



ČESKÁ REPUBLIKA
ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ



OSVĚDČENÍ

O ZÁPISU UŽITNÉHO VZORU

Josef Kratochvíl
předseda
Úřadu průmyslového vlastnictví

Úřad průmyslového vlastnictví

zapsal podle § 11 odst. 1 zákona č. 478/1992 Sb., v platném znění, do rejstříku

UŽITNÝ VZOR

číslo

35996

na technické řešení uvedené v příloženém popisu.

V Praze dne: 10.05.2022

Za správnost:

Jiří Voráček
oddělení rejstříků

Úřad průmyslového vlastnictví v zápisném řízení nezjišťuje, zda předmět užitého vzoru splňuje podmínky způsobilosti k ochraně podle § 1 zák. č. 478/1992 Sb.

Číslo zápisu: **35996**

Datum zápisu: 10.05.2022

Číslo přihlášky: **2021-39225**

Datum přihlášení: 30.09.2021

MPT: A 61 K 35/12 (2015.01)
A 61 K 35/74 (2015.01)
A 61 K 9/107 (2006.01)
A 61 K 9/08 (2006.01)
A 61 P 31/02 (2006.01)
A 61 Q 11/00 (2006.01)
A 61 Q 19/00 (2006.01)
A 61 K 47/44 (2017.01)

Název: Přípravky na ochranu mikrobiomu kůže a sliznic proti patogenním mikrobům a virům

Majitel: BiomServ s.r.o., Praha 6, Bubeneč

Původce: prof. RNDr. Karel Bezouška, CSc., DSc., Praha 6, Bubeneč
RNDr. Jan Engl, CSc., Rumburk, Rumburk 1

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

35 996

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

A61K 35/12 (2015.01)
A61K 35/74 (2015.01)
A61K 9/107 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)
A61P 31/02 (2006.01)
A61Q 11/00 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
A61K 47/44 (2017.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2021-39225**
(22) Přihlášeno: **30.09.2021**
(47) Zapsáno: **10.05.2022**

- (73) Majitel:
BiomServ s.r.o., Praha 6, Bubeneč, CZ
- (72) Původce:
prof. RNDr. Karel Bezouška, CSc., DSc., Praha 6,
Bubeneč, CZ
RNDr. Jan Engl, CSc., Rumburk, Rumburk 1, CZ
- (74) Zástupce:
Hák, Janeček & Švestka, Patentová a známková
kancelář, RNDr. Roman Hák, patentový zástupce,
U průhonu 827/5, 170 00 Praha 7, Holešovice

- (54) Název užitného vzoru:
**Přípravky na ochranu mikrobiomu kůže a
sliznic proti patogenním mikrobům a virům**

Přípravky na ochranu mikrobiomu kůže a sliznic proti patogenním mikrobům a virům

Oblast techniky

5

Technické řešení se týká přípravků na ochranu mikrobiomu kůže a sliznic před patogenními mikroorganismy a viry obsahujících aplikační základ v kombinaci s bezbuněčnými extrakty komensálních mikroorganismů. Tyto přípravky mohou být využity jako přípravky kosmetické a biocidní ve třídě desinfekcí na lidskou a zvířecí kůži.

10

Dosavadní stav techniky

Léčba infekcí patogenními mikroorganismy a viry na kůži a přilehlých sliznicích respiračního, gastrointestinálního a urogenitálního systému doposud byla a je prováděna pomocí kombinace různých přístupů. Lze využít chemických látek typu antibiotik, antimykotik, antivirotik nebo desinfekcí stejně jako pro člověka přirozenějších postupů, mezi něž se řadí například očkování (vakcinace). V posledních letech bylo dále toto spektrum doplněno o přístupy založené na managementu zdravé mikroflóry kůže a sliznic nazývané mikrobiomem.

20

Použití antibiotik a desinfekcí bylo v dosavadní historii kritické pro zvládnutí mnohých epidemií a kritických medicinských stavů, a i dnes zůstávají kritické stavy pacientů doménou použití těchto látek. Jinak se však tento přístup dostává v současnosti do problémů z pohledu stále většího rozšíření mikrobiálních kmenů odolných vůči antibiotikům. Velkým problémem je dále v podstatě nespecifický účinek těchto látek eliminujících kromě patogenů též mnohé blahodárné mikroorganismy sloužící potřebám našeho organismu, jejichž obnovení do původního spektra není vždy jednoduše dosažitelné. Z tohoto pohledu je třeba použití antibiotik a desinfekčních látek vždy pečlivě zvažovat, a pokud to není nezbytné, je lépe se jim vyhnout.

Očkování (vakcinace) sehrálo v historii boje s infekčními chorobami nezastupitelné místo, což platí i v případě současně probíhající pandemie COVID-19. Jednotlivé přístupy zahrnující použití oslabeného viru, použití izolovaného virového antigenu, nebo imunizace pomocí antigenů vytvořených přímo v těle chráněné osoby (vakcíny založené na virových vektorech nebo systémech schopných dopravit do buněk přímo mRNA kódující virové antigeny) se vzájemně vhodně doplňují a mohou přispět k nastolení účinné ochrany. Opět však existují faktory, které snižují univerzálnost tohoto přístupu, ať jde o mutované formy virů generované přímo v infikovaných osobách během pandemie, nebo nevhodnost tohoto přístupu u osob alergických na některou z chemických komponent vakcíny, mladých jedinců do 16 let, osob se specifickými diagnózami (vysoký krevní tlak, diabetes, astma) nebo kojící ženy.

40

V poslední dekádě je na základě nových výsledků týkajících se lidského mikrobiomu akcentován celostní přístup k řešení infekčních onemocnění kůže a sliznic založený na kombinovaném účinku normální zdravé mikroflóry a správně vyladěného imunitního systému pracujících ve vzájemné rovnováze a kooperaci. Pokud jde o zdraví kůže a přilehlých sliznic, je akcentován zejména význam dominantního komensálního mikroorganismu kůže bakterie *Staphylococcus epidermidis* (Stacy a Belkaid 2019, Eisenstein 2020) ve společenství s dalšími kožními komensály zahrnující zejména druhy *Corynebacterium amycolatum*, *Cutibacterium acnes* a *Streptococcus infantis* (Claudel a kol. 2019, Kim a kol. 2021). Blahodárné účinky těchto mikroorganismů jsou na molekulární úrovni podmíněny zejména produkcí účinných a selektivních antibiotik nenarušujících rovnováhu mikrobiomu kůže (Sanford a Gallo 2013), produkcí látek schopných správně naladit imunitní systém a udržovat jej v nezbytné kondici (Naik a kol. 2012) stejně jako látek schopných zesilovat kožní bariéru na základě zesíleného spojení keratinocytů v pokožce (Ohnemus a kol. 2008). Jako vhodné se jeví použít extrakty v kombinaci s enzymovým komplexem z environmentálních mikroorganismů (CZ308231B6).

55

Je ovšem též třeba zmínit další zajímavé souvislosti mezi zdravým mikrobiomem kůže a sliznic zjištěné v posledních letech. Především bylo zjištěno, že dominantní komensál kůže *Staphylococcus epidermidis* produkuje látky s antivirovými účinky založenými na velmi zajímavém mechanismu „nespecifického“ zaslepení virového povrchu účinně snižujícího infektivitu (Chen a kol. 2016). Antivirová aktivita byla lokalizována do frakce velkých povrchových proteinů („extracellular matrix-binding protein“) označovaných jako Embp (Christner a kol. 2010). Kromě toho bylo na několika studiích z posledních let jasně prokázáno, že osoby udržující zdravý mikrobiom kůže a sliznic mají zvýšenou odolnost vůči respiračním virovým infekcím (Kim a kol. 2019). Velmi zajímavé souvislosti byly odhaleny, zejména pokud jde o vzájemný vztah zdravého mikrobiomu dutiny ústní a zdravého mikrobiomu kůže, kdy tato závislost platí i přes zdánlivě autonomní charakter mikrobiomů. Překvapivě se zdravý orální mikrobiom ukazuje v těchto složitých interakcích jako kritický, a to nejen z pohledu ovlivnění zdravého mikrobiomu kůže a přilehlých sliznic, ale i z pohledu svého přímého vlivu na tvorbu zdravého mikrobiomu sliznice respiračního systému (Scannapieco a kol. 2020).

Moderní trendy vědeckého výzkumu se přitom odrážejí i v relevantních patentových dokumentech posledního desetiletí. Tak např. Reddy (US11077052) popisuje formulace pro léčbu COVID-19 infekcí obsahujících probiotika, peptidy a antioxidanty. Black a kol. (US 9820953) chrání použití huminových extraktů pro urychlení léčby poranění. Walensky a kol. (WO 2017/004591) popisují formulace antimikrobiálních peptidů vhodné pro léčbu bakteriálních infekcí způsobovaných G+ i G-bakteriemi. Několik patentových dokumentů popisuje použité směsi látek zahrnujících mastné kyseliny s krátkým řetězcem jako je kyseliny máselná, propionová nebo jantarová v různých topických nebo i orálních formulacích vhodných pro zlepšení zdraví kůže (US 11065217, US 10786477 a US 10980845). Blanchard a Nebrini (EP 3407739 B1) popisují použití topické kompozice obsahující prebiotika ve formě fukosylovaných oligosacharidů pro zlepšení zdraví kůže, jmenovitě pro zlepšení mikrobiomu kůže a léčbu některých kožních chorob (atopická dermatitida). Ve dvou případech byly látky z komensálních mikroorganismů kůže uvedených výše prezentovány ve formě bakteriálních nanovesikulů o rozměrech sahajících od 10 nm až do 1 µm, v obou případech bylo možné využít takto připravené nanočástice biologického původu jak k diagnostickým účelům, tak také k léčbě některých kožních onemocnění (atopická dermatitida a jiné zánětlivé stavy na kůži – KR 102223406 a patentová aplikace US 2019/0345561). Nakatsuji a kol. (US 10980848) podali patent na antimikrobiální terapii založené na látkách extrahovaných z klinických isolátů stafylokoků negativních na koagulasu. Bezouška a kol. (CZ 308231 B6) popsali kombinované několikastupňové mikrobiální přípravky a způsob jejich aplikace. Zahrnutím extraktů komensálních a environmentálních mikroorganismů do olejových emulzí byly formulovány 4 kompozice a navrženo jejich použití pro řešení různých problémů na kůži pomocí aplikace těchto emulzí v určité vyzkoušené sekvenci.

Výše uvedená řešení však mají řadu významných omezení. Mnohá z těchto řešení byla náležitě odzkoušena jen na laboratorní úrovni a otázkou tedy zůstává jejich praktické fungování u větších skupin uživatelů. Praktické využití přípravků obsahujících živé nebo životaschopné mikroorganismy se ukazuje jako velmi složité z regulačního pohledu: tyto přípravky je možné uvést na trh pouze jako léčiva v kategorii „live biotherapeutic products“. Požadavky regulátorů v této oblasti jsou neobyčejně složité, mj. je nutno získat důkazy o stavu kolonizace aplikačního místa jednotlivými kmeny stejně jako data, že kolonizací nedochází k porušení struktury normálního mikrobiomu. Z tohoto důvodu je tato cesta přípravku k uživateli tak složitá, že na ní obstálo zatím jen několik mikrobiálních přípravků.

50 Podstata technického řešení

Výše uvedené nedostatky částečně nebo úplně eliminují přípravky podle předloženého technického řešení, kdy jsou oproti předcházejícím řešením integrovány jednotlivé komponenty pocházející z mikroorganismů do aplikačních směsí vyššího řádu, což významným způsobem napomáhá 55 snadnosti aplikace a tím pádem pohodlí uživatelů. Naopak vyvinutím tří nových aplikačních

kompozic pro postřik na kůži, do dutiny ústní a dutiny nosní byly vytvořeny předpoklady pro zabezpečení dokonalé ochrany proti mikroorganismům a virům na všech kritických místech přicházejících v úvahu.

- 5 Olejová emulze pro aplikaci na kůži se jeví jako vhodná alternativa k doposud používaným desinfekcím na kůži rukou nebo na jiná citlivá místa na kůži. Antimikrobiální účinek u většiny běžně používaných desinfekcí je založen na využití desinfekčních vlastností organických rozpouštědel (ethanol, 2-propanol) často v kombinaci s detergenty typu kvartérních amoniových solí ve formě roztoků nebo gelů. Dlouhodobé používání takových přípravků nevytváří pro kůži a její mikrobiom příznivé prostředí, kůže se stává v podstatě abiotickou a je tedy zbavena své přirozené ochrany potřebné pro obranu před invazí patogenů. Pozorování publikovaná již před současnou pandemií COVID-19 jasně ukazují, že k této invazi v praxi opravdu dochází, což postupně vede k tvorbě nespecifických dermatitid až dlouhodobých zánětů. Naproti tomu koncepce zde uváděné olejové emulze je založená na schématu komplexní péči o kůži zahrnující upevnění a posílení fyzikální bariéry (promaštění, hydratace), chemické bariéry (kyselé pH nepříznivé pro usídlení patogenů) i biologické ochrany, kterou poskytují vysokomolekulární ochranné komponenty přítomné v bezbuněčném extraktu S100 ze *Staphylococcus epidermidis* kmene ATCC_12228. Nově vytvořená kompozice bohatá na přítomnost emulgátorů a nově navržený výrobní postup zajišťují stabilitu vytvořené olejové emulze, kdy nedochází k separaci fází ani krémování ani po 2 letech skladování při doporučené teplotě. Kombinace účinných antimikrobiálních látek nacházejících se ve vysokomolekulární frakci S100 *Staphylococcus epidermidis* kmene ATCC_12228 s antimikrobiálními účinky použitých olejů (olej z černého kmínu, citrusový olej) poskytuje vysokou antimikrobiální účinnost, včetně schopnosti vázat a neutralizovat respirační viry, která je poněkud překvapivě srovnatelná nebo dokonce vyšší oproti běžně používaným chemickým desinfekčním prostředkům. Emulze je bohatá na prebiotika, jako je xylitol a farnesol, která vytvářejí příznivé podmínky pro rozvoj normální mikroflóry kůže, zatímco potlačují rozvoj patogenů (např. *Staphylococcus aureus*). Kombinací látek zajišťujících rozvoj zdravého mikrobiomu kůže (který je *per se* považován za kritický faktor antimikrobiální obrany) a účinnými látkami potlačujícími selektivně rozvoj patogenů je zabezpečena robustní ochrana kůže proti širokému spektru patogenů.

U vodného přípravku pro aplikaci do dutiny ústní, popřípadě do dutiny nosní, se jedná o velmi podobné složení, i když podmínky aplikované regulátorem jsou pro obě místa značně odlišné. Zatímco v případě aplikace do dutiny ústní se připouští forma kosmetického přípravku ve formě osvěžujícího ústního spreje, u dutiny nosní je tato forma na základě precedenčního evropského rozhodnutí vyloučena. U přípravků aplikovaných do dutiny nosní se může jednat v případě velmi jednoduchého složení typu solného fyziologického roztoku nebo mořské vody o zdravotnický prostředek, v ostatních případech, a zejména u dokumentované vazby kterékoliv komponenty směsi na lidské buňky, by se jednalo o léčivo. Vazba proteinu Embp na makrofágy a jiné antigen prezentující buňky imunitního systému může nicméně představovat významnou výhodu při tlumení hyperreakivity imunitního systému v respiračním traktu a toto může společně s prokázanou schopností neutralizovat viry významně přispívat k blahodárným účinkům přípravku u respiračních virových infekcí. Původci dále zohlednili nezbytnost zdravého ústního mikrobiomu pro zdraví mikrobiomu kůže (zejména v pozdním věku), stejně jako zdravý mikrobiom dýchacích cest a respiračního traktu nezbytný pro účinnou obranu proti infekcím. Pro zvýšený účinek na zdravý orální mikrobiom obsahuje tento přípravek navíc bezbuněčný proteinový extrakt (frakce F) připravený z rezidentního orálního mikroorganismu *Fusobacterium simiae* kmene ATCC_33568. Tato proteinová směs účinně brání adhezi a nasednutí orálních bakteriálních patogenů na struktury orálního plaku, jak ukazují dobré výsledky přípravku v laboratorních testech orálního mikrobiomu. Vzhledem k těmto výrazným účinkům je další oblastí využití přípravku ochrana před zánětem dásní a onemocněním periodontu.

Pokud bychom uvažovali nově vytvořené přípravky jako celek, jeví se jako vhodné je integrovat a nabízet uživatelům ve formě dvojsložkového, popřípadě trojsložkového balíčku ochrany před respiračními infekcemi včetně infekce virem SARS-CoV-2. Ovšem i mimo současnou pandemii

COVID-19 je možné uvažovat o použití takového balíčku pro ochranu mikrobiomu kůže a dutiny ústní, popřípadě mikrobiomu kůže, dutiny ústní a dutiny nosní, u sezónních virových nákaz, ať již jde o chřipkové sezónní nákazy, rýmy, běžné příklady prostydnutí a zánětu respiračního systému apod. V případě takového dvojsložkového balíčku lze uvažovat o aplikačním protokolu zahrnující ošetření rukou postříkáním olejovou emulzí a jejím rozestřením na ploše ruky, dále ošetření kůže na obličej pomocí vhodného tamponu a konečně aplikaci vodného orálního přípravku rozstříkem na vnitřní sliznice tváří a plochy kolem zubů. U tříložkového balíčku respirační ochrany je možno uvažovat o podobném postupu zahrnujícím ještě aplikaci do dutiny nosní.

Předmětem technického řešení je přípravek na ochranu mikrobiomu kůže a sliznic proti patogenním mikrobům a virům, který obsahuje bezbuněčný extrakt z komensálních bakterií lidské kůže druhu *Staphylococcus epidermidis*. Výhodně je extrakt z bakterií formulován do olejové emulze. Výhodněji olejová emulze obsahuje vodu, olivový olej v BIO kvalitě, xylitol, glycerol, olej z černého kmínu, olej z citrusových jader, močovinu, arabskou gumu, polysorbát 80, cetyl alkohol, kyselinu stearovou, stearat hořečnatý, glyceryl distearát, phenoxyethanol, farnesyl acetát, hydroxid sodný, ethylhexylglycerin, fenyklový olej, olej z *Melaleuca alternifolia*, kyselinu octovou a kyselinu mléčnou. Přípravek je vhodný zejména pro aplikaci na kůži.

Dále je předmětem technického řešení přípravek, který obsahuje bezbuněčný extrakt z komensálních bakterií lidské kůže druhu *Staphylococcus epidermidis* a dále obsahuje bezbuněčný extrakt z komensálních bakterií lidské dutiny ústní druhu *Fusobacterium simiae*. Výhodně jsou extrakty z bakterií formulovány do vodného přípravku. Výhodněji přípravek obsahuje vodu, vodný extrakt aloe vera v BIO kvalitě, ethanol, glycerol, xylitol, glukosu, laktosu, NaCl, MgSO₄·7H₂O, kyselinu dihydrooctovou, hydroxid sodný, kyselinu benzoovou, K₂HPO₄, KCl, kyselinu jantarovou, kyselinu citronovou, šalvějový extrakt, heřmánkový extrakt, CaCl₂, polysorbát 80, kyselinu boritou, tymiánovou silici, kyselinu mléčnou, mátovou silici, levandulový olej, acerolu, extrakt třapatky a citrusový olej. Přípravek je vhodný zejména pro aplikaci do dutiny ústní a/nebo dutiny nosní.

Přípravky podle předloženého technického řešení jsou vhodné pro použití jako kosmetické přípravky nebo desinfekční přípravky.

Předmětem technického řešení je dále kosmetická sada pro posílení mikrobiomu kůže a sliznic a ochranu před patogenními mikroorganismy a viry, která obsahuje přípravek obsahující bezbuněčný extrakt z komensálních bakterií lidské kůže druhu *Staphylococcus epidermidis*, formulovaný pro aplikaci na kůži, a alespoň jeden přípravek obsahující bezbuněčný extrakt z bakterií druhu *Staphylococcus epidermidis* a bezbuněčný extrakt z komensálních bakterií lidské dutiny ústní druhu *Fusobacterium simiae*, formulovaný pro aplikaci do ústní a/nebo nosní dutiny.

Termínem „v BIO kvalitě“ se u olejů (olivový, z černého kmínu) míní to, že se jedná o produkt ekologického zemědělství, certifikovaný v souladu se zákonem č. 242/2000 Sb. a/nebo nařízením Komise (EU) č. 271/2010, lisovaný za studena. V případě vodného extraktu Aloe vera termín „v BIO kvalitě“ označuje produkt ekologického zemědělství, certifikovaný v souladu se zákonem č. 242/2000 Sb. a/nebo nařízením Komise (EU) č. 271/2010, s obsahem čistě šťávy 99,7 %.

Objasnění výkresů

Technické řešení je dále podrobně popsáno na příkladných provedeních a blíže osvětleno na připojených schématických výkresech:

Obr. 1. Způsob přípravy tří šarží rekombinantních 70 kDa fragmentů Embp *Staphylococcus epidermidis* kmene ATCC_12228 exprimovaných v *Escherichia coli* a kontrola správnosti produkovaných proteinů metodou hmotnostní spektrometrie, kde obrázek nalevo ukazuje analýzu

tří jednotlivých šarží Embp fragmentů před štěpením enzymem enterokinasou a po třech dnech štěpení tímto enzymem pomocí SDS polyakrylamidové elektroforesy, barveno pomocí koloidního barviva Coomassie Brilliant Blue G-250, obrázek vpravo potom potvrzení identity získaného Embp fragmentu metodou hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (FT-MS). Ukázáno je naměřené spektrum tryptických štěpů fragmentu Embp proteinu a ve spodní části obrázku též pokrytí sekvence proteinu těmito naměřenými fragmenty. Marker molekulových hmotností zahrnoval viditelné standardy o velikosti (seshora dolů) 250, 150, 100, 75, 50 a 37 kDa.

Obr. 2. Způsob přípravy přirozených extraktů o velikosti molekul větší než 100 kDa z bakterie *Staphylococcus epidermidis* kmene ATCC_12228 (extrakt S100) a způsob přípravy extraktů z bakterie dutiny ústní *Fusobacterium simiae* kmene ATCC_33568 (extrakt F) pomocí chromatografie na sloupci Nuvia® c Prime. Ukázán je typický chromatografický profil separace extraktu S100 v horním panelu a extraktu F v prostředním panelu. U obou chromatogramů označuje silná čára absorpenci při 280 nm, slabá čára vodivost, odebrané frakce jsou značeny šedivými čtverci a konec odběru šedivými obdélníky. Odebrané frakce byly analyzovány metodou SDS polyakrylamidové elektroforesy ve spodním panelu. Zde panel vlevo ukazuje analýzu frakcí extraktu S100 v pořadí F1, F5, F7, F8, F9, F10 a F11, poslední dvě dráhy na gelu jsou volné, zatímco panel vpravo ukazuje analýzu frakcí extraktu F, kde jednotlivé dráhy obsahují prošlou frakci a dále frakce F1, F2, F3 a F4, poslední čtyři dráhy na gelu jsou volné. Marker molekulových hmotností ukázaný vždy v první (levé) dráze na gelu je identický jako v případě Obr. 1.

Obr. 3. Testy antivirové a antimikrobiální účinnosti pro připravené mikrobiální extrakty a formulované přípravky ve srovnání s relevantními kontrolami. Obrázek vlevo nahoře je ukázána vazba dvou mutovaných rekombinantních Embp fragmentů a osmi nativních rekombinantních Embp fragmentů na proteiny odpovídající vazebným doménám 4 různých virů, viru SADS způsobujícího střevní problémy a tří virů (AVIN, MERS a SARS) způsobujících respirační problémy. Obrázek vpravo nahoře ukazuje virové neutralizační účinky 8 různých vzorků zahrnujících (zleva doprava) rekombinantní E3 fragment proteinu Embp, dvě nezávislé přípravy S100 extraktů, olejový přípravek podle předloženého technického řešení, vodný přípravek podle předloženého technického řešení a dva různé vzorky chemických antivirotik oproti experimentální kontrole (poslední sloupec). Neutralizační experiment provedený na SARS-CoV-2 viru je doplněn ještě plakovou esejí (kruhy pod grafem). Obrázek dole ukazuje standardní mikrobiální inhibiční test prováděný s desítkovým sériovým ředěním (prvá jamka zleva ředění 10x, druhá jamka zleva ředění 100x atd.) osmi látek zahrnujících dvě šarže extraktu S100, dvě nezávislé šarže olejového přípravku, dvě nezávislé šarže vodného přípravku podle předloženého technického řešení, negativní a pozitivní kontrolu (přípravek Sanytol®). Testované patogeny kůže a sliznic zahrnovaly v panelu A sbírkový kmen *Staphylococcus aureus* ATCC_9144, v panelu B sbírkový kmen *Candida albicans* ATCC_8215, v panelu C klinický isolát *Staphylococcus aureus* rezistentní na methicillin (MRSA) dodaný z Výzkumného ústavu veterinárních léčiv v Brně, v panelu D sbírkový kmen *Pseudomonas aeruginosa* ATCC_27853, v panelu E sbírkový kmen *Klebsiella aerogenes* ATCC_13058, v panelu F sbírkový kmen *Klebsiella pneumoniae* ATCC_10031, v panelu G sbírkový kmen *Enterococcus faecalis* ATCC_29212, v panelu H sbírkový kmen *Acinetobacter baumannii* ATCC_17904, v panelu I sbírkový kmen *Enterobacter cloacae* ATCC_10699, v panelu J sbírkový kmen *Staphylococcus sciuri* ATCC_29062, v panelu K klinický isolát *Candida albicans* dodaný z Výzkumného ústavu veterinárních léčiv v Brně a v panelu L klinický isolát *Malassezia pachydermatis* dodaný z Výzkumného ústavu veterinárních léčiv v Brně.

Obr. 4. Laboratorní a praktické testy připravených bakteriálních extraktů a formulovaných přípravků. V horním panelu vlevo je znázorněno přežití ve čtyřech skupinách myší (n=10) s podáním kontroly, směsi obou připravených bakteriálních extraktů S100+F, podáním olejového přípravku podle předloženého technického řešení a podáním vodného přípravku podle předloženého technického řešení, přičemž ve všech případech byly fyziologický roztoky (kontrola) nebo zkoušené přípravky podány myším laváží do dutiny ústní. V horním panelu vpravo byla u dvou nejdéle přežívajících myší v každé skupině znázorněna úroveň virové nálože infikujícího kmene chřipkového viru. Ve spodním panelu jsou výsledky dvaceti dobrovolníků, kteří aplikovali

vodný přípravek podle předloženého technického řešení obsahující jako účinné látky extrakty S100 + F (10 jedinců) nebo placebo přípravek bez těchto látek (10 dobrovolníků). Dobrovolníci začali aplikovat přípravek vstříkem do dutiny ústní dvakrát denně v den, kdy se u nich objevila respirační infekce (tj. chřipka, rýma nebo nachlazení) a zaznamenali počet dnů do odeznění příznaků (světle šedý sloupec pro skupinu aplikující experimentální přípravek a černý sloupec pro skupinu aplikující placebo). Statistické vyhodnocení dat ukázalo, že u skupiny aplikující placebo činila průměrná doba do odeznění příznaků $6,7 \pm 0,97$ dne, zatímco u skupiny aplikující experimentální přípravek činila tato doba $2,9 \pm 0,73$ dne. Existovalo tedy statisticky významné doby onemocnění u skupiny aplikující přípravek oproti skupině aplikující placebo ($p < 10^{-6}$). Žádný účastník této studie si nestěžoval na výskyt jakýchkoliv vedlejších příznaků a stejně dobře byl přípravek snášen během testů i 20 dobrovolníky s citlivou kůží.

Příklady uskutečnění technického řešení

Technické řešení je dále demonstrováno pomocí příkladných řešení popisujících a ukazujících způsob biotechnologické výroby potřebných účinných látek, způsob formulace těchto látek do kosmetických a farmaceutických kompozic, testování antimikrobiální účinnosti účinných látek i formulovaných přípravků a konečně jsou v příkladech zahrnuty testy *in vivo* na laboratorním zvířecím modelu a ověření účinnosti přípravku u reálných uživatelů – dobrovolníků. Pomocí příkladných provedení je demonstrována povaha, podstata a praktické ověření technického řešení, který však není těmito příkladnými provedeními omezován. Tato příkladná provedení jsou uvedena, aby byl popis důkladný a úplný a plně zprostředkoval podstatu technického řešení v rozsahu nároků na ochranu.

Provedení příkladných řešení je založeno na metodách běžných v oboru řešení. Pro bioinformatický průzkum Embp proteinu byla využita dostupná literární data v kombinaci s biologickými databázemi dostupnými na internetu (www.ncbi.nlm.nih.org, www.expasy.org a IEDB.org). Kultivace geneticky modifikovaných organismů v kategorii 1 byla prováděna ve firemní laboratoři na základě ohlášení na MŽP ČR, č.j. MZP/2021/750/164. DNA fragmenty kódující cca 70 kDa úseky gigantického Embp proteinu byly amplifikovány s použitím AccuPrime™ Pfx DNA polymerasy (Invitrogen), separovány na agarosovém gelu a fragmenty ligovány přímo do pBAD-202/D-TOPO expresního vektoru (Invitrogen) a následně transformovány do buněk *Escherichia coli* kmene TOP10.

Bakteriální kmeny použité k přípravě extraktů zahrnovaly *Staphylococcus epidermidis* kmene ATCC_12228 získaný ze sbírky CCM Brno jako CCM4418 a *Fusobacterium simiae* kmene ATCC_33568 získaný ze sbírky CCM Brno jako CCM3660. K provedení kultivací použitých mikroorganismů byla použita média popsaná v příkladu provedení 4. Kultivace byla provedena za podmínek specifikovaných u konkrétních kultivací v termostátované bakteriální třepačce s maximální kapacitou 1,6 l třepané kultury. 12 vybraných transformantů na selekčním médiu bylo nejprve třepáno v malých experimentálních kulturách v bohatém médiu LB v objemu 1,5 ml pro provedení prvního indukčního pokusu, u úspěšných produkčních klonů byla následně prováděna kultivace v objemu 400 ml bohatého média. Produkční kultura byla zakoncentrována metodou Depth Filtration na filtru DOCH (Merck), následně byla kultura z filtrů odebrána pomocí zpětného chodu extrakčního pufru o a sonikována na zařízení Ultrasonic Disruptor po dobu 4 x 5 min při intenzitě 40 W v pulsním režimu (10 s sonikační puls následovaný 10 s prodlevou). Sonikovaná kultura byla zpracována metodou Depth Filtration s použitím kaskády filtrů DOCH a COCH (Merck), vyčerený filtrát byl následně nanášen na kolonu chelating-Sepharosy 4B nabitě nikelnatými ionty a ekvilibrován v sonikačním pufru. Rekombinantní proteiny obsahující His6 kotvu byly eluovány okyselením na pH = 5,5, koncentrovány, převedeny do vhodného pufru a štěpeny prasečí enterokinasou (Sigma) po dobu 3 dní. Úspěšné odštěpení histidinové kotvy společně s velikostí proteinu bylo kontrolováno SDS elektroforézou a proteiny zbavené kotvy dále přečištěny ionexovou a gelové permeační chromatografií.

Bakteriální buňky *Staphylococcus epidermidis* kmene ATCC_12228 a *Fusobacterium simiae* kmene ATCC_33568 byly kultivovány v 1. třídě mikrobiologického rizika. Kultury byly zpracovány obdobným způsobem, výsledný extrakt byl převeden do pufru PBS pomocí centrifugačních proteinových koncentrátorů (10 kDa MWCO) a proteiny byly sterilně filtrovány pomocí 0,22 um filtrů Corning. Koncentrace proteinu byla stanovena Bradfordovou metodou a nastavena na 10 mg/ml pomocí sterilního PBS.

Rekombinantní proteiny odpovídající virovým “spike“ proteinům byly produkovány podle publikovaných protokolů s použitím pBAD expresního systému a genů připravených synteticky (BioCat, SRN). Pro provedení vazebných stanovení byly jednotlivé rekombinantní Embp proteiny E1 až E8 inkubovány s částicemi agarosy pokryté spike proteiny, povařeny v pufru pro SDS elektroforézu a kvantitativně vyhodnoceny.

Pro testování antimikrobiální účinnosti vůči klíčovým patogenům na kůži byl použit MIC test v desítkovém ředění. Pro stanovení ochranné aktivity přípravků *in vivo* byl proveden experiment na 4 skupinách myši po 10 jedincích podle standardního protokolu. Praktické testy ochrany u uživatelů probíhaly v zimě 2020 / 2021 v době výskytu virových respiračních infekcí, jak je popsáno v popisu k obrázku č. 4. Veškeré testy probíhaly na základě podepsaného informovaného souhlasu s tím, že účastníkům testu byl k dispozici aplikační návod a protokol pro zápis výsledků. Veškeré údaje získané během studie jsou anonymní, identita testujících osob nebyla přihlašovatelí vyjevena. V rámci zkoušek pro vypracování Zprávy o bezpečnosti kosmetického přípravku podle EU 1223/2009 byla bezpečnost olejového přípravku testována u 20 dobrovolníků s citlivou kůží.

Příklad 1

Bioinformatická analýza antivirových Embp proteinů

Údaje týkající se aminokyselinové sekvence a doménové stavby Embp proteinu ze *Staphylococcus epidermidis* známé ze stavu techniky byly dále zpracovány pomocí výše uvedených databází. Zdrojové soubory pro 480 kDa funkčně významný C-terminální segment proteinu byly konsolidované do jediné nukleotidové sekvence s aminokyselinovou sekvencí uvedenou těsně pod nukleotidy v jednopísmenkovém kódu. Celá oblast kódující 480 kDa fragment byla s ohledem na doménovou stavbu rozdělena na 8 jednotlivých proteinů o predikované velikosti 60 až 70 kDa a byly odečteny definující oligonukleotidové sekvence. Kromě toho byly též s pomocí predikčního programu navrženy v každé z jednotlivých úseků Embp proteinu imunodominantní peptidové sekvence pro přípravu protilátek.

Příklad 2

Příprava rekombinantních fragmentů proteinu Embp a jejich verifikace hmotnostní spektrometrií

Při amplifikaci genových fragmentů s využitím optimalizované DNA polymerasy byly získané DNA fragmenty očekávané velikosti pro jednotlivé úseky Embp proteinů. U delších úseků již k produktivní amplifikaci nedocházelo a vzhledem k limitu velikosti proteinů exprimovatelných v *Escherichia coli* se v těchto experimentech dále nepokračovalo. Celková úroveň exprese jednotlivých úseků pro proteiny E1 až E8 byla dobrá stejně jako rozpustnost proteinu v extrakčním pufru. Z důvodu možných interferencí expresní a purifikační kotvy v biologických stanoveních byla tato kotva účinně odštěpena (viz obr. 1 vlevo) pomocí enzymu enterokinázy, přičemž jako nejúčinnější se ukázal prasečí přirozený enzym. Byly získány proteiny s čistotou kolem 90 %. Identita získaných proteinů byla potvrzena moderní metodou FT-MS, bylo dosaženo vysokého pokrytí proteinových sekvencí (viz obr. 1 vpravo).

Příklad 3

Příprava králičích polyklonálních protilátek proti Embp proteinu

5 Syntetické peptidy byly konjugovány na BSA glutaraldehydovou metodou a bylo získáno celkem 8 peptidových konjugátů. Tyto konjugáty potom tvořily společně s osmi rekombinantními proteiny popsanými v příkladu provedení č. 2 imunogeny pro imunizaci králíků. Z 6 vykonaných pokusů byl neúspěšnější experiment č. 4 (králík D), kdy se jednalo o čtyři různé imunizace s použitím směsi syntetických konjugátů pro prvou a druhou imunizaci, přičemž u třetí a čtvrté imunizace byla
10 naopak použita směs rekombinantních proteinů. Metodou Western blottingu byla prokázána dobrá reaktivita jak s rekombinantními proteiny a velikosti cca 70 kDa, tak i s fragmenty přirozeného Embp proteinu produkovaného bakterií *Staphylococcus epidermidis* kmene ATCC_12228 o velikosti cca 240, 360 a 480 kDa. Získané králičí protilátky byly při ověření technického řešení použity pro charakterizaci přirozených vysokomolekulárních extraktů *S. epidermidis* (viz dále
15 příklad 4) a pro sledování aplikací.

Příklad 4

Příprava aktivních proteinových extraktů

20 Vzhledem k omezeným možnostem rekombinantního expresního systému s použitím bakterií *Escherichia coli* (viz příklad 3) se jako výhodná ukázala přirozená produkce Embp proteinu v produkčním kmeni *Staphylococcus epidermidis* ATCC_12228. Buňky *Staphylococcus epidermidis* ATCC_12228 byly kultivovány v médiu MMM o složení Na₂HPO₄ 2,32 g/L, KH₂PO₄
25 0,95 g/L, D-glukosa 2 g/L, TBS 0,4 g/L, bovinní podčelistní mucin 0,4 g/L, (NH₄)₂SO₄ 0,8 g/L a MgSO₄·7H₂O 0,05 g/L. 100 ml objemy média po sterilizaci byly umístěny do 250 ml Erlenmayerových baněk a třepány 32 h v rotační bakteriální třepačce při teplotě 30 °C a 200 otáčkách za minutu. Nejvyšší koncentrace produkovaných proteinů byly získány sonikací produkčních buněk v kyselém pufru a následnou separací získaného extraktu na koloně Nuvia® c
30 Prime (BioRad), kdy došlo k dobré separaci aktivních proteinů od rozpustných fragmentů buněčných stěn a nukleových kyselin (viz obr. 2 nahoře). Proteiny v hlavním píku eluované změnou pH byly dále koncentrovány na membránách s vylučovacím limitem 100 kDa a převedeny do fyziologického fosfátového roztoku pH 7,4. Pro použití v přípravcích byly spojeny frakce F9 a F10 jak je ukázáno na chromatogramu a elektroforeogramu (viz obr. 2 vlevo dole), čímž byla
35 získána frakce označená jako frakce S100 (označovaná též jako extrakt S100). Velikost proteinů ve frakci podle gelové filtrace byla v rozsahu 120 až 480 kDa a jejich finální koncentrace byla upravena na 10 mg/ml.

40 Fakultativně anaerobní ústní bakterie *Fusobacterium simiae* ATCC_33568 je kultivovatelná ve velmi bohatém médiu za omezeného přístupu kyslíku, nevyžaduje však velmi komplexní biologická média potřebná pro produkci jiných druhů fusobakterií. Kultivace probíhala v médiu obsahujícím kvasničný autolyzát 5 g/L, hovězí extrakt 2 g/L, trypton 10 g/L, D-glukosu 2 g/L, NaCl 5 g/L a L-cystein hydrochlorid 0,3 g/L. 100 ml objemy média po sterilizaci byly umístěny do
45 250 ml Erlenmayerových baněk, neprodyšně uzavřeny a třepány 48 h v rotační bakteriální třepačce při teplotě 30 °C a 200 otáčkách za minutu. Purifikační postup pro přípravu extraktů z těchto bakterií byl velmi podobný jako v případě extraktů stafylokoka. Byla provedena sonikace produkčních buněk v kyselém pufru a během následné separace získaného extraktu na koloně Nuvia® c Prime (BioRad), byly odebrány frakce číslo F1 až F4 zahrnující celý druhý pík na separaci (viz obr. 2 uprostřed), čímž byla získána frakce označená jako frakce F (označovaná též
50 jako extrakt F). Elektroforesa spojených frakcí je ukázána na obr. 2 dole vpravo. Velikost proteinů ve frakci podle gelové filtrace byla v rozsahu 20 až 140 kDa a jejich finální koncentrace byla upravena na 10 mg/ml.

Příklad 5

Kompozice olejové emulze pro aplikaci na kůži

5 Pro přípravu olejové emulze s desinfekčním účinkem na kůži byl aktivní mikrobiální extrakt ze *Staphylococcus epidermidis* kmene ATCC_12228 ve formě frakce S100 (viz příklad 4) vpraven do formy olejové emulze o následujícím složení (procenty jsou myšlena procenta hmotnosti): voda 66,826, olivový olej v BIO kvalitě 10,7, xylitol 5, glycerol 4, olej z černého kmínu v BIO kvalitě 3,5, olej z citrusových jader 3,5, močovina 2, arabská guma 1, polysorbát 80 0,5, cetyl alkohol 0,5, kyselina stearová 0,5, stearát hořečnatý 0,5, glyceryl distearát 0,5, phenoxyethanol 0,375, farnesyl acetát 0,2, hydroxid sodný 0,147, ethylhexylglycerin 0,125, fenyklový olej 0,05, olej z *Melaleuca alternifolia* (tee tree oil) 0,05, kyselina octová 0,018, kyselina mléčná 0,009 a proteinová frakce S100 (o koncentraci 10 mg/ml) 0,001. Rostlinné extrakty, oleje a silice jsou v kosmetické kvalitě a jsou běžně komerčně dostupné. Během přípravy se nejprve smísí všechny komponenty rozpustné ve vodě, rozpuštění se usnadní sonikací a zahřátím na 55 °C. U olejových komponent se postupuje obdobně a směs olejů a emulgátorů se též zahřeje na 55 °C. Zahřátá vodná fáze se přenesení do mixeru a za horka se míchá s přidanou olejovou fází. pH směsi se upraví na hodnotu 4,0 pomocí kyseliny octové a směs se nechá zchladnout za neustálého míchání (minimální otáčky mixeru) na laboratorní teplotu. Poté se pH směsi upraví na hodnotu 5,4, přidá se proteinový extrakt. Poté se plní do 30ml lahviček (případně např. 50, 100, 150 nebo 250ml) s ručním rozstřikovačem a skladuje v tmavém místě při teplotě mezi 15 a 25 °C.

Příklad 6

25 *Vodná kompozice pro ústní a nosní sprej*

Bakteriální extrakty proteinů ze *Staphylococcus epidermidis* kmene ATCC_12228 (frakce S100) a z *Fusobacterium simiae* kmene ATCC_33568 (frakce F) určené pro rozvoj zdravého mikrobiomu dutiny ústní, a tím pro zdraví dutiny ústní, kůže a sliznice respiračního systému, byly pro aplikaci vpraveny do vodného přípravku níže uvedeného složení (v procentech hmotnosti): voda 83,942, vodný extrakt aloe vera v BIO kvalitě 5, ethanol 3,15, glycerol 3, xylitol 1, glukosa 1, laktosa 1, NaCl 0,64, MgSO₄.7H₂O 0,32, kyselina dihydrooctová 0,25, hydroxid sodný 0,136, kyselina benzoová 0,1, K₂HPO₄ 0,08, KCl 0,06, kyselina jantarová 0,06, kyselina citronová 0,06, šalvějový extrakt 0,05, heřmánkový extrakt 0,04, CaCl₂ 0,028, polysorbát 80 0,02, kyselina boritá 0,018, tymiánová silice 0,01, kyselina mléčná 0,009, mátová silice 0,009, levandulový olej 0,004, acerola (*Malpighia glabra*) 0,004, extrakt třapatky (*Echinacea purpurea*) 0,004, citrusový olej 0,004, extrakt S100 ze *Staphylococcus epidermidis* kmene ATCC_12228 (o koncentraci 10 mg/ml) 0,001, extrakt F z *Fusobacterium simiae* kmene ATCC_33568 (o koncentraci 10 mg/ml) 0,001. Rostlinné extrakty, oleje a silice jsou v kosmetické kvalitě a jsou běžně komerčně dostupné. Smíchají se všechny komponenty s výjimkou rostlinných a bakteriálních extraktů počínaje vodou v nádobě, rozpuštění se urychlí sonikací a zahřátím na 50 °C. Poté se upraví hodnota pH na 7,4, přidají se rostlinné a bakteriální extrakty. Promíchaná směs se filtruje přes filtry PVDF o velikosti pórů 0,66 μm a plní sterilně do 30ml (případně např. 50, 100, 150 nebo 250ml) lahviček s ručním rozstřikovačem a/nebo do 10ml (případně např. 15, 20, 30, 50, 60 nebo 120 ml) lahviček pro nosní sprej.

Příklad 7

50 *Laboratorní testy antimikrobiálních aktivit a vliv přípravků na obnovení normálního zdravého mikrobiomu*

Pro průkaz schopnosti produkovaných Embp proteinů vázat se na povrchové virové proteiny byly provedeny vazebné experimenty na povrchový glykoprotein viru způsobujícího průjemová střevní onemocnění SADS a dále povrchové glykoproteiny tří respiračních virů, AVIN, MERS a SARS. Z důvodu minimalizace falešných pozitivit byla použita metodika bez zavádění jakýchkoliv značek

do testovaných proteinů. Výsledky stanovení prezentované na obr. 3 nahoře vlevo ukázaly, že mutované proteiny s pozměněnou sekundární strukturou ERE1 a ERE2 nevykazovaly žádnou významnou vazbu na kterýkoliv z testovaných proteinů, zatímco nativní proteiny E1ER až E8ER zahrnující různé úseky 480 kDa segmentu Embp proteinu se střídajícími se FIVAR a GA doménami vykazovaly konzistentní vazbu na povrchové glykoproteiny respiračních virů, nikoliv však střevního viru. Virový neutralizační test (viz obr. 3 nahoře vpravo) posloužil pro vzájemné srovnání jednotlivých použitých proteinů, extraktů a přípravků. Výsledky ukázaly, že jednotlivé segmenty 480 kDa úseku byly schopny neutralizovat SARS-Cov2 virus pouze v malé míře, zatímco jak přirozené extrakty S100 a S100d (druhá nezávislá příprava této šarže), stejně jako přípravek formulovaný v olejovém prostředí (přípravek podle příkladu 5) i vodném prostředí (přípravek podle příkladu 6) byly schopny neutralizovat infektivitu viru s účinností téměř shodnou se standardními antiviroty. Konečně byly bakteriální extrakt a obě finální formulace (podle příkladu 5 a 6) testovány na antimikrobiální činnost proti panelu bakteriálních a kvasinkových patogenů na kůži (viz obr. 3 dole). Tyto experimenty jasně prokázaly, že přípravky podle předloženého technického řešení mají stejnou nebo lepší mikrobiální účinnost ve srovnání s běžnými desinfekcemi s alkoholy a detergenty.

Příklad 8

20 *Účinnost přípravků při antimikrobiální ochraně zjištěná v experimentech in vivo a v testech individuálních uživatelů*

V testu přežití myši s virovou infekcí vysoce infekčním chřipkovým virem (viz obr. 4 nahoře) si vedly oba formulované přípravky velmi dobře, kdy olejový přípravek (podle příkladu 5) zachránil před infekcí až 80 % testovaných myši a vodný přípravek (podle příkladu 6) dokonce 90 % (n=10 u obou skupin) po dobu čtrnáctidenního sledování (u neošetřených myši všechna zvířata uhynula kolem šestého dne experimentu a samotný extrakt S100 pouze prodloužil tuto dobu na 13 dní). Provedením stěrů u myši v okamžiku jejich vystoupení z experimentu bylo prokázáno, že důvodem úhynu zvířat byla opravdu virová infekce s nekontrolovaným zvýšením virového titru v okamžiku úhynu. Dále byl mezi uživateli vodného přípravku (podle příkladu 6) proveden jednoduchý test účinnosti, kdy jim byl dvojitě zaslepeným způsobem předán přípravek buď ve variantě bez přítomnosti bakteriálních extraktů (placebo) nebo naopak plný přípravek (experiment). Uživatelé začali přípravek aplikovat v okamžiku nástupu prvních příznaků respiračních infekcí zahrnujících chřipku, rýmu nebo nachlazení (nikoliv infekci virem SARS-Cov2) a počítali dny do úplného vymizení příznaků. Výsledky tohoto testu uvedeného na obr. 4 dole ukázaly, že u osob aplikujících placebo přípravek trvaly příznaky průměrně $6,7 \pm 0,97$ dne (N = 10), zatímco u osob aplikujících přípravek tyto příznaky trvaly $2,9 \pm 0,73$ dne (N = 10). Po podání přípravku se tedy podařilo významně snížit délku trvání příznaků z obvyklé doby cca 1 týdne na pouhé 3 dny.

40

Průmyslová využitelnost

Přípravky na ochranu mikrobiomu kůže a sliznic proti patogenním mikrobům a virům obsahující bezbuněčné extrakty komensálních mikroorganismů mohou být použity k výrobě jednotlivých kosmetických přípravků nebo sad kosmetiky sloužících k posílení zdravého mikrobiomu kůže, sliznice dutiny ústní a sliznice respiračního traktu s tím, že takto posílený mikrobiom dokáže udržet v dobré kondici imunitní systém a významným způsobem tak zvýšit ochranu před patogenními mikroorganismy včetně respiračních virů. Dále mohou být přípravky podle předloženého technického řešení též použity jako biocidní desinfekční přípravky představující desinfekce přátelské vůči mikrobiomu kůže, a přitom poskytující úroveň antimikrobiální a protivirové ochrany srovnatelnou s chemickými desinfekcemi nepřátelskými vůči zdravé kožní mikroflóře z důvodu přítomnosti alkoholů, detergentů a jiných chemikálií.

Citovaná literatura

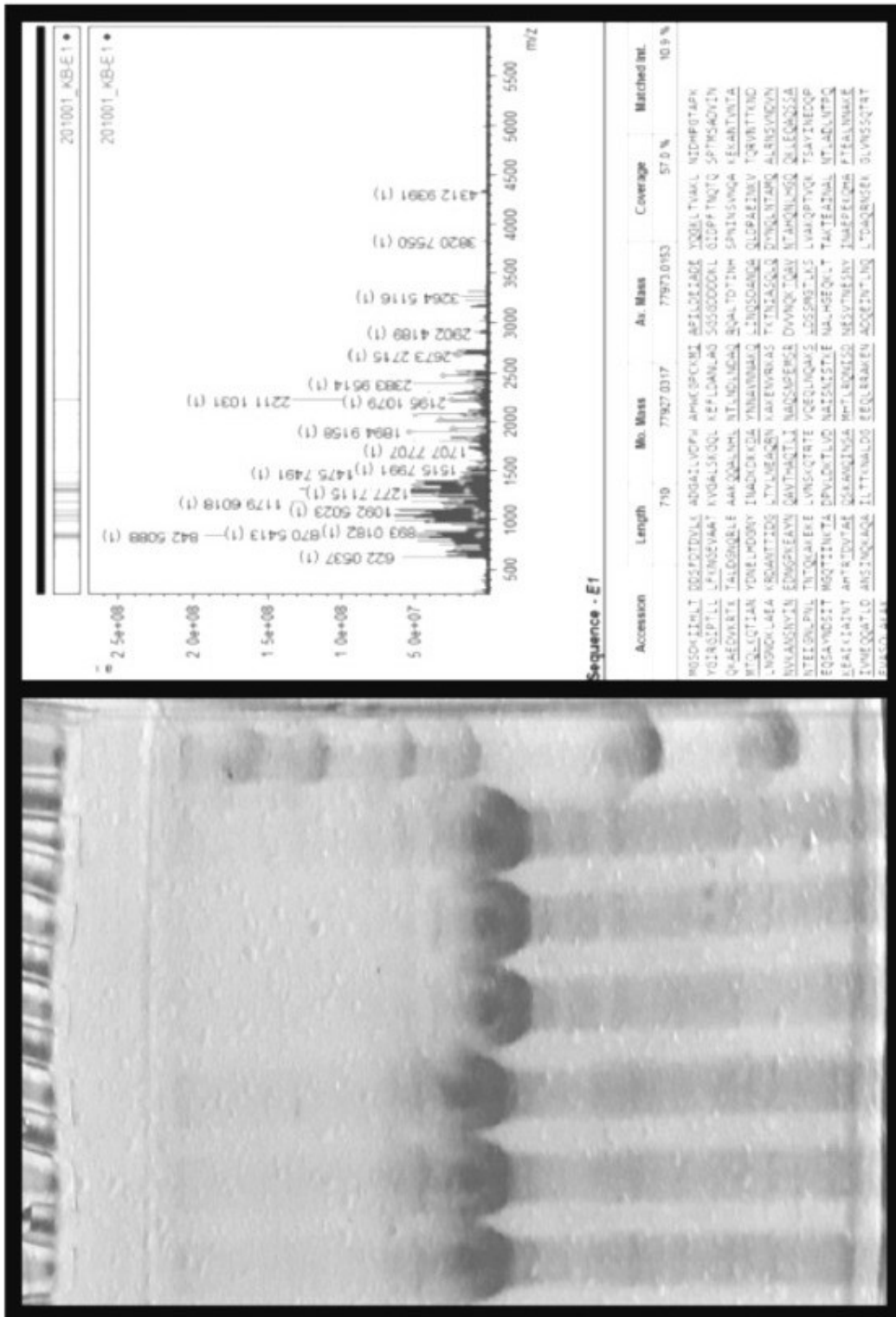
1. Berry D, Afeyan NB a kol. US10,980,845_B2 (uveřejněno 20. dubna 2021).
2. Bezouška K, Engl J a kol. CZ308231_B6 (uveřejněno 11. března 2020).
- 5 3. Black GW, Christensen J a kol. US9,820,953_B2 (uveřejněno 21. listopadu 2017).
4. Blanchard C, Nembrini C EP3407739_B1 (uveřejněno 23. června 2021).
5. Brucker RM, Zhang X a kol. US11,040,077_B2 (uveřejněno 22. června 2021).
6. Chen WH a kol. (2016) Sci Rep 6, 27870.
7. Christner M a kol. (2010) Mol Microbiol 75: 187-207.
- 10 8. Claudel JP a kol. (2019) Dermatology 235: 287-294.
9. Eisenstein M (2020) Nature 588: S209.
10. James-Meyer LS, Coles GC US10,786,477_B2 (uveřejněno 29. září 2020).
11. Jeon J a kol. KR102223406_B1 (uveřejněno 20. října 2018).
12. Kim G a kol. (2021) Communic Biol 4: 231
- 15 13. Kim HJ a kol. (2019) Microbiome 7: 80.
14. Kim YK, Ban C a kol. US2019/0345561_A1 (uveřejněno 14. listopadu 2019).
15. Naik S a kol. (2012) Science 337: 1115-1119.
16. Nakatsuji T, Gallo RL US10,980,848_B2 (uveřejněno 20. dubna 2021).
17. Ohnemus U a kol. (2008) J Invest Dermatol 128: 906-916.
- 20 18. Reddy MS US11,077,052_B1 (uveřejněno 3. srpna 2021).
19. Sanford JA, Gallo RL (2013) Sem Immunol 251: 370-377.
20. Scannapieco FA a kol. (2020) Clin Microbiol Newslet 35: 163-169.
21. Spector IC, Feltelson MA a kol. US11,065,217_B2 (uveřejněno 20. července 2021).
22. Stacy A, Belkaid Y (2019) Science 363: 227-228.
- 25 23. Walensky LD, Mourtada R a kol. WO2017/004591_A3 (uveřejněno 5. ledna 2017)

NÁROKY NA OCHRANU

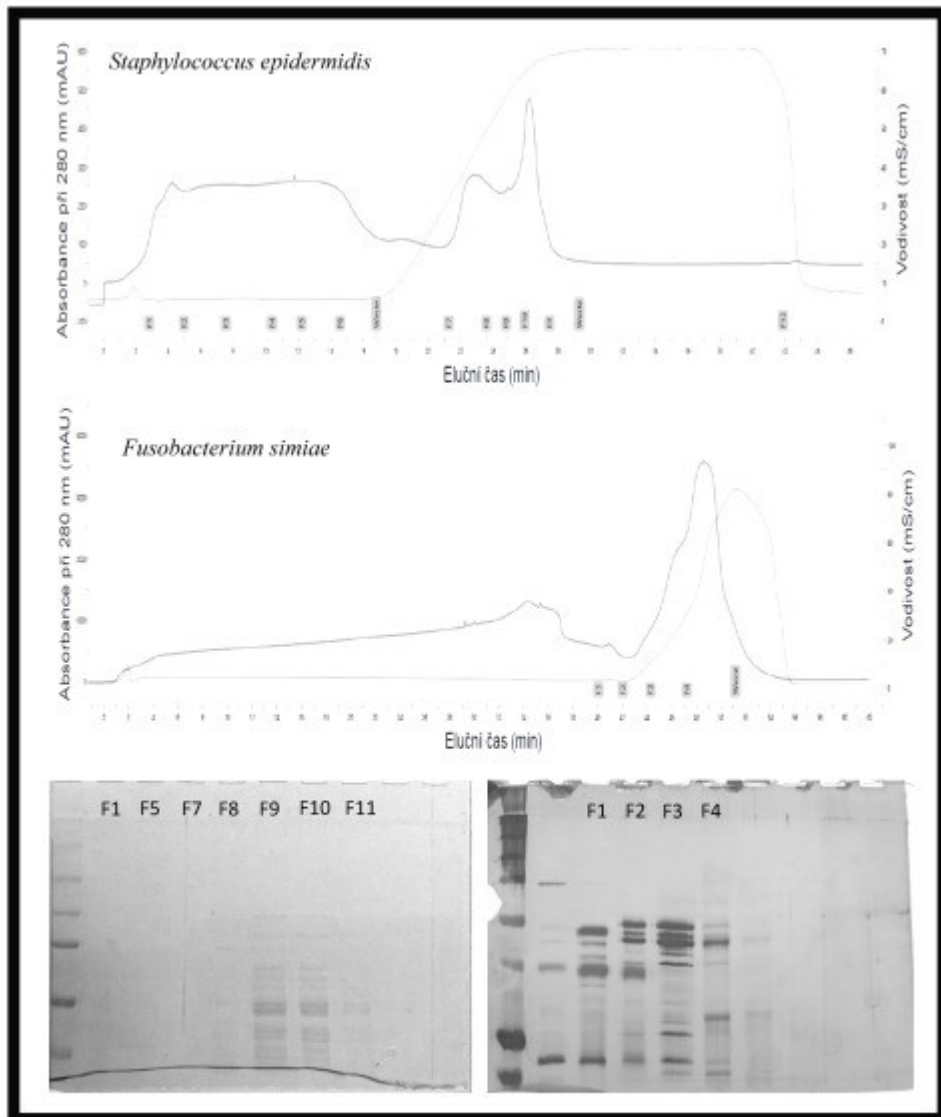
- 5 1. Přípravek na ochranu mikrobiomu kůže a sliznic proti patogenním mikrobům a virům, **vyznačující se tím**, že obsahuje bezbuněčný extrakt z komensálních bakterií lidské kůže druhu *Staphylococcus epidermidis*.
2. Přípravek podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že extrakt z bakterií je formulován do olejové emulze.
- 10 3. Přípravek podle nároku 2, **vyznačující se tím**, že olejová emulze obsahuje vodu, olivový olej, xylitol, glycerol, olej z černého kmínu, olej z citrusových jader, močovinu, arabskou gumu, polysorbát 80, cetyl alkohol, kyselinu stearovou, stearát hořečnatý, glyceryl distearát, fenoxylethanol, farnesyl acetát, hydroxid sodný, ethylhexylglycerin, fenyklový olej, olej z *Melaleuca alternifolia*, kyselinu octovou a kyselinu mléčnou.
- 15 4. Přípravek podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že dále obsahuje bezbuněčný extrakt z komensálních bakterií lidské dutiny ústní druhu *Fusobacterium simiae*.
5. Přípravek podle nároku 4, **vyznačující se tím**, že extrakty z bakterií jsou formulovány do vodného přípravku.
- 20 6. Přípravek podle nároku 5, **vyznačující se tím**, že vodný přípravek obsahuje vodu, vodný extrakt Aloe vera, ethanol, glycerol, xylitol, glukosu, laktosu, NaCl, MgSO₄·7H₂O, kyselinu dihydrooctovou, hydroxid sodný, kyselinu benzoovou, K₂HPO₄, KCl, kyselinu jantarovou, kyselinu citronovou, šalvějový extrakt, heřmánkový extrakt, CaCl₂, polysorbát 80, kyselinu boritou, tymiánovou silici, kyselinu mléčnou, mátovou silici, levandulový olej, acerolu, extrakt třapatky a citrusový olej.
7. Přípravek podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, **vyznačující se tím**, že je pro aplikaci na kůži.
- 25 8. Přípravek podle kteréhokoliv z nároků 4 až 6, **vyznačující se tím**, že je pro aplikaci do dutiny ústní a/nebo dutiny nosní.
9. Kosmetická sada pro posílení mikrobiomu kůže a sliznic a ochranu před patogenními mikroorganismy a viry, **vyznačující se tím**, že obsahuje přípravek podle nároku 7 a alespoň jeden přípravek podle nároku 8.

30

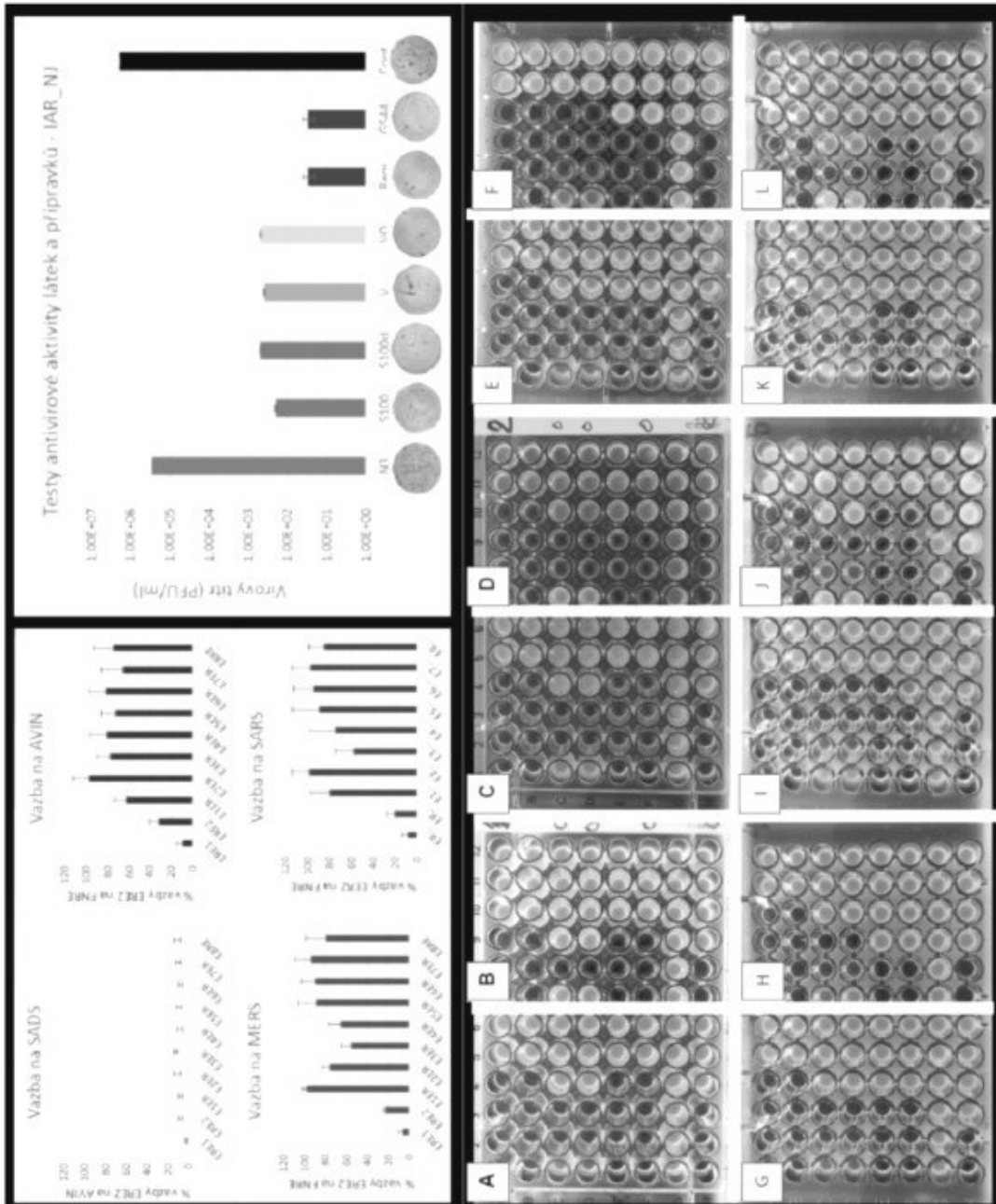
4 výkresy



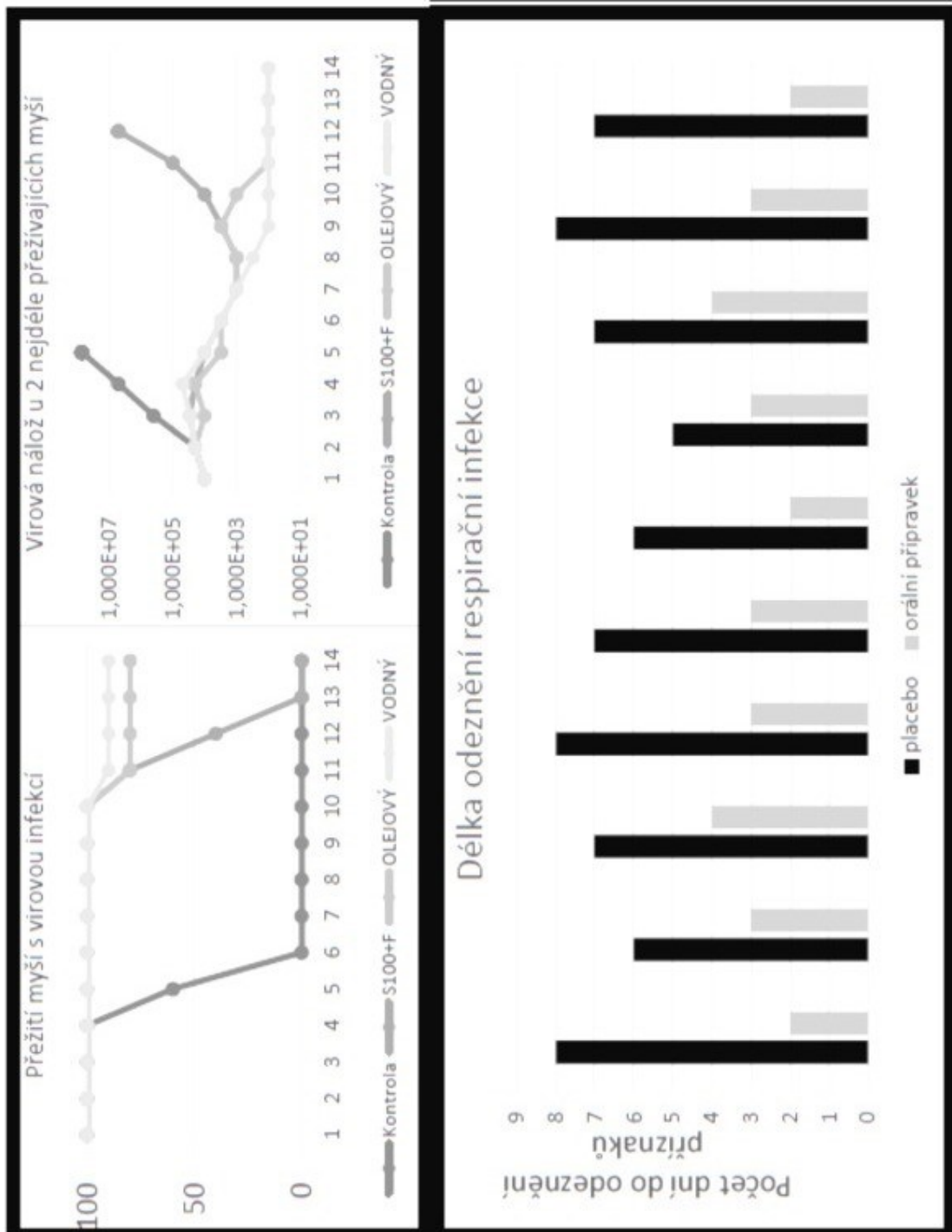
Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3



Obr. 4