



УКРАЇНА

(19) **UA**(11) **124661**(13) **C2**

(51) МПК

A61K 31/145 (2006.01)**A61K 31/7036** (2006.01)**A61P 31/04** (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2017 00511	(72) Винахідник(и):	О'Ніл Дебора (GB), Керріер Седрік (GB)
(22) Дата подання заявки:	14.12.2011	(73) Володілець (володільці):	НОВАБАЙОТІКС ЛІМІТЕД, The Cruickshank Building, Craibstone, Aberdeen AB21 9TR, United Kingdom (GB)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності:	28.10.2021	(74) Представник:	Крилова Надія Іванівна, реєстр. №30
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	1021186.0, 61/423,000	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 2007/101560 A1, 13.09.2007 WO 2007/050565 A2, 03.05.2007 WO 2010/112848 A2, 07.10.2010
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	14.12.2010, 14.12.2010		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	GB, US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	28.08.2017, Бюл.№ 16		
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію:	27.10.2021, Бюл.№ 43		
(62) Номер та дата подання попередньої заявки, з якої виділено заявку, позначену кодом (21):	, a201308670, 14.12.2011		

(54) КОМПОЗИЦІЯ, ЩО МІСТИТЬ АНТИБІОТИК ТА ДИСПЕРГАТОР АБО АНТИАДГЕЗИВНИЙ АГЕНТ**(57) Реферат:**

Винахід стосується продуктів для профілактики та лікування інфекцій, що містить синергетично ефективну кількість (i) антибіотичного агента та (ii) цистеаміну, де антибіотичним агентом є непептидний антибіотик, за винятком тобраміцину, гентаміцину або ципрофлоксацину, або антибіотичним агентом є пептидний антибіотик, за виключенням колістину.

UA 124661 C2

Винахід стосується продуктів, композицій, способів та застосування, які є корисними відносно попередження та лікування бактеріальних інфекцій.

Антибіотики широко застосовують, як в медицині/ветеринарії, а також у сільському господарстві, що призвело до зростання проблеми щодо медикаментозної резистентності до існуючих антибіотиків. Це особливо стосується інфекційних станів або захворювань, які лікують одним антибіотиком (відоме ще як монотерапія). В зв'язку з цим, існує значна потреба не тільки в ефективних та безпечних нових способах лікування, але й тих, які матимуть механізм дії, що мінімізує або усуває ризик можливого розвитку медикаментозної резистентності в популяціях цільових патогенів, та в терапії, яку можуть застосовувати в комбінації з іншими способами лікування з метою мінімізації можливості резистентності та розширення доцільності застосування існуючих антимікробних засобів.

Бактеріальні інфекції збагачених слизом середовищ, таких як легені, є характерними в захворюваннях, таких як муковісцидоз (CF). Однак, традиційні антибіотики не схильні добре працювати в таких середовищах, та їх антибактеріальна ефективність є в значній мірі зниженою при застосуванні в таких середовищах.

Мікробна біоплівка представляє собою спільноту мікробних клітин, вбудованих в позаклітинний матрикс полімерних речовин та є адгезивною до біологічної або не біотичної поверхні. Ряд мікроорганізмів (бактерії, гриби та/або найпростіші, асоційовані з бактеріофагами та іншими вірусами) може бути знайдений в цих біоплівках. Біоплівки є широко розповсюдженими в природі, які, як правило, зустрічаються в широкому діапазоні умов. Біоплівки є все більше загально визнаними в науковому та медичному співтоваристві, як безпосередньо пов'язані з багатьма інфекціями, та особливо їх внесок в резистентність лікування інфекцій.

Біоплівки представляють собою етіологічні фактори для ряду хворобливих станів у ссавців та є залученими у 80 % інфекцій у людей. Приклади включають інфекції шкіри та ран, інфекції середнього вуха, інфекції шлунково-кишкового тракту, інфекції перитонеальної мембрани, сечостатевої інфекції, інфекції м'яких тканин ротової порожнини, утворення зубного нальоту, очні інфекції (включаючи інфікування контактних лінз), ендокардити, інфекції при муковісцидозі та інфекції медичних виробів, що постійно використовуються, таких як протези суглобів, зубні імплантати, катетери та серцеві імплантати.

Планктонні мікроби (тобто, мікроорганізми, суспендовані або які зростають в рідкому середовищі), як правило, застосовують як моделі для дослідження антимікробної чутливості, як описано Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) та European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Мікроби в біоплівках є значно більш резистентними до антимікробного лікування, ніж їх планктонні еквіваленти. Однак, не існує стандартизованого методу вивчення чутливості до антибіотиків біоплівки мікробів.

Формування біоплівки не обмежується виключно здатністю мікробів прикріплюватися до поверхні. Мікроби, що ростуть в біоплівці, здатні взаємодіяти більше один з одним, ніж з фактичним фізичним субстратом, на якому біоплівка початково розвивається. Наприклад, дане явище сприяє кон'югативному перенесенню гена, яке відбувається з більшими швидкостями між клітинами в біоплівці, ніж між планктонними клітинами. Це представляє собою підвищену можливість для горизонтального переносу гена між бактеріями, та є важливим, тому що може сприяти перенесенню резистентності до антибіотиків або вірулентної здатності генів від резистентних до чутливих мікробів. Бактерії можуть взаємодіяти одна з одною за рахунок системи, відомої як бактеріальне відчуття кворуму, за допомогою якої сигнальні молекули вивільняються в навколишнє середовище, та їх концентрацію можуть розпізнавати навколишні мікроби. Бактеріальне відчуття кворуму дає можливість бактеріям координувати свою поведінку, таким чином, підвищуючи їх здатність до виживання. Відповіді на бактеріальне відчуття кворуму включають адаптацію до доступності до поживних речовин, захист від інших мікроорганізмів, які можуть конкурувати за ті самі поживні речовини, та уникнення токсичних сполук потенційно небезпечних для бактерій. Це дуже важливо для патогенних бактерій під час інфікування господаря (наприклад, людей, тварин або рослин), щоб скоординувати свою вірулентність з метою уникнення імунної відповіді господаря, щоб мати можливість успішно здійснити інфікування.

Формування біоплівки відіграє ключову роль в багатьох інфекційних захворюваннях, таких як муковісцидоз та періодонтит, при інфекціях кровотоку та сечових шляхів, та в результаті присутності медичних виробів, що постійно перебувають в організмі. Запропоновані механізми, за якими мікроорганізми, асоційовані в біоплівку, викликають захворювання у свого господаря, включають наступні: (i) уповільнене проникнення антимікробних агентів через матрицю біоплівки, (ii) відокремлення клітин або клітинних агрегатів від біоплівок медичних виробів, що

постійно перебувають в організмі, (iii) продукування ендотоксинів, (iv) резистентність до імунної системи господаря, (v) забезпечення ніші для генерації резистентних організмів за рахунок горизонтального переносу гена резистентності до антимікробних агентів та/або вірулентної здатності генів, та (vi) змінена швидкість росту (тобто метаболічна сплячка) (Donlan and Costerton, Clin Microbiol Rev 15: 167-193, 2002; Parsek and Singh, Annu Rev Microbiol 57: 677-701, 2003; Costerton JW, Resistance of biofilms to stress. In The biofilm primer'. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 56-64.2007).

Недавні експериментальні дані показали існування в біоплівках невеликої під-популяції спеціалізованих неметаболізуючих персистуючих клітин (сплячих клітин). Вважають, що клітини можуть бути відповідальними за високу резистентність/толерантність біоплівки до антимікробних агентів. Толерантні до багатьох лікарських засобів персистуючі клітини є присутніми як в планктонних популяціях, так і в популяціях біоплівки, та припускається, що дріжджі та бактерії розвивалися за аналогічними стратегіями, які визначають функцію виживання в даній під-популяції. Захист, що пропонується полімерною матрицею, дозволяє персистуючим клітинам уникати знищення та служити як джерело для повторного заселення. Існує доказ, що персистери в значній мірі можуть бути відповідальними за толерантність до багатьох лікарських засобів мікробної біоплівки (LaFleur et al., Antimicrob Agents Chemother. 50: 3839-46, 2006; Lewis, Nature Reviews Microbiology 5, 48-56 2007).

В цьому відношенні залишається необхідність в кращій терапії для лікування та попередження бактеріальних інфекцій, зокрема тих, які асоційовані з муколітичними середовищами, такими як CF легені. Крім того, залишається необхідність в обмеженні кількості та доз антибіотиків, які застосовують при введенні нових, замісних терапій або додаткового лікування, які можуть покращити ефективність існуючих лікувальних процедур в процесі лікування або попередження бактеріальних інфекцій, зокрема біоплівковому оточенні.

Відповідно до першого аспекту за представленим винаходом передбачається продукт, що містить антибіотичний агент та другий агент, який є диспергуючим або антиадгезивним агентом, зокрема муколітичним диспергуючим або муколітичним антиадгезивним агентом.

Відповідно до одного втілення, другий агент може мати антимікробну активність. Альтернативно, другий агент може не мати притаманну пряму активність.

Винахід включає фармацевтичні продукти, що містять, щонайменше, один антибіотичний агент та, щонайменше, один диспергуючий або, щонайменше, один антиадгезивний агент, зокрема муколітичний диспергуючий або муколітичний антиадгезивний агент.

Крім того, передбачається продукт, описаний вище, для терапевтичного застосування.

Відповідно до наступного аспекту, за представленим винаходом передбачається продукт для застосування в лікуванні або попередженні бактеріальної інфекції.

Бактеріальна інфекція може бути розсіяною планктонною бактеріальною інфекцією або, зокрема, бактеріальною біоплівкою.

Крім цього, передбачається спосіб попередження або лікування бактеріальної інфекції, який включає стадії введення терапевтичної ефективної кількості продукту за винаходом пацієнту, що цього потребує. Антибіотичний агент та диспергуючий або антиадгезивний агент можуть вводити комбінованим або послідовним способом.

Детальний опис винаходу

Продукт

Відповідно до першого аспекту, за представленим винаходом передбачається продукт, що містить антибіотичний агент та другий агент, який є диспергуючим або антиадгезивним агентом.

Відповідно до одного втілення, антибіотик є непептидним антибіотиком. Переважно, продукт за представленим винаходом не містить ніяких пептидів.

Продукти за представленим винаходом є ефективними в лікуванні та попередженні бактеріальних інфекцій, включаючи бактеріальні інфекції муколітичного середовища. Такі стани є, як правило, дуже складними для лікування, так як традиційні антибіотики є менш ефективними в таких середовищах. До того ж, агенти продукту за представленим винаходом, як правило, синергетично поєднуються, забезпечуючи несподівано високу антибактеріальну активність. Таким чином мінімізується необхідна кількість антибіотику. Альтернативно, агенти продукту за представленим винаходом можуть поєднуватися адитивно.

Продукти мають перевагу в тому, що вони демонструють антибактеріальну активність щодо встановлених бактерійних колоній, у тому числі персистуючих клітин, присутніх в бактеріальних колоніях, таких як бактеріальні біоплівки, що є важливим кроком на шляху до знищення біоплівки.

Синергетичний ефект

Несподівано виявлено, що антибактеріальна дія антибіотичного агента та диспергуючого або антиадгезивного агента, як правило, синергетично підвищується при комбінації.

Фракційна інгібуюча концентрація (FIC) відповідає коефіцієнта взаємодії, що показує, чи є комбінація антибактеріальних агентів синергетичною, адитивною, антагоністичною або нейтральною. FIC визначають шляхом порівняння активності агента в комбінації (MIC агента A + агента B) з активністю препарату окремо (MIC агента A або агента B) як наведено далі (Singh et al., 2000):

$$FIC = MIC_{A[\text{комбінація}]} / MIC_{A[\text{окремо}]} + MIC_{B[\text{комбінація}]} / MIC_{B[\text{окремо}]}$$

Аддитивні комбінації двох антимікробних агентів позначають за допомогою FIC індексу, що дорівнює 1, тоді як FIC індекс < 1 показує синергетичні комбінації. Нейтральні комбінації дають FIC від 1 до 4, FIC індекс вищий, ніж 4 показує антагоністичні ефекти між двома антимікробними агентами.

Як правило, FIC індекс комбінації компонентів продукту за представленим винаходом становить менше ніж 1, як правило, менше ніж 0,9, прийнятно, менше ніж 0,8, переважно, менш ніж або близько 0,75, наприклад, менше ніж або близько 0,5.

Альтернативно, FIC індекс комбінації компонентів продукту за представленим винаходом може бути більше ніж 1; як правило, від 1 до 2; зазвичай від 1 до 1,5, прийнятно, від 1 до 1,2.

В муколітичних середовищах традиційні антибіотики, такі як тобраміцин, колістин, гентаміцин або ципрофлоксацин не демонструють такий самий рівень антибактеріальної активності, як у випадку коли вони діють поза муколітичними середовищами. Несподівано, антибактеріальна активність таких традиційних антибіотиків зростає при введенні диспергуючого або антиадгезивного агента, такого як цистеамін. Антибіотики та антиадгезивний або диспергуючий агент діють синергетично та, коли введені разом або послідовно, антибактеріальна активність активних агентів є набагато вищою, ніж коли вони введені окремо.

Як правило, антибактеріальна активність продукту за представленим винаходом є, щонайменше, вдвічі більшою, ніж антибактеріальна активність антибіотичного агента окремо, зазвичай антибактеріальна активність продукту за представленим винаходом є, щонайменше, в чотири рази вищою, ніж у антибіотичний агента окремо, прийнятно, щонайменше, у вісім разів вищою, переважно, щонайменше, або приблизно у десять разів вищою.

Як правило, мінімальна інгібуюча концентрація (MIC) продукту за представленим винаходом є, щонайменше, вдвічі нижчою, ніж MIC антибіотичного агента окремо відносно до бактеріального патогена, прийнятно, щонайменше, в чотири рази нижчою, зазвичай, щонайменше, у вісім разів нижчою, переважно, щонайменше, або приблизно у десять разів нижчою.

Для одержання синергетичного ефекту агентів продукту за представленим винаходом їх можуть вводити разом або послідовно, переважно не більше 10 хвилин між введеннями.

Антибіотичний агент

Термін "антибіотик" застосовують відносно антибактеріальних агентів, що можуть бути одержані з бактеріальних джерел. Антибіотичні агенти можуть бути бактерицидними та/або бактеріостатичними.

Як правило, антибіотичний агент представляє собою групу, що складається з аміноглікозидів, ансаміцинів, карбацефема, карбапенемів, цефалоспоринів (включаючи цефалоспорини першого першого, другого, третього, четвертого та п'ятого покоління), лінкозамідів, макролідів, монобактамів, нітрофуранів, хінолонів, пеніцилінів, сульфаніламідів, поліпептидів та тетрациклінів. Альтернативно або додатково антибіотичний агент може бути ефективним проти мікобактерій.

Відповідно до одного втілення, антибіотичний агент може бути аміноглікозидом, таким як амікацин, гентаміцин, канаміцин, неоміцин, нетилміцин, тобраміцин або паромоміцин.

Відповідно до одного втілення, антибіотичний агент може бути таким як гелданаміцин та гербіміцин.

Альтернативно, антибіотичний агент може бути карбацефемом, таким як лоракарбеф.

Відповідно до наступного втілення, антибіотичний агент є карбапенемом, таким як ертапенемом, доріпенемом, іміпенемом/циластатином або меропенемом.

Альтернативно, антибіотичний агент може бути цефалоспоринами (першого покоління), такими як цефадроксил, цефазолін, цефалексин, цефалотин або цефалотін, або, альтернативно, цефалоспоринами (другого покоління), такими як цефаклор, цефамандол, цефокситин, цефпрозил або цефуросксим. Альтернативно, антибіотичний агент може бути цефалоспоринами (третього покоління), такими як цефіксим, цефдинір, цефдиторен, цефоперазон, цефотаксим, цефподоксим, цефтибутен, цефтизоксим, цефтріаксон, або цефалоспоринами (четвертого покоління), такими як цефепім та цефтобіпрол.

Антибіотичний агент може бути лінкозамидами, такими як кліндаміцин та азитроміцин, або макролідами, такими як азитроміцин, кларитроміцин, діритроміцин, еритроміцин, рокситроміцин, тролеандоміцин, телітроміцин та спектиноміцин.

Альтернативно, антибіотичний агент може бути монобактамами, такими як азтреонам, або нітрофураном, таким як фуразолідон або нітрофурантоїн.

Антибіотичний агент може бути пеніциліном, таким як амоксицилін, ампіцилін, азлоцилін, карбеніцилін, клоксацилін, диклоксацилін, флуклоксацилін, мезлоцилін, нафцилін, оксацилін, пеніцилін G або V, піперацилін, темоцилін та тікарцилін.

Антибіотичний агент може бути сульфаніламідом, таким як мафенід, сульфонамідокризоїдин, сульфацетамід, сульфадіазин, сульфадіазин срібла, сульфаметизол, сульфаметоксазол, сульфанілімід, сульфасалазин, сульфізоксазол, триметоприм та триметоприм-сульфаметоксазол (ко-тримоксазол) (TMP-SMX).

Антибіотичний агент може бути хінолоном, таким як ципрофлоксацин, еноксацин, гатифлоксацин, левофлоксацин, ломефлоксацин, моксифлоксацин, налідиксова кислота, норфлоксацин, офлоксацин, тровафлоксацин, грепафлоксацин, спарфлоксацин та темафлоксацин.

Відповідно до одного втілення, антибіотичний агент може бути поліпептидом, таким як бацитрацин, колістин та поліміксин В.

Альтернативно, антибіотичний агент може бути тетрацикліном, таким як демеклоциклін, доксициклін, міноциклін та окситетрациклін.

Альтернативно або додатково антибіотичний агент може бути ефективним проти мікобактерій.

Зокрема антибіотичний агент може бути клофазиміном, лампреном, дапсоном, капреоміцином, циклосерином, етамбутолом, етіонамідом, ізоніазидом, піразинамідом, рифампіцином, рифабутином, рифапентином або стрептоміцином.

Як правило, антибіотичний агент є активним в лікуванні або профілактиці інфекцій, які викликаються грам-негативними або грам-позитивними бактеріями, такими як *Escherichia coli* та *Klebsiella*, зокрема *Pseudomonas aeruginosa*.

Другий агент

Другий агент може бути вибраний з диспергуючого або антиадгезивного агента. Зокрема, другий агент вибирають з муколітичного диспергуючого або муколітичного антиадгезивного агента. Другим агентом може бути будь-який агент, який інгібує формування бактеріальної колонії, зокрема будь-який агент, який інгібує формування біоплівки. Як приклад, другий агент може інгібувати бактеріальну адгезію, гідрофобність або продукування слизу.

Відповідно до одного втілення за представленим винаходом другий агент не є пептидом.

Мається на увазі, що термін "диспергуючий агент" включає будь-який агент, здатний диспергувати бактеріальні частинки, таким чином інгібуючи утворення бактеріальних колоній. Зокрема, диспергуючий агент може диспергувати частинки бактеріальної біоплівки. Диспергуючий агент може сприяти дисперсії слизу, що продукується бактеріальними мікробами, слизової, яка утворює частину біоплівки, наприклад слиз, що продукується клітинами, до яких мікроби біоплівки прилипають, та біоплівки бактерій.

Диспергуючий агент може бути муколітичним агентом. Муколітичний агент може бути ферментом, наприклад, ДНКазою, алгіназою, протеазою або карбоногідроазою. Альтернативно, муколітичний агент може бути малою молекулою, наприклад аміном, таким як амінотіол або кислота, така як етилендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТО). Амін можуть вибирати з ацетилцистеїну та цистеаміну, переважно цистеаміну.

Мається на увазі, що термін "антиадгезивний агент" включає будь-який агент, здатний інгібувати адгезію між клітинами, протеїнами та організмами, наприклад, мікробами, тим самим запобігаючи формуванню бактеріальної колонії, зокрема утворенню бактеріальної біоплівки або сприяючи самознищенню біоплівки. Зокрема, антиадгезивний агент може запобігти адгезії до поверхні або субстрату всіх типів клітин, що зустрічаються в мікробній біоплівці, зокрема мікроби, що вільно живуть, тобто планктонні клітини. Антиадгезивні агенти можуть включати, але не обмежуються цим, гіалуронову кислоту, гепарин або карбопол 934.

Другий антибіоплівковий агент може бути антибактеріальним агентом. Антибактеріальний агент може бути муколітичним агентом, що проявляє як муколітичну, так і антибактеріальну активність. Переважно, антибактеріальний агент є цистеаміном.

Фармацевтичний продукт

Зазначені вище активні агенти можуть вводити у вигляді вільних або фіксованих комбінацій. Вільні комбінації можуть бути представлені у вигляді комплектів комбінації, що містить всі активні агенти у вільних комбінаціях. Фіксовані комбінації часто є таблетками або капсулами.

Агенти за винаходом можуть вводити у формі фармацевтично прийнятних солей. Фармацевтично прийнятні солі за представленим винаходом можуть бути синтезовані з початкової сполуки, яка містить основний або кислотний фрагмент за традиційними хімічними способами. Як правило, такі солі можуть одержувати шляхом взаємодії вільних кислотних або основних форм цих сполук із стехіометричною кількістю відповідної основи або кислоти у воді або органічному розчиннику, або в суміші з двох; зазвичай, неводних середовищ, переважно, подібних етеру, етилацетату, етанолу, ізопропанолу або ацетонітрилу. Перелік прийнятних солей зазначено в Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., US, 1985, p. 1418, розкриття яких є включеним таким чином у вигляді посилання; дивись також Stahl et al, Eds, "Handbook of Pharmaceutical Salts Properties Selection and Use", Verlag Helvetica Chimica Acta and Wiley-VCH, 2002. Вираз "фармацевтично прийнятний", як застосовують в даному документі, стосується таких сполук, речовин, композицій та/або дозованих форм, які є, в межах медичної точки зору, прийнятними для застосування, будучи в контакті з тканинами людини, або, може бути як випадок, тварини без надмірної токсичності, подразнення, алергічної реакції або іншої проблеми або ускладнення, пропорційно з доцільним співвідношенням перевага/ризик.

Таким чином, винахід включає фармацевтично прийнятні солі розкритих сполук, де початкова сполука є модифікованою шляхом утворення їх кислотних або основних солей, наприклад, традиційні нетоксичні солі або кватернізовані амонійні солі, які утворюються, наприклад, з неорганічних або органічних кислот або основ. Приклади таких кислотних адитивних солей включають ацетат, адипат, альгінат, аспартат, бензоат, бензолсульфонат, бісульфат, бутират, цитрат, камфорат, камфорсульфонат, циклопентанпропіонат, диглюконат, додецилсульфат, етансульфонат, фумарат, глюкогептаноат, гліцерофосфат, гемісульфат, гептаноат, гексаноат, гідрохлорид, гідробромід, гідройодид, 2-гідроксіетансульфонат, лактат, малеат, метансульфонат, 2-нафталінсульфонат, нікотинат, оксалат, памоат, пектинат, персульфат, 3-фенілпропіонат, пікрат, півалат, пропіонат, сукцинат, тартрат, тіоціанат, тозилат та ундеканат. Основні солі включають амонійні солі, солі лужних металів, такі як солі натрію та калію, солі лужноземельних металів, таких як солі кальцію та магнію, солі органічних основ, такі як солі дициклогексиламіну, N-метил-D-глюкаміну, та солі з амінокислотами, такими як аргінін, лізин тощо. Крім того, основні азотовмісні групи можуть бути кватернізовані такими агентами, як нижчі алкілгалогеніди, такі як метил-, етил-, пропіл- та бутілхлорид, броміди та йодиди, діалкілсульфати, такі як диметил-, діетил-, дибутил- та діамілсульфати, довголанцюгові галогеніди, такі як децил-, лаурил-, міристил- та стеарилхлориди, броміди та йодиди, арилалкілгалогеніди, такі як бензил та фенетилброміди та інші.

Продукти за винаходом

Відповідно до одного втілення, антибіотичний агент продукту за представленим винаходом не містить пептидів. Відповідно, продукт за представленим винаходом не містить пептидів.

Переважний продукт містить непептидний антибіотик та диспергуючий агент, зокрема муколітичний диспергуючий агент, такий як цистеамін.

Відношення антибіотичного агента до другого агента в продуктах за винаходом може становити від 1:10 до 10:1; зазвичай, щонайменше 2:1, наприклад, щонайменше 3:1 або 4:1. Альтернативно, відношення антибіотичного агента до другого агента в продуктах за винаходом може становити від 1:100 до 1:2000, наприклад від 1:500 до 1:1000. Відповідно до одного втілення, відношення антибіотичного агента до другого агента становить приблизно 1:1. Переважно перший антибіотичний агент є непептидним антибіотиком, та другий агент є цистеаміном, та продукт містить дані компоненти у співвідношенні від 2:1 аж до 4:1. Відповідно до наступного втілення, співвідношення може становити приблизно 1:1.

Активні агенти можуть вводити одночасно, послідовно або окремо. Активні агенти можуть передбачатися як комбінований набір. Комбінований набір може містити продукт за винаходом разом з інструкціями щодо одночасного, окремого або послідовного введення кожного з активних агентів. Для послідовного введення, активні агенти можуть вводити в будь-якому порядку.

Активні агенти продукту за винаходом можуть передбачатися як фармацевтичні композиції, що додатково містять один або більше фармацевтично прийнятних розріджувачів, наповнювачів та/або носіїв. Це застосовують як до фіксованих, так і до вільних комбінацій.

Активні агенти за представленим винаходом можуть вводити будь-яким прийнятним шляхом, відомим кваліфікованому фахівцю в даній галузі з рівня техніки, переважно, в формі фармацевтичної композиції, адаптованої до такого шляху, та в дозі, ефективній для призначеного лікування. Активні сполуки та композицію, наприклад, можуть вводити парентерально, перорально, інтраназально, внутрішньобронхіально, ентерально,

трансдермально, сублінгвально, ректально, вагінально, окулярно або місцево. Розглядається як місцево, так і системне введення.

З метою парентерального введення ("парентеральний" як застосовується в даному документі, стосується способів введення, які включають внутрішньовенне, внутрішньом'язове, ентеральне, внутрішньочеревне, інтратернальне, підшкірне та внутрішньосуглобове ін'єкційне та інфузійне введення, з яких внутрішньовенне (включаючи безперервне внутрішньовенне введення) є найбільш переважним) можуть застосовувати розчини у водному пропіленгліколі, а також стерильні водні розчини відповідних водорозчинних солей. Такі водні розчини можуть бути відповідно забуферизованими, якщо необхідно, та рідкий розріджувач спочатку роблять ізотонічним, використовуючи відповідний сольовий розчин або глюкозу. Ці водні розчини є особливо прийнятними для внутрішньовенних, внутрішньом'язових, підшкірних та внутрішньобрюшинних ін'єкційних цілей. В такому контексті, стерильні водні середовища, що застосовують, є всі такими, що можуть бути легко одержані за стандартними методиками, добре відомими кваліфікованому фахівцю в даній галузі з рівня техніки.

Крім цього, продукти за винаходом можуть вводити інтраназально або шляхом інгаляції, та зручно доставлятися у формі сухого порошкового інгалятора або аерозольного спрейного інгалятора з контейнера під тиском, насоса, розпилювача, атомайзера, небулайзера з або без застосування прийнятного пропіленту.

Альтернативно, продукти за винаходом можуть вводити в формі супозиторію або пессарію, або їх можуть застосовувати місцево в формі гелю, гідрогелю, лосьйону, розчину, крему, мазі або порошку. Продукти за винаходом можуть вводити дермально або трансдермально, наприклад, шляхом застосування шкірного пластиру, накопичувача або підшкірної ін'єкції. Крім того, їх можуть вводити легеневим або ректальним шляхом.

Для перорального введення, фармацевтична композиція може бути в формі, наприклад, таблетки, капсули, суспензії або рідини. Фармацевтичну композицію переважно виробляють в формі дозованої одиниці, що містить конкретну кількість активного інгредієнта. Прикладами таких дозованих одиниць є капсули, таблетки порошки, гранули або суспензії, з традиційними наповнювачами, такими як лактоза, маніт, кукурудзяний крохмаль або картопляний крохмаль; зі зв'язуючими речовинами, такими як кристалічна целюлоза, похідні целюлози, камедь, кукурудзяний крохмаль або желатини; з розпушувачами, такими як кукурудзяний крохмаль, картопляний крохмаль або натрію карбоксиметилцелюлоза; та з лубрикантами, такими як тальк або стеарат магнію. Крім цього, активний інгредієнт можуть вводити шляхом ін'єкції, як композицію, в якій, наприклад, як прийнятний носій можуть застосовувати сольовий розчин, декстрозу або воду.

Крім цього, продукти за винаходом можуть знайти застосування як/в пероральному препараті, в якому продукт формулюють з носієм, наприклад, вибраний з плівок, лейкопластирів, гелів, мікросфер, пастилок, жувальних гумок, засобів для чищення зубів та полоскання рота.

Кількість терапевтично активної сполуки, що вводять та режим дозування лікарського засобу для лікування хворобливого стану за допомогою сполук та/або композицій за даним винаходом, залежить від ряду факторів, включаючи вік, вага, стать та медичний стан суб'єкту, важкості захворювання, шляху та частоти введення, та конкретної сполуки, що застосовують, а також фармакокінетичних властивостей індивідуального лікування, та, таким чином, може варіювати в широких межах. Дозування, зазвичай, буде нижчим, якщо сполуки вводять переважніше місцево, ніж системно, так для переважніше профілактики, ніж для лікування. Таке лікування можна проводити так часто, як необхідно, та протягом періоду часу, який визначається лікуючим лікарем як необхідний. Кваліфікованому фахівцеві в даній галузі буде зрозуміло, що режим дозування або терапевтично ефективна кількість інгібітора, яку вводять, можливо необхідно оптимізувати для кожного індивідууму. Фармацевтичні композиції можуть містити активний інгредієнт в діапазоні від близько 0,1 до 2000 мг, переважно, в діапазоні від близько 0,5 до 500 мг та найбільш переважно від близько 1 до 200 мг. Денна доза може становити від близько 0,01 до 100 мг/кг маси тіла, переважно від близько 0,1 до близько 50 мг/кг маси тіла та найбільш переважно від близько 1 до 20 мг/кг маси тіла. Денну дозу можуть вводити від однієї до чотирьох доз на день.

Продукти за винаходом переважно вводять у дихальні шляхи. Таким чином, представлений винахід, крім того передбачає аерозольні фармацевтичні препарати, що містять продукт за винаходом. Крім цього, передбаченими є небулайзер або інгалятор, що містить продукт за винаходом.

Крім цього, продукти за винаходом можуть бути прийнятними для формулювання дозованих форм з уповільненим вивільненням та їм подібним. Композиції можуть бути сформульовані

таким чином, що вони вивільняють активні агенти, наприклад в певній частині кишкового або дихального тракту, можливо протягом певного періоду часу. Покриття, оболонки та захисні матриці можуть бути виготовлені, наприклад, з полімерних речовин, таких як полілактид-гліколяти, ліпосоми, мікроемульсії, мікрочастинки, наночастинки, або воски. Дані покриття, оболонки та захисні матриці можуть бути застосовані для покриття пристроїв, що постійно перебувають в організмі, наприклад, стентів, катетерів, перитонеальних діалізних труб, дренажних пристроїв, тощо.

Продукти за винаходом можуть включати синергетично ефективні кількості кожного активного агента, визначеного в даному документі. Винахід в наслідок цього включає продукти, що містять синергетично ефективну кількість (i) антибіотичного агента (який може бути непептидним антибіотичним агентом) (ii) другого агента, який, як правило, є цистеаміном. Продукт можуть застосовувати у виробництві лікарського засобу для одночасного, окремого або послідовного введення згаданих агентів у лікуванні мікробної інфекції, наприклад, бактеріальної інфекції. "Синергетично", як використовується в даному документі, може описувати дію двох або більше агентів продукту за винаходом, що працюють разом, щоб одержати ефект більший, ніж очікуваний комбінований ефект від агентів, що застосовують окремо.

В додатковому аспекті за винаходом передбачається субстрат до якого продукт прикладається або прикріплюється. Переважно, субстрат є прийнятним для застосування до ран або доставки до пошкоджених ділянок. Переважно, субстрат забезпечує перенос активних агентів продукту за винаходом із субстрату до поверхні рани, щоб досягти їх антибактеріальний ефект. Субстрат може бути пов'язкою, наприклад, пов'язкою на рану. Пов'язка може містити тканий матеріал або вона може бути матеріалом подібним до колагену. Субстрат може бути в будь-якій формі прийнятній для нанесення на рану, як правило, субстрат може бути в формі гідрогелю, колоїду, мазі, крему, гелю, піни або спрею.

Продукти за винаходом, крім того, можуть знайти застосування як/в дезінфікуючому агенті або біоциді. В даному контексті, фармацевтичні композиції за винаходом можуть застосовувати, або окремо, або в комбінації з іншими дезінфікуючими агентами, до поверхні, що підлягає обробці. Як використовується в даному документі "поверхня, що підлягає обробці" може бути субстратом, як визначено в даному документі, та може включати медичні пристрої та пристрої, що постійно перебувають в організмі, наприклад, стенти, катетери, перитонеальні діалізні труби, дренажні пристрої, протези суглобів, зубні імпланти, тощо.

Способи та застосування

Винахід передбачає спосіб лікування або попередження бактеріальної інфекції. Бактеріальна інфекція може бути, як правило, генералізованою інфекцією або, зокрема, в середовищі багатому на слиз, такому як легень, наприклад, в легені пацієнта, страждаючого на CF або бактеріально-асоційоване хронічне обструктивне захворювання легень (ХОЗЛ). Спосіб за представленим винаходом включає стадію введення в середовище продукту відповідно до винаходу. Спосіб може бути *in vivo* або *ex vivo*.

В середовищах багатих на слиз традиційні антибіотики, такі як тобраміцин, колістин, гентаміцин або ципрофлоксацин, не демонструють такий самий рівень антибактеріальної активності, як у випадку коли вони знаходяться в середовищах з низьким вмістом слизу. Несподівано виявлено, що антибактеріальна активність антибіотиків підвищується при введенні диспергуючого або антиадгезивного агента, такого як цистеамін.

Переважно спосіб включає стадію введення

- антибіотичного агента; та

- другого агента, що є диспергуючим або антиадгезивним агентом, переважно цистеаміном.

Коли спосіб за представленим винаходом застосовують для лікування бактеріальних інфекцій, пов'язаних з CF, антибіотичним агентом переважно є тобраміцин, колістин, гентаміцин або ципрофлоксацин.

Середовище може включати будь-яку бактеріальну інфекцію, включаючи інфекцію, викликану більш ніж одним мікроорганізмом, наприклад, бактеріями та будь-яким одним з грибів, дріжджів, вірусів та найпростіших.

Бактерія може бути грам-позитивною або грам-негативною бактерією. Бактеріальний патоген може бути похідним з бактеріальних видів, вибраних з групи, що складається з: *Staphylococcus* spp., наприклад, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*; *Enterococcus* spp., наприклад, *Enterococcus faecalis*; *Streptococcus pyogenes*; *Listeria* spp.; *Pseudomonas* spp.; *Mycobacterium* spp., наприклад, *Mycobacterium tuberculosis*; *Enterobacter* spp.; *Campylobacter* spp.; *Salmonella* spp.; *Streptococcus* spp., наприклад, *Streptococcus* групи A або B, *Streptococcus pneumoniae*; *Helicobacter* spp., наприклад, *Helicobacter pylori*; *Neisseria* spp., наприклад, *Neisseria gonorrhoea*, *Neisseria meningitidis*; *Borrelia burgdorferi*; *Shigella* spp., наприклад, *Shigella flexneri*;

Escherichia coli; *Haemophilus* spp., наприклад, *Haemophilus influenzae*; *Chlamydia* spp., наприклад *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*; *Francisella tularensis*; *Bacillus* spp., наприклад, *Bacillus anthracis*; *Clostridia* spp., наприклад, *Clostridium botulinum*; *Yersinia* spp., наприклад, *Yersinia pestis*; *Treponema* spp.; *Burkholderia* spp.; наприклад, *Burkholderia mallei* та *B pseudomallei*.

Зокрема бактерія може включати *Pseudomonas* spp., наприклад, *Pseudomonas aeruginosa*; *Staphylococcus* spp., наприклад, *Staphylococcus aureus* та *Staphylococcus epidermidis*; *Haemophilus* spp., наприклад, *Haemophilus influenza*; *Burkholderia* spp., наприклад, *Burkholderia cepacia*; *Streptococcus* spp., *Propionibacterium* spp., наприклад, *Propionibacterium acnes*.

Переважно бактерію вибирають з *Pseudomonas* spp., наприклад, *Pseudomonas aeruginosa*, та *Staphylococcus* spp., наприклад, *Staphylococcus aureus* та *Staphylococcus epidermidis*.

Спосіб за винаходом можуть застосовувати для мінімізації та, переважно, запобігання утворення бактеріальних колоній, зокрема бактеріальних біоплівки в різних середовищах, включаючи, але не обмежуючись цим, побутове, робоче, лабораторне, промислове середовище, водне середовище (наприклад, системи трубопроводів), медичні пристрої, включаючи пристрої, постійно перебуваючи в організмі, такі як визначено в даному документі, стоматологічні пристрої або зубні імпланти, тіло тварини, наприклад, тіло людини.

Спосіб за винаходом, таким чином, можуть застосовувати для ротової порожнини, щоб запобігти утворенню нальоту або карієсу на зубах людини або зубному імплантаті, наприклад зубному протезі.

Спосіб за винаходом можуть застосовувати для запобігання або обмеження формування колонії бактерій. Спосіб за представленим винаходом можуть застосовувати для попередження або лікування бактеріальних інфекцій, в тому числі місцевих інфекцій, інфекцій ротової порожнини та системних інфекцій. Місцеві інфекції можуть включати рани, виразки та пошкодження, наприклад, рани на шкірі, такі як порізи або опіки, та стани, пов'язані з ними.

Інфекції ротової порожнини можуть включати гінгівіт, пародонтит та запалення слизової оболонки.

Системні інфекції можуть включати кістозний фіброз, ХОЗЛ та інші стани, пов'язані з інфекціями слизової оболонки, наприклад, шлунково-кишкового тракту, сечостатевої системи, або іншими респіраторними інфекціями.

Інший аспект даного винаходу стосується способів лікування, попередження або затримки розвитку бактеріальної інфекції у ссавців, особливо людини, шляхом введення ссавцю терапевтично ефективної кількості продукту за винаходом.

Під "ефективною" кількістю або "терапевтично ефективною кількістю" розуміють кількість однієї або більше активних речовин, яка, в межах медичної точки зору, є достатньою для забезпечення бажаного ефекту без надмірної токсичності, подразнення, алергічної реакції або іншої проблеми або ускладнення, у відповідності з прийнятним співвідношенням користь/ризик.

Таким чином, продукт за винаходом може бути корисним для попередження, уповільнення прогресування або лікування захворювання або стану, вибраного з групи, що складається зі шкірних та ранових інфекцій, інфекцій середнього вуха, інфекцій шлунково-кишкового тракту, інфекцій перитонеальної мембрани, сечостатевих інфекцій, інфекцій м'яких тканин ротової порожнини, утворення зубного нальоту, очних інфекцій (включаючи забруднення контактної лінзи), ендокардит, інфекцій при муковісцидозі та інфекцій медичних пристроїв, що постійно перебувають в організмі, таких як описані в даному документі.

Винахід, крім того, включає способи лікування, за яким продукт за винаходом вводять ссавцю, разом з одним або більше інших антибактеріальних агентів, наприклад, антибіотиком. Як правило, продукт за винаходом та будь-яка композиція за представленим винаходом не містять ніяких пептидів.

Активні агенти, згадані в цьому описі, можуть існувати в різних формах, таких як, наприклад, вільні кислоти, вільні основи, естери та інші проліки, солі та таутомери, та винахід включає всі варіантні форми агентів.

По всьому опису та формулі даної заявки одиниця охоплює множину, якщо контекст не вимагає іншого. Зокрема, якщо використовується невизначений артикль, слід розуміти, що опис передбачає множину, а також одиницю, якщо контекст не вимагає іншого.

Слід розуміти, що властивості, цілі числа, характеристики, сполуки, хімічні фрагменти або групи, описані у зв'язку з конкретним аспектом, втіленням або прикладом винаходу, є такими, що застосовують до будь-якого іншого аспекту, втілення або прикладу, описаних в даному документі, якщо несумісні з ним.

По всьому опису та формулі даної заявки, слова "містити" і "включати" та варіації слів, наприклад, "що, містить" та "містить", означає "включаючи, але не обмежуючись цим", та не є

призначеним для (не робить) виключення інших фрагментів, добавок, компонентів, цілих чисел або стадій.

Як правило, термін "приблизно" є призначеним для охоплення діапазону від 10 % або менше будь-якого числового значення, до якого його застосовують.

5 Наступні аспекти та втілення винаходу викладені в нижченаведеному описі та формулі винаходу.

Зараз винахід буде описано за допомогою прикладів з посиланням на наступні креслення, на яких:

10 Фігури 1a та 1b: наведено порівняння антибактеріальної активності тобраміцину та цистеаміну (NM001) щодо планктонних клітин *Pseudomonas*, при введенні окремо та комбінованої форми. NM001 знижує MIC тобраміцину щодо планктонних клітин, щонайменше в 4 рази (фіг. 1b).

15 Фігура 2: наведено порівняння антибактеріальної активності тобраміцину та ципрофлоксацину щодо клітин *Pseudomonas aeruginosa*, що культивуються в середовищі слизу, що відтворюється, яке виявлене при CF легені, при введенні окремо та в комбінації з цистеаміном.

20 Фігура 3: наведено порівняння активності тобраміцину одного та в комбінації з цистеаміном (NM001) щодо клітин *Pseudomonas aeruginosa*, коли вони культивовані в середовищі без слизу та коли вони культивовані в середовищі слизу, що відтворюється, яке виявлене при CF легені (в присутності NaCl та/або муцину). NM001 відновлює активність антибіотиків до традиційних антибіотиків в муколітичному середовищі.

25 Фігура 4: демонструє гістограму порівняння активності антибіоплівки цистеаміну одного та в комбінації з тобраміцином щодо встановленої біоплівки PAO1 *P. aeruginosa*: дослідження відповіді на дозу дозволяло ідентифікацію мінімальної концентрації для знищення біоплівки (MBEC) цистеаміну щодо встановленої біоплівки PAO1 *P. aeruginosa* та кількісне визначення адитивної активності з тобраміцином. MBEC цистеаміну одного становила 1000 мкг/мл та тобраміцин показав MBEC 4 мкг/мл. При комбінованому, однак, загальне знищення біоплівки одержували при концентрації 500 мкг/мл цистеаміну та 1 мкг/мл тобраміцину. Таким чином, фракційна інгібуюча концентрація (FIC) такої комбінації становить 0,75, що вказує на адитивність між двома антимікробними агентами. Таким чином, муколітичний/антимікробний агент цистеамін, має потенціал, що підвищує активність антибіоплівки традиційних антибіотиків, які можуть відігравати роль у зниженні поширення антимікробної резистентності та і витрат на лікування.

35 Фігура 5: показує графік після-антимікробного ефекту цистеаміну (NM001) в комбінації з тобраміцином (EC) порівняно з біоплівкою PAO1 *P. aeruginosa*.

40 Фігура 6: показує графік, який демонструє, що цистеамін (NM001) покращує антимікробну активність тобраміцину щодо резистентності *Burkholderia ceracia* NCTC10743 до багатьох лікарських засобів. Адитивна антимікробна активність цистеаміну та тобраміцину, крім того, була визначена щодо резистентного до багатьох лікарських засобів штаму *Burkholderia ceracia* NCTC10743. MIC₁₀₀ тобраміцину була вищою, ніж 16 мкг/мл, тоді як цистеамін показав MIC₁₀₀ при 500 мкг/мл. При комбінованому разом, цистеамін зміг підвищити активність тобраміцину та його MIC₁₀₀ становив 0,25 мкг/мл в комбінації з 250 мкг/мл цистеаміну. Це призводить до того, що FIC індекс є меншим, ніж 0,51, що демонструє, щонайменше, адитивну антимікробну активність та можливо синергію між цими двома сполуками.

45 Фігура 7: показано гістограму, яка демонструє антимікробну активність тобраміцину та цистеаміну щодо планктонних клітин PAO1 *P. aeruginosa* окремо та в комбінації в фізіологічно характерних концентраціях, як виявлено в легенях пацієнтів на муковісцидоз (CF). Антимікробну активність (MIC₁₀₀) цистеаміну порівнювали в нормальному стані (як описано в CLSI M7-A7 способі - див. Додаток 1) та в присутності 150 mM хлориду натрію (NaCl), 1,7 mM хлориду кальцію (CaCl₂), 1 мг/мл ДНК або 1 % (мас/об.) свинячого шлункового муцину в трьох повторах, в 96-лункових планшетах. Зростання бактерій спостерігали протягом наступного 24 годинного періоду та поглинання зчитували, використовуючи мікротитрований планшетний рідер БіоТек на 625 нм. Загальне інгібування бактеріального росту зберігалось в присутності NaCl, CaCl₂ або ДНК, та в два рази нормального MIC₁₀₀. У присутності муцину. Активність тобраміцину пригнічувалась в присутності двовалентного катіону Ca²⁺ та в присутності аніонного полімеру ДНК. Коли комбінований з цистеаміном, активність тобраміцину зберігалась за всіх досліджених умов при концентраціях аж до в 4 рази вищих за їх нормальний MIC.

60 Фігура 8: є гістограмою, яка показує муколітичну активність цистеаміну в порівнянні з іншими руйнівниками дисульфідних зв'язків та муколітичними агентами. Муколітичну активність цистеаміну порівнюють з іншими муколітичними агентами, такими як N-ацетилцистеїн

(Мукоміст®), ДНКаза I (Дорназа альфа®), альгінат ліази та цистеаміну гідрохлорид, шляхом вимірювання в'язкості розчину муцину після обробки. Муцин шлунку свині (Sigma-Aldrich, Gillingham, UK) одержували в стерильній очищеній воді з концентрацією 20 % (мас./об.). Муколітичні агенти одержували при 10 мг/мл в 20 % (мас./об.) розчині муцину. Швидкість муцину вимірювали через приблизно 5 хвилин після дії муколітичних агентів. Дані показують середнє та стандартне відхилення значень незалежних дворазових повторювань експериментів.

Фігура 9: є графіком, що показує пост-антимікробний ефект цистеаміну (NM001) в комбінації з тобраміцином щодо біоплівки PAO1 *P. aeruginosa*. Це показує антибіоплівкову активність цистеаміну в комбінації з тобраміцином при двох різних концентраціях, тоді як пост-антимікробний ефект (PAE) даних сполук також визначали шляхом наступного бактеріального росту після обробки біоплівки.

Фігура 10: показує графік, який демонструє інгібування мікробної метаболічної активності біоплівки PAO1 *P. aeruginosa* після обробки цистеаміном (NM001) в комбінації з тобраміцином. Це показує метаболічну активність біоплівки після лікування. Дані демонструють антибіоплівкову активність цистеаміну, окремо та в комбінації з тобраміцином, зі значним PAE, як продемонстровано шляхом затримки росту бактерій та зниження метаболічної активності біоплівки.

Приклади

Активність антимікробних агентів щодо бактеріальних колоній

Матеріали та способи

1.1 Бактеріальні штами

Pseudomonas aeruginosa ATCC27853 та *Burkholderia cepacia* NCTC10743 застосовували в даному дослідженні. Додаткові штами *Pseudomonas aeruginosa* застосовували, як показано в таблицях 1 та 2.

1.2 Одержання антимікробних сполук

Антимікробними агентами, які аналізували в даному дослідженні, були цистеамін (NM001), тобраміцин, цiproфлосаксин, колістин та гентаміцин. Агенти були одержані від компанії Sigma-Aldrich (Gillingham, UK) та вихідні розчини готували з концентрацією 20 мг/мл у чистій воді з 14-18 МОм см (Purite HP40 система очистки води, Oxon, UK). Після розчинення препарати стерилізували, використовуючи фільтри 0,22 мкм (Millipore, Watford, England) та зберігали при -20 °C.

1.3 Підготовка бактеріального інокуляту

Бактеріальний інокулят встановлювали способом розбавлення з активно зростаючої культури в бульйоні Мюллера-Хінтона (MH), стандартизований за 0,5 стандартом мутності McFarland, як описано в CLSI методі M26-A.

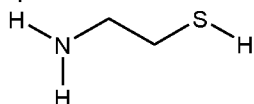
1.4 Визначення мінімальної інгібуючої концентрації (MIC)

Як бактеріальний інокулят, так і антимікробні агенти, включаючи сполуки структурно споріднені цистеаміну, додавали одночасно до планшетів. Планшети інкубували при 37 °C протягом 24 годин та оптичну густину зчитували на 625 нм на мікротитрованому планшетному рідері (BioTek Powerwave XS, Winooski, USA). MIC одержували як найнижчу концентрацію антимікробного показника загального інгібування бактеріального росту.

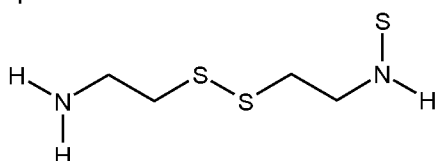
Антимікробна ефективність похідних цистеаміну щодо *P. aeruginosa*

Ряд сполук зі спорідненою хімічною структурою до цистеаміну перевіряли щодо антимікробної активності; цистамін (дигідрохлоридна сіль), таурин та 2,3-димеркаптобурштинову кислоту. Інші сполуки хімічно споріднені до цистеаміну є відомими, але є токсичними, та, внаслідок цього, їх не застосовують в лікарському засобі такої природи.

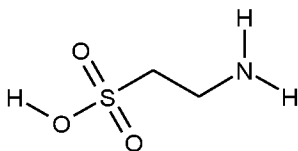
Цистеамін:



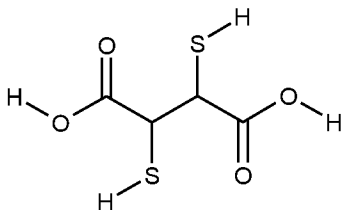
Цистамін:



Таурин:



2,3-Димеркаптобурштинова кислота:



1.5 Визначення MIC в фізіологічно-важливих іонних концентраціях

Аналогічний спосіб, як описано вище (1.4), застосовують для визначення антимікробної активності цистеаміну (Lynovex®) в присутності високих іонних концентрацій. Антимікробну активність (MIC₁₀₀) цистеаміну порівнювали в нормальних умовах (як описано в CLSI M7-A7 способі) та в присутності 150 мМ хлориду натрію (NaCl), 1,7 мМ хлориду кальцію (CaCl₂), 1 мг/мл ДНК або 1 % (мас/об.) свинячого шлункового муцину в трьох повторах, в 96-лункових планшетах. Бактеріальний ріст відбувався протягом наступного 24 годинного періоду та поглинання зчитували, використовуючи мікротитрований планшетний рідер BioTek на 625 нм.

1.6 Визначення антибіоплівкової активності

Антибіоплівкова активність оцінювали, використовуючи мікрофлуїдальну BioFlux 800 систему проточної кювети (Fluxion, South San Francisco, USA). Мікрофлуїдальні канали 48-лункового BioFlux планшету інокулювали 0,5 McFarland еквівалентом інокуляту PAO1 *P. aeruginosa* в бульйоні Мюллера-Хінтона. Мікробним клітинам давали приєднатися та почати утворення мікроколоній протягом приблизно 30 хвилин при 37 °C. Муколітичні агенти готували в 1 мг/мл бульйоні Мюллера-Хінтона та пропускали крізь мікрофлуїдальну систему зі швидкістю потоку 0,5 дін/см² (еквівалент 53 мкл/год.) протягом 16 годин при 37 °C. Виконували мікроскопічні спостереження, та записували картинки, використовуючи інвертований мікроскоп Axiovert 40 зі 100-кратним збільшенням (Carl Zeiss, Welwyn Garden City, UK).

1.7 Визначення фракційної інгібуючої концентрації (FIC)

FIC відповідає коефіцієнта взаємодії, що показує, чи є комбінація антибактеріальних агентів синергетичною, адитивною, антагоністичною або нейтральною. FIC визначають шляхом порівняння активності агента в комбінації (MIC агента A + агента B) з активністю препарату окремо (MIC агента A або агента B) як наведено далі (Singh et al., 2000):

$$FIC = MIC_{A[комбінація]} / MIC_{A[окремо]} + MIC_{B[комбінація]} / MIC_{B[окремо]}$$

Адитивні комбінації двох антимікробних агентів позначають за допомогою FIC індексу, що дорівнює 1, тоді як FIC індекс < 1 показує синергетичні комбінації. Нейтральні комбінації дадуть FIC від 1 до 4, FIC індекс вищий, ніж 4 показує антагоністичні ефекти між двома антимікробними агентами.

Крім того, FIC розраховують, щоб оцінити взаємодію двох антимікробних агентів в комбінації проти бактеріальних зразків.

1.8 Визначення пост-антимікробного ефекту (PAE) та метаболічної активності

PAE визначали шляхом переносу 10 мкл біоплівкових культур в 90 мкл стерильного МН бульйону в трьох повторах в мікротитровані планшети після обробки. Ріст бактерій відслідковували, використовуючи BioTek планшетний рідер протягом 24 годин при 37 °C. Мікробну метаболічну активність після обробки біоплівки визначали, використовуючи той самий спосіб, що й для визначення PAE та додаючи 10 % (об./об.) флуоресцентний індикатор клітинної життєздатності, резазурин (аламар блакитний, Serotec), який виявляв ріст мікробної метаболічної активності шляхом підвищення флуоресценції. Флуоресценцію вимірювали протягом 24 годин при 37 °C, використовуючи BioTek Synergy HT мікропланшетний рідер (BioTek, Winooski, USA) на 530/590 нм.

1.9 Визначення муколітичної активності

Муколітичну активність цистеаміну порівнювали з іншими муколітичними агентами, такими як N-ацетилцистеїн (Мукоміст®), ДНКаз I (Дорназа альфа®), альгінат ліази та цистеаміну гідрохлорид, шляхом вимірювання в'язкості розчину муцину після обробки. Муцин шлунку свині (Sigma-Aldrich, Gillingham, UK) одержували в стерильній очищеній воді з концентрацією 20 % (мас/об.). Муколітичні агенти одержували при 10 мг/мл в 20 % (мас/об.) розчині муцину. Швидкість муцину вимірювали через приблизно 5 хвилин після дії муколітичних агентів.

2 Результати

2.1 Попередження та лікування бактеріальної колонізації

Діапазон концентрацій антимікробних агентів становив 0-10 мкг/мл.

2.1.1 Активність щодо *P. aeruginosa* ATCC 27853

- 5 MIC тобраміцину та ципрофлоксацину значно знижувався при введенні з цистеаміном в порівнянні з введенням поодиночі. Даний ефект був продемонстрований в середовищах, що імітують ті, що виявлені в легенях при CF.

- 10 Визначення FIC для даної комбінації показує, що антимікробні агенти мають синергетичні ефекти (FIC=0.75). Антимікробні агенти за представленим винаходом діють синергетично, забезпечуючи підвищений антибактеріальний ефект. Антибактеріальний ефект традиційних антибіотиків, таких як тобраміцин та ципрофлоксацин зберігається, коли їх вводять в комбінації з цистеаміном у муколітичне середовище.

2.2

- 15 Таблиця 1: Індекс фракційної інгібуючої концентрації комбінацій цистеаміну, цистеаміну гідрохлориду та N-ацетилцистеїну та традиційних антибіотиків колістину, ципрофлоксацину, тобраміцину та гентаміцину проти вибраних штамів *Pseudomonas aeruginosa*

Таблиця 1:

Цистеамін (NM001)		NM001 FICI (Синергія)				NM001 FICI (Адитивність)			
Штам	Резистентність антибіотика	Кол	Цип	Тоб	Гент	Кол	Цип	Тоб	Гент
Pa01	Кол ^R	0,38 0,31 0,25	H	0,31 0,28 0,25	0,38	0,53 0,56	H	0,63	0,5 0,53 0,63
Pa14	Кол ^R	0,38	H	H	H	0,53 0,5 0,56	0,75 0,63	0,56 0,75 0,5	0,63 0,5 0,75
Pa058	Кол ^R , Цип ^R Тоб ^R	H	H	H	H	0,75 0,53 0,56 0,5	0,53 0,56	0,52 0,56 0,5 0,53 0,63 0,75	0,56 0,5 0,75
Pa57388A	Кол ^R	0,38 0,31	H	0,31 0,38	0,38	0,52 0,51 0,63 0,56	0,63	0,63 0,75 0,5 0,56	0,5 0,56 0,75
Pa57388D	Кол ^R , Гент ^R	0,31 0,38	H	0,38 0,31 0,25	0,38	0,62 0,53 0,56 0,5	0,53 0,56 0,52 0,75	0,56 0,51 0,52	0,5 0,63 0,51

Цистеаміну гідрохлорид (Cyst HCl)		Cyst HCl FICI (Синергія)				Cyst HCl FICI (Адитивність)			
Штам	Резистентність антибіотика	Кол	Цип	Тоб	Гент	Кол	Цип	Тоб	Гент
Pa01	Кол ^R	0,125 0,14 0,28 0,26	H	0,25 0,31 0,38 0,28 0,19	H	0,5 0,5	0,75 0,52 0,56	0,51 0,53 0,5	0,75 0,5
Pa14	Кол ^R	0,125 0,28 0,19 0,09	0,31 0,37 0,38	H	H	0,51 0,5 0,53 0,52	0,56 0,63 0,5	0,63 0,75 0,5	0,5 0,63 0,56

Pa058	Кол ^R , Цип ^R Тоб ^R	0,38	Н	Н/А	Н	0,52 0,75 0,56 0,5	0,53 0,63 0,75 0,56	Н/А	0,75
Pa57388A	Кол ^R	0,25 0,31 0,19 0,26	0,19 0,25	Н	Н	0,53 0,52 0,5	0,53 0,5 0,63 0,56 0,75	0,63 0,75	0,63
Pa57388D	Кол ^R , Гент ^R	0,19 0,28 0,25 0,31	0,31 0,38	0,25 0,31 0,19	Н	0,52 0,53	0,56 0,53	0,51 0,5	0,53 0,52

N-ацетилцистеїн (NAC)		NAC FICI (Синергія)				NAC FICI (Адитивність)			
Штам	Резистентність антибіотика	Кол	Цип	Тоб	Гент	Кол	Цип	Тоб	Гент
Pa01	Кол ^R	Н/А	Н	Н	Н	Н/А	0,56 0,75	0,53 0,52 0,5 0,56	Н
Pa14	Кол ^R	Н	Н	Н	Н	0,5 0,75	0,56 0,75	0,63 0,5 0,75	0,51 0,52
Pa058	Кол ^R Цип ^R Тоб ^R	Н	Н	Н	Н	0,53	0,56 0,75	0,75 0,53 0,51	0,53
Pa57388A	Кол ^R	Н	Н	Н	Н	0,56 0,75 0,52	0,63 0,5 0,56	0,53	0,63
Pa57388D	Кол ^R Гент ^R	Н	Н	0,25 0,31	Н	0,56 0,75 0,53 0,5 0,51	0,53 0,75	0,56 0,63	Н

2.3

5 Таблиця 2: Антимікробна ефективність цистеаміну та структурно споріднених сполук проти вибраних клінічно важливих штамів *Pseudomonas aeruginosa*.

Таблиця 2

Цистеамін			
		MIC (мкг/мл)	
Штам	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₁₀₀
Pa01	250-500	500	666,67
Pa14	125-250	500	1333,33
Pa058	500	1000	1000
NH57388A	250	250-500	666,67
Цистамін			
		MIC (мкг/мл)	
Штам	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₁₀₀
Pa01	250-1000	1000-2000	2000
Pa14	125-250	1000-2000	2000
Pa058	250-500	1000-2000	2000
NH57388A	500-1000	1000-2000	2000

Таурин			
	MIC (мкг/мл)		
Штам	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₁₀₀
Pa01	>2000	>2000	>2000
Pa14	>2000	>2000	>2000
Pa058	>2000	>2000	>2000
NH57388A	>2000	>2000	>2000

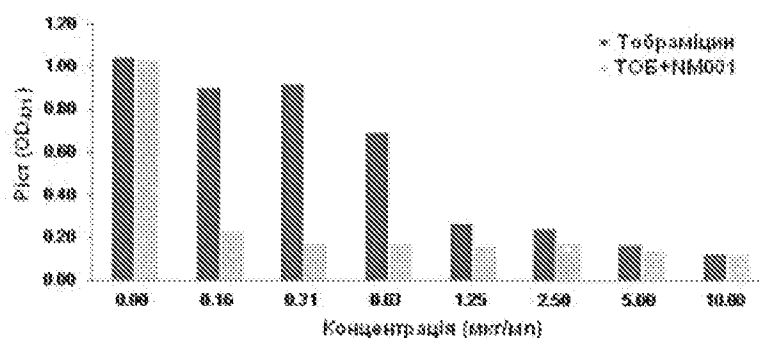
2,3-Димеркаптобурштинова кислота			
	MIC (мкг/мл)		
Штам	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₁₀₀
Pa01	1000-2000	>2000	>2000
Pa14	1000-2000	1000-2000	>2000
Pa058	500-2000	1000-2000	2000
NH57388A	500-2000	1000-2000	2000

- В усіх випадках, цистеамін демонстрував більшу антимікробну ефективність, ніж споріднені сполуки, показуючи притаманну основну властивість як сульфідрильної так і аміної груп щодо значної антимікробної активності.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Продукт для профілактики та лікування інфекцій, що містить синергетично ефективну кількість (i) антибіотичного агента та (ii) цистеаміну, причому антибіотичний агент є непептидним антибіотиком, для використання як лікарського засобу, де синергетично ефективна кількість (i) антибіотичного агента та (ii) цистеаміну є ідентифікованою за індексом FIC (фракційна інгібуюча концентрація) і де антибіотичним агентом є непептидний антибіотик, за винятком тобраміцину, гентаміцину або ципрофлоксацину.
2. Продукт для профілактики та лікування інфекцій, що містить синергетично ефективну кількість (i) антибіотичного агента та (ii) цистеаміну, причому антибіотичний агент є пептидним антибіотиком, за виключенням колістину, для використання як лікарського засобу і де синергетично ефективна кількість (i) антибіотичного агента та (ii) цистеаміну є ідентифікованою за індексом FIC (фракційна інгібуюча концентрація).
3. Продукт за п. 1, в якому антибіотичний агент вибрано з групи, яка складається з аміноглікозидів, ансаміцинів, карбацефема, карбапенемів, цефалоспоринов, лінкозамідів, макролідів, монобактамів, нітрофуранів, хінолонів, пеніцилінів, сульфаніламідів та тетрациклінів.
4. Продукт за п. 3, в якому антибіотичний агент вибрано з групи, яка складається з аміноглікозидів, лінкозамідів, макролідів, хінолонів, сульфаніламідів та тетрациклінів.
5. Продукт за будь-яким із пп. 1-4, де індекс FIC комбінації цистеаміну та антибіотичного агента менше 1, як визначено методом "шахової дошки".
6. Фармацевтичний продукт, який містить продукт за будь-яким з пп. 1-5 та один або більше з фармацевтично прийнятних розріджувачів, наповнювачів та/або носіїв.
7. Застосування продукту за будь-яким одним з пп. 1-5 або фармацевтичного продукту за п. 6 в лікуванні або профілактиці мікробної інфекції.
8. Застосування за п. 7, де інфекцію вибирають з групи, що складається з інфекцій шкіри та рани, інфекцій середнього вуха, інфекцій шлунково-кишкового тракту, інфекцій перитонеальної мембрани, сечостатевої інфекції, інфекцій м'яких тканин ротової порожнини, інфекцій ока, ендокардитів, інфекцій при муковісцидозі та інфекцій медичного пристрою, що постійно перебуває в організмі.
9. Застосування за п. 7 або 8, де мікробна інфекція є інфекцією муколітичного середовища.
10. Застосування за п. 7, де мікробна інфекція є бактеріальною інфекцією, асоційованою з муковісцидозом.
11. Застосування за будь-яким одним з пп. 7-10, де інфекція є викликаною бактерією, вибраною з групи, що складається з *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp., *Haemophilus* spp., *Burkholderia* spp., *Streptococcus* spp. та *Propionibacterium* spp.
12. Застосування за п. 11, де бактерією є *Pseudomonas* spp., *Burkholderia* spp. або *Staphylococcus* spp.

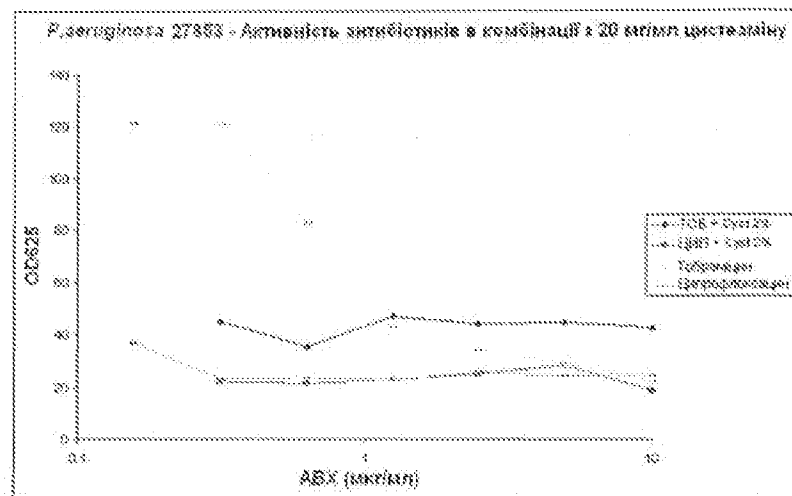
13. Спосіб лікування або профілактики мікробної інфекції, де антибіотичний агент та цистеамін продукту за будь-яким одним з пп. 1-5 або фармацевтичного продукту за п. 6 вводять сумісно або послідовно.



Фіг. 1а

	MIC окремо		MIC в комбінації		FIC індекс
	NM001 (мкг/мл)	Тобрамідин (мкг/мл)	NM001 (мкг/мл)	Тобрамідин (мкг/мл)	
PA01	500	1	250	0.25	Аддитивність (0.75)

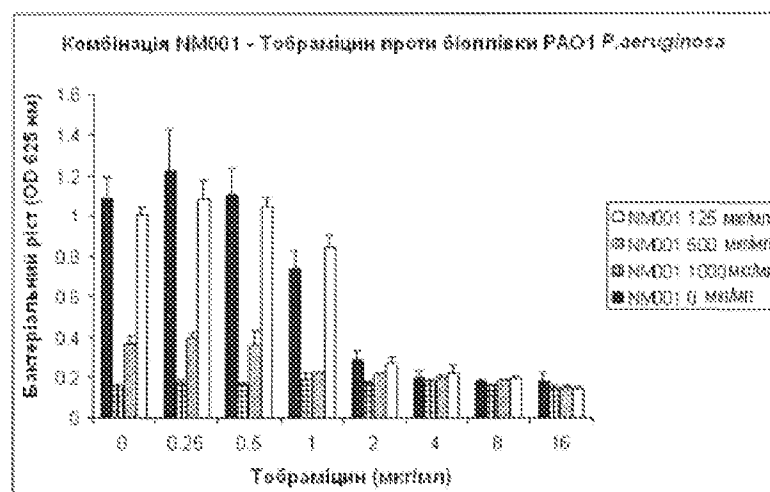
Фіг. 1b



Фіг. 2

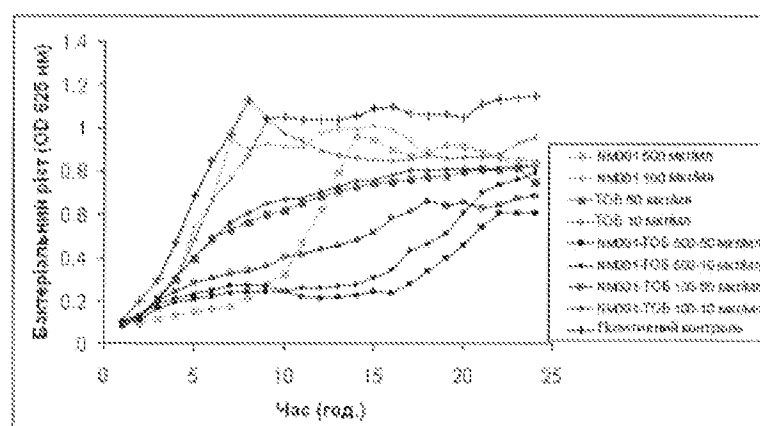
PA01 - MIC (мкг/мл)	Стандартний		Муцин		NaCl	
	Окремо	+ NM001 (250 мкг/мл)	Окремо	+ NM001 (250 мкг/мл)	Окремо	+ NM001 (250 мкг/мл)
Тобрамідин	1	0.25	8	1	4	0.5

Фіг. 3



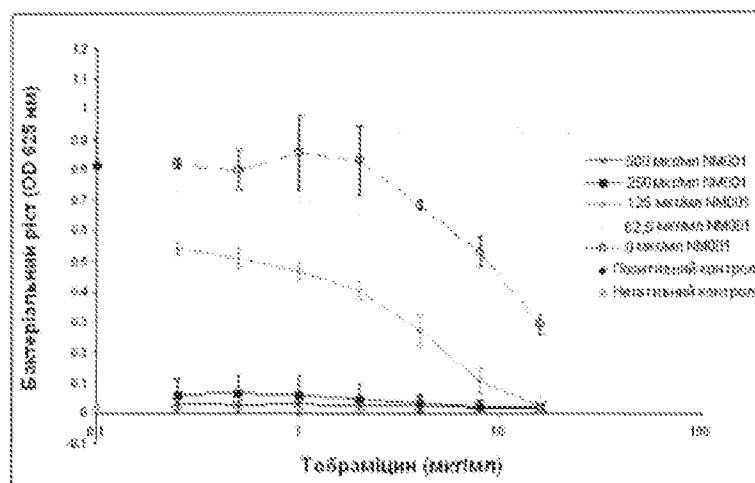
Фіг. 4

Антибіоплівкова активність цистеаміну окремо та в комбінації з тобраміцином щодо встановленої біоплівки PAO1 *P. aeruginosa*



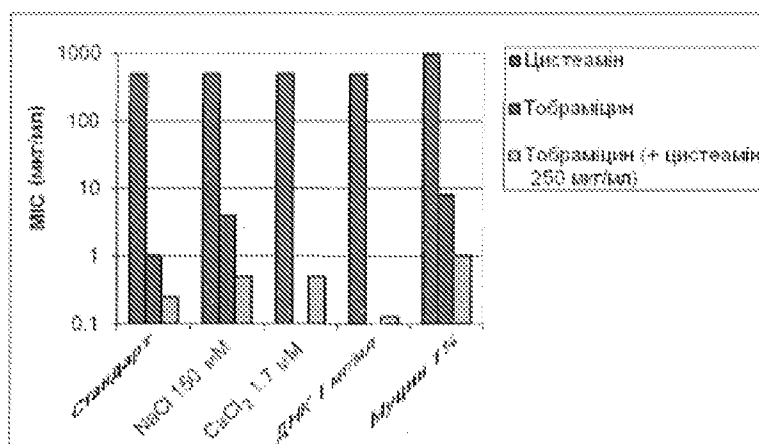
Фіг. 5

Пост-антимікробний ефект цистеаміну (NM001) в комбінації з тобраміцином (ТОБ) щодо біоплівки PAO1 *P. aeruginosa*



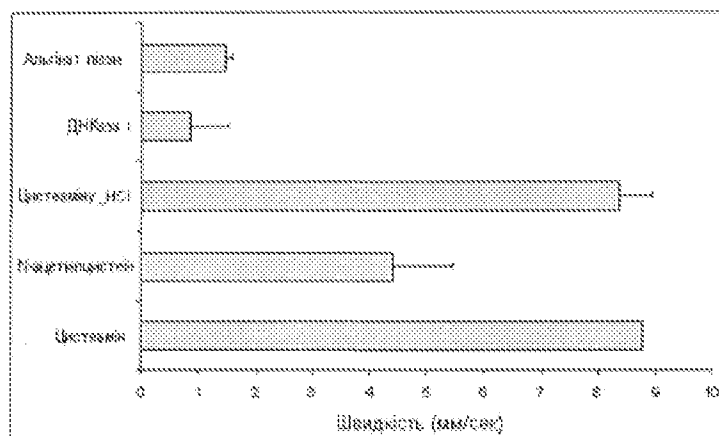
Фіг. 6

Цистеамін (NM001) підсилює антимікробну активність тобраміцину щодо резистентної до багатьох лікарських засобів *Burkholderia cepacia* NCTC10743



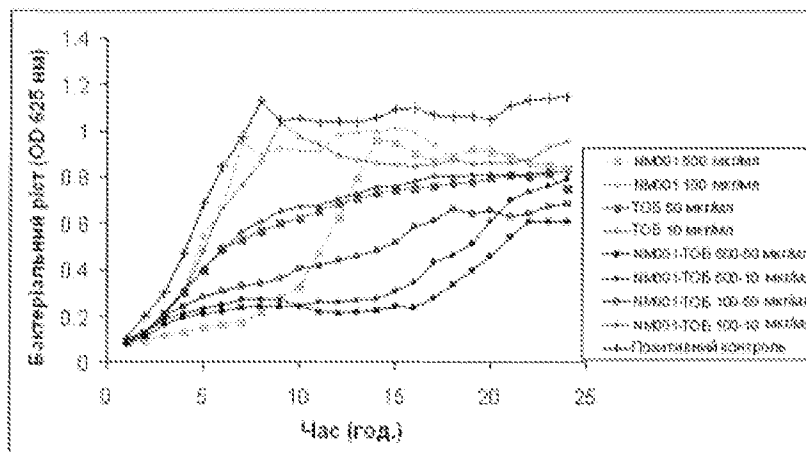
Фіг. 7

Антимікробна активність тобраміцину та Lypovex® (цистеаміну) щодо планктонних клітин PAO1 *P. aeruginosa* окремо та в комбінації в фізіологічно важливих концентраціях, як виявлено в легенях пацієнтів з CF



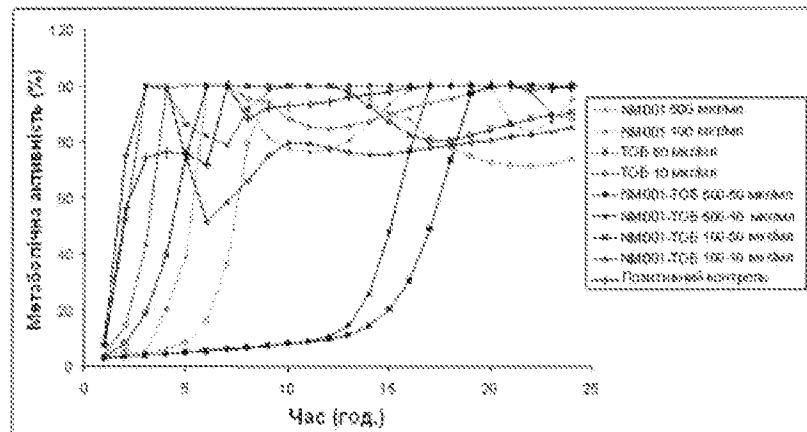
Фіг. 8

Муколітична активність цистеаміну в порівнянні з іншими руйнівниками дисульфідних зв'язків та муколітичними агентами



Фіг. 9

Пост-антимікробний ефект цистеаміну (NM001) в комбінації з тобраміцином щодо біоплівки PAO1 *P. aeruginosa*



Фіг. 10

Інгібування мікробної метаболічної активності біоплівки PAO1 *P. aeruginosa* після обробки цистеаміном (NM001) в комбінації з тобраміцином