



(51) МПК  
*A61K 35/10* (2006.01)  
*A61K 31/41* (2006.01)  
*A61K 31/7048* (2006.01)  
*A61P 31/10* (2006.01)

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

(21)(22) Заявка: 2011134414/15, 18.01.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
 18.01.2010

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
 19.01.2009 GB 0900786.5

(43) Дата публикации заявки: 27.02.2013 Бюл. № 6

(45) Опубликовано: 10.12.2014 Бюл. № 34

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **Харкевич Д.А. Фармакология: Учебник.- 9-е изд., перераб., доп. и испр.- М.: Гэотар-Медицина, 2006.- С. 653-659. US 6569900, 27.05.2003. US 4663167, 05.05.1987. EA 008585 B1, 29.06.2007. EP 0955056 A1, 10.11.1999**

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 19.08.2011

(86) Заявка РСТ:  
 IB 2010/050213 (18.01.2010)

(87) Публикация заявки РСТ:  
 WO 2010/082182 (22.07.2010)

Адрес для переписки:  
 105082, Москва, Спартаковский пер., д. 2, стр. 1,  
 секция 1, этаж 3, "ЕВРОМАРКПАТ"

(72) Автор(ы):

**Питер УОРН (GB),  
 Стивен Уильям ЛЕЙВЕРС (GB)**

(73) Патентообладатель(и):

**НЕЙТРЕСИН ЮК ЛИМИТЕД (GB)**

**(54) КОМБИНАЦИЯ ФУЛЬВОВОЙ КИСЛОТЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ СОСТОЯНИЙ И БОЛЕЗНЕЙ**

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к области медицины, а именно к фармакологии, и описывает композицию, содержащую фульвовую кислоту или ее соль и противогрибковое соединение, выбранное из флуконазола и амфотерицина В. Композиция по первому варианту исполнения содержит около 10 мг/кг раствора от около 0.25% до около 1% (мас./об.) фульвовой кислоты или ее соли и около 10 мг/кг флуконазола. Композиция

по второму варианту исполнения содержит 0.25% (мас./об.) раствора фульвовой кислоты или ее соли и от около 0.06 мг/л до около 0.5 мг/л амфотерицина В. Изобретение может быть использовано в методе лечения грибковой инфекции человеческого тела или тела животного, метод включает введение объекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества композиции. 10 з.п. ф-лы, 1 ил., 10 табл., 3 пр.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*A61K 35/10* (2006.01)  
*A61K 31/41* (2006.01)  
*A61K 31/7048* (2006.01)  
*A61P 31/10* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2011134414/15, 18.01.2010**(24) Effective date for property rights:  
**18.01.2010**

Priority:

(30) Convention priority:  
**19.01.2009 GB 0900786.5**(43) Application published: **27.02.2013** Bull. № 6(45) Date of publication: **10.12.2014** Bull. № 34(85) Commencement of national phase: **19.08.2011**(86) PCT application:  
**IB 2010/050213 (18.01.2010)**(87) PCT publication:  
**WO 2010/082182 (22.07.2010)**

Mail address:

**105082, Moskva, Spartakovskij per., d. 2, str. 1,  
seksija 1, ehtazh 3, "EVROMARKPAT"**

(72) Inventor(s):

**Piter UORN (GB),  
Stiven Uill'jam LEJVERS (GB)**

(73) Proprietor(s):

**NEJTRESIN JuK LIMITED (GB)**(54) **COMBINATION OF FULVIC ACID FOR TREATMENT OF VARIOUS CONDITIONS AND DISEASES**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: claimed invention relates to the field of medicine, namely to pharmacology, and describes a composition, containing fulvic acid or its salt and an antifungal compound, selected from fluconazole and amphotericin B. In accordance with the first version of the implementation the composition contains about 10 ml/kg of a solution of from about 0.25% to about 1% (wt/vol) fulvic acid or its salt and of about 10 mg/kg fluconazole. In accordance with the second version of

the implementation the composition contains 0.25% (wt/vol) of the solution of fulvic acid or its salt and from about 0.06 mg/l to about 0.5 mg/l of amphotericin B.

EFFECT: invention can be used in a method of treating a fungal infection of the human or animal body, the method includes the introduction to an object, requiring it, of a therapeutically effective quantity of the composition.

11 cl, 1 dwg, 10 tbl, 3 ex

## ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Это изобретение относится к фульвовой кислоте в комбинации с одним или более противогрибковыми соединениями для применения в терапевтическом лечении или профилактике различных состояний в теле животного или человека.

5 Фульвовая кислота представляет собой одно из веществ, которые сформированы во время распада органического вещества в окружающей среде. Она является растворимой в воде при всех условиях рН и, главным образом, имеет более низкий молекулярный размер и вес и низшую интенсивность цвета, чем гуминовые кислоты, которые также производятся во время процесса распада.

10 Не смотря на то, что фульвовая кислота возникает естественно при низких уровнях в почве и воде, она является сложной для изолирования. Известен процесс для того, чтобы получить фульвовую кислоту для применения в медицинском применении посредством конторля влажного окисления каменного угля, как описано в US Патент No. 4912256. Применение такой фульвовой кислоты для лечения воспаления, прыщей, 15 экземы, бактериальных, грибковых и вирусных инфекций было ранее раскрыто в Международной публикации патента WO 00/19999. Кроме того, US Патент Nos. 4999202 и 5204368 раскрывают составы, которые содержат фульвовую кислоту, соль или их производную, которые имеют бактериостатические или бактериоцидные свойства и являются пригодными для применения в качестве дезинфицирующих средств.

20 Произведенные из угля фульвовые кислоты содержат высокие концентрации тяжелых металлов, таких как алюминий, ртуть, кадмий, хром и свинец, которых нужно избегать в фармацевтических препаратах. Композиция фульвовой кислоты, которая получена из углеводного источника (CHD-FA) посредством влажного окисления, была ранее раскрыта в Международной публикации патента WO 2007/125492. Этот CHD-FA 25 является, в частности, используем для фармацевтического применения, так как имеет низкое содержание тяжелых металлов.

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В соответствии с первым воплощением изобретения, в нем обеспечена комбинация фульвовой кислоты или соли, сложного эфира или их производной и противогрибкового 30 соединения, выбранного из флуконазола и амфотерицина В.

Фульвовая кислота, соль, сложный эфир или их производная может иметь любой рН, от кислоты до щелочи. К примеру, рН фульвовой кислоты может быть поднят посредством преобразования кислоты в соль, такую как соль калия или натрия. Это может быть достигнуто посредством добавления подходящего гидроксида к фульвовой 35 кислоте. Как правило, фульвовая кислота находится в форме кислоты или соли.

Предпочтительно, фульвовая кислота представляет собой полученный углевод (CHD-FA), произведенный посредством метода, который описан в WO 2007/125492. В частности, CHD-FA может быть получен из сахара. Как правило, CHD-FA имеет молекулярную массу, которая не превышает 20000 Дальтон, и низкое содержание таких 40 элементов, как алюминий, ртуть, кадмий и хром. CHD-FA производится посредством подвергания углевода влажному окислению и затем обработыванием полученного продукта реакции до удаления существенным образом всех кислотных компонентов с молекулярной массой, которая превышает 20000 Дальтон.

Флуконазол представляет собой известный противогрибковый агент и описан, к 45 примеру, в Пункте 4122 из Merck Index, 14<sup>th</sup> Ed. Флуконазол может быть использован в форме сложного эфира, и следует подразумевать, что термин "флуконазол", который используется здесь и в формуле, включает сложные эфиры и другие подходящие фармацевтические формы флуконазола.

Амфотерицин В является также известным противогрибковым агентом и описан, к примеру, в Пункте 585 из Merck Index, 14<sup>th</sup> Ed.

К удивлению было найдено, что комбинация фульвово́й кислоты и флуконазола была эффективна тогда, когда она была применена против грибов, устойчивых к флуконазолу. В частности, комбинация фульвово́й кислоты и флуконазола является эффективной тогда, когда она применяется против устойчивой к флуконазолу *Candida* spp.

Амфотерицин В, как к удивлению было найдено, был эффективен в более низкой, нетоксичной дозе, когда вводился против грибковых разновидностей в комбинации с фульвово́й кислотой.

В одной форме изобретения комбинация включает приблизительно от 10 мл/кг раствора от приблизительно 0.25% до приблизительно 1% фульвово́й кислоты или соли, сложного эфира или его производного и около 10 мг/кг флуконазола.

Амфотерицин В может присутствовать в комбинации в эффективной дозе, которая является нетоксичной к объекту. В большей особенности, комбинация содержит приблизительно 0.25% фульвово́й кислоты и от приблизительно 0.06 мг/л до приблизительно 0.5 мг/л амфотерицина В.

В соответствии с дополнительным воплощением изобретения, в нем обеспечена фармацевтическая композиция, которая содержит комбинацию, которая описана выше в виде активных ингредиентов.

Фармацевтическая композиция может быть в форме, которая является подходящей для перорального приема или местного применения, или любой другой подходящей формы применения. К примеру, фармацевтическая композиция может быть образована в жидкость, таблетку, капсулу, в крем или мазь.

В соответствии с дополнительным аспектом изобретения, в нем обеспечена комбинация или фармацевтическая композиция, которая описана выше для применения в методе лечения или профилактики болезни или состояния тела животного или человека. Метод может содержать оральную, местную или любую другую подходящую форму применения.

Человек или животное, которое будут лечить, может быть иммуносупрессивным или со сниженной иммунной реакцией.

Болезни или состояние могут быть вызваны посредством резистентных к воздействию лекарств грибов.

Болезнь или состояние может быть вызвано посредством дрожжей. Предпочтительно, болезнь или состояние вызвано посредством *Candida* spp.

Болезнь или состояние может быть вызвано посредством *Aspergillus* spp или *Zygomycetes*.

В соответствии с дополнительным объектом изобретение обеспечивает применение комбинации, которая описана выше в изготовлении фармацевтической композиции для лечения или профилактики болезни или состояния тела животного или человека.

Фармацевтическая композиция может быть в форме, которая является подходящей для перорального приема или местного применения, или любой другой подходящей формы применения. К примеру, фармацевтическая композиция может быть образована в жидкость, таблетку, капсулу, в крем или мазь.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Чертеж показывает почечную ткань впоследствии отягощения инфекцией *Candida albicans* у мышей, которые обработаны различными концентрациями СНД-ФА в одиночку или в комбинации с флуконазолом.

## ДЕТАЛЬНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Устойчивость к лекарственному средству представляет собой большую проблему для лечения болезней и состояний, которые вызваны грибковыми носителями, такими, которые произошли с применением флуконазола для лечения инфекции *Candida* и применением амфотерицина В в лечении *Aspergillus*. В частности, применение амфотерицина В в лечении инфекций *Aspergillus* является не долготерапевтически эффективным, так как доза, которая требуется для ингибирования *Aspergillus*, является токсичной для объекта (3 мг/л).

Кроме того, условно-патогенные грибковые инфекции, которые возникают у пациентов со сниженной иммунной реакцией или иммуносупрессивных пациентов, являются трудно управляемыми противогрибковыми носителями.

Таким образом, необходима стратегия лечения у этих пациентов, в особенности больных раком, которые получают препараты против рака, и других пациентов на любых лекарствах, которые вызывают ослабление иммунной реакции.

Три исследования было проведено для того, чтобы оценить противогрибковые характеристики фульвово́й кислоты против определенных организмов. Фульвово́я кислота, которая используется в этих исследованиях, была такой, которая здесь описана, и произведена посредством метода, который описан в WO 2007/125492, и именуемая здесь в дальнейшем СНД-ФА. Говоря кратко, фульвово́я кислота была получена из углевода, в частности сахара. СНД-ФА имеет молекулярную массу такую, которая не превышает 20000 Дальтон, и низкое содержание, то есть меньше чем 30 частей на миллион элементов, таких как алюминий, ртуть, кадмий, хром, свинец, серебро, мышьяк и бериллий. СНД-ФА был произведен посредством подвергания углевода влажному окислению и затем обработке полученного продукта реакции для того, чтобы удалить существенным образом все кислые компоненты с молекулярной массой, которая превышает 20000 Дальтон.

В первом исследовании почки отягощенные *Candida albicans* были определены в виде показателя эффективности увеличивающихся концентраций СНД-ФА в одиночку или в комбинации с противогрибковым соединением, флуконазолом. Результаты показали, что фульвово́я кислота значительным образом усиливает активность флуконазола против *Candida albicans*.

Во втором исследовании эффективность фульвово́й кислоты в одиночку или в комбинации с противогрибковым соединением амфотерицин В против *Aspergillus* или *zygomycetes* была определена посредством количественного определения количества колоний на пластинах с выращенными живыми тканями.

В третьем исследовании эффективность флуконазола в комбинации с фульвово́й кислотой против штамма, резистентного к лекарственным средствам *Candida spp*, была определена посредством количественного определения количества колоний на пластинах с выращенными живыми тканями.

Все растворы приводятся в виде процентов веса на единицу объема.

Следующие примеры приведены только с целью иллюстрации и не должны быть рассмотрены как ограничение на изобретение в любом из случаев.

**ПРИМЕР 1 - In vivo эффективность СНД-ФА против *Candida***

**1.1. ФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НОВОГО АНТИБИОТИЧЕСКОГО АГЕНТА МОДУЛЯЦИИ РЕЗИСТЕНТНОСТИ, ТАКЖЕ ИЗВЕСТНОГО КАК ФУЛЬВОВА́Я КИСЛОТА ВТОРИЧНОГО УГЛЕВОДА (СНД-ФА)**

СНД-ФА был ресуспендирован как 4%-ный раствор. Раствор был сохранен при комнатной температуре в темноте с момента доставки. 4%-ный раствор СНД-ФА был

желто/коричневым, немного вязким раствором с сильным запахом и pH 2.1 при 25°C.

## 1.2. МЕТОДЫ

### 1.2.1 Регулирующие исследования

5 Все эксперименты на животных были выполнены в соответствии с Лицензией  
Министерства внутренних дел Великобритании 40/3101 Инвазивные Грибные  
Заболевания (Держатель Лицензии доктор Peter Warn) и с согласия местного этического  
комитета. Все эксперименты были выполнены техническим персоналом, который  
закончил части 1, 2 и 3 курса персонального лицензионного курса Министерства  
10 внутренних дел и является держателем текущей персональной лицензии. Все  
эксперименты были выполнены в специализированном аппарате Biohazard 2 в пределах  
Биологического Сервисного Устройства Манчестерского университета (это место  
является держателем Сертификата Назначения).

### 1.2.2 Модель для животных

15 Мыши, которые были использованы в этом исследовании, особи мышей мужского  
пола CD1 (скрещенные неродственные особи, которые очень похожи на домашних  
мышей), были предоставлены компанией Charles River (Margate UK) и были свободны  
от специфической патогенной микрофлоры (16-18 г по факту поставки). Все мыши  
имели вес 20-22 г во время иммунодепрессии.

Мыши были размещены в индивидуальных вентилированных клетках (ИВК), которые  
20 поставляются воздухом, профильтрованным через HEPA фильтр. Стерильная подстилка  
с осиновой щепкой поставлялись в предварительно обработанных в автоклаве коробках.  
Стерильная вода была обеспечена по усмотрению с использованием пакетов  
одноразового действия. Обычная еда мыши была обеспечена по усмотрению (еда была  
увлажнена в месиво, когда у мышей были продемонстрированы симптомы сепсиса).

25 Мыши были испытаны в течение 12-часового цикла дня и ночи при  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  
относительной влажности 55-60% и фоновом шуме <60 децибел.

Животные были обработаны с применением или 30 г доступного 'инсулина' Monojects  
(для внутривенного (iv) или внутрибрюшинного (ip) введения), или 19 г многократно  
используемых игл.

30 Все животные были иммуносупрессированы единственной дозой 200 мг/кг  
циклофосамида (Pharmacia) внутрибрюшинным образом (ip) за 3 дня до заражения.  
Это приводит в результате к глубокому состоянию нейтропении, которое длится 3-4  
дня после заражения.

### 1.2.3 Продолжительность эксперимента

35 Эксперимент был продолжен до 53 часов после заражения.

### 1.2.4 Численность группы животных

При комбинированном исследовании животных лечили в группах из 4 мышей на  
группу лечения.

### 1.2.5 Заражение

40 Мыши были заражены 0.2 мл суспензии FA7070 в PBS+0.05% переход 80, содержащей  
 $1.5 \times 10^5$  бластоконидий/мл, то есть  $3.0 \times 10^4$  дрожжевых грибков на мышь. Следом за  
заражением все мыши наблюдались по крайней мере 4 раза ежедневно. Животные, у  
которых было превышение уровня опасности эксперимента, были гуманным образом  
подвергнуты эвтаназии.

### 1.2.6 Противогрибковое лечение

Мышей лечили 5 часов после заражения чем-либо из:

а) 0.125 мл 2%-ного CHD-FA, который был введен посредством принудительного  
кормления (введение мыши 25 г во время лечения). CHD-FA был введен два раза в день

(общее количество 6 введенных доз).

b) 0.125 мл 0.5%-ного СНД-ФА, который был введен посредством принудительного кормления (введение мышца 25 г во время лечения). СНД-ФА был введен два раза в день (общее количество 6 введенных доз).

5 c) 10 мг/кг флуконазола, который был введен внутривенно в 5%-ной глюкозе (в 0.25 мл)

d) Комбинированная терапия 0.125 мл 2%-ного СНД-ФА, который был введен два раза в день орально, и 10 мг/кг флуконазола, который был введен внутривенно в 5%-ной глюкозе.

10 e) Комбинированная терапия 0.125 мл 0.5%-ого СНД-ФА, который был введен два раза в день орально и 10 мг/кг флуконазола, который был введен внутривенно в 5%-ой глюкозе.

f) 0.5 мг/кг амфотерицина В (растворенный в 5%-ной глюкозе), который был введен внутривенным образом.

15 g) Мышам, которых лечили инертным веществом, было дано 0.125 мл 0.9%-ного солевого раствора посредством принудительного кормления, который был введен два раза в день, и 0.25 мл 5%-ной глюкозы, которая была введена внутривенно.

#### 1.2.7 Конец эксперимента на животных

20 Спустя 53 часа после заражения, все животные были подвергнуты эвтаназии с применением процедуры приложения 1. Все животные были взвешены; почки были немедленно удалены и гомогенизированы в охлажденном до нуля стерильном фосфатно-буферном солевом растворе. Почечные гомогенаты были в количественном соотношении культивированы на агаре Сабуро с декстрозой и инкубированы при 37°C в течение до 4 дней и колонии были подсчитаны.

#### 25 1.2.8 Статистический Анализ

Данные из отягощенных культур были проанализированы посредством критерия Крускала-Уоллиса с применением прямой статистики.

### 1.3 РЕЗУЛЬТАТЫ

#### 1.3.1 Почечные отягощения

30 Краткое изложение почечных отягощений детализировано на чертеже 1.

В этом исследовании не было никаких побочных эффектов, отмеченных после лечения СНД-ФА, и исследование было закончено в 53 часа после заражения по причине тяжелой инфекции в группе, которую лечили инертным веществом.

#### 1.3.2. Статистический Анализ

35

40

45

**Таблица 1: Крускал-Уоллис: все попарные сравнения (Коновер-Инман)**

	Солевой раствор	0.25% CHD-FA	1% CHD-FA	10 мг/кг Флуконазола	0.25% CHD-FA + 10 мг/кг флуконазола	1% CHD-FA + 10 мг/кг флуконазола	0.5 мг/кг Амфотерицина
5	Солевой раствор	НС (0.06)	0.028	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
	0.25% CHD-FA		НС (0.67)	0.0026	<0.0001	<0.0002	<0.0001
	1% CHD-FA			0.007	<0.0001	0.006	<0.0001
10	10 мг/кг Флуконазола				0.044	НС (0.19)	0.004
	0.25% CHD-FA + 10 мг/кг флуконазола					НС (0.51)	НС (0.29)
15	1% CHD-FA + 10 мг/кг флуконазола						НС (0.11)
	0.5 мг/кг Амфотерицина						

**НС = не существенно**

#### 20 1.4 КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

- Эксперименты были установлены с применением 0.125 мл принудительно скормленного 2%-ного и 0.5%-ного CHD-FA два раза в день (эквивалентно 1%-ному и 0.25%-ному CHD-FA, который был введен при 10 мл/кг).

25 - 5 мл/кг 2%-ного или 0.5%-ного CHD-FA (эквивалентно 10 мл/кг при 1%-ном и 0.25%-ном CHD-FA) был хорошо переносим у мышей.

- 5 мл/кг 2%-ного или 0.5%-ного CHD-FA (эквивалентно 10 мл/кг при 1%-ном и 0.25%-ном CHD-FA) был эффективен при сокращении почечного отягощения у мышей, зараженных *Candida albicans*. Отягощение после лечения было значительно ниже, чем у мышей, которых лечили инертным веществом (~0.6 log<sub>10</sub> КОЕ/грамм сокращение).

30 - 5 мл/кг 2%-ного или 0.5%-ного CHD-FA (эквивалентно 10 мл/кг при 1%-ном и 0.25%-ном CHD-FA) было добавлено при использовании в комбинации с флуконазолом. Комбинированное сокращение отягощения ткани значительно превосходило любое лечение, используемое в качестве монотерапии.

ПРИМЕР 2 - In vitro эффективность CHD-FA против *Aspergillus* и *Zygomycetes*

#### 35 2.1 ФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА CHD-FA, ТАКЖЕ ИЗВЕСТНОГО КАК ФУЛЬВОВАЯ КИСЛОТА

40 CHD-FA был ресуспендирован как 4%-ный раствор. Растворы были сохранены при комнатной температуре в темноте с момента поставки. 4%-ный раствор CHD-FA представлял собой желто/коричневый немного вязкий раствор с сильным запахом и рН 2.1 при 25°C.

#### 2.2 МЕТОДЫ - Предварительный Эксперимент

##### 2.2.1 Грибковые Культуры

45 Тесты восприимчивости были выполнены на следующих культурах, которые представляют собой все разновидности, выделенные из случаев человеческой клинической болезни.

(i) 2 x *Aspergillus fumigatus*.

(ii) 2 x *Aspergillus terreus* - эти разновидности являются в умеренной степени стойкими in vitro и стойкими in vivo к амфотерицину В, который является типичным к



разновидности *A. terreus*.

(iii) 2 x *Aspergillus flavus* - эти разновидности имеют промежуточную восприимчивость *in vitro* и соответственно обедненную *in vivo* к амфотерицину В (1 разновидность).

(iv) 2 x *Aspergillus flavus* - эти разновидности имеют промежуточную восприимчивость *in vitro* и соответственно обедненную *in vivo* к амфотерицину В (1 разновидность).

(v) 2 x *Absidia corymbifera* - эти разновидности являются восприимчивыми *in vitro* и соответственно имеют очень обедненную *in vivo* к амфотерицину В.

(vi) 2 x *Fusarium solani* - эти разновидности являются очень стойкими *in vitro* и соответственно не являются *in vivo* к амфотерицину В.

Каждая культура была выращена на агаре Сабуро при 37°C в течение 10 дней, чтобы гарантировать чистоту и позволить спорам взреть.

#### 2.2.2 Среда

RPMI-1640 (Сигма, Дорсет, Великобритания), добавленный к 2%-ной глюкозе (Сигма), буферизованной с морфолинопропансульфоновой кислотой (МОПС), (Сигма), и приспособленный к рН 7.0, использовался как рекомендующийся в Клинических Лабораторных Стандартах документ М38А (Справочный метод для растворения бульона противогрибкового тестирования восприимчивости конидий-формирования волокнистых грибов. Одобренный стандарт. Документ М38-А 2002а. NCCLS, Уэйн, Пенсильвания 2002. NCCLS, Уэйн, Пенсильвания, США).

#### 2.2.3 Приготовление инокулята

а) Все грибы были культивированы в атмосферном воздухе при 35-37°C в восстановительной среде (агар Сабуро с декстрозой) в течение 8-10 дней перед тестированием.

б) Инокулятные суспензии были приготовлены с 8 дня по 10 день культивирования, выращенные на агаре Сабуро с декстрозой при 37°C в вентилируемых колбах для выращивания живых тканей, чтобы избежать перекрестного заражения. Споры были собраны посредством заливки поверхности, на которой происходит выращивание, 25 мл стерильного физиологического раствора с фосфатным буфером плюс 0.05% Tween 80. Количество спор было подогнано с применением счетной камеры.

в) Инокулят был полностью суспендирован посредством интенсивной встряски на вихревом смесителе в течение 15 сек. Финальная плотность споры в тестах МИК была между  $0.5 \times 10^4$  и  $5 \times 10^4$  КОЕ/мл, о чем свидетельствует количественный подсчет колоний. Немедикаментозный и бесклеточный контроли были включены (Среда RPMI, которая используется в пластинах, была приготовлена или при 2- или 4-конечной прочности, чтобы обеспечить одиночное растворение инокулята и растворенный CHD-FA был добавлен).

#### 2.2.4 Испытание на патологические состояния

Стерильные пластмассовые пластины одноразового действия для микротитрования с 96 плоскодонными колодцами были использованы.

ЭТАП 1 Добавление амфотерицина В (маточный раствор приготовлен в 100% ДМСО)

а) Колонка 1 панели микротитрования была заполнена 100 мкл стерильной воды, которая содержит четыре значения финальной концентрации препарата (16 мг/л амфотерицина В).

б) Колонки 2-12 были заполнены 50 мкл дистиллированной воды.

в) Количества 50 мкл были взяты из лунок в колонке 1 и вдвойне растворены посредством передачи их в колонку 2 многоканальной пипеткой ( $\pm 2\%$  коэффициент вариации). 50 мкл образцов были затем удалены из колонки 2 и перемещены в колонку 3 и так далее до колонки 10. Последние 50 мкл растворенного препарата затем

выбрасывают. Таким образом, каждая лунка в колонках 1-10 будет содержать 50 мкл воды, содержащей четыре значения финальных концентраций противогрибкового препарата.

#### ЭТАП 2 Добавление CHD-FA

5 Маточные растворы CHD-FA были произведены с содержанием 4%, 2%, 1%, 0.5% и 0.25% нативного соединения.

100 мкл растворенного CHD-FA было добавлено к панелям микротитрования таким образом, что ряд А содержал финальное разбавление 2%, ряд В 1%, ряд С 0.5%, ряд D 0.25%, ряд Е 0.125% и ряд F только растворитель.

10 ЭТАП 3 Добавление *Aspergillus* или *Zygomycetes* нагрузок

50 мкл растворенной споровой суспензии в 4 x RPMI было добавлено ко всем клеткам. Это производит лунки, содержащие 200 мкл финального объема (состоящий из 50 мкл растворенного противогрибкового вещества, 100 мкл растворенного CHD-FA или разбавителя, 50 мкл 4 X RPMI, содержащие грибковые споры).

15 ЭТАП 4 Инкубирование пластин

Все пластины были инкубированы при 37°C в воздухе в затемненном инкубаторе.

#### ЭТАП 5 Считывание пластин

20 Пластины были прочитаны визуально с конечной точкой, которая была взята в виде самой низкой концентрации препарата, который ингибировал рост на 50% по отношению к такому же без медикаментозного контроля.

### 2.3. РЕЗУЛЬТАТЫ - Предварительный эксперимент

#### 2.3.1 МИК по отношению к CHD-FA и Амфотерицину В

25 МИК по отношению к одиночным агентам продемонстрировали, что CHD-FA при 4%, 2% и 1% ингибировали рост *Aspergillus* и *Zygomycetes* в течение по крайней мере 24 часов. Значения МИК для CHD-FA и Амфотерицина В детализированы в Таблице 2.

Таблица 2			
Эффективность CHD-FA по отношению к <i>Aspergillus</i> и <i>zygomycetes</i>			
Вид изолята	Номер изолята	МИК (%) CHD-FA	Амфотерицин МИК (мг/л)
A. fumigatus	1	0.5	0.5
A. fumigatus	2	0.5	0.25
A. terreus	1	0.5	0.5
A. terreus	2	0.5	1.0
A. flavus	1	0.5	4.0

Вид изолята	Номер изолята	МИК (%) CHD-FA	Амфотерицин МИК (мг/л)
A. flavus	2	0.25	0.5
Absidia	1	0.25	0.25
Absidia	2	0.25	0.06
Fusarium	1	0.25	2.0
Fusarium	2	0.25	2.0

#### 3.3.2 МИК по отношению к Комбинации CHD-FA и Амфотерицина В

40 МИК по отношению к комбинации CHD-FA и амфотерицина В показаны в таблице 3. Они примечательны тем, что ни одна из комбинаций не была антагонистической, но комбинация была очень эффективна по отношению к отягощению *Aspergillus fumigatus*, которое является устойчивым *in vitro* и *in vivo* к амфотерицину В.

Таблица 3					
Эффективность комбинации CHD-FA и амфотерицина В по отношению к <i>Aspergillus</i>					
Вид изолята	CHD-FA разбавление	МИК CHD-FA	Амфотерицин МИК	Комбинация МИК	Эффект
A.	0.5	Нет	Нет роста	Нет роста	Возможна синергия

5	fumigates отягоще- ние 1	0.25	роста	Нет роста	Нет роста	
		0.125	Нет роста Рост	0.06	<0.06	
10	A. fumigates отягоще- ние 2	0.5	Нет роста	Нет роста Нет роста	Нет роста Нет роста	Ни синергии, ни антагонизма
		0.125	Нет роста Рост	0.125	0.125	
10	A. terreus отягоще- ние 1	0.5	Нет роста	Нет роста Нет роста	Нет роста Нет роста	Ни синергии, ни антагонизма
		0.125	Нет роста Рост	0.25	0.25	
15	A. terreus отягоще- ние 2	0.5	Нет роста	Нет роста Нет роста	Нет роста Нет роста	Ни синергии, ни антагонизма
		0.125	Нет роста Рост	0.125	0.125	
20	Вид изоля- та	СНД-ФА разбавление	МИК СНД- ФА	Амфотерицин МИК	Комбинация МИК	Эффект
25	A. flavus отягоще- ние 1	0.5	Нет роста	Нет роста Нет роста	Нет роста Нет роста	Комбинация сниженного МИК от устойчивого до очень восприимчивого
		0.125	Нет роста Рост	>4.0	<0.06	
30	A. flavus отягоще- ние 2	0.5	Нет роста	Нет роста Нет роста	Нет роста Нет роста	Ни синергии, ни антагонизма
		0.125	Нет роста Рост	0.25	0.5	

#### 2.4. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

- СНД-ФА не демонстрирует антагонистическую активность, когда используется в комбинации с амфотерицином В *Aspergillus* spp.

- Комбинация 0.25% СНД-ФА с амфотерицином В (0.06-0.5 мг/л) ингибирует рост всех культур *Aspergillus*, протестированных независимо от амфотерицина В МИК культур.

ПРИМЕР 3 - In vitro эффективность комбинации флуконазола и СНД-ФА по отношению к *Candida* spp.

#### 3.1 ФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СНД-ФА, ТАКЖЕ ИЗВЕСТНОГО КАК ФУЛЬВОВАЯ КИСЛОТА

СНД-ФА был ресуспендирован как 4%-ный раствор. Растворы были сохранены при комнатной температуре в темноте с момента размещения. 4%-ный раствор СНД-ФА представлял собой желто/коричневый слегка вязкий раствор с сильным запахом и рН 2.1 при 25°C.

#### 3.2 МЕТОДЫ - Предварительный эксперимент

##### 3.2.1 Грибковые культуры

Тесты на восприимчивость были выполнены на 5 культурах *Candida albicans*, которые все представляют собой клинические культуры (все с уменьшенной восприимчивостью

к флуконазолу). Каждая культура была выращена на агаре Сабуро при 37°C в течение 48 ч для того, чтобы гарантировать чистоту.

### 3.2.2 Среда

RPMI-1640 (Сигма, Dorset, UK), добавленный к 2%-ной глюкозе (Сигма), которая  
5 буферизована с морфолинопропансульфоновой кислотой (МОПС), (Сигма), и  
подогнанный до pH 7.0, был использован как рекомендуемый в Европейском  
комитете по тестированию антимикробной чувствительности (E.Dis. 7.1) (Rodriguez-  
Tudela, J.L, F.Barchiesi, J.Bille, E.Chryssanthou, M.Cuenca-Estrella, D.Denning, J.P.Donnely,  
10 B.Dupont, W.Fegeler, C.Moore, M.Richardson, P.E.Verweij) и Подкомитетом по тестированию  
противогрибковой чувствительности (Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing)  
(AFST) Европейского Сообщества Клинической Микробиологии и Инфекционных  
заболеваний (The European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases) ESCMID  
Европейского комитета по тестированию антимикробной чувствительности (European  
Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing) (EUCAST) 2003. Метод определения  
15 минимальной ингибирующей концентрации (МИК) на бульоне разбавления  
ферментативных дрожжей. Клиническая микробиология и инфекции (9:I-VIII).

### 3.2.3 Приготовление инокулята

а) Все дрожжевые грибки были культивированы в воздушной окружающей среде  
при 35-37°C на восстановительной среде (декстрозный агар Сабуро) в течение 18-24  
20 ч перед тестированием.

б) Инокулят был приготовлен посредством отбора пяти отличающихся колоний от  
18 до 24 ч культивирования и суспендирования их в 5 мл стерильной дистиллированной  
воды.

с) Инокулят был полностью суспендирован посредством интенсивного встряхивания  
25 в вихревом миксере в течение 15 сек. Плотность клетки была подогнана к плотности  
0.5 стандарту Макфарлэнда посредством добавления стерильной дистиллированной  
воды и измерения спектральной поглощательной способности в спектрофотометре при  
длине волны 530 нм. Это дало суспензию дрожжевых грибков  $1-5 \times 10^6$  КОЕ/мл. Рабочая  
30 суспензия была приготовлена посредством дополнительного растворения 1 к 10  
дополнительно в 4 X RPMI для получения  $1-5 \times 10^5$  КОЕ/мл (Среда RPMI, которая  
используется в пластинах, была приготовлена при 4-финальном напряжении, чтобы  
обеспечить 75%-ное растворение одного инокулята и разбавленный CHD-FA был  
добавлен).

### 3.2.4 Испытание на патологические состояния

35 Стерильные пластмассовые пластины одноразового действия для микротитрования  
с 96 плоскодонными колодцами были использованы.

#### ЭТАП 1 Добавление флуконазола

а) Колонка 1 панели микротитрования была заполнена 100 мкл стерильной воды,  
40 которая содержит четыре значения финальной концентрации препарата (512 мг/л  
флуконазола).

б) Колонки 2-12 были заполнены 50 мкл дистиллированной воды.

с) Количества 50 мкл были взяты из лунок в колонке 1 и вдвойне растворены  
посредством передачи их в колонку 2 многоканальной пипеткой ( $\pm 2\%$  коэффициент  
45 вариации). 50 мкл образцов были затем удалены из колонки 2 и перемещены в колонку  
3 и так далее до колонки 10. Последние 50 мкл растворенного препарата затем  
выбрасывают. Таким образом, каждая лунка в колонках 1-10 будет содержать 50 мкл  
воды, содержащей четыре значения финальных концентраций противогрибкового  
препарата.

## ЭТАП 2 Добавление CHD-FA

Маточные растворы CHD-FA были произведены с содержанием 4%, 2%, 1%, 0.5% и 0.25% нативного соединения. 100 мкл растворенного CHD-FA было добавлено к панелям микротитрования таким образом, что ряд А содержал финальное разбавление 2%, ряд В 1%, ряд С 0.5%, ряд Е 0.25%, ряд D 0.125% и ряд F только растворитель.

## ЭТАП 3 Добавление *Candida albicans*

50 мкл растворенной суспензии *Candida albicans* в 4 x RPMI было добавлено ко всем клеткам. Это производит лунки, содержащие 200 мкл финального объема (состоящий из 50 мкл растворенного флуконазола, 100 мкл растворенного CHD-FA или разбавителя, 50 мкл 4 X RPMI, содержащие *Candida albicans*).

## ЭТАП 4 Инкубирование пластин

Все пластины были инкубированы при 37°C в воздухе в затемненном инкубаторе.

## ЭТАП 5 Считывание пластин

Пластины были прочитаны визуально с конечной точкой, которая была взята в виде самой низкой концентрации препарата, который ингибировал рост на 50% по отношению к такому же без медикаментозного контроля.

### 3.3.1 РЕЗУЛЬТАТЫ - Предварительный эксперимент

Начальные тесты продемонстрировали, что CHD-FA при 4%, 2% и 1% ингибировал рост *Candida albicans* в течение по меньшей мере 24 часов, когда объединен с 1 X RPMI 1640 питательной средой, рост в 0.5% CHD-FA происходит на подобных уровнях, чтобы контролировать растворение. Ингибирование роста (4%, 2% и 1%) было возможным по причине сильно кислотного pH. При собственном pH CHD-FA (pH 2.1) могло быть обнаружено отсутствие синергии или антагонизма с флуконазолом.

pH CHD-FA был подогнан до pH 7.0 с применением 10 М раствора NaOH (идеальный pH для активности флуконазола). Это привело в результате к коричневому немного вязкому раствору с сильным характерным ароматом. Испытание восприимчивости было повторено как приведено выше.

Как было ранее отмечено с присутствием CHD-FA, 4%, 2% и 1% растворы ингибировали рост *Candida albicans* в течение по меньшей мере 24 часов при объединении с 1 X RPMI 1640 питательной средой, рост в 0.5% CHD-FA происходит при подобных уровнях для управляющих воздействий на растворение. Могло быть обнаружено отсутствие синергии или антагонизм с флуконазолом.

МИК отягощений *Candida albicans* с и без CHD-FA перечислены в Таблице 4 (pH CHD-FA был подогнан до 7.0).

<i>Candida</i> Отягоще- ние	2% CHD-FA	1% CHD-FA	0.5% CHD-FA	0.25% CHD-FA	0.125% CHD-FA	Растворитель
1	Нет роста	Нет роста	16	16	16	128
2	Нет роста	Нет роста	32	16	16	16
3	Нет роста	Нет роста	2	16	16	16
4	Нет роста	Нет роста	32	32	32	32
5	Нет роста	Нет роста	32	32	16	16

## 3.4 МЕТОДЫ - Главный эксперимент

### 3.4.1 Грибковые культуры

Тесты на восприимчивость были выполнены на 40 донорских штаммах *Candida*, среди которых 38 имели уменьшенную восприимчивость к флуконазолу. Группа содержала 25 *C. albicans*, 11 *C. glabrata* (все с уменьшенной восприимчивостью к

флуконазолу) и 4 *C.tropicalis* (все с уменьшенной восприимчивостью к флуконазолу). Каждая культура была выращена на агаре Сабуро при 37°C в течение 48 ч для обеспечения чистоты.

#### 3.4.2 Среда

5 Как обозначено в 3.2.2.

#### 3.4.3 Приготовление инокулята

Как обозначено в 3.2.3.

#### 3.4.4 Испытание на патологические состояния

10 Стерильные пластмассовые пластины одноразового действия для микротитрования с 96 плоскодонными колодцами были использованы.

##### ЭТАП 1 Добавление флуконазола

а) Колонка 1 панели микротитрования была заполнена 100 мкл стерильной воды, которая содержит четыре значения финальной концентрации препарата (512 мг/л флуконазол).

15 б) Колонки 2-12 были заполнены 50 мкл дистиллированной воды.

с) Количества 50 мкл были взяты из лунок в колонке 1 и вдвойне растворены посредством перемещения их в колонку 2 при помощи многоканальной пипетки ( $\pm 2\%$  коэффициент вариации). 50 мкл образцов были затем удалены из колонки 2 и перемещены в колонку 3 и так далее до колонки 10. Последние 50 мкл растворенного препарата  
20 затем выбрасывают. Таким образом, каждая лунка в колонках 1-10 будет содержать 50 мкл воды, содержащей четыре значения финальных концентраций противогрибкового препарата.

##### ЭТАП 2 Добавление CHD-FA

25 Маточные растворы CHD-FA были произведены с содержанием 4%, 2% (также 1% и 0.5% для *Candida parapsilosis* и *Candida krusei*). 100 мкл растворенного CHD-FA было добавлено к панелям микротитрования таким образом, что ряды содержали финальные растворы.

Для *Candida albicans* и *tropicalis*: 1-й ряд пары 0.5% CHD-FA, 2-ной ряд пары только растворитель.

30 Для *Candida glabrata*: 1-й ряд тройки 1% CHD-FA, 2-ной ряд тройки 0.5% CHD-FA, 3-й ряд тройки только растворитель.

Для *Candida parapsilosis* и *Candida krusei* ряды включали 2%, 1%, 0.5%, 0.25 и 0.125% CHD-FA и ряд только растворителя.

35 Все приведенные выше концентрации были перемешаны с фиксированной концентрацией флуконазола при 128, 32, 8, 2, 0.5 мг/л и растворителем для оценки синергии/антагонизма.

##### ЭТАП 3 Добавление *Candida spp*

40 50 мкл растворенной суспензии *Candida spp* в 4 x RPMI было добавлено ко всем клеткам. Это производит лунки, содержащие 200 мкл финального объема (состоящий из 50 мкл растворенного флуконазола, 100 мкл растворенного CHD-FA или разбавителя, 50 мкл 4 X RPMI, содержащие *Candida*).

##### ЭТАП 4 Инкубирование пластин

Все пластины были инкубированы при 37°C в воздухе в затемненном инкубаторе.

##### ЭТАП 5 Считывание пластин

45 Пластины были прочитаны визуально с конечной точкой, которая была взята в виде самой низкой концентрации препарата, который ингибировал рост на 50% по отношению к такому же без медикаментозного контроля.

### 3.5. РЕЗУЛЬТАТЫ - Главный эксперимент

Результаты в итоге суммированы в Таблицах 5-10.

Никакого разрастания *Candida* не происходило при длительной инкубации (96 часов) при 37°C или комнатной температуре.

5

Таблица 5  
Эффективность CHD-FA (0.5%) в комбинации с флуконазолом по отношению к *Candida albicans*

Вид изолята	Номер изолята	Флуконазол МИК (мг/л) в одиночку	Флуконазол МИК с 0.5% CHD-FA
C. Albicans	1	128	Нет роста
C. Albicans	2	8	Нет роста
C. Albicans	3	16	Нет роста
C. Albicans	4	4	Нет роста
C. Albicans	5	128	Нет роста
C. Albicans	6	>128	Нет роста
C. Albicans	7	128	Нет роста
C. Albicans	8	128	Нет роста
C. Albicans	9	64	Нет роста
C. Albicans	10	128	Нет роста
C. Albicans	11	0.5	Нет роста
C. Albicans	12	64	Нет роста
C. Albicans	13	0.5	Нет роста
C. Albicans	14	32	Нет роста
C. Albicans	15	2	Нет роста
C. Albicans	16	64	Нет роста
C. Albicans	17	>128	Нет роста
C. Albicans	18	>128	Нет роста

10

15

20

25

Вид изолята	Номер изолята	Флуконазол МИК (мг/л) в одиночку	Флуконазол МИК с 0.5% CHD-FA
C. Albicans	19	0.5	Нет роста
C. Albicans	20	>128	Нет роста
C. Albicans	21	4	Нет роста
C. Albicans	22	2	Нет роста
C. Albicans	23	1	Нет роста
C. Albicans	24	1	Нет роста
C. Albicans	25	>128	Нет роста

30

Таблица 6  
Эффективность CHD-FA (0.5%) в комбинации с флуконазолом по отношению к *Candida glabrata*

Вид изолята	Номер изолята	Флуконазол МИК (мг/л) в одиночку	Флуконазол МИК с 0.5% CHD-FA
C. glabrata	1	>128	>128
C. glabrata	2	>128	>128
C. glabrata	3	>128	>128
C. glabrata	4	>128	>128
C. glabrata	5	>128	Признаки роста
C. glabrata	6	>128	>128
C. glabrata	7	>128	>128
C. glabrata	8	>128	>128
C. glabrata	9	>128	>128
C. glabrata	10	>128	>128
C. glabrata	11	>128	>128

35

40

45

Таблица 7  
Эффективность CHD-FA (1%) в комбинации с флуконазолом по отношению к *Candida glabrata*

Вид изолята	Номер изолята	Флуконазол МИК (мг/л) в одиночку	Флуконазол МИК с 0.5% CHD-FA
C. Glabrata	1	>128	Нет роста
C. Glabrata	2	>128	Нет роста
C. Glabrata	3	>128	Нет роста

	C. Glabrata	4	>128	Нет роста
	C. Glabrata	5	>128	Нет роста
	C. Glabrata	6	>128	Нет роста
	C. Glabrata	7	>128	Нет роста
5	C. Glabrata	8	>128	Нет роста
	C. Glabrata	9	>128	Нет роста
	C. Glabrata	10	>128	Нет роста
	C. Glabrata	11	>128	Нет роста

Таблица 8

Эффективность CHD-FA (0.5%) в комбинации с флуконазолом по отношению к *Candida tropicalis*

Вид изолята	Номер изолята	Флуконазол МИК (мг/л) в одиночку	Флуконазол МИК с 0.5% CHD-FA
C. Tropicalis	1	16	Нет роста
C. Tropicalis	2	>64	Нет роста
C. Tropicalis	3	16	Нет роста
C. Tropicalis	4	16	Нет роста

Таблица 9

Эффективность CHD-FA (0.5%) в комбинации с флуконазолом по отношению к *Candida parapsilosis*

Вид изолята	Номер изолята	Флуконазол МИК (мг/л) в одиночку	Флуконазол МИК с 0.5% CHD-FA	CHD-FA (%) без флуконазола
C parapsilosis	1	8	Нет роста	0.25
C parapsilosis	2	2	Нет роста	0.5
C parapsilosis	3	8	Нет роста	0.5
C parapsilosis	4	8	Нет роста	0.5
C parapsilosis	5	8	Нет роста	0.5

Таблица 10

Эффективность CHD-FA (0.5%) в комбинации с флуконазолом по отношению к *Candida krusei*

Вид изолята	Номер изолята	Флуконазол МИК (мг/л) в одиночку	Флуконазол МИК с 0.5% CHD-FA	CHD-FA (%) без флуконазола
C. krusei	1	32	Нет роста	0.25
C. krusei	2	32	Нет роста	0.5
C. krusei	3	32	Нет роста	0.25
C. krusei	4	32	Нет роста	0.5
C. krusei	5	32	Нет роста	0.5

### 3.6 КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

- CHD-FA является одинаково эффективен как противогрибковый агент *in vitro* как то при исследовании при присущем ему pH 2.1 или буферизованном до pH 7.0.

- CHD-FA ингибирует рост *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* и *Candida krusei* при использовании в виде 0.5% *in vitro*.

- CHD-FA ингибирует рост *Candida glabrata* при использовании в виде 1% раствора.

- Комбинация 1% CHD-FA с флуконазолом (0.25-128 мг/л) ингибирует рост всех протестированных изолятов *Candida*.

- CHD-FA является очень эффективным по отношению к отягощениям *C. krusei*, которые по своей природе являются устойчивыми к флуконазолу.

### Формула изобретения

1. Композиция, содержащая комбинацию:

(а) фульвой кислоты или ее соли, и

(б) противогрибкового соединения, выбранного из флуконазола и амфотерицина

В,



для применения в методе лечения грибковой инфекции человеческого тела или тела животного, метод включает введение объекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества композиции.

2. Композиция по п.1, в которой фульвовая кислота представляет собой СНD-FA.

5 3. Композиция по п.1, в которой соль содержит соль натрия или калия.

4. Композиция по п.1, содержащая около 10 мл/кг раствора от около 0.25% до около 1% (мас./об.) фульвовой кислоты или ее соли и около 10 мг/кг флуконазола.

5. Композиция по п.1, содержащая 0.25% (мас./об.) раствора фульвовой кислоты или ее соли и от около 0.06 мг/л до около 0.5 мг/л амфотерицина В.

10 6. Композиция по п.1, в форме жидкости, таблетки, капсулы или т.п.

7. Композиция по п.1, которая вводится посредством перорального введения.

8. Композиция по п.1, которая вводится посредством местного применения.

9. Композиция по п.1, которая вводится в форме крема, мази или жидкости.

15 10. Композиция по п.1, в которой грибковая инфекция вызвана устойчивым к препарату грибом.

11. Композиция по п.1, в которой животное или человек является иммуносупрессивным или с ослабленным иммунитетом.

20

25

30

35

40

45

