

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

Zveřejněná podle §31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2015-23

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **16.01.2015**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **27.07.2016**

(Věstník č. 30/2016)

A61K 36/06	(2006.01)
C12R 1/645	(2006.01)
C12R 1/225	(2006.01)
C12R 1/45	(2006.01)
C12R 1/01	(2006.01)
C12R 1/07	(2006.01)
A61K 45/06	(2006.01)
A61K 35/747	(2015.01)
A61K 35/66	(2015.01)
A61K 35/74	(2015.01)
C12N 1/20	(2006.01)
A61P 31/10	(2006.01)
A61P 31/04	(2006.01)
A61Q 11/00	(2006.01)
A61P 17/02	(2006.01)
A01N 65/00	(2009.01)
A01N 63/04	(2006.01)

(71) Přihlašovatel:
Bio Agens Research and Development - BARD,
s.r.o., Únětice, CZ

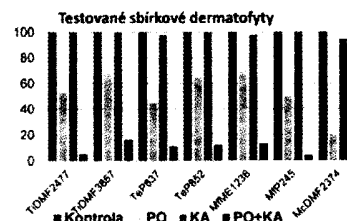
(72) Původce:
Ing. arch. Martin Suchánek, Praha 6, CZ
Radim Klimeš, Praha 6 Liboc, CZ

(74) Zástupce:
Ing. Marie Smrčková, patentový zástupce,
Velflíkova 10, 160 00 Praha 6

mikrobiálním preparátu jsou buď mikroskopická řasovka *Pythium oligandrum* nebo komponenta fyziologického mikrobiomu přítomná ve formě usmrčených buněk, buněčných extraktů, nebo izolovaných buněčných frakcí. Pro řasovku *Pythium oligandrum* je mikrobiálním aktivátorem kvasničný autolyzát v množství 0,1 % až 10 % hmotn. Pomocné látky jsou upraveny způsobem umožňujícím aplikaci ve formě mastí, krémů, olejů, čípků nebo ve formě tekutého vodného přípravku.

(54) Název přihlášky vynálezu:
**Duální mikrobiální preparát pro
dlouhodobé potlačení nebo prevenci
symptomů oportunních mikrobiálních
infekcí**

(57) Anotace:
Duální mikrobiální preparát zahrnuje mikroskopickou řasovku *Pythium oligandrum* a komponenty fyziologického mikrobiomu. Mikroskopická řasovka *Pythium oligandrum* i komponenta fyziologického mikrobiomu jsou v duálním preparátu přítomné v podobě umožňující jejich vzklíčení, následné namnožení a kolonizaci cílových tkání. Mikroskopická řasovka *Pythium oligandrum* obsahuje $10^3 - 10^8$ KTJ (kolonie tvořících jednotek), s výhodou 10^5 až 10^6 KTJ na jeden cyklus aplikací. Komponentu fyziologického mikrobiomu obsahuje 5×10^6 až 5×10^{10} KTJ, s výhodou 5×10^7 až 5×10^9 KTJ na jeden cyklus aplikací. Pro obě mikrobiální komponenty je zdrojem živin fermentovaný substrát obsažený v řasovce *Pythium oligandrum*. Duální mikrobiální preparát dále obsahuje nejméně jednu z pomocných složek ze skupiny zahrnující desikant, komponenty pufrčního systému, protispěkáci látku, a prostředek pro tvorbu fyziologického osmotického prostředí. Komponentou fyziologického mikrobiomu je lidský mikrobiom, a to jeden z mikrobů zeleného komplexu, jako je bakterie *Capnocytophaga sputigena*, nebo jedna z komponent zdravého mikrobiomu kůže, jako je bakterie *Staphylococcus epidermidis*, nebo jedna z komponent zdravého vaginálního mikrobiomu, jako je peroxidy produkující *Lactobacillus crispatus*. V duálním



Duální mikrobiální preparát pro dlouhodobé potlačení nebo prevenci symptomů oportunních mikrobiálních infekcí

Oblast techniky

- 5 Vynález se týká duálního mikrobiálního preparátu pro dlouhodobé potlačení symptomů oportunních mikrobiálních infekcí, zejména oportunních mikrobiálních infekcí, způsobených dysbiosou (porušením mikrobiální rovnováhy).

Dosavadní stav techniky

- 10 Výskyt oportunních (příležitostných) mikrobiálních infekcí, zanícených nehojících se ran, infekcí agresivními formami komensálních kvasinek a mykotické infekce dermatofyty jeví v současné době zvyšující se tendenci, čímž začíná zasahovat významný segment populace. Je to způsobeno zejména tím, že nárůst výskytu těchto onemocnění není zpravidla způsoben ani vnějšími epidemiologickými faktory ani genetickými defekty způsobujícími zásadní narušení fyziologického programu obranných imunitních reakcí hostitele. Hlavní příčinou oportunních mikrobiálních infekcí je
- 15 dnes zejména dočasné oslabení imunitního systému a přirozených obranných reakcí, nejčastěji v důsledku stresu, náročného životního stylu, nadměrné zátěže organismu u sportovců nebo těžce pracujících, stárí spojenému s přirozeným oslabením imunitních reakcí, nebo v důsledku působení závažných doprovodných onemocnění a projevů, jako je například cukrovka, obezita, potravinové
- 20 alergie, autoimunitní onemocnění aj. Nápadným doprovodným jevem většiny oportunních mikrobiálních infekcí pak bývá dysbios, tedy porušení fyziologické rovnováhy ve složení zdravé mikrobiální flóry charakteristické pro jednotlivé části našeho těla. Výše uvedené jevy tedy nabývají masivních rozměrů a ovlivňují zdravotní stav populace více než tradiční příčiny onemocnění (úrazy, infekce, genetika).
- 25 Dosavadní léčba oportunních mikrobiálních infekcí, probíhající bez pochopení jemné rovnováhy mezi složením fyziologické mikroflóry a imunitním systémem hostitele, se ukazuje jako velmi málo účinná, zejména z dlouhodobého pohledu. Časté používání antibiotik, antimykotik a antiseptických látek s sebou nese riziko zátěže organismu reaktivními chemickými látkami, které navíc málokdy bývají bez vedlejších toxických účinků, jakými je například účinek antimykotik jako
- 30 endokrinních disruptorů narušujících přirozenou hormonální regulaci organismu. Neuvážené používání antibiotik, které je známé a kritizované, ale přesto k němu neustále dochází, je typickým příkladem nefyziologického a nekauzálního přístupu k léčbě oportunních mikrobiálních infekcí dlouhodobě narušující citlivou rovnováhu přirozené mikroflóry na povrchu kůže a různých sliznic. Antibiotika nejčastěji zlikvidují potřebné mikrobiální komponenty přirozené mikroflóry, přičemž mají
- 35 minimální účinek na patogenní mikroorganismy, zvláště na patogeny schopné tvořit mikrobiální biofilmy. Jejich dlouhodobé používání pak vede jen k vytvoření odolnosti vůči antibiotikům, antimykotikům a dokonce i antiseptikům, čímž tyto látky rychle ztrácejí i poslední zbytky svých

účinků. Rezistence vůči dostupným antibiotikům nabyla epidemických rozměrů a stává se důvodem obav odborných lékařských společností i široké veřejnosti. Oportunní mikrobiální infekce nejčastěji nepatří k onemocněním bezprostředně ohrožující život, byť zásadním způsobem zhoršují jeho kvalitu. Při jejich léčbě se potom nedostatečnost použití chemických prostředků projevuje jako časté
 5 znovuobjevení se infekce a jejích symptomů po předcházející „úspěšné“ léčbě, přičemž frekvence opakujících se infekcí se neustále zvyšuje, až se pacient dostane do jakéhosi permanentního cyklu infekce – léčba – reinfekce – léčba atd.

Mezi nejdůležitější příklady oportunních mikrobiálních infekcí se řadí zánět dásní a periodontální onemocnění, mikrobiální zanícení způsobující komplikace u nehojících se ran, oportunní
 10 kvasinkové infekce postihující sliznice urogenitálního traktu, dermatofytární onemocnění u lidí nebo zvířat a mikrobiální infekce komplikované tvorbou biofilmu. Všechna tato onemocnění zahrnují jako každé infekční onemocnění silný vliv životního prostředí. Proto se dnes péče o čisté pracovní a životního prostředí považuje za integrální součást moderní, účinné léčby.

Akutní zánět dásní a chronické periodontální onemocnění jsou dvě stádia dysbiosy v dutině
 15 ústní, způsobující zánětlivou reakci imunitního systému vedoucí k destrukci periodontálních struktur, oslabení závažného aparátu zubu a nakonec jeho úplné ztrátě [20]. V agresivním prostředí dutiny ústní se stávají patogenní bakterie dutiny ústní, nefyziologicky namnožené za podmínek dysbiosy, součástí polymikrobiálních společenstev, tzv. biofilmů, což jim umožňuje odolávat jak obranným reakcím imunitního systému, tak i antibiotikům podaným lokálně nebo celkově [30], [9], [4], [5], [27].
 20 Moderní studie již také dostatečně přesně identifikovaly jednak zdravý mikrobiom dutiny ústní, charakterizovaný přítomností zeleného mikrobiálního komplexu, zahrnujícího bakterie rodů *Streptococcus*, *Prevotella*, *Veillonella*, *Gemella*, *Granulicatella*, *Eikenella* a *Cytophaga*, stejně jako posun od G+ aerobních bakterií ke G- anaerobům druhům *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* a *Treponema denticola*, charakterizujícím
 25 oranžový a červený mikrobiální komplex, jehož výskyt je typický pro rozvinutou dysbiosu [1], [11], [19]. Přemnožení patogenních bakterií v dutině ústní pak klinicky způsobuje zejména krvácivost dásní, která se charakterizuje hodnotou PBI indexu (Bleeding on Probing Index) a dále celkové zhoršení stavu chrupu a jeho prognózy, které je charakterizováno komunitním CPITN indexem dle WHO [2], [25]. Dosavadní postupy, spočívající v použití lokálních nebo celkových antibiotic, lokálních
 30 desinfekčních činidel (chlorhexidine a jiné) nebo pouhého mechanického čištění a bělení zubů, nepřinášejí očekávané dlouhodobé účinky [5]. Alternativní postupy spočívající v použití probiotik nejsou příliš účinné, což se přičítá zejména tomu, že byly doposud používány komponenty odvozené od normálních mikrobiomů v jiných prostředích lidského těla než v ústní dutině [35].

Mikrobiální zanícení ran představuje jeden z kritických komplikujících faktorů při léčbě
 35 bércových vředů a to nejen u diabetiků, ale i u nediabetiků [15]. Společenská závažnost tohoto onemocnění je dána nejen jeho dlouhodobými následky z hlediska pracovní neschopnosti a sociální diskriminace postižených jedinců, ale zejména jeho masivním rozšířením, představujícím až 980 tisíc

případů ročně pouze v zemích EU (Evropské unie), stejně jako ohromnými náklady na léčbu, odhadované na 6,5 mld. EUR ročně v zemích EU [12]. Chronický průběh bércových vředů zvyšuje sám o sobě náchylnost k infekcím v důsledku poškození kožní bariéry, problémů s cirkulací a inhibicí obranných reakcí imunitního systému [37]. Příznaky klinické infekce zahrnují zejména zarudnutí, bolest, vznik edémů, pachové symptomy a hnisavé výtoky, které mohou přejít až v život ohrožující septické stavy [8]. Nedávno publikovaný materiál odborné společnosti EWMA se staví velmi kriticky k léčbě mikrobiálních infekcí lokálními antibiotiky nebo antiseptiky a vyzývá k hledání nových řešení. Množství inovativních přístupů je však velmi omezené a 85 % celosvětového trhu prostředků na odstranění zánětu nehojících se ran je stále založeno na použití koloidního stříbra, prostředku známého již od antiky, a to bez ohledu na současné zevrubné znalosti normálního kožního mikrobiomu [18], [13] dosud zúročené jen minimálně.

Naše znalosti etiologie oportunních infekcí patogenními kvasinkami na kůži a sliznicích zaznamenaly v poslední době exponenciální nárůst, který se však bohužel zatím projevil jen omezeně v návrhu nových terapeutických modalit. Samotné označení kvasinky *Candida albicans*, a jí příbuzných druhů jako patogenní kvasinky, není příliš přesné. Jedná se o organismus hojně přítomný v životním prostředí, který žije jako komensální mikroorganismus na kůži a sliznicích člověka a je u zdravých jedinců převážně neškodný. Oslabení imunity, byť dočasné, však dokáže velmi dobře rozpoznat a vůči imunokompromitovaným jedincům se začne chovat agresivně. Přitom používá jednotlivé virulentní faktory, jejichž molekulární povaha je již od 90. let minulého století neustále upřesňována – jde zejména o adhezivní proteiny odpovědné za silné uchycení na povrch epiteliální buňky hostitele, faktory odpovědné za změnu morfologie z jednobuněčné na hyfální formu, a hydrolytické enzymy, jako jsou sekretované aspartátové proteinasy nebo fosfolipasy [6]. Další faktory mohou mít povahu uvolňovaných rozpustných glukánů, které potlačují cytokinovou signalizaci monocytů a inhibují též specifickou imunitu závislou na T-lymfocytech [29]. Velkým nebezpečím mohou potom být kandidy (jednobuněčné kvasinky) pro trvale imunosuprimované pacienty, protože u nich mohou přežívat dokonce v cirkulaci a způsobovat smrtící infekce [14]. Orální a vaginální kandidové infekce jsou však velmi časté u jedinců trpících pouze mírně oslabenou imunitou [21]. Znalosti přírodních mechanismů infekce kandidou bylo doposud využito jen minimálně. Ve stádiu laboratorních zkoušek se nacházejí protilátky proti výše uvedeným virulentním faktorům nebo chemické inhibitory sekretovaných aspartátových proteinas, většího klinického rozšíření však doposud nedosáhly [10]. Mechanismy imunitní odpovědi vůči kvasinkám se průběžně doplňují, zatím však nebyl identifikován žádný jejich přirozený biologický nepřítel [16].

Podobně jako u kandidias (kvasinkových infekcí), i u dermatofytóz může trvalé oslabení imunitního systému vést k systémovým infekcím. Nedávné sekvenování genomů několika dermatofyt otevřelo cestu k identifikaci jejich infekčních genů a molekulární diagnostice [3]. Jinak je však léčba těchto onemocnění stále závislá zejména na použití chemických antimykotik nechvalně proslulých jak svými vedlejšími účinky, tak pouze dočasným potlačením infekce.

Dermatofytózy patří mezi plísňové infekce rozšířené u lidí i u zvířat. Řadíme je mezi zoonózy. U lidí může často být infekce zvířecího původu. Možný je ovšem i opačný přenos z člověka na zvíře. Riziko přenosu stoupá i v dnešní moderní době, kdy mykotické infekce nepostihují pouze farmáře, tedy chovatele v přímém styku s potravinovými zvířaty a koňmi [28], ale i obyvatele měst, kde k přenosu infekce dochází blízkým stykem s domácími zvířecími mazlíčky chovanými ve společné domácnosti, kteří žijí v denním úzkém kontaktu s jejich majiteli [24]. U zvířat je často obtížné dosáhnout infekce v případě zcela zdravých jedinců. Poměrně častý je však výskyt těchto infekcí u stresovaných jedinců s oslabeným imunitním systémem a u plemen s dědičnými predispozicemi ke kožním chorobám. Tato onemocnění se vyskytují též ve formě druhotných infekcí, výrazně ztěžujících průběh primárního onemocnění. Dermatofytické infekce jsou časté ve velkých chovech. K propuknutí dochází zejména při nedodržení karantény při příchodu nového jedince a při celkovém nedodržování zoohygienických podmínek chovu. V chovech hospodářských zvířat mohou být příčinou významných ekonomických ztrát. Zoonózy způsobené patogeny rodu *Trichophyton* podléhají povinnému hlášení příslušným autoritám. Léčba těchto infekcí pomocí klasických chemických prostředků tak představuje zátěž nejen pro zvíře, ale také pro majitele. U zvířat, jejichž produkty, jako maso a mléko se dostávají do potravinového řetězce, takováto léčba znemožňuje zpracování těchto surovin ve stanovených ochranných lhůtách tak, aby spotřebitel nebyl ohrožen rezidui používaných terapeutik.

Teprve nedávno se začalo přistupovat k problematice oportunních mikrobiálních infekcí diferencovaně a komplexně, na základě důkladného studia a dobrých znalostí jejich příčin a s důrazem na účinné přírodní metody, související s tzv. biologickou léčbou. Zásadním přínosem pro zvyšující se popularitu biologických přístupů pak byly nedávné výsledky mezinárodního výzkumného konsorcia Human Microbiome Project Consortium, které provedlo na základě moderních metod molekulární genetiky detailní rozbor jednotlivých fyziologických mikrobiálních společenstev vyskytujících se na kůži, sliznicích a v respiračním, trávicím a urogenitálním traktu [22]. Na základě těchto mezinárodně prověřených a neustále doplňovaných analýz, se poprvé vědecká a lékařská veřejnost dozvěděla dosud jen částečně objasněná fakta o složení mikrobiálních společenstev v různých částech našeho těla u dostatečného, statisticky významného souboru zdravých jedinců, což umožnilo zcela nový pohled na jejich individuální variabilitu, časovou stabilitu, a zejména na změny v těchto společenstvech charakterizující jednotlivé patologické stavy.

Po zveřejnění výsledků výše uvedeného konsorcia pro lidské mikrobiomy, očekávala vědecká a lékařská veřejnost rychlé využití těchto poznatků pro návrh nových a účinných léčebných postupů, mj. právě též v oblasti léčby oportunních mikrobiálních infekcí, o jejichž vazbě na mikrobiální dysbiosy již existovala řada důkazů. Z hlediska výše uvedených očekávání je možno konstatovat, že množství prakticky odzkoušených léčebných postupů, používajících výše uvedené revoluční poznatky i množství postupů založených na jakémkoliv biologickém způsobu léčby, doposud zůstalo daleko za očekáváním. Z hlediska použití biologických způsobů léčby oportunních infekcí, stojí za zmínku CZ 9883 U (18. 4. 2000) [36], popisující prostředky na ochranu kůže, používající houbu *Pythium*

oligandrum ve formě biologického prostředku pro potírání původců dermatofytóz, který obsahuje jako účinnou složku uvedený houbový organismus ve formě oospór s tím, že celkový počet oospór je maximálně 2×10^5 na 1 g prostředku.

Použití mikroorganismu *Pythium oligandrum*, jako nástroje k biologickému boji s plísňovými a jinými infekcemi, byla následně značně rozšířena v CZ 302 297 (9. 2. 2011) [34], jehož majitel je přihlašovatelem tohoto vynálezu. Vynález popisuje protiplísňovou směs s houbovým organismem *Pythium oligandrum*, určenou pro potírání lidských chorob a chorob zvířat plísňového, bakteriálního či jiného původu a pro narušení biofilmů na cizorodých materiálech, užívaných v humánní i veterinární medicíně, a pro eliminaci mikroflory z různých předmětů, přicházejících do styku s lidmi nebo zvířaty. Navrhovaná protiplísňová směs využívá účinné látky houbového organismu *Pythium oligandrum* ve směsi s inertními složkami. Aktivita houbového organismu *Pythium oligandrum* ve směsi nastává v okamžiku, kdy tento organismus přijde do styku s vlhkostí. Řešení dle CZ 302 297 [34] je pojaté ve vztahu k lékařskému využití oomycety *Pythium oligandrum* pro potlačení symptomů řady různých onemocnění, nejen chorob plísňového původu. Na základě tohoto patentu přistoupil jeho majitel a současně přihlašovatel této předložené přihlášky vynálezu, k vývoji, odzkoušení a prodeji řady kosmetických přípravků. Tyto přípravky jsou v prodeji v lékárnách a u veterinárních lékařů v České republice, a jsou v závislosti na platné legislativě též notifikovány podle požadavků EU v příslušném evropském portálu. Ve vztahu k lékařskému použití je třeba zmínit zejména nízkou toxicitu, která je v současné době podpořena jak zkušenostmi řady uživatelů, tak i laboratorními testy, příkázanými pro posouzení bezpečnosti kosmetického přípravku odpovědnými orgány. Dlouhodobým užíváním tohoto v podstatě jednosložkového preparátu s účinnou složkou *Pythium oligandrum* se velmi osvědčilo. Přesto se ukázalo, že některým pacientům nevyhovuje v dlouhodobém horizontu. Ukázalo se, že se jedná o pacienty s oslabenou nebo jinak porušenou imunitou.

Použití biologických prostředků pro ochranu proti oportunním infekcím je dále předmětem několika zahraničních patentů a patentových přihlášek. US 5,190,746 (2. 3. 1993) [7] navrhuje použít hexasacharid o molekulární hmotnosti 959, izolovaného z orálního mikroba *Streptococcus oralis* pro blokování vzájemné interakce tohoto streptokoka s komponentou bakteriálního zubního plaku *Capnocytophaga ochracea*. Přestože byl efekt oligosacharidu testován pouze v laboratorním testu, ve vynálezu se předpokládá, že by mohl být účinný při prevenci, inhibici nebo rozrušení mikrobiálních depozit v zubním plaku, a to například při použití v zubních pastách nebo ústní vodě. CA 2 374 938 A1 (30. 11.2001) [31] popisuje metodu pro inhibici infekce ran u savců spočívající v podání probiotických organismů přímo do rány, přičemž jako probiotický organismus je navrhováno několik kmenů laktobacilů, například *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum* a.j. Tatáž metoda je navrhována pro inhibici tvorby biofilmů, nikoliv ovšem v nehojících se ranách, ale na různých operačních nástrojích. WO 2008/ 077 251 A (3.7.2008) [32] se zabývá použitím laktobacilů k eliminaci methicillin-rezistentního patogenu *Staphylococcus aureus* na základě laboratorního testu. WO 2013/122 931 A2 (22.8.2013) [26] popisuje použití prebiotik, podporujícího

rozvoj zdravých komensálních mikroorganismů kůže, jmenovitě bakterií *Streptococcus epidermidis*, *Corynebacterium jeikeium* a *Propionibacterium acnes*, pro zlepšení fyziologického stavu a vzhledu kůže. Kolonizace těmito mikroorganismy byla prokázána *in vivo* testem. Ve studii však není uveden žádný důkaz pro blahodárny efekt takto aplikovaných mikroorganismů na kůži nebo pro jejich použití pro léčbu.

Ve vědecké a lékařské literatuře byly zaznamenány úspěšné výsledky s použitím laktobacilů pro zvýšení odolnosti žen s opakovanými kvasinkovými vulvovaginálními infekcemi. Za zmínku v této souvislosti stojí zejména výsledky získané s preparátem Lactin V firmy Osel ve studiích sponzorovaných University of Washington. Výsledky fáze IIa a IIb těchto studií, které jsou k dispozici ve vědeckých publikacích [33], ukázaly, že opakované infekce urogenitálního traktu se vyskytovaly u 15 % žen léčených Lactinem V, zatímco u skupiny neléčených žen byla incidence vyšší, kolem 27 %. Kolonizace laktobacilem byla prokázána genetickým testem a byla zjištěna statisticky významná korelace mezi takto zjištěnou kolonizací a snížením opakovaných vaginálních infekcí i infekcí urogenitálního traktu.

Výše uvedené vynálezy mají však některé zásadní nevýhody. Všechny uvedené principy byly prokázány pouze v laboratorních testech, maximálně na zvířecích experimentálních modelech. Tento nedostatek je zásadní povahy, neboť je odborníkům v oboru dobře známo, že výsledky získané na zvířecích modelech nemusí vždy platit v případě humánní léčby, a nemusí mít univerzální platnost ani pro léčbu veterinární; tj. nálezy učiněné na jednom živočišném druhu nelze vždy účinně aplikovat pro jiný živočišný druh. Navíc byly jako probiotické organismy použity mikroorganismy bez jakékoliv fyziologické relevance k místu léčby – nejčastěji se jednalo o laktobacily, které tvoří predominantní mikrobiální komponentu vaginálního mikrobiomu, ale u ostatních mikrobiomů se fyziologicky prakticky vůbec nevyskytují. Pouze v případě řešení dle US 5,190,734 A [7] a WO 2013/122 931 A2 [26] byly využity komponenty přirozených, fyziologických mikrobiomů v dutině ústní resp. v kůži. V těchto případech se však jednalo o použití prebiotik, nikoliv probiotik. Prebiotika jsou sloučeniny, které mohou – ale nemusí – povzbudit růst a namnožení příslušných probiotických organismů. I v těchto případech platí námitka, že účinnost těchto přípravků byla prokázána pouze v laboratorních testech a ne v reálné situaci v klinických studiích.

Podstata vynálezu

Uvedené nevýhody se odstraní nebo podstatně omezí u duálního mikrobiálního preparátu pro dlouhodobé potlačení symptomů nebo pro prevenci oportunních mikrobiálních infekcí, zejména způsobených dysbiosou, podle tohoto vynálezu. Podstata tohoto vynálezu spočívá v tom, že dvojsložkový mikrobiální preparát obsahuje dvě základní mikrobiální komponenty, a to mikroskopickou řasovku *Pythium oligandrum* a komponenty mikrobiomu, přičemž komponentou mikrobiomu je fyziologický mikrobiom lidského či zvířecího původu nebo mikrobiom pochází

z životního prostředí. . Mikroskopická řasovka je přítomna ve formě propagulí a různých uvolňovaných látek makromolekulární i nízkomolekulární povahy jako jedna komponenta.

Druhá komponenta je klinickými studiemi prověřená bakterie obsažená ve fyziologickém mikrobiomu, která se dodává z duálního mikrobiálního preparátu až do ustavení požadované mikrobiální rovnováhy v lidském nebo případně zvířecím organismu. Komponenta fyziologického mikrobiomu je lidského nebo zvířecího původu nebo pochází z životního prostředí. Komponenta fyziologického mikrobiomu lidského původu se použije pro eliminaci a prevenci symptomů způsobených dysbiózou u lidí, přičemž je nezbytné zohlednit topologickou lokalizaci této dysbiózy, např. pro dutinu ústní připadá v úvahu užití pouze komponenty ústního mikrobiomu. Komponenta fyziologického mikrobiomu zvířecího původu se použije pro eliminaci a prevenci symptomů způsobených dysbiózou u zvířat, přičemž je nezbytné zohlednit topologickou lokalizaci této dysbiózy, např. pro infekci dermatofyty na kůži srsti zvířete připadá v úvahu využití pouze komponenty kožního mikrobiomu. Komponenta mikrobiomu z životního prostředí se použije pro nastolení mikrobiální rovnováhy příznivé pro eliminaci a prevenci plísní a kvasinek ze životního a pracovního prostředí.

Hlavní výhodou tohoto vynálezu je, že duální mikrobiální preparát navozuje stav dlouhodobé a trvalé stabilizace zdravého mikrobiomu v místě aplikace. Velkou předností tohoto řešení je, že obě základní komponenty mikrobiálního duálního preparátu působí vzájemně se zesilujícím a vzájemně působícím (synergním) mechanismem, společně s imunitním systémem hostitele eliminaci původců a podmínek vybraných patologických stavů. Po eliminaci patologické noxy umožněné unikátními aktivitami *Pythium oligandrum* přetrvává tato řasovka v místě aplikace v klidové podobě, zatímco druhá mikrobiální komponenta posiluje fyziologické komponenty normálního zdravého mikrobiomu a svými metabolickými procesy stabilizuje a nastoluje požadované zdravé mikroprostředí v místě aplikace.

Velmi významnou předností je dlouhodobý příznivý účinek duálních mikrobiálních preparátů podle tohoto vynálezu, čímž se liší od alternativních chemických prostředků, které mívají zpravidla pouze krátkodobý účinek. Tento krátký účinek je možné kompenzovat pouze opakovaným podáváním chemických přípravků, během něhož však většinou začínají cílové patogenní organismy projevovat rezistenci na tyto chemické prostředky. Jediným způsobem překonání této rezistence pak je progresivní podávání stále vyšších dávek chemických prostředků, čímž se ovšem ještě násobí případné vedlejší účinky a toxické působení těchto chemikálií. Použití biologických prostředků má nespornou výhodu v tom, že používají naprosto odlišné mechanismy působení více slučitelné s odstraněním patogenní infekce a dlouhodobými stabilizujícími účinky.

V konkrétním případě navrhovaného duálního mikrobiálního preparátu podle tohoto vynálezu výsledky ukazují, že každý z obou použitých mikroorganismů projevuje v místě aplikace přípravku vlastní populační křivku vycházející z jeho biologických vlastností. Jedna složka, *Pythium oligandrum*, zaznamenává rychlý nárůst v počáteční fázi v závislosti na přítomnosti potencionálních

živin a po vyčištění místa aplikace a potlačení patogenů ještě přežívá na místě aplikace ve sporulující podobě. Druhá složka, stabilizující komponenta normálního zdravého mikrobiomu, přežívá na místě aplikace dlouhodobě a posiluje příznivé účinky již přítomné normální mikroflóry, které pomáhá při její stabilizaci.

5 Duální mikrobiální preparát podle tohoto vynálezu přispívá k potlačení a eliminaci oportunních plísňových, kvasinkových a bakteriálních infekcí lidí a zvířat a navození zdravého mikrobiomu dutiny ústní, povrchu nehojících se ran a sliznic zasažených kvasinkovými infekcemi narušeného v důsledku stresu, nezdravého životního stylu, mechanického namáhání nebo nadužívání chemických prostředků osobní hygieny.

10 Předkládaný vynález je vhodný zejména pro potlačení řady patologických symptomů založené na stabilizaci normálních, zdravých fyziologických mikrobiomů, jejichž přirozená rovnováha je narušena v případě stresu, nadměrné fyzické zátěže, oslabení organismu, genetické poruchy nebo jiného onemocnění. Předkládaný vynález je založený na synergním působení mikroskopické řasovky *Pythium oligandrum*, jejíž úlohou je zejména vyčištění aplikačního mikroprostředí, eliminace
15 plísňové nebo kvasinkové zátěže, rozrušení mikrobiálního biofilmu v místě aplikace a potlačení růstu patogenních bakterií a dominantní mikrobiální komponenty zdravého fyziologického mikrobiomu.

Je výhodné, když mikroskopická řasovka *Pythium oligandrum* i komponenta fyziologického mikrobiomu jsou přítomny v podobě umožňující jejich vzklíčení, následné namnožení a kolonizaci cílových tkání, v nichž, uplatňují v závislosti na lokálních podmínkách své běžné metabolické
20 aktivity, včetně schopnosti uvolňovat do svého okolí biologicky aktivní makromolekulární nebo nízkomolekulární látky. Fyziologické regulační mechanismy, spolu s omezenou povrchovou kapacitou kůže a sliznic, zároveň účinně zabraňují možnosti dodání nadměrného množství komponenty fyziologického mikrobiomu, neboť v takovém případě dochází rychle k nasycení povrchové vazebné kapacity a přebytečné komponenty jsou automaticky odstraňovány.

25 Duální mikrobiální preparát podle tohoto vynálezu obsahuje optimálně účinné zjištěné rozmezí obou základních složek, a to mikroskopickou řasovku *Pythium oligandrum* v množství 10^3 až 10^8 , přednostně 10^5 až 10^6 , KTJ (kolonie tvořících jednotek, anglický ekvivalent CFU) na jeden gram preparátu, v kombinaci s dominantní komponentou relevantního fyziologického mikrobiomu v množství 5×10^6 až 5×10^{10} , přednostně 5×10^7 až 5×10^9 , KTJ (kolonie tvořících jednotek, CFU)
30 na jeden gram preparátu. Bylo zjištěno, že nižší hodnoty nárokováného rozmezí složek nejsou dostatečně účinné, zatímco vyšší hodnoty by mohly zbytečně zatěžovat lidský organismus. Poměr obou použitých mikrobiálních komponent přitom vhodně vychází ze vzájemného kapacitního biosyntetického poměru obou použitých mikroorganismů, který je v podstatě definován poměrem objemů obou použitých buněk a je tedy charakterizován přepočítacím faktorem cca 2350, při
35 uvažovaném rozměru řasovky *Pythium oligandrum* $18 \times 18 \times 18 \mu\text{m}$ a bakterie $1 \times 1 \times 2 \mu\text{m}$.

V duálním mikrobiálním preparát podle tohoto vynálezu může sloužit substrát, fermentovaný během nárůstu řasovky *Pythium oligandrum*, jako zdroj živin pro obě mikrobiální komponenty. Živiny a prebiotika podporují metabolismus obou mikrobiálních komponent.

- Optimální aplikaci duálního mikrobiálního preparátu podle tohoto vynálezu podporují
- 5 pomocné složky, obsahující nejméně jednu z pomocných složek ze skupiny, zahrnující: desikant jako je oxid křemičitý; komponenty pufracího systému jako je kyselina citronová, hydrogenuhličitan sodný a uhličitan sodný navozující správné pH během aplikace; protispěkáci látku, jako je sorbitol nebo polyethylenglykol; a prostředek pro tvorbu fyziologického osmotického prostředí, jako je chlorid sodný.
- 10 Pomocí testů specifity vzájemného působení za podmínek blízkých různým částem lidského těla bylo zjištěno, že vhodnou mikrobiální komponentou duálního mikrobiálního preparátu je vždy dominantní mikrobiální komponenta příslušného mikrobiomu, který je relevantní za podmínek pro podmínky příslušné povrchové lokality.

- Pro dlouhodobé potlačení příznaků periodontálního onemocnění a dlouhodobé udržování
- 15 zdravé dutiny ústní je výhodné, když komponentou fyziologického mikrobiomu je zdravý lidský mikrobiom, a to jeden z mikrobů zeleného komplexu, jako je bakterie *Capnocytophaga sputigena*, přičemž jeho kvantitativní množství odpovídá obsahu komponenty fyziologického mikrobiomu.

- Podobně pro dlouhodobé potlačení symptomů klinické infekce u nehojících se ran u nediabetických pacientů, rozrušení biofilmů v nehojících se ranách, včetně biofilmů způsobovaných
- 20 mikroorganismy *Stenotrophomonas maltophilia* a *Pseudomonas aeruginosa* a pro dlouhodobé udržování zdravé pokožky, je výhodné, když komponentou fyziologického mikrobiomu je lidský mikrobiom, a to jedna z komponent zdravého mikrobiomu kůže, jako je bakterie *Staphylococcus epidermidis*.

- Pro dlouhodobé potlačení kvasinkových infekcí urogenitálního traktu a kůže, vaginální
- 25 sliznice je výhodné, když komponentou fyziologického mikrobiomu je lidský mikrobiom, a to jedna z komponent zdravého vaginálního mikrobiomu, jako je peroxidy produkující *Lactobacillus crispatus*.

- Pro kosmetické účely nebo pro pacienty s oslabenou imunitou je výhodné, když jsou v duálním mikrobiálním preparátu přítomny buď mikroskopická řasovka *Pythium oligandrum* nebo komponenta fyziologického mikrobiomu ve formě neživých složek, jako jsou usmrčené buňky,
- 30 buněčné extrakty, nebo izolované buněčné frakce.

- Bylo zjištěno, že pro eliminaci původců mykotických onemocnění kůže a dermatofytóz u zvířat a dlouhodobé udržování zdravé kůže je výhodné, když pro řasovku *Pythium oligandrum* je mikrobiálním aktivátorem kvasničný autolyzát v množství 0, 1 % - 10 % hm. z celkového množství duálního mikrobiálního preparátu.

- 35 Pro snadnější aplikaci duálního mikrobiálního preparát podle tohoto vynálezu je vhodné, když pomocné látky jsou ve formě mastí, krémů, olejů, čípků nebo ve formě tekutého vodného přípravku.

Vzhledem k teplotní růstové limitaci mikroskopické řasovky *Pythium oligandrum*, při aplikaci duálního mikrobiálního preparátu podle tohoto vynálezu by měla být teplota vždy nižší než fyziologická teplota, jako je teplota např. kolem 35 °C. Tato limitace prakticky vylučuje použití duálních mikrobiálních preparátů podle tohoto vynálezu pro vnitřní užití. Proto zůstává jejich použití omezené na kůži a sliznice dutiny ústní a urogenitálního traktu, které je možné oplachovat vodnými roztoky navrženého preparátu právě za teplot poněkud nižších, než je teplota lidského těla.

Duální mikrobiální preparát se při aplikaci aktivuje stykem s vlhkostí. Aktivita duálního mikrobiálního preparátu ve směsi se ustaví v okamžiku, kdy tento preparát přijde do styku s vlhkostí, resp. s navlhčenými inertními komponentami. Aplikace zvlhčeného, aktivovaného preparátu se provádí zejména oplachy postižených míst, jinými způsoby vlhké aplikace, popřípadě mohou být komponenty dodány ve formě mastí, krémů, olejů, čípků, ve formě suchých lyofilizovaných směsí, obsažených v těchto kosmetických přípravcích nebo ve formě tekutého vodného **přípravku**.

Pro potlačení nebo rozrušení biofilmů odolných vůči působení jednotlivých izolovaných komponent, při rozrušení biofilmů způsobených mikroorganismy jako je např. *Stenotrophomonas maltophilia* nebo *Pseudomonas aeruginosa*, pro eliminaci plísní, kvasinek a patogenních bakterií z životního prostředí, je výhodné, když komponentou mikrobiální složky je některá z bakterií, zejména bacilů, schopných potlačovat rozvoj plísní v životním prostředí, v množství 10^5 až 10^{12} KTJ (kolonie tvořících jednotek) na 1 g. Přednostně je touto mikrobiální komponentou pocházející ze životního prostředí bakterie *Bacillus amyloliquefaciens*.

Přehled obrázků na výkresech

Vynález je dále podrobně popsán na příkladných provedeních a blíže osvětlen na připojených schematických výkresech, v nichž je znázorněn na

obr. 1A, obr. 1B, obr.1C test účinnosti duálního mikrobiálního preparátu pro dutinu ústní, pro jednotlivé pacienty (očíslované): a to v levé části pro „responzivní pacienty“ za podmínek odpovídajících aplikací dvousložkového mikrobiálního preparátu dle vynálezu; v pravé části pro „neresponzivní pacienty“ za podmínek odpovídajících aplikací jednosložkového preparátu na bázi *Pythium ligandrum* dle vynálezu CZ 302 297 B6, a podrobněji

obr. 1A ukazuje závislost indexu krvácivosti PBI dásní před aplikací, 2 měsíce po aplikaci a 6 měsíců po aplikaci,

obr. 1B ukazuje závislost intenzity hybridizace v *rj*- (relativních jednotkách), odpovídajících počtu rozpadů radioaktivní značky pro mikroorganismy náležící do uvedených mikrobiálních komplexů,

obr. 1C ukazuje závislost obsahu bakterií zeleného komplexu *Capnocytophaga sputigena* a *Eikenella corrodens* vyjádřenou jako procento hybridizačního signálů; dále jsou znázorněny na

- obr. 2** časová stabilita komponent duálního mikrobiálního preparátu pro léčbu příznaků gingivitidy (zánětu dásní) a periodontální onemocnění v dutině ústní, ukazující závislost počtu kolonií KTJ (CFU) na měsících skladování pro *Pythium ligandrum* a pro *Capnocytophaga sputigena*;
- obr.3** test účinnosti duálního preparátu pro nehojící se rány, ukazující procento původního stavu:
- 5 v levé části pro jednotlivé „Responzivní pacienty“ za podmínek odpovídajících aplikaci dvosložkového mikrobiálního preparátu podle vynálezu; a v pravé části pro „Neresponzivní pacienty“ za podmínek odpovídajících aplikaci jednosložkového preparátu na bázi *Pythium oligandrum* dle vynálezu CZ 302 297 B6.
- obr. 4** časová stabilita komponent duálního mikrobiálního přípravku pro nehojící se rány, a to
- 10 závislost počtu kolonií na měsících skladování pro *Pythium oligandrum* a pro *Staphylococcus epidermidis*;
- obr. 5A, obr. 5B, obr. 5C** test účinnosti duálního preparátu pro sliznice náchylné k výskytu kvasinek, pro jednotlivé pacienty: a to v levé části pro „Responzivní pacienty“ za podmínek odpovídajících aplikaci dvousložkového mikrobiálního preparátu dle vynálezu; a v pravé části
- 15 pro „Neresponzivní pacienty“ za podmínek odpovídajících aplikaci jednosložkového preparátu na bázi *Pythium ligandrum* dle vynálezu CZ 302 297 B6, kde
- obr. 5A** ukazuje klinickém hodnocení na škále 1 až 6, a to na počátku před a po 3 měsících po aplikaci, kde „1“ označuje odstranění jednoho a 6 je odstranění všech 6 symptomů, přičemž sledované byly nepohodlí, svědění, pálení, výtok, bolest a zarudnutí, a
- 20 **obr. 5B** ukazuje počet kvasinek v arbitrárních jednotkách, kde značí „1“ výskyt pouze po kultivaci, „2“ sporadický výskyt, „3“ četný výskyt, „4“ masivní výskyt, a to na počátku před aplikací, a 3 měsíce po aplikaci,
- obr. 5C** ukazuje počet *Lactobacillus* v arbitrárních jednotkách, shora uvedených, a to na počátku před aplikací, 3 měsících po aplikaci; dále jsou znázorněny na
- 25 **obr. 6** časová stabilita duálních mikrobiálních preparátů pro kůži a sliznice náchylné k namnožení patogenních kvasinek, ukazující závislost počtu kolonií na měsících skladování pro *Pythium oligandrum* a *Lactobacillus crispatus*;
- obr. 7** test účinnosti *in vitro* pro duální mikrobiální preparát pro mykózy nohou; ukazující závislost počtu kolonií KTJ v % vztažených vůči placebo, kde K je Kontrola odpovídající placebo, PO je *Pythium oligandrum*, KA je kvasničný autolýzát, PO + KA *Pythium oligandrum* a kvasničný autolýzát; testované kmeny dermatofytů byly sbírkové kmeny *Trichophyton interdigitale* DMF2477 (TiDMF2477), *Trichophyton interdigitale* DMF3857 (TiDMF3857), *Trichophyton erinacei* P837 (TeP837), *Trichophyton erinacei* P852 (TeP852), *Microsporum floccosum* ME1236 (MfME1236), *Microsporum floccosum* P245 (MfP245) a *Microsporum canis* DMF2374 (McDMF2374);
- 30 **obr. 8A, obr. 8B**, test vlivu počtu plísňových spór v ovzduší a test zamoření plísněmi ve stěrech u dvou různých místností s výskytem plísní na stěnách s dominantním výskytem plísně

- Aspergillus niger* a *Cladosporium spp.*, kde K jsou hodnoty odpovídající kontrole bez jakéhokoliv ošetření, P.o. jsou hodnoty odpovídající použití jednosložkového preparátu na bázi *Pythium ligandrum* dle vynálezu CZ 302 297 B6, B.a. jsou hodnoty odpovídající aplikaci samotného bacilu *Bacillus amyloliquefaciens* a P.o.+B.a. jsou hodnoty odpovídající aplikaci dvousložkového mikrobiálního preparátu dle vynálezu, kde
- 5 **obr. 8A** ukazuje počet plísňových spór na 1 m³ vzduchu v zamořené místnosti zjištěný Omeljanského metodou po odběru spadů na misky s tím, že dle standardů WHO by měla být tato hodnota pod limitní hodnotu 500,
- 10 **obr. 8B** ukazuje výsledky mikrobiálních odběrů a kultivací ze seškrabů vyjádřené v arbitrárních jednotkách ve škále lékařských hodnocení 1 až 4, kde značí „1“ výskyt pouze po kultivaci, „2“ sporadický výskyt, „3“ četný výskyt, „4“ masivní výskyt.

Příklady provedení vynálezu

- 15 Námí navrhované řešení je umožněno na základě detailní analýzy výsledků laboratorních a praktických zkoušek kosmetických přípravků založených na výše uvedeném patentu CZ 302 297 B6 [34], jejichž detailní formulace byla optimalizována pro výrobky, např. s ohledem na pomoc při eliminaci symptomů oportunních infekcí v dutině ústní *Chytrá houba® Pythie® BioPlus*, v prostředí nehojících se ran *Biomycosin*, na povrchu sliznic urogenitálního traktu *FeelFresh* a s ohledem na
- 20 eliminaci původců plísňových infekcí kůže *Chytrá houba® Pythie® Biodeur® Nail*, veterinární přípravek *Chytrá houba® Ecosin*. Všechny tyto přípravky, obsahující jako účinnou látku pouze *Pythium oligandrum*, s optimalizovanou formulací prošly toxikologickými a bezpečnostními zkouškami dle zásad evropské notifikace kosmetických přípravků, v případě veterinárního přípravku byly schválené Ústavem pro státní kontrolu biopreparátů a léčiv, přičemž hodnocení bezpečnosti
- 25 přípravků jsou k dispozici na evropském notifikačním portálu CPNP. Jednotlivé takto formulované přípravky byly poté testovány v klinických zkouškách za podmínek odpovídajících fázi II klinických zkoušek nezbytných pro vývoj léčiva.

P ř í k l a d 1

- 30 **(Obr. 1A, obr. 1B, obr. 1C, obr. 2)**

- Přípravek *Chytrá houba® Pythie® BioPlus* ve formě šumivé tablety byl testován v multicentrické studii zahrnující tři stomatologická pracoviště a jedno pracoviště klinické mikrobiologie. Skupiny účastníků studie trpících periodontálním onemocněním (paradentózou) se nacházely na třech dentálních klinikách v Praze, v Kladně a v Košicích. Skupina v Praze zahrnovala 7 participantů,
- 35 skupina v Kladně 15 participantů a skupina v Košicích 22 participantů. Celkový počet participantů ve studii tedy činil 44. Paralelně byla stejným způsobem léčena i kontrolní skupina, dostávala však nikoliv biologický, ale klasický chemický přípravek chlorhexidin gel. Účastníci studie byli pravidelně

monitorování měřením PBI (Probing of Bleeding Index) indexu krvácivosti, který odráží okamžitý stav zánětu v dásních a CPITN (Community Periodontal Index of Treatment Needs) indexu, který je měřítkem dlouhodobého stavu chrupu i předpovědí potřeb z hlediska jeho ošetření. Studie probíhala dvojité zaslepeným způsobem, v němž byly obálky s preparáty připraveny a očíslovány administrativním pracovníkem nezasvěceným do průběhu studie. Po provedení dentální hygieny a podepsání informovaného souhlasu byli jednotliví pacienti instruováni, jak provádět večerní dentální hygienu a aplikovat přípravky. Aplikace byla prováděna formou výplachů vždy večer po skončení orální hygieny pět dnů po sobě. Dentální prohlídka byla provedena na počátku studie, po 2 měsících a po 6 měsících, přičemž byl kontrolován stav chrupu a na konci studie po 6 měsících i kolonizace mikroby zdravého orálního mikrobiomu na základě genetického testu.

Statistickým vyhodnocením výsledků bylo zjištěno, že účinek chemického dezinfekčního prostředku chlorhexidinu byl pouze krátkodobý, neboť došlo ke statisticky významnému snížení PBI indexu $p \leq 0.05$ pouze po 2 měsících sledování, nikoliv však na konci studie po 4 měsících. Naopak dlouhodobé výsledky ve skupině s podáním biologického přípravku byly výborné. Došlo v krátkodobém zhodnocení ke statisticky významnému $p \leq 0,05$ a v dlouhodobém zhodnocení ke statisticky vysoce významnému $p \leq 0,01$ snížení indexu krvácivosti a stabilizaci stavu chrupu až po dobu 6 měsíců, po níž byli participanté studie sledováni. U největší skupiny participantů na dentální klinice v Košicích byly výsledky heterogenní a po statistickém vyhodnocení nebylo očekávaných léčebných účinků, na rozdíl od dvou výše uvedených skupin, dosaženo. Pro vyjasnění této situace byly využity detaily klinického hodnocení a skutečnosti, že u této skupiny participantů byl před podáváním preparátu sledován úplný mikrobiální profil ústní mikroflóry genetickým testem. Vzájemnou korelaci klinických a laboratorních výsledků bylo možno konstatovat, že se tato heterogenní skupina skládá ze tří podskupin, označených jako nízkoriziková, středně riziková a vysoce riziková skupina. Nápadným rysem vysoce rizikové skupiny je nízký obsah fyziologických orálních bakterií tzv. zeleného ochranného komplexu, zahrnující analyzované druhy *Eikenella corrodens* a *Capnocytophaga sputigena*.

Výsledky jsou uvedeny na obrázku 1A, 1B, 1C. Na obr. 1A a jsou znázorněny hodnoty indexu krvácivosti PBI, jednak pro pacienty, za podmínek odpovídajících aplikaci preparátu s *Pythium oligandrum*, označených v grafu jako „Neresponzivní pacienti“ a jednak pro pacienty za podmínek odpovídajících aplikaci duálního mikrobiálního preparátu označených v grafu jako „Responzivní pacienti“, a to před aplikací, po 2 měsících aplikace a po 6 měsících aplikace.

Na počátku studie před aplikací (černé sloupce) nebyl mezi oběma skupinami statisticky významný rozdíl. „Neresponzivní pacienti“ měli hodnoty indexu krvácivosti PBI $38,8 \pm 5,8$ a „Responzivní pacienti“ měli hodnotu indexu krvácivosti $44,6 \pm 4,7$. Hodnota pravděpodobnosti odlišnosti obou skupin byla $p = 0,121$; tedy, obě skupiny pacientů tedy nebyly statisticky významně rozdílné. Na konci studie, po 6 měsících, měli „Neresponzivní pacienti“ za podmínek odpovídajících aplikaci *Pythium oligandrum* hodnoty krvácivosti PBI statisticky významně vyšší, oproti

„Responzivním pacientům“ za podmínek odpovídajících aplikaci duálního mikrobiálního preparátu podle vynálezu. Vypočtené hodnoty indexu krvácivosti PBI činily po 6 měsících $39,4 \pm 10,8$ pro pacienty za podmínek odpovídajících aplikaci pouze *Pythium oligandrum*, zatímco hodnoty za podmínek odpovídajících aplikaci duálního mikrobiálního preparátu podle vynálezu činily $10,6 \pm 2,4$.

- 5 Hodnota pravděpodobnosti odlišnosti obou skupin byla $p = 0,0003$. Podobné byly i výsledky týkající se CPITN indexů, který je však méně pohotovým indikátorem, vzhledem k jeho pomalejší reakci na stav dutiny ústní a odrážejícím spíše dlouhodobé trendy.

Obr. 1B znázorňuje závislost intenzity hybridizace genetických sond detekujících jednotlivé skupiny orálních mikroorganismů náležejících do zeleného, oranžového nebo červeného komplexu.

- 10 Na **obr. 1B** jsou uvedeny výsledky genetické analýzy přítomnosti vybraných mikrobů zeleného orálního komplexu (černé sloupce), oranžového orálního komplexu (světle šedé sloupce) a červeného orálního komplexu (tmavě šedé sloupce) uvedeny v jednotkách, odpovídajících počtu rozpadů za minutu radiokativně značených DNA sond. Participantů v kontrolní skupině za podmínek, odpovídajících podávání *Chytrá houba® Pythie® BioPlus* (vpravo obr. 1B) a v experimentální skupině za podmínek odpovídajících podávání duálního mikrobiálního preparátu (vlevo obr. 1B), mají vysoký obsah mikrobů oranžového a červeného komplexu, což podporuje jejich diagnózu vážného periodontálního onemocnění. Mezi oběma skupinami nebyly pozorovány statisticky významné rozdíly. V experimentální skupině responzivních participantů je ovšem nápadný statisticky významně vyšší obsah bakterií zeleného komplexu: 14908 ± 1489 rel. j. oproti 2750 ± 1171 rel. j., $p < 0,001$, a to zejména bakterie *Capnocytophaga*, jak je ukázáno na **obrázku 1C** (tmavé sloupce).

- 25 Tyto výsledky potvrzují, že duální mikrobiální preparát podle tohoto vynálezu pro použití v dutině ústní vykazuje statisticky významně lepší výsledky ve srovnání se standardním preparátem. Na základě těchto výsledků jsme zvažovali a hledali řešení pro účinný a dlouhodobý efekt řasovky *Pythium oligandrum* na odstranění příznaků paradentózy a zánětu dásní, zkoušeli a vyvíjeli jsme experimenty na prokázání kooperace tohoto mikroorganismu *Pythium oligandrum* s mikrobiálními komponentami zdravého ústního mikrobiomu, zejména pak s bakterií *Capnocytophaga sputigena*.

- 30 Byly připraveny celkem tři verze duálního mikrobiálního přípravku pro použití v dutině ústní a byla prokázána stabilita takových přípravků a provedeno jejich klinické testování u pacientů s periodontálním onemocněním. Detailní popis získaných výsledků je uveden dále podrobněji v tomto příkladu provedení tohoto vynálezu. Souhrnně výsledky tohoto testování prokázaly, že při aplikaci duálního mikrobiálního přípravku podle tohoto vynálezu ve formě šumivé tablety pro ústní výplachy, což je forma preferovaná většinou uživatelů dosavadních preparátů, nedocházelo k negativnímu ovlivnění stability žádné z komponent během skladování v suchém stavu. Po aplikaci duálního přípravku formou uživatelsky jednoduchých výplachů dutiny ústní docházelo k účinné kolonizaci a posílení komponenty normálního orálního mikrobiomu, což vedlo k významnému zvýšení úspěšnosti odstranění symptomů hodnoceného dle standardních indexů.

1. Příprava, kontrola a testování účinnosti duálního mikrobiálního preparátu vhodného pro odstranění příznaků gingivitidy a periodontálního onemocnění v dutině ústní.

1.1 Protokol pro přípravu duálního mikrobiálního preparátu pro použití v dutině ústní.

5

1.1.1 Příprava technického preparátu *Pythium oligandrum* M1 ATCC 38472.

Inokulum pro kultivaci mikroskopické řasovky *Pythium oligandrum* kmene M1 ATCC 38472 se připraví s použitím firemního systému „master cell bank“ – „working cell bank“. V master cell bank je uchovávaný firemní kmen *Pythium oligandrum* M1 ATCC 38472 dlouhodobě zmražením v kapalném dusíku při -150°C. Z master cell bank je podle protokolu produkováno limitované množství alikvotů pro working cell bank tak, aby počet reprodukčních generací nepřesáhnul celkový počet 50. Tím je zajištěna genetická stabilita firemního kmene. Kultivace násady probíhá na reciproké třepačce s rozkyvem 10,5 cm a 96 kyvy za minutu po dobu 48 hodin při 28 °C.

Mezitím připravíme jahelný substrát pro pevnou kultivaci *Pythium oligandrum* M1: 500 g loupaného prosa typu *Panicum miliaceum* se důkladně promyje tekoucí studenou vodou. Ve 200 ml destilované vody se rozpustí 50 mg ZnSO₄, 150 mg KH₂PO₄, 50 mg MgSO₄ a 250 mg CaCl₂. Poté se roztok zahřeje k bodu varu a nalije na promyté proso. Po povaření se nádoba s prosem přikryje a nechá stát 30 min. Poté se proso rozprostře na filtrační papír v tenké vrstvě a nechá se vychladnout a oschnout.

Takto připravené proso se rozváží po 30 g do 500 ml Erlenmayerových baněk a probíhá sterilizace v parním autoklávu při teplotě 120 °C po dobu 40 min. Po 24 hod je sterilizace opakována, po každé sterilizaci se proso lehce protřepe.

Vysterilizované proso očkujeme 4 ml inokula připraveného podle výše uvedeného postupu. Po naočkování se proso důkladně protřepe s inokulem a nakonec mírným poklepem vyrovná do stejnoměrné vrstvy.

Pevná kultivace na jahelném substrátu se provádí v termostatu při teplotě 28 °C a relativní vlhkosti 70 % po dobu 14 dnů. Fermentovaný substrát s nárůstem kultury *Pythium oligandrum* se poté suší při 30 °C v sušárně po dobu 48 hodin na konečnou vlhkost 5 %.

Takto získaný fermentovaný substrát se rozemele s použitím kulového mlýnu na částice o velikosti menší než 0.6 mm.

V takto připraveném preparátu technické kvality se nakonec stanoví počet oospór na 1 g preparátu a vzcházivost podle níže uvedených postupů. Asi 1 g připraveného technického preparátu *Pythium oligandrum* se odváží přesně na analytických vahách a rozmixuje 1 min v mixeru v destilované vodě tak, aby byla dodržena koncentrace přesně 2 g/l. Poté se přenese cca 1 ml suspenze do Sedgewick-Rafterovy počítací komůrky a v mikroskopu se počítají jednotlivé charakteristické oospory i oospory ve shlucích tak, aby bylo celkově napočítáno minimálně 100 oospór. Celé měření se

třikrát opakuje, přičemž se před každým odběrem do komůrky suspenze oospór pečlivě promíchá.

Nakonec se počet oospór na 1 g preparátu vypočítá podle vzorce

$$n = (a.c)/(b.d.e), \text{ kde}$$

a je počet zjištěných oospór,

5 b je objem jednoho čtverce v komůrce ($1 \times 1 \times 0.1 \text{ mm} = 1 \times 10^{-4} \text{ ml}$),

c je objem destilované vody použité pro přípravu vzorku v ml (500 ml),

d je váha vzorku v g (1 g) a

e je počet čtverců v komůrce, v nichž byl fakticky napočítán zjištěný počet oospór.

Vzházivost technického preparátu *Pythium oligandrum* se stanoví navážením cca 10 mg
10 technického preparátu přesně na analytických vahách, a jeho rozmixováním ve vodě na vortexovém mixeru na koncentraci 1 mg/ml. Z takto připravené suspenze připravíme tři následná desetinásobná ředění a poté vysejeme po 100 l každého ředění na MEA médium.

Klíčivost odečítáme po 8 hodinách a 16 hodinách kultivace v sušárně při 28 °C, a poté též odečteme finální počet kolonií po 7 dnech kultivace.

15 Počet získaných oospór se pohybuje mezi 0,8 a $1,4 \times 10^6$ /g preparátu podle tohoto vynálezu v závislosti na použité šarži. Klíčivost se pohybuje zpravidla od 2 do 10 %. Šarže použité v příkladu provedení 1 měla $1,0 \times 10^6$ oospór na g a klíčivost 13,1 %, tj. obsahovala $0,131 \times 10^6$ KTJ (kolonie tvořících jednotek, ekvivalent CFU – z anglického colony forming unit) na 1 g.

20 1.1.2 Příprava technického preparátu *Capnocytophaga sputigena* CCM3712

Původní kultura *Capnocytophaga sputigena* CCM3712 je po doručení ze sbírky mikroorganismů uchovávána při -70 °C. Pro kultivaci je malé množství kultury nejprve přeneseno na misku s „čokoládovým agarem“ obsahující tryptikasový sojový agar s 0,1 % kvasničným extraktem, 5 % defibrinovanou koňskou krev. Misky byly kultivovány v 5 % CO₂ při 37 °C přes noc. Druhý den
25 byly narostlé kolonie přeneseny do kapalné kultury obsahující tryptikasovou sojovou půdu s 0,1 % kvasničným extraktem, 0,002 % koňským heminem III, 0,0001 % menadionem a 0,1 % hydrogenuhličitanem sodným. Kultura byla třepána v atmosféře 5 % CO₂ na orbitální třepače při 200 ot/min. Jakmile dosáhla kultura středu logaritmické fáze 10^9 buněk/ml, byly bakterie sedimentovány centrifugací $10000 \times g_{av}$ po dobu 20 min a poté promyty třikrát v 0,1 M sodnocičratovém pufru pH
30 6,0. Po posledním promytí byl sediment bakterií pečlivě zbaven zbytků pufru a vysušen mrazovou sublimací (lyofilizací).

Tímto postupem byl získán z 1 l kultury cca 1 g lyofilizovaných bakterií obsahujících 10^9 KTJ (CFU) na 1 mg prášku.

35 1.1.3 Příprava finální formulace duálního preparátu pro použití v dutině ústní.

Pro přípravu finální formulace byly použity tři různé varianty přípravku lišící se vzájemně svým relativním obsahem bakterie *Capnocytophaga sputigena* CCM3712. Tyto tři varianty byly

označeny zkratkou *PlaqueA*, *PlaqueB* a *PlaqueC*. Přípravky byly připravovány pro zalisování do šumivé tablety o celkové váze 3 g na jednu aplikaci, proto jsou jednotlivé receptury přepočteny na tuto hmotnost. Složení jednotlivých přípravků je uvedeno v Tabulce 1.

- 5 Složka *Pythium oligandrum* je obsažena v duálním mikrobiálním preparátu *PlaqueA*, *PlaqueB* a *PlaqueC* v množství $0,6663 \cdot 10^4$ KTJ na 1 g.

Složka *Capnocytophaga sputigena* CCM3712 je obsažena v duálním mikrobiálním preparátu *PlaqueA* v množství $0,333 \cdot 10^8$ KTJ na 1 gram; v preparátu *PlaqueB* v množství $0,333 \cdot 10^9$ na 1 gram; a v preparátu *PlaqueC* v množství $3,333 \cdot 10^{10}$ KTJ na 1 g.

10 Tabulka 1

Složení duálních mikrobiálních preparátů pro použití v dutině ústní (mg na 3 g tabletu). Léčebná kúra zahrnuje 5 aplikací (5 tablet).				
Název přípravku		<i>PlaqueA</i>	<i>PlaqueB</i>	<i>PlaqueC</i>
Název látky	CAS No.	Obsah (mg)		
<i>Pythium ol.</i>	Viz. 1.1.1	150 (20×10^3 KTJ)	150 (20×10^3 KTJ)	150 (20×10^3 KTJ)
<i>Capnocytoph.</i>	Viz. 1.1.2	0.1 (10^8 KTJ)	1 (10^9 KTJ)	10 (10^{10} KTJ)
Sorbitol	50-70-4	719,9	719	710
PEG 6000	25322-68-3	90	90	90
Menth.aroma	-	30	30	30
Oxid křemičitý	7631-86-9	210	210	210
Kys.citronová	77-92-9	930	930	930
NaHCO ₃	144-55-8	810	810	810
Na ₂ CO ₃	497-19-8	60	60	60
Celkem (mg)		3000	3000	3000

1.2 Zkouška stability duálního mikrobiálního preparátu pro použití v dutině ústní

- 15 Zkouška stability duálního mikrobiálního preparátu pro použití v dutině ústní musí zjistit, zda nedošlo ke vzájemnému negativnímu působení obou mikrobiálních komponent po dobu skladování připraveného preparátu, nejméně však po dobu vykonání testů efektivity *in vitro* a *in vivo*. Jedna tableta s přípravkem *PlaqueA*, *PlaqueB* nebo *PlaqueC* se rozpustí ve 100 ml vlažné vody při cca 35 °C. Po dokonalém rozpuštění se odebere 1 ml na stanovení klíčivosti *Pythia* a 0.1 ml na stanovení KTJ *Capnocytophagy*.

- 20 Pro stanovení KTJ u *Capnocytophagy* ještě vzorek ředíme desítkovou ředící řadou. Na stanovení KTJ použijeme třetí ředění pro *PlaqueA*, např. ředění 10^3 x, čtvrté ředění pro *PlaqueB* např. ředění 10^4 x a páté ředění pro *PlaqueC*, např. ředění 10^5 x.

Zkouška stability se provádí ihned po výrobě přípravku, a dále po 1, 2, 3, 4, 5 a 6 měsících. Výsledky typického stabilitního testu jsou uvedené na obr. 2, znázorňujícím závislost počtu koloni na měsících skladování. Z výsledku je možné uzavřít, že vzcházivost *Pythia* se během šesti měsíců

skladování a následného použití preparátu nejprve poněkud snížila, a posléze ustálila na hodnotě odpovídající cca 75 % původně deklarované nominální hodnoty. Naopak u *Capnocytophaga* nedocházelo během zkoušeného období k význačným změnám ve viabilitě, která odpovídala původně deklarované hodnotě. Výsledek uvedený na obr. 1 se týká preparátu označeného jako *PlaqueB*.

- 5 Výsledky získané s preparáty *PlaqueA* a *PlaqueC* byly v podstatě identické a nejsou proto v grafu pro jeho větší přehlednost uvedeny.

Lze tedy konstatovat, že zalisování původních aktivních komponent do šumivé tablety ani její aktivace před použitím duálního mikrobiálního preparátu podle tohoto vynálezu nesnižovaly významným způsobem životaschopnost ani jedné z komponent duálního preparátu pro použití v ústní dutině.

1.3 Zkouška efektivity připravených směsí s použitím *in vitro* testu

Cílem *in vitro* efektivitních testů je prokázat, že kombinace řasovky *Pythium oligandrum* M1 ATCC38472 a bakterie zeleného orálního komplexu *Capnocytophaga sputigena* CCM3712 bude působit synergním způsobem, tj. dojde ke zvýšení některé měřitelné *in vitro* aktivity řasovky *Pythium oligandrum*. Z tohoto hlediska byl zvolen standardní laboratorní test potlačení růstu patogeních kvasinek *Candida albicans* třech různých hyfy tvořících kmenů získaných z klinických isolátů v Nemocnici Pardubice a převezených pro další experimenty na MBÚ AV ČR (laborať Dr. Kolaříka). Vlastní provedení testu spočívalo v použití standardního aplikačního protokolu, který je vždy zahájen rozpuštěním tablety s obsahem samotného pythia (přípravek *Chytrá houba® Pythie® BioPlus*), popřípadě některé z výše uvedených testovacích tablet označovaných jako *PlaqueA*, *PlaqueB* a *PlaqueC*. Tablety byly rozpuštěny ve 100 ml vlažné vody při cca 35 °C. Poté 12,5 ml této suspenze bylo poté smícháno přímo s 12,5 ml dvakrát koncentrované směsi pro přípravu CDA (Czapek Dox Agar) agarových destiček. Na takto připravené desky bylo po jejich zchladnutí aplikováno rovnoměrně 10⁵ patogenních kvasinek *Candida albicans*. Výsledky tohoto testu jsou uvedeny níže v **Tabulce 2**. Výsledky ukazují, že zatímco samotné *Pythium oligandrum* mělo významný vliv na potlačení růstu kvasinek na experimentálních miskách. Avšak, jeho kombinace s *Capnocytophagou* produkovala další posílení účinku. V případě všech tří patogenních získaných z klinických isolátů. Po týdenní kultivaci při 28 °C byl odečten počet narostlých kolonií ve srovnání s kontrolní miskou, přičemž snížení počtu kolonií oproti kontrole je měřítkem účinnosti *Pythia* kvasinkových kmenů byl nejúčinnější přípravek za podmínek *in vitro* preparát *PlaqueB*, přípravky ve složení označeném jako *PlaqueA* a *PlaqueC* dosahovaly zhruba kolem 80 % této účinnosti.

Vzhledem k náročnosti klinických zkoušek prováděných s velkým množstvím duálních mikrobiálních preparátů podle tohoto vynálezu je jako přípravek pro preklinické a klinické zkoušky vybrán nejúčinnější přípravek *PlaqueB*.

Tabulka 2

Testování duálních preparátů pro dutinu ústní v <i>in vitro</i> testu						
	<i>C. albicans</i> 2944		<i>C. albicans</i> 2548		<i>C. albicans</i> 2508	
	Počet kolonií na misce	Relativní účinnost vůči kontrole	Počet kolonií na misce	Relativní účinnost vůči kontrole	Počet kolonií na misce	Relativní účinnost vůči kontrole
Kontrola	954	-	1014	-	1253	-
<i>Pythium</i>	330	65,4	450	55,6	432	65,5
<i>PlaqueA</i>	285	70,1	230	77,3	253	79,8
<i>PlaqueB</i>	95	90,0	85	91,6	80	93,6
<i>PlaqueC</i>	273	71,4	243	76,0	260	79,2

Příklad 2

5 (Obr. 3, Obr. 4)

Kosmetický přípravek *Biomycosin* s účinnou látkou *Pythium oligandrum* byl na žádost Krajské nemocnice v Pardubicích ověřován na dvou skupinách pacientů s mikrobiálně zanícenými nehojícími se ranami, a to diabetické a nediabetické. Účastníci studie nebyli randomizováni, ale jejich diabetický status byl monitorován, což na závěr studie umožnilo rozdělení dat do diabetické a nediabetické skupiny. Pokud jde o nediabetické pacienty, jejich průměrný věk činil $63,7 \pm 13,1$ roků, přičemž pacienti byli ve věkovém rozpětí 37 – 79 let. Celkový počet sledovaných pacientů činil 19, z toho bylo 14 žen a 5 mužů, protože incidence zanícených bérkových vředů je vyšší u žen než u mužů. Aplikace *Biomycosinu* proběhla v nemocnici pod dohledem lékařského personálu. Ambulantní pacienti byli po dobu podávání přípravku hospitalizováni. Jedno balení *Biomycosinu* bylo použito pro tři osmihodinové vlhké aplikace, přičemž celkem probíhala aplikace 4 dny po sobě. Tři dni po poslední aplikaci byly odebrány vzorky na mikrobiologické vyšetření a poté byli ambulantní pacienti propuštěni. Nadále probíhaly pravidelné měsíční kontroly u ambulantních i neambulantních pacientů po dobu 6 měsíců od aplikace. Výsledky jednoznačně prokázaly významné snížení mikrobiální zátěže a to zejména u G- tyčinek, anaerobních mikroorganismů a patogenních kvasinek. Korelační analýzou výsledků získaných pro nediabetické pacienty byla jasně prokázána negativní korelace mezi snížením mikrobiální zátěže G+ koky a zlepšením stavu klinické infekce u těchto pacientů. Tato negativní korelace byla zvláště nápadná pro kategorii „ostatních stafylokoků“, z nichž má na kůži zásadní důležitost zejména bakterie *Staphylococcus epidermidi*. Negativní korelace (y) pro ostatní stafylokoky byla charakterizovaná rovnicí $y = -0,56x + 85,8$ s korelačním koeficientem $R^2 = 0,87$.

Vzhledem k závislosti průběhu léčby u tohoto onemocnění na věku a pohlaví, protože ženy jsou více náchylné, museli být nejprve pacienti rozděleni do dvou skupin a randomizováni v závislosti na

věku a pohlaví. Průměrný věk pacientů v kontrolní skupině odpovídající podmínkám ošetření přípravkem obsahujícím pouze *P. oligandrum* činil $77,6 \pm 9,8$ let. U experimentální skupiny odpovídající ošetřování duálním preparátem tento parametr činil $78,0 \pm 10,3$ roků. Mezi věkem pacientů v obou skupinách tedy nebyl statisticky významný rozdíl. V obou skupinách byly zařazeny 3
 5 ženy a 2 muži, procento žen tedy bylo v obou skupinách identické a činilo 67 %. Výsledky získané po oba způsoby aplikace jsou znázorněny na **obr. 3**. Ze získaných výsledků je reciproční vztah mezi množstvím odstraněných stafylokoků a snížením zlepšením klinických příznaků infekce jasně patrný. U klinicky responzivních pacientů znázorněných na **obr. 3** v levé části je jasně patrný vysoký obsah zachovaných stafylokoků během léčby preparátem s obsahem řasovky *P. oligandrum* a zároveň je
 10 jasné významné zlepšení klinických známek infekce, většinou na 20 až 50 % původního stavu. Naopak skupina klinicky neresponzivních pacientů, jejichž výsledky jsou znázorněny na **obr. 3** v pravé části pozorujeme velmi výrazné snížení počtu stafylokoků zjištěných kultivačně (včetně druhu *Staphylococcus epidermidis*), avšak pokrok při odstranění klinických symptomů infekce byl u těchto pacientů velmi nízký.

15 Na základě těchto výsledků jsme zvažovali a ověřovali hypotézu, že potlačení některých G+ koků nebylo žádoucí, neboť postihlo zástupce fyziologické mikroflóry. Tuto pracovní hypotézu jsme testovali, tak že byly připraveny celkem tři verze duálního mikrobiálního přípravku podle tohoto vynálezu pro použití pro dlouhodobou eliminaci symptomů klinické infekce u nehojících se ran. Byla prokázána stabilita takových přípravků a provedeno sledování jejich efektivity v relevantním
 20 laboratorním testu. Detailní popis získaných výsledků je uveden v tomto příkladu, dále podrobněji popsán. Souhrnně výsledky tohoto testování prokázaly, že při skladování ve formě suchého přípravku nedocházelo k negativnímu ovlivnění ani jedné z komponent duálního preparátu. Ve srovnání s doposud používaným jednosložkovým preparátem na bázi *Pythium oligandrum* pak došlo při použití mikrobiálního duálního preparátu ke statisticky významnému snížení mikrobiální
 25 kvasinkové zátěže i zlepšení vývoje klinické infekce.

2. Příprava, kontrola a testování účinnosti duálního mikrobiálního preparátu vhodného pro eliminaci symptomů klinické infekce u nehojících se ran u nediabetiků.

30 2.1 Protokol pro přípravu duálního mikrobiálního preparátu pro použití na nehojící se rány nediabetiků.

2.1.1 Příprava technického preparátu *Pythium oligandrum* M1 ATCC 38472.

Postup použitý pro tuto přípravu je identický s postupem popsáným v části 1.1.1.

35 Šarže použité v příkladu provedení 2 měla $1,1 \times 10^6$ oospór na g a klíčivost 14,3 %, tj. obsahovala $0,157 \times 10^6$ KTJ (kolonie tvořících jednotek, ekvivalent CFU) na 1 g.

2.1.2 Příprava technického preparátu *Staphylococcus epidermidis* CCM2124

Původní kultura *Staphylococcus epidermidis* CCM2124 je po doručení ze sbírky mikroorganismů uchovávána při -70 °C. Pro kultivaci je malé množství kultury nejprve přeneseno na misku s tryptone soya agarem CM131 *Oxoid*. Misky byly kultivovány při 37 °C přes noc. Deset dobře separovaných kolonií bylo přeneseno do 2l Erlenmayerovy baňky obsahující 500 ml média o složení 30 g/l peptonu, 10 g/l kvasničného autolyzátu, 5 g/l NaCl, 0.1 g CaCl₂·2H₂O a 1 ml trybutyrinu, pH média bylo upraveno na 8.0. Baktérie byly kultivovány do středu logaritmické fáze, poté byly baktérie sedimentovány centrifugací 10000 x *g_{av}* po dobu 20 minut a třikrát promyty v 0.1 M sodnocitrátovém pufru pH 6.0. Po posledním promytí byl sediment bakterií pečlivě zbaven zbytků pufru a vysušen mrazovou sublimací - lyofilizací.

Z 1 l kultury byl získán cca 0.6 g lyofilizovaných bakterií obsahujících 10⁸ KTJ (CFU) na 1 mg prášku.

2.1.3 Příprava finální formulace duálního mikrobiálního preparátu pro použití na nehojící se rány nediabetiků.

Pro přípravu finální formulace byly použity tři různé varianty přípravku lišící se vzájemně svým relativním obsahem baktérie *Staphylococcus epidermidis* CCM2124, tyto tři varianty byly označeny pracovní zkratkou *NonhealA*, *NonhealB* a *NonhealC*. Přípravky byly připravovány pro použití v jednom balení obsahujícím 10 g sypkého preparátu na jednu aplikaci. Složení jednotlivých přípravků je níže uvedené v Tabulce 3 na následující straně.

Složka *Pythium oligandrum* je obsažena v duálním mikrobiálním preparátu *NonhealA* a *NonhealB* v množství 7,85·10³ KTJ na 1 g; a *NonhealC* v množství 7,85·10³ KTJ na 1 g.

Složka *Staphylococcus epidermidis* CCM2124 je obsažena v duálním mikrobiálním preparátu *NonhealA* v množství 1 x 10⁶ KTJ na 1 g; v preparátu *NonhealB* v množství 1 x 10⁷ KTJ na 1 g; a v preparátu *NonhealC* v množství 1 x 10⁸ KTJ na 1 g.

2.2 Zkouška stability duálního mikrobiálního preparátu pro použití na nehojící se rány nediabetiků

Zkouška stability duálního preparátu pro použití v dutině ústní musí zjistit, zda nedošlo ke vzájemnému negativnímu působení obou mikrobiálních komponent po dobu skladování připraveného preparátu, nejméně však po dobu vykonání testů efektivity *in vitro* a *in vivo*. Jedno balení, 10 g přípravku *Nonheal A*, *Nonheal B* nebo *Nonheal C* se resuspenduje v 250 ml vlažného fyziologického roztoku 9 g/l NaCl při teplotě cca 35 °C. Po dokonalém resuspendování se odebere 1 ml na stanovení klíčivosti *Pythia* a 0,1 ml na stanovení KTJ (CFU) jednotek staphylokoka. Pro stanovení KTJ u staphylokoka ještě vzorek ředíme desítkovou ředicí řadou, a na stanovení KTJ použijeme prvé ředění pro *Nonheal A*, např. ředění 10 x, druhé ředění pro *Nonheal B*, např. ředění 10² x a třetí ředění pro *Nonheal C*, např. ředění 10³ x. Zkouška stability se provádí ihned po výrobě přípravku, a dále po 1, 2, 3, 4, 5 a 6 měsících. Výsledky typického stabilitního testu jsou uvedené na obr. 3. Z výsledku je možné konstatovat, že viabilita *Pythia* se během šesti měsíců skladování a následného použití

- preparátu nejprve poněkud snížila, a posléze ustálila na hodnotě odpovídající cca 75 % původně deklarované nominální hodnoty. Naopak, u staphylokoků nedocházelo během zkoušeného období k význačným změnám ve viabilitě, která odpovídala téměř původně deklarované hodnotě. Výsledek uvedený na **obr. 4** se týká preparátu označeného jako *NonhealB*. Výsledky získané s preparáty *NonhealA* a *NonhealC* byly velmi podobné a nejsou proto v grafu pro jeho větší přehlednost uvedeny.

Tabulka 3

Složení duálních mikrobiálních preparátů pro použití na nehojící se rány nediabetiků.				
Složení je uvedené v mg na 10 g sypkého přípravku.				
1 léčebná kúra zahrnuje 4 aplikace (4 balení přípravku).				
Název přípravku		<i>NonhealA</i>	<i>NonhealB</i>	<i>NonhealC</i>
Název látky	CAS No.	Obsah (mg)		
<i>P. oligandrum</i>	Viz. 2.1.1	500 (78x10 ³ KTJ)	500 (78x10 ³ KTJ)	500 (78x10 ³ KTJ)
<i>Staphylococcus</i>	Viz. 2.1.2	0,1 (10 ⁷ KTJ)	1 (10 ⁸ KTJ)	10 (10 ⁹ KTJ)
Oxid křemičitý	7631-86-9	9499,9	9499	9490
Celkem (mg)		10000	10000	10000

- Lze tedy konstatovat, že vysušením původních aktivních komponent a jejich uchovávání v přítomnosti silikagelu ani jejich aktivace před použitím preparátu podle tohoto vynálezu nesnižovaly významným způsobem viabilitu žádné z komponent duálního preparátu pro použití v ústní dutině.

2.3 Zkouška efektivity připravených směsí duálního mikrobiálního preparátu použitím *in vitro* testu

- Cílem *in vitro* efektivitních testů je prokázat, že kombinace řasovky *Pythium oligandrum* M1 ATCC38472 a zdravé bakterie normálního kožního mikrobiomu *Staphylococcus epidermidis* CCM2124 bude působit synergním způsobem, tj. dojde ke zvýšení některé měřitelné *in vitro* aktivity řasovky *Pythium oligandrum*. Z tohoto hlediska byl zvolen standardní laboratorní test potlačení růstu patogeních kvasinek *Candida albicans* třech různých hyfy tvořících kmenů získaných z klinických isolátů v Nemocnici Pardubice a převezených pro další experimenty na MBÚ AV ČR. Vlastní provedení testu spočívalo v použití standardního aplikačního protokolu, který je vždy zahájen resuspendováním suchého přípravku s obsahem samotného pythia (přípravek *Biomycosin*), popřípadě některé z výše uvedených testovacích přípravků označených jako *Nonheal A*, *B* nebo *C*. Přípravky byly resuspendovány v 250 ml vlažného při teplotě cca 35 °C fyziologického roztoku. Poté 12,5 ml této suspenze bylo smícháno přímo s 12,5 ml dvakrát koncentrované směsi pro přípravu CDA (Czapek Dox agar) agarových destiček. Na takto připravené desky bylo po jejich zchladnutí aplikováno rovnoměrně 10⁵ patogenních kvasinek *Candida albicans* získaných z klinických isolátů. Po týdenní kultivaci při 28 °C byl odečten počet narostlých kolonií ve srovnání s kontrolní miskou, přičemž snížení počtu kolonií oproti kontrole je měřítkem účinnosti *pythia*. Výsledky tohoto testu jsou uvedeny níže v Tabulce 4. Výsledky ukazují, že zatímco samotné *pythium* mělo významný vliv na potlačení

růstu kvasinek na experimentálních miskách, jeho kombinace se staphylokokem produkovala další posílení účinku. V případě všech tří patogenních kvasinkových kmenů byl nejúčinnější přípravek za podmínek *in vitro* preparát *Nonheal B*, přípravky ve složení označeném jako *Nonheal A* a *Nonheal C* dosahovaly zhruba kolem 50 % této účinnosti.

- 5 Vzhledem k náročnosti klinických zkoušek prováděných s velkým množstvím preparátů podle tohoto vynálezu je jako výchozí přípravek pro preklinické a klinické zkoušky navrhován nejúčinnější přípravek *NonhealB*.

Tabulka 4

Testování duálních mikrobiálních preparátů pro nehojící se rány v <i>in vitro</i> testu						
Číslo kmene	<i>C. albicans</i> 2944		<i>C. albicans</i> 2548		<i>C. albicans</i> 2508	
Sledované parametry	Počet kolonií na misce	Relativní účinnost vůči kontrole	Počet kolonií na misce	Relativní účinnost vůči kontrole	Počet kolonií na misce	Relativní účinnost vůči kontrole
Kontrola	980	-	1013	-	988	-
<i>Pythium</i>	335	65,8	364	64,1	370	62,6
<i>NonhealA</i>	270	72,4	255	74,8	262	73,5
<i>NonhealB</i>	102	89,6	98	90,3	107	89,2
<i>NonhealC</i>	283	71,1	248	75,5	260	73,7

10

Uvedený příklad na použití duálního mikrobiálního preparátu uvedený v tomto příkladu provedení pro nehojící se rány na kůži není omezující. Jsou samozřejmě možné i jiné použití zde neuvedené, např. použití v jiných případech oportunních mikrobiálních infekcí doprovázených dysbiózou na kůži, jako je atopický ekzém a lupenka.

15

Příklad 3

(Obr. 5A, Obr. 5B, Obr. 5C, Obr. 6.)

- Z klinických pozorování získaných v oblasti péče o zdravou dutinu ústní, nehojící se rány a potlačení kvasinky u vaginálních kandidóz byly získány přesvědčivé důkazy, že *Pythium oligandrum* potlačuje a zabíjí patogenní kvasinky rodů *Candida* a *Malassezia*. Tento závěr byl pak nezávisle potvrzen laboratorním kultivačním testem na Mikrobiologickém ústavu AV ČR v Praze. V laboratorním testu byly zkoušeny v kompetičním testu celkem 4 klinické kmeny patogenní kvasinky *Candida albicans*, které byly izolovány v Nemocnici Pardubice, přičemž byla zjištěna jejich schopnost přecházet do hyfální formy růstu, což je důkazem klinické agresivity těchto kmenů. Jednalo se o kmeny *Candida albicans* označené 2508, 2548, 2558 a 2944. V kompetičním testu *Pythium*

25

oligandrum zcela přerostlo všechny 4 testované kmeny a to jak s použitím média MEA (malt extract agar), tak s použitím média PDA (potato dextrose agar). Po 10 dnech experimentu, tj. po skončení experimentu, byly ještě zbytky kvasinkových kmenů přerostlé pythiem přeneseny na médium CDA (Czapek-Dox agar). Na tomto médiu rostou kvasinky, ale ne *Pythium oligandrum*. Nicméně k žádnému růstu kvasinek na tomto testovacím médiu nedocházelo, což ukazuje, že *Pythium oligandrum* patogenní kvasinky nejen přerostlo, ale i zabilo. V návaznosti na tyto výsledky laboratorních zkoušek proto proběhly ve spolupráci s lékaři gynekologických ordinací v Praze, Rychnově nad Kněžnou, Vysokém Mýtě, Klášterci nad Ohří, Plzni a Uhlířských Janovicích následné systematické studie srovnávající účinky chemického antimykotika *Clotrimazolu* a přípravku *FeelFresh* u žen s opakovaným výskytem vaginálních kandidos. Na začátku testování bylo provedeno klinické hodnocení žen lékařem na šestibodové škále zahrnující nepohodlí, přítomnost vaginálního výtoku, svědění, bolesti, pálení a zarudnutí. Bylo provedeno počáteční mikrobiologické vyšetření na přítomnost patogenních kvasinek rodu *Candida* a laktobacilů, které jsou dominantními mikroorganismy normálního vaginálního mikrobiomu. Aplikace probíhaly po dobu 5 po sobě následujících dní aplikací *Clotrimazolu* nebo pomocí sedacích koupelí s přípravkem *FeelFresh*. Následně proběhla mikrobiologická kontrola po 10 dnech a 1 měsíci. Nakonec byla provedena studie závěrečná klinická a mikrobiologická kontrola po 3 měsících od aplikace. Na počátku studie byla intenzita klinických příznaků v kontrolní skupině s aplikací *Clotrimazol* a experimentální skupině s aplikací *FeelFresh* srovnatelné. Avšak, po 3 měsících byly výsledky hodnocení klinických příznaků (počet zjištěných klinických příznaků) statisticky významně lepší u skupiny aplikující *FeelFresh* ve srovnání s chemickým antimykotikem *Clotrimazole*: $2,57 \pm 0,53$ a $1,00 \pm 1,52$, $p=0,035$. Intenzitu kvasinkové infekce bylo možné sledovat kultivačně po 10 dnech, 1 měsíci a 3 měsících, tedy častěji než klinický obraz. Také výsledky v tomto ohledu byly velmi zajímavé, neboť prokázaly rychlé a statisticky významné snížení výskytu patogenních kvasinek u *Clotrimazolu* po 10 dnech, kdy počáteční hodnoty v arbitrárních jednotkách byly $3,71 \pm 0,75$ a $3,71 \pm 0,48$ pro aplikaci s *Clotrimazol* a *Feel Fresh*. Po 10 dnech však odpovídající hodnoty v arbitrárních jednotkách činily $1,28 \pm 0,48$ a $1,85 \pm 0,38$, $p=0,04$. Nicméně po 1 měsíci nebo dokonce 3 měsících se situace zcela obrátila a snížená hladina patogenních kvasinek již byla stabilizována pouze u pacientek používajících *FeelFresh*, kdy hodnoty po 1 měsíci u kontroly a aplikaci v arbitrárních jednotkách *FeelFresh* činily $2,42 \pm 0,53$ a $1,28 \pm 0,48$, $p=0,008$. Hodnoty v arbitrárních jednotkách po 3 měsících činily $3,14 \pm 0,69$ a $1,42 \pm 0,78$, $p=0,007$. Velmi zajímavá ovšem ještě byla pozitivní korelace jednak mezi zlepšením klinického stavu a koncentrací laktobacilů a jednak mezi odstraněním kvasinkové infekce a koncentrací laktobacilů. Tyto výsledky jasně ukazují, podobně jako již v předcházejících uváděných příkladech, že léčebný efekt mikroorganismu *Pythium oligandrum* obsaženého v přípravku *FeelFresh* je významně potencionován přítomností zdravé mikroflory, v tomto případě laktobacilů. Z těchto výsledků bylo možné vyvodit pracovní hypotézu, že přítomnost laktobacilů významným způsobem zvyšuje účinnost potlačení kvasinky řasovkou *P. oligandrum*.

Studie k průkazu úlohy laktobacilů probíhala dvojité zaslepeným způsobem, v němž byly obálky s preparáty připraveny a očíslovány administrativním pracovníkem nezasvěceným do průběhu studie. Po potvrzení klinické diagnózy a prvním odběru mikrobiologie podepsaly pacientky informovaný souhlas a byli instruováni, jak aplikovat přípravky. Aplikace byly prováděny formou výplachů pět dnů po sobě pomocí dodaného vaginálního aplikátoru. Odborná prohlídka gynekologem byla provedena na počátku studie, a po 3 měsících, přičemž byl vždy kontrolován stav kvasinkové infekce, stav osídlení vaginální sliznice laktobacily. Výsledky klinické studie jsou přehledně prezentovány v grafické podobě na **obr. 5A, 5B, a 5C**.

Z hlediska klinického hodnocení na počátku a na konci studie je kontrolní skupina s aplikací klasického přípravku obsahujícího pouze řasovku *Pythium oligandrum* rozkolísaná, u některých žen došlo k účinné eliminaci příznaků, avšak u jiných pacientek nikoliv, jak je zřejmé z **obr. 5A**. Proto byly pacientky rozděleny do dvou skupin klinicky rezponzivních pacientek v levé části **obr. 5** a klinicky neresponzivních pacientem v pravé části tohoto obrázku.

U klinicky rezponzivních pacientek došlo po třech měsících použití přípravku k významnému snížení výskytu kvasinky *Candida albicans* ve všech případech, zatímco u neresponzivních pacientek k takovému snížení nedocházelo (v případě jedné pacientky se dokonce objevilo zvýšení – **obr. 5B**). Zajímavý nicméně zůstává zejména fakt, že u rezponzivních pacientek byl ve všech případech výskyt laktobacilů mnohem vyšší, a v průběhu studie dokonce docházelo k jeho nárůstu na fyziologicky vysoké hodnoty (**obr. 5C**), zatímco u neresponzivních pacientek byl výskyt kvasinky významně nižší, ve dvou případech ještě doprovázený dalším poklesem.

Tyto výsledky potvrzují, že duální mikrobiální preparát pro použití na potlačení a eliminaci patogenních kvasinek vykazuje ve všech parametrech ve všech parametrech statisticky významně lepší výsledky ve srovnání se standardním preparátem.

Tuto hypotézu jsme proto ověřovali a testovali: byly připraveny celkem tři verze duálního mikrobiálního přípravku podle tohoto vynálezu pro použití v dutině ústní a byla prokázána stabilita takových přípravků a provedeno jejich klinické testování u pacientů s periodontálním onemocněním. Detailní popis získaných výsledků je uveden v Příkladu 3 tohoto vynálezu. Souhrnné výsledky tohoto testování prokázaly, že během vysušení a skladování v suchém stavu nedošlo ke vzájemnému negativnímu ovlivnění obou účinných mikrobiologických komponent. Výsledky laboratorních testů prokázaly největší účinnost pro duální přípravek VaginalB.

3. Příprava, kontrola a testování účinnosti duálního mikrobiálního preparátu podle tohoto vynálezu vhodného pro aplikaci na kůži a sliznice náchylné k výskytu patogenních kvasinek.

3.1 Protokol pro přípravu duálního mikrobiálního preparátu pro aplikaci na kůži a sliznice náchylné k výskytu kvasinek.

3.1.1 Příprava technického preparátu *Pythium oligandrum* M1 ATCC 38472.

Postup použitý pro tuto přípravu je identický s postupem uvedeným v části 1.1.1. Šarže použitá v příkladu provedení 3 měla $0,8 \times 10^6$ oospór na g a klíčivost 12,8 %, tj. obsahovala $0,102 \times 10^6$ KTJ (kolonie tvořících jednotek, ekvivalent CFU) na 1 g preparátu.

5

3.1.2 Příprava technického preparátu *Lactobacillus crispatus* CCM7010

Původní kultura *Lactobacillus crispatus* CCM7010 je po doručení ze sbírky mikroorganismů uchovávána při $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pro kultivaci je malé množství kultury nejprve přeneseno na agarovou misku s médiem pro kultivaci laktobacilů, obsahujícím v množství 5 g/l kvasničný autolyzát, 10 g/l hovězí extrakt, 10 g/l peptone, 20 g/l glukózu, 5 ml/l Tween 80, 2 g/l K_2HPO_4 , 5 g/l octan sodný, 2 g/l diamonium citrát, 0,2 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 0,05 g/l $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. pH po přidání všech komponent upravíme na hodnotu pH 6,2 – 6,6. Misky byly kultivovány při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ přes noc. Deset dobře separovaných kolonií bylo přeneseno do 2l Erlenmayerovy baňky obsahující 500 ml média 6 o výše uvedeném složení. Baktérie byly kultivovány do středu logaritmické fáze, poté byly baktérie sedimentovány centrifugací $10000 \times g_{av}$ po dobu 20 min a třikrát promyty v 0,1 M sodnocitrátovém pufru pH 6,0. Po posledním promytí byl sediment bakterií pečlivě zbaven zbytků pufru a vysušen mrazovou sublimací - lyofilizací.

15

Z 1 l kultury byl získán cca 0,8 g lyofilizovaných bakterií obsahujících 10^9 KTJ (CFU) na 1 mg prášku.

20

3.1.3 Příprava finální formulace duálního preparátu pro aplikaci na kůži a sliznice náchylné k výskytu kvasinek.

Pro přípravu finální formulace byly použity tři různé varianty přípravku lišící se vzájemně svým relativním obsahem baktérie *Lactobacillus crispatus* CCM7010, tyto tři varianty byly označeny zkratkou *VaginalA*, *VaginalB* a *VaginalC*. Přípravky byly připravovány pro použití v jednom balení obsahujícím 2 g sypkého preparátu. Složení jednotlivých přípravků je níže uvedené v **Tabulce 5** na následující straně. V přípravku jsou *Pythium* a *Lactobacillus* aktivními komponentami, silikagel se přidává jako sušidlo u důvodu uchování originálních vlastností a vzcházivosti obou aktivních komponent. Malé množství přidaného chloridu sodného napomáhá lepší aktivaci biologického prostředku, heřmánkové aroma funguje jako parfém.

30

Složka *Pythium oligandrum* je obsažena v duálním mikrobiálním preparátu *VaginalA*, *VaginalB* v množství $19,2 \cdot 10^3$ KTJ na 1 g. *VaginalC* v množství $19,2 \cdot 10^3$ KTJ na 1 g.

Složka *Lactobacillus crispatus* CCM7010 je obsažena v duálním mikrobiálním preparátu *VaginalA* v množství $0,5 \cdot 10^8$ KTJ, v preparátu *VaginalB* v množství $0,5 \cdot 10^9$ KTJ na 1 g, a v preparátu *VaginalC* v množství $0,5 \cdot 10^{10}$ KTJ na 1 g.

35

3.2 Zkouška stability duálního preparátu pro použití na kůži a sliznice náchylné k výskytu kvasinek.

Zkouška stability duálního preparátu pro použití na kůži a sliznice náchylné k výskytu kvasinek musí zjistit, zda nedošlo ke vzájemnému negativnímu působení obou mikrobiálních komponent po dobu skladování připraveného preparátu, nejméně však po dobu vykonání testů efektivity *in vitro* a *in vivo*.

- 5 Jedno balení 2 g přípravku *VaginalA*, *VaginalB* nebo *VaginalC* se resuspenduje ve 500 ml vlažné vodovodní vody při teplotě cca 35 °C. Po dokonalém resuspendování se odebere 1 ml na stanovení klíčivosti *Pythium oligandrum* a 0,1 ml na stanovení KTJ (CFU) jednotek laktobacila. Pro stanovení KTJ u laktobacila ještě vzorek ředíme desítkovou ředící řadou, a na stanovení KTJ použijeme první ředění pro *VaginalA* - ředění 100 x, druhé ředění pro *VaginalB* - ředění 10³ x a třetí ředění pro
- 10 *VaginalC* - ředění 10⁴ x. Zkouška stability se provádí ihned po smíchání přípravku a dále po 1, 2, 3, 4, 5 a 6 měsících. Výsledky typického stabilitního testu jsou uvedené na obr. 6. Z výsledku je možné uzavřít, že viabilita *Pythia* se během šesti měsíců skladování a následného použití preparátu nejprve poněkud snížila, a posléze ustálila na hodnotě odpovídající cca 80 % původně deklarované nominální hodnoty. Naopak u laktobacila došlo během zkoušeného období pouze k mírnému snížení viability asi
- 15 o 10 %. Výsledek uvedený na obr. 6 se týká preparátu označeného jako *VaginalB*. Výsledky získané s preparáty *VaginalA* a *VaginalC* byly velmi podobné a nejsou proto v grafu pro jeho větší přehlednost uvedeny.

Tabulka 5

Složení duálních preparátů pro použití na kůži a sliznice náchylné k výskytu kvasinek.				
Složení je uvedené v mg na 2 g sypkého přípravku.				
1 léčebná kúra zahrnuje 5 aplikací (5 přípravků).				
Název přípravku		<i>VaginalA</i>	<i>VaginalB</i>	<i>VaginalC</i>
Název látky	CAS No.	Obsah (mg)		
<i>Pythium oligandrum</i>	Viz. 3.1.1	376 (38,4 x 10 ³ KTJ)	376 (38,4 x 10 ³ KTJ)	376 (38,4 x 10 ³ KTJ)
<i>Lactobacillus</i>	Viz. 3.1.2	0,1 (10 ⁸ KTJ)	1 (10 ⁹ KTJ)	10 (10 ¹⁰ KTJ)
Oxid křemičitý	7631-86-9	1618.9	1618	1609
NaCl	7647-14-5	4	4	4
Heřmánk. olej	8022-66-2	1	1	1
Celkem (mg)		2000	2000	2000

20

Lze konstatovat, že vysušením původních aktivních komponent a jejich uchovávání v přítomnosti silikagelu ani jejich aktivace před použitím preparátu podle tohoto vynálezu nesnižovaly významným způsobem vzcháživost žádné z komponent duálního preparátu pro použití v ústní dutině.

25

3.3 Zkouška efektivity připravených směsí s použitím *in vitro* testu

Cílem *in vitro* efektivitních testů je prokázat, že kombinace řasovky *Pythium oligandrum* M1 ATCC38472 a zdravé bakterie normálního vaginálního mikrobiomu *Lactobacillus crispatus* CCM7010 bude působit synergním způsobem, tj. dojde ke zvýšení některé měřitelné *in vitro* aktivity řasovky *Pythium oligandrum*. Z tohoto hlediska byl zvolen standardní laboratorní test potlačení růstu patogeních kvasinek *Candida albicans* třech různých hyfy tvořících kmenů získaných z klinických isolátů v Nemocnici Pardubice a převezených pro další experimenty na MBÚ AV ČR (laboratoř Dr. Kolaříka). Vlastní provedení testu spočívalo v použití standardního aplikačního protokolu, který je vždy zahájen resuspendováním suchého přípravku s obsahem samotného *Pythia oligandrum* (přípravek *FeelFresh*), popřípadě některé z výše uvedených testovacích přípravků označených jako *Vaginal A*, *B* nebo *Vaginal C*. Přípravky byly resuspendovány v 500 ml vlažné vody o teplotě cca 35 °C, a 12,5 ml této suspenze bylo poté smícháno přímo s 12,5 ml dvakrát koncentrované, ochlazené na teplotu 45 °C směsi pro přípravu CDA (Czapek Dox agar) agarových destiček. Na takto připravené desky bylo po jejich zchladnutí aplikováno rovnoměrně 10^5 patogenních kvasinek *Candida albicans* získaných z klinických isolátů. Po týdenní kultivaci při 28 °C byl odečten počet narostlých kolonií ve srovnání s kontrolní miskou, přičemž snížení počtu kolonií oproti kontrole je měřítkem účinnosti *Pythia oligandrum*. Výsledky tohoto testu jsou uvedeny níže v **Tabulce 6**. Výsledky ukazují, že zatímco samotné *Pythium oligandrum* mělo významný vliv na potlačení růstu kvasinek na experimentálních miskách, jeho kombinace s laktobacilem produkovala další posílení účinku. V případě všech tří patogenních kvasinkových kmenů byl nejúčinnější přípravek za podmínek *in vitro* preparát *VaginalB*, přípravky ve složení označeném jako *VaginalA* a *VaginalC* dosahovaly zhruba kolem 50 % této účinnosti.

Vzhledem k náročnosti klinických zkoušek prováděných s velkým množstvím preparátů byl jako přípravek pro další preklinické a klinické zkoušky vybrán nejúčinnější duální mikrobiální preparát *VaginalB*.

Tabulka 6

Testování duálních mikrobiálních preparátů pro potlačení kvasinek v <i>in vitro</i> testu						
	<i>C. albicans</i> 2944		<i>C. albicans</i> 2548		<i>C. albicans</i> 2508	
	Počet kolonií na misce	Relativní účinnost oproti kontrole	Počet kolonií na misce	Relativní účinnost oproti kontrole	Počet kolonií na misce	Relativní účinnost oproti kontrole
Kontrola	1013	-	998	-	1120	-
<i>Pythium</i>	302	70,2	325	67,4	332	70,3
<i>VaginalA</i>	272	73,1	265	73,4	273	75,6
<i>VaginalB</i>	102	89,9	103	89,5	89	86,7
<i>VaginalC</i>	273	73,1	273	72,6	267	76,2

Příklad 4

(Obr. 7)

Významná pozitivní korelace mezi přítomností kvasinek a zlepšením klinického stavu infekce u nehojících se ran se projevila stejně u diabetických jako u nediabetických pacientů. Příslušné korelační koeficienty činily 0,4 a 1,0. Tato korelace vedla k úvaze, zda přítomnost kvasinek nebo jejich komponent nemůže způsobovat aktivaci mikroorganismu *Pythium oligandrum*. Vzhledem k tomu, že biologické testy obsahující současně tři různé mikroorganismy jsou z hlediska svého provedení a vyhodnocení velmi složité, byla zvolena varianta zahrnutí mrtvých pekařských kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* ve formě tzv. kvasničného autolyzátu, který je běžně komerčně dostupný. Pomocí standardního destičkového testu na MEA agaru. Jeho složení bylo: 20g/L sladový extrakt, 20 g/L glukóza, 1 g/L pepton, 20 g/L agar. Byla sledována interakce řasovky *Pythium oligandrum* s dermatofyty *Trichophyton interdigitale* DMF2477 a *Microsporum fulvum* P245, u nichž bylo již dříve vyzkoušeno, že potlačují růst těchto dermatofytů asi na 50 % neinhibovaného růstu. Po přidání kvasničného extraktu v koncentraci 1 g/L do agarového nosiče však opravdu došlo k aktivaci *Pythia* spojené se zvýšením inhibice růstu na 75 % u trichophytona a 80 % u microspora. Také tento výsledek tedy prokázal, jak je výsledek biologické schopnosti *Pythia* potlačovat některé dermatofyty závislý na jeho fyziologickém stavu, přičemž může být jeho biologická schopnost významně zvýšena přítomností dokonce i usmrcených cílových organismů nebo jejich další formou zpracovaných komponent a extraktů, v tomto případě komerčního kvasničného autolyzátu. Z těchto výsledků bylo možné vyvodit pracovní hypotézu, že dokonce i usmrcené kvasinky mají vliv na zvýšení účinnosti řasovky *Pythium oligandrum*.

Optimální duální přípravek pro eliminaci původců mykóz (dermatofytóz) byl zkoušen u pacientů s mykotickým onemocněním nohou zahrnujícím dermatofytální infekce na ploskách, v mezíprstí a za nehty - onychomykózy. Léčebný efekt byl hodnocen klinicky kožními lékaři a zároveň byly na počátku a na konci sledovaného období prováděné mikrobiologické testy. Pacienti byli randomizováni do 2 skupin. V první skupině probíhala léčba jednosložkovým přípravkem s obsahem řasovky *P. oligandrum*, ve druhé skupině byl podán kombinovaný preparát s obsahem kvasničného autolyzátu. Výsledky prokázaly dobrou klinickou účinnost již u preparátu obsahujícího pouze *P. oligandrum*, u duálního mikrobiálního preparátu však byla klinická účinnost ještě zlepšena (kontrola $3,0 \pm 0$, experiment $3,6 \pm 0,5$, t-test, $p=0,01$). Podobně tomu bylo i u zlepšení mikrobiologie dle Obr. 9C (kontrola $2,0 \pm 0$, experiment $2,6 \pm 0,5$, t-test, $p=0,01$).

Tyto výsledky potvrzují, že duální mikrobiální preparát podle tohoto vynálezu pro použití na mykózy nohou vykazuje statisticky významně lepší výsledky ve srovnání se standardním monopreparátem.

Celkem u 25 morčat domácích typu *Cavia porcellus* proběhla studie sledující účinky jednosložkového přípravku obsahující řasovku *P. oligandrum*. Efekt přípravku byl hodnocen veterinárními lékaři a zároveň potvrzen odběrem mikrobiologických vzorků vždy na počátku a na

konci sledovaného období, kde byl po ukončení pokusu u všech jedinců negativní na přítomnost dermatofytních plísní a kvasinek. Celkové skóre klinického hodnocení účinků přípravku bylo $1,72 \pm 0,87$, $p < 0,05$, při známce 1 – výborný efekt až ke známce 4 – bez efektu. Mnohokrát vědci popsaná zoonotická charakteristika dermatofytických infekcí nám zaručuje, že mechanismus těchto infekcí u zvířat je totožný s mykotickými infekcemi u lidí. Vzhledem k náročnosti klinických zkoušek a k faktu, že výsledky získané při hodnocení efektivity jednosložkového preparátu je shodovaly v porovnání testovaných humánních i zvířecích skupin, pro další ověření efektivity duálního preparátu je možné odkázat se na bod 4.3.

Obě série výše provedených experimentů prokázala potencující vliv kvasinek nebo produktů jejich metabolismu na účinnost přípravků obsahujících *P. oligandrum* při eliminaci původců dermatofytóz. Tento potencující účinek mohl být způsobován aktivací živými kvasinkami nebo aktivací jejich metabolity bez bezprostředního požadavku výskytu živých kvasinek. Systematickým výzkumem se jevila poslední možnost jako pravděpodobnější a byla tedy vyslovena hypotéza, že *P. oligandrum* je ve své schopnosti eliminovat dermatofyty povzbuzováno určitými komponentami souvisejícími s kvasinkovým metabolismem.

Tato pracovní hypotéza byla proto testována: byly připraveny celkem tři verze duálního mikrobiálního přípravku podle tohoto vynálezu pro použití na mykózy nohou a byla prokázána stabilita takových přípravků a provedeno jejich klinické testování u pacientů s tímto onemocněním. Detailní popis získaných výsledků je uveden v Příkladu 4 tohoto vynálezu. Souhrnně výsledky tohoto testování prokázaly, že ve srovnání s živou variantou duálních mikrobiálních preparátů musí být usmrcený, neživý partnerský mikroorganismus resp. jeho komponenty přidávány v relativně velkém množství, v případě testovaného kvasničného autolyzátu se osvědčilo přidání do cca 10 hmotn. %. U takto připraveného preparátu pak opravdu docházelo ke statisticky významnému zvýšení účinnosti oproti klasickému jednosložkovému přípravku. Toto zvýšení bylo ekvivalentní zvýšení pozorovanému v případě, že se vyskytla kvasinková infekce endogenně v důsledku přirozeně se vyskytující koinfekce, k níž dochází cca ve 20 % případů.

4. Příprava, kontrola a testování účinnosti duálního mikrobiálního preparátu podle tohoto vynálezu vhodného pro aplikaci v případě mykóz nohou včetně onychomykóz u lidí a dermatofytóz u zvířat.

4.1 Protokol pro přípravu duálního preparátu pro použití u mykóz lidí a zvířat.

4.1.1 Příprava technického preparátu *Pythium oligandrum* M1 ATCC 38472. Postup použitý pro tuto přípravu je identický s postupem uvedeným v části 1.1.1. Šarže použité v příkladu provedení 4 měla $1,3 \times 10^6$ oospór na g a klíčivost 14.5 %, tj. obsahovala $0,189 \times 10^6$ KTJ (kolonie tvořících jednotek, ekvivalent CFU) na 1 g preparátu.

4.1.2 Kvasničný autolyzát, představující druhou komponentu tohoto preparátu, byl zakoupen u firmy Oxoid.

4.1.3 Příprava finální formulace duálního preparátu pro aplikaci u mykóz

5 Pro přípravu finální formulace byly použity tři různé varianty přípravku lišící se vzájemně svým relativním obsahem kvasničného autolyzátu, tyto tři varianty byly označeny zkratkou *MycosinA*, *MycosinB* a *MycosinC*. Přípravky byly připravovány pro zalisování do šumivé tablety o celkové váze 3 g, proto jsou jednotlivé receptury přepočteny na tuto hmotnost. Složení jednotlivých přípravků je níže uvedené v **Tabulce 7**.

10 Složka *Pythium oligandrum* je obsažena v duálním mikrobiálním preparátu *MycosinA*, *MycosinB* a *MycosinC* v množství $12,6 \cdot 10^3$ KTJ na 1 g.

Složka *kvasničného autolyzátu* je obsažena v duálním mikrobiálním preparátu *MycosinA* v množství 50 mg na 3g tabletu, tj. v množství 1,66 % hmotn. na jednu tabletu; v preparátu *MycosinB* v množství 100 mg na 3g tabletu, t.j. 3,33 % na 3 g tabletu; a 5 % hmotn. na jednu 3g tabletu.

Tabulka 7

Složení duálních preparátů pro použití u mykóz a dermatofytóz.				
Složení je uvedené v mg na 3 g tabletu.				
1 léčebná kúra zahrnuje 3 aplikace (3 tablety).				
Název přípravku		<i>MycosinA</i>	<i>MycosinB</i>	<i>MycosinC</i>
Název látky	CAS No.	Obsah (mg)		
<i>Pythium oligandrum</i>	Viz. 4.1.1	200 ($37,8 \times 10^3$ KTJ)	200 ($37,8 \times 10^3$ KTJ)	200 ($37,8 \times 10^3$ KTJ)
Kvasnič.autolyz.	Viz. 4.1.2	50	100	150
Oxid křemičitý	7631-86-9	110	60	10
Sorbitol	50-70-4	1260	1260	1260
Kyselina citrónová	77-92-9	690	690	690
NaHCO ₃	144-55-8	540	540	540
PEG 6000	25322-68-3	90	90	90
Na ₂ CO ₃	497-19-8	60	60	60
Celkem (mg)		3000	3000	3000

4.2 Zkouška stability duálního preparátu vhodného pro aplikaci v případě mykóz a dermatofytóz

Zkouška stability nebyla pro daný preparát prováděna, jelikož je z literárních údajů dobře známo, že přítomnost kvasničného autolyzátu ve vysušeném preparátu neovlivňuje vlastnosti řasovky *P. oligandrum*.

5

4.3 Zkouška efektivity připravených směsí s použitím *in vitro* testu

Cílem *in vitro* efektivitních testů je prokázat, že kombinace řasovky *Pythium oligandrum* M1 ATCC38472 a komponent usmrčených kvasinek obsažených v kvasničném autolyzátu budou působit synergním způsobem, tj. dojde ke zvýšení některé měřitelné *in vitro* aktivity řasovky *Pythium oligandrum*. Z tohoto hlediska byl zvolen standardní laboratorní test potlačení růstu čtyř druhů dermatofytů, o nichž je prokázáno, že jsou známými původci mykotických onemocnění zoonotického charakteru. Konkrétně byly testy provedeny s použitím čtyř běžných dermatofytů, od každého z nich byly použity dva různé kmeny: a to *Trichophyton interdigitale* (Ti), *Trichophyton erinacei* (Te), *Microsporum fulvum* (Mf) a *Microsporum canis* (Mc). Výsledky stanovení aktivit jednotlivých přípravků jsou uvedeny na obr. 8, přičemž počet narostlých kolonií dermatofytů je vztažen ke kontrole bez účinné látky. Výsledky ukázané na obr. 8 se týkají přípravku *MycosinB*, výsledky získané s přípravky *MycosinA* a *MycosinC* byly kvalitativně obdobné, ale výsledná schopnost potlačit dermatofyty dosahovala pouze asi 30 % nárůstu na kontrole. Výsledek na **obr. 7** jasně prokazuje, že schopnost potlačovat dermatofyty má jednoduchý přípravek obsahující pouze *P. oligandrum* jako účinnou látku, bylo dosaženo potlačení na úrovni 50 – 60 % kontrolního nárůstu. Samotný kvasničný autolyzát v použitém testu žádné schopnosti potlačit růst dermatofytů neměl, výsledky byly zhruba na úrovni kontrolního experimentu. U duálního preparátu bylo prokázáno statisticky významné zvýšení účinnosti zhruba na úroveň 10 % infekce u kontrolních vzorků.

Vzhledem k náročnosti klinických zkoušek prováděných s velkým množstvím preparátů podle tohoto vynálezu je jako přípravek pro preklinické a klinické zkoušky navrhován nejúčinnější přípravek *Mycosin B*.

25

Příklad 5

Také aktivace jiných unikátních schopností mikroskopické řasovky *Pythium oligandrum* komponentami zdravé mikroflóry stojí za zaznamenání. V našich předcházejících studiích byla prokázána unikátní schopnost technické látky *Pythium oligandrum* rozrušovat biofilmy tvořené patogenními bakteriemi osídlujícími nehojící se rány. Výsledky studie byly předneseny na XII. celostátním kongresu s mezinárodní účastí na téma „Mezioborová spolupráce při léčbě ran a kožních defektů“ konaném ve dnech 23. a 24. ledna 2014 na fakultě zdravotnických studií Univerzity Pardubice. Provedená měření prokázala, že ze 160 zkoušených bakteriálních kmenů klinicky izolovaných z nehojících se ran jich 129 tvořilo biofilm. Dále bylo prokázáno 70 % snížení tvorby

35

biofilmu u biofilm-pozitivních kmenů po přidání zárodků řasovky *Pythium oligandrum* přípravkem *Biomycosin*, z tohoto počtu bylo u 43 % testovaných kmenů zjištěné snížení biofilmu velmi výrazné, došlo ke snížení aktivity tvorby biofilmu o více než 50 %. U 17 % vyšetřovaných kmenů nebyla *in vitro* zaznamenána žádná změna v intenzitě tvorby biofilmu, u zbývajících 13 % sledovaných kmenů nebyly získány reprodukovatelné výsledky. Nejméně se *in vitro* dařilo ovlivnit produkci biofilmů v případě sledovaných kmenů *Stenotrophomonas maltophilia* a *Pseudomonas aeruginosa*. Pokud však byly do inkubačních směsí přidány kromě zárodků řasovky též bakterie normálního kožního mikrobiomu *Staphylococcus epidermidis*, došlo ke snížení tvorby biofilmů o více než 50 % i u dvou výše zmíněných obtížných kmenů. Tento zajímavý jev společně s poznatky již publikovanými [32], společně prokazují, že komponenty normálního fyziologického mikrobiomu se mohou kromě svých metabolických regulačních funkcí též podílet na snížení intenzity biofilmu tvořícího se s účastí patogenních mikroorganismů.

Cílem *in vitro* efektivitních testů je prokázat, že kombinace řasovky *Pythium oligandrum* M1 ATCC38472 a zdravé bakterie normálního kožního mikrobiomu bude působit synergním způsobem, tj. dojde ke zvýšení některé měřitelné *in vitro* aktivity řasovky *Pythium oligandrum*. Dalším velmi důležitým faktorem, který je třeba ověřit, je specifita takového působení. V předcházejících experimentech byly v probiotických preparátech často aplikovány komponenty fyziologického mikrobiomu, ovšem bez zachování topologické specifity. Účinnost takto podaných preparátů byla většinou velmi nízká, což dobře koreluje s odlišným mikrobiálním složením fyziologických mikrobiomů v topologicky odlišných lokalitách lidského těla s různou expozicí vnějšímu prostředí i různými metabolickými níché. Jednoduchý laboratorní test tvorby biofilmů byl tedy použit pro ověření této hypotézy, jak je popsáno v tomto příkladu provedení. Tvorba biofilmu byla měřena na základě absorbce modrého mikrobiálního barviva znázorňujícího intenzitu tvorby biofilmu, přičemž každý experiment byl prováděn třikrát nezávisle v triplicátu [38]. Pro průkaz ovlivnění životaschopnosti mikroorganismů obsažených v biofilmech byla ještě tato životaschopnost také měřena testem vitálního barvení podle literární citace [39].

Výsledky těchto stanovení prováděných jednak s preparáty obsahujícími pouze mikroskopickou řasovku *P. oligandrum* podle vynálezu CZ 302 297 B2, jednak s optimalizovanými duálními mikrobiálními preparáty popsanými v příkladech provedení 1, 2 a 3 dle předkládaného vynálezu jednoznačně prokázaly, že k optimálnímu rozrušení biofilmů docházelo vždy pouze v případě duálních preparátů obsahujících fyziologickou mikrobiální komponentu obsaženou v mikrobiomu relevantní topologie. Biofilmy dutiny ústní tedy byly neúčinněji rozrušovány duálním mikrobiálním preparátem obsahující dominantní fyziologický mikrob této lokalizace, zatímco efekt jiných fyziologických komponent byl minoritní. Podobné důkazy o specifitě pak byly prokázány i v případě kožního a vaginálního mikrobiomu.

Takto získané výsledky jsou velmi významné, protože ukazují, že neexistuje univerzální probiotický ani duální mikrobiální preparát vhodný pro dlouhodobé potlačení symptomů oportunních

mikrobiálních infekcí, ale účinný je vždy pouze preparát s obsahem topologicky relevantní mikrobiální komponenty.

Tabulka 8.

Vliv duálních mikrobiálních přípravků podle patentu CZ 302 297 B2 a podle tohoto vynálezu na tvorbu a aktivitu mikrobiálních společenstev tvořících biofilm v dutině ústní (konkrétně sledována tvorba biofilmu pro bakterie <i>Streptococcus gordonii</i> a <i>Fusobacterium nucleatum</i>).		
<i>Použitý preparát</i>	<i>Tvorba biofilmu (A_{590}) *</i>	<i>Aktivita biofilmu (A_{490}) *</i>
Kontrola	$1,05 \pm 0,15$	$0,90 \pm 0,04$
Chytrá Houba Pythie BioPlus	$0,69 \pm 0,10$	$0,57 \pm 0,04$
Plaque B	$0,12 \pm 0,08$	$0,10 \pm 0,01$
Biomycosin	$0,70 \pm 0,11$	$0,56 \pm 0,03$
Nonheal B	$0,72 \pm 0,10$	$0,53 \pm 0,04$
Feel Fresh	$0,50 \pm 0,08$	$0,45 \pm 0,03$
Vaginal B	$0,51 \pm 0,07$	$0,44 \pm 0,04$

- 5 * Je uvedena průměrná hodnota absorbance $\pm$ směrodatná odchylka vypočtená ze třech nezávislých stanovení, z nichž každé bylo provedeno v triplicátu (tři nezávislá měření).

5.1 Vliv duálních mikrobiálních preparátů na rozrušení biofilmů obsahujících bakterie dutiny ústní.

- V tomto testu byly použity jednoduché laboratorní testy tvorby a viability biofilmů používající jako sledované komponenty dvě bakterie dutiny ústní, *Streptococcus gordonii* a *Fusobacterium nucleatum*. Obě tyto bakterie mají při tvorbě mikrobiálních biofilmů dutiny ústní klíčovou úlohu: *Streptococcus* je totiž jedinou bakterií schopnou se zachytit přímo na zubní sklovině v agresivním prostředí dutiny ústní, zatímco svým rozměrem veliké bakterie rodu *Fusobacterium* tvoří důležitá záchytná centra pro kolonizaci bakteriemi oranžového a červeného komplexu a invazivními patogeny typu *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Výsledky laboratorního testu jsou uvedené v **Tabulce 8** na předcházející straně. Výsledky jasně ukazují, že zatímco u jednoduchého preparátu obsahujícího pouze řasovku *P. oligandrum* docházelo pouze k menšímu ovlivnění biofilmu, k velmi výraznému rozrušení i omezení viability orálního biofilmu došlo pouze pomocí duálního preparátu *PlaqueB*. Poněkud významnější rozrušení biofilmu způsobené přípravkem *FeelFresh* a *VaginalB* lze přičítat vyššímu procentuálnímu obsahu pythia v tomto přípravku.

5.2 Vliv duálních mikrobiálních preparátů na rozrušení biofilmů obsahujících bakterie nehojících se ran.

- V tomto testu byly použity jednoduché laboratorní testy tvorby a viability biofilmů používající jako sledované komponenty dvě bakterie tvořící biofilmy v nehojících se ranách, totiž *Stenotrophomonas maltophilia* a *Pseudomonas aeruginosa*. Tyto bakterie byly použity z toho důvodu,

- že v předcházejících testech prováděných Dr. Karlem Menclem na Oddělení klinické mikrobiologie Nemocnice Pardubice byly tyto dva kmeny odolné na rozrušení biofilmu pomocí jednoduchých preparátů používajících pouze řasovku *Pythium oligandrum*. Výsledky uvedené v **Tabulce 9** ovšem jasně ukazují, že duální mikrobiální preparát určený pro zlepšení klinické infekce u nehojících se ran a obsahující normální komponentu kožního mikrobiomu *Staphylococcus epidermidis* byl schopen tento nedostatek účinně překonat a zajistit účinné rozrušení biofilmu u těchto odolných druhů. Určitý menší vliv zaznamenal i preparát *VaginalB* obsahující laktobacily, u nichž byla taková aktivita popsána [33].

Tabulka 9

Vliv duálních mikrobiálních přípravků podle patentu CZ 302 297 B2 a podle tohoto vynálezu a aktivitu mikrobiálních společenstev tvořících biofilm v nehojících se ranách (konkrétně sledována tvorba biofilmu pro bakterie <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> a <i>Pseudomonas aeruginosa</i>).		
<i>Použitý preparát</i>	<i>Tvorba biofilmu (A_{590}) *</i>	<i>Aktivita biofilmu (A_{490}) *</i>
Kontrola	$1,10 \pm 0,25$	$0,86 \pm 0,05$
Chytrá Houba Pythie BioPlus	$0,70 \pm 0,08$	$0,58 \pm 0,03$
Plaque B	$0,68 \pm 0,07$	$0,56 \pm 0,04$
Biomycosin	$0,60 \pm 0,10$	$0,50 \pm 0,03$
Nonheal B	$0,13 \pm 0,07$	$0,10 \pm 0,01$
Feel Fresh	$0,50 \pm 0,08$	$0,44 \pm 0,04$
Vaginal B	$0,31 \pm 0,07$	$0,25 \pm 0,02$

- * Je uvedena průměrná hodnota absorbance $\pm$ směrodatná odchylka vypočtená ze třech nezávislých stanovení, z nichž každé bylo provedeno v triplicátu (tři nezávislá měření).

Tabulka 10

Vliv duálních mikrobiálních přípravků podle patentu CZ 302 297 B2 a podle tohoto vynálezu na tvorbu a aktivitu mikrobiálních společenstev tvořících biofilm v místech náchylných ke kvasinkovým infekcím (konkrétně sledována tvorba biofilmu pro patogenní kvasinku <i>Candida albicans</i>).		
<i>Použitý preparát</i>	<i>Tvorba biofilmu (A_{590}) *</i>	<i>Aktivita biofilmu (A_{490}) *</i>
Kontrola	$1,08 \pm 0,20$	$0,96 \pm 0,05$
Chytrá Houba Pythie BioPlus	$0,72 \pm 0,09$	$0,56 \pm 0,04$
Plaque B	$0,70 \pm 0,08$	$0,55 \pm 0,05$
Biomycosin	$0,70 \pm 0,10$	$0,54 \pm 0,02$
Nonheal B	$0,68 \pm 0,07$	$0,53 \pm 0,02$
Feel Fresh	$0,50 \pm 0,07$	$0,44 \pm 0,01$
Vaginal B	$0,07 \pm 0,02$	$0,06 \pm 0,01$

* Je uvedena průměrná hodnota absorbance $\pm$ směrodatná odchylka vypočtená ze třech nezávislých stanovení, z nichž každé bylo provedeno v triplicátu (tři nezávislá měření).

5.1 Vliv duálních mikrobiálních preparátů na rozrušení biofilmů tvořených patogenními kvasinkami

- 5 V tomto testu byly použity jednoduché laboratorní testy tvorby a viability biofilmů používající jako sledovanou komponentu kvasinku *Candida albicans*. K nejúčinnějšímu rozrušení tohoto biofilmu docházelo pomocí duálního mikrobiálního preparátu *VaginalB*, jak je evidentní z výsledků uvedených v **Tabulce 10** výše. Tyto poznatky mohou mít obecný význam, protože patogenní kvasinka *Candida albicans* často tvoří kombinované mikrobiální biofilmy v kombinaci s některými druhy patogenních
- 10 bakterií.

Příklad 6

(Obr. 8)

- Velkou předností duálních mikrobiálních preparátů podle předkládaného vynálezu je možnost jejich preventivního použití, k čemuž je možno využít až desetinásobně nižších hodnot aktivních komponent na základě možnosti účinné kolonizace a dlouhodobé propagace na místě určení. Účinného mykoparazitismu řasovky *P. oligandrum* a antifungálního působení některých jiných mikrobiálních kmenů je ovšem možné použít též k ochraně životního a pracovního prostředí před plísněmi. V lékařské literatuře je dobře popsáno, že plísně nacházející se v životním a pracovním prostředí
- 15 mohou vystřelovat škodlivé spóry do svého okolí. Jestliže jejich průměrná koncentrace ve vzduchu přesáhne hodnotu 500 životaschopných spór na 1 m³, mohou se podle standardů Světové zdravotnické organizace (WHO) již plně projevit škodlivé vlivy vedoucí k alergiím, respiračním onemocněním nebo dokonce depresím.

- Na základě vynálezu CZ 302 297 B2 byl vyvinut a je úspěšně používán protiplísňový prostředek BioRepel obsahující *P. oligandrum* sloužící zejména k eliminaci plísní ze zdí, stropů, podlah a jiných prostor zamořených místností. Současně jsou k tomuto účelu používány jiné mikrobiální preparáty schopné eliminovat plísně na základě principu antibiomy využívající k těmto účelům zejména hojně rozšířený bacil *Bacillus amyloliquefaciens*.
- 25

- Efektivita duálního preparátu pro eliminaci plísní a kvasinek z životního prostředí založeného na kombinaci dvou výše uvedených mikroorganismů se testuje v terénních experimentech za podmínek jejich faktického použití. Experimentálním objektem je například stěna ve vlhké místnosti s rovnoměrným výskytem černé plísně *Aspergillus niger*, přičemž před aplikací a 6 měsíců po aplikaci měříme koncentraci spór v místnosti a kvantitativně se vyhodnocuje též přítomnost plísně přímo ve stěrech z materiálu odebraného ze stěn standardním způsobem. Pro aplikaci se 3 g preparátu rozdělí do dvou sáčků, sáček A obsahuje 1 g přípravku a sáček B obsahuje 2 g přípravku. Sáček A se resuspenduje v 10 l vlažné vody a veškerá zasažená plocha se přetře houbičkou namočenou do tohoto
- 30
- 35 přípravku. Po zavadnutí se ještě stejná oblast přetře houbičkou navlhčenou do roztoku B, který se

přípravý resuspendováním sáčku B v 1.5 l vlažné vody. Odběry na zjištění efektivity jsou prováděny po 1 měsíci, 3 měsících a 6 měsících, kdy je terénní pokus ukončen. Jako efektivní je přípravek hodnocen v případě, kdy se množství spór ve spadu sníží na méně než 500 (WHO norma) a přítomnost plísně zjišťovaná stěrovou zkouškou sníží na stupeň 1 (přítomná sporadicky pouze po kultivaci).

- 5 Konkrétní výsledek terénních experimentů ve dvou různých lokalitách je znázorněn na **Obr. 8**. Je zřetelné, že v obou sledovaných lokalitách po 6 měsících po aplikaci došlo k požadovanému snížení koncentrace spór v ovzduší na hodnotu pod 500 pouze při použití duálního preparátu, ačkoliv obě jeho komponenty vykazovaly jisté snížení oproti kontrole (**Obr. 8A**). Podobně pouze duální preparát snížil faktický výskyt plísní na zdi prokazovaný stěrovou zkouškou na cílovou hodnotu kolem 1,0. I v tomto
10 případě byl efekt jednotlivých preparátů pouze částečný a nebylo dosaženo cílové hodnoty (Obr. 8B).

Tyto výsledky potvrzují hypotézu, že duální mikrobiální preparát pro eliminaci plísní a kvasinek z životního prostředí vykazuje lepší výsledky než standardní preparát.

- Tato hypotéza byla námi dále systematicky testována a ověřována. V rámci tohoto ověření jsme připravili dle postupů popsanych v tomto příkladu provedení tři různé varianty kombinovaného
15 preparátu a jejich účinnost vůči cílovým plísním jsme ověřovali za podmínek *in vitro*.

5. Příprava, kontrola a testování účinnosti duálního mikrobiálního preparátu vhodného pro eliminaci plísní a kvasinek z životního prostředí.

- 20 6.1 Protokol pro přípravu duálního preparátu pro použití na nehojící se rány nediabetiků.

6.1.1. Příprava technického preparátu *Pythium oligandrum* M1 ATCC 38472.

- Postup použitý pro tuto přípravu je identický s postupem uvedeným v části 1.1.1. Šarže použita v příkladu provedení 6 měla $1,0 \times 10^6$ oospór na g a klíčivost 12,6 %, tj. obsahovala $0,126 \times 10^6$ KTJ (kolonie tvořících jednotek, ekvivalent CFU) na 1 g preparátu.
25

6.1.2. Příprava technického preparátu *Bacillus amyloliquefaciens* CCM1084

- Původní kultura *Bacillus amyloliquefaciens* CCM1084 je po doručení ze sbírky mikroorganismů uchovávána při -70°C . Pro kultivaci je malé množství kultury nejprve přeneseno na
30 miskou s agarem a médiem 10 pro kultivaci bacilů o složení peptone, 5 g/l, hovězí extrakt, 3 g/l, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.01 g/l, pH média upraveno na 7.0. Misky byly kultivovány při 37°C přes noc. Deset dobře separovaných kolonií bylo přeneseno do dvou 2l Erlenmayerovy baňky obsahující 500 ml média 10 výše uvedeného složení. Baktérie byly kultivovány do středu logaritmické fáze, poté byly baktérie sedimentovány centrifugací ($10000 \times g_{\text{av}}$, 20 min) a třikrát promyty v 0.1 M sodnocitrátovém pufru pH
35 6.0. Po posledním promytí byl sediment baktérií pečlivě zbaven zbytků pufru a vysušen mrazovou sublimací (lyofilizací).

Z 1 l kultury byl získán cca 0.6 g lyofilizovaných bakterií obsahujících 10^8 KTJ (CFU) na 1 mg prášku.

6.1.3. Příprava finální formulace duálního preparátu pro použití pro eliminaci plísní a kvasinek z životního prostředí.

Pro přípravu finální formulace byly použity tři různé varianty přípravku lišící se vzájemně svým relativním obsahem bakterie *Bacillus amyloliquefaciens* CCM1084, tyto tři varianty byly označeny zkratkou MouldA, MouldB a MouldC. Přípravky byly připravovány pro použití v jednom balení obsahujícím 3 g sypkého preparátu (jde o sáček A obsahující 1 g a sáček B obsahující 2 g sypkého preparátu). Složení jednotlivých přípravků je níže uvedené v **Tabulce 11**.

Tabulka 11

Složení duálních preparátů pro eliminaci plísní a kvasinek z životního prostředí. Složení je uvedené v mg na 3 g sypkého přípravku.				
Název přípravku		Mould A	MouldB	MouldC
Název látky	CAS No.	Obsah (mg)		
Pythium	Viz. 1.1.1	750 ($94,5 \times 10^3$ KTJ)	750 ($94,5 \times 10^3$ KTJ)	750 ($94,5 \times 10^4$ KTJ)
Bacilus	Viz. 1.1.2	0,1 (10^7 KTJ)	1 (10^8 KTJ)	10 (10^9 KTJ)
Silikagel	7631-86-9	2499,9	2499	2490
Celkem		3000	3000	3000

6.2 Zkouška stabilit duálního preparátu pro eliminaci plísní a kvasinek z životního prostředí

Zkouška stability duálního preparátu pro použití v dutině ústní musí zjistit, zda nedošlo ke vzájemnému negativnímu působení obou mikrobiálních komponent po dobu skladování připraveného preparátu, nejméně však po dobu vykonání testů efektivity *in vitro* a *in vivo*. Jedno balení (3 g) přípravku MouldA, MouldB nebo MouldC se resuspenduje v 10000 ml vlažné vody (teplota cca 35 °C). Po dokonalém resuspendování se odebere 10 ml na stanovení klíčivosti Pythia a 1 ml na stanovení KTJ (CFU) jednotek bacila. Pro stanovení KTJ u bacila ještě vzorek ředíme desítkovou ředící řadou, a na stanovení KTJ použijeme neředěný preparát pro MouldA (ředění 1 x), první ředění pro MouldB (ředění 10 x) a druhé ředění pro MouldC (ředění 10^2 x). Zkouška stability se provádí ihned po výrobě přípravku, a dále po 1, 2, 3, 4, 5 a 6 měsících. Z výsledku je možné uzavřít, že viabilita Pythia se během šesti měsíců skladování a následného použití preparátu nejprve poněkud snížila, a posléze ustálila na hodnotě odpovídající cca 75 % původně deklarované nominální hodnoty. Naopak u bacila nedocházelo během zkoušeného období k význačným změnám ve vzcházivosti, která odpovídala téměř původně deklarované hodnotě.

Lze tedy uzavřít, že vysušením původních aktivních komponent a jejich uchovávání v přítomnosti silikagelu významným způsobem vzchází z žádné z komponent duálního preparátu.

6.3 Zkouška efektivity připravených směsí s použitím *in vitro* testu

- 5 Cílem *in vitro* efektivitních testů je prokázat, že kombinace řasovky *Pythium oligandrum* M1 ATCC38472 a zdravé bakterie normálního kožního mikrobiomu *Staphylococcus epidermidis* CCM2124 bude působit synergním způsobem, tj. dojde ke zvýšení některé měřitelné *in vitro* aktivity řasovky *Pythium oligandrum*. Z tohoto hlediska byl zvolen standardní laboratorní test potlačení růstu kontaminující plísňe na stěnách *Aspergillus niger*. Vlastní provedení testu spočívalo v použití standardního aplikačního protokolu, který je vždy zahájen resuspendováním suchého přípravku s obsahem samotného pythia (přípravek BioRepel), popřípadě některé z výše uvedených testovacích přípravků označených jako MouldA, B nebo C. Přípravky byly resuspendovány v 250 ml vlažného (cca 35 °C) fyziologického roztoku, a 12,5 ml této suspenze bylo poté smícháno přímo s 12,5 ml dvakrát koncentrované směsi pro přípravu MEA agarových destiček. Na takto připravené desky bylo po jejich zchladnutí aplikováno rovnoměrně 10^5 plísňových mikrokonidií plísňe *Aspergillus niger*. Po týdenní kultivaci při 28 °C byl odečten počet narostlých kolonií ve srovnání s kontrolní miskou, přičemž snížení počtu kolonií oproti kontrole je měřítkem účinnosti pythia. Výsledky tohoto testu jsou uvedeny níže v **Tabulce 12**. Výsledky ukazují, že zatímco samotné pythium mělo významný vliv na potlačení růstu kvasinek na experimentálních miskách, jeho kombinace se staphylokokem produkovala další posílení účinku. V případě všech tří patogenních kvasinkových kmenů byl nejúčinnější přípravek za podmínek *in vitro* preparát MouldB, přípravky ve složení označeném jako MouldA a MouldC dosahovaly zhruba kolem 50 % této účinnosti. Vzhledem k náročnosti terénních testů je pro další terénní zkoušky navrhován nejúčinnější přípravek MouldB.

25 Tabulka 12

Testování duálních preparátů pro eliminaci plísni a kvasinek z prostředí						
	<i>Aspergillus niger</i>		<i>Aspergillus niger</i>		<i>Aspergillus niger</i>	
	Počet	Rel.účín.	Počet	Rel.účín.	Počet	Rel.účín.
Kontrola	1054	-	1064	-	1110	-
Pythium	340	67,7	350	67,1	352	68,2
MouldA	287	72,8	280	73,7	273	75,4
MouldB	105	90,0	85	92,0	80	92,8
MouldC	289	72,5	283	73,4	270	75,7

Uvedený příklad na použití duálního mikrobiálního preparátu uvedený v tomto příkladu provedení pro eliminaci plísni nebo kvasinek z okolního prostředí není omezující. Tento typ duálního mikrobiálního preparátu může být výhodně použit jako prevence výskytu plísni a kvasinek

v životním a pracovním prostředí, což může být pro osoby trpící oportunistickými mikrobiálními infekcemi důležité.

5 **Průmyslová využitelnost**

Řešení je určeno pro aplikace pro zdravou dutinu ústní, nehojící se rány jako jsou bércové vředy, na kůži a pro potlačení kvasinek vyskytujících se na výše uvedených místech a na sliznici urogenitálního traktu, i pro jiná místa lidského těla, zejména potom na kůži napadené plísňovými nebo kvasinkovými infekcemi.

10

15

20

25

30

35

Citovaná literatura

- [1] Aas JA, Paster BJ, Stokes LN a spol (2005) J Clin Microbiol 43, 5721-5732.
- [2] Ainamo J, Barmes D, Baegric D (1982) Int Dent J 32, 281-289.
- [3] Arabatzis M a spol (2007) Br J Dermatol 157, 681-689.
- 5 [4] Berezov AB, Darveau RP (2011) Periodontol 2000 55, 36-47.
- [5] Burne RA, Zeng L, Ahn SJ a spol (2012) Adv Dent Res 24, 77-80.
- [6] Calderone RA, Fonzi WA (2001) Trends Microbiol 9, 327-335.
- [7] US 5,190,746 A (issued March 2, 1993), Cassels JF, London J.
- [8] Cutting KF, White R (2004) Br J Community Nurs 9:S6-S15.
- 10 [9] Darveau RP (2010) Nat Rev Microbiol 8, 481-490.
- [10] DeBernardis F, Liu H, O'Mahony R a spol (2007) J Infect Dis 195, 149-157.
- [11] Dewhirst FE, Chen T, Izard J a spol (2010) J Bacteriol 192, 5002-5017.
- [12] EWMA Patient Outcome Group (2010) J Wound Care 19, 239-268.
- [13] Findley K, Oh J, Yang J a spol (2013) Nature 498, 367-370.
- 15 [14] Frandin C, Kretschmar M, Nichterlein T a spol (2003) Mol Microbiol 47, 1523-1543.
- [15] Gottrup E, Apelqvist J, Bjansholt T a spol (2013) J Wound Care 22, S1-S89.
- [16] Gow NAR, Hube B (2012) Curr Opin Microbiol 15, 406-412.
- [18] Grice EA, Segre JA (2012) Annu Rev Genomics Human Genet 13, 151-170.
- [19] Hajishengalis G, Liang S, Payne MA a spol (2011) Cell Host & Microbe 10, 497-506.
- 20 [20] Holt SC, Ebersole JL (2005) Periodontol 2000 38, 72-122.
- [21] Hube B (2004) Curr Opin Microbiol 7, 336-341.
- [22] Human Microbiome Project Consortium (2012) Nature 486, 207-214.
- [23] Kostov G, Angelev M, Denkova Z a spol. (2011) Eng Life Sci 11, 517-527.
- [24] Kotnik T (2007) Slov Vet Res, 44 (3): 63-73.
- 25 [25] Lang NP, Adler R, Joss A a spol (1990) J Clin Periodontol 17, 714-721.
- [26] WO 2013/122 931 A2 (publ. 22.8.2013), Lanzalaco AC, Charbonneau DL, Howard BW.
- [27] Liu B, Faller RR, Klitgord N a spol (2012) PLoS One 7, e37919.
- [28] Morrell J, Stratman E (2011) J Agromedicine, 16:4, 244-250.
- [29] Nakagawa Y, Ohno N, Murai T (2003) J Infect Dis 187, 710-713.
- 30 [30] Okuda K, Kato T, Ishihara K (2004) Oral Dis 10, 5-12.
- [31] CA 2374938 A1 (publ. 30. 11. 2000) Reid G, Bruce A.
- [32] WO2008/077251 (publ. 3.7.2008), Smoragiewicz W, Karska-Wysocki, Bazo, Ruiz Liquez.
- [33] Stapleton AE a spol (2011) Clin Infect Dis 52, 1212-1217.
- [34] CZ 302 297 B6 (publ. 29.12.2010), Suchánek M, Klimeš R.
- 35 [35] Teughels W, Durukan A, Ozcelik O a spol (2013) J Clin Periodontol 40, 1025-1035.
- [36] CZ 9883 U (publ. 14.4.2000), Veselý, D, Veselý L.
- [37] Wounds UK (2010) Aberdeen: Wounds UK 2010. Best practice statement: use of topical antiseptic / antimicrobial agents in wound management.
- [38] Moskowitz SM, Foster JM, Emerson J a spol. (2004) J Clin Microbiol 42, 1915-1920.
- 40 [39] Bruzual I, Riggler P, Hadley S a spol. (2007) J Antimicrob Chemother 59, 441-450.

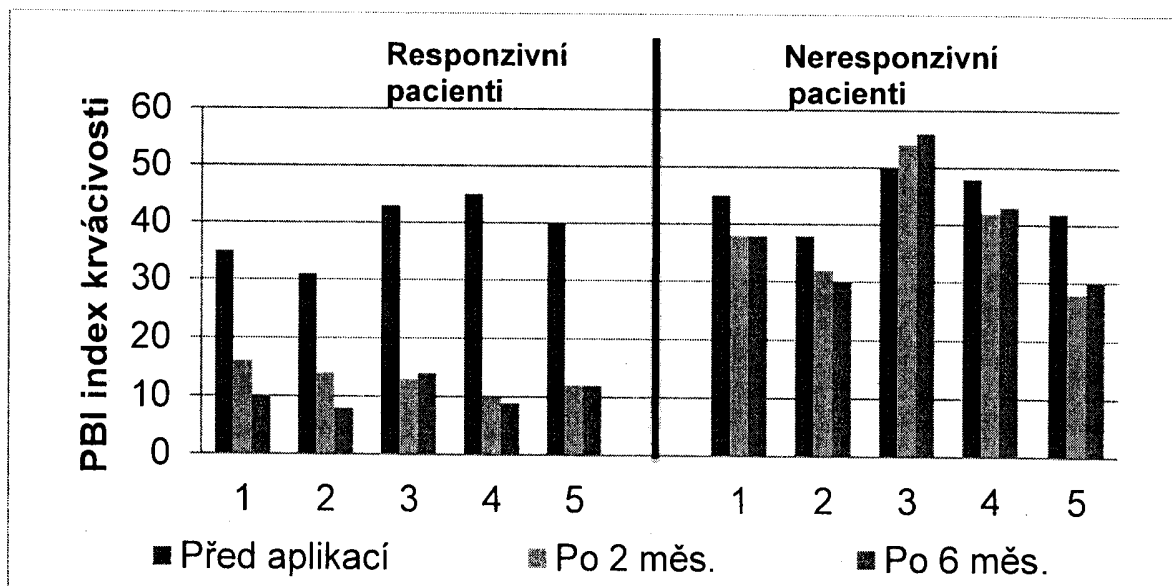
16.01.15

PATENTOVÉ NÁROKY

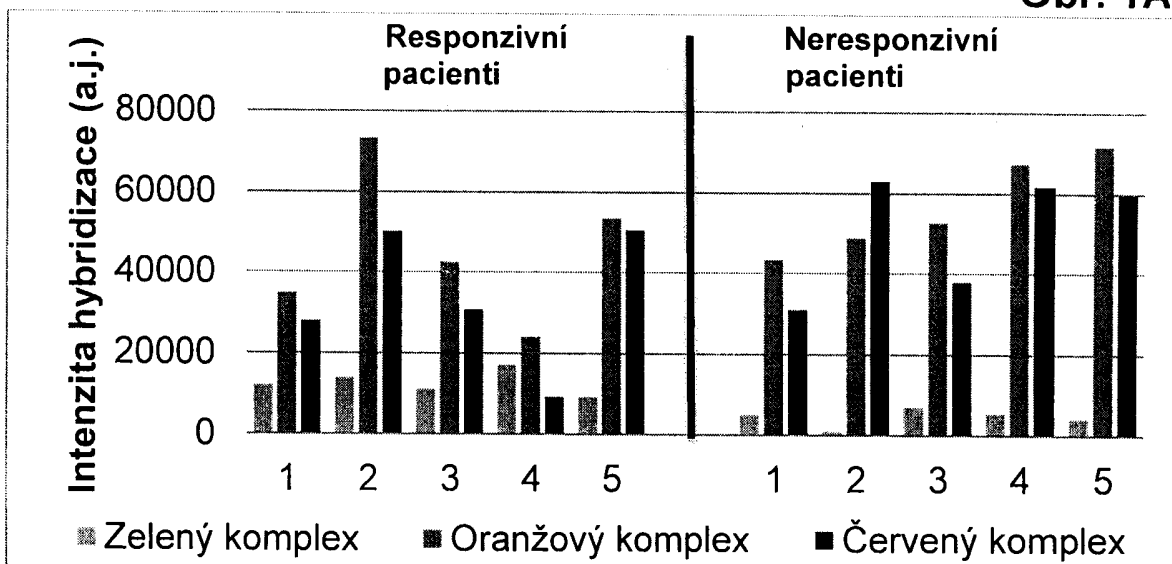
1. Duální mikrobiální preparát pro dlouhodobé potlačení nebo prevenci symptomů oportunních mikrobiálních infekcí, zejména symptomů způsobených dysbiosou, **vyznačující se tím**, že zahrnuje dvě základní mikrobiální komponenty ve vzájemném synergním působení, a to mikroskopickou řasovku *Pythium oligandrum* a komponentu mikrobiomu, přičemž komponentou mikrobu je fyziologický mikrobiom lidského nebo zvířecího původu nebo mikrobiom pochází ze životního prostředí.
2. Duální mikrobiální preparát podle nároku 1 **vyznačující se tím**, že mikroskopická řasovka *Pythium oligandrum* i komponenta fyziologického mikrobiomu jsou přítomny v podobě umožňující jejich vzklíčení, následné namnožení a kolonizaci cílových tkání.
3. Duální mikrobiální preparát podle nároků 1 a 2 **vyznačující se tím**, že mikroskopická řasovka *Pythium oligandrum* obsahuje množství 10^3 až 10^7 KTJ (kolonie tvořících jednotek) na 1 g.
4. Duální mikrobiální preparát podle nároků 1 až 3 **vyznačující se tím**, že mikroskopická řasovka *Pythium oligandrum* obsahuje množství 10^4 až 10^5 KTJ (kolonie tvořících jednotek) na 1 g.
5. Duální mikrobiální preparát podle nároku 1 až 4 **vyznačující se tím**, že komponenta fyziologického mikrobiomu obsahuje množství 10^5 až $\times 10^{12}$ KTJ (kolonie tvořících jednotek) na 1 g.
6. Duální mikrobiální preparát podle nároku 1 až 5 **vyznačující se tím**, že komponenta fyziologického mikrobiomu obsahuje množství 10^6 až 10^{10} KTJ (kolonie tvořících jednotek) na 1 g.
7. Duální mikrobiální preparát podle nároku 1 až 6 **vyznačující se tím**, že pro obě mikrobiální komponenty je zdrojem živin fermentovaný substrát obsažený v řasovce *Pythium oligandrum*.
8. Duální mikrobiální preparát podle nároků 1 až 7, **vyznačující se tím**, že dále obsahuje nejméně jednu z pomocných složek ze skupiny zahrnující:
desikant jako je oxid křemičitý;
komponenty pufručního systému jako je kyselina citronová, hydrogenuhličitán sodný a uhličitán sodný;
protispěkáci látka, jako je sorbitol nebo polyethylenglykol; a

prostředek pro tvorbu fyziologického osmotického prostředí, jako je chlorid sodný.

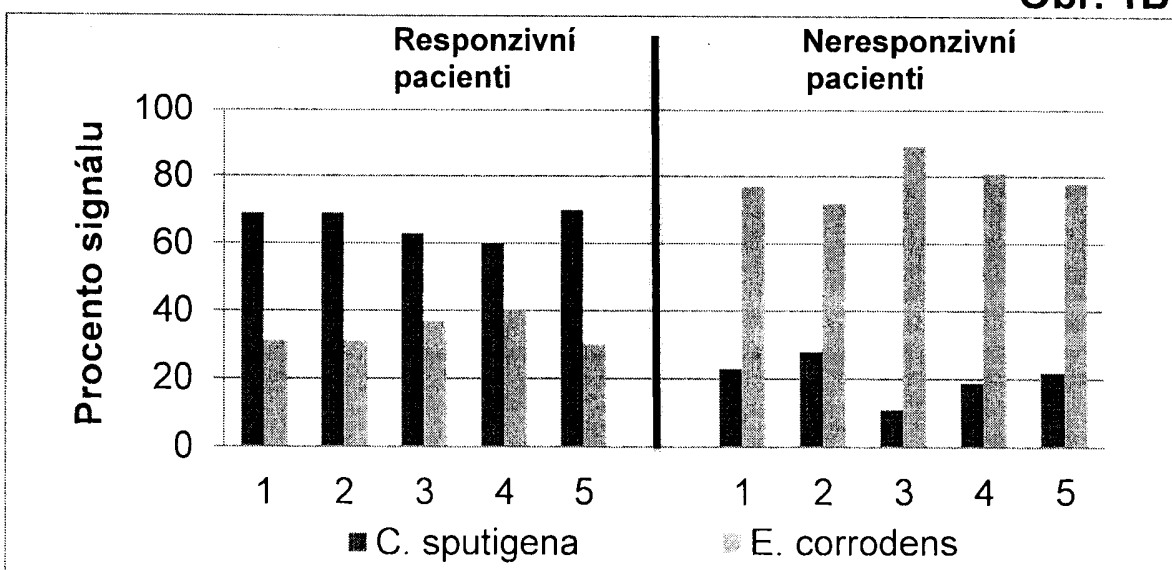
- 5 9. Duální mikrobiální preparát podle nároků 1 až 8, **vyznačující se tím**, že komponentou fyziologického mikrobiomu je jedna z komponent zdravého mikrobu dutiny ústní, jako je bakterie *Capnocytophaga sputigena*.
- 10 10. Duální mikrobiální preparát podle nároků 1 až 8, **vyznačující se tím**, že komponentou fyziologického mikrobiomu je lidský mikrobiom, a to jedna z komponent zdravého mikrobiomu kůže, jako je bakterie *Staphylococcus epidermidis*.
- 11 11. Duální mikrobiální preparát podle nároků 1 až 8, **vyznačující se tím**, že komponentou fyziologického mikrobiomu je lidský mikrobiom, a to jedna z komponent zdravého vaginálního mikrobiomu, jako je peroxidy produkující *Lactobacillus crispatus*.
- 15 12. Duální mikrobiální preparát podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že buď mikroskopická řasovka *Pythium oligandrum* nebo komponenta fyziologického mikrobiomu jsou přítomny ve formě neživých složek, jako usmrcené buňky, buněčné extrakty, nebo izolované buněčné frakce.
- 20 13. Duální mikrobiální preparát podle nároku 12, **vyznačující se tím**, že pro řasovku *Pythium oligandrum* je mikrobiálním aktivátorem kvasničný autolyzát v množství 0, 1 % až 10 % hm. z celkového množství duálního preparátu.
- 25 14. Duální mikrobiální preparát podle nároků 1 až 15, **vyznačující se tím**, že pomocné látky jsou upraveny způsobem umožňujícím aplikaci ve formě mastí, krémů, olejů, čípků nebo ve formě tekutého vodného přípravku.
- 30 15. Duální mikrobiální preparát podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že mikrobiální komponenta pocházející ze životního prostředí obsahuje 10^5 až 10^{12} KTJ (kolonie tvořících jednotek) na 1 g.
16. Duální mikrobiální preparát podle nároku 15, **vyznačující se tím**, že mikrobiální komponentou pocházející ze životního prostředí je bakterie *Bacillus amyloliquefaciens*.



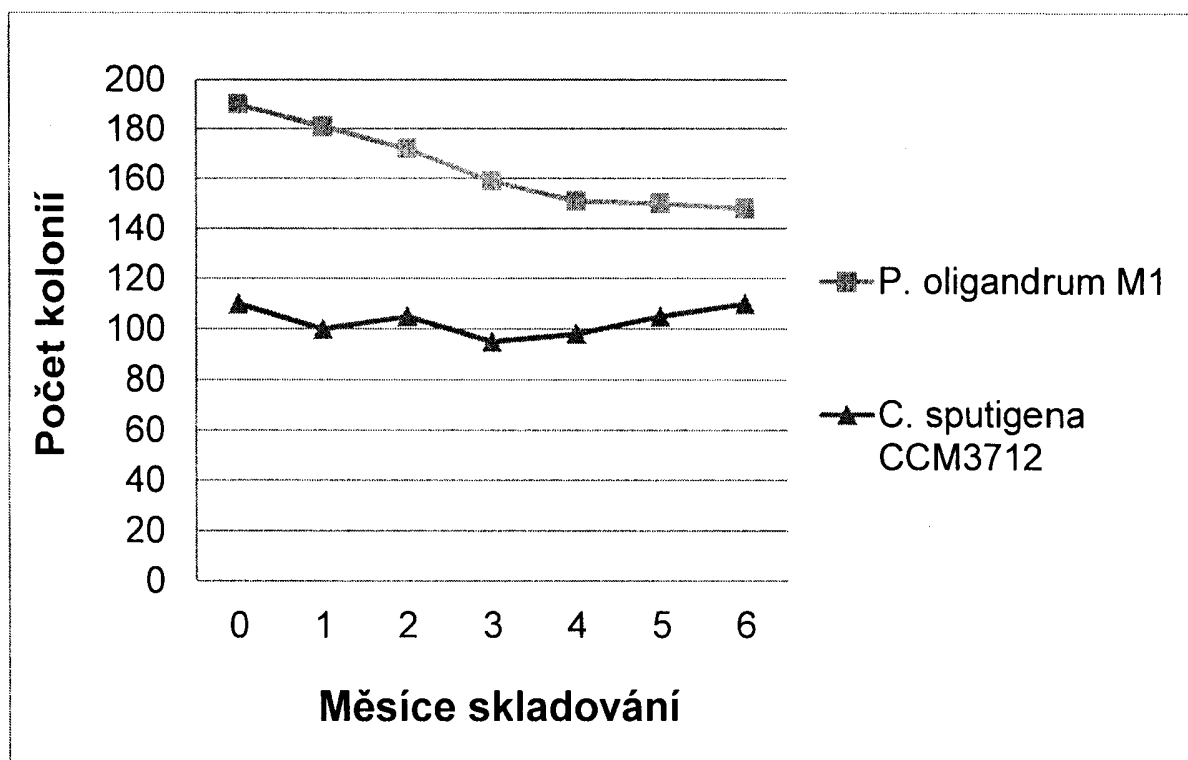
Obr. 1A



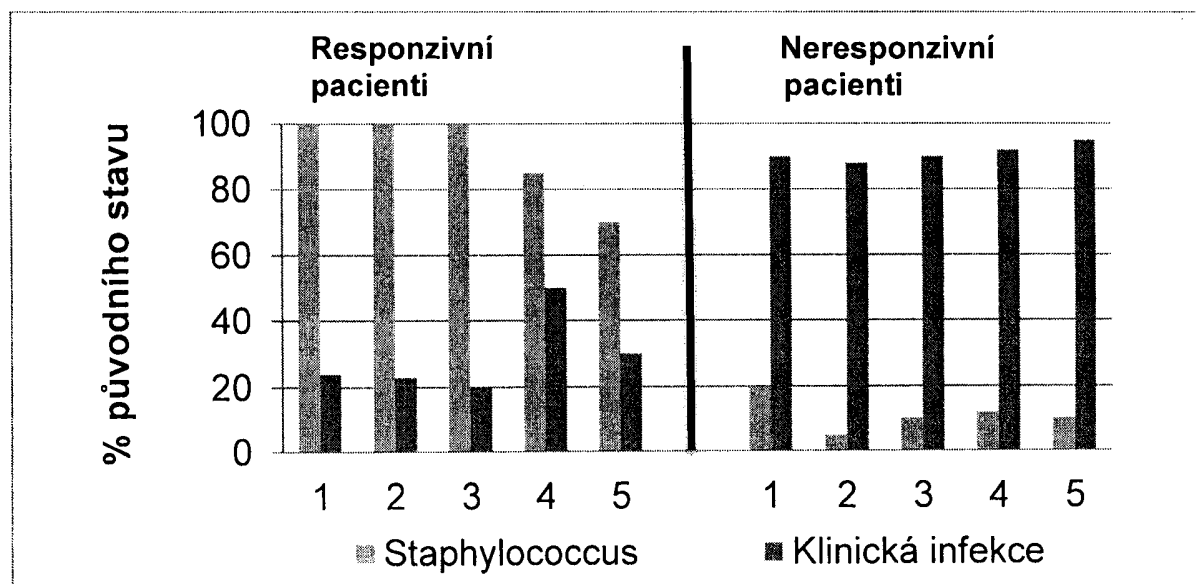
Obr. 1B



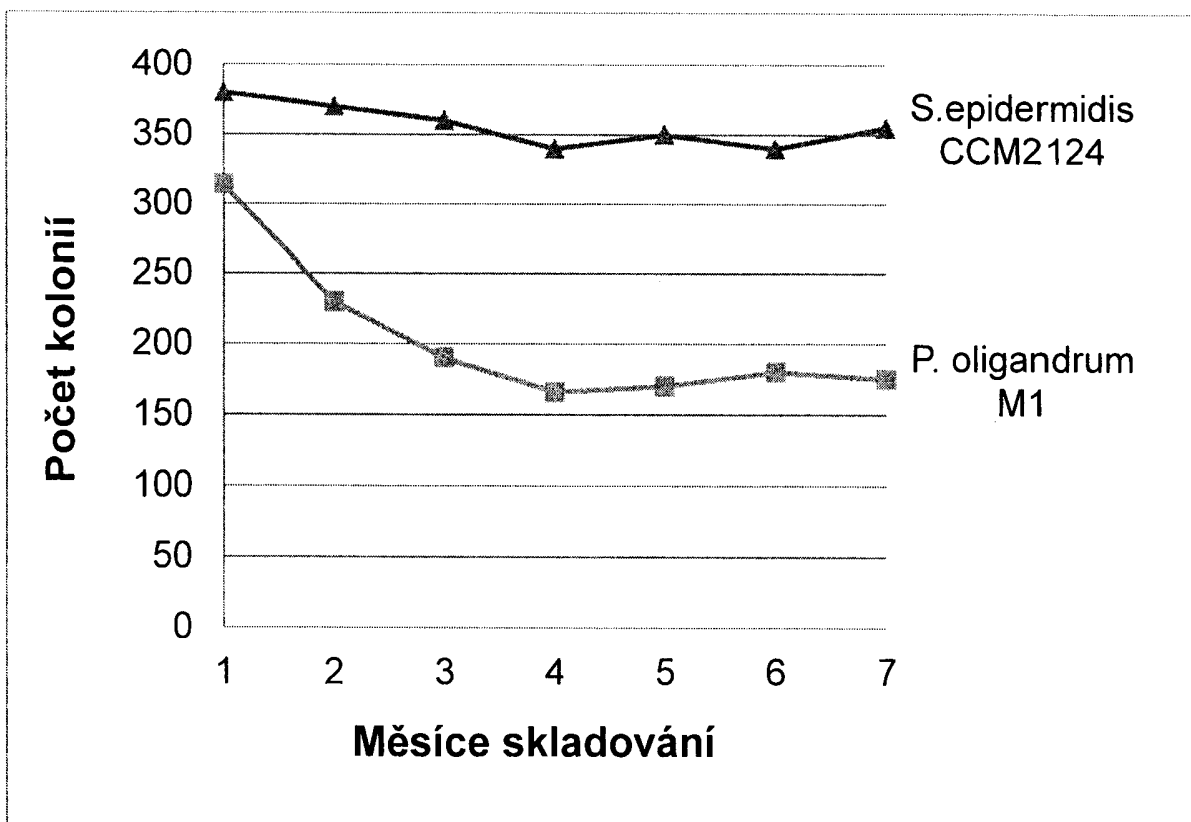
Obr. 1C



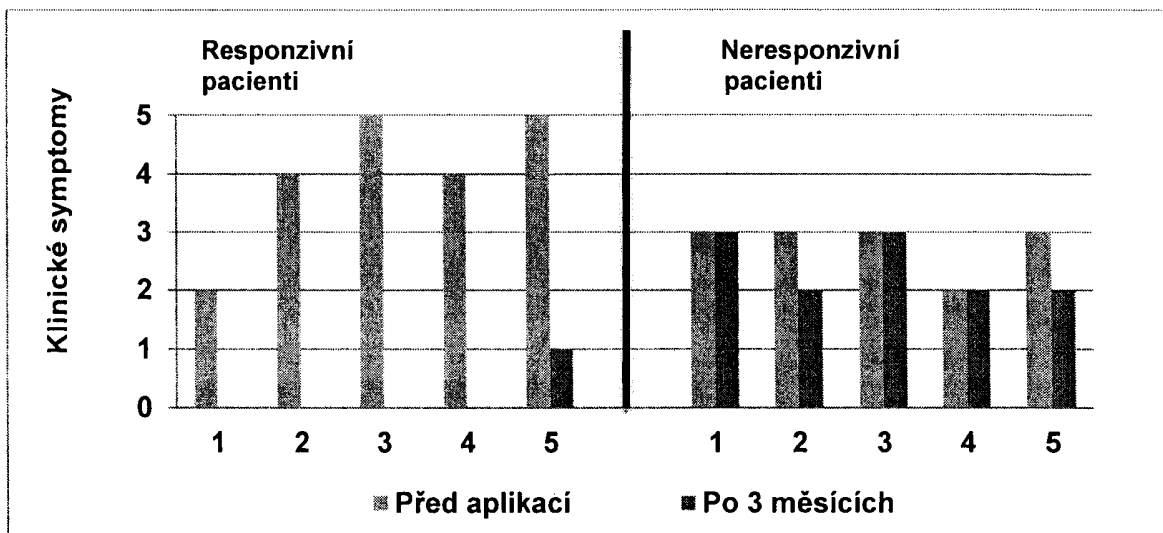
Obr. 2



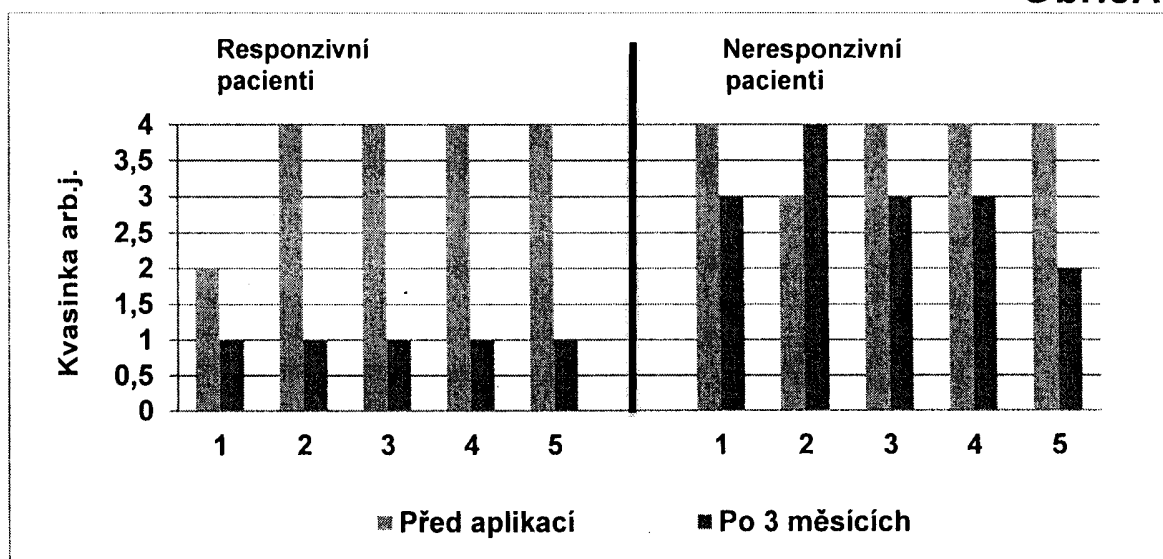
Obr. 3



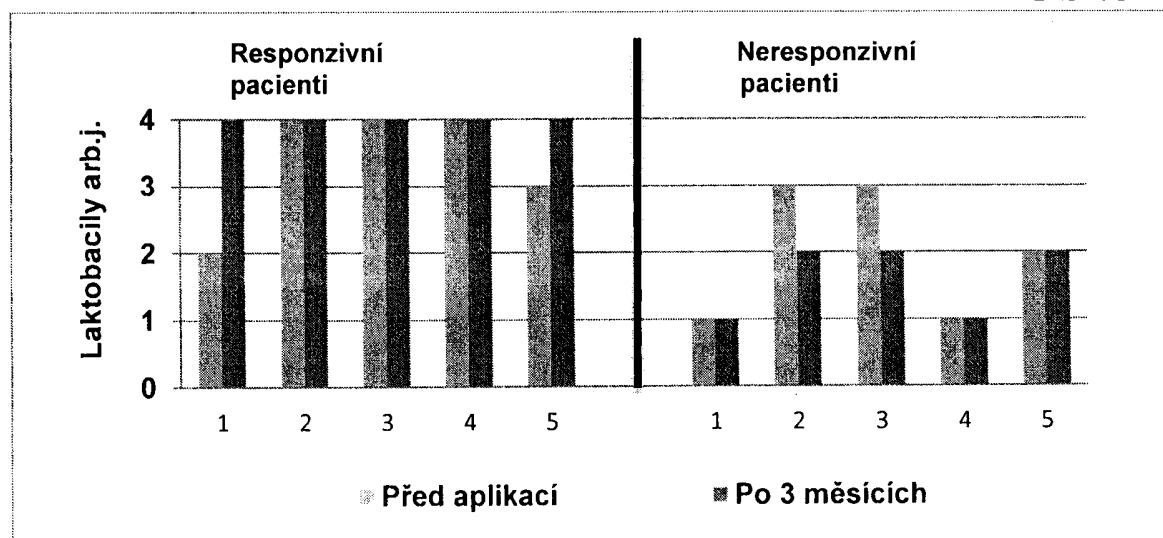
Obr. 4



Obr.5A

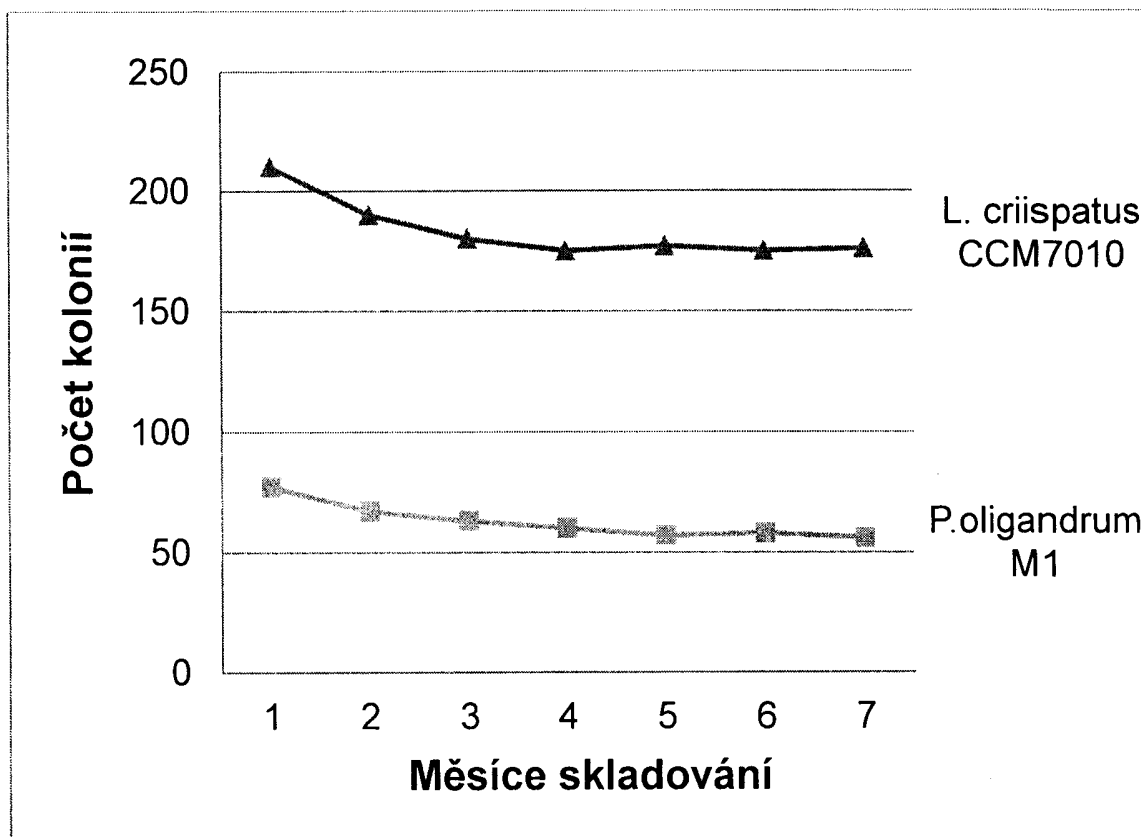


Obr.5B

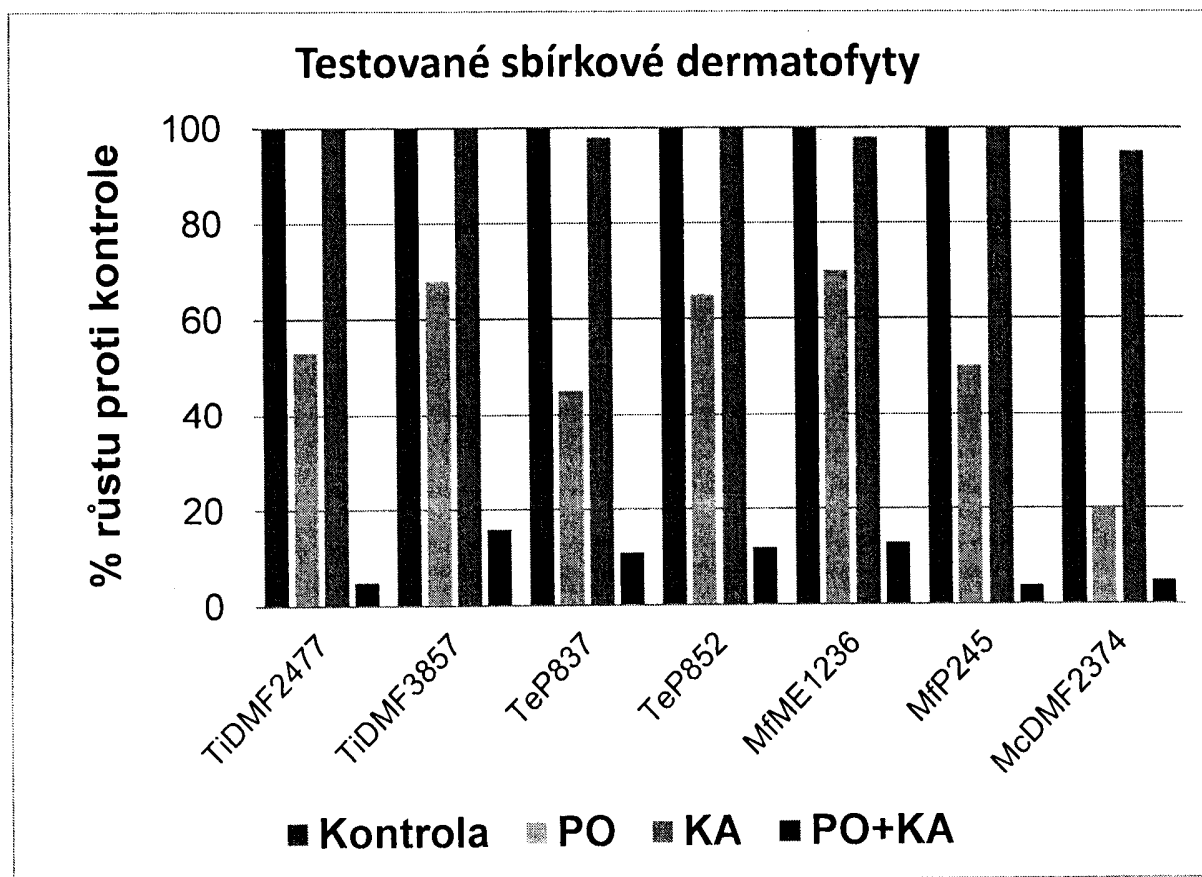


Obr.5C

15.01.15

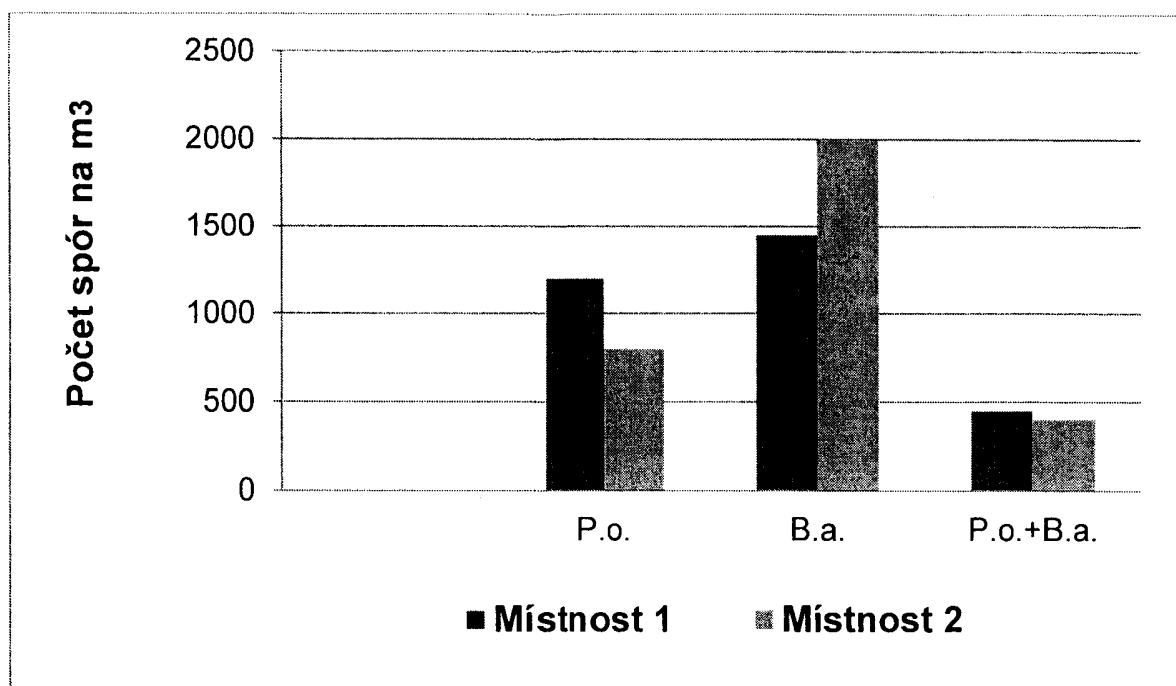


Obr. 6

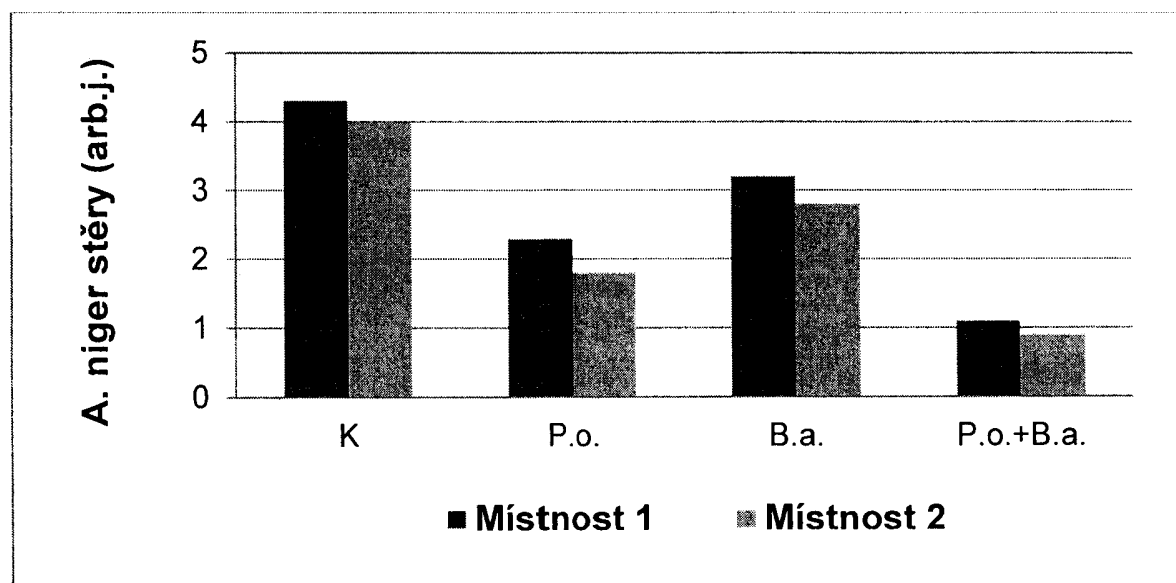


Obr. 7

16.01.15



Obr.8A



Obr. 8B