

# UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

# 36 625

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

*A61K 31/505* (2006.01)

*A61K 31/635* (2006.01)

*A61P 31/04* (2006.01)

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2022-40434**

(22) Přihlášeno: **04.11.2022**

(47) Zapsáno: **29.11.2022**

(73) Majitel:  
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.,  
Brno, Medlánky, CZ  
Tekro, spol. s r.o., Praha 4, Krč, CZ

(72) Původce:  
Ing. Kamil Šťastný, Ph.D., Brno, Ivanovice, CZ  
MVDr. Kateřina Nedbalcová, Ph.D., Brno, Jundrov,  
CZ  
MVDr. Monika Zouharová, Ph.D., Sentice, CZ  
MVDr. Katarína Matiašková, Brno, Lesná, CZ  
RNDr. Iva Bartejsová, Brno, Židenice, CZ  
Ing. Michaela Charvátová, Ph.D., Vanovice, CZ  
Mgr. Kristína Tošnerová, Brno, Líšeň, CZ  
Mgr. Michaela Višková, Šternberk, CZ  
Mgr. Michal Petreň, Dlouhá Loučka, CZ  
Ing. Martin Jeřábek, Ph.D., Brněnec, CZ  
Mgr. Jakub Ondrouch, Přerov, Přerov I-Město, CZ

(74) Zástupce:  
HARBER IP s.r.o., Dukelských hrdinů 567/52,  
170 00 Praha 7, Holešovice

(54) Název užitého vzoru:  
**Veterinární léčivý přípravek na bázi  
trimethoprimu a sulfamethoxazolu určený  
pro drůběž**

CZ 36625 U1

## Veterinární léčivý přípravek na bázi trimethoprimu a sulfamethoxazolu určený pro drůbež

### Oblast techniky

5

Předkládané technické řešení poskytuje veterinární léčivý přípravek s optimalizovanou dávkou kombinace antimikrobiálních substancí trimethoprimu a sulfamethoxazolu pro maximální účinnou prevenci a léčbu bakteriálních infekcí u drůbeže, zejména u masných plemen brojlera kura domácího.

10

### Dosavadní stav techniky

Antimikrobika hrají v humánní i veterinární medicíně nezastupitelnou roli pro léčbu bakteriálních infekcí a v současné době nejsou k dispozici žádná alternativní léčiva, která by zajistila léčbu bakteriálních infekcí. V posledních letech došlo k výraznému poklesu objevů a zavádění nových molekul antimikrobik do klinické praxe. Z tohoto důvodu je klíčovým problémem současné medicíny zachovat účinnost v současnosti využívaných antimikrobik, která je vážně ohrožena zvyšující se prevalencí rezistence mikroorganismů. K omezení vzniku a rozvoje rezistence zásadní měrou přispívá optimálně definované dávkování antimikrobik, které je vyvozeno na základě znalosti farmakokinetických (PK) a farmakodynamických (PD) vlastností daných látek, které definují potřebné expozice antimikrobiálních látek pro maximální účinek na bakterie.

Farmakokinetika popisuje pohyb léčiva v těle v závislosti na čase, zabývá se procesy absorpce léčiva z místa podání, distribuce v těle, metabolismu, konjugace a eliminace léčiva z organismu. Mezi nejčastěji používané PK parametry patří biologická dostupnost léčiva v krevním séru nebo v místě infekce v závislosti na čase (%) nebo distribuční objem  $V_d$ , který představuje intenzitu distribuce léčiva v krevním séru nebo do tělesných tkání. Další důležitý parametr je poločas eliminace ( $t_{1/2}$ ) – doba, za kterou koncentrace léčiva v organismu klesne na polovinu. Znalost ( $t_{1/2}$ ) umožňuje predikci času potřebného k eliminaci léčiva z organismu nebo akumulaci léčiva při opakovaném dávkování.

PD parametry jsou definované jako vztahy mezi křivkou koncentrace antimikrobika v séru jako zástupný klinický ukazatel pro koncentrace antimikrobika v místě infekce, poměr vrcholu křivky koncentrace a MIC (minimální inhibiční koncentrace) nebo MPC (mutant preventivní koncentrace) ( $C_{max}/MIC$  nebo  $C_{max}/MPC$ ), poměr plochy pod křivkou koncentrace a MIC nebo MPC ( $AUC/MIC$  nebo  $AUC/MPC$ ) a doba, po kterou koncentrace antimikrobika překročí MIC nebo MPC ( $T > MIC$  nebo  $T > MPC$ ). Stanovení  $T > MIC$  a  $T > MPC$  je důležité u antimikrobiálních látek s účinkem závislým na čase (např. beta-laktamová antibiotika nebo makrolidy). U antimikrobik s účinkem závislým na koncentraci (např. fluorochinolony nebo aminoglykosidy) je zásadní definovat  $C_{max}/MIC$  nebo  $AUC/MIC$ .

Vědecké a klinické studie a data k určení PK a PD vlastností antimikrobiálních látek, potřebné ve veterinární medicíně k predikci účinných dávkovacích schémat pro všechny typy antimikrobik proti všem běžným infekcím a platné pro všechny druhy zvířat, nejsou v žádných databázích dohledatelné. V současné době jsou ve veterinární medicíně PK a PD vlastnosti u používaných veterinárních antimikrobik definovány v převážné většině jen pro velká hospodářská zvířata. Protože je velmi dobře známo, že se PK a PD parametry velmi liší mezi cílovými druhy zvířat, dokonce i mezi jednotlivými věkovými kategoriemi v rámci druhu, nelze definovaná data zobecnit pro všechna zvířata.

U drůbeže a zejména u brojlerů kura domácího byly PK a PD vlastnosti antimikrobik definovány pouze u omezeného spektra antimikrobiálních látek a dostupná data byla generována před desítkami let, byla měřena jinými, méně přesnými metodami než je požadováno dnes podle směrnic EU. Tehdy chovaná plemena kura domácího měla jiný genetický základ v rámci šlechtění, brojleři

dnes nejčastěji chovaných plemen Ross a Comb jinak využívají potravu, mají jiné denní přírůstky, což souvisí s množstvím přijímané potravy a tekutin a tím i možností medikovat krmivo nebo pitnou vodu. Z důvodů nedostatku relevantních dat nejsou možné registrace nových povolených veterinárních léčivých přípravků pro drůbež.

5

Situace je nyní taková, že jsou kuřatům z nutnosti podávána léčiva, která nemají požadovanou účinnost, a tím je umožněn vznik a šíření rezistentních bakteriálních populací původců nejrůznějších onemocnění nebo jsou podávána antimikrobika kategorie „B“ (rozdělení antimikrobik podle Evropské lékařské agentury), takzvaná antimikrobika 3. volby, která by měla být podávána jen v krajním případě, kdy ostatní možnosti léčby selžou a jejich možnost použití ve veterinární medicíně je ještě více omezená než v medicíně humánní. Dokonce se vážně uvažuje o jejich zákazu používání k léčbě zvířat. Jsou to účinná antimikrobika s širokým spektrem účinku, ke kterým je třeba zachovat citlivost bakteriálních populací. V případě brojlerových kuřat a drůbeže obecně se jedná především o fluorochinolony, zejména hojně používaný enrofloxacin, který je účinný na většinu vyskytujících se infekcí bakteriálního původu u kuřat, je relativně levný a má krátké ochranné lhůty. Časté používání enrofloxacinu může zvýšit prevalenci bakterií rezistentních na fluorochinolony a snížit účinnost terapie ostatními chinolony u infekcí lidí i zvířat z důvodu možné zkřížené rezistence. Přesto je aplikace enrofloxacinu v chovech drůbeže vzhledem k širokému spektru účinnosti proti infekcím různé etiologie mnohem častější v porovnání s jinými antimikrobiálními látkami. Tyto informace vycházejí z údajů o spotřebách antimikrobiálních látek v ČR, které jsou od roku 2000 v souladu se Zákonem o léčivech a Akčním plánem Národní antibiotické politiky (Usnesení vlády, 2009) shromažďovány a analyzovány v Ústavu pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv v Brně (ÚSKVBL).

Cílem předkládaného technického řešení je poskytnout alternativní veterinární léčivo k enrofloxacinu a dalším fluorochinolonom.

25

#### Podstata technického řešení

30

Předpokládané technické řešení poskytuje veterinární léčivý přípravek s optimalizovanou dávkou a složením antimikrobiálních substancí v kombinaci sulfamethoxazolu s trimethoprimem pro dosažení maximální účinnosti léčby bakteriálních infekcí u cílového druhu zvířete, zejména u chovných plemen brojlerů kura domácího, stanovených na základě provedených nových farmakokinetických studií.

35

Předkládané technické řešení vytváří podmínky k tomu, aby mohla být veterinárním lékařům zaměřeným na problematiku chovu drůbeže nabídnuta alternativní léčiva za účelem omezení spotřeby enrofloxacinu a dalších fluorovaných chinolonů. Moderními metodami hmotnostní spektrometrie byla získána jedinečná data pro definování hodnot PK a PD parametrů trimethoprimu a sulfamethoxazolu, které jsou podávány v kombinaci pro brojlerová kuřata, které by v mnohých případech mohly používání enrofloxacinu u kuřat nahradit. Byla stanovena účinnost těchto antimikrobiálních látek z hlediska závislosti jejich koncentrace v krvi brojlerových kuřat na čase po jednorázovém a opakovaném podání léčiva a byla stanovena jedinečná eliminační křivka těchto látek, která je jedinečná u brojlerových kuřat. Z těchto údajů byl navržen nový optimální přípravek obsahující kombinaci trimethoprimu se sulfamethoxazolem pro brojlery kura domácího, včetně popisu léčby, způsobu podávání, doby léčby a optimálního dávkování.

40

45

Přestože mechanismus účinků obou použitých substancí je rozdílný, tak společně v kombinaci obě účinné látky blokují dva následné stupně biosyntézy DNA, které jsou zásadní pro bakterie, které si samy syntetizují kyselinu dihydrolistovou a tetrahydrolistovou. Sulfamethoxazol soutěží na základě anti-metabolické interference s para-aminobenzoovou kyselinou o enzym dihydropterát-syntetázu a brání tak tvorbě dihydropteroové kyseliny. Trimethoprim kompetitivně inhibuje enzym dihydrofolát-reduktázu a tím zabraňuje redukci kyseliny listové na dihydrolistovou a tetrahydrolistovou kyselinu. Tímto vzájemným dvojím působením účinných substancí dochází

50

55

k depleci základního kofaktoru biosyntézy nukleových kyselin (DNA). Cílem kombinovaného působení sulfamethoxazolu a trimethoprimu je snížení rizika vzniku rezistentních kmenů bakterií a dosažení maximálního synergického antimikrobního účinku vůči řadě grampozitivních i gramnegativních bakterií.

5

Předmětem předkládaného technického řešení je tedy veterinární léčivý přípravek pro léčbu bakteriálních infekcí u drůbeže, vhodný zejména pro podání kuřatům, který obsahuje jako účinnou složku kombinaci látek sulfamethoxazol (sulfamethoxazolium) s trimethoprim (trimethoprimum) v hmotnostním poměru 4:1. S výhodou je přípravek určen pro dávkování 20 mg účinné složky na

10

1 kg živé hmotnosti (v kombinaci 16 mg sulfomethoxazolu + 4 mg trimethoprimu).

Sulfamethoxazol (CAS: 723-46-6) a Trimethoprim (CAS: 738-70-5) jsou s výhodou v chemické čistotě odpovídající Evropskému lékopisu (Ph.Eur.).

15

Bakteriálními infekcemi se rozumí zejména infekce dýchacích cest, infekce kůže a infekce měkkých tkání u drůbeže, s výhodou u brojlerů kura domácího.

20

Takto je poskytnuta přesně definovaná a bezpečná léčivá směs s optimálně stanoveným dávkováním, vhodná pro masné i nosné linie drůbeže, která ve vysoké účinnosti dosahuje maximálního synergického antimikrobního účinku vůči řadě grampozitivních i gramnegativních bakterií a zároveň významně snižuje rizika vzniku rezistentních kmenů těchto bakterií.

25

Veterinární léčivý přípravek je vhodný zejména pro podávání v rané fázi výkrmu drůbeže, optimálně po prvních 14 dnech života drůbeže, ale lze ho podat i v pozdějších dnech v průběhu celého cyklu výkrmu za předpokladu dodržení předepsaných ochranných lhůt.

Veterinární léčivý přípravek podle předkládaného technického řešení má oproti všem podobným, doposud používaným produktům, tyto technické výhody:

30

- kombinace antimikrobiálních léčivých látek volně použitelných ve veterinární medicíně bez jakýchkoli restrikcí, částečných omezení či zákazu použití,
- doporučené dávkování je optimalizováno pro drůbež, zejména pro kura domácího, v závislosti na dosažené hmotnosti a souvisejícím věku a vede k významnému snížení užívání (nadužívání) antimikrobik,

35

- omezení rozvoje, a především šíření rezistence bakterií ke kombinaci trimethoprimu a sulfamethoxazolu vlivem selekčního tlaku,

40

- navržené významné snížení účinné dávky antimikrobik vede k celé řadě pozitivních efektů v rámci využívání těchto léčiv ve veterinární medicíně, například: účinnou ochranu kura domácího s minimalizovanou zátěží jeho organismu, zkrácením ochranné lhůty pro použití v potravinovém řetězci, snížení reziduální zátěže životního prostředí po vyloučení zbytků léčiv a jejich metabolitů z organismu na farmách a jejich okolí, zejména užití u odpadních vod.

45

Veterinární léčivý přípravek může být podán v jedné dávce nebo v opakované dávce po dobu 3 dnů, s výhodou 14 denním kuřatům.

50

Přípravek lze podávat optimálně v pitné vodě nebo krmivu. Pro dosažení homogenního pokrytí celého hejna je však vhodnější aplikace léčiva v pitné vodě. Veterinární léčivý přípravek může dále obsahovat alespoň jednu pomocnou látku, vybranou ze skupiny zahrnující nosiče, jako jsou přírodní polymery (například chitosan, kyselina alginová, karageny, arabská guma, pektiny) nebo syntetické polymery (například kopolymery na bázi *N*-(2-hydroxypropyl) methakrylamidu, deriváty poly(ethylenglykolu)) nebo látky upravující chuťové vlastnosti (například cukry: laktózu, maltózu, kyselinu citronovou).

Veterinární léčivý přípravek dle předkládaného technického řešení lze připravit prostým smícháním sulfamethoxazolu s trimethoprimem ve výše uvedeném poměru, popřípadě jejich rozpuštěním ve vodě nebo fyziologickém roztoku. Případně může být k účinné složce přidána pomocná látka, jako jsou přírodní polymery (například chitosan, kyselina alginová, karageny, arabská guma, pektiny) nebo syntetické polymery (například kopolymery na bázi *N*-(2-hydroxypropyl) methakrylamidu, deriváty poly(ethylenglykolu)) nebo látky upravující chuťové vlastnosti (například cukry: laktózu, maltózu, kyselinu citronovou).

#### 10 Objasnění výkresů

Obrázek 1: Chromatogram a hmotnostní spektrum trimethoprimu v reálném vzorku séra a v čase  $T_{max}$  farmakokinetické křivky po orální aplikaci brojleru kura domácího. Všechny naměřené chromatografické data byly automaticky integrovány a kvantitativní koncentrace byly stanoveny na základě matricové (sérum) kalibrační křivky s přidavkem izotopicky značených interních standardů Trimethoprim-D9 a Sulfamethoxazole-13C6.

Obrázek 2: Časový průběh PK křivky pro změnu koncentrace v séru brojlerů po jednorázové orální aplikaci Sulfamethoxazolu, dávkování 27,5 mg/kg živé hmotnosti (body na křivce představují průměr + SD).

Obrázek 3: Časový průběh PK křivky pro změnu koncentrace v séru brojlerů po jednorázové orální aplikaci Trimethoprimu, dávkování 5,5 mg/kg živé hmotnosti (body na křivce představují průměr + SD).

#### Příklad uskutečnění technického řešení

V rámci předkládaného technického řešení byla provedena řada PK experimentů s masným plemenem ROSS kura domácího, který má dnes největší zastoupení v chovech brojlerů na hospodářských farmách. Prvotním cílem provedených PK studií bylo najít vhodné veterinární léčivo, které by mohlo být minimálně ekvivalentem, případně mohlo úspěšně nahradit dnes nejrozšířeněji používané u brojlerových kuřat a drůbeže obecně enrofloxacin. Hledání vhodné náhrady za enrofloxacin bylo dáno několika důvody. Hlavním důvodem bylo, že antimikrobiální léčiva na chemické bázi fluorochinolonů (nejčastěji používaný u drůbeže, již výše jmenovaný enrofloxacin) patří dle nové legislativy Evropské lékařské agentury (EMA) do kategorie antimikrobik kategorie „B“, takzvaná antimikrobika 3. volby, která by měla být podávána jen v krajním případě, kdy ostatní možnosti léčby selžou a jejich možnosti použití ve veterinární medicíně je ještě více omezená než v medicíně humánní. Dokonce se dnes diskutuje a vážně uvažuje o jejich úplném zákazu používání k léčbě zvířat. Dalším důvodem, neméně podstatným, bylo, že v současné době jsou ve veterinární medicíně PK a PD vlastnosti u používaných veterinárních antimikrobik definovány v převážné většině jen pro velká hospodářská zvířata, nikoli však pro drůbež. Dále, PK a PD vlastnosti jsou v převážné většině případů definovány na základě zastaralých analytických metod, používaných před více než 30 lety (především malá citlivost a velmi špatná schopnost identifikace cílené chemické molekuly). A protože je obecně velmi dobře známo, že farmakokinetické a farmakodynamické parametry se podstatně liší mezi cílovými druhy zvířat, dokonce i mezi jednotlivými věkovými kategoriemi v rámci druhu, nelze definovaná data zobecnit pro všechna zvířata.

Na základě znalostí byly vybrány léčivé substance skupiny ze skupiny sulfonamidů v kombinaci s trimethoprim jako vhodná náhrada. Využitím závislosti mezi chemickou strukturou a účinkem v kombinaci s mikrobiologickým testováním účinnosti *in vitro* byla vybrána jako nejúčinnější kombinace sulfamethoxazol s trimethoprim. A dále bylo opakovaně prokázáno, v uskutečněných farmakokinetických studiích provedených na cílovém druhu brojlerech kura domácího při použití aplikační dávky léčiva obecně používané a odvozené od velkých hospodářských zvířat, že skutečně

dosažené plazmatické koncentrace v bodě C<sub>max</sub> (maximální plasmatické koncentrace) byly u testovaných brojlerů pro sulfamethoxazol přibližně 10 x vyšší a u trimethoprim byly koncentrace 10 x vyšší ve srovnání s uváděnými hodnotami.

#### 5 Farmakokinetika – sulfamethoxazol a trimethoprim

V příkladu provedení byly použity tyto čisté léčivé substance Sulfamethoxazol (Registrační číslo CAS: 723-46-6) a Trimethoprim (Registrační číslo CAS: 738-70-5), v chemické čistotě odpovídající Evropskému lékopisu (Ph.Eur.). Pro kvantitativní hodnocení pohybu léčivých 10 substancí v organismu cílového zvířete v závislosti na čase, který závisí v hlavní míře na daném léčivu, na cestě podání a na působení organismu na léčivo, a s použitím matematických přístupů, byly určeny PK parametry, které nám umožnily srovnávat léčivé substance mezi sebou a stanovit optimální dávku. PK experimenty byly provedeny na cílovém zvířeti - testovacím systému brojlerů kura domácího, hybridní linie ROSS 308. Druh hybridní linie neměl na výsledek vliv, hybridní 15 linie ROSS byla zvolena z důvodu snadné dostupnosti brojlerů v chovech v České republice a výhodné standardizaci. Dnes jsou k výkrmu určeny speciální masné hybridy, a to převážně ROSS a COBB, kteří tak patří mezi nejrozšířenější plemena v užitkových chovech. Pro tyto hybridy jsou stanoveny propracované technologické postupy výkrmu a spočítány přesné parametry užitkovosti, které by měli jedinci v daném dni věku při dodržení stanovených podmínek dosahovat, a proto se 20 dal pokus lépe standardizovat. Výběr biologického testovacího systému byl dále založen na získání vzorků o dostatečném objemu. Biologické testovací systémy byly zdraví jedinci cílového druhu, u nichž bylo možno očekávat bezproblémový příjem krmiva a vody, a tím zabezpečit příjem testované položky.

25 Do provedených studií byli zařazeni jednodenní brojleři obojího pohlaví, poměr pohlaví neměl na studii vliv. Pokusná zvířata byla krmena *ad libitum* standardní krmnou směsí dle receptury BR1 (BIOSTAN), odpovídající dané věkové kategorii bez antikocidů z důvodu možných interferencí s testovanými léčivými látkami a ovlivnění správnosti výsledků při analýzách biologického 30 materiálu. Krmná směs byla používána po celou dobu studií. Po celou dobu pokusu byl zajišťován welfare jednotlivých brojlerů v souladu se zákonem 246/1992 Sb. Klimatické a světelné podmínky, velikost prostor ustájení, krmení a napájení zvířat bylo nastaveno tak, aby odpovídalo požadavkům na odchov brojlerů, bylo denně kontrolováno a upravováno. Manipulace s brojlerem byla šetrná a byla omezena na nejmenší možnou míru. Brojleři byli chováni ve větších skupinách, v počtech odpovídajících prostoru chovného boxu, po dobu 14 dnů potřebných k aklimatizaci. K jejich 35 rozdělení do menších skupin došlo až v den začátku aplikace dávek testovaných léčiv (15. den studie). Průměrná živá hmotnost brojlerů v den aplikace (16. den života) dle technologického postupu činí 593 g, skutečně naměřená hmotnost byla v rozmezí 450 – 535 g. Roztok pro aplikaci byl připraven naředěním veterinárního léčivého přípravku o fixní kombinaci sulfamethoxazolu s trimethoprimem v hmotnostním poměru 5 : 1 do pitné vody, takto připravený roztok byl kuřatům 40 jednotlivě aplikován v objemu 1 ml *per orálně* pomocí stříkačky se sondou.

Postupně byly uskutečněny dvě PK studie. První studie byla „pilotní“. V obou studiích probíhala v experimentálních stájích VÚVeL experimentální část studie se zvířaty a laboratorní část studie byla provedena ve společnosti TEKRO s.r.o. Praha.

45 Kinetika změny plazmatických koncentrací cílových analytů sulfamethoxazolu a trimethoprimu v závislosti na časových intervalech byla měřena na analytických zařízeních využívajících vysoce citlivých a přesných metod na základě kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií typu triple-Q (LC-MS/MS) a orbitrap s vysokým rozlišením (LC-MS/MS-HR). Použité analytické 50 metody pro stanovení koncentrací cílových analytů ve vzorcích kuřecích sér byly validovány v plném rozsahu dle mezinárodních standardů pro biochemické metody ve veterinární medicíně: pokynu CVMP/VICH/591/98 VICH GL 2 a pokynu EMEA/CVMP/VICH/463202/2009 VICH GL 49. Základní parametry hmotnostní spektrometrie pro molekuly cílových analytů jsou uvedeny v následující tabulce (Tabulka 1) a příklad naměřeného chromatografického spektra s vyznačenými integrovanými plochami píků pro určení koncentrace analytu trimethoprimu 55

a hmotnostního spektra v odpovídajícím retenčním čase analytu pro konfirmační identifikaci molekuly analytu je uveden na Obrázku 1.

- 5 Stanovení základních farmakokinetických parametrů ( $C_{max}$ ,  $T_{max}$  a AUC) bylo provedeno v souladu s mezinárodními standardy. Vypočtené hodnoty základních PK parametrů veterinárních léčivých substancí trimethoprimu a sulfamethoxazolu v séru brojlerů po jednorázové a opakované orální aplikaci -  $C_{max}$ ,  $T_{max}$  a AUC jsou uvedeny v následujících tabulkách (Tabulky 2 a 3). Příklady grafického vyhodnocení průběhu farmakokinetických křivek je uveden na Obrázcích 2 a 3.

10

Tabulka 1. Identifikace analytu trimethoprimu a sulfamethoxazolu pomocí parametru MA (mass accuracy) v hmotnostní spektrometrii s využitím vysokého rozlišení  $RP = 70\ 000$  (FWHM).

Analyt	Elementární složení	m/z	MA (ppm)	Elementární složení produktového iontu	m/z	MA (ppm)	RT (min)
		prekurzorový iont (Da)			produktový iont (Da)		
Trimethoprim	$[C_{14}H_{19}N_4O_3]^+$	291.145 17	-1.03	$[C_{12}H_{13}N_4O_3]^+$	261.098 22	-1.91	1.53
				$[C_3H_7N_4]^+$	123.066 51	-0.08	1.53
Trimethoprim-d <sub>9</sub>	$[C_{14}H_{10}D_9N_4O_3]^+$	300.201 66	-2.03	$[C_{12}H_{10}D_3N_4O_3]^+$	264.117 05	-2.95	1.51
Sulfamethoxazol	$[C_{10}H_{12}N_3O_3S]^+$	254.059 39	-0.08	$[C_6H_6NO_2S]^+$	156.011 38	0.19	3.81
				$[C_6H_6NO]^+$	108.044 62	2.13	3.81
Sulfamethoxazol- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	$[C_4^{13}C_6H_{12}N_3O_3S]^+$	260.079 52	0.04	$[^{13}C_6H_6NO_2S]^+$	162.031 5	-0.06	3.82

5

Pozn.: FWHM = full width at half maximum; MA = mass accuracy; MS = mass spectrometry (hmotnostní spektrometrie); RP = resolving power (rozlišovací schopnost); RT = retenční čas



*Farmakokinetické vlastnosti (experimentálně ověřené v provedených studiích)*

## Absorpce

- 5 Po perorálním podání brojlerům se obě léčivé látky rychle a velmi dobře absorbují z gastrointestinálního traktu do systémové cirkulace.

## Distribuce

- 10 Maximální koncentrace ( $C_{\max}$ ) každé složky v séru bylo dosaženo za krátkou dobu po jednorázovém podání: hodnoty  $T_{\max}$  se pohybují okolo 1 hodiny. Maximální sérové koncentrace vykazují výrazné rozdíly u každého ošetřeného zvířete, naměřeny byly na hladinách  $C_{\max} = 1,3$  až  $2,1 \mu\text{g/ml}$  pro trimethoprim, resp.  $C_{\max}$  v rozmezí  $47$  až  $59 \mu\text{g/ml}$  sulfamethoxazolu. Distribuce obou účinných složek byla u brojlerů rozdílná; trimethoprim má více lipofilní fyzikálněchemický
- 15 charakter, tedy lépe pronikal do tkání, naopak sulfamethoxazol má více hydrofilní charakter, z tohoto důvodu se lépe distribuoval v intersticiálním prostoru a v séru byly naměřeny výrazně vyšší koncentrace. Distribuční objem  $V_d$  sulfamethoxazolu byl  $267 \text{ ml}$  a trimethoprimu byl  $2093 \text{ ml}$  po jednorázové aplikaci, a  $176 \text{ ml}$  u sulfamethoxazolu a  $2677 \text{ ml}$  u trimethoprimu po opakované aplikaci (3 dny).

20

## Biotransformace

Obě složky kombinace byly primárně metabolizovány v játrech, sulfamethoxazol hlavně acetylací a konjugací s kyselinou glukuronovou, trimethoprim hlavně oxidací a hydroxylací.

25

## Eliminace

- Obě léčivé substance a jejich metabolity se vylučují ledvinami a díky jejich fyzikálně chemickým vlastnostem (hydrofilitě/lipofilitě) byla eliminace ze séra rychlejší u trimethoprimu v porovnání s sulfamethoxazolem. Eliminační poločas  $t_{1/2}$  byl u trimethoprimu  $< 1,5$  hodiny, zatímco eliminační poločas  $t_{1/2}$  sulfamethoxazolu byl v rozmezí  $2$  až  $3$  hodiny. A v souladu s tím byly i odpovídající vyčíslené hodnoty  $Cl$  (clearance), vyšší u trimethoprimu  $15,8 \text{ ml/min}$  po jednorázové aplikaci,  $21,5 \text{ ml/min}$  po opakované aplikaci a nižší u sulfamethoxazolu  $1,1 \text{ ml/min}$  po jednorázové aplikaci, respektive  $0,8 \text{ ml/min}$  po opakované aplikaci. Měřitelné koncentrační hladiny na úrovni
- 30 LOQ (Limit kvantifikace daný použitou analytickou metodou) těchto substancí v krvi (séru) brojlerů, lze nalézt ještě v čase  $6$  hodin u trimethoprimu, v čase  $14$  hodin, po jednorázové aplikaci odpovídající dávky.

35

Tabulka 2. Přehled farmakokinetických parametrů fixní kombinace účinných látek Sulfamethoxazolu a Trimethoprimu při dávkování 33 mg (27,5 mg + 5,5 mg) na 1kg živé hmotnosti po jednorázovém a opakovaném podání; pilotní PK studie ( $C_{max}$  je maximální koncentrace v séru,  $T_{max}$  je čas maximální koncentrace v séru,  $k_{el}$  je rychlostní konstanta absorpce,  $t_{1/2}$  značí eliminační poločas,  $AUC_t$  značí plochu pod křivkou koncentrace v čase od 0 do t,  $AUC_{\infty}$  značí celkovou plochu pod křivkou koncentrace)

Parametr + SD	Jednorázové podání		Opakované podání (3 dny)	
	Sulfamethoxazol	Trimethoprim	Sulfamethoxazol	Trimethoprim
$C_{max}$ (µg/ml)	47,1 ± 15,3	2,1 ± 1,0	35,58	1,59
$T_{max}$ (h)	1	1,5	1	2,2
$k_{el}$ (1/h)	0,004 6 ± 0.000 3	0,009 ± 0.001	-	-
$t_{1/2}$ (h)	1,92	0,88	1,64	0,75
$AUC_t$ (µg.h/ml)	89,676 ± 26,9	2,901 ± 1,4	85,86 ± 24,1	2,702 ± 1,2
$AUC_{\infty}$ (µg.h/ml)	94,612 ± 28,4	2,907 ± 1,5	91,10 ± 25,2	2,705 ± 1,2

Tabulka 3. Přehled farmakokinetických parametrů fixní kombinace účinných látek Sulfamethoxazolu a Trimethoprimu při dávkování 45 mg (37,5 mg + 7,5 mg) na 1kg živé hmotnosti po jednorázovém a opakovaném podání; PK druhé studie ( $C_{max}$  je maximální koncentrace v séru,  $T_{max}$  je čas maximální koncentrace v séru,  $k_{el}$  je rychlostní konstanta adsorbce  $k_a$  je rychlostní konstanta eliminace,  $t_{1/2}$  značí eliminační poločas,  $AUC$  značí plochu pod křivkou koncentrace,  $V_D$  značí distribuční objem,  $Cl$  značí clearance)

Parametr ± SD	Jednorázové podání		Opakované podání	
	Sulfamethoxazol	Trimethoprim	Sulfamethoxazol	Trimethoprim
$C_{max}$ (µg/ml)	58,657	1,289	95,790	1,133
$T_{max}$ [min]	65,51	47,30	49,28	36,37
$k_c$ [min <sup>-1</sup> ]	0,00415±0,00018	0,00755 ± 0,00036	0,00462±0,00018	0,00802±0,00053
$k_a$ [min <sup>-1</sup> ]	0,03793 ± 0,00582	0,04554 ± 0,00898	0,05481±0,01227	0,06597±0,01557
$t_{1/2}$ [min]	167,06±6,08	91,80±3,56	149,94±4,89	86,45±4,66
AUC (SMX [µg/ml/min])	12,79±2,93	176,55±38,03	14,90±3,35	149,77±72,82
TMP [ng/ml/min])				
$V_D$ [ml]	267,3±33,6	2092,8±257,9	175,8±22,4	2676,7±411,3
$Cl$ [ml/min]	1,109	15,799	0,813	21,457

#### *Antimikrobiální účinnost sulfamethoxazol s trimethoprim*

Inhibiční účinnost kombinace trimethoprimu a sulfamethoxazolu byla hodnocena stanovením minimálních inhibičních koncentrací (MIC) této kombinace u 114 terénních izolátů aviárně patogenní *Escherichia coli* (APEC) provedením bujónové mikrodiluční metody podle mezinárodně závazných metodik vydaných European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) a Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) (Tabulka 4).

V mikrotitračních destičkách byla v ředící řadě 1:2 naředěna kombinace trimethoprimu a sulfamethoxazolu v hmotnostním poměru 1:19. Testované koncentrace trimethoprim/sulfamethoxazol byly v rozmezí 0,5/9,5 mg/l až 64/1216 mg/l. Do každé jamky bylo podle přesně uvedeného postupu (EUCAST, CLSI) inokulováno požadované množství bakteriální kultury o požadované denzitě. Po následné kultivaci 18 hodin při 35 °C byly odečítány výsledky. Jako MIC byla zaznamenána první koncentrace testované kombinace trimethoprimu a sulfamethoxazolu v ředící řadě, která viditelně zabránila růstu bakteriální kultury (čirá jamka bez zákalu). Jako kontrola kvality testování bylo provedeno souběžné testování referenčního kmene *E. coli* ATCC 25922, u kterého je stanoveno odpovídající rozmezí naměřené koncentrace pro kombinaci trimethoprimu a sulfamethoxazolu.

Rozdělení izolátů do kategorií citlivosti (citlivé a rezistentní) bylo provedeno podle interpretačních kritérií (= breakpointů) uvedených pro *E. coli* (Enterobacteriales) v EUCAST. Citlivé izoláty mají MIC v rozmezí od  $\leq 0,5/9,5$  mg/l do 2/38 mg/ml a rezistentní izoláty mají hodnotu MIC vyšší než 4/76 mg/l.

Tabulka 4. Distribuce MIC (minimální inhibiční koncentrace) u izolátů APEC (n = 114)

Koncentrace trimethoprim/sulfamethoxazol	Počet izolátů	Vyjádřeno v %
>64/1216	20	17,6
64/1216	2	1,8
32/608	0	0
16/304	0	0
8/152	0	0
4/76	1	0,9
2/38	1	0,9
1/19	3	1,6
$\leq 0,5/9,5$	87	76,3

#### Stanovení optimálního účinného dávkování pro cílové zvíře – brojler kura domácího

Použití klinicky aplikované farmakokinetiky na cílovém druhu zvířete bylo hlavním nástrojem k predikci koncentrace léčiva v ustáleném stavu, druhým nástrojem bylo použití hodnocení antimikrobní účinnosti „*in vitro*“. Na základě těchto použitých experimentálních přístupů bylo možno optimalizovat a individualizovat dávkování za různých podmínek (různá dávka, jednorázová nebo opakovaná aplikace). Porovnáním  $C_{max}$  a AUC s mikrobiologickou účinností každé ze zkoumaných účinných látek byla stanovena účinná dávka jejich kombinace a opakovaná dávka.

Navržené složení a dávkování je pro brojlera kura domácího podané:

V hmotnostním poměru sulfamethoxazolu + trimethoprimu 4:1. S výhodou je v tomto případě dávkování 20 mg (v kombinaci 16 mg sulfomethoxazolu + 4 mg trimethoprimu) na 1 kg živé hmotnosti.

#### Dodržování ochrany zvířat

V provedených PK studiích byl dále uplatněn:

- Zákon č. 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání v platném znění
- Vyhláška č. 419/2012 Sb. o ochraně pokusných zvířat v platném znění
- Experimentální část studie proběhla v prostorách experimentálních stájí VÚVeL na základě oprávnění k používání experimentálních zvířat rozhodnutím Ministerstva

zemědělství č.j. 5050/2020-MZE-18134, spisová značka 16OZ15806/2019-18134, jehož platnost je do 24. 3. 2025.

- Experimentální část studie proběhla dle schváleného projektu pokusů VÚVeL 23-2018, č.j. 39317/2019-MZE-18134

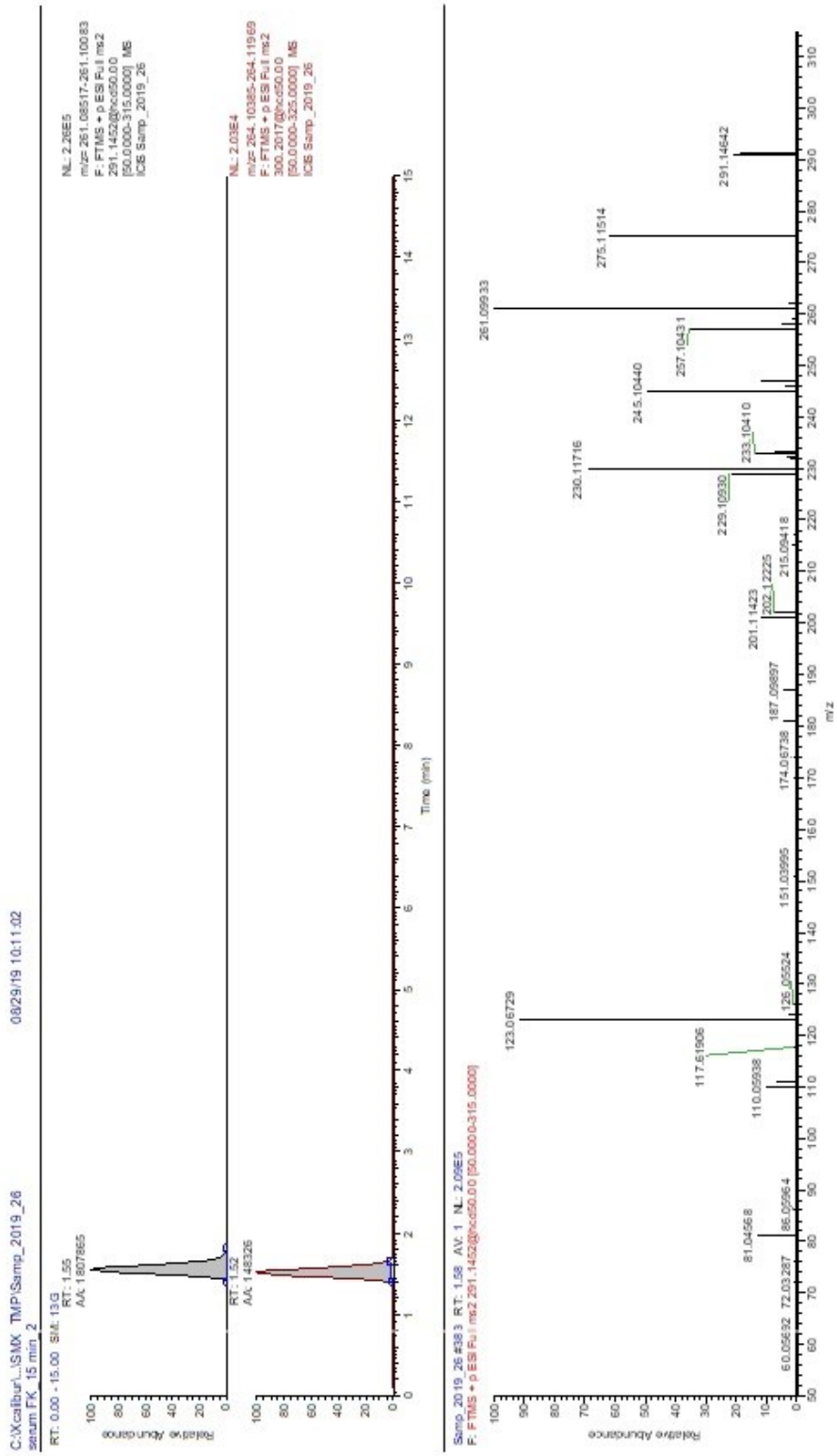
5

Použité postupy získávání dat pro vývoj léčiv byly v souladu s mezinárodními standardy na provedení farmakokinetických studií, průkaz účinnosti antibiotik a kombinací léčiv.

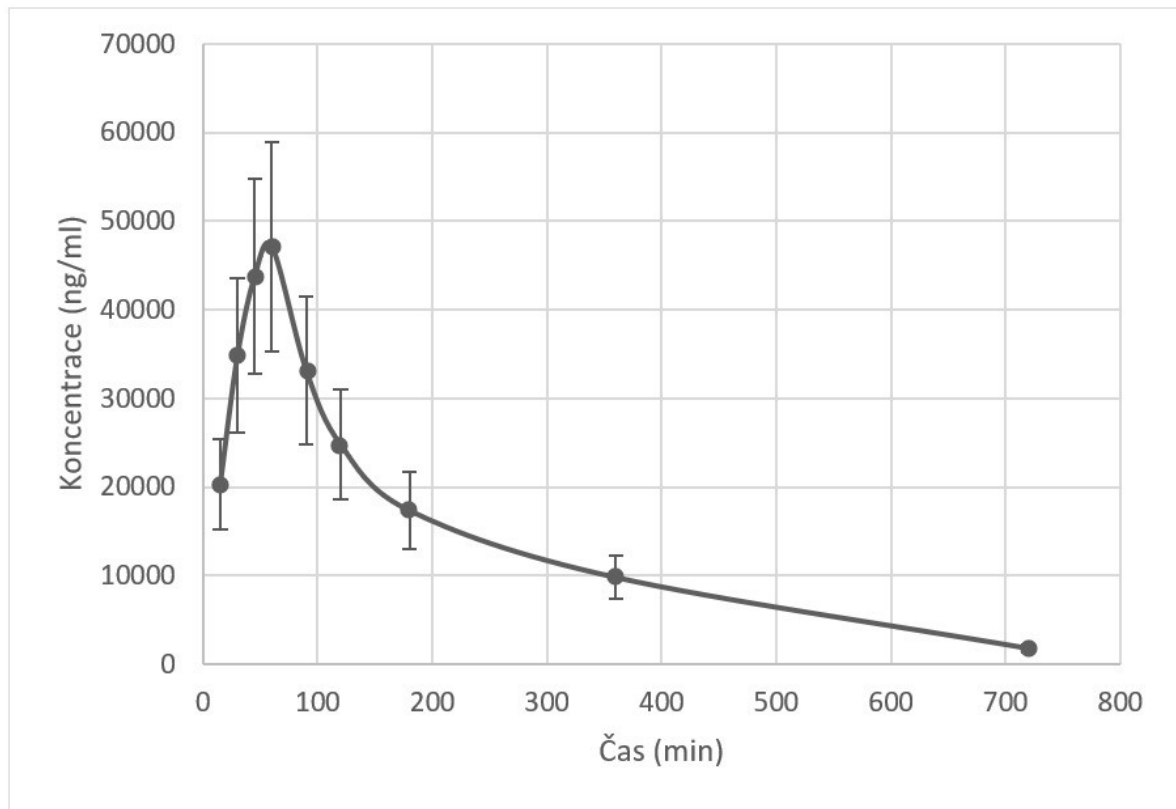
## NÁROKY NA OCHRANU

1. Veterinární léčivý přípravek pro drůbež, **vyznačený tím**, že obsahuje jako účinnou složku kombinaci sulfamethoxazolu a trimethoprimu v hmotnostním poměru 4:1.
- 5 2. Veterinární léčivý přípravek pro drůbež podle nároku 1, **vyznačený tím**, že dále obsahuje alespoň jednu pomocnou látku, vybranou ze skupiny zahrnující nosiče a látky upravující chuťové vlastnosti, s výhodou jsou nosiče vybrané ze skupiny zahrnující přírodní a syntetické polymery.
3. Veterinární léčivý přípravek pro drůbež podle nároku 2, **vyznačený tím**, že přírodní polymery jsou vybrané ze skupiny zahrnující chitosan, kyselinu alginovou, karageny, arabskou gumu a pektiny; syntetické polymery jsou vybrané ze skupiny zahrnující kopolymery na bázi N-(2-hydroxypropyl) methakrylamidu, deriváty poly(ethylen glykolu); a látky upravující chuťové vlastnosti jsou vybrané ze skupiny zahrnující laktózu, maltózu a kyselinu citronovou.
- 10 4. Veterinární léčivý přípravek pro drůbež podle kteréhokoliv z předchozích nároků 1 až 3 pro použití pro léčbu bakteriálních infekcí u drůbeže, s výhodou u brojlerů kura domácího.
- 15 5. Veterinární léčivý přípravek pro drůbež podle kteréhokoliv z předchozích nároků 1 až 3 pro použití pro léčbu bakteriálních infekcí dýchacích cest, infekcích kůže a infekcí měkkých tkání u drůbeže, s výhodou u brojlerů kura domácího.
6. Veterinární léčivý přípravek pro drůbež podle kteréhokoliv z předchozích nároků 1 až 3 pro použití pro léčbu bakteriálních infekcí u drůbeže, s výhodou u brojlerů kura domácího, při dávkování 20 mg účinné složky na 1 kg živé hmotnosti v jedné dávce nebo v opakované dávce po dobu v 3 dnů.
- 20

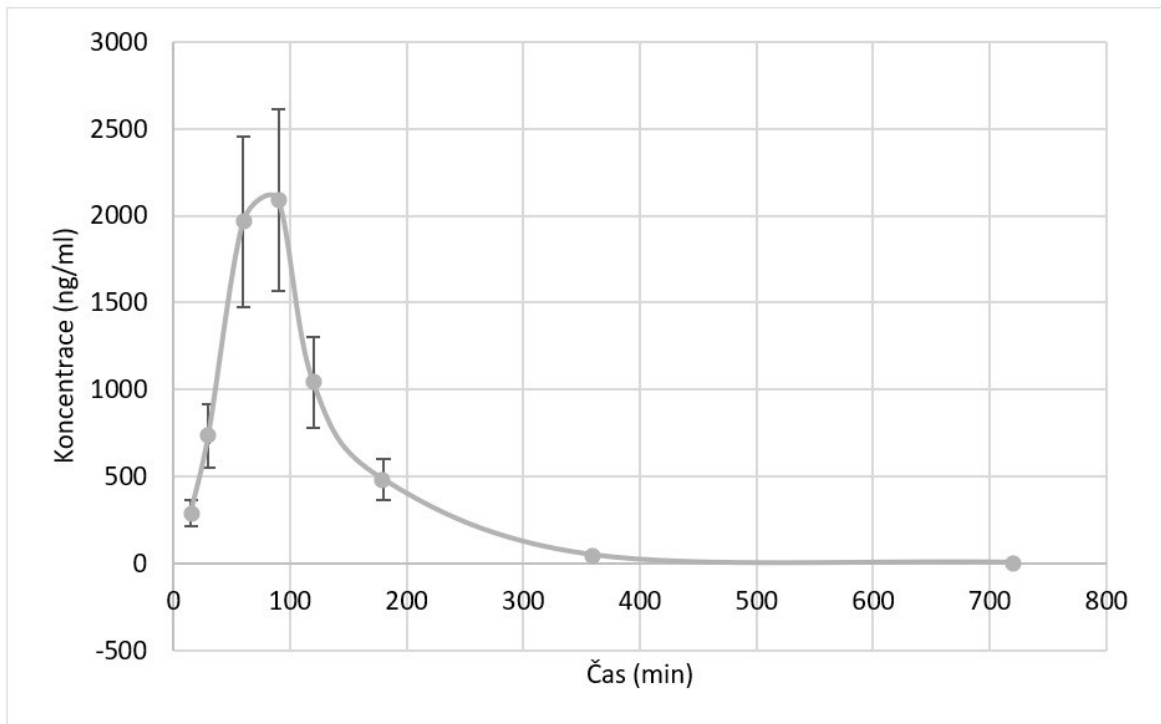
3 výkresy



Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3