peroxidázové aktivity se použije supernatant získaný po dezintegraci suspenze jednotlivých kmenů. Dezintegrované buňky se centrifugují při 39 200 m.s⁻² po dobu 20 min. Do otvorů mikrotitrační destičky s plochým dnem se nanese 150 µl supernatantu získaného po dezintegraci suspenze jednotlivých kmenů a 50 µl substrátu pro peroxidázu připra-

veného těsně před použitím. Z každého vzorku se dělá 6 paralelních stanovení. Měří se absorban-
ce při vlnové délce 490 nm oproti vzduchu v čase 0 a 20 min spektrofotometricky (DYNATECH
MR 5000). Po 20 min se reakce zastaví přidáním 50 μ l kyseliny sírové (4 mol.l⁻¹) a znovu se
změří absorbance.

5

Adherence k epitelovým buňkám (alternativní metoda stanovení hydrofobnosti)

Testovaný kmen se naočkuje do M.R.S. bujónu a nechá se růst do vrcholu exponenciálního růstu.
Vykultivovaná kultura se centrifuguje při 39 200 m.s⁻² po dobu 20 min, sediment se promyje
v tlumivém roztoku na hydrofobnost a následně se naředí na určenou absorbanci. 4 ml této sus-
penze se smíchá s 1,0 ml xylenu a směs se 1 až 2 min promíchává. Následně se nechá 30 min
stát. Kapilárou se odebere vodní vrstva do kyvety a měří se pokles absorbance při vybrané vlnové
délce oproti absorbanci základní suspenze.

10

kmen	% hydrofobnosti	průměr
13A	74,55	64,23
	53,91	
16A/1	48,71	56,90
	65,08	

15

Produkce kyseliny mléčné

Jednotlivé kmeny se naočkují do M.R.S. bujónu a inkubují 18 h při 37 °C v 5% atmosféře CO₂.
Vykultivovaná kultura se zcentrifuguje při 39 200 m.s⁻² po dobu 20 min. Poté se 2,5 g buněk
z mokré masy přenesou do 25 ml fosfátového tlumivého roztoku (pH 7,0). Dezintegrovány buňky
(dezintegrace 4 x 20s při 18 kHz) se centrifugují při 39 200 m.s⁻² po dobu 20 min. Do kyvety se
vloží: 1 ml supernatantu po centrifugaci, 2 ml roztoku 1 (Glycin 75,1 g + hydrazin sulfát 52,1 g
doplnit H₂O do 800 ml, pH 9,5) a 2 ml roztoku NAD (900 mg β -NAD v 30 ml vody). Jako
porovnávací roztok slouží fosfátový tlumivý roztok (pH 7,0). Měří se absorbance při 340 nm
(E1), potom se přidá 0,02 ml roztoku L-LDH (2250 U/ml L-LDH rozpuštěno ve fosfátovém
tlumivém roztoku, pH 7,0). Inkubuje se po dobu 30 min při 37 °C, ochladí na laboratorní teplotu
a měří se absorbance při 340 nm (E2). Výpočet: E = E2 - E1. Roztok kyseliny mléčné standard:
kyselina mléčná 0,1 mg/ml.

25

30

Kmen	konc. g/l	$\pm$ SD
13A	19	1,8
16A/1	18	1

Kvantitativní stanovení produkce peroxidu vodíku

Enzym peroxidáza štěpí H₂O₂ za vzniku molekuly vody a kyslíku, přičemž akceptorem protonů
vodíku je o-dianizidin. Touto reakcí vzniká barevná sloučenina o-dianizidinchinondiimin. Kulti-
vace: jednotlivé kmeny se nechají růst do vrcholu exponenciálního růstu v M.R.S. bujónu v 5%
atmosféře CO₂. Suspenze bakteriálních kultur se upraví na absorbanci 0,1 při 410 nm a kultivují
se 30 min a též 10 h při 37 °C v M.R.S. bujónu v 5% atmosféře CO₂. Buňky se oddělí centrifuga-
cí při 39 200 m.s⁻² a v supernatantě se stanoví obsah peroxidu vodíku po 30 minutách a po
10 hodinách. Koncentrace H₂O₂ se vypočítá z kalibrační křivky.

40

Reakční směs: Supernatant 163,9 μ l
0,1% vodný roztok křenové peroxidázy 32,8 μ l
1% vodný roztok o-dianizidinu 3,3 μ l
Celkový objem 200,0 μ l

45

Reakční směs se inkubuje 10 min při laboratorní teplotě a reakce se zastaví přidáním 6,5 µl mol/l HCl. Následně se měří absorbance při 410 nm.

30 min	13A	16A/1
	0,149	0,142
	0,211	0,198
	0,196	0,15
	0,192	0,171
	0,226	0,154
	0,163	0,146
průměr	0,190	0,160
	0,085	0,055
Prům. odchylka	0,029	0,021
µg/ml	116,00	41,00

10 h	13A	16A/1
	0,303	0,223
	0,28	0,207
	0,311	0,181
	0,312	0,222
	0,258	0,195
	0,349	0,235
průměr	0,302	0,211
	0,132	0,041
Prům. odchylka	0,031	0,020
µg/ml	233,50	6,00

Baktericidní a kandidacidní aktivita

Jednotlivé kmeny laktobacilů se kultivují v tekutém M.R.S. bujonu v 5% atmosféře CO₂ při teplotě 37 °C. Suspenze se ředí podle stupnice McFarlanda 4 (t.j. 2,1x10⁹ bakterií/ml) v 0,9% roztoku NaCl, což odpovídá A 600 = 0,669. Následně se na desce s modifikovaným M.R.S. agarem udělají pruhy použitím kličky o objemu 10 µl (Obrázek 5). Desky se inkubují 24 h při teplotě 37 °C v 5% atmosféře CO₂.

Vybrané bakterie (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 11229 a *Candida albicans* CCM 8186) se inkubují v peptonové vodě 24 h. Jednotlivé bakterie se ředí peptonovou vodou podle stupnice McFarlanda 3, což odpovídá A600 = 0,582. Následně se na desku, kde jsou vykultivované laktobacily, inokulují jednotlivé bakterie kličkou o objemu 1 µl ve dvou liniích. První se vede od středové linie laktobacilů k okraji desky o objemu 1 µl ve dvou liniích. První se vede od středové linie laktobacilů k okraji desky a druhá opačně – od okraje desky k středové laktobacilové linii s odstupem 2 mm (viz obr.). Desky se inkubují 18 h v 5% atmosféře CO₂ při teplotě 37 °C. Po inkubaci vybraných bakterií se měří inhibiční zóny v mm. Inhibice růstu patogenu dlouhá 0 až 12 mm se považuje za slabou, 13 až 25 mm za středně silnou a když je inhibiční zóna delší než 25 mm, považuje se za silnou.

13 A	1. miska (mm)		2. miska (mm)		3. miska (mm)		4. miska (mm)		5. miska (mm)		θ (mm)	SD ±
<i>E. coli</i>	12	13	13	14	13	13	11	12	14	13	12,8	0,871
<i>St. aureus</i>	-	17	-	16	18	18	15	14	13	14	15,6	1,798
<i>C. albicans</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16 A/1	1. miska (mm)		2. miska (mm)		3. miska (mm)		4. miska (mm)		5. miska (mm)		θ (mm)	SD ±
<i>E. coli</i>	19	19	21	19	17	17	19	18	15	17	18,1	1,578
<i>St. aureus</i>	25	28	25	27	-	25	26	30	26	27	26,5	1,571
<i>C. albicans</i>	3	3	2	3	2	2	3	2	3	2	2,5	0,5

Antibiogram

Stanovení citlivosti na antibiotika se dělá deskovou metodou podle Fleminga: na Petriho misku o průměru 9 cm se nalije M.R.S. agar a nechá se ztuhnout. Jednotlivé kmeny se nechají kultivovat

do vrcholu exponenciálního růstu v M.R.S. bujonu. Bujon se zcentrifuguje ($34\,580\text{m.s}^{-2}$), sediment se rozsuspenderuje ve fyziologickém roztoku (pH 7,2) a absorbance se upraví na hodnotu 0,35 při 540 nm. Připravené suspenze sledovaných kmenů se nanesou na ztuhlý M.R.S. agar v množství 100 μl a zahnutou skleněnou vysterilizovanou tyčinkou se rovnoměrně rozprostou po povrchu agaru. Na jednu Petriho misku se nanesou šest antibiotických (ATB) disků (s průměrem 6 mm) a nechá se kultivovat 24 h v anaerobní atmosféře 5% CO_2 . Nevykultivované mikroorganismy na desce v blízkosti ATB disku jsou známkou citlivosti testovaného mikroorganismu na ATB. Citlivost na ATB se vyjádří jako průměr prstence inhibice růstu okolo kruhového ATB disku v mm. Jako referenční mikroorganismu byl použit kmen *Staphylococcus aureus* CCM 2022.

kmen	PNC R28/C29	AMP R28/C29	OX R10/C13	CAZ R14/C18	CTX R14/C23	VA R9/C12	CN R12/C15
<i>S. aureus</i>	40	31	25	19	33	13	16
	C	C	C	C	C	C	C
13A	30	27	12	18	20	0	7
	C	SC	SC	C	SC	R	R
16A/1	28	27	18	22	24	0	8
	SC	R	C	C	C	R	R

kmen	TOB R12/C15	OXF R12/C16	CIP R15/C21	TE R14/C19	E R13/C23	DA R14/C21
<i>S. aureus</i>	16	23	27	35	25	25
	C	C	C	C	C	C
13A	0	0	0	21	21	22
	R	R	R	C	SC	C
16A/1	0	0	0	21	23	17
	R	R	R	C	C	SC

PNC– penicilin, AMP – ampicilin, OX–oxacilin, CAZ– ceftazidin, CTX – cefotaxim, VA– vancomycin, CN–gentamicin, TOB–tobramycin, OFX– ofloxacin, CIP – ciprofloxacin, TE – tetracyklin, E – erytromycin, DA – klindamycin,

C–citlivý, R–rezistentní, SC–středně citlivý

Přehled obrázků na výkresech

Na obr. 1a je mikroskopický snímek probiotického kmene *Lactobacillus fermentum* 16A/1, pořízený pomocí QuickPhoto Camera 2.1.

Na obr. 1b je mikroskopický snímek probiotického kmene *Lactobacillus crispatus* 13A, pořízený pomocí QuickPhoto Camera 2.1.

Obr. 2a znázorňuje růstovou křivku probiotického kmene *Lactobacillus fermentum* 16A/1.

Obr. 2b znázorňuje růstovou křivku probiotického kmene *Lactobacillus crispatus* 13A.

Obr. 3 ukazuje fagocytovou aktivitu.

Obr. 4 ukazuje fagocytový index.

Na obr. 5 je znázorněna lysozymová aktivita.

Na obr. 6 je znázorněna peroxidázová aktivita.

Obr. 7 ukazuje postup očkování laktobacilů proužkovou metodou na desce.

5

Příklady provedení vynálezu

10 Zdravotnický prostředek nebo léčivý přípravek, který obsahuje kombinaci probiotických kmenů *Lactobacillus fermentum* 16A/1 (CCM 7879) a *Lactobacillus crispatus* 13A (CCM 7878), je určený k vaginální aplikaci s indikací pro prevenci či terapii poševních infekcí, způsobených patogenními mikroorganismy, a k obnovení a stabilizaci poševního prostředí při vaginálních disbiózách.

15

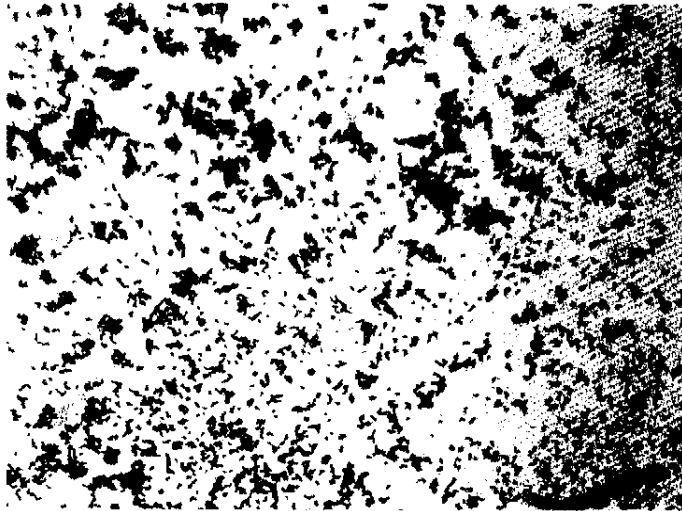
PATENTOVÉ NÁROKY

20 1. Probiotický kmen *Lactobacillus fermentum* 16 A/1 (CCM 7879) a *Lactobacillus crispatus* 13A (CCM 7878).

25 2. Probiotický kmen *Lactobacillus fermentum* 16 A/1 (CCM 7879) a *Lactobacillus crispatus* 13A (CCM 7878) pro použití k prevenci či terapii vaginálních infekcí a k obnovení a stabilizaci vaginálního prostředí.

30

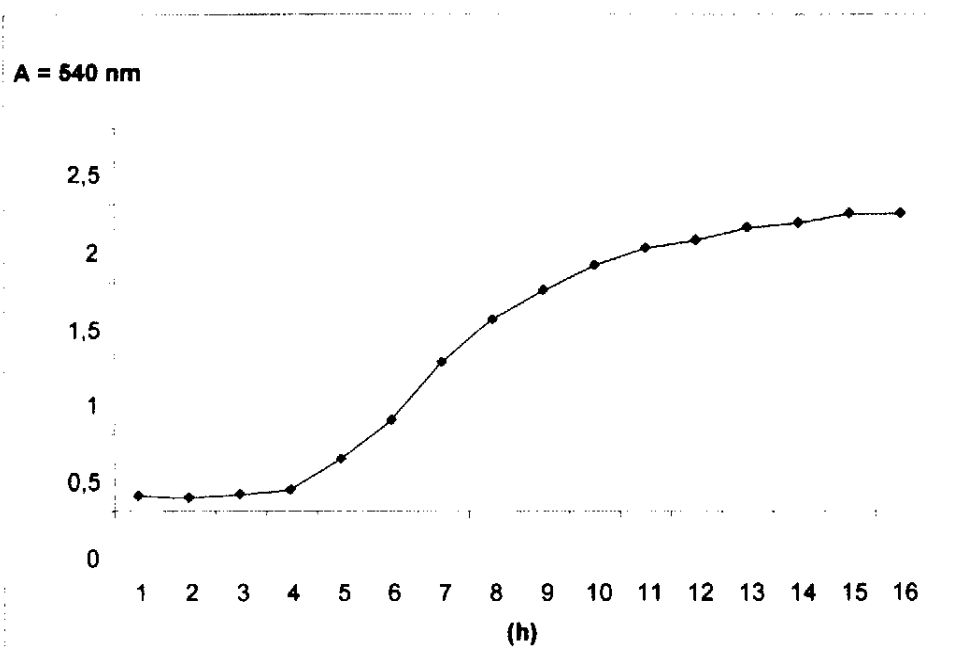
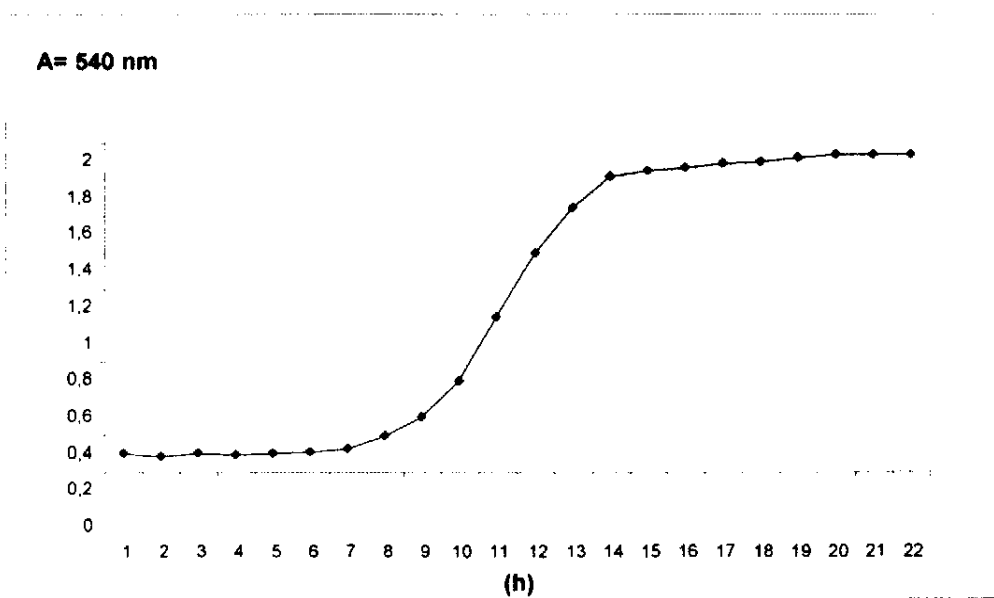
5 výkresů

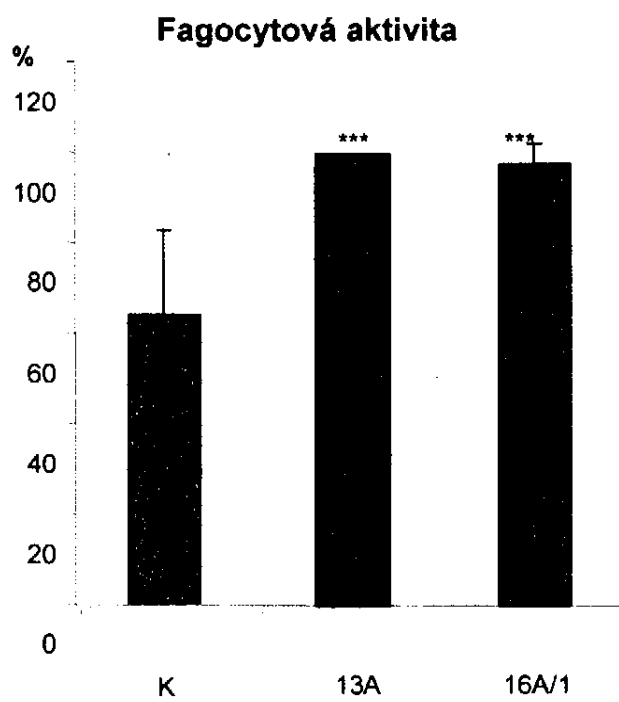


Obr. 1a

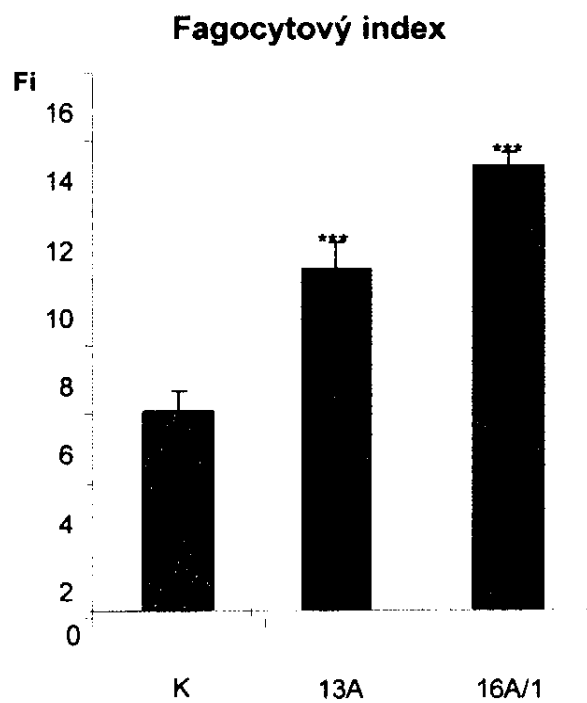


Obr. 1b

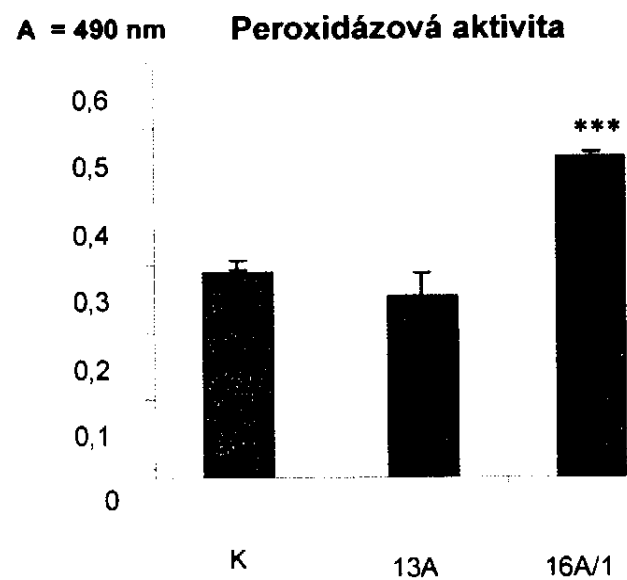
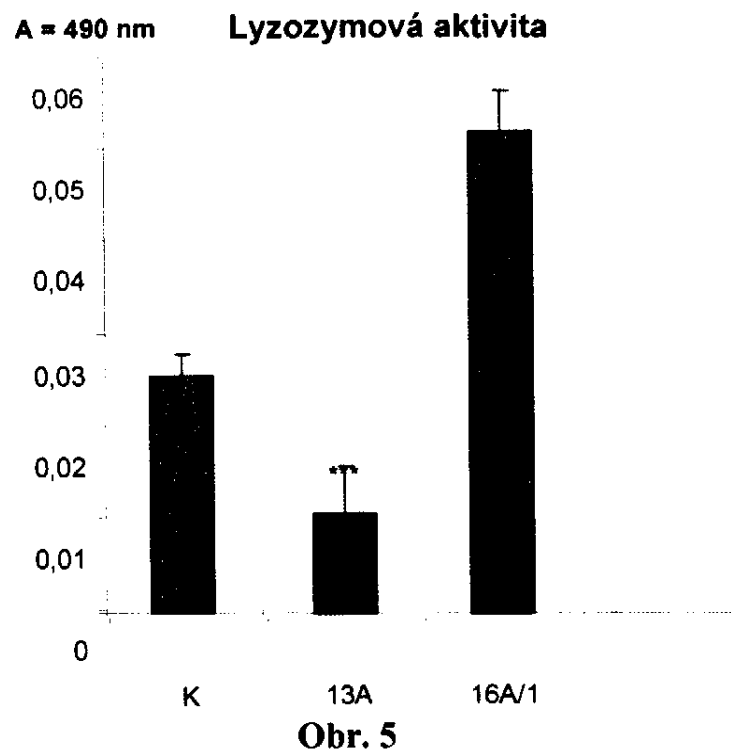
**Obr. 2a****Obr. 2b**

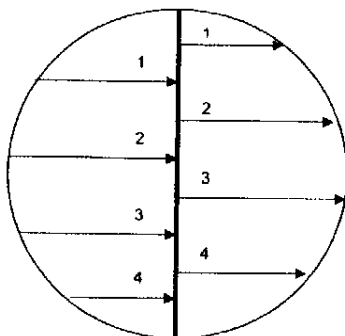


Obr. 3



Obr. 4





Obr. 7

Konec dokumentu
