

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **044449**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.08.29

(21) Номер заявки
201991889

(22) Дата подачи заявки
2018.02.26

(51) Int. Cl. **A61K 31/164** (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(54) АССОЦИАТ N-АЦЕТИЛЦИСТЕИНА И КОЛИСТИНА ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ ПРИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЯХ

(31) **17158241.4**

(32) **2017.02.27**

(33) **EP**

(43) **2020.01.09**

(86) **PCT/EP2018/054611**

(87) **WO 2018/154091 2018.08.30**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЗАМБОН С.П.А (IT)

(72) Изобретатель:
**Паллекки Лучия, Серджо Франческо,
Россолини Джан Мария (IT)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) SUTEP JARURATANASIRIKUL ET AL.: "Population pharmacokinetics and pharmacodynamics modeling to optimize dosage regimens of sulbactam in critically ill patients with severe sepsis caused by *Acinetobacter baumannii*", ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, 1 December 2016 (2016-12-01), XP055382211, ISSN: 0066-4804, DOI: 10.1128/AAC.01669-16, page 7236, table 1, page 7241, paragraph first, page 7243

ALFREDSSON H ET AL.: "N-ACETYLCYSTEINE AND 2-MERCAPTOETHANE SULPHONATE INHIBIT ANTI-PSEUDOMONAS ACTIVITY OF ANTIBIOTICS IN VITRO", EUROPEAN JOURNAL OF RESPIRATORY DISEASE, MUNKSGAARD, COPENHAGEN, DK, vol. 70, no. 4, 1 January 1987 (1987-01-01), pages 213-217, XP009020456, ISSN: 0106-4339, page 213 - page 214, table 1

WO-A1-2004/022048

LORENZO DRAGO ET AL.: "Activity of N-acetyl-L-cysteine against biofilm of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* on orthopedic prosthetic materials", INTERNATIONAL JOURNAL OF ARTIFICIAL ORGANS, vol. 36, no. 1, 14 February 2013 (2013-02-14), pages 39-46, XP055381798, IT ISSN: 0391-3988, DOI: 10.5301/ijao.5000135, abstract, page 43 - page 45

WO-A1-2012080700

WO-A2-9820836

(57) Настоящее изобретение относится к применению синергического фармакологического ассоциата, состоящего из N-ацетилцистеина (НАС) и колистина для лечения бактериальной инфекции, вызванной одним или более патогенами, выбранными из штаммов *S. maltophilia* и *A. baumannii*, где НАС находится в количестве от 1,6 до 8 мг/мл, а колистин находится в количестве от 2 до 8 мкг/мл колистина. При этом бактериальная инфекция может быть связана с заболеванием дыхательных путей, таким как хроническое заболевание дыхательных путей, включая CF, немукковисцидозный бронхоэктаз и COPD.

B1**044449****044449****B1**

Область техники настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к синергическому фармакологическому ассоциату N-ацетилцистеина (в настоящем изобретении далее NAC) и колистина для применения в лечении бактериальных инфекций, вызванных одним или более патогенами, выбранными из штаммов *Stenotrophomonas maltophilia* (*S. maltophilia*) и *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*).

В частности, настоящее изобретение относится к синергическому фармакологическому ассоциату NAC и колистина для применения в лечении заболевания, связанного с бактериальными инфекциями, вызванными одним или более патогенами, выбранными из штаммов *S. maltophilia* и *A. baumannii*, особенно для применения в лечении заболевания дыхательных путей.

Уровень техники настоящего изобретения

Колистин, также называемый полимиксином E, полимиксиновым антибиотиком, продуцируемый определенными штаммами *Bacillus polymixa*, состоит из катионного циклического гептапептида с трипептидной боковой цепью, ацилированной по N-концу жирной кислотой через α -амидную связь (Reviews of Anti-Infective Agents CID 2005; 40: 1033-41).

Две различные формы колистина имеются в наличии для клинического применения: колистинсульфат, который вводят перорально для обезвреживания желудка и местно в виде порошка для лечения бактериальных конных инфекций, и колистиметат натрия (CMS) (также называемый метансульфатом колистина, колистиметансульфатом пентанатрия и колистинсульфонилметатом) для парентеральной (внутривенной, внутримышечной, аэрозольной и интратекальной/интравентрикулярной) терапии.

Следовательно, колистин можно вводить в виде пролекарства в виде колистиметата натрия, который легко гидролизует, образуя сульфаметилированные производные, а также колистинсульфат, активную форму лекарственного средства.

Колистин недавно приобрел решающую роль для лечения различных типов инфекций (например, пневмонии, бактериемии, инфекций мочеполовой системы), вызванных грамотрицательными патогенами, проявляющими фенотип с множественной лекарственной устойчивостью (например, неферментирующие грамотрицательные патогены и устойчивые к карбопенему энтеробактерии).

У пациентов, пораженных кистозным фиброзом или другими хроническим респираторными заболеваниями, его обычно применяют для лечения инфекций, вызванных *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) или другими мультирезистентными неферментирующими грамотрицательными патогенами (например, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*).

Колистин представляет собой агент для принятия крайних мер при лечении инфекций, вызванных мультирезистентными *A. baumannii*. В данной перспективе, большие опасения вызывает растущая тенденция возникновения резистентности к колистину у *A. baumannii*, которая часто приводит в результате к фенотипам с панмультирезистентностью (PDR), причем не остается доступного варианта лечения.

Лечение *S. maltophilia* инфекций осложняется врожденной множественной лекарственной устойчивостью. В случае, когда лечение препаратами первой линии на основе триметоприма-сульфаметоксазола не является пригодным (из-за непереносимости пациентом или приобретенной устойчивости), колистин является одним из вариантов второй линии, причем его преимуществом является также введение путем распыления. Однако задокументирована увеличивающаяся степень устойчивости к колистину у *S. maltophilia*, являясь причиной большой озабоченности.

Колистиметат натрия представляет собой комбинацию отрицательно заряженного молекулярного иона сульфометата колистина с положительными ионами натрия.

Колистиметат натрия можно получить реакцией сульфометилирования колистина с формальдегидом, с последующим бисульфитом натрия, которая приводит к присоединению сульфометильной группы к первичным аминам колистина (Antimicrob. Agents Chemother. April 2003 vol. 47 no. 4 1364-1370).

Колистиметат натрия имеется в продаже под различными торговыми названиями у различных производителей во всем мире, например, как PromixinTM (Profile Pharma Limited).

Согласно настоящему изобретению термин "колистин" включает колистин и его фармацевтически приемлемые соли и/или пролекарства, такие как колистинсульфат, колистиметат натрия, метансульфат колистина и колимицин или коломицин, причем предполагается, что все они относятся к бактериальному циклопептидному антибиотику колистин или его предшественникам, таким как пролекарство колимицина, которое превращается в активное лекарственное средство колистин. В конкретном аспекте, для испытаний на чувствительность *in vitro* в экспериментальной части настоящего изобретения термин "колистин" относится к сульфату колистина (в соответствии с международными руководящими принципами испытания на антимикробную чувствительность, предоставленными Институтом клинических и лабораторных стандартов-CLSI и Европейским комитетом по тестированию антимикробной чувствительности-EUCAST).

NAC представляет собой ацетилированный предшественник аминокислоты L-цистеина и восстановленного глутатиона (GSH). Исторически его применяли в качестве муколитического средства с антиоксидантными и противовоспалительными свойствами, на пациентах, у которых есть вязкая или загустевшая слизь в дыхательных путях при ряде хронических респираторных заболеваний, включая хронический бронхит, эмфизему, COPD и экстацербации, кистозный фиброз, бронхоэктаз, в качестве антидота

после передозировки ацетаминофеном и в качестве потенциальной терапии заболеваний, характеризующихся свободными радикалами, окислительным повреждением.

NAC можно в основном считать неантибиотическим лекарственным средством, с которым, в некоторых случаях, связаны антибактериальные и антибиопленочные свойства. Например, в 1977, Parry и Neu обнаружили, что NAC обладает характеристиками ингибировать рост и грамположительных и грамотрицательных бактерий, включая *Staphylococcus aureus*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* и *Enterobacter cloacae* (Journal of Clinical Microbiology, Jan 1977, p.58-61).

В литературе приводятся спорные результаты, относящиеся к перекрестному взаимодействию антибиотиков и муколитических агентов, таких как NAC. В 1981, Roberts и Cole обнаружили, что 2%-5% NAC ингибировало антимикробную активность относительно *P. aeruginosa* и что эффект карбенициллина на *P. aeruginosa* увеличивался при низких концентрациях NAC (Journal of Infection том 3, выпуск 4, декабрь 1981, страницы 353-359).

В 2016 результат исследования, проводимого Landini et al., по эффекту высоких концентраций NAC на антибиотическую активность против коллекции респираторных патогенов, показал, что высокие концентрации NAC не влияют на активность наиболее часто применяемых антибиотиков, тогда как NAC снижал активность карбапенемов (Antimicrob. Agents Chemother. December 2016 т. 60 no. 12 7513-7517).

NAC имеется в продаже под различными торговыми названиями у различных производителей по всему миру, например, как Fluimucil™ (Zambon Spa).

S. maltophilia инфекции обычно связаны с заболеваниями дыхательных путей, в частности хроническими заболеваниями дыхательных путей; например, *S. maltophilia* инфекции могут спровоцировать легочные эксацербации хронического обструктивного заболевания легких (COPD), кистозного фиброза (CF) и немукковисцидозного бронхоэктаза.

S. maltophilia инфекции возникают в основном, но не исключительно, у ослабленных индивидов и индивидов с ослабленным иммунитетом.

S. maltophilia характеризуются фенотипом с множественной лекарственной устойчивостью и способностью образовывать биопленки. В силу данных особенностей, они ответственны за хроническую легочную колонизацию у индивидов с ослабленной иммунной системой или хроническим заболеванием легких, в частности CF и немукковисцидозным бронхоэктазом, которые могут длиться в течение нескольких месяцев или лет и которые трудно или невозможно устранить современными стратегиями терапии антибиотиками.

S. maltophilia, *A. baumannii* представляет собой важный и трудноизлечимый патоген, который может заражать дыхательные пути пациентов, пораженных заболеваниями дыхательных путей, включая хронические заболевания дыхательных путей. Например, присутствие *A. baumannii* инфекций у пациента с пневмонией, в частности, с вентилятор-ассоциированной пневмонией (VAP), представляет собой одно из самых страшных осложнений, которые возникают в условиях интенсивной терапии.

A. baumannii также обнаружены у CF популяции и в популяции с немукковисцидозным бронхоэктазом.

Связь *A. baumannii* инфекций с бактериемией, раневыми инфекциями, инфекциями мочеполовой системы и менингитом также описана. Можно отметить, что есть значительное увеличение количества *A. baumannii* штаммов с устойчивостью ко многим классам антибиотиков, и мультирезистентные свойства данного патогена представляют собой проблему в лечении и борьбе с нозокомиальными инфекциями, с относительно ограниченными вариантами лечения. Например, нозокомиальная пневмония из-за мультирезистентных грамотрицательных бактерий, включающих *A. baumannii*, является одним из самых серьезных осложнений, которые возникают в палатах интенсивного лечения (ICU). Смертность, заболеваемость и расходы на здравоохранение существенно увеличиваются при данном типе инфекции.

Несмотря на то, что значительное количество времени и энергии посвящено исследованию эффективных терапий для успешной борьбы с бактериальными инфекциями, особенно дыхательных путей и/или легкого, вызванных рядом патогенов, включая возникающие патогены, такие как *S. maltophilia* и *A. baumannii*, по существу отсутствуют хорошие терапевтические варианты и, следовательно, остается необходимость в более хороших терапиях указанных бактериальных инфекций, в частности инфекций, связанных с хроническими заболеваниями легких, такими как, например, CF, немукковисцидозный бронхоэктаз и COPD.

Сущность настоящего изобретения

Соответственно изобретатели настоящего изобретения столкнулись с проблемой лечения бактериальной инфекции, вызванной одним или более патогенами, выбранными из *S. maltophilia* и/или *A. baumannii*.

После длительного набора тестов и экспериментов, изобретатели настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что ассоциат NAC и колистина обладает синергическим антимикробным эффектом против постоянного количества клинических изолятов *S. maltophilia* и/или *A. baumannii*, даже приводя в результате к бактерицидному эффекту.

Также обнаружено, что ассоциат NAC и колистина обладает синергической антибиопленочной активностью в *in vitro* моделях биопленок *S. maltophilia* и/или *A. baumannii*. Антибиопленочная активность ассоциата NAC и колистина относительно биопленок *S. maltophilia* и/или *A. baumannii* предусматривает потенциальное применение также для предотвращения и устранения колонизации указанными патогенами.

ми, особенно у госпитализированных пациентов, подверженных заболеваниям, включающим, например, хронический бронхит, эмфизему, COPD и экстацервации, CF, немукковисцидозный бронхоэктаз, пневмонию, VAP, бактериемию, раневые инфекции, инфекции мочеполовой системы и менингит.

Более подробно, изобретатели настоящего изобретения обратили внимание на то, что появляется все больше сообщений об увеличении применения колистина для лечения инфекций, вызванных мультирезистентными грамотрицательными патогенами, устойчивыми к колистину.

Поскольку колистин представляет собой один из последних терапевтических вариантов для борьбы с грамотрицательными бактериями, появление устойчивых к колистину грамотрицательных патогенов, таких как *S. maltophilia* и/или *A. baumannii*, вызывает большую озабоченность.

Изобретатели настоящего изобретения, сконцентрировав свои усилия на обнаружении эффективной терапии, способной восстановить чувствительность указанных патогенов к терапии колистином, неожиданно обнаружили, что эффективность колистина относительно устойчивых к колистину грамотрицательных патогенов, таких как, например, *A. baumannii* и *S. Maltophilia*, можно неожиданно восстановить введением колистина вместе с NAC. В частности, МИК всех испытываемых устойчивых к колистину штаммов снижалась до или ниже предела чувствительности в присутствии NAC 8 мг/мл.

Краткое описание фигур

Фиг. 1. Кривая зависимости остаточной микробиологической нагрузки от времени. Только NAC (1,6 и 8 мг/мл), только колистин (2 и 8 мкг/мл) и комбинация NAC+колистин (1,6 мг/мл+2 мкг/мл, 1,6 мг/мл+8 мкг/мл, 8 мг/мл+2 мкг/мл, 8 мг/мл+8 мкг/мл). Символы: -○○- : контроль; ···· (пунктирная линия) : NAC 1,6 мг/мл; === : NAC 8 мг/мл; -\ - колистин 2 мкг/мл; -П- колистин 8 мкг/мл; ···· □···· (пунктирная линия) NAC 1,6 мг/мл+колистин 2 мкг/мл; ···· ○···· (пунктирная линия): NAC 1,6 мг/мл+колистин 8 мкг/мл; ===□=== : NAC 8 мг/мл+колистин 2 мкг/мл; ===○=== : NAC 8 мг/мл+колистин 8 мкг/мл.

Фиг. 2. Кривая зависимости остаточной микробиологической нагрузки от времени изолятов *S. maltophilia* с суб-МИК концентрациями N-ацетилцистеина (NAC 1,6, 3,2 и 8 мг/мл) и колистина (COL 2, 8 мкг/мл) отдельно и в комбинации. А) STX: триметоприм-устойчивый к сульфаметоксазолу штамм *S. maltophilia*; В) *S. maltophilia* CF: штамм пациента с кистозным фиброзом. Символы: -X- : контроль; ===□=== колистин 2 мкг/мл; ===○=== колистин 8 мкг/мл; === : NAC 1,6 мг/мл; ··· (пунктирная линия) NAC 3,2 мг/мл; --- (штриховая линия) NAC 8 мг/мл; -λ- : NAC 1,6 мг/мл+колистин 2 мкг/мл; -v- : NAC 1,6 мг/мл+колистин 8 мкг/мл; ···λ··· (пунктирная линия) NAC 3,2 мг/мл+колистин 2 мкг/мл; ···v··· (пунктирная линия) NAC 3,2 мг/мл+колистин 8 мкг/мл; ---λ--- (штриховая линия): NAC 8 мг/мл+колистин 2 мкг/мл; ---v--- (штриховая линия) : NAC 8 мг/мл+колистин 8 мкг/мл.

Фиг. 3. Антибиопленочная активность NAC, колистина и комбинации колистин/NAC (суб-МИК концентрации), испытываемых на изоляте *S. maltophilia* при кистозном фиброзе. Биопленки выращивали на Calgary Device (МБЕС анализ) в течение 48 ч и обрабатывали в течение 24 ч только NAC, только колистином при двух различных концентрациях: 2 мкг/мл и 8 мкг/мл и комбинацией двух (NAC 8 мг/мл+колистин 2 мкг/мл и 8 мкг/мл).

Подробное описание настоящего изобретения

Первый аспект настоящего изобретения относится к применению синергического фармакологического ассоциата NAC и колистина для ингибирования или подавления роста и/или уничтожения штамма патогена, выбранного из штаммов *S. maltophilia* и *A. baumannii*.

Таким образом, синергический фармакологический ассоциат NAC и колистина предназначен для лечения бактериальной инфекции, вызванной одним или более патогенами, выбранными из штаммов *S. maltophilia* и *A. baumannii*, в частности бактериальной инфекции, связанной с заболеванием дыхательных путей, в частности хроническим заболеванием дыхательных путей, таким как, например, CF, немукковисцидозный бронхоэктаз и COPD.

В конкретном аспекте, бактериальная инфекция вызвана патогеном, выбранным из штаммов *S. maltophilia* и *A. baumannii*, проявляющих чувствительный или устойчивый к колистину фенотип; особенно патогеном, выбранным из штаммов *S. maltophilia* и *A. baumannii*, проявляющих устойчивый к колистину фенотип.

Бактериальную инфекцию, вызванную штаммом *S. Maltophilia*, можно детектировать, например, у пациентов, страдающих от заболеваний дыхательных путей, в частности хронических заболеваний дыхательных путей, таких как, например, у пациентов, страдающих от COPD, CF или немукковисцидозного бронхоэктаза, особенно когда пациенты имеют ослабленную иммунную систему.

Бактериальную инфекцию, вызванную штаммом *A. Baumannii*, можно детектировать, например, у пациентов, страдающих от пневмонии, VAP, бактериемии; раневых инфекций, инфекций мочеполовой системы, CF и немукковисцидозного бронхоэктаза, особенно когда пациенты представляют собой госпитализированных пациентов.

В более конкретном аспекте настоящего изобретения, пациенты, страдающие от бактериальной инфекции, вызванной патогеном, выбранным из штаммов *S. maltophilia* и *A. Baumannii*, как описано выше, представляют собой иммунокомпрометированных и/или госпитализированных пациентов.

Бактериальная инфекция, вызванная патогеном, выбранным из штаммов *S. maltophilia* и *A. baumannii*, согласно настоящему изобретению может представлять собой инфекцию, связанную с биопленкой.

Аспекты выше основаны на наблюдении того, что существует синергическое взаимодействие между NAC и колистином, которое дает значительный антибактериальный эффект.

Согласно настоящему изобретению термины "синергический" и "синергически", как применяют к эффекту NAC и колистина, применяемым в ассоциате (одновременно ли или последовательно) относится к большему антибактериальному эффекту, полученному, когда указанные выше бактерии обрабатывают только или NAC или колистином. В некоторых вариантах осуществления, эффект NAC и колистина, применяемых в ассоциате (одновременно ли или последовательно), является большим, чем простое суммирование эффектов каждого агента, вводимого отдельно, т.е. есть эффект, который превосходит ожидаемый эффект, основанный на аддитивных эффектах.

Следующий аспект настоящего изобретения относится к применению синергического фармакологического ассоциату NAC и колистина для лечения бактериальной инфекции, вызванной одним или более патогенами, выбранными из устойчивых к колистину штаммов *S. maltophilia* и *A. baumannii*, где NAC способен восстанавливать чувствительность указанных патогенов к колистину.

Следующий аспект настоящего изобретения относится к применению фармакологического ассоциату NAC и колистина для лечения бактериальной инфекции, вызванной одним или более патогенами, выбранными из чувствительных к колистину штаммов *S. maltophilia* и *A. baumannii*, где NAC способен предотвращать *in vivo* возникновение устойчивости к колистину, при режимах терапии колистином.

NAC и колистин фармакологического ассоциата согласно настоящему изобретению можно вводить в одном из двух вариантов, отдельно или одновременно, с перекрывающимися или неперекрывающимися периодами введения, одинаковыми или различными способами введения.

Например, NAC и колистин можно вводить одновременно в единичной лекарственной форме, или альтернативно NAC и колистин можно вводить в виде отдельных лекарственных форм в любом из двух вариантов, одновременно или последовательно, с перекрывающимися или неперекрывающимися периодами введения, одинаковыми или различными способами введения.

Одновременное или раздельное введение фармакологического ассоциата NAC и колистина имеет эффект ингибирования или подавления роста и/или уничтожения штамма патогена, выбранного из штаммов *S. maltophilia* и *A. baumannii*, причем указанный эффект неожиданно и удивительно был большим, чем эффект, наблюдаемый, когда бактерии контактируют только с NAC или только с колистином.

Подробно, изобретатели настоящего изобретения отметили, что по мере увеличения применения колистина для лечения инфекций, вызванных мультирезистентными грамотрицательными патогенами, появляется все больше сообщений об устойчивости к колистину.

Поскольку колистин представляет собой одну из последних антибиотиковых терапий для борьбы с грамотрицательными бактериями, возникновение устойчивых к колистину грамотрицательных патогенов вызывает большую озабоченность.

Изобретатели настоящего изобретения почувствовали большую необходимость эффективной терапии против устойчивых к колистину грамотрицательных патогенов, таких как, например, *A. baumannii* и *S. maltophilia*, способной восстанавливать чувствительность указанных патогенов к лечению антибиотиками или предотвращать *in vivo* возникновение устойчивости к колистину при режимах лечения колистином.

Изобретатели настоящего изобретения обнаружили, что эффективность колистина относительно устойчивых к колистину грамотрицательных патогенов, таких как, например, *A. baumannii* и *S. Maltophilia*, можно неожиданно восстанавливать введением ассоциата NAC с колистином.

В частности, чувствительность к колистину можно восстанавливать NAC концентрациями, возможно достигаемыми местным введением. В частности, МИК всех испытуемых устойчивых к колистину штаммов снижалась до или ниже предела чувствительности в присутствии NAC 8 мг/мл.

Ассоциат NAC и колистина можно вводить пациенту в виде одного или более фармацевтических составов.

Фармацевтические составы, применяемые в настоящем изобретении содержат NAC и/или колистин вместе с носителем, пригодным для фармацевтического применения, состоящим из одного или более вспомогательных веществ. Например, фармацевтические составы настоящего изобретения могут содержать NAC и колистин вместе с носителем, пригодным для фармацевтического применения, состоящим из одного или более вспомогательных веществ, т.е. фармацевтические составы для одновременного введения и NAC и колистина; или фармацевтические составы настоящего изобретения могут содержать NAC вместе с носителем, пригодным для фармацевтического применения, состоящим из одного или более вспомогательных веществ; или фармацевтические составы настоящего изобретения могут содержать колистин вместе с носителем, пригодным для фармацевтического применения, состоящим из одного или более вспомогательных веществ, т.е. отдельные фармацевтические составы для последовательного или одновременного введения NAC и колистина.

Согласно настоящему изобретению, термин "вспомогательное вещество" включает любое инертное вещество, добавляемое к фармацевтической композиции, для дополнительного облегчения введения ак-

тивного ингредиента.

Согласно настоящему изобретению, термин "носитель" включает любые вещества, пригодные в качестве среды для доставки НАС и/или колистина в подходящее место *in vivo* или *in vitro*.

Фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества представляют собой соединения, хорошо известные специалисту в данной области техники, которые можно применять для получения составов, содержащих НАС и/или колистин, которые являются пригодными для введения субъекту. Приемлемые способы получения фармацевтических составов согласно настоящему изобретению являются хорошо известными специалисту в данной области техники.

Согласно настоящему изобретению способ лечения бактериальной инфекции, вызванной патогеном, выбранным из штаммов *S. maltophilia* и *A. Baumannii*, у нуждающегося субъекта, включает введение ассоциата, содержащего НАС и колистин, где ассоциат обладает синергическим антибактериальным эффектом.

Согласно настоящему изобретению способ лечения бактериальной инфекции, вызванной патогеном, выбранным из штаммов *S. maltophilia* и *A. Baumannii*, у нуждающегося субъекта, включает одновременное введение ассоциата, содержащего НАС и колистин, где ассоциат обладает синергическим антибактериальным эффектом.

Согласно настоящему изобретению способ лечения бактериальной инфекции, вызванной патогеном, выбранным из штаммов *S. maltophilia* и *A. Baumannii*, у нуждающегося субъекта, включает раздельное введение ассоциата, содержащего НАС и колистин, где ассоциат обладает синергическим антибактериальным эффектом.

Согласно настоящему изобретению термины "индивид", "субъект" и "пациент" применяют взаимозаменяемо для ссылки на члена вида млекопитающих, предпочтительно человека, который страдает от конкретного заболевания, расстройства или состояния.

Согласно настоящему изобретению термин "антибактериальный" обозначает ослабление вредных эффектов бактерий ингибированием, подавлением роста и/или их уничтожением.

Согласно настоящему изобретению термин "антибактериальные агенты" включают НАС и колистин.

Согласно настоящему изобретению термин "бактерицидный" обозначает обладающий разрушительным уничтожающим действием на бактерии.

Согласно настоящему изобретению, "бактериальная инфекция" относится к любой ситуации, при которой наличие микробной популяции (популяций) наносит вред млекопитающему-хозяину. Таким образом, индивид "страдает" от микробной инфекции, когда избыточное количество микробной популяции присутствует в или на теле индивида, или когда эффекты присутствия микробной популяции (популяций) повреждают клетки или другую ткань индивида. В частности, "бактериальная инфекция" относится к инфекции, вызванной штаммом бактерий, для которых применение синергического фармакологического ассоциата НАС и колистина, описанного в настоящем изобретении, является подходящим.

Согласно настоящему изобретению, термины "лечить" и "лечение" относятся к уменьшению, снижению, ограничению или ослаблению степени, интенсивности, масштаба бактериальной инфекции или связанных с ней заболеваний и симптомов, вызванных штаммом *S. maltophilia* и/или *A. baumannii*, которое достигают ослаблением, ингибированием или подавлением роста, репликации, и/или воспроизведения или гибелью или разрушением указанных бактерий, на или в субъекте.

Согласно настоящему изобретению, термин "фармакологический ассоциат" относится или к фиксированной комбинации НАС и колистина в одной стандартной лекарственной форме, нефиксированной комбинации или набору частей для комбинированного введения, где НАС и колистин, как определено выше, можно вводить одновременно, независимо в одно и то же время или раздельно в пределах интервалов времени, которые обеспечивают проявление партнерами комбинации синергического эффекта.

Любой подходящий путь введения можно применять для композиций настоящего изобретения, включая пероральный, парентеральный (подкожный, внутримышечный или внутривенный) пути и путь ингаляцией.

Согласно настоящему изобретению, термины "пероральный" или "перорально" относятся к введению в организм через рот, посредством этого поглощение осуществляется в одной или более из следующих областей организма: в области рта, желудка, тонкой кишки и мелких кровеносных сосудах слизистой оболочки полости рта.

Неограничивающие примеры фармацевтических составов согласно применению в соответствии с настоящим изобретением для перорального введения включают, например, таблетки, таблетки с покрытием, гранулы, пилюли, капсулы, жидкости, гели, сиропы, суспензии и подобные, для перорального поглощения индивидом. Подходящие носители для перорального введения являются хорошо известными в данной области техники.

Для парентерального введения, фармацевтические составы можно формулировать, например, в виде водных растворов, таких как в виде физиологически совместимых буферов или физиологических солевых буферов. Составы для инъекции можно предоставлять в виде стандартных лекарственных форм, например, в виде ампул, или в виде контейнеров с множеством доз, необязательно с добавлением консерванта.

Для введения путем ингаляции, фармацевтические составы можно формулировать в виде растворов, суспензий и сухого порошка и доставлять применением общепринятых способов, так чтобы обеспечивать пациента оптимальными количествами подходящего диапазона размеров частиц.

Фармацевтические составы можно предпочтительно вводить в дыхательные пути. Таким образом, настоящее изобретение также обеспечивает аэрозольные фармацевтические составы, содержащие NAC и/или колистин.

Фармацевтические композиции можно получать общепринятыми способами, следуя способам, хорошо известным в данной области техники.

Количество NAC и колистина для применения согласно настоящему изобретению может изменяться, в зависимости от пути введения, выбранного типа композиции, индивидуальных характеристик пациента, продолжительности лечения и свойств сопутствующих терапий.

Например, синергически эффективное количество фармакологического ассоциата NAC и колистина может давать уменьшение, снижение, ограничение или ослабление степени, интенсивности, масштаба бактериальной инфекции или связанных с ней симптомов, вызванных штаммом *S. maltophilia* и/или *A. baumannii*.

Согласно одному варианту осуществления, количество NAC и колистина, достаточное для того, чтобы обладать синергическим эффектом на бактериальную инфекцию, вызванную штаммом *A. baumannii* и/или *S. Maltophilia*, может изменяться, например, принимая во внимание физические характеристики пациента, тяжесть симптомов у субъекта, форму инфекции, особенности бактерий, составы и способы, применяемые для введения лекарственного средства. Конкретную дозу для указанного субъекта обычно устанавливают по решению лечащего врача.

Для применения согласно настоящему изобретению NAC находится в количестве от 1,6 мг/мл до 8 мг/мл, а колистин находится в количестве от 2 мкг/мл до 8 мкг/мл колистина.

Более того, в качестве примера эффективное количество колистина может составлять приблизительно от 0,075 миллионов единиц до 12 миллионов единиц (т.е. приблизительно от 6 мг до 960 мг), предпочтительно приблизительно от 0,5 миллионов единиц до 12 миллионов единиц (т.е. приблизительно от 40 мг до 960 мг); эффективное количество NAC может изменяться от 100 до 5800 мг, предпочтительно от 100 до 4600 мг, которые будут вводить в виде единичной дозы или в виде нескольких повторяющихся доз.

В зависимости от способа введения дозу можно вводить всю сразу или медленно в течение некоторого периода времени, таким как внутривенным введением или введением ингаляций.

Согласно настоящему изобретению, термин "доза", "единичная доза", "дозирование", "эффективная доза" и родственные термины относятся к физически дискретным единицам, которые содержат заранее определенное количество активного ингредиента, рассчитанное для того, чтобы обеспечивать требуемый терапевтический эффект. Таким образом, единичная доза представляет собой предварительно определенное количество колистина или NAC, которое вводят пациенту.

Точный состав, путь введения и дозу может выбрать индивидуальный врач с учетом состояния пациента. Лечение следует продолжать до тех пор, пока это необходимо для получения полезного эффекта настоящего изобретения.

Определение синергического взаимодействия между NAC и колистином может быть основано на результатах, полученных в анализах, описанных в настоящем изобретении ниже.

In vitro антимикробный синергизм между NAC и колистином определяли, следуя EUCAST руководству. В частности, суммарную фракционную подавляющую концентрацию (Σ FIC) рассчитывали следующим образом: Σ FIC равна FIC агента A плюс FIC агента B, где FIC агента A или B представляет собой минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) агента A или B в присутствии другого, разделенную на МИК только агента A или B. Синергизм определяют как Σ FIC величину $<0,5$.

Пример 1.

Активность NAC в ассоциате с колистином относительно *A. baumannii*.

Семь клинических изолятов устойчивых к колистину *A. baumannii* включали в исследование (диапазон МИК колистина 16-256 мкг/мл, МИК50=64 мкг/мл, МИК90=128 мкг/мл). Классические анализы способом "шахматной доски" применяли для исследования потенциального синергизма между колистином (диапазон 0,25-256 мкг/мл) и NAC (диапазон 0,5-32 мг/мл). Показатели фракционной подавляющей концентрации (FIC) рассчитывали, и синергизм определяли как FIC величины $< 0,5$. Синергизм между колистином и NAC также подтверждали анализами активности по времени гибели, проводимыми с одним изолятом, применяя две различные концентрации колистина (2 и 8 мкг/мл, представляющие концентрации, достигаемые в сыворотке и эпителиальном бронхоальвеолярном секрете-ELF соответственно) и NAC (1,6 и 8 мг/мл, вероятно достигаемые в ELF при местном введении).

МИК NAC составляла 32 мг/мл для двух изолятов, и >32 мг/мл для оставшихся изолятов. Синергизм между колистином и NAC наблюдали в анализах способом "шахматной доски" со всеми испытуемыми изолятами. В частности, восстановление чувствительности к колистину (т.е. МИК <2 мкг/мл) наблюдали с 100 и 52% испытуемых штаммов в присутствии NAC 4 мг/мл и NAC 2 мг/мл, соответственно.

Кривые зависимости остаточной микробиологической нагрузки от времени подтверждали синергизм, наблюдаемый при анализах способом "шахматной доски", демонстрируя бактерицидный эффект комбинаций колистин/НАС при суб-МИК концентрациях (фиг. 1 показывает кривые, полученные для изолята N50, с МИК=>32 мг/мл НАС и МИК=16 мкг/мл колистина).

Для того чтобы дополнительно исследовать синергизм комбинаций колистина/НАС относительно устойчивых к колистину штаммов *A. baumannii*, анализы активности по времени гибели также проводили согласно CLSI руководству с двумя отобранными штаммами (т.е. Z165 и Z167, Col^R). Две концентрации колистина (т.е. 2 и 8 мкг/мл), и три концентрации НАС (т.е. 1,6, 3,2 и 8 мг/мл) испытывали отдельно и в комбинации с колистином, с определением жизнеспособности клеток, проводимым через 0, 2, 4, 6, 8, 24 и 48 ч воздействия (предел обнаружения 25 КОЕ/мл). Данные получали в двух независимых экспериментах, с двумя повторами на одни условия на один эксперимент, и они показывают зависимое от дозы усиление активности колистина НАС. В частности, полное устранение исходного инокулята достигали с комбинациями, включающими НАС 8 мг/мл (т.е. отсутствие повторного роста после 48 ч выдерживания).

Тест на уничтожение биопленки на двух изолятах также проводили следующим образом: биопленки выращивали в системе с крышкой NUNC TSP (МБЕС анализ) в течение семи дней в ежедневно обновляемом САМНВ (статичные условия). Затем, подготовленные пленки подвергали воздействию двух концентраций колистина (т.е. 2 и 8 мкг/мл) и трех концентраций НАС (т.е. 1,6, 3,2 и 8 мг/мл), отдельно и в комбинации, в течение 24 ч. После воздействия, биопленки разрушали обработкой ультразвуком, и определяли среднее количество жизнеспособных клеток на peg ($\log \text{КОЕ/peg}$) (предел обнаружения $1,3 \log \text{CFU/peg}$). Данные получали, по меньшей мере, в двух независимых экспериментах, по меньшей мере, с шестью повторами на одни условия на один эксперимент.

Результаты показали заметную антибиопленочную синергическую активность комбинаций, содержащих колистин 8 мкг/мл (т.е. представляющую 0,25× и 0,06× МИК для Z165 и Z167 соответственно), причем заметное снижение жизнеспособных клеток биопленки также наблюдалось в присутствии меньших испытываемых концентраций НАС (т.е. 1,6 мг/мл).

Пример 2.

Активность НАС в ассоциате с колистином относительно *S. maltophilia*.

Испытывали двадцать клинических изолятов *S. maltophilia*, включая также четыре изолята пациентов, пораженных кистозным фиброзом (CF). Два изолята показывали устойчивость к триметоприм-сульфаметоксазолу. Синергизм между колистином (диапазон 0,25-256 мкг/мл) и НАС (диапазон 0,5-32 мг/мл) исследовали классическими анализами способом "шахматной доски". Показатели фракционной подавляющей концентрации (FICI) рассчитывали, и синергизм определяли как FICI величины <0,5. Анализы активности по времени гибели проводили для двух клинических изолятов (включая один штамм, устойчивый к триметоприм-сульфаметоксазолу, и один от CF). Для этих целей, две различные концентрации колистина (2 и 8 мкг/мл, представляющие собой концентрации, достигаемые в сыворотке и эпителиальном бронхоальвеолярном секрете-ELF, соответственно) и НАС (1,6 и 8 мг/мл, вероятно достигаемые в ELF при местном введении) испытывали отдельно и в комбинации.

МИК колистина были в диапазоне от 0,5 до 128 мкг/мл (МИК50, 16 мкг/мл; МИК90, 64 мкг/мл). МИК НАС составляла 16 мг/мл для девяти изолятов, >32 мг/мл для одного изолята, и 32 мг/мл для оставшихся изолятов. Синергизм между колистином и НАС наблюдали в анализах способом "шахматной доски" со всеми испытываемыми изолятами. В частности, НАС 8 мг/мл и 2 мг/мл снижали колистин МИК до ≤2 мкг/мл (предел чувствительности для *A. baumannii* и *P. aeruginosa*) для 100% и 47% изолятов с МИК колистина >2 мкг/мл (n=17) соответственно. Кривые зависимости остаточной микробиологической нагрузки от времени подтверждали синергизм, наблюдаемый анализами способом "шахматной доски", демонстрируя бактерицидный эффект комбинаций колистин/НАС при суб-МИК концентрациях (фиг. 2 А и В).

Антибиопленочную активность комбинаций колистин/НАС исследовали, применяя МБЕС анализ, исходная методика для испытания на биопленочную чувствительность. Зрелые *S. maltophilia* (возраст 48 ч) обрабатывали в течение 24 ч НАС и колистином, или отдельно или в комбинации. Количество жизнеспособных клеток обрабатываемых биопленок сравнивали с контролями для того, чтобы оценить антибиопленочную активность испытываемых лекарственных средств и лекарственных средств/комбинаций.

Также было обнаружено, что суб-МИК комбинаций колистин/НАС проявляет релевантную антибиопленочную активность относительно биопленок зрелых *S. maltophilia*. В частности, НАС 8 мг/мл плюс колистин 2 мкг/мл обеспечивали снижение более чем 3 $\log$ колониеобразующих единиц (КОЕ)/ peg , по сравнению с контролями (фиг. 3).

Результаты показывают, что МИК всех испытываемых устойчивых к колистину штаммов (т.е. *S. maltophilia*, n=17; *A. baumannii*, n=7) снижались до или ниже предела чувствительности в присутствии НАС 8 мг/мл.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение синергического фармакологического ассоциата, состоящего из N-ацетилцистеина (НАС) и колистина, для лечения бактериальной инфекции, вызванной одним или более патогенами, выбранными из штаммов *S. maltophilia* и *A. baumannii*, где НАС находится в количестве от 1,6 до 8 мг/мл, а колистин находится в количестве от 2 до 8 мкг/мл колистина.

2. Применение по п.1, где патогены, выбранные из штаммов *S. maltophilia* и *A. baumannii*, проявляют устойчивый к колистину фенотип.

3. Применение по п.1 или 2, где инфекция, вызванная штаммами *S. maltophilia* и *A. baumannii*, представляет собой инфекцию, связанную с биопленками.

4. Применение по любому из пп.1-3, где указанная бактериальная инфекция присутствует у пациентов с заболеванием дыхательных путей.

5. Применение по п.4, где заболевание дыхательных путей представляет собой хроническое заболевание дыхательных путей, включая кистозный фиброз (CF), немуковисцидозный бронхоэктаз и хроническое обструктивное заболевание легких (COPD).

6. Применение по любому из пп.1-5, где НАС и колистин вводят в любом из двух порядков, раздельно или одновременно, с перекрывающимися или неперекрывающимися периодами введения.

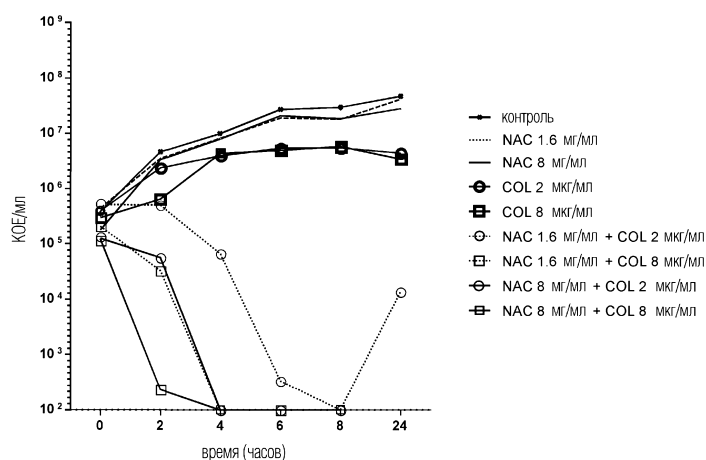
7. Применение по п.6, где НАС и колистин вводят одинаковыми или различными путями введения.

8. Применение по любому из пп.1-6, где НАС и колистин вводят одновременно в единичной лекарственной форме.

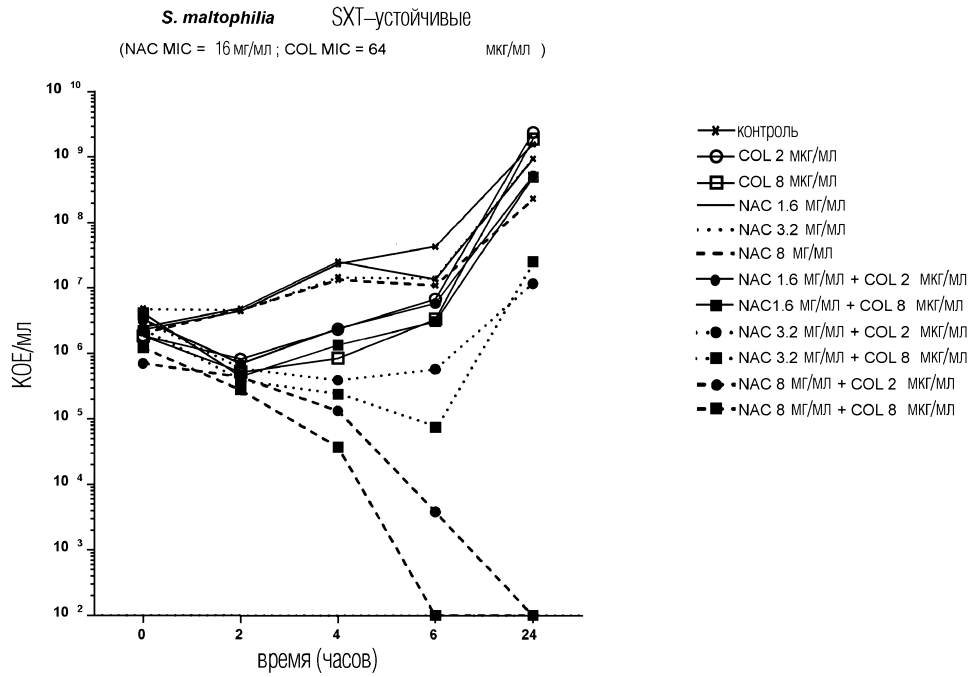
9. Применение по любому из пп.1-6, где НАС и колистин вводят в виде отдельных лекарственных форм в любом из двух порядков, одновременно или последовательно, с перекрывающимися или неперекрывающимися периодами введения.

10. Применение по п.9, где НАС и колистин вводят одинаковыми или различными путями введения.

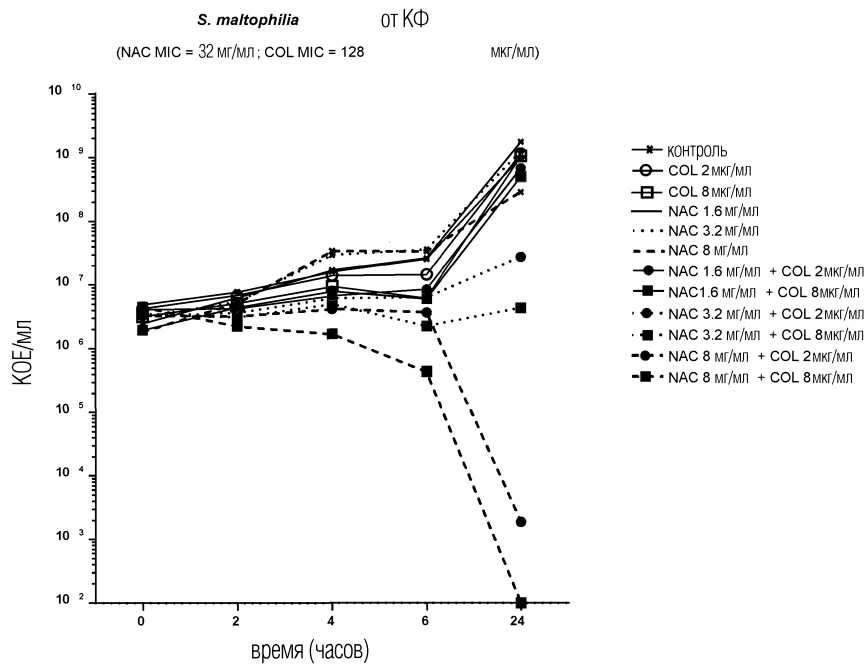
11. Применение по п.1 для нарушения образования биопленок устойчивыми к колистину штаммами *S. maltophilia* и *A. baumannii* при бактериальной инфекции, вызванной указанным одним или более патогенами.



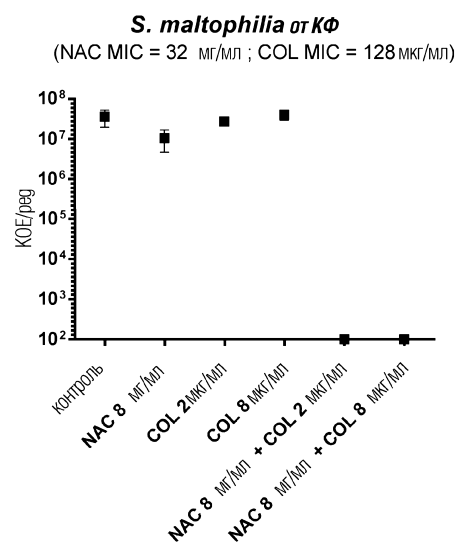
Фиг. 1



Фиг. 2а



Фиг. 2б



Фиг. 3



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2