

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL** (11) **235995**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **427798**

(51) Int.Cl.

A61K 9/12 (2006.01)

A61K 35/76 (2015.01)

(22) Data zgłoszenia: **16.11.2018**

(54) **Sposób otrzymywania kompozycji do leczenia bakteryjnego zapalenia spojówek**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

18.05.2020 BUP 11/20

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

16.11.2020 WUP 18/20

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet PRZYRODNICZY W LUBLINIE,
Lublin, PL**

**UNIwersytet MEDYCZNY W LUBLINIE,
Lublin, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

ANDRZEJ WERNICKI, Kalinówka, PL

RENATA URBAN-CHMIEL, Lublin, PL

IRENEUSZ BALICKI, Lublin, PL

MARTA DEC, Lublin, PL

ANDRZEJ PUCHALSKI, Lublin, PL

ANNA NOWACZEK, Lublin, PL

DIANA STĘGIERSKA, Kraśnik, PL

AGNIESZKA MAREK, Lublin, PL

EWELINA PYZIK, Motycz, PL

DAGMARA STĘPIEŃ-PYŚNIAK, Motycz, PL

KATARZYNA ŚWIĄDER, Lublin, PL

EWA POLESZAK, Lublin, PL

PL 235995 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania kompozycji w postaci kropli okulistycznych do leczenia bakteryjnego zapalenia spojówek wywołanego szczepami *St. aureus* odpowiedzialnymi za występowanie choroby u psów i kotów.

St. aureus są bakteriami często wywołującymi zapalenie spojówek u psów i kotów. Flurochiny, erytromycyna i chloramfenikol są najczęściej stosowanymi antybiotykami w terapii bakteryjnego zapalenia spojówek u psów i kotów. Natomiast infekcje wywoływane pałeczkami gram-ujemnymi dodatkowo zwalczą się antybiotykami z grupy aminoglikozydów. Należy podkreślić, że szczególnie przewlekłe zapalenia są trudne w leczeniu i cechują się nawrotami spowodowanymi przez bakterie odporne na większość antybiotyków.

Z publikacji europejskiego opisu patentowego EP2197284 (B1) znany jest sposób oraz kompozycja do dezynfekcji zawierająca nośnik i dwa lub więcej fagi, o składzie w proporcjach co najmniej fagi (PFU/mL):bakterie (cfu) 5:1. Wykorzystuje się fagi; P68 lub jego mutanty. Nośnikami są lanolina lub parafina. Kompozycja może mieć postać płynu, balsamu, maści, pasty, żelu, albo pianki i może być stosowana na skórę ssaków. Kompozycja przewiduje ponadto stosowanie fagów będących patogenami w odniesieniu do bakterii wybranych spośród *Staphylococcus*, *Helicobacter*, *Klebsiella*, *Listeria*, *Mycobacterium*, *Escherichia*, *Meningococcus*, *Campylobacter*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Clostridium*, *Legionella*, *Acetivobacter* lub *Salmonella*.

Celem wynalazku jest opracowanie sposobu uzyskiwania kompozycji w postaci kropli okulistycznych dla psów i kotów.

Istota sposobu otrzymywania kompozycji w postaci kropli okulistycznych do leczenia bakteryjnego zapalenia spojówek wywołanego szczepami *St. aureus* odpowiedzialnymi za występowanie choroby u psów i kotów polega na tym, że z bakteriofagów swoistych dla szczepów *St. aureus* otrzymuje się zawiesinę, którą następnie zagęszcza się i zawiesza się w roztworze przygotowanym do kropli okulistycznych metodą kolejnych rozcieńczeń do uzyskania rozcieńczenia wynoszącego od 10^{-8} do 10^{-10} PFU/mL, przy czym roztwór do kropli okulistycznych ma skład: 0,004%–0,05% wagowych środka konserwującego z grupy czwartorzędowych związków amoniowych, 0,01%–0,09% wagowych soli sodowej EDTA, środek do wyregulowania pH do wartości 6,8–7,2, niejonowy środek regulujący toniczność roztworu, wybrany z grupy złożonej z glicerolu, mannitolu albo sorbitolu oraz woda do 100,0% objętościowych, przy ciśnieniu osmotycznym 517 mOsm/kg, po czym otrzymaną zawiesinę rozcieńcza się w roztworze okulistycznym o po wyższym, składzie i parametrach, stosując rozcieńczenie 1:5.

Korzystnie, jako środek konserwujący stosuje się chlorek benzakoniowy albo chlorek cetylpirydyniowy.

Korzystnie, jako niejonowy środek regulujący toniczność roztworu stosuje się glicerol w ilości od 2,4%–4,0% objętościowych.

Substancją czynną kompozycji są zawieszone w roztworze okulistycznym bakteriofagi wykazujące właściwości lityczne w stosunku do patogennych szczepów *St. aureus* wyizolowane od psów i kotów z zapaleniem spojówek wywołanym tymi szczepami.

Kompozycję można aplikować psom i kotom bezpośrednio do worka spojówkowego w postaci kropli okulistycznych przez co najmniej 14 kolejnych dni od pierwszego podania. Kompozycja może również znaleźć zastosowanie w celowanych terapiach zastępczych samodzielnie lub jako lek wspomagający w leczeniu antybiotykami. Opracowana kompozycja w postaci kropli okulistycznych umożliwia ich wielokrotne stosowanie bez obniżenia miana litycznego bakteriofagów przez okres nawet do 21 dni, ze względu na przygotowanie opakowania wielokrotnego zastosowania (5 lub 10 mL).

Na podstawie rezultatów uzyskanych w badaniach *in vitro* potwierdzono szerokie spektrum aktywności przeciwbakteryjnej opracowanej kompozycji fagowej w stosunku do bakterii z rodzaju *Staphylococcus* izolowanych od psów i kotów z objawami bakteryjnego zapalenia spojówek. Przygotowany preparat zachowywał swoje właściwości antibakteryjne przez okres minimum 3 tygodni od rozpakowania hermetycznie zapakowanego pojemnika przechowywanego w temp. 8°C. Co więcej, w badanym okresie nie uległ również zanieczyszczeniom wtórnym zarówno bakteryjnym jak też grzybiczym.

Przedmiot wynalazku został szczegółowo opisany poniżej w przykładzie wykonania.

Załączony rysunek przedstawia efekt antibakteryjny (lityczny) przykładowych fagów badanych w warunkach *in vitro* zawieszonych w roztworze kropli do oczu.

Przygotowanie zawiesiny bakteriofagów

Materiałem wyjściowym do produkcji są bakteriofagi swoiste dla szczepów *St. aureus* wyizolowane od psów i kotów, można również wykorzystać fagi swoiste dla referencyjnego szczepu *St. aureus* ATCC.

Z uwagi na fakt, że bakteriofagi nie posiadają bariery gatunkowej, wyizolowane z bakterii wywołujących schorzenia u ludzi mogą z powodzeniem być wykorzystywane u zwierząt. Podobnie fagi izolowane na szczepach pozyskiwanych od zwierząt mogą być stosowane w zwalczaniu infekcji u ludzi.

Uzyskane szczepy wzorcowe fagów namnaża się na odpowiednim dla danego faga szczepie bakteryjnym będącym jego gospodarzem. Technika izolacji prowadzona jest zgodnie z procedurą zaproponowaną przez Han i wsp. (2013). Po 24 godz. inkubacji w 37°C uzyskane bakteriofagi zbierane są z agaru miękkiego z obszaru, w którym wystąpiła liza bakterii – brak wzrostu tzw. łysinki, a następnie przenoszone do 2 ml płynnego podłoża TSB. Całość zawiesza się w bulionie TSB, z dodatkiem 250 µl 1M CaCl₂, 250 µl 1M MgSO₄ oraz 250 µl 3-godz. hodowli szczepu *St. aureus* i inkubuje w wytrząsarce przez 18 godz. w temp. 37°C przy obrotach 120 rpm. Następnie, po odwirowaniu w wirówce 12 000 x g/30 min do uzyskanego supernatantu dodaje się chloroform do końcowego stężenia 2% v/v. Zawiesinę po worteksowaniu przez 5 min i odwirowaniu (5000 x g/10 min/20°C) oraz przefiltrowaniu przechowuje się w temp. 4°C do dalszych analiz.

W kolejnym etapie badań określa się miano lityczne uzyskanych bakteriofagów metodą płytek dwuwarstwowych na agarze TSA oraz zakres aktywności litycznej w stosunku do badanych patogenów, a także oznacza tolerancję pH dla badanych fagów metodą oceny przeżywalności oraz stabilności miana litycznego wg Niu i wsp. (2012). Analizę morfologiczną uzyskanych bakteriofagów wykonuje się metodą mikroskopii elektronowej z wykorzystaniem preparatów bawionych negatywowo 2% octanem uranylu (Xie i wsp. 2005).

Zagęszczanie lizatu bakteriofagowego prowadzi się metodą precypitacji glikolem polietylenowym w roztworze PEG 8000 wg Chibani-Chennoufi i wsp. (2004). W tym celu do probówek zawierających zawiesinę bakteriofagów po dodaniu po 6,5 ml 20% buforu PEG 8000 NaCl, wymieszaniu na worteksie, inkubacji w temp. 4°C przez 24 godz. oraz odwirowaniu 8500 x g/10 min/4°C, uzyskany osad zawiesza się w określonej objętości buforu TE. Następnie, po odwirowaniu 11 000 x g/10 min/4°C, do zawiesiny dodaje się 120 µl 20% PEG 8000 NaCl i prowadzi inkubację w temp. 4°C przez 1,5 godz. Następnie, po odwirowaniu 13 000 x g/10 min/4°C i usunięciu supernatantu do osadu ponownie dodaje się bufor TE. Otrzymaną zawiesinę ekstrahuje się równą ilością chloroformu w stosunku 1:1, a następnie miesza na worteksie przez 30 sek. w celu usunięcia resztek glikolu polietylenowego. Uzyskaną zagęszczoną zawiesinę bakteriofagów po odwirowaniu 4500 x g/7 min/4°C i zebraniu fazy wodnej, po uprzednim oznaczeniu miana litycznego, wykorzystuje się jako składnik kropli okulistycznych. Taką zawiesinę można przechowywać w temp. - 80°C przez 9 mies. lub w temp. 4°C przez 8 tyg.

Przygotowanie roztworu do kropli okulistycznych

Przygotowano roztwór o składzie:

- 85% glicerol 3,97% objętościowych, do regulacji toniczności,
- chlorek benzalkoniowy 0,01% wagowych, jako środek konserwujący,
- sól sodowa EDTA 0,05% wagowych, jako środek chelatujący,
- wodorotlenek sodu do wyregulowania pH do wartości 6,92,
- woda do wstrzykiwań do 100,0% objętościowych.

pH 6,92; ciśnienie osmotyczne 517 mOsm/kg.

Oznaczanie miana bakteriofagów swoistych dla *St. aureus*

Miano bakteriofagów określono metodą kropelkową w seryjnych rozcieńczeniach lizatu fagowego zawieszonego ww. roztworze przygotowanym do kropli okulistycznych. Do probówki typu Eppendorf zawierającej 90 µl roztworu okulistycznego po dodaniu 10 µl lizatu fagowego, worteksowaniu, następnie 10 µl zawiesiny przenoszono do kolejnych probówek zawierających 90 µl buforu. Proces powtarzano do momentu uzyskania rozcieńczenia wynoszącego 10⁻¹⁰ PFU/mL. Na płytkę z podłożem TSA z uprzednio wylanym agarem górnym zawierającym bakterie *St. aureus* po naniesieniu po 2,5 µl każdego z rozcieńczeń fagów, płytki inkubowano w termostacie przez 18 godz. w 37°C. Następnego dnia liczono, powstałe łysinki, a miano, czyli gęstość fagów określono dla 1 ml zawiesiny fagowej, na podstawie poniższego wzoru.

Wzór do obliczenia miana fagów

$X = a \times b \times 10$ gdzie X – miano faga PFU/ml
a – średnia liczba łysinek
b – odwrotność rozcieńczenia
10 – przeliczenie na 1 ml wyjściowej zawiesiny

Wykonanie kropli do oczu

Skład %

Zawiesina bakteriofagów o mianie litycznym 10^{-10} PFU/mL 20,0% v,

Glicerol 85%, 3,97% v,

Sól sodowa EDTA 0,05% w,

Chlorek benzalkoniowy 0,01% w,

Wodorotlenek sodu do pH 6,92

Woda do wstrzykiwań do 100,0% v

ciśnienie osmotyczne 517,0 mOsm/kg

Postać farmaceutyczna: krople

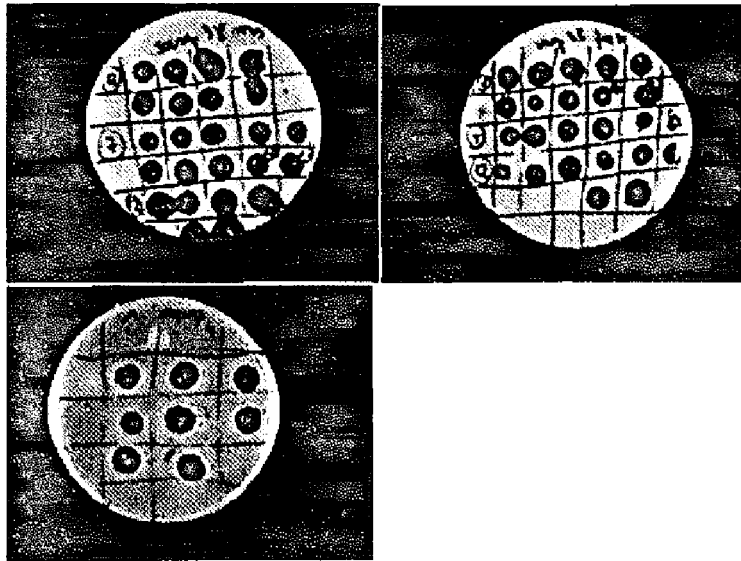
W celu przygotowania kompozycji w postaci kropli do oczu rozpuszczono chlorek benzalkoniowy w ilości 0,01% wagowych oraz sól sodową EDTA w ilości 0,05% wagowych w wodzie do wstrzykiwań w ilości około 75,0 części objętościowych.

Następnie dodaje się 85% glicerol w ilości 3,97% objętościowych. Roztwór doprowadzono do pH=6,92 za pomocą wodorotlenku sodu. Następnie dodano wodny roztwór z fagami w ilości – 20,0% objętościowych i uzupełniono do 100,0% objętościowych wodą do wstrzykiwań. Następnie sączono przez sączek membranowy o wielkości porów $0,22 \mu\text{m}$ wprost do jałowej butelki. Roztwór mieszano i rozfazowano w warunkach aseptycznych w opakowania jednostkowe z ciemnego szkła z zakraplaczem.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania kompozycji w postaci kropli okulistycznych do leczenia bakteryjnego zapalenia spojówek wywołanego szczepami *St. aureus* odpowiedzialnymi za występowanie choroby u psów i kotów, **znamienny tym**, że z bakteriofagów swoistych dla szczepów *St. aureus* otrzymuje się zawiesinę, którą następnie zagęszcza się i zawiesza się w roztworze przygotowanym do kropli okulistycznych metodą kolejnych rozcieńczeń do uzyskania rozcieńczenia wynoszącego od 10^{-8} do 10^{-10} PFU/mL, przy czym roztwór do kropli okulistycznych ma skład: 0,004%–0,05% wagowych środka konserwującego z grupy czwartorzędowych związków amoniowych, 0,01%–0,09% wagowych soli sodowej EDTA, środek do wyregulowania pH do wartości 6,8–7,2, niejonowy środek regulujący toniczność roztworu, wybrany z grupy złożonej z glicerolu, mannitolu albo sorbitolu oraz woda do 100,0% objętościowych, przy ciśnieniu osmotycznym 517 mOsm/kg, po czym otrzymaną zawiesinę rozcieńcza się w roztworze okulistycznym o powyższym składzie i parametrach, stosując rozcieńczenie 1:5.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako środek konserwujący stosuje się chlorek benzalkoniowy albo chlorek cetylpirydyniowy.
3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako niejonowy środek, regulujący toniczność roztworu stosuje się glicerol w ilości od 2,4%–4,0% objętościowych.

Rysunek



Rys.