



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETÀ INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

UIBM

DOMANDA NUMERO	101996900496229
Data Deposito	08/02/1996
Data Pubblicazione	08/08/1997

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		

Titolo

COMPOSIZIONI FARMACEUTICHE PER IL TRATTAMENTO BIOLOGICO DELLE INFEZIONI DOVUTE A CEPPI DI ENTEROCOCCUS FAECIUM RESISTENTI AGLI ANTIBIOTICI ED ALLA VANCOMICINA IN PARTICOLARE (VRE)

DESCRIZIONE dell'invenzione industriale

a nome: CHEMICAL AND BIOLOGICAL INDUSTRIES LIMITED

di nazionalità: irlandese

con sede in: DUBLINO (Irlanda)

MI 96 A 0239

Il brevetto italiano N° 1.112.479 a nome della Giuliani S.A. è relativo ad una composizione farmaceutica particolarmente adatta alla terapia di enteriti e diarree infettive in genere, caratterizzata dal fatto di contenere quale principio attivo una coltura di batteri appartenenti alla specie *Enterococcus faecium*.

In particolare tale brevetto tratta di composizioni in cui i batteri della specie *Enterococcus faecium* appartengono al ceppo batterico SF 68.

Il ceppo batterico SF 68 è il principio attivo della specialità farmaceutica BIOFLORIN®, una ben documentata preparazione biologica contenente questo particolare ceppo di *Enterococcus faecium* in forma secca, ampiamente usata per il trattamento di forme enterocolitiche diarroiche acute.

L'*Enterococcus faecium*, già classificato nella famiglia delle streptococcacee genere *Streptococcus* del gruppo D di Lancefield, dal 1984, è considerato appartenente del genere *Enterococcus* ed appare come

08 FEB. 1996

un cocco sferico del diametro di circa 1 μ , generalmente rappresentato in catenelle di varia lunghezza, gram +, aerobio, facoltativo anaerobio, non sporigeno non mobile.

La temperatura ottimale di crescita è 36° - 37°C e il pH è 7. I terreni di coltura elettivi per una crescita ottimale sono MRS broth (Difco) e l'agar sangue di cavallo. La crescita può essere stimata da una torbidità uniforme in terreno liquido e da colonie piccole, rotonde, leggermente convesse, lisce in terreno solido. Compare una leggera α -emolisi su colonie che crescono in agar sangue.

In agar sangue TSA (Difco) con emazie al 5 % di coniglio, pecora e uomo e cavia e cavallo si ottiene una α -emolisi in presenza di sangue di cavallo, pecora e uomo ma non di ratto, coniglio e cavia.

Il ceppo SF 68 è stato originariamente isolato da organismi umani ed è stato usato anche nell'industria alimentare, specie per la fermentazione dei formaggi.

Il ceppo SF 68 è stato depositato dalla società Giuliani al DSM (Deutsche Sammlung Mikroorganismen und Zellkulturen): il codice di deposito è DSM 8912.

Il preparato contenente l'*Enterococcus faecium* SF 68 per l'uso clinico ha avuto origine nel 1978; lo stesso ceppo è stato studiato ed usato anche in campo veterinario.

La società Giuliani ha sviluppato il preparato nel periodo 1978-1980 attraverso molti studi tossicologici, microbiologici e clinici; questi ultimi sono stati condotti quasi tutti come studi controllati in doppio-cieco vs. placebo o vs. controlli attivi.

La rassegna di Loizeau E. (pubblicata su "Revue Médicale de la Suisse Romande" 114; 651, 1994) riassume le proprietà biologiche e cliniche del preparato.

Recentemente i campylobacter, l'helicobacter e gli enterococchi vancomicino-resistenti (VRE) hanno assunto grande rilievo nella microbiologia clinica gastroenterologica per differenti ragioni:

- i campylobacter perchè si sono rivelati i batteri enteropatogeni più frequentemente riscontrati nella patologia infettiva intestinale; invece, la causa più frequente in assoluto è rappresentata dai rotavirus;
- gli helicobacter pylori perchè spesso in causa nell'etiopatogenesi dell'ulcera peptica gastro-duodenale;
- gli enterococchi VRE (vancomicino-resistenti) perchè coinvolti in elevate percentuali nelle emergenze nosocomiali (infezioni nosocomiali od ospedaliere) con un elevato potenziale di morbidità e mortalità, come rilevato in importanti studi

epidemiologici statunitensi ed europei.

Nell'era dell'elevato consumo di antibiotici e del sensibile aumento di germi resistenti a molti antibiotici stessi, appare di rilevante interesse esplorare il potenziale di prodotti biologici capaci di produrre batteriocine o, comunque, sostanze biologicamente attive contro gli agenti patogeni.

Sarà utile ricordare che il ceppo SF 68 di *Enterococcus faecium* ha già dimostrato una rilevante attività antagonista nei confronti di vari germi enteropatogeni, tra cui *Salmonelle*, *Coli*, *Shigelle* e altri batteri. Il ceppo SF 68 aveva anche evidenziato attività antagonista nei confronti di alcuni virus responsabili di infezioni intestinali.

Recenti studi hanno dimostrato una attività inibitoria e battericida del ceppo di *Enterococcus faecium* SF 68 nei confronti di numerosi tipi di *Campylobacter*, mentre piuttosto scarsa è risultata invece l'attività nei confronti di *Helicobacter pylori*.

Si è ora sorprendentemente trovato, e ciò costituisce oggetto della presente invenzione insieme alle relative applicazioni cliniche (terapeutiche o profilattiche), che il ceppo SF 68 di *Enterococcus faecium* dimostra la capacità di inibire regolarmente, tramite produzione di sostanze biologicamente attive,

con una riproducibilità del 100%, la crescita di altri ceppi di *Enterococcus faecium* vancomicina-resistenti (VRE) di tipo Van-A e Van-B, nei confronti dei quali è stato saggiato.

Lo stesso tipo di attività è prevedibile secondo la presente invenzione anche per gli *Enterococcus faecium* aventi attività simile a quella del ceppo SF 68.

Gli studi microbiologici sono stati condotti con le appropriate metodiche microbiologiche.

La cultura dei ceppi di *Enterococcus faecium* è stata effettuata in "Mueller-Hinton II broth" per una notte a 37°C in atmosfera al 5% di CO₂. La cultura del ceppo SF 68 "producer" di batteriocine è stata centrifugata a 13.000 rpm per 5 minuti allo scopo di rimuovere le cellule ed il supernatante senza cellule è stato lasciato in incubazione a 80°C per 1 min (la maggior parte delle batteriocine sopravvivono a questo trattamento che permette di eliminare la possibilità di ulteriore crescita di cellule del "producer"). Le osservazioni ai tempi "0", "4", "8" e "30" ore sono state effettuate su piastre microtitolate dove si erano posti:

- nei pozzetti sperimentali, 100 µl del supernatante del prodotto in studio e 200 µl del medium indicatore inoculato;

- nei pozzetti di controllo, 100 µl del solo medium del prodotto in studio e 200 µl del medium indicatore inoculato;
- nei pozzetti "blank", 100 µl del solo medium del prodotto in studio e 200 µl del medium indicatore senza alcun inoculo.

I risultati sono stati espressi in termini di percentuali di inibizione secondo la seguente equazione "OD" = "optical densities"):

$$\frac{\text{"OD dei pozzetti controllo"} - \text{"OD dei pozzetti test"}}{\text{"OD dei pozzetti controllo"} - \text{"OD dei pozzetti blank"}} \times 100$$

I ceppi di "Enterococcus faecium" con caratteristiche di resistenza alla vancomicina (di tipo Van-A o Van-B) verso i quali è stata testata l'attività antibatterica del ceppo di Enterococcus faecium SF 68 erano stati isolati in clinica umana da varie fonti (comprendenti feci, sangue, ferite infette) in occasione di uno studio epidemiologico policentrico condotto in Belgio. Il genotipo "Van" è stato determinato utilizzando un "PCR" basato sulla tecnica descritta da Dutka-Malen et al ("Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci" - J. Clin. Microbiol. 33: 24-27 - 1995). Altri ceppi di Enterococcus faecium erano di

collezione (LGM-cfr.tabella).

Il riconoscimento genetico degli enterococchi rilevati nei pozzetti o negli isolati fecali (cfr. studi clinici menzionati più avanti) è stato effettuato per mezzo del "random amplified polymorphic DNA (RAPD) typing" e del confronto dei profili del DNA con quelli ottenuti con l'*Enterococcus faecium* ceppo SF 68.

I risultati relativi alle esperienze sull'attività "in vitro" del ceppo SF 68 verso altri *Enterococcus faecium*, quasi tutti di isolamento clinico umano, Vancomicino-resistenti tipo Van-A, tra cui 1 Iowa 1, e Vancomicino-resistenti tipo Van-B (un Iowa 2), ed alcuni ceppi di collezione), sono riportati nella seguente tabella:

Inibizione di vari ceppi di <i>E.faecium</i> da parte di <i>E.faecium</i> SF 68	Numero dei ceppi testati	Numero dei ceppi inibiti	Percentuale di inibizione da parte di SF 68
Vancomicino-resistenti	9	9	100%
tipo Van-A	8	8	100%
tipo Van-B	1	1	100%
Ceppi di collezione (LMG)	4	4	100%
Totali	13	13	100%

Ulteriori esperienze hanno dimostrato che l'effetto riscontrato è di tipo battericida in almeno il 50% delle prove condotte. E' importante anche

ricordare che la riproducibilità di questi risultati è stata del 100%.

Questi risultati sono del tutto sorprendenti e permettono di ritenere che il ceppo SF 68 produca batteriocine (o altri prodotti biologici) specificamente attive nei confronti non solo di vari germi patogeni, ed enteropatogeni in modo specifico (ed anche di virus enteropatogeni), ma anche nei confronti di germi della stessa specie "Enterococcus faecium" aventi caratteristiche di resistenza alla vancomicina tipo Van-A e Van-B.

Le esperienze effettuate sono di notevole interesse e sono molto incoraggianti in quanto suggeriscono un uso potenziale di Enterococcus faecium ceppo SF 68 (o di altri Enterococcus faecium aventi caratteristiche biologiche similari) per eradicare dall'intestino ceppi di enterococchi vancomicino-resistenti (VRE) e di bonificare così anche portatori di tali germi in sede di infezioni nosocomiali.

Sulla base delle esperienze effettuate "in vitro", abbiamo ritenuto di estremo interesse pianificare un ampio studio clinico placebo-controllato in condizioni doppio-cieche avente lo scopo di verificare se effettivamente un trattamento con SF 68 fosse in grado di eliminare la presenza di

VRE ("vancomycin-resistant enterococchi") dalle feci di soggetti portatori e suscettibili di soggiacere all'infezione intestinale e/o di diffondere tali ceppi imputabili di infezioni nosocomiali.

A tale studio, ormai in corso, si era fatto precedere uno studio pilota su casistica molto limitata atto ad ottenere dati e risultati preliminari utili per l'attuazione dell'ampia ricerca sopra menzionata.

Questo studio clinico pilota è stato effettuato in 4 soggetti volontari (studenti) sottoposti ad esame coproculturale nel quadro di un programma di controllo epidemiologico, e nei quali si era dimostrata la presenza di un *Enterococcus faecium* con vancomicina-resistenza di tipo Van-A con un quadro enteritico relativamente paucisintomatico.

I soggetti sono stati trattati con una preparazione farmaceutica in capsule contenenti almeno 75 milioni di CFU di *Enterococcus faecium* ceppo SF 68® per ogni capsula (commercialmente BIOFLORIN®) alla posologia di 2 capsule, 3 volte al giorno per 5 giorni.

Le coproculture di controllo sono state effettuate al tempo "0", dopo i 5 giorni di trattamento e ripetute, in seguito, dopo 1, 3, 5 e 25 giorni dal termine del trattamento.

Dopo i 5 giorni di trattamento e per gli altri 5 giorni dopo il termine, la presenza dell'*Enterococcus faecium* ceppo SF 68 nelle feci è stata rilevata in tutti i casi, mentre in 2 casi su 4 la presenza è stata rilevata anche al controllo dopo 25 giorni.

Tuttavia, l'aspetto di maggior importanza è che, in tutti i casi, non è stato più possibile evidenziare la presenza di ceppi di *Enterococcus faecium* con vancomicina-resistenza di tipo Van-A al controllo al termine del trattamento.

La discriminazione tra i differenti ceppi di *Enterococcus faecium* (SF 68 e VRE) è stata resa possibile dalle metodiche di "PCR fingerprinting"; il riconoscimento genetico degli enterococchi rilevati negli isolati fecali è stato effettuato per mezzo del "random amplified polymorphic DNA (RAPD) typing" e con confronto dei profili del DNA ottenuti con l'*Enterococcus faecium* ceppo SF 68 e con gli altri VRE isolati come criterio di arruolamento.

I risultati di questo studio pilota hanno evidentemente conferito notevole importanza alla ricerca allargata relativa alla possibilità di eradicare i VRE utilizzando l'*Enterococcus faecium* ceppo SF 68, ricerca che ora è in corso.

Per quanto riguarda i dosaggi che si possono proporre in riferimento a queste particolari

applicazioni, è da precisare che i ceppi di *Enterococcus faecium* devono avere caratteristiche vitali e le CFU ("colony forming unit") da somministrare ogni giorno possono andare da 10 milioni sino oltre 10 miliardi; tale ampio "range" si giustifica con il fatto che l'aspetto essenziale per l'effetto biologico è che esistano nell'organismo condizioni permettenti la moltiplicazione del batterio che è, come sua caratteristica, molto rapida (duplicazione ogni 19 minuti).

Allo scopo di meglio comprendere le caratteristiche dell'invenzione, se ne riportano di seguito alcuni esempi di pratica attuazione relativi alle forme farmaceutiche da utilizzarsi per gli scopi dell'invenzione.

Tali esempi hanno lo scopo solo illustrativo e non limitativo.

ESEMPI

Le forme farmaceutiche con *Enterococcus faecium* ceppo SF 68, cui si riferisce il presente brevetto, sono tutte quelle normalmente utilizzabili per impiego clinico.

In particolare, come composizioni, si possono citare, i seguenti esempi:

1) Capsule di gelatina dura - Per ogni capsula:

- *Enterococcus faecium* ceppo SF 68 non meno di 75 milioni

- Magnesio stearato mg 5,5
- Silice precipitata mg 0,8
- Lattosio mg 257,7

2) Polvere in flacone con misurino dosatore - Per 100 g di polvere:

- Enterococcus faecium ceppo SF 68 non meno di 7,5 miliardi
- Destrosio g 75
- Destrina g 25

3) Granulato in bustina - Per ogni bustina da 1 g:

- Enterococcus faecium ceppo SF 68 non meno di 75 milioni
- Mannitolo mg 150
- Saccarina sodica mg 10
- Gomma xantano mg 100
- Aroma naturale mg 40
- Sorbitolo q.b. a mg 1500

4) Pellets in bustina - Per ogni bustina da 1,2 g:

- Enterococcus faecium ceppo SF 68 non meno di 75 milioni
- Lattosio mg 120
- Saccarosio mg 702
- Amido mg 78
- Metilcellulosa mg 200
- Polivinilpirrolidone mg 60
- Aroma naturale mg 40

5) Pellets in capsula - Per ogni capsula da 380 mg di contenuto:

- Enterococcus faecium ceppo SF 68 non meno di 75 milioni
- Lattosio mg 38
- Saccarosio mg 257

- Amido	mg	64,25
- Polivinilpirrolidone	mg	18,75
- Magnesio stearato	mg	2

I pellets potrebbero essere resi gastroresistenti mediante filmatura con polimeri dell'acido metacrilico.

Ing. Barzanò & Zanardo Milano S.p.A.

RIVENDICAZIONI

1. Uso di un *Enterococcus faecium* del ceppo SF 68 o ad attività simile per la preparazione di un prodotto medicinale adatto al trattamento terapeutico delle infezioni dovute a ceppi di "*Enterococcus faecium*" resistenti agli antibiotici ed alla vancomicina in particolare (VRE).

2. Uso secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che detto *Enterococcus faecium* appartiene al ceppo SF 68.

3. Uso secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che trattasi specificatamente di infezioni intestinali quali enteriti ed enterocoliti.

4. Uso secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che trattasi dello stato di portatore di detti enterococchi vancomicino-resistenti (VRE) da parte di soggetti apparentemente non malati e quindi dell'eradicazione di focolai epidermici nosocomiali od extranosocomiali e della prevenzione della diffusione di infezioni intestinali o sistemiche tramite bonifica dello stato di portatore.

5. Composizione farmaceutica per il trattamento terapeutico delle infezioni dovute a ceppi di "*Enterococcus faecium*" resistenti agli antibiotici ed

alla vancomicina in particolare (VRE), caratterizzata dal fatto di ottenere quale principio attivo un *Enterococcus faecium* del ceppo SF 68 o ad attività simile.

6. Uso e composizione farmaceutica
sostanzialmente come sopra definiti.

Ing. Barzanò & Zanardo Milano S.p.A.

Cl./RA/vr

I MANDATARI

(firma)

(per sé e per gli altri)

