

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **240083**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **431245**

(22) Data zgłoszenia: **23.09.2019**

(51) Int.Cl.

A61K 35/76 (2015.01)

A61P 11/16 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

(54) **Sposób otrzymywania kompozycji w postaci zawiesiny do leczenia syndromu oddechowego z udziałem Mannheimia haemolytica u bydła**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

06.04.2021 BUP 07/21

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

14.02.2022 WUP 07/22

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIWERSYTET PRZYRODNICZY W LUBLINIE,
Lublin, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

RENATA URBAN-CHMIEL, Lublin, PL

ANDRZEJ WERNICKI, Kalinówka, PL

MARTA DEC, Lublin, PL

ANDRZEJ PUCHALSKI, Lublin, PL

ANNA NOWACZEK, Lublin, PL

AGNIESZKA MAREK, Lublin, PL

EWELINA PYZIK, Motycz, PL

DAGMARA STĘPIEŃ-PYŚNIAK, Motycz, PL

PL 240083 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania kompozycji w postaci zawiesiny do leczenia bakteryjnego zapalenia układu oddechowego z udziałem *Mannheimia haemolytica* odpowiedzialnymi za występowanie syndromu oddechowego u bydła.

Choroby układu oddechowego bydła stanowią istotny problem zdrowotny i ekonomiczny. W Stanach Zjednoczonych średnie koszty w przeliczeniu na jedno cielę ponoszone na profilaktykę i leczenie oraz straty wynikające z zachorowalności i śmiertelności zawierają się w granicach od 13,9 do 15,6 dolarów. Roczne straty związane z występowaniem zespołu oddechowego u bydła to ok. 1 mld dolarów, natomiast łączne wydatki ponoszone na profilaktykę i terapię zwierząt sięgają 3 mld dolarów rocznie (Snowder i wsp., 2006, 2007). Wykazano (Edwards, 1996), że najwyższe wskaźniki zachorowalności cieląt zawierające się w granicach od 65 do 80% przypadają na pierwsze 45 dni opasu. Wśród czynników etiologicznych obok czynników wirusowych (BHV-1; BRSV, PI-3, corona- i adenowirusy) dominującą rolę odgrywają bakterie z rodzaju *Pasteurellaceae*, w tym *M. haemolytica* głównie serotyp 1. Rozpowszechniona na świecie antybiotykoterapia oraz działania metafilaktyczne przyczyniły się do powstania drobnoustrojów lekoopornych, co znacznie utrudnia skuteczne leczenie i eliminację patogenów. Ograniczone możliwości zwalczania wielu bakteryjnych jednostek chorobowych w tym także zespołu oddechowego u bydła, przyczyniły się do poszukiwania metod alternatywnych, polegających między innymi na wykorzystaniu bakteriofagów specyficznych dla drobnoustrojów izolowanych z dróg oddechowych u bydła.

Wysoka skuteczność oraz większe bezpieczeństwo terapii fagowej, w porównaniu do antybiotyków wynika między innymi ze swoistości jaka cechuje bakteriofagi względem wybranych bakterii, co przejawia się zdolnością do infekcji tylko jednego gatunku, serotypu lub szczepu bakteryjnego. Taki mechanizm nie powoduje destrukcji np: komensalnej mikroflory jelitowej, bądź innych układów organizmu. Samoreplikacja bakteriofagów odbywa się w trakcie trwania leczenia, co eliminuje ich wielokrotne stosowanie. Zaletą fagów jest również brak możliwości namnażania się w komórkach eukariotycznych, co przyczynia się do równoczesnego spadku ich miana, połączonego z wyraźnym zmniejszeniem liczby bakterii chorobotwórczych w organizmie.

Zastosowanie bakteriofagów w leczeniu zakażeń u ludzi przyniosło wysoki odsetek wyleczeń (ok. 85%) szczególnie w przypadku zwalczania infekcji mieszanych spowodowanych głównie przez bakterie z rodzaju *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella*, *E. coli*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* oraz odporne na wankomycynę bakterie *Enterococcus* i *Staphylococcus aureus* (Biswas i wsp. 2002). W terapii chorób zwierząt hodowlanych, bakteriofagi okazały się skutecznym narzędziem w zwalczaniu chorób drobiu, bydła, owiec, trzody chlewnej oraz ryb.

Dotychczasowe doniesienia naukowe z zakresu izolacji oraz oceny właściwości litycznych bakteriofagów swoistych dla bakterii z rodzaju *M. haemolytica* są bardzo nieliczne (Highlander i wsp. 2006; Hsu i wsp. 2013). Dotyczą one głównie uzyskiwania bakteriofagów z wybranych szczepów *M. haemolytica* w oparciu o szczep referencyjny BAA-410 oraz ich morfologicznej i restrykcyjnej analizy porównawczej wyłącznie w warunkach *in vitro*. Jak dotąd nie potwierdzono metodyki umożliwiającej wykorzystanie uzyskanych bakteriofagów w warunkach terenowych, szczególnie u bydła.

Celem wynalazku jest opracowanie sposobu uzyskiwania kompozycji w postaci zawiesiny w izotonicznym roztworze soli morskiej dla bydła.

Istota sposobu otrzymywania kompozycji w postaci zawiesiny do leczenia syndromu oddechowego z udziałem szczepów *Mannheimia haemolytica* u bydła polega na tym, że z bakteriofagów uzyskanych z zawiesiny pobranej z górnych dróg oddechowych od cieląt, swoistych dla szczepów *Mannheimia haemolytica* otrzymuje się zawiesinę bakteriofagów, którą następnie zagęszcza się i zawiesza się w izotonicznym roztworze wody morskiej przygotowanym metodą kolejnych rozcieńczeń do uzyskania rozcieńczenia wynoszącego od 10^{-6} do 10^{-7} PFU/mL, po czym otrzymaną zawiesinę rozcieńcza się w izotonicznym roztworze soli morskiej stosując rozcieńczenie 1 : 5, mianowicie: 1 część zawiesiny fagowej, 4 części izotonicznego roztworu soli morskiej.

Korzystnie, preparat ma postać aerozolu.

Do zawiesiny wykorzystuje się pojedyncze bakteriofagi albo alternatywnie bakteriofagi w postaci mieszaniny, izolowane z różnych serotypów szczepów *M. haemolytica* uczestniczących w etiopatogenezie syndromu oddechowego u bydła.

Otrzymana kompozycja może mieć również zastosowanie w zapobieganiu infekcjom układu oddechowego na tle *M. haemolytica* u bydła.

Możliwe jest ponadto stosowanie kompozycji w postaci tradycyjnej wlewki donosowej.

Substancją czynną kompozycji są zawieszony w roztworze bakteriofagi wykazujące właściwości lityczne w stosunku do patogennych szczepów *Mannheimia haemolytica* należące do tego samego albo różnych serotypów, wyizolowane od bydła w wieku od 5 do 12 miesięcy, u którego doszło do zakażenia tymi szczepami. Kompozycję można aplikować cielętom oraz bydłu dorosłemu bezpośrednio na błony śluzowe jamy nosowej przez co najmniej 6 kolejnych dni od pierwszego podania.

Donosowa aplikacja koktajlu fagowego zawierającego testowane fagi ϕ A1, ϕ A5, ϕ A6, ϕ 25, opisane w dalszej części, o mianach 10^{-6} PFU/mL zawieszona w 20 mL izotonicznego roztworu soli morskiej swoistych dla różnych serotypów *M. haemolytica* 2 x 6 dni – istotnie obniża o 4 jednostki log koncentrację bakterii w górnych drogach oddechowych u cieląt, a w wielu przypadkach (> 65%) prowadzi do całkowitej eliminacji bakterii z jamy nosowej zwierząt.

Kompozycja może również znaleźć zastosowanie w celowanych terapiach zastępczych samodzielnie lub jako lek wspomagający w leczeniu antybiotykami. Kompozycję można stosować również jako działanie profilaktyczne u cieląt narażonych na czynniki stresowe w celu redukcji szczepów *M. haemolytica* w jamie nosowej.

Opracowana kompozycja w postaci zawiesiny w aerozolu umożliwia jej wielokrotne stosowanie bez obniżenia miana litycznego bakteriofagów przez okres nawet do 28 dni. Przygotowane opakowania mogą zawierać od 20 do 100 mL zawiesiny w zależności od ilości dawek niezbędnych do aplikacji.

Na podstawie rezultatów uzyskanych w badaniach *in vitro* potwierdzono szerokie spektrum aktywności przeciwbakteryjnej bakteriofagów w stosunku do bakterii *M. haemolytica* zarówno referencyjnych szczepów jak też terenowych, izolowanych od bydła z objawami zespołu oddechowego z udziałem szczepów *M. haemolytica* ((Urban-Chmiel R., Wemicki A., Stęgierska D., Dec M., Dudzic A., Puchalski A. (2015) Isolation and characterization of Lytic Properties of Bacteriophages Specific for *M. haemolytica* Strains. PLoS ONE 10 (10): pp. 1-11, e0140140. doi:10.1371/journal.pone.0140140.). Na podstawie wyników przedstawionych w w/w publikacji opracowano kompozycję preparatu fagowego dla cieląt, która następnie została przetestowana w warunkach *in vitro* z wykorzystaniem izolatów referencyjnych *M. haemolytica* oraz terenowych będących w posiadaniu Zakładu Prewencji Weterynaryjnej i Chorób Ptaków. Przeprowadzone badania potwierdziły wysoką skuteczność antybakteryjną opracowanej kompozycji fagowej w warunkach *in vitro*. Również w badaniach *in vivo* podczas terapii eksperymentalnej z wykorzystaniem opracowanej zawiesiny fagowej w roztworze soli morskiej, prowadzonej przez 6 dni w postaci dwukrotnej (dzień pierwszy), a następnie jednokrotnej aplikacji (pozostałe dni eksperymentu) uzyskano istotną redukcję występowania szczepów *M. haemolytica* u badanych zwierząt. Ponadto w odniesieniu do znacznej grupy zwierząt badanych (30 szt. na 45 szt. przebadanych) nie izolowano w/w szczepów, co potwierdziło antybakteryjny efekt zastosowanej zawiesiny.

Przygotowany preparat zachowywał swoje właściwości antybakteryjne przez okres minimum 3 tygodni od rozpakowania hermetycznie zapakowanego pojemnika lub worka plastikowego przechowywanego w temp. 8°C. Co więcej, w badanym okresie nie ulegał również zanieczyszczeniom wtórnym zarówno bakteryjnym jak też grzybiczym.

Przedmiot wynalazku został szczegółowo opisany poniżej w przykładzie wykonania.

Załączony rysunek ilustruje efekt antybakteryjny (lityczny) przygotowanej badanej zawiesiny z fagami w warunkach *in vitro* zawieszonymi w roztworze soli morskiej.

Przygotowanie zawiesiny bakteriofagów

Materiałem wyjściowym do produkcji są bakteriofagi swoiste dla szczepów *Mannheimia haemolytica* wyizolowane od bydła w wieku od 6 do 12 miesiąca życia, można również wykorzystać fagi swoiste dla referencyjnego szczepu *M. haemolytica* BAA 410.

Z uwagi na fakt, że bakteriofagi nie posiadają bariery gatunkowej, wyizolowane z bakterii mogą z powodzeniem być wykorzystywane u innych gatunków zwierząt gospodarskich szczególnie owiec i kóz.

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 Hsu i wsp. (2013). W tym celu wykorzystywano mieszaniny wybranych szczepów referencyjnych *M. haemolytica*:

- z kolekcji ATCC®-BAA-410™ serotyp 1 – jako wzorcowy szczep referencyjny profagowy.
- referencyjne szczepy serotypów A1 (P588), A2 (499), A5 (P501), A6 (6174), A7, A9 i A11, pozyskane od Prof. Schimmel of the Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz, Niemcy.

- a także własne izolaty terenowe uzyskane od cieląt z objawami zespołu oddechowego – 25, 99, 101 należące do serotypu 1 (Urban-Chmiel i wsp. 2015). Następnie do mieszaniny badanych szczepów bakteryjnych z logarytmicznej fazy wzrostu (4,5 godz.) na bulionie BHI o gęstości ok. 5×10^8 CFU/ml dodawano filtrowanego roztworu wydzieliny z jamy nosowej w proporcjach 5 : 1 – 5 części hodowli bakteryjnej i 1 część filtratu wydzieliny z dróg oddechowych cieląt z dodatkiem 10 mmol/L $MgSO_4$. Następnie po 18 godz. inkubacji w 37°C na wytrząsarce przy obrotach 120 rpm uzyskaną hodowlę odwirowywano wirówce 10 000 x g/30 min i filtrowano przez filtry o wielkości por 0,4 i 0,2 μm . Tak uzyskany bogaty w bakteriofagi supernatant był wykorzystywany do oceny aktywności przeciwbakteryjnej, zakresu aktywności litycznej oraz zagęszczania i oczyszczania fagów. Powyższe procedury prowadzono metodą płytek dwuwarstwowych na 0,7% agarze BHI z dodatkiem 1M $CaCl_2$, 250 μl 1M $MgSO_4$. Bakteriofagi zbierane są z agaru miękkiego z obszaru, w którym wystąpiła liza bakterii – brak wzrostu tzw. łysinki, a następnie przenoszone do 2 ml buforu TM. Całość zawiesza się w bulionie BHI, z dodatkiem 250 μl 1M $CaCl_2$, 250 μl 1M $MgSO_4$ oraz 250 μl 4,5-godz. hodowli szczepu *M. haemolytica* i inkubuje w wytrząsarce przez 18 godz. w temp. 37°C przy obrotach 120 rpm. Następnie, po odwirowaniu w wirówce 10 000 x g/30 min do uzyskanego supernatantu dodaje się chloroform do końcowego stężenia 2% v/v. Zawiesinę po worteksowaniu przez 5 min i odwirowaniu (6000 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 0,7% agarze BHI oraz zakres aktywności litycznej w stosunku do badanych patogenów, a także oznaczenie tolerancji 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 barwionych negatywowo 2% octanem uranylu (Xie i wsp. 2005). Zagęszczanie lizatu bakteriofagowego prowadzi się metodą precypitacji glikolem polietylenowym w roztworze PEG 8000. W tym celu do próbek 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 TM. 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 8000 x g/20 min/4°C i zawieszeniu w buforze TM pH 7,5 i po uprzednim oznaczeniu miana litycznego, wykorzystuje się jako składnik zawiesiny fagowej w roztworze soli morskiej dla bydła. Taką zawiesinę można przechowywać w temp. -80°C przez 6 miesięcy lub w temp. 4°C przez 8 tygodni.

Skład buforu TM: Bufor zawiera 10 mM Tris-HCl o pH 7,4 oraz 10 mM $MgCl_2$.

Oznaczanie miana bakteriofagów swoistych dla *M. haemolytica*

Miano bakteriofagów określono metodą kropelkową w seryjnych rozcieńczeniach lizatu fagowego zawieszono w buforze TM. Do próbki typu Eppendorf zawierającej 90 μl buforu TM po dodaniu 10 μl lizatu fagowego, worteksowaniu, następnie 10 μl zawiesiny przenoszono do kolejnych próbek zawierających 90 μl buforu. Proces powtarzano do momentu uzyskania rozcieńczenia wynoszącego 10–9 PFU/mL. Na płytkę z podłożem BHA (Brain heart infusion agar) z uprzednio wylanym 0,7% agarem górnym zawierającym bakterie *M. haemolytica* po naniesieniu po 2,5 μl każdego z rozcieńczeń fagów, płytki inkubowano w termostacie przez 24 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

Przygotowanie zawiesiny zawierającej mieszaninę w izotonicznym roztworze soli morskiej.

Przygotowano zawiesinę o składzie:

- woda morska 10 mL - roztwór izotoniczny NaCl o stężeniu 77,75%
- zawiesina bakteriofagów swoistych dla szczepów *M. haemolytica* o mianie litycznym w zakresie od 10^{-6} do 10^{-7} PFU/mL-5 mL.

PH 7,5; ciśnienie osmotyczne 517 mOsm/kg.

Postać farmaceutyczna: zawiesina w postaci aplikacji aerozolowej lub zawiesina w płynie w postaci wlewki donosowej

W celu przygotowania kompozycji w postaci zawiesiny donosowej dla bydła wykorzystano izotoniczny roztwór soli morskiej. Następnie dodano roztwór z zawiesiną koktajlu fagów swoistych dla *M. haemolytica* serotyp 1, 2, 5 w ilości – 25,0% objętościowych i uzupełniono do 100,0% objętościowych izotonicznym roztworem wody morskiej. Następnie sączono przez sączek membranowy o wielkości porów 0,22 µm wprost do jałowej butelki ze spryskiwaczem. Jest też możliwość wykorzystania zarówno opakowań szklanych jak też z tworzywa sztucznego.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania kompozycji w postaci zawiesiny do leczenia syndromu oddechowego z udziałem szczepów *Mannheimia haemolytica* u bydła **znamienny tym**, że z bakteriofagów swoistych dla szczepów *Mannheimia haemolytica* otrzymuje się zawiesinę, którą następnie zagęszcza się i zawiesza się w izotonicznym roztworze wody morskiej przygotowanym do zawiesiny metodą kolejnych rozcieńczeń do uzyskania rozcieńczenia wynoszącego od 10^{-6} do 10^{-7} PFU/mL, po czym otrzymaną zawiesinę rozcieńcza się w izotonicznym roztworze soli morskiej, stosując rozcieńczenie 1 : 5 – 1 część zawiesiny fagowej, 4 części izotonicznego roztworu soli morskiej.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że kompozycja ma postać aerozolu.
3. Sposób według zastrz. 1 **znamienny tym**, że do zawiesiny wykorzystuje się pojedyncze bakteriofagi albo bakteriofagi w postaci mieszaniny, izolowane z różnych serotypów szczepów *M. haemolytica* uczestniczących w etiopatogenezie syndromu oddechowego u bydła.

Rysunek

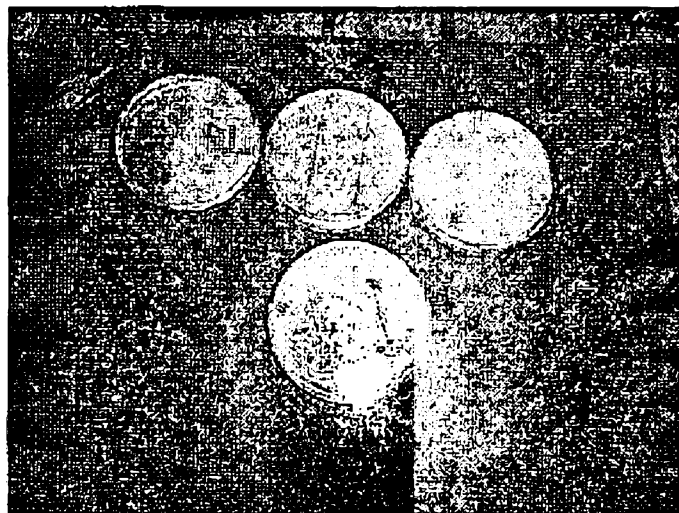


Fig.1