

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2012-561**
(22) Přihlášeno: **22.08.2012**
(40) Zveřejněno: **23.10.2013**
(**Věstník č. 43/2013**)
(47) Uděleno: **12.09.2013**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **23.10.2013**
(**Věstník č. 43/2013**)

(11) Číslo dokumentu:

304 104

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:
A61K 38/17 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

Desired immune response characteristics in an RSV vaccine: What infants tell us v: *Procedia in Vaccinology* 1 (2009) s. 45-48; Innate immune signals modulate antiviral and polyreactive antibody responses during severe respiratory syncytial virus infection v: *Journal of Infect. Dis.* (2009) 199 (8) s. 1128-1138; The BLyS family of ligands and receptors: an archetype for niche-specific homeostatic regulation v: *Immunol. Rev.* 202 s. 237-49 (2004) (abstrakt); Functional and clinical aspects of the B-cell-activating factor (BAFF) narrative review v: *Scand. J. Immunol.* 73(1) s. 1-7 (2011) (abstrakt); Innate control of B cell responses v: *Trends in Immunology* 32 (5) s. 202-211 (2011).

(73) Majitel patentu:

Masarykova univerzita, Brno, CZ

(72) Původce:

Bienertová Vašků Julie MUDr. Ph.D., Želešice, CZ

(74) Zástupce:

Inventia s.r.o., RNDr. Kateřina Hartvichová, Na Bělidle
3, Praha 5, 15000

(54) Název vynálezu:

**B-buněčný aktivující faktor pro zvýšení
slizniční imunity kojenců a přípravek jej
obsahující**

(57) Anotace:

Řešení se týká použití B-buněčného aktivujícího faktoru pro výrobu přípravku pro zvýšení slizniční imunity dětí v kojeneckém věku. Dále řešení popisuje přípravek pro perorální podání určený pro stimulaci slizniční imunity dětí kojeneckého věku, který obsahuje B-buněčný aktivující faktor

CZ 304104 B6

B–buněčný aktivující faktor pro zvýšení slizniční imunity kojenců a přípravek jej obsahující

5 Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká B–buněčného aktivujícího faktoru (BAFF, B–cell activating factor) pro použití pro zvýšení imunity kojenců a přípravků BAFF obsahujících.

10

Dosavadní stav techniky

B lymfocyty hrají významnou úlohu v rámci protilátkové i buněčné imunitní odpovědi. Nezralé B lymfocyty vznikají v kostní dřeni a migrují do sleziny, kde hovoříme o tzv. přechodných B buňkách a část z nich se diferencuje do podoby zralých B lymfocytů. Pro normální vývoj B lymfocytů je zásadní přítomnost B–buněčného aktivujícího faktoru (BAFF). BAFF je rovněž znám jako BlyS, TALL–1, zTNF4 a THANK, a je členem nadrodiny TNFSF13B) nekrotického faktoru tumorů (TNF, tumor necrosis factor).

BAFF aktivuje v B lymfocytech tvorbu specifických typů protilátek třídy IgG, IgA a IgE. Zdá se, že odchylky v signalizačních drahách B lymfocytů, které vyžadují BAFF, úzce souvisejí s řadou onemocnění, např. alergiemi, autoimunitními chorobami, infekcemi i některými nádorovými onemocněními, u kterých dochází k dysregulaci jak buněčné, tak humorální imunity (Cerutti A, Puga I, Cols M: Innate control of B cell responses. Trends Immunol. 2011 May;32(5):202–11; Lied GA, Berstad A.: 48. Functional and clinical aspects of the B–cell–activating factor (BAFF): a narrative review. Scand J Immunol. 2011 Jan;73(1):1–7.; Cancro MP: The BlyS family of ligands and receptors: an archetype for niche–specific homeostatic regulation. Immunol Rev. 2004 Dec;202:237–49).

Všeobecně je známo, že slizniční imunita trávicí trubice u dětí v kojeneckém věku krmených umělou výživou je oproti dětem kojeným narušena, což způsobuje významně vyšší výskyt infekcí zažívacího traktu u nekojených dětí.

35 Podstata vynálezu

Předmětem předkládaného vynálezu je B–buněčný aktivující faktor (BAFF) pro použití pro zvýšení slizniční imunity dětí v kojeneckém věku.

Předmětem předkládaného vynálezu je použití B–buněčného aktivujícího faktoru (BAFF) pro výrobu přípravku pro zvýšení slizniční imunity dětí v kojeneckém věku.

Předmětem předkládaného vynálezu je dále způsob zvýšení slizniční imunity dětí v kojeneckém věku, při němž se dětem v kojeneckém věku podává B–buněčný aktivující faktor (BAFF).

45

Kojenecký věk odpovídá věkovému rozmezí 0 až 2 roky.

V rámci předkládaného vynálezu bylo nově zjištěno, že BAFF se vylučuje u člověka ve značném množství do mateřského mléka. Hladiny BAFF v mateřském mléce dosahují v časném poporodním období extrémních hodnot, 25x převyšujících cirkulující hodnoty v séru matky, a tyto hladiny postupně během kojení exponenciálně klesají. Přítomnost BAFF v kolostru poskytuje silný maturační signál pro B lymfocyty v časném postnatálním období, přičemž důležitost tohoto signálu klesá s dobou uplynulou od porodu společně s růstem specifické imunity potomstva. Protože BAFF se účastní fyziologického přepnutí tvorby protilátek na podtypy IgG, IgA a IgE, což je mechanismus, kterým dochází ke změně místně vytvářených protilátek, uvolňování BAFF

55

do mateřského mléka ovlivní B lymfocyty slizniční lymfoidní tkáň trávicí trubice (GALT) novorozenců, což dítěti poskytuje významnou ochranu před infekcí z vnějšího prostředí. BAFF způsobuje akumulaci a maturaci B lymfocytů u novorozence i zvýšenou intestinální produkci IgA v GALT.

5

Dále je předmětem předkládaného vynálezu přípravek pro perorální podání určený pro stimulaci slizniční imunity dětí kojeneckého věku obsahující BAFF. S výhodou je takovým přípravkem umělé kojenecké mléko s obsahem BAFF nebo suspenze BAFF ve vodě.

10

Přípravek pro zvýšení slizniční imunity je určen pro častou umělou dětskou výživu pro děti v kojeneckém věku, tj. ve věkovém rozmezí 0 až 2 roky. Ve výhodném provedení je přípravek určen pro děti ve věku 0 až 6 měsíců.

15

Ve výhodném provedení vynálezu obsahuje přípravek 200 až 3500 pg BAFF/ml přípravku, výhodněji 400 až 2500 pg/ml, ještě výhodněji 500 až 2000 pg/ml, nejvýhodněji 500 nebo 2000 pg/ml.

20

Umělé kojenecké mléko je výrobek na bázi kravského mléka nebo mléka jiných zvířat a/nebo dalších složek, u kterých bylo prokázáno, že jsou použitelné pro výživu kojenců u člověka.

25

Umělé mléko připravené k finální konzumaci v souladu s pokyny výrobce by mělo mít energetickou hodnotu minimálně 250 kJ na 100 ml, přičemž energetická hodnota by neměla přesáhnout 295 kJ na 100 ml a na každých 100 kcal by mělo obsahovat minimální až maximální hladiny nutrientů definovaných v tabulce 1 (Koletzko B, Baker S, Cleghorn G., Neto UF, Gopalan S, Hernell O. Hock QS, Jirapinyo P, Lonnerdal B, Pencharz P, Pzyrembel H, Ramirez-Mayans J, Shamir R, Truck D, Yamashiro Y, Zong-Yi D.: Global standard for the composition of infant formula: recommendations of an ESPGHAN coordinated international expert group. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2005 Nov;41(5):584–99).

30

Codex Alimentarius Výboru pro potraviny a zemědělství Organizace spojených národů ve spolupráci se Světovou zdravotnickou organizací (WHO) dlouhodobě vyvíjí standardy pro potraviny i připravuje související texty, tak, aby bylo chráněno zdraví konzumenta a aby se zajistily globálně adekvátní výrobní procesy. Standard Codexu týkající se umělého mléka byl přijat v roce 1981 na základě vědeckých poznatků získaných v 70. letech 20. století a v současnosti podléhá přezkoumání. Jako součást tohoto procesu požádala komise Codexu v roce 2004 nutriční výbor ESPGHAN, aby zahájil proces konzultace s mezinárodní vědeckou komunitou, tak, aby došlo k vytvoření nových požadavků na zastoupení jednotlivých látek v mateřském mléce, které by lépe odrážely současný stav poznání na tomto vědeckém poli. Výbor ESPGHAN vytvořil mezinárodní expertní skupinu, která vytvořila v roce 2005 nová doporučení týkající se složení umělého mléka (Tabulka 1).

40

Složení umělých kojeneckých mlék jsou tedy odborníkům v daném oboru dobře známa.

Tabulka 1: Doporučené standardy pro přípravu umělého mléka dle ESPGHAN

Složka	jednotka	minimum	maximum
Energie	kcal/100 ml	60	70
Kravný mléčný protein	g/100 kcal	1,8	3
Celkový tuk	g/100 kcal	4,4	6,0
kyselina linolenová	g/100 kcal	0,3	1,2
kyselina alfa-linolenová	mg/100 kcal	50	-
poměr linolenová / alfa-linolenová kyselina		5:1	15:1
laurová a myristová kyselina	% v tuku	NS	20
trans-mastné kyseliny	% v tuku	NS	3
eruková kyselina	% v tuku	NS	1
celkové sacharidy	g/100 kcal	9	14
vitamín A	µg RE/ 100 kcal	60	180
vitamín D3	µg / 100 kcal	1	2,5
vitamín E	mg alfa-TE/ 100 kcal	0,5	5
vitamín K	µg / 100 kcal	4	25
thiamin	µg / 100 kcal	60	300
riboflavin	µg / 100 kcal	80	400
niacin	µg / 100 kcal	300	1500
vitamín B6	µg / 100 kcal	35	175
vitamín B12	µg / 100 kcal	0,1	0,5
kyselina listová	µg / 100 kcal	400	2000
kyselina pantothenová	µg / 100 kcal	10	50
vitamín C	mg / 100 kcal	10	30
biotin	µg / 100 kcal	1,5	7,5
železo	mg / 100 kcal	0,3	1,3
vápník	mg / 100 kcal	50	140
fosfor	mg / 100 kcal	25	90

poměr vápník/fosfor	mg / mg	1:1	2:1
hořčík	mg / 100 kcal	5	15
sodík	mg / 100 kcal	20	60
chlorid	mg / 100 kcal	50	160
draslík	mg / 100 kcal	60	160
mangan	μg / 100 kcal	1	50
fluor	μg / 100 kcal	NS	60
jód	μg / 100 kcal	10	50
selen	μg / 100 kcal	1	9
měď	μg / 100 kcal	35	80
zinek	mg / 100 kcal	0,5	1,5
cholin	mg / 100 kcal	7	50
myoinositol	mg / 100 kcal	4	40
L-karnitin	mg / 100 kcal	1,2	NS

Pozn.: NS = nespecifikováno

- 5 Vzhledem k tomu, že obecným trendem při výrobě umělého mléka je maximální podobnost s mlékem mateřským, je vhodné, aby hladiny BAFF v umělém mléce napodobovaly dynamiku hladin v mléce mateřském: proto je obzvláště výhodné, aby přípravky podle předloženého vynálezu, jedná-li se o umělá kojenecká mléka, obsahovaly 1500 až 3500 pg BAFF/ml mléka, s výhodou 2000 pg/ml pro děti ve věku 0 až 3 měsíce, a 400 až 800 pg/ml, s výhodou 500 pg/ml, pro děti ve věku 3 až 6 měsíců.

10 Přípravky podle vynálezu jsou vhodné zejména pro stimulaci slizniční imunity nedonošených novorozenců a nekojených novorozenců i starších dětí kojeneckého věku krmených umělým kojeneckým mlékem. Obzvláště velký účinek mají přípravky u dětí ve věku 0 až 6 měsíců.

15 Výhodou fortifikace kojeneckého mléka BAFF je rychlé nastartování adekvátní slizniční imunity dítěte, ustavení adekvátního mikrobiomu i rychlý rozvoj tolerance trávicího traktu dítěte vůči jednotlivým složkám umělého mléka.

20

Přehled obrázků

Obr. 1 znázorňuje obsah BAFF v krevním séru kojících matek v závislosti na čase od porodu.

25 Obr. 2 znázorňuje obsah BAFF v mateřském mléce kojících matek v závislosti na čase od porodu.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

5

Od sedmi kojících žen byly získány vzorky mateřského mléka a periferní žilní krve, přičemž tyto ženy měly spontánní, nekomplikované, fyziologické těhotenství a velikost novorozenců byla přiměřená gestačnímu věku (AGA). Vzorky byly odebírány vždy ve dvojici mateřské mléko-
 10 žilní krev matky, a to v době porodu (bylo-li už mléko přítomno), v den 1 až 3, 12 až 14, 28 až 30, 88 až 90 a 178 až 180 po porodu, přičemž během celého trvání studie byly děti pouze plně kojeny. Kritéria pro zařazení do studie zahrnovala: A) spontánní početí, B) nekomplikované jednočetné těhotenství, C) spontánní, nekomplikovaný porod, D) normální výsledky perorálního glukózového tolerančního testu (oGTT) mezi 24 až 28 týdnem těhotenství na základě definice WHO a E) velikost plodu přiměřenou gestačnímu stáří (AGA). Studie byla schválena Etickou
 15 komisí lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně v souladu s Helsinskou deklarací. Mléko bylo odebíráno manuální extrakcí z obou prsů v daných časových bodech studie, přičemž bylo-li to možné, bylo odebíráno 5 ml mléka (zejména v časovém bodě 1 a 2 bylo odebíráno tolik kolost-ra, kolik bylo možné). Koncentrace proteinu BAFF v mateřském séru a mléce byly stanoveny s použitím testovací soupravy BAFF ELISA (R&D Systems, Inc. Minneapolis, USA) podle
 20 pokynů výrobce. Rozmražené vzorky mléka byly nejdříve zbaveny lipidů centrifugací při 12000xg po dobu 15 min při 0 °C a poté rozředěny až 40krát kalibračním ředidlem v duplikátech pro testovací rozmezí (62,5 až 4000 pg/ml). Koeficienty variace mezi testy a v rámci testu (CV) byly u BAFF v mateřském mléce <6,0% a v mateřském séru <9,0%, s detekčním limitem 3,38 pg/ml.

25

Analýza proteinu BAFF v mateřském séru u celé studované skupiny žen po celé období neprokázala významné rozdíly v koncentracích BAFF mezi sledovanými časovými body [$F(5;38) = 3,09$, $p = 0,68$], ovšem koncentrace v mateřském mléce se během trvání studie dramaticky měnily [$F(5;42) = 33,08$, $p = 0,0000001$]. Pozorovali jsme konzistentní přítomnost BAFF v mateřském
 30 mléce, přičemž průměrná koncentrace BAFF v mléce byla v době porodu přibližně 25x vyšší než v séru [průměr $\pm$ SD: 32706 $\pm$ 26172 pg/ml], 6x vyšší v den 1 až 3 [průměr $\pm$ SD: 8769 $\pm$ 2481 pg/ml] a přibližně stejná v mléce a mateřském séru v den 12 až 14 [průměr $\pm$ SD: 1493 $\pm$ 892 pg/ml], následně hladiny BAFF v mléce klesly pod úroveň pozorovanou v periferní krvi matky [průměr $\pm$ SD: 1091 $\pm$ 526 pg/ml] v den 28 až 30, [průměr $\pm$ SD: 445 $\pm$ 245 pg/ml] v den 88
 35 až 90 a [průměr $\pm$ SD: 354 $\pm$ 335 pg/ml] v den 178 až 180.

V přiložených grafech jsou znázorněny změny obsahu BAFF v krevním séru (Obr. 1) a v mateřském mléce (Obr. 2) ve sledovaném období.

40

Příklad 2

Složení přípravku na bázi umělého kojeneckého mléka pro časnou umělou výživu (do konce druhého měsíce po porodu). Umělé kojenecké mléko se připravuje způsoby dobře známými
 45 odborníky v oboru.

Složka	jednotka	Minimální obsah složky	Maximální obsah složky
Energie	kcal/100 ml	60	70
Kravný mléčný protein	g/100 kcal	1,8	3
Celkový tuk	g/100 kcal	4,4	6,0
kyselina linolenová	g/100 kcal	0,3	1,2
kyselina alfa-linolenová	mg/100 kcal	50	
poměr linolenová / alfa-linolenová kyselina		5:1	15:1
laurová a myristová kyselina	% v tuku	NS	20
trans-mastné kyseliny	% v tuku	NS	3
eruková kyselina	% v tuku	NS	1
celkové sacharidy	g/100 kcal	9	14
vitamín A	µg RE/ 100 kcal	60	180
vitamín D3	µg / 100 kcal	1	2,5
vitamín E	mg alfa-TE/ 100 kcal	0,5	5
vitamín K	µg / 100 kcal	4	25
thiamin	µg / 100 kcal	60	300

riboflavin	µg / 100 kcal	80	400
niacin	µg / 100 kcal	300	1500
vitamín B6	µg / 100 kcal	35	175
vitamín B12	µg / 100 kcal	0,1	0,5
kyselina listová	µg / 100 kcal	400	2000
kyselina pantothenová	µg / 100 kcal	10	50
vitamín C	mg / 100 kcal	10	30
biotin	µg / 100 kcal	1,5	7,5
železo	mg / 100 kcal	0,3	1,3
vápník	mg / 100 kcal	50	140
fosfor	mg / 100 kcal	25	90
poměr vápník/fosfor	mg / mg	1:1	2:1
hořčík	mg / 100 kcal	5	15
sodík	mg / 100 kcal	20	60
chlorid	mg / 100 kcal	50	160
draslík	mg / 100 kcal	60	160
mangan	µg / 100 kcal	1	50
fluor	µg / 100 kcal	NS	60
jód	µg / 100 kcal	10	50
selen	µg / 100 kcal	1	9
měď	µg / 100 kcal	35	80
zinek	mg / 100 kcal	0,5	1,5
cholin	mg / 100 kcal	7	50
myoinositol	mg / 100 kcal	4	40
L-karnitin	mg / 100 kcal	1,2	NS
BAFF	pg/ ml hotového mléka	2000	3500

Příklad 3

Složení přípravku na bázi umělého kojeneckého mléka pro pokračování umělou výživu (do konce druhého měsíce po porodu). Umělé kojenecké mléko se připravuje způsoby dobře známými odborníky v oboru.

5

Součást	jednotka	Minimální obsah složky	Maximální obsah složky
Energie	kcal/100 ml	60	70
Kravný mléčný protein	g/100 kcal	1,8	3
Celkový tuk	g/100 kcal	4,4	6,0
kyselina linolenová	g/100 kcal	0,3	1,2
kyselina alfa-linolenová	mg/100 kcal	50	-
poměr linolenová / alfa-linolenová kyselina		5:1	15:1
laurová a myristová kyselina	% v tuku	NS	20
trans-mastné kyseliny	% v tuku	NS	3
eruková kyselina	% v tuku	NS	1
celkové sacharidy	g/100 kcal	9	14
vitamín A	µg RE/ 100 kcal	60	180
vitamín D3	µg / 100 kcal	1	2,5
vitamín E	mg alfa-TE/ 100 kcal	0,5	5
vitamín K	µg / 100 kcal	4	25
thiamin	µg / 100 kcal	60	300
riboflavin	µg / 100 kcal	80	400
niacin	µg / 100 kcal	300	1500
vitamín B6	µg / 100 kcal	35	175

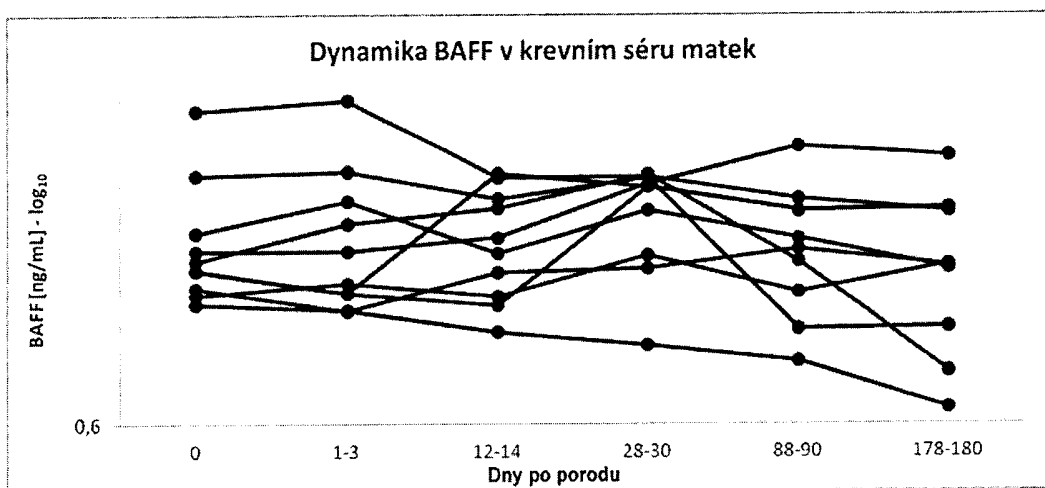
vitamín B12	µg / 100 kcal	0,1	0,5
kyselina listová	µg / 100 kcal	400	2000
kyselina pantothenová	µg / 100 kcal	10	50
vitamín C	mg / 100 kcal	10	30
biotin	µg / 100 kcal	1,5	7,5
železo	mg / 100 kcal	0,3	1,3
vápník	mg / 100 kcal	50	140
fosfor	mg / 100 kcal	25	90
poměr vápník/fosfor	mg / mg	1:1	2:1
hořčík	mg / 100 kcal	5	15
sodík	mg / 100 kcal	20	60
chlorid	mg / 100 kcal	50	160
draslík	mg / 100 kcal	60	160
mangan	µg / 100 kcal	1	50
fluor	µg / 100 kcal	NS	60
jód	µg / 100 kcal	10	50
selen	µg / 100 kcal	1	9
měď	µg / 100 kcal	35	80
zinek	mg / 100 kcal	0,5	1,5
cholin	mg / 100 kcal	7	50
myoinositol	mg / 100 kcal	4	40
L-karnitin	mg / 100 kcal	1,2	NS
BAFF	pg/ ml hotového mléka	500	800

PATENTOVÉ NÁROKY

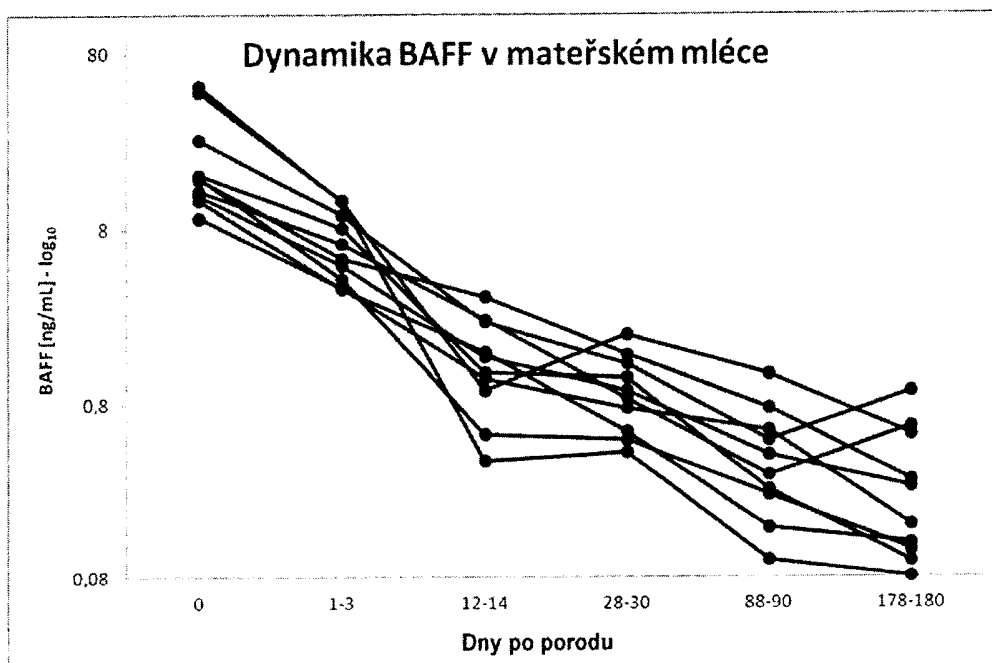
- 5 **1.** Použití B–buněčného aktivujícího faktoru pro výrobu přípravku pro zvýšení slizniční imunity dětí v kojeneckém věku.
- 2.** Přípravek pro perorální podání určený pro stimulaci slizniční imunity dětí kojeneckého věku, **v y z n a ě n ý t í m**, že obsahuje B–buněčný aktivující faktor.
- 10 **3.** Přípravek podle nároku 2, **v y z n a ě n ý t í m**, že přípravkem je kojenecké mléko obsahující B–buněčný aktivující faktor.
- 4.** Přípravek podle nároku 2, **v y z n a ě n ý t í m**, že přípravkem je suspenze B–buněčného aktivujícího faktoru ve vodě.
- 15 **5.** Přípravek podle nároku 2, **v y z n a ě n ý t í m**, že obsahuje 200 až 3500 pg B–buněčného aktivujícího faktoru/ml přípravku.
- 20 **6.** Přípravek podle nároku 5, **v y z n a ě n ý t í m**, že obsahuje 400 až 2500 pg B–buněčného aktivujícího faktoru/ml přípravku.

25

1 výkres



Obr. 1



Obr. 2

Konec dokumentu
