

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

290 100

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 2000 - 1894

(22) Přihlášeno: 18.11.1998

(30) Právo přednosti:
22.11.1997 DE 1997/19751907

(40) Zveřejněno: 15.11.2000
(Věstník č. 11/2000)

(47) Uděleno: 29.03.2002

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 15.05.2002
(Věstník č. 5/2002)

(86) PCT číslo: PCT/EP98/07389

(87) PCT číslo zveřejnění: WO 99/26642

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 39/108

A 61 K 35/74

A 61 P 1/12

(73) Majitel patentu:

PHARMA-ZENTRALE GMBH, Herdecke, DE;

(72) Původce vynálezu:

Proppert Hans, Hagen, DE;

(74) Zástupce:

Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1,
11000;

(54) Název vynálezu:

**Farmaceutický prostředek pro prevenci a léčení
mikrobiálních průjmů u zvířat**

(57) Anotace:

Řešení se týká použití bakterie Escherichia coli kmene
DSM 6601 pro výrobu farmaceutických prostředků pro
prevenci a léčení mikrobiálních průjmů způsobených
přítomností patogenních hub u zvířat.

CZ 290100 B6

Farmaceutický prostředek pro prevenci a léčeni mikrobiálních průjmů u zvířatOblast techniky

5

Vynález se týká použití bakterií *Escherichia coli* kmene DSM 6601 pro prevenci a léčeni mikrobiálních průjmů u zvířat.

10

Dosavadní stav techniky

Pod průjmy se u lidí nebo zvířat rozumí časté vyprazdňování řídkých exkrementů, přičemž příčina průjmů může být různá, jako například alergická reakce na některou potravinu, ale i reakce na mikroorganismy, a to bakterie, houby nebo viry nebo jejich toxiny. Děletrvající průjmy mohou vést pro velkou ztrátu vody a solí k těžkým komplikacím, až ke smrti. Těžké průjmy proto v každém případě vyžadují léčeni, zvláště v případě, kdy se jedná o mladé nebo již oslabené lidi nebo zvířata.

Ve velké většině případů jsou průjmy způsobeny bakteriemi, které nepatří k normální mikroflóře postiženého organismu, přičemž hlavní úlohu hrají zvláště určité patogenní kmeny *Escherichia coli*, *salmonely* a *shigely*. Vedle bakterií mohou být však průjmy vyvolány také infekcemi viry, zvláště koronaa rotaviry nebo také houbami, které ve většině případů patří do oddělení *Eumycota*. Zatímco bakteriální průjmy jsou v současnosti dobře zvládnutelné podáváním absorpčních látek nebo nesystémových sulfonamidů nebo antibiotik, dosud není žádný prostředek úspěšně použitelný při virové infekci a téměř žádné prostředky, které jsou účinné při osídlení žaludečně-střevního traktu houbami.

Jako houby se označuje polyfylogenetická skupina heterotrofních a eukaryotních organismů neobsahujících chlorofyl, které mohou být jedno nebo vícebuněčné a jejichž rozmnožování probíhá jako u všech eukaryot mitózou a meiózou za vytvoření pohlavních nebo nepohlavních spór, ale také pučením. Jednobuněčné houby, které se rozmnožují pouze pučením, se často označují jako kvasinky, ačkoliv kvasinky jsou skupinou organismů s různou příbuzností. Téměř všechny eumykoty, tedy pravé houby, procházejí během individuálního vývoje dvěma nebo více morfologicky rozlišitelnými stupni, totiž jako teleomorfy, při kterých se po meióze vytvoří spóry, a jedním nebo více stupni jako anamorfy, u kterých není tvorba spór spojená s meiózou. Houby, jejichž teleomorfy jsou neznámé nebo ztratily schopnost je tvořit, se zahrnují do skupiny *Fungi imperfecti*. Přesná botanická klasifikace není u hub často ještě ukončená.

Pro nepřítomnost chlorofylu se všechny houby vyživují heterotrofně odbouráváním organických látek, jsou tedy označovány jako saprofyty. Z lékařského hlediska se rozlišuje mezi oportunními organismy, tedy saprofyty, které se mohou zřídka a jen za zcela určitých podmínek stát patogeny, a kam patří zvláště rody *Candida* a *Aspergillus*. Tzv. patogenní saprofyty vedou mimo tělo normální saprofytický život, ale pro člověka nebo zvířata jsou, jestliže dojde k infekci, za všech okolností považovány za patogeny. Také mezi houbami se vyskytují obligatorní paraziti, kteří nemohou růst mimo hostitelský organismus a kteří byli nalezeni nejen u lidí, ale i u zvířat, sem patří většina dermatofyt.

Podstatný rozdíl mezi bakteriemi a houbami spočívá v tom, že houby jsou na rozdíl od bakterií eukaryoty, tedy mají jádro s membránou a na rozdíl od bakterií mají navíc také mitochondrie, a jejich buněčná stěna se skládá z chitinu a/nebo celulózy, zatímco buněčná stěna bakterií je vystavěna z mukopeptidů. To vysvětluje, proč většina antibiotik účinných na bakterie u hub selhává, protože u mnoha známých antibiotik jsou hlavním místem zásahu stěna bakterií nebo mitochondrie.

Existují také některá antibiotika, která mohou být použita proti houbovým infekcím také systémově, tedy nejen místně, a která se vyznačují polyenovou strukturou, jako například amfotericin B, griseofulvin, natamycin a nystatin. Syntetickými systémovými antimykotiky jsou flucytosin a řada azolových derivátů jako je ketokonazol a mikonazol nebo flukonazol a itrakonazol.

5

Zatímco přesný mechanismus působení polyenových antibiotik ještě není do všech podrobností znám, účinkují syntetické azolové deriváty na syntézu ergosterolu v buněčné membráně a tím ovlivňují prostupnost buněčné stěny.

10

Nevýhoda všech dosud známých systémově použitelných antimykotik je v tom, že nejsou zpravidla fungicidní, ale pouze fungistatická, a proto je nutné dlouhodobé léčení. Navíc se vyskytuje zkřížená rezistence jak u polyenových antibiotik, tak i u azolových sloučenin a konečně i cena těchto produktů je relativně vysoká, což snižuje možnost širokého použití ve veterinárním lékařství.

15

Proto existuje ještě další potřeba veterinárních farmaceutických prostředků, které jsou schopny účinně potlačovat průjmy u zvířat, které jsou podmíněny v podstatě nebo také účastí patogenních hub.

20

Podstata vynálezu

25

Zcela překvapivě bylo nyní zjištěno, že při použití bakterie *Escherichia coli* kmen DSM 6601 je možno tyto průjmy dobře léčit, a to i když selhala obvyklá medikace sloučeninami působícími proti houbám.

30

Escherichia coli, v následujícím textu zkracovaná jako *E. coli*, se vyskytuje v četných variantách, které se odlišují antigeny povrchu, povrchovými antigeny a antigeny bičíků a které je proto možné zařadit do velkého množství serologických typů. Zařazení podle serotypů však vždy nevypovídá o rozdílné virulenci mikroorganismu. Zástupci stejného serotypu mohou mít jak u lidí, tak i u zvířat rozdílný patogenní potenciál, který může v extrémním případě zasahovat od avirulentního až do vysoce patogenního stavu. Je však známo, že kmen *E. coli* DSM 6601 nepatří ani k lidským, ani ke zvířecím patogenům. Tento kmen se používá například v humánním lékařství jako substituční preparát u infekčních onemocnění střev salmonelami nebo shigelami, a to nejen u akutních, ale i u chronických stavů. Tento kmen *E. coli* se úspěšně používá při substituční terapii také u jiných případech porušení střevní flóry, například po léčení antibiotiky nebo ozáření. Zda se při tom v podstatě jedná pouze o potlačení patogenních kmenů bakterií odpovídajícími variantami *E. coli* nebo *Proteus* tímto zvláštním kmenem *E. coli*, tedy o snížení množství toxinů, nebo zda produkty látkové přeměny kmene *E. coli* DSM 6601 mají samy o sobě terapeutické účinky, není jednoznačně vyjasněno.

40

45

Na základě těchto známých vysvětlení mechanismu účinku živých bakterií *E. coli* však nebylo možno v žádném případě očekávat, že by mohlo léčení těmito živými kulturami mít překvapivou účinnost při infekci střevního traktu zvířat houbami a zvláště kvasinkami. V padesátých letech byly sice příležitostně používány nepatogenní kmeny *E. coli* ve veterinárním lékařství při onemocnění hovězího dobytka nebo vepřů spočívajícím také v průjmu, ale zde se jednalo o léčení poruch výživy selat (Fischer W., Erfahrungen eines praktischen Tierarztes bei der Behandlung kranker Ferkel in den Jahren 1945 bis 1950; dizertace, univerzita Mnichov 1950) nebo o léčení tzv. Semperovy nemoci u hovězího dobytka, jejíž příčinou byla často nedostatečná výživa způsobená geologickými podmínkami oblasti (Häfele W., Die "Semperkrankheit" eine Ernährungs- und Entwicklungsstörung des Rindes im Hochschwarzwald in der Umgebung von St. Blasien; dizertace, veterinární klinika, univerzita Mnichov 1952). Tyto dřívější pokusy pokusně používat koliformní kmeny u zvláštních onemocnění vepřů nebo hovězího dobytka byly zcela ojedinělé a v žádném případě nemohly naznačovat, že by bylo možno podnikat další pokusy

50

5 tohoto typu v případě průjmů způsobených bakteriemi. Tím překvapivější bylo zjištění, že kmen *E. coli* DSM 6601 má překvapivý účinek také při onemocněních střev, která jsou podmíněna zcela nebo v podstatě houbami, protože léčení houbových infekcí, zvláště jestliže je postižena sliznice střev, je zvláště obtížné, protože prostředky používané u bakteriálních infekcí nemají prakticky žádnou účinnost.

10 Dosud je o normální střevní flóře různých druhů zvířat překvapivě málo poznatků, ale napadení gastrointestinálního traktu houbami a zvláště kvasinkami je třeba vždy považovat za patologický jev.

15 Překvapivě rychlý účinek léčení kmenem *E. coli* DSM 6601 vede k závěru, že účinnost tohoto léčení nespočívá pouze v náhradě houbové flóry zdravou bakteriální flórou, ale že kmen ve velké míře přispívá ke zvýšení obranných schopností těla, přičemž je možno předpokládat, že produkty látkové přeměny tohoto kmene mají značný imunostimulační účinek.

15 V následující části bude vynález blíže osvětlen na příkladech.

20 Příklady provedení vynálezu

20 V podniku pro chov krav na mléko v Sasku, který má v průměru stav zvířat 1480 dojníc, 600 jalovic a mladých kusů a 185 telat se vyznačoval od začátku roku 1997 stav telat velmi dobrými výsledky při chovu, nízkou nemocností a úmrtností. Zjevná žaludeční a střevní onemocnění s průjmy byla výjimečně řídká. Ztráty telat se pohybovaly pod hranicí 3 %, vztaheno na počet živě narozených telat.

30 Na konci ledna 1997 došlo náhle k častému výskytu průjmů s klinicky markantními příznaky gastroenteritidy. Onemocnění začínala u telat ve věku 7 až 11 dnů, měla různou dobu trvání a vyznačovala se nemocností více než 90 % a úmrtností více než 10 %. Průběh onemocnění se vyznačoval následujícími příznaky: na počátku zelenavěžlutý průjem s konzistencí řídké kaše, v dalším průběhu nemoci byla stolice hlenovitá, stále řidší a většinou vodnatá. Tělesné teploty byly na počátku onemocnění mírně zvýšené (39,7 až 39,9 °C), ale v dalším průběhu rychle klesaly a dosahovaly již jen spodních hranic, zčásti v rozmezí 37,8 až 37,5 °C. Nemocná telata měla velkou chuť na sání a byla stále zesláblejší, takže v dalším průběhu nemoci ležela. Těžce nemocným zvířatům musela být podávána umělá výživa.

40 Po trvání onemocnění od 3 do 9 dnů došlo k ještě vyšším ztrátám. Prováděné sekce ukazovaly souhlasně nanejvýš nápadné nálezy, totiž kapalný, vločkovitý až mírně krvavý obsah střev a vícečetné vředovité záněty bачoru a slézu. V měsíci dubnu 1997 dosáhla četnost onemocnění téměř 100 % a úmrtnost stoupla na více než 15 %.

45 Mikrobiologická vyšetření obsahu žaludku a střev a vnitřních orgánů zpočátku neposkytla specifické výsledky, až v únoru 1997 byly u dvou uhynulých telat z obsahu žaludku a střev izolovány kvasinky rodu *Candida* (*C. glabrata* a *C. albicans*). Střevní patogenní *E. coli* nebyly nalezeny. Tyto kvasinky se podařilo prokázat u všech dalších pitev různých telat a u vyšetření vzorků stolice telat a jejich matek. Dále prováděná cílená vyšetření stolice a kolostra u krav a telat přinesla stejné výsledky. Rozšířená vyšetření na viry, jmenovitě koronaa rotaviry a na kryptosporidie poskytla pouze ve dvou případech uhynulých telat částice koronaviru a v jednom případě rotaviry.

50 Původ těchto kvasinek nebyl dlouhou dobu objasněn, až v březnu 1997 při zkoumání mláta použitého jako krmiva se podařilo prokázat kvasinky (převažující *Candida glabrata*) v množství $3,6 \times 10^7$ KBE/g krmiva.

Od počátku široce prováděná léčebná opatření jako dietní nápoje, antiflogistika, styptika, elektrolyty a prostředky pro povzbuzení srdce a krevního oběhu vedla k pouze neuspokojivým výsledkům. Po použití sulfonamidů a antibiotik zvířata uhynula 6 až 8 hodin po podání. Protože tyto způsoby léčení byly neúspěšné, byly použity léčebné prostředky obsahující jako účinné látky huminové kyseliny. Také tato opatření nepřinesla žádná významná zlepšení průběhu nemoci.

Z 236 telat živě narozených ve dvou měsících od 24. dubna do 23. června 1997 onemocněla všechna zvířata, přičemž 41 zvířat v tomto časovém období uhynulo, což odpovídalo 17,4 %, a to 29 zvířat na průjmy, což odpovídá 70,7 % ztrát a 8 zvířat na průjmy s doprovodnou broncho-pneumonií, což odpovídá 19,5 % ztrát a 4 zvířata z jiných příčin, což odpovídá 9,8 % ztrát.

V období od 24. června 1997 do 4. září 1997 byla potom podávána 300 nově narozeným telatům suspenze živé kultury *E. coli* kmen DSM 6601 v množství denně 15,0 ml na zvíře. Tato dávka nezávisela na hmotnosti a věku zvířat a byla podávána orálně, v trvání 10 až 13 dnů po porodu. V období od 24. června do 8. července 1997 bylo tímto způsobem ošetřeno 61 telat, z nichž dvě onemocněla na průjem, což odpovídá nemocnosti 3,3 %. Žádné ze zvířat na toto onemocnění neuhynulo.

V období od 9. června do 23. července 1997 bylo odpovídajícím způsobem ošetřeno 49 telat, z nichž žádné neonemocnělo na gastroenteritidu s průjmem. Úmrtnost na toto onemocnění byla také 0 %.

V období od 23. července do 6. srpna 1997 bylo ošetřeno 64 telat, z nichž dvě onemocněla na průjem, což je nemocnost 3,1 %. Žádné ze zvířat na toto onemocnění neuhynulo, takže úmrtnost je rovna nule.

Poté, co byly vyčerpány všechny dostupné terapeutické možnosti, bylo možno preventivním a terapeutickým použitím suspenze *E. coli* kmene DSM 6601 téměř úplně zabránit průjmům vyvolaným gastroenteritidami u sajících telat.

Použití jiných léčiv a dietních přísad mohlo být podstatně sníženo, takže náklady vynaložené na tyto prostředky se snížily o 70 %.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Použití *Escherichia coli* kmen DSM 6601 pro výrobu farmaceutických prostředků pro prevenci a léčení průjmů u zvířat podmíněných v podstatě patogenními houbami.

Konec dokumentu
