

Область техники, к которой относится изобретение

Данное изобретение относится к средствам для увеличения чувствительности бактерий к антимикробным агентам и, в частности, но не только, к средствам для превращения бактерий, устойчивых к антимикробному агенту, в бактерии, имеющие увеличенную чувствительность к этому антимикробному агенту.

Уровень техники

Глобальное появление бактерий и других микроорганизмов, устойчивых к антибиотикам и антимикробным агентам вообще, создает главную угрозу для человечества. Распространение огромных количеств антимикробных агентов в экосфере человека на протяжении последних 60 лет ввело мощное селективное давление в отношении возникновения и распространения резистентных к антимикробным агентам бактериальных патогенов. Резистентные организмы особой эпидемиологической важности вследствие преобладания этих патогенов для вызывания перекрестной инфекции в больницах (нозокомиальной инфекции) и других учреждениях здравоохранения включают в себя метициллин-резистентные *Staphylococcus aureus* (MRSA) и другие грамположительные бактерии, такие как ванкомицин-резистентные энтерококки (VRE) и *Clostridium difficile*, и *Streptococcus pneumoniae*, который становится в увеличивающейся степени резистентным к β -лактамам и другим антимикробным агентам, плюс грамотрицательные палочки, которые продуцируют расширенный спектр β -лактамаз. Поскольку существует устойчивость к любому клинически доступному антибиотику, в частности, среди недавних штаммов эпидемического MRSA (EMRSA), существует перспектива постантибиотической эры, в которой существующие антимикробные агенты окажутся неэффективными.

Staphylococcus aureus

S. aureus является важной причиной приобретенной в общественных местах и внутрибольничной (нозокомиальной) инфекции и является второй наиболее важной причиной септицемии после *Escherichia coli* и второй наиболее частой причиной катетер-ассоциированной инфекции и перитонита, возникающего при продолжительном амбулаторном перитонеальном диализе. *S. aureus* является также главной причиной инфекции костей, суставов и кожи. В целом, *S. aureus* является наиболее обычным бактериальным патогеном в современных больницах и общественных учреждениях и местах. Он является также одним из наиболее устойчивых к антимикробным агентам и легко передающимся патогеном, который, в среднем, может присутствовать в приблизительно трети популяции здоровых людей, облегчая таким образом распространение по всему миру эпидемических штаммов.

Колонизация является предпосылкой для носительства и инфекции, и стафилококки являются хорошо известными «колонизаторами» кожи, ран и имплантируемых устройств. Носительство обычно встречается на специфических участках кожи, гистологически связанных с апокринными железами, в основном, в носдрах (подбирающей зоне носа) и, вторично, подмышечных ямках и промежности. Постулировалось, что *S. aureus* диссеминирует из носа на руки и, следовательно, в другие участки тела, где инфекция может возникать при разрывах в дермальных поверхностях, посредством катетеризации сосудов или хирургического рассечения. Интраназально вводимый мупироцин является главной опорой для искоренения назального носительства метициллин-резистентных *S. aureus* (MRSA), которые являются по природе устойчивыми ко множеству антибиотиков, во время вспышек эпидемий в больницах. Ввиду увеличивающихся опасений в отношении инфекции *S. aureus* крайне необходимым является поиск новых и надежных способов лечения для элиминации носительства *S. aureus*.

В начале 1950-х годов устойчивость к пенициллину, сообщаемая пенициллиназой (т.е. β -лактамазой), переносимой трансмиссивными плазмидами, была обычной в штаммах *S. aureus*, приобретаемых в больницах. Альтернативные антимикробные агенты, а именно, тетрациклин, стрептомицин и макролиды, вводили, но устойчивость развивалась быстро. Понимание химии β -лактамного кольца сделало возможным разработку метициллина, полусинтетического стабильного к пенициллиназе изоксазол-пипенициллина. Метициллин и последующая разработка других содержащих изоксазол-пипенициллина полусинтетических агентов, таких как флуклоксациллин, клоксациллин и оксациллин, произвели революцию в лечении инфекций *S. aureus*.

MRSA были впервые обнаружены в Англии в 1960 г. и с тех пор стали хорошо признанной причиной внутрибольничной (нозокомиальной) инфекции во всем мире. MRSA являются устойчивыми ко всем клинически доступным β -лактамам и цефалоспорином и легко приобретают детерминанты устойчивости к другим антимикробным агентам, используемым в клинической медицине. Селективное давление обеспечило возникновение и всемирное распространение MRSA. Вспышки эпидемий, вызываемые "современными" эпидемическими MRSA (EMRSA) в Соединенном Королевстве, начались в начале 1980-х годов со штамма, впоследствии охарактеризованного как EMRSA-1. В настоящее время имеются 17 эпидемических типов, признанных в Соединенном Королевстве, и частота заболеваний, связанных с ними, устойчиво растет в Англии и Уэльсе с 1-2% от описанных изолятов из крови и спинно-мозговой жидкости в 1989-92 гг. до 31,7% в 1997 г. Это повышение отражает увеличивающееся преобладание эпидемических штаммов типов 15 и 16. EMRSA являются очень трансмиссивными и вариабельно приобретают устойчивость ко всем антимикробным агентам, помимо антимикробных агентов, связанных с метицил-

лином и β -лактамным кольцом. Помимо EMRSA серьезная кожная инфекция ассоциировалась с внебольничным MRSA (community-acquired C-MRSA). Она представляет собой быстро растущее явление, о котором в последнее время сообщалось в США, Англии и континентальной Европе. Сообщалось также об инфекции нижних дыхательных путей. Многие из этих C-MRSA продуцируют токсин, называемый PVL, который является лейкоцидином, ассоциированным с высокой смертностью. Серьезная инфекция, происходящая из кожного и из назального носительства (такая как внебольничная пневмония) MRSA, может быть предотвращена путем применения подходящих противостафилококковых антимикробных агентов для местного применения.

Устойчивость к ванкомицину

S. aureus/MRSA

Следующим зловещим проявлением является способность некоторых штаммов к приобретению пониженной или промежуточной устойчивости к гликопептидам. Гликопептидные антибиотики, в частности ванкомицин, были лекарственными средствами выбора и во многих случаях лишь единственными агентами для лечения инфекции MRSA и других устойчивых грамположительных бактерий, таких как энтерококки. Если MRSA не поддаются контролю, то клиническое применение ванкомицина или тейкопланина приобретает значение вследствие увеличивающегося количества инфекций ран и кровообращения у госпитализированных пациентов. Вскоре после сообщения Hiramatsu о промежуточно устойчивых к ванкомицину MRSA в Японии (Lancet 1997, 350, pp 1670-3) EMRSA-16 начал уменьшать его чувствительность к ванкомицину в некоторых клинических изолятах из диабетических язв ног. Новый эпидемический штамм EMRSA-17 возник на южном побережье Англии, и он обладает преимуществом в отношении уменьшенной чувствительности к ванкомицину. В настоящее время считают, что этот штамм возник из EMRSA-5, и это демонстрирует, что эпидемические штаммы непрерывно возникают даже с еще большей устойчивостью и склонностью вызывать тяжелое заболевание. Наиболее серьезным проявлением является развитие MRSA с устойчивостью высокого уровня к ванкомицину (VRSA). О них сообщалось в США, и эти штаммы несут гены, идентичные генам устойчивости к ванкомицину в VRE. Распространение VRSA представляется неизбежным и, если не будет подходящих антимикробных агентов для борьбы с носительством и инфицированием ран, то продолжение рутинной хирургии в зараженных учреждениях, по-видимому, является невозможным.

Энтерококки

Энтерококки, в частности, *Enterococcus faecium* и *E. faecalis*, являются прежде всего кишечными комменсалами, но могут становиться условно-патогенными микроорганизмами, которые колонизируют и инфицируют хозяев иммунокомпрометированных, таких как пациенты с трансплантатом печени. Устойчивые к ванкомицину *E. faecium* (VREF) появились и с тех пор стали важными нозокомиальными патогенами. С первого появления устойчивых к ванкомицину энтерококков в южной части Лондона и Париже в 1987 г. во многих странах с увеличивающейся частотой сообщалось об устойчивых ко многим антимикробным агентам энтерококках. Действительно, *E. faecium*, устойчивый к гентамицину, ванкомицину и другим агентам, вызывал инфекции, для которых в Соединенном Королевстве не было доступных терапевтических агентов, хотя в настоящее время лицензирован хинупристин/далфопристин, который является активным (МИК ≤ 2 мг/л) против 86% изолятов *E. faecium*. В США доля VREF среди энтерококков, выделенных из кровяных культур, увеличилась с 0% в 1989 г. до 25,9% в 1999 г. Главным источником VREF является, по-видимому, сырое мясо домашней птицы.

Хотя антимикробная устойчивость является предметом глобального беспокойства, единственным способом, предложенным для контроля и уменьшения устойчивости, является поощрение подходящего использования антимикробных агентов. Однако ожидания, что осторожное использование антибиотиков будет приводить к обращению тенденций устойчивости, должны восприниматься с осторожностью. Концепция превращения устойчивых штаммов в чувствительные штаммы с целью возобновления применения ранее разработанных антимикробных агентов, а не разработки новых агентов, к которым будет впоследствии развиваться устойчивость, не была исследована.

Целью данного изобретения является обеспечение средства для превращения бактерий (ВТА) для обращения (частичного или полного) устойчивости бактериальной клетки к антимикробному агенту.

Средства для превращения бактерий являются известными и имеют следующие характеристики.

1. Когда микроорганизмы имеют клеточные стенки, устойчивые к активным в отношении клеточных стенок антимикробным агентам и эта устойчивость основана на поперечных мостиковых связях (сшивках) между клеточными стенками, ВТА превращают этот устойчивый микроорганизм из его устойчивого состояния в состояние, чувствительное к активному в отношении клеточной стенки агенту.

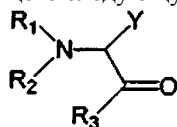
2. Присутствие ВТА является существенным для осуществления превращения.

3. ВТА сами по себе не являются терапевтическими агентами в концентрациях, в которых они используются в качестве ВТА.

4. Действие ВТА на микроорганизм-мишень обращается при удалении ВТА.

5. ВТА не являются ингибиторами специфического механизма устойчивости, такого как β -лактамаза, насос для откачки или разрушающий антибиотик фермент.

Данное изобретение относится к способу увеличения чувствительности бактериального штамма к антимикробному активному в отношении клеточной стенки агенту, к которому данный бактериальный штамм или штамм-предшественник, из которого развился данный штамм, является чувствительным, предусматривающему стадию подвергания указанного бактериального штамма действию по меньшей мере одного превращающего средства, имеющего следующую формулу (I):



где остатки R_1 и R_2 , каждый независимо, выбраны из алкила, алкилокси, алкилоксикарбонила, алкилкарбонилокси, алкенила, алкенилокси, алкенилоксикарбонила, алкенилкарбонилокси, алкинила, алкинилокси, алкинилоксикарбонила, алкинилкарбонилокси, каждый из которых может быть замещенным или незамещенным, имеющим прямую цепь или разветвленным или циклическим, арила, арилокси, арилоксикарбонила, арилкарбонилокси, каждый из которых может быть замещенным или незамещенным, и карбамоила,

остаток R_3 выбран из алкила, алкилокси, алкилкарбонилокси, алкенила, алкенилокси, алкенилкарбонилокси, алкинила, алкинилокси, алкинилкарбонилокси, каждый из которых может быть замещенным или незамещенным, имеющим прямую цепь или разветвленным или циклическим, арила, арилокси, арилкарбонилокси, каждый из которых может быть замещенным или незамещенным, и карбоксила,

иные, чем R_1 , R_2 и R_3 , не являются все H, и

Y выбран из боковой цепи природной аминокислоты, или его физиологически приемлемой соли или производного, которое превращается в соединений формулы I при физиологических условиях.

Серосодержащие аналоги указанных кислородсодержащих заместителей также находятся в рамках данного изобретения. Ссылка на циклические соединения предполагает включение в рамки данного изобретения гетероциклических соединений, имеющих один или более атомов N, S или O в их кольцевой системе.

Подходящие заместители в любом из указанных остатков R_1 , R_2 и R_3 включают в себя галоген (например, F или Cl), гидроксил (-OH), карбоксил (-CO₂H), аминогруппу или амидную группу.

Предпочтительно Y представляет собой -H₂ (т.е. «боковую цепь» глицина).

Предпочтительно один из R_1 и R_2 является H.

Предпочтительно один из R_1 и R_2 представляет собой алкилкарбонил (более предпочтительно C₁-C₆-алкилкарбонил), алкенилкарбонил (более предпочтительно C₂-C₆-алкенилкарбонил), алкинилкарбонил (более предпочтительно C₂-C₆-алкинилкарбонил). Даже более предпочтительно один из R_1 и R_2 является C₁-C₆-алкилкарбонил и наиболее предпочтительно метилкарбонил (ацетил).

Предпочтительно R_3 представляет собой алкилокси (более предпочтительно C₁-C₆-алкилокси), алкенилокси (более предпочтительно C₂-C₆-алкенилокси), алкинилокси (более предпочтительно C₂-C₆-алкинилокси) или арилокси (более предпочтительно фенилоксикарбонил). Еще более предпочтительно R_3 является бензилокси.

Особенно предпочтительными превращающими средствами являются такие, где R_1 обозначает H, R_2 обозначает ацетил и R_3 обозначает карбоксил (N-ацетилглицин) или бензилокси (бензиловый эфир N-ацетилглицина) и где R_1 и R_2 обозначают H и R_3 обозначает бензилокси (бензиловый эфир глицина). Особенно предпочтительные превращающие средства включают в себя бензиловый эфир глицина, этиловый эфир глицилглицина, гиппуровую кислоту, парааминогиппуровую кислоту и пропаргилглицин.

Способ в соответствии с данным изобретением особенно пригоден для увеличения чувствительности бактериального штамма к антимикробному агенту, такому как пенициллин и его производные и аналоги, в частности, такие, которые устойчивы к стафилококковой и подобным β-лактамазам (например, оксациллин), и к гликопептидам (например, ванкомицину).

Во избежание сомнения превращающие средства, применимые в способе данного изобретения, включают в себя физиологически приемлемые соли и другие производные вышеуказанных соединений формулы I, которые превращаются в соединение формулы I при физиологических условиях.

Должно быть понятно, что указанные превращающие средства обычно сами по себе не имеют антимикробных свойств при «превращающих» количествах, т.е. при концентрациях, которые лишь потенцируют активность антимикробных агентов. Некоторые из описанных соединений могут быть антибактериальными при более высоких количествах, например, пропаргилглицин и гиппуровая кислота.

Характеристики, связанные с описанной формулой и ее вариантами

1. Термин «превращающий» поясняется, например, превращением устойчивого к метициллину *S. aureus* в чувствительный к метициллину *S. aureus*.

2. Устойчивость к метициллину не сообщается β-лактамазами. Если стафилококк является продуцентом β-лактамазы, превращающее средство не будет влиять на чувствительность к антибиотикам, чувствительным к β-лактамазам.

3. Действие превращающих средств распространяется на все стафилококки, устойчивые к β -лактамным антибиотикам, устойчивым к β -лактамазе, в том числе цефалоспорином.

4. Имеется также активность против устойчивых к ванкомицину энтерококков (VRE), хотя это действие является менее сильным. Считается, что активность ВТА в VRE обусловлена одной или несколькими молекулами глицина в поперечной мостиковой связи (связях) в клеточной стенке этих микроорганизмов.

5. Действие превращающих средств должно распространяться на VRSA.

Данное изобретение относится также к использованию средства, имеющего формулу (I), в приготовлении лекарственного средства для увеличения чувствительности бактериального штамма, инфицирующего, колонизирующего пациента или носимого пациентом, к антимикробному агенту. Предпочтительно указанный бактериальный штамм (т.е. мишень превращения) имеет устойчивость к антимикробному агенту, подлежащему для совместного составления в рецептуру с ВТА.

Далее, данное изобретение относится к способу предупреждения и/или лечения пациента от инфекции носимым бактериальным штаммом, предусматривающему введение указанному пациенту количества превращающего средства формулы (I), достаточного для превращения указанного штамма в более чувствительный к антимикробному агенту штамм, вместе с терапевтически эффективным количеством указанного антимикробного агента.

Должно быть понятно, что указанный пациент может быть бессимптомным носителем данного бактериального штамма или указанный пациент может иметь симптоматическую клиническую инфекцию.

Введение указанного превращающего средства (ВТА) может проводиться до, после введения антимикробного агента или одновременно с этим антимикробным агентом. Однако предпочтительно указанный превращающий агент вводят вместе с указанным антимикробным агентом или до введения указанного антимикробного агента. В случае одновременного введения превращающее средство и антимикробный агент могут вводиться в комбинации в виде единого лекарственного средства или в виде отдельных лекарственных средств. Предпочтительно, превращающее средство и антимикробный агент вводят в комбинации в виде единого лекарственного средства (т.е. совместным введением). Следует отметить, что совместно вводимый антимикробный агент должен иметь достаточную присущую ему активность в отношении вида, к которому принадлежит организм-мишень, т.е. должен иметь хорошую активность против природно чувствительных вариантов этого устойчивого организма-мишени.

Введение может выполняться любым известным способом, например, внутривенной, внутримышечной или интратекальной (спинно-мозговой) инъекцией, интраназальным, местным введением в виде мази, целебной мази, крема или настойки, пероральным введением в виде таблетки, капсулы, суспензии или жидкости и назальным введением в виде спрея (например, аэрозоля). Выбор способа введения выполняют в зависимости от свойств выбранного ВТА.

В каждом случае указанное средство или комбинация агентов может быть в смеси с одним или несколькими эксципиентами, носителями, эмульгаторами, растворителями, буферами, регуляторами pH, улучшающими вкус и запах агентами, красителями, консервантами или другими обычно используемыми добавками в области фармацевтических средств, подходящими для способа введения.

Предпочтительно указанное средство способно увеличивать чувствительность к подходящему активному в отношении клеточной стенки антимикробному агенту по меньшей мере одного бактериального штамма, выбранного из *Staphylococcus aureus*, коагулаза-отрицательных стафилококков, энтерококков, *Clostridium difficile* и *Streptococcus pneumoniae*. Более предпочтительно указанный агент способен увеличивать чувствительность к антимикробному агенту по меньшей мере одного из устойчивого к метициллину *Staphylococcus aureus* и устойчивых к ванкомицину энтерококков, в частности, когда этот бактериальный штамм является устойчивым к антимикробному агенту, например метициллину, оксациллину, флуклоксациллину, ванкомицину. В частности, указанный агент предпочтительно способен увеличивать чувствительность EMRSA-15, -16 и/или -17 или других EMRSA к β -лактамным (и аналогичным) антибиотикам/антимикробным агентам и/или увеличивать чувствительность EMRSA с пониженной чувствительностью к ванкомицину, тейкопланину или другому гликопептиду или VRSA к вышеуказанным антимикробным агентам.

В каждом случае, чувствительность предпочтительно увеличивается до уровня сравнимого неустойчивого бактериального штамма при концентрации агента 0,02 М или менее, более предпочтительно 0,002 М или менее, и наиболее предпочтительно 0,001 М или менее при определении посредством стандартного теста чувствительности к антибиотикам, предпочтительно Е-теста.

Указанное средство способно также увеличивать чувствительность уже чувствительного бактериального штамма, выбранного из *Staphylococcus aureus*, коагулаза-отрицательных стафилококков, энтерококков, *Clostridium difficile*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* и других стрептококков и грамположительных патогенов, до «гиперчувствительности» к пенициллину или аналогу или производному или гликопептиду. Таким образом, указанное средство может прописываться совместно или может вводиться совместно или составляться в рецептуру совместно с подходящим антимикробным агентом в случаях, когда этот бактериальный штамм вызывает быстро угрожающую жизни инфекцию, в частности,

в ослабленном хозяине, для создания "гиперчувствительности" инфицирующего организма к антимикробному агенту.

Предпочтительно антимикробный агент, к которому увеличивается чувствительность, выбран из группы, состоящей из β -лактамов (и аналогичных) антибиотиков (например, метициллина, пиперациллина, флюксоациллина, клоксациллина, оксациллина, аугментина, офлоксациллина, имипенема и мерпенама), цефалоспоринов (например, цефтазидима и цефуроксима) и гликопептидов (например, ванкомицина, тейкопланина, гентамицина и оритавацина).

Будет понятно, что могут быть использованы два или более антимикробных агента (из одного и того же класса или предпочтительно из различных классов).

Устойчивость к метициллину в стафилококках

Клеточная стенка стафилококка играет важную роль в патогенезе и лечении инфекции. В грамположительных бактериях клеточная стенка состоит из слоев пептидогликана, которые поперечно сшиты пептидными мостиками. Грамотрицательные бактерии имеют тонкий пептидогликановый слой, инкапсулированный наружной клеточной мембраной. Этот пептидогликан содержит также поперечные мостиковые связи и муропептидные хвосты, на которые могут быть нацелены ВТА, как определено общими принципами, очерченными в общем виде ниже. Вследствие уникальности структуры и сборки пептидогликана он является одной из предпочтительных мишеней для антимикробных агентов, в том числе антибиотиков, природно продуцируемых несколькими типами микроорганизмов. Пептидогликан *Staphylococcus aureus* состоит из линейных сахарных цепей из чередующихся звеньев N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмуравовой кислоты, замещенной пентапептидом L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala. Характеристикой клеточной стенки *S. aureus* является пентаглициновая поперечная связь, которая соединяет L-Lys с D-Ala на пентапептиде соседнего звена, причем концевой D-Ala отщепляется транспептидированием. Этот гибкий пентаглициновый мостик делает возможным поперечное сшивание до 90% пептидогликановых звеньев, обеспечивая таким образом существенную стабильность клеточной стенки. Кроме того, эта пентаглициновая связь действует в качестве реципиента для поверхностных стафилококковых белков, которые ковалентно закориваются на ней посредством реакции, подобной транспептидазной реакции. Поверхностные белки играют важную роль в адгезии и патогенности посредством взаимодействия с белками матрикса хозяина. Основная теория в отношении механизма действия β -лактамов касается их структурного сходства с D-Ala-D-Ala-карбокси-концевым районом пентапептида пептидогликана. Пенициллины, цефалоспорины и другие β -лактамы ацилируют серии активного сайта транспептидаз клеточной стенки с образованием стабильных ацилферментов, которые лишены каталитической активности. Ингибирование синтеза пептидогликанов ковалентным связыванием β -лактамов ферментами синтеза клеточной стенки, известными как пенициллинсвязывающие белки (PBP), делает возможным автолиз *S. aureus*, опосредованный эндогенными автолитическими ферментами. Хотя автолиз является менее вероятным в MRSA, ген *lrm* кодирует липофильный белок из 351 аминокислотного остатка, который ассоциирован с уменьшенной устойчивостью к метициллину, сопровождаемой увеличенным автолизом. Чувствительные к метициллину *S. aureus* продуцируют четыре основных PBP с молекулярными массами приблизительно 85, 81, 75 и 45 кДа, соответственно обозначаемыми PAP 1, 2, 3 и 4 (в соответствии с принятой договоренностью, PBP нумеруются в порядке уменьшения молекулярной массы). Устойчивость к пенициллину в *S. aureus* первоначально была приобретена в форме β -лактамаз или пенициллиназ, в настоящее время продуцируемых приблизительно 90% клинических изолятов. Структурный ген β -лактамазы, *blaZ*, и два регуляторных гена, *blaI* и *blaRI*, обычно находятся на трансмиссивной плазмиде, хотя в некоторых штаммах была идентифицирована хромосомная локализация. Считается, что индукция β -лактамазы инициируется связыванием β -лактамов с трансмембранным доменом передающего сигнал PBP, кодируемого *blaRI* (PBP3), приводящим в конце концов к деградации репрессора с потерей его ДНК-связывающих свойств, так что становится возможной транскрипция *blaZ*. Способ, при помощи которого комплекс *BlaRI*-пенициллин вызывает деградацию репрессора, является неясным, хотя считается, что деградация могла бы происходить либо вследствие 1) конформационных изменений *BlaRI*, индуцируемых активацией протеазы в цитоплазматическом домене в результате связывания β -лактама, либо вследствие 2) инактивирующей репрессор протеазы, кодируемой предполагаемым геном *blaR2*, которую комплекс *BlaRI*-пенициллин либо активирует, либо заставляет индуцироваться, β -лактамазы катализируют инактивацию пенициллина и других β -лактамов (в зависимости от класса β -лактамазы) ковалентным связыванием с β -лактамным кольцом. По существу, это является такой же реакцией, которая имеет место, когда β -лактамы связываются с активным сайтом PBP, за исключением того, что эта реакция является негидролитической и необратимой. Некоторые PBP имеют детектируемую β -лактамазную активность, в том числе PBP 4 *S. aureus*. Однако высокомолекулярные PBP (например, PBP 1, 2 и 3 в *S. aureus*), в основном, участвуют в транспептидировании пептидогликана, тогда как низкомолекулярные PBP проявляют только карбоксипептидазную активность.

Устойчивость к метициллину в *S. aureus* и коагулаза-отрицательных стафилококках определяется образованием специфического PBP, PBP2a, который имеет уменьшенную аффинность в отношении β -лактамов соединений. Низкоаффинный PBP2a придает внутреннюю устойчивость к практически всем

β -лактамным антимикробным агентам, в том числе цефалоспорином. PBP2a действует в качестве транспептидазы в синтезе клеточной стенки в MRSA, когда присутствуют высокие концентрации β -лактамов, что ингибирует активность нормальных PBP, 1-4. PBP2a кодируется структурным геном *mecA*, локализованным на хромосоме устойчивого к метициллину стафилококка. Экспрессия PBP2a регулируется двумя регуляторными генами на *mec*-ДНК, *mecI* и *mecRI*, локализованными впереди от *mecA*, которые кодируют репрессорный белок *mecA* и белок передачи сигнала, соответственно. MRSA, несущие интактные *mecI* и *mecRI* вместе с *mecA*, называют «пре-MRSA». Поскольку интактный продукт *mecI* сильно репрессировывает экспрессию PBP2a, пре-MRSA является, по-видимому, чувствительным к метициллину. Была высказана гипотеза, что удаление репрессорной функции в отношении *mecA* является предпосылкой для конститутивной экспрессии устойчивости к метициллину в *S. aureus*, несущей *mec*-ДНК. Существует гомология между *mecI* и *blaI*, *mecRI* и *blaRI* и промоторными и N-концевыми частями *blaZ* и *mecA*. Эта гомология является достаточно сильной для того, чтобы *blaI* мог восстанавливать нормальный индуцибельный фенотип у изолятов *S. aureus*, что приводит к большим количествам конститутивной продукции PBP2a вследствие отсутствия или дефекта в локусе *mecI*. Увеличенное продуцирование PBP2a может быть связано с устойчивостью к ванкомицину (см. ниже).

После обнаружения PBP2a стало понятным, что фенотипическая экспрессия устойчивости к метициллину не коррелировала с количеством экспрессируемого PBP2a. В 1983 г. было показано, что необходимы несколько дополнительных генов, независимых от *mecA*, для сохранения высокого уровня устойчивости к метициллину в MRSA. Эти гены были названы *fem*, так как считалось, что они обеспечивают факторы, существенные для устойчивости к метициллину, или *aux*, т.е. вспомогательные (*auxiliary*) факторы. Хотя первоначально считали, что факторы *fem* и *aux* представляли дополнительные гены, рекрутированные стафилококками после приобретения *mecA* для дополнительного улучшения и укрепления устойчивости к метициллину и ее гомогенности, становилось все более ясным, что гены *fem* были природными компонентами всех стафилококков и участвовали в образовании пентапептидного мостика и модификации этого мостика или муропептида. Синтез пентаглицинового мостика происходит на мембраносвязанном предшественнике липида II NAG-(β -1,4)-NAM-(L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala)-пирофосфорилундекапеноле посредством последовательного добавления глицина к ϵ -аминогруппе лизина с использованием глицил-tРНК в качестве донора независимым от рибосом образом. Были описаны шесть генов *fem* (*femA*, *femB*, *femC*, *femD*, *femE*, *femF*). Гены *femA* и *femB* являются близкородственными, но отличными генами, которые образуют часть оперона. Было показано, что как *femA*, так и *femB* участвуют в образовании пентаглицинового мостика. *FemA*, продукт гена *femA*, является ответственным за добавление глицинов 2 и 3 к этому мостику, тогда как *FemB*, продукт гена *femB*, добавляет глицины 4 и 5. Был предложен гипотетический ген *femX* как ответственный за белок, который добавляет первый глицин.

В стафилококках были идентифицированы другие FemA,B-подобные факторы, такие как *Lif* в *Staphylococcus simulans* и *Epr* в *Staphylococcus capitis*, которые защищают эти организмы от их собственной глицилглицин-эндопептидазы. Затем были идентифицированы три новых гена, *fmhA*, *B* и *C*. Эти *fem*-подобные гены являются ответственными за введение 1-2 остатков серина в пентапептидный мостик в коагулаза-отрицательных стафилококках и могут, при определенных условиях, включать остатки серина в положения 3 или 5 в этом мостике в некоторых штаммах *S. aureus*. Затем было показано, что *fmhB* является постулируемым *femX*, который добавлял остатки глицина в положение 1 в пентаглициновом межпептидном мостике.

Ингибирование образования пентаглицинового мостика уменьшает устойчивость к метициллину без влияния на синтез PBP2', приводя к гиперовосприимчивости к β -лактаму (гиперчувствительности). Таким образом, пентапептидный мостик имеет важную функцию в поддержании стабильности клеточной стенки, в том числе устойчивости к антимикробным агентам. Данная заявка придает также большое значение пригодности эндогенных эндопептидаз в качестве мишеней для превращения, так как природная активность этих ферментов может использоваться для превращения чувствительности бактериальных клеток к определенным активным в отношении клеточных стенок агентам, примером чего является превращение устойчивых к метициллину штаммов в чувствительные к метициллину штаммы.

Устойчивость к ванкомицину

Гликопептидные антибиотики являются ингибиторами синтеза пептидогликанов. В отличие от β -лактамов и родственных антимикробных агентов, гликопептиды не связываются непосредственно с ферментами биосинтеза клеточной стенки (PBP), а образуют комплекс с карбоксигруппой концевой D-аланина пентапептида-предшественника клеточной стенки. Это блокирует продвижение к последующим стадиям трансгликозимерования в синтезе пептидогликанов и препятствует реакциям, катализируемым D,D-транспептидазами и D,D-карбоксипептидазами, необходимым для заякоривания пептидогликанового комплекса.

С первого появления VRE (ванкомицин-резистентных энтерококков) было очевидно, что штаммы могут быть разделены по их типу и уровню устойчивости к гликопептидам. В настоящее время имеются семь генотипических классов для характеристики гликопептид-резистентных энтерококков: *vanA*, обнаруживаемый преимущественно в *E. faecium* и *E. faecalis*, который придает устойчивость к ≥ 256 мг/л ван-

комицина и ≥ 32 мг/л тейкопланина; *vanB*, обнаруженный в *E. faecium*, *E. faecalis* и *Streptococcus bovis*, который придает устойчивость к 4-1000 мг/л ванкомицина и $\leq 1,0$ мг/л тейкопланина; *vanC1* (*E. gallinarium*), *vanC2* (*E. casseliflavus*), *vanC3* (*E. flavescens*), который придает устойчивость к 2-32 мг/л ванкомицина и $\leq 1,0$ мг/л тейкопланина; *vanD*, который придает устойчивость к 64-256 мг/л ванкомицина и 4-32 мг/л тейкопланина в *E. faecium*; и *vanE*, который придает устойчивость к 16 мг/л ванкомицина и 0,5 мг/л тейкопланина в *E. faecalis*. VRE типа VanA обеспечивают основную модель достижения резистентности высокого уровня к ванкомицину: вместо образования пентапептидных звеньев клеточной стенки с хвостами D-Ala-D-Ala, с которыми связываются ванкомицин и другие гликопептиды, гликопептидами индуцируется кластер генов *vanA* для образования хвостов D-Ala-D-Lac, с которыми ванкомицин и тейкопланин не связываются. Кластер генов *vanA* содержится на транспозируемом элементе TN1546, а сам ген *vanA* продуцирует белок 39 кДа, локализованный в цитоплазматической мембране. Этот белок является лигазой, которая синтезирует преимущественно D-Ala-D-Lac. Кроме *vanA*, имеются два других гена: *vanH*, который кодирует фермент дегидрогеназу, продуцирующую D-lac из пирувата, и *vanX*, который кодирует металлодипептидазу, которая преимущественно гидролизует D-Ala-D-Ala. Активация транскрипции *vanHAX* регулируется двухкомпонентной регуляторной системой VanRS, содержащей гены *vanS*, сенсора сигнала, и *vanR*, регулятора ответа. Остальная часть кластера генов *vanA* включает в себя два дополнительных гена, *vanY* (D,D-карбоксипептидаза, которая отщепляет концевой D-Ala от остатков пентапептида и может увеличивать уровень устойчивости к гликопептидам дополнительно элиминацией мишеней связывания, т.е. D-Ala-DS-Ala) и *vanZ* (который опосредует увеличенную устойчивость к тейкопланину).

Возникновение в конце концов устойчивых к ванкомицину MRSA было предвосхищено, так как было показано экспериментально, что гены *vanA* из VRE могут быть перенесены в дефицитный по комбинации *S. aureus*. Однако это не случилось на практике ни с *S. aureus*, ни с коагулаза-отрицательными стафилококками. По-видимому, в MRSA устойчивость к ванкомицину не встречается без толерантности к β -лактамам, и толерантные штаммы *S. aureus*, вызывающие эндокардит, ассоциированы с увеличенной смертностью. Толерантность к ванкомицину возникала также в *Streptococcus pneumoniae*, и толерантные штаммы более легко превращаются в высокоустойчивые штаммы. Это, по-видимому, опосредовано изменениями ДНК в двухкомпонентной системе сенсор-регулятор (*VncS-VncR*), которая опосредует изменения в экспрессии генов, связанных с образованием клеточной стенки. Аминокислотные последовательности *VncS* и *VncR* обнаруживают 38% гомологию с регуляторной системой *VanS_B-VanR_B*, связанной с устойчивостью к гликопептидам в ванкомицин-резистентном *E. faecalis* (VREF), и являются, возможно, релевантными в отношении MRSA. Действительно, сверхпродуцирование цитоплазматического белка 37 кДа, который, как считается, является D-лактатдегидрогеназой, аналогичной *VanH* в VREF, было связано с устойчивостью к ванкомицину в штамме *S. aureus*. Эта стафилококковая D-лактатдегидрогеназа может также находиться под контролем механизмов трансдукции сигналов, сходных с двухкомпонентными гомологичными районами в *S. pneumoniae*, и MRSA, возможно, имеют последовательности, гомологичные *VanS_B-VanR_B/VncR-VncS*. Устойчивость к ванкомицину в MRSA достигалась скорее другим способом, чем приобретение новых генетических элементов, а именно изменением состава клеточной стенки, которое в сильной степени регулируется ферментами, классически чувствительными к пенициллину (PBP). Сверхпродукция PBP2a, утолщенная клеточная стенка, содержащая неамидированный компонент с высоким содержанием глутамин, и увеличение синтеза клеточной стенки, - все цитировались в качестве механизмов. До сих пор еще не было показано, что появление в клеточной мембране дегидрогеназы, гомологичной *VanH* в энтерококках, является важным в клинических штаммах, хотя существует определенный потенциал в отношении развития устойчивости высокого уровня к ванкомицину при участии этого белка. В настоящее время этот тип устойчивости к ванкомицину, встречающийся в *S. aureus*, был описан как промежуточная или уменьшенная (чувствительность), которую обычно трудно детектировать рутинными диагностическими способами. Основным способом детектирования является отсутствие успеха при лечении. Однако в настоящее время в США были выделены штаммы VRSA, и ожидается, что они широко распространятся по всему миру или будут свидетельствовать о появлении подобных штаммов в других местах.

Терапевтическое применение тейкопланина является несколько противоречивым, так как он не был одобрен для применения в США и может селекционировать на ванкомицин-резистентный *S. aureus*. MRSA с уменьшенной чувствительностью к гликопептидам, выделенный из диабетических язв стоп, был ассоциирован с использованием тейкопланина, и неудача лечения была связана с увеличенными МИК (минимальными ингибирующими концентрациями) тейкопланина.

Известно, что высокие концентрации экзогенного глицина влияют на синтез клеточной стенки. Более специфический интерес представляет открытие того, что глицин уменьшает МИК метициллина против MRSA: De Jonge et al. (*Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (1996), 40, pp. 1498-1503) использовали концентрации глицина в среде для выращивания, которые приводили к пептидогликану, в котором муропептиды с D-Ala-D-Ala-концом были заменены муропептидами с D-Ala-глицин-концом. Эти авторы сделали вывод, что исчезновение муропептидов с D-Ala-D-Ala-концами в пептидогликане и сопутст-

вующее уменьшение устойчивости свидетельствуют о центральной роли имеющих D-Ala-D-Ala-концы предшественников в устойчивости к метициллину. Авторы считают, что выраженный эффект ВТА формулы I заключается в том, что концевой муропептидный хвост в стафилококках становится хвостом D-Ala-ВТА, и что это оказывает превращающую активность либо отдельно, либо вместе с другими эффектами против устойчивости к метициллину и устойчивости к ванкомицину.

Начальные эксперименты с MRSA, распространенными в Соединенном Королевстве в 1980-х годах, обнаружили, что 2% глицин превращал все MRSA в чувствительные к метициллину штаммы. Это имело место только в присутствии глицина, клетки не были постоянно затронуты. Затем был идентифицирован более активный агент, бензиловый эфир глицина (GBE), который обнаруживал превращающую активность при уровнях 0,1-1%. В присутствии GBE MRSA были также чувствительными к цефалоспорином и другим β -лактамам агентам, которые не гидролизировались стафилококковой β -лактамазой, т.е. устойчивость к пенициллину была стабильной вследствие продуцирования этого фермента. Достигнутая чувствительность была соизмеримой с чувствительностью, достигаемой посредством этих агентов при тестировании против чувствительных к метициллину штаммов, как обсуждалось выше.

Насколько известно авторам данного изобретения, использование GBE в качестве превращающего средства для клинического лечения инфекции MRSA не было продвинуто. Также не было исследовано использование GBE для превращения штаммов, устойчивых к "не- β -лактамам активным в отношении клеточной стенки" антимикробным агентам, например, гликопептидным антимикробным агентам.

Следующие общие принципы должны соблюдаться для идентификации превращающих средств в микроорганизмах с клеточными стенками.

GBE (бензиловый эфир глицина) является первым ВТА (средством для превращения бактерий) с полезной активностью, против которой может оцениваться эффективность других соединений.

Способ идентификации остатков состоит в установлении состава поперечных (мостиковых) связей в клеточной стенке организма-мишени (т.е. выбранного организма) и тестировании превращающей способности этих индивидуальных молекул в отношении антимикробных агентов, активных в отношении клеточной стенки. Остатки, которые повторяются в любой конкретной поперечной связи, вероятно, указывают на молекулы с более полезной эффективностью. Выбранные организмы будут включать в себя инфекционные микроорганизмы с поперечными (мостиковыми) связями в клеточной стенке и дипептидными муропептидными хвостами, например, грамотрицательные и грамположительные бактерии, *Chlamydia* и т.д.

Аминокислотные остатки в поперечных мостиковых связях клеточной стенки являются мишенями для идентичных или структурно сходных остатков, содержащихся в молекулах, обладающих большей эффективностью, чем эффективность, достигаемая одними аминокислотами. Остатки одной или нескольких аминокислот, входящих в поперечные мостиковые связи клеточной стенки, являются структурами, которые обнаруживают увеличенную эффективность в сравнении с превращающей активностью одних аминокислот.

В случае MRSA поперечная мостиковая связь состоит из пяти молекул глицина, для которых N-ацетилглицин и бензиловый эфир глицина являются двумя исходными ВТА-соединениями. Эти основные ВТА демонстрируют, каким образом молекулы с остатком глицина могут экспонировать карбоксильные или аминокислоты, связанные с пентаглициновой поперечной связью в *S. aureus*.

Кроме того, эндопептидазы, такие как глицилглицин-эндопептидаза стафилококков, могут быть также потенциальными превращающими мишенями, поскольку природная активность этих ферментов может использоваться для превращения чувствительности бактериальных клеток к определенным активным в отношении клеточных стенок агентам, примером чего является превращение метициллин-резистентных штаммов в чувствительные к метициллину штаммы. Точные молекулярные взаимодействия ВТА, описанных в данной заявке, неизвестны, но взаимодействие с глицилглициндипептидазами и другими ферментами, участвующими в образовании и ремоделировании поперечных связей клеточной стенки и муропептидных хвостов, являются наиболее вероятными.

Целью данной заявки является также использование подобного подхода для идентификации ВТА, специфических для устойчивости к ванкомицину, которая в VRE и VRSA основана на изменении муропептидных хвостов клеточной стенки из D-Ala-D-Ala в D-Ala-D-Lac или других вариациях. Таким образом, ВТА могли бы содержать остатки D-Ala-D-Lac или другие вариации или быть способными прямо заменять концевую аминокислоту с образованием D-Ala-ВТА-концов. Скрининг таких соединений на превращающую активность должен использовать способы, описанные в данной заявке.

Таким образом, целью данной заявки является обеспечение разработки всех молекул, которые взаимодействуют с поперечными мостиковыми связями и муропептидными хвостами в клеточных стенках микроорганизмов, представляющих интерес для медицины, либо прямо, либо опосредованно сходным образом с тем, как это установлено для GBE так, что эти организмы превращаются в организмы с клинически релевантной чувствительностью, т.е. чувствительностью, которая поддается лечению подходящим активным в отношении клеточной стенки антимикробным агентом, одновременно прописываемым или одновременно вводимым с этим ВТА.

Примеры

Для нахождения веществ, родственных GBE, которые могут иметь увеличенную эффективность, различные вещества, в том числе вещества с дополнительными глициновыми остатками и бензилаты, были подвергнуты скринингу. Скрининг проводили с использованием агара Isosensitest (Oxoid, UK), в который были включены различные количества потенциальных ВТА при концентрациях 0,01-1,0%. Затем этот агар с включенными ВТА использовали таким же образом, как и в стандартном тесте на устойчивость к антибиотикам, с использованием дисков с 10 мкг метициллина. Тест-организм инокулировали на поверхность агара при концентрации, подходящей для достижения конфлюэнтного роста после 18 ч инкубирования при 30°C. После инкубирования диаметры зон сравнивали с диаметрами, получаемыми на контрольной чашке (только Isosensitest) для каждого тестируемого организма.

- Бензиловый эфир глицина (GBE) [C₉H₁₁NO₂] (сравнительный пример)
- трет-бутиловый эфир глицина [C₇H₇N₂O₂] (пример 1)
- ангидрид глицина [C₄H₆N₂O₂] (пример 2)
- этиловый эфир глицина [C₄H₉NO₂] (пример 3)
- N,N-диметилглицин [(CH₃)₂NCH₂CO₂H] (пример 4)
- этиловый эфир N,N-диметилглицина [(CH₃)₂NCH₂CO₂C₂H₅] (пример 5)
- метиловый эфир глицина [C₃H₇NO₂] (пример 6)
- диглицин (глицилглицин) [C₄H₈N₂O₃] (пример 7)
- метиловый эфир глицилглицина [C₅H₁₀N₂O₃] (пример 8)
- этиловый эфир глицина [C₆H₁₂N₂O₃] (пример 9)
- бензиловый эфир глицилглицина [C₁₁H₁₄N₂O₃] (пример 10)
- триглицин [C₆H₁₁N₃O₄] (пример 11)
- N-ацетилглицин (NAGly) [C₆H₁₂N₂O₃] (пример 12)
- N-трис(гидроксиметил)метилглицин [C₆H₁₃NO₅] (пример 13)
- N,N-диметилглицин [C₄H₉NO₂] (пример 14)
- D-2-(трет-бутил)глицин [C₆H₁₃NO₅] (пример 15)
- глицинамид [C₂H₆N₂O] (пример 16)
- N-карбамоилглицин (гидантоиновая кислота) [C₃H₆N₂O₃] (пример 17)
- N-CBZ-глицин [C₁₀H₁₁NO₄] (пример 18)
- N-фталоилглицин (1,3-диоксо-2-изоиндолинукусная кислота) [C₁₀H₇NO₄] (пример 19)
- N-(2-меркаптопропионил)глицин [CH₃CH(SH)CONHCH₂] (пример 20)
- N-(2-карбоксифенил)глицин [HO₂CC₆H₄NHCH₂CO₂H] (пример 21)
- N-(2-фурил)глицин [C₇H₇NO₄] (пример 22)
- метиловый эфир N-(2-фурил)глицина [C₈H₉NO₄] (пример 23)
- 1-амино-1-циклопропанкарбоновая кислота [C₄H₇NO₂] (пример 24)
- пропаргилглицин (2-амино-4-пентиновая кислота) [C₅H₇NO₂] (пример 25)
- 2-фенилглицин [C₆H₅CH(NH₂)CO₂H] (пример 26)
- метиловый эфир 2-фенилглицина [C₆H₅CH(NH₂)CO₂CH₃] (пример 27)
- N-(2-карбоксифенил)глицин [HO₂CC₆H₄NHCH₂CO₂H] (пример 28)
- D-4-гидроксифенилглицин [HO₂CC₆H₄CH(NH₂)CO₂H] (пример 29)
- N-(4-гидроксифенил)глицин [HO₂CC₆H₄NHCH₂CO₂H] (пример 30)
- 2,2-дифенилглицин [H₂NC(C₆H₅)₂CO₂H] (пример 31)
- гиппуровая кислота (N-бензоилглицин) [C₉H₈NO₃] (пример 32)
- 2-метилгиппуровая кислота [CH₃C₆H₄CONHCH₂CO₂H] (пример 33)
- 3-метилгиппуровая кислота [CH₃C₆H₄CONHCH₂CO₂H] (пример 34)
- 4-метилгиппуровая кислота [CH₃C₆H₄CONHCH₂CO₂H] (пример 35)
- п-аминогиппуровая кислота [C₉H₈N₂O₃] (пример 36)
- 2-иодгиппуровая кислота [C₆H₄CONHCH₂CO₂H] (пример 37)
- Arg-Gly [C₈H₁₇N₅O₃] (пример 38)

Все приведенные выше вещества, в том числе сам глицин, превращали референс-штамм MRSA (типовой штамм) и различные выбранные MRSA (OMRSA), EMRSA-1 и EMRSA-16 в чувствительные штаммы.

Гидантоиновая кислота имела низкий уровень активности против ванкомицин-резистентных энтерококков (VRE), тогда как GBE и этиловый эфир глицилглицина имели более высокую активность в отношении VRE и MRSA, чем бензиловый эфир глицилглицина. п-аминогиппуровая кислота имела улучшенную активность в сравнении с гиппуровой кислотой и GBE.

Различные соли могут иметь измененную активность и стабильность, как и другие аналоги, в том числе пептидные, бензилатные, аминок- и ацетатные варианты и удлиненные соединения.

Табл. 1 показывает улучшенное действие на чувствительность к метициллину бензилового эфира глицина (GBE) (пример 10) на различных выделенных из пациентов MRSA (L-ряда) и референс-штаммах. В момент выделения изоляты от пациентов были устойчивыми ко всем клинически доступным

β-лактамам, цефалоспорином, макролидам и гентамицину. Была вариабельная чувствительность к тетрациклину, триметоприму, хлорамфениколу, фузидовой кислоте и рифампицину.

Как можно видеть из табл. 1, бензиловый эфир глицина увеличивал чувствительность к метициллину в гораздо большей степени, чем глицин. Даже при 0,001 М наблюдали улучшенное действие в сравнении с глицином при 0,2 М (тест 3, сравните с тестом 1) для всех штаммов.

Таблица 1

Тестируемый изолят	МИК метициллина (мг/л)			
	0,0 (контроль)	Глицин 0,02М (0,15%) (опыт 1)	0,2М (1,5%) (опыт 2)	GBE 0,001М (0,2%) (опыт 3)
NCTC 12493	>256	0,12	0,06	0,015
L265	>256	64	8	2
L266	>256	64	8	2
L267	>256	32	8	2
L268	>256	32	8	2
L269	>256	16	4	1
L270	>256	8	4	1
L271	>256	8	4	2
L272	>256	16	2	1
L273	>256	8	4	1
L274	>256	16	4	2
L275	>256	32	8	2
L276	>256	16	4	2
L277	>256	8	4	2
L278	>256	64	16	4
L279	>256	64	2	2
L280	>256	16	4	2
L281	>256	32	4	2
L282	>256	32	4	2
L283	>256	32	4	2
L284	>256	32	2	2
L285	>256	32	4	2
L286	>256	32	4	2
L287	>256	32	4	2
L288	>256	32	4	2
L289	>256	32	4	2
L290	>256	32	4	2
L291	>256	32	4	2
L292	>256	32	4	2
L293	>256	32	4	2
L294	>256	32	4	2
MC01*	>256	32	4	2
JF1-32*	>256	32	4	2
DS09*	>256	32	4	2
SW2-32*	>256	32	4	2
PS3-32*	>256	32	4	2
ST11*	>256	32	4	2
SN31*	>256	32	4	2
CD40*	>256	32	4	2
E16-96**	>256	32	4	2
E15-97***	>256	32	4	2

* EMRSA-1; ** EMRSA-16; *** EMRSA-15

В табл. 1 желаемая минимальная ингибирующая концентрация МИК обеспечивается чувствительным к ванкомицину референс-штаммом NCTC 12493, который имеет МИК ванкомицина 2 мг/л. 0,2 М глицин достигает такой МИК в 50% испытанных штаммов в сравнении с 0,02 М глицилбензиловым эфиром, который дает полное превращение в 100% испытанных штаммов.

Важно, что полезность агентов данного изобретения не ограничивается увеличением бактериальной чувствительности к метициллину. Превращающий эффект глицилбензинового эфира в отношении двух цефалоспоринов показан в табл. 2.

Таблица 2

Тестируемый изолят	МИК цефтазида или цефуроксима (мг/л) при выращивании с бензиловым эфиром глицина (GBE) или без него			
	Контроль		GBE (0,2%)	
	Цефтазидим	Цефуроксим	Цефтазидим	Цефуроксим
NCTC 12493	>256	>256	2	4
MC01*	>256	>256	2	4
JF1-32*	>256	>256	2	2
DS09*	>256	>256	2	2
SW2-32*	>256	>256	4	4
PS3-32*	>256	>256	4	4
ST11*	>256	>256	2	2
SN31*	>256	>256	4	4
CD40*	>256	>256	4	2
E16-96**	>256	>256	2	4
E15-97***	>256	>256	4	4

* EMRSA-1; ** EMRSA-16; *** EMRSA-15

Бензиловый эфир глицина превращает тестируемый MRSA в чувствительный к цефтазидиму и цефуроксиму, делая таким образом эти два лекарственных средства, которые никогда не имели полезной активности против MRSA, снова активными против MRSA.

Потенциал полезной активности *in vivo* показан в табл. 3, которая показывает МИК метициллина в 1% плазме человека для изолятов MRSA от 19 пациентов для бензинового эфира глицина и глицина в качестве эталона. Хранящуюся в замороженном состоянии плазму от пяти субъектов объединяли.

Таблица 3

Тестируемый изолят MRSA	МИК метициллина (мг/л) при выращивании с глицином или GBE при указанных концентрациях в М (%) с 1% плазмой или без 1% плазмы человека			
	Глицин (0,02М [0,15%])		GBE (0,00075М [0,15%])	
	Без плазмы (контроль)	+плазма (опыт 1)	Без плазмы (контроль)	+плазма (опыт 2)
L277	8	32	4	8
L278	64	256	8	16
L279	64	256	4	16
L280	16	64	4	8
L281	8	32	4	8
L282	32	256	4	16
L283	32	128	4	16
L284	32	256	2	8
L285	32	256	4	16
L286	32	64	4	8
L287	32	128	4	16
L288	32	128	2	16
L289	32	256	4	16
L290	32	128	4	8
L291	32	64	4	16
L292	32	256	4	32
L293	32	128	2	8
L294	16	128	2	8
5518*	8	32	2	4

* EMRSA-1

Плазма человека может связывать или иным образом инактивировать чужеродные вещества, и хорошая активность в плазме свидетельствует о хорошей активности *in vivo*. Аппроксимации из приведенных выше данных предполагают, что активность глицина снижалась на приблизительно 75%, а активность бензинового эфира глицина снижалась на приблизительно 75-50%. Это может быть обусловлено скорее связыванием белком, чем ферментативной деградацией, что указывает на ценную стабильность *in vivo*. И в этом случае увеличение чувствительности к метициллину является значительно увеличенным для бензинового эфира глицина в сравнении с глицином.

Табл. 4 показывает способность бензинового эфира глицина и N-ацетилглицина (NAGly) (пример 4) превращать MRSA с промежуточной устойчивостью к гликопептидам в чувствительные к гликопептидам штаммы.

Таблица 4

Тестируемый MRSA	МИК ванкомицина или тейкопланина (мг/л) при выращивании с GBE или NAGly при указанных концентрациях в М (%):		
	Контроль	NAGly 0,001M	GBE 0,001M
МИК ванкомицина EMRSA-17 (VISA)			
L266	8	4	2
L266	8	2	1
NCTC 12493	0,5	0,25	0,12
МИК тейкопланина EMRSA-16 (TISA)			
L265	32	4	1
L266	8	4	2
NCTC 12493	0,25	0,15	0,06

Эти результаты показывают, что бензиловый эфир глицина и N-ацетилглицин могут восстанавливать активность ванкомицина в промежуточно-резистентном к ванкомицину MRSA (VISA) и активность тейкопланина в промежуточно-резистентном к тейкопланину MRSA (TISA) посредством снижения МИК ниже общепринятого порога устойчивости МИК 8 мг/л, который определяет промежуточную устойчивость, при очень низких концентрациях (0,001 М).

Средства данного изобретения не ограничиваются обращением резистентности в *Streptococcus*. Тест-штаммами в табл. 5 являются изоляты из пациентов ванкомицин- и гентамицин-резистентного *Enterococcus faecium*. В момент выделения они были обычно резистентными ко всем клинически используемым антимикробным агентам.

Таблица 5

Тестируемый штамм	МИК ванкомицина (мг/мл) при выращивании с глицином или бензиловым эфиром глицина при указанных концентрациях в М (%)			
	Глицин			GBE
	0,0 (контроль)	0,02M (опыт 1)	0,2M (опыт 2)	0,02M (опыт 3)
ATCC29212	2	4	2	1
S317	128	32	4	2
S227	128	32	4	2
E267	128	16	4	2
E254	128	16	4	2
E297	128	8	2	2
S226	128	8	4	2
S283	64	8	2	2
S315	64	4	1	1
S497	64	8	2	1
E285	64	16	2	2
S556	64	32	2	1
S319	64	16	1	2
S302	64	8	4	2
S393	64	8	2	2
E271	64	8	2	2
S333	64	8	2	2
GBC	64	8	4	2
WBC	64	8	4	2
BBC	32	16	4	2
S337	32	4	2	2

В табл. 5 желаемая МИК для превращения обеспечивается чувствительным к ванкомицину референс-штаммом ATCC 29212, который имеет МИК ванкомицина 2 мг/л. 0,2 М глицин достигает этого желаемого значения в 50% испытанных штаммов в сравнении с 0,02 М GBE, который дает полное превращение в 100% испытанных штаммов.

Как упоминалось ранее, обычной причиной аутоинфекции является *S. aureus*, носимый на ноздрах. Данные в табл. 6 показывают, что бензиловый эфир глицина увеличивает чувствительность уже чувствительных бактерий к метициллину (и косвенно к другим родственным антибиотикам, таким как флуклоксациллин). Превращающие средства данного изобретения могут быть также использованы в комбинации с подходящим антимикробным агентом для устранения назального носительства MRSA перед хирургией сердца или перед другими инвазивными процедурами, несущими в себе риск аутоинфекции.

Таблица 6

Тестируемый изолят	МИК метициллина (мг/л) при выращивании с GBE при указанных концентрациях в М (%) с 1% плазмой или без 1% плазмы человека		
	GBE (0,00075М [0,15%])		
	Без плазмы (контроль 1)	Без плазмы (опыт 1 и контроль 2)	+плазма (опыт 2)
LHS77	<0,25	<0,25	<0,25
LHS78	0,25	<0,25	1
LHS79	0,5	<0,25	0,25
LHS80	0,25	<0,25	0,25
LHS81	<0,25	<0,25	<0,25
LHS82	0,5	<0,25	4
LHS83	0,25	<0,25	0,25
LHS84	0,25	<0,25	2
LHS85	0,25	<0,25	0,5
LHS86	0,25	<0,25	0,25
LHS87	0,5	<0,25	4
LHS88	0,25	<0,25	0,5
LHS89	0,25	<0,25	0,5
LHS90	<0,25	<0,25	<0,25
LHS91	<0,25	<0,25	<0,25
LHS92	0,5	<0,25	1
LHS93	0,25	<0,25	0,5
LHS94	0,25	<0,25	0,5
5518*	>256	<0,25	0,5

* EMRSA-1

Табл. 7 демонстрирует активность пяти ВТА-соединений в соответствии с данным изобретением. Четыре клинических изолята выделяли из пациентов во время первых трех месяцев 2003 г. Самые поздние изоляты использовали так, как они представляют эволюцию штамма, в частности, в эпидемический MRSA, примером чего является большая способность проявлять пониженную чувствительность к гликопептидам. Включали также MRSA с промежуточной устойчивостью, когда устойчивость к метициллину достигалась другим способом, чем продуцирование RBP2a. Пониженная чувствительность EMRSA-17 к ванкомицину преобразуется средствами для превращения бактерий (ВТА), как и устойчивость к цефалексину, который является обычно минимально активным против стафилококков.

Таблица 7

Антимикробный агент плюс ВТА		I-EMRSA	EMRSA-16	EMRSA-17	VRE
Оксациллин		32	256	256	N/A
+ GBE 1,0%		0,75	1,0	1,5	N/A
" 0,1%		1,0	2	2	N/A
" 0,01%		2	4	6	N/A

+ GGEE 1,0%	0,32	0,75	1,0	N/A
“ 0,1%	0,75	1,0	2	N/A
“ 0,01%	1,0	1,5	3	N/A
+ HA 0,1%	2	4	4	N/A
“ 0,01%	4	6	8	N/A
+ Амино-НА 0,1%	0,064	0,75	1,0	N/A
“ 0,01%	1,5	3	6	N/A
+ PPG 0,01%	0,125	1,5	2	N/A
“ 0,001%	2,0	4	8	N/A
Ванкомицин	0,5	1,0	2	>256
+ GBE 1,0%	<0,25	0,25	0,25	64
+ GGEE 1,0%	<0,25	0,25	0,25	64
+ HA 0,1%	<0,25	0,25	0,25	64
+ Амино-НА 0,1%	<0,25	0,25	0,25	64
+ PPG 0,01%	<0,25	0,25	0,25	64
Цефалексин*	32	256	256	N/A
+ GBE 1,0%	0,75	1,0	1,5	N/A
“ 0,1%	1,0	2	2	N/A
+ GGEE 1,0%	0,38	0,75	1,0	N/A
“ 0,1%	0,75	1,5	2	N/A
+ HA 0,1%	2	6	8	N/A
+ Амино-НА 0,1%	0,064	1,0	4	N/A
“ “ 0,01%	1,5	3	6	N/A
+ PPG 0,01%	0,125	12	6	N/A

I-EMRSA = MRSA с промежуточной устойчивостью; EMRSA = эпидемический MRSA; GBE = бензиловый эфир глицина; GGEE = этиловый эфир глицилглицина; PPG = пропаргилглицин (2-амино-4-пентеновая кислота); HA = гиппуровая кислота; амино-НА = п-аминогиппуровая кислота; * = неактивен против VRE

Для клинического применения эти агенты могут вводиться системно (например, внутривенно) при тяжелых системных инфекциях, таких как септицемия. Однако ожидается, что одним из главных применений этих агентов будет местное введение для последующего лечения локальных инфекций или введение в качестве части программы для элиминирования устойчивых бактерий из их носителя, например, перед хирургическим вмешательством, для предупреждения диссеминации инфекции перед ее возникновением.

Далее следует неисчерпывающий перечень антибиотиков, которые могут быть включены с превращающими средствами данного изобретения, и их предпочтительные способы введения:

Пероральное введение: флуклоксациллин, клоксациллин, оксациллин, пиперациллин;
внутривенное (IV) введение: ванкомицин, меропенем, флуклоксациллин, клоксациллин, оксациллин, пиперациллин, цефуроксим;
внутримышечное (IM) введение: флуклоксациллин, цефуроксим, цефтриаксон;
местное введение: флуклоксациллин, оксациллин, цефалексин.

Общие соображения, касающиеся композиций

Когда речь идет о системном введении, предпочтительной обычно является комбинированная форма, если полупериоды существования в организме превращающего средства и антимикробного агента являются сравнимыми. Например, пенициллины обычно имеют полупериод существования приблизительно 1,5-2 ч и вводятся 3-4 раза в день. С другой стороны, тейкопланин имеет полупериод существования 12 ч, и его вводят обычно 1 раз в день. Таким образом, превращающее средство должно быть выбрано таким образом, чтобы оно имело соответствующий полупериод существования или, альтернативно, вводилось отдельно по отличающейся схеме введения.

Обычно превращающее средство должно находиться в достаточной концентрации для получения уровней *in vivo*, которые будут выполнять превращение в бактериях-мишенях во время приблизительно того же самого периода, что и полупериод существования антимикробного агента. Должно быть, конечно, понятно, что действительная концентрация превращающего средства не связана с концентрацией антимикробного агента в композиции. Должно быть также понятно, что, если организм-мишень является бактериальным штаммом, который эволюционировал из исходного предшественника, существенным является то, что совместно приготовляемый или совместно вводимый антибиотик имеет демонстрируемую полезную активность против исходного штамма-предшественника организма-мишени. Это является обязательным требованием, так как превращающее средство полностью или частично уменьшает устойчивость эволюционировавшего организма-мишени самое большое до устойчивости чувствительного эквивалентного штамма.

Пример 1 лекарственного средства.

Бензиловый эфир глицина, этиловый эфир глицилглицина, гиппуровую кислоту, п-аминогиппуровую кислоту или пропаргилглицин и флуклоксациллин или оксациллин смешивают с па-

рафиновым воском, софитсаном™, гидроксипропилметилцеллюлозой, полиглицерил-4-капратом и глицерином с получением мази, содержащей 0,2 мас.% ВТА и 1 мас.% флуклоксациллина или оксациллина.

Схема лечения.

Мазь втирают в инфицированный участок 3-4 раза в день, пока инфекция не элиминируется, или наносят в глубокую рану при наложении повязки. Этот препарат может быть также нанесен в место введения внутрисосудистого устройства в качестве профилактической меры против связанного с канюлей или катетером инфицирования.

Пример 2 лекарственного средства.

N-ацетилглицин или один из ВТА, перечисленных в табл. 7, и цефуроксим или оксациллин или другой подходящий антимикробный агент смешивают с инертным жидким носителем с получением 1% (масса/объем) каждого активного ингредиента, и дозы вводят в аэрозольный аппликатор.

Схема лечения.

Это лекарственное средство распыляют интраназально 3-4 раза в день в течение пяти дней перед хирургическим вмешательством (или во время вспышки эпидемии в больнице) для элиминации носительства *S. aureus* в носдрах. Лечение может быть продолжено после хирургии, если это желательно, или в том случае, если происходит повторная инокуляция участка носительства бактерий.

Этот спрей может быть также использован для введения антимикробного продукта в хирургическую рану перед ее закрытием для предупреждения инфекции (например, грудинные раны, протезы или трансплантаты костей и суставов).

Этот спрей может быть также использован для введения антимикробного продукта в хронические язвы (например, диабетические язвы ног) перед наложением повязки или в том случае, если язву оставляют открытой.

Пример 3 лекарственного средства.

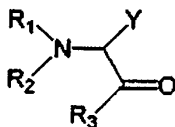
1,0% раствор ВТА (например, как в табл. 7) плюс подходящий антимикробный агент, такой как оксациллин или цефуроксим, готовят в виде раствора, например обычного физиологического солевого раствора.

Схема обработки для сосудистого трансплантата.

Трансплантат сосуда помещают в этот раствор и оставляютмокнуть перед трансплантацией.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ увеличения чувствительности бактериального штамма к активным в отношении клеточной стенки антимикробным агентам, к которым бактериальный штамм или штамм-предшественник, из которого развился данный штамм, является чувствительным, предусматривающий стадию подвергания указанного бактериального штамма действию по меньшей мере одного превращающего средства, имеющего следующую формулу (I):



где остатки R₁ и R₂, каждый независимо, выбраны из алкила, алкилокси, алкилоксикарбонила, алкилкарбонилокси, алкенила, алкенилокси, алкенилоксикарбонила, алкенилкарбонилокси, алкинила, алкинилокси, алкинилоксикарбонила, алкинилкарбонилокси, каждый из которых может быть замещенным или незамещенным, имеющим прямую цепь или разветвленным или циклическим, арила, арилокси, арилоксикарбонила, арилкарбонилокси, каждый из которых может быть замещенным или незамещенным, и карбамоила.

остаток R₃ выбран из алкила, алкилокси, алкилкарбонилокси, алкенила, алкенилокси, алкенилкарбонилокси, алкинила, алкинилокси, алкинилкарбонилокси, каждый из которых может быть замещенным или незамещенным, имеющим прямую цепь или разветвленным или циклическим, арила, арилокси, арилкарбонилокси, каждый из которых может быть замещенным или незамещенным, и карбоксила,

иные, чем R_1 , R_2 и R_3 , не являются все H , и

У выбран из боковой цепи природной аминокислоты, или его физиологически приемлемой соли или производного, которое превращается в соединение формулы I при физиологических условиях.

2. Способ по п.1, где Y представляет собой $-H_2$ (т.е. «боковую цепь» глицина).

3. Способ по п.1, где один из R_1 и R_2 является Н.

4. Способ по п.1, где один из R₁ и R₂ представляет собой алкилкарбонил (более предпочтительно C₂-C₆-алкилкарбонил), алкенилкарбонил (более предпочтительно C₂-C₆-алкенилкарбонил), алкинилкарбонил (более предпочтительно C₂-C₆-алкинилкарбонил).

5. Способ по п.1, где один из R_1 и R_2 представляет собой C_1 - C_6 -алкилкарбонил и предпочтительно метилкарбонил (ацетил).

6. Способ по п.1, где R_3 является алкилокси (более предпочтительно C_1 - C_6 -алкилокси), алкенилокси (более предпочтительно C_2 - C_6 -алкенилокси), алкинилокси (более предпочтительно C_2 - C_6 -алкинилокси) или арилокси (более предпочтительно фенилоксикарбонил).

7. Способ по п.1, где R_3 является бензилокси.

8. Способ по п.1, где антимикробным агентом является пенициллин, цефалоспорин или их производное или аналог или гликопептид.

9. Способ по п.8, где антимикробным агентом является устойчивый к β -лактамазе пенициллин, или его производное, или аналог.

10. Способ по п.1, где антимикробным агентом является оксациллин или ванкомицин.

11. Способ по п.1, где превращающим средством является бензиловый эфир глицина, этиловый эфир глицилглицина, гиппуровая кислота, p -аминогиппуровая кислота или пропаргилглицин.

12. Применение средства, имеющего формулу (I), в изготовлении лекарственного средства для увеличения чувствительности бактериального штамма, инфицирующего, колонизирующего или несомого пациентом, к активному в отношении клеточной стенки антимикробному агенту по п.1.

13. Способ предупреждения инфекции и перекрестной инфекции, связанной с носительством бактериального штамма, предусматривающий местное нанесение на участок (участки) носительства указанного пациента количества превращающего средства формулы (I) по п.1, достаточного для превращения указанного штамма в более чувствительный к антимикробному агенту, и введение указанному пациенту терапевтически эффективного количества указанного антимикробного агента в качестве компонента композиции и/или в качестве совместно вводимого агента.

14. Способ по п.13, где указанное средство может находиться в смеси с одним или несколькими эксципиентами, носителями, эмульгаторами, растворителями, буферами, регуляторами pH, улучшающими вкус и запах агентами, красителями, консервантами или другими обычно используемыми добавками в области фармацевтических веществ в соответствии со способом введения.

15. Способ по п.13, где указанный агент способен увеличивать чувствительность к антимикробному агенту по меньшей мере одного бактериального штамма, выбранного из *Staphylococcus aureus*, коагулаза-отрицательных стафилококков и энтерококков, *Clostridium difficile* и *Streptococcus pneumoniae* и других грамположительных патогенов.

16. Способ по п.15, где бактериальный штамм является устойчивым к антимикробному агенту.

17. Способ по п.13, где указанное средство способно увеличивать чувствительность к антимикробному агенту по меньшей мере одного из устойчивого к метициллину и/или устойчивого к гликопептиду *Staphylococcus aureus* и устойчивых к ванкомицину энтерококков к антимикробному агенту, к которому является устойчивым бактериальный штамм.

18. Способ по п.17, где бактериальный штамм является устойчивым по меньшей мере к одному из метициллина и его производных или родственных антимикробных агентов, ванкомицина, тейкопланина или других родственных гликопротеидов.

19. Способ по п.13, где указанное средство способно увеличивать чувствительность к антимикробному агенту по меньшей мере одного бактериального штамма, выбранного из *Staphylococcus aureus*, коагулаза-отрицательных стафилококков, энтерококков, *Clostridium difficile*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus ruogenes* и других стрептококков и грамположительных патогенов, в случаях, когда этот бактериальный штамм вызывает быстро угрожающую жизни инфекцию, в частности, в ослабленном хозяине, для создания "гиперчувствительности" инфицирующего организма к антимикробному агенту.

20. Способ по п.13, где указанное средство способно увеличивать чувствительность EMRSA-15, -16 и/или -17 или других EMRSA к β -лактамам (или аналогичным) антибиотикам/антимикробным агентам и/или увеличивать чувствительность EMRSA с пониженной чувствительностью к ванкомицину, тейкопланину или другому гликопептиду или VRSA к вышеуказанным антимикробным агентам.

21. Способ по п.19, где чувствительность увеличивается до уровня сравнимого неустойчивого бактериального штамма при концентрации агента 0,02 М или менее, более предпочтительно 0,002 М или менее и наиболее предпочтительно 0,001 М или менее при определении посредством стандартного теста чувствительности к антибиотикам.

22. Способ по п.13, где антимикробный агент, к которому увеличивается чувствительность, выбран из группы, состоящей из β -лактамов (и аналогичных) антибиотиков/антимикробного агента, стабильных к стафилококковым β -лактамазам, цефалоспоринов и гликопептидов.

23. Способ по п.22, где антимикробным агентом, к которому увеличивается чувствительность, является метициллин, флуклоксациллин, клоксациллин, оксациллин, имипенем, меропенем, цефтазидим, цефуроксим, ванкомицин, тейкопланин или оритаваксин.

24. Способ по п.13, где антимикробный агент, к которому увеличивается чувствительность, выбран из группы агентов, состоящей из β -лактамов (и аналогичных) антибиотиков/антимикробного агента, стабильных к стафилококковым β -лактамазам, вместе с ингибитором β -лактамазы или его производным или аналогом.

25. Способ идентификации превращающих средств в микроорганизмах, имеющих медицинское значение, с клеточными стенками, имеющими структуру, пригодную для действия на них пенициллина и родственных/аналогичных антимикробных агентов и гликопептидов, где состав поперечных мостиковых связей и муропептидных хвостов в клеточной стенке организма-мишени должны быть полностью или частично установлены, и превращающей способности индивидуальных молекул с соответствующими остатками, выбранными для тестирования.

