УКРАЇНА

(19) UA (11) 123954 (13) C2

(51) МПК (2021.01)
A61K 9/00
A61K 31/366 (2006.01)
A61P 31/10 (2006.01)

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

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **a 2018 09076**
(22) Дата подання заявки: **06.04.2017**
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: **01.07.2021**
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **1650467-2**
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **06.04.2016**
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **SE**
(41) Публікація відомостей про заявку: **26.12.2018, Бюл.№ 24**
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: **30.06.2021, Бюл.№ 26**
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору PCT: **PCT/EP2017/058268, 06.04.2017**

(72) Винахідник(и):
Еллервік Ульф (SE),
Стернер Олов (SE),
Стрівенс Хелена (SE),
Маннер Софі (SE)

(73) Володілець (володільці):
ГЕДЕА БІОТЕЧ АБ,
Medicon Village, Scheelevägen 2, 223 81 Lund, Sweden (SE)

(74) Представник:
Кістерський Кирило Арсенійович, реєстр. №207

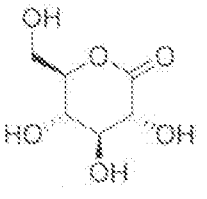
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
CN 1124622 A (ZHOU YANHUA [CN]), 19.06.1996
US 5942250 A (YU RUEY J. [US], et al.), 24.08.1999
US 5385938 A (YU RUEY J. [US], et al.), 31.01.1995
US 4234599 A (VAN SCOTT EUGENE J., et al.), 18.11.1980
US 6541034 B1 (GERGELY GERHARD [AT], et al.), 01.04.2003
WO 99/66904 A1 (THERATECH INC [US]), 29.12.1999
US 2003/017207 A1 (LIN SHUN Y [US], et al.), 23.01.2003

UA 123954 C2

(54) ГЛЮКОНО-ДЕЛЬТА-ЛАКТОН ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ВАГІНАЛЬНИХ ГРИБКОВИХ ІНФЕКЦІЙ

(57) Реферат:

Даний винахід належить до фармацевтичного складу для вагінального введення, при цьому склад містить фармацевтично прийнятний допоміжний засіб та глюконо-δ-лактон, при цьому глюконо-δ-лактон присутній у кількості 5-99 мас. % складу. Даний винахід також належить до фармацевтичного складу, відповідно до даного винаходу, для застосування при попередженні або лікуванні урогенітальної грибкової інфекції. Крім цього, даний винахід належить до глюконо-δ-лактону (формула (III)) для застосування при попередженні або лікуванні грибкової інфекції.



(III)

Галузь техніки, до якої відноситься даний винахід

Даний винахід відноситься до фармацевтичних складів для вагінального введення для застосування при лікуванні вагінальних грибкових інфекцій. Зокрема, даний винахід відноситься до фармацевтичних складів для вагінального введення для застосування при лікуванні вульвовагінального кандидозу.

Попередній рівень техніки даного винаходу

Вагінальний мікробіом є динамічною системою зі складною сумішшю різних мікроорганізмів у різних співвідношеннях та кількостях, що залежить від бактерій, що продукують молочну кислоту, для підтримування слабко кислогоконечнда середовища (зазвичай pH від 3,5 до 4,5). Будь-яка раптова зміна у вагінальній мікрофлорі збільшить вагінальний pH та, відповідно, створить більш сприятливе середовище для розвитку вагінальних хвороботворних організмів, які оптимально ростуть при pH вище 5. Таким чином, дисбаланс флори мікроорганізмів у піхві може призвести до вагінальних інфекцій, стану, який щорічно уражує більший відсоток жінок репродуктивного віку.

Вагінальна інфекція Candida являє собою поширену проблему, що часом уражує велику кількість жінок (більш ніж 75 %) та створює велику та вкрай обтяжливу, а також рецидивну проблему для ряду жінок (8 %). Симптоми включають у себе свербіж, хворобливість або подразнення, почервоніння та набряк вагінальних тканин, біль при сечовипусканні і статевому акті, зазвичай в'язкі білі та грудкуваті, схожі на сир виділення (сирнисті) або виділення від нормальних до негустих та рідких. Candida albicans є найбільш поширеним хвороботворним організмом, часто присутнім у менших кількостях, зазвичай у піхві, у роті, у травному тракті та на шкірі, не викликаючи інфекції, але при змінах у нормальній флорі, наприклад, після лікування антибіотиками, Candida може рости занадто швидко та інфікувати. Однак інформація про виникнення вульвовагінальних інфекцій у значному ступені є неповною внаслідок психосоціальних стереотипів, пов'язаних з генітальними інфекціями.

Хворобливість на C. albicans опосередкована трансформацією з планктонних клітин у гіфи. Гіфальна форма, тобто ниткоподібні клітини, володіє здатністю проникати у тканину і індукувати запалення, опосередковане кандидалізином, цитотоксичним пептидним токсином, який руйнує епітеліальні клітини піхви (Moyes et. al., Nature, 2016, 532, 64).

Candida розвивається на глікогені, що присутній у слизовій оболонці піхви, та інфекція також стимулюється за рахунок впливу на слизову оболонку підвищеного вмісту естрогену під час вагітності, а також за рахунок послабленої імунної системи під час вагітності. Протизаплідні пігулки можуть викликати схожий ефект, як при менструації, а також як при інших стресових факторах. Ще одним поширеним стимулятором є цукровий діабет.

Діагноз ставлять після вагінального огляду із взяттям мазків з піхви для отримання зразка виділень, на якому виконують мікроскопію так званого вологого мазка або вологого препарату із додаванням KOH до лізату епітеліальних клітин із візуалізацією гіф Candida. У жінок з рецидивними або стійкими симптомами слід отримувати вагінальні культури, оскільки менш поширені види Candida, такі як Candida glabrata або Candida krusei, потребують різних лікарських препаратів. Самодіагностика може бути недоцільною, у одному дослідженні тільки 11 % жінок точно діагностували у себе інфекцію, та жінки з раніше перенесеною інфекцією були лише трохи більш точними (35 %), що призводить до дорогого лікування з потенційними побічними ефектами [D. G. Ferris, et al. Obstet. Gynecol. 2002, 99, 419-425].

Види лікування включають у себе вагінальні креми або таблетки, такі як еконазол, кломітразол, міконазол, тіоконазол або бутоконазол, протягом 1-3 діб або 7-14 діб при персистувальному стані, хоча флуконазол часто рекомендується при персистувальній або рецидивній інфекції. Для попередження рецидивної інфекції флуконазол можна також вводити щотижня або через тиждень протягом 3-6 місяців. Однак, хоча побічні ефекти флуконазолу є легкими та нечастими, вони можуть включати у себе розлад шлунку, головний біль та висип. Флуконазол взаємодіє з рядом лікарських препаратів та не рекомендується під час вагітності через потенційний ризик заподіяння шкоди плоду. Може розвинутися стійкість до лікарського засобу, і в такому випадку можна застосовувати ітраконазол, але також не під час вагітності.

Хоча вульвовагінальний кандидоз зазвичай не є небезпечним для життя, він може бути більш або менш хронічним та знижує якість життя, сексуального життя, роботи і здатність концентруватися; це може у підсумку призвести до депресій. Хронічний стан може викликати виснажливий вестибуліт, вилікувати який може бути надзвичайно складно. Є докази, які підтверджують, що надмірне запалення при продукуванні простагландинів може викликати передчасні схватки та передчасні пологи. Недоношений новонароджений може згодом зіткнутися з інвазивною інфекцією Candida, одною з найбільш серйозних нозокоміальних

інфекцій, що викликають більш високу захворюваність і смертність, ніж бактеріальна інфекція, особливо у відділеннях інтенсивної терапії новонароджених.

Зростає занепокоєння з приводу зростаючої поширеності стійкості до протигрибкових препаратів навіть при внутрішньовенному лікуванні ехікандином. Лікування жіночих захворювань є відносно слаборозвиненою галуззю, а вульвовагінальні інфекції є великою та почасти прихованою проблемою без ефективного лікування. Особливо схильні до ризику діабетики та, зокрема, вагітні діабетики. Безпечне лікування для застосування під час вагітності може виявитися особливо цінним також і при попередженні передчасних пологів.

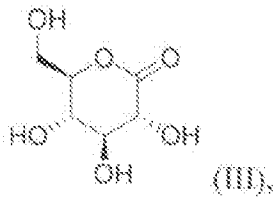
Альтернативні пропоновані методи лікування вульвовагінального кандидозу включають у себе застосування молочної кислоти (див. WO 2008/119518) та молочнокислих бактерій (див. WO 2008/071783), які тривалий час використовували при лікуванні бактеріального вагінозу. Однак при ураженні вульвовагінальним кандидозом молочна кислота менше ефективна.

Таким чином, як визнано у рівні техніки, вульвовагінальний кандидоз залишається поширеною проблемою в усьому світі, що зачіпає усі верстви суспільства, незважаючи на терапевтичні досягнення [J. D. Sobel. Lancet, 2007, 369, 1961-1971].

Таким чином, існує потреба у нових фармацевтичних складах проти вульвовагінального кандидозу. Даний винахід спрямований на те, щоб надати просте, недороге, екологічно безпечне вирішення проблеми вульвовагінальних інфекцій.

Коротке розкриття даного винаходу

Отже, даний винахід спрямований на зменшення, полегшення, усунення або подолання одного або декількох з перерахованих вище недоліків у даній галузі та недоліків окремо або у будь-якій комбінації шляхом забезпечення фармацевтичного складу для вагінального введення, при цьому склад містить фармацевтично прийнятний допоміжний засіб та глюконо-8-лактон (формула (III)),



(III),

при цьому глюконо-δ-лактон присутній у кількості 5-99 мас. % (маса/маса) складу. Показали, що така композиція зменшує присутність біоплівки різних видів Candida та, крім того, також виявляє цитотоксичну дію у відношенні кількох видів Candida. Глюконо-δ-лактон (GDA) є твердою речовиною при кімнатній температурі та температурі тіла і, тому, підходить для застосування у якості активного інгредієнта, наприклад, у вагінальних таблетці, диску, або супозиторії, або вагіторії.

Згідно з одним варіантом здійснення глюконо-8-лактон присутній у кількості 10-70 мас. % складу. Глюконо-δ-лактон може бути присутнім у кількості 20-70 мас. % складу. Глюконо-δ-лактон може бути присутнім у кількості більше 50 мас. %, наприклад, більше 60 мас. %, наприклад, більше 70 мас. %, наприклад, більше 75 мас. %, наприклад, більше 80 мас. %. Така композиція має перевагу швидкого вивільнення ефективної дози глюконо-5-лактону.

Згідно з іншим варіантом здійснення композиція містить не більше 10 мас. %, переважно не більше 5 мас. %. Така композиція має перевагу тривалого терміну придатності та захищає глюконо-δ-лактон від гідролізу.

Згідно з одним варіантом здійснення фармацевтичний склад додатково містить протигрибковий засіб, вибраний з групи, яка складається з міконазолу, терконазолу, ізоконазолу, фентиконазолу, флуконазолу, ністатину, кетоконазолу, клотримазолу, бутоконазолу, еконазолу, тіоконазолу, ітраконазолу, 5-фторацилу та метронідазолу. Перевага такої композиції полягає у тому, що вона ефективна у випадках, коли інфекція викликана не тільки видом, який є сприйнятливим до глюконо-δ-лактону, але підлягає лікуванню із застосуванням іншого протигрибкового засобу.

Згідно з одним варіантом здійснення фармацевтичний склад містить носій, наповнювач та/або буферний засіб або засіб, що регулює pH.

Згідно з іншим варіантом здійснення фармацевтичний склад складають для вивільнення сполуки формули (III) протягом тривалого періоду часу, наприклад, протягом щонайменше 4 годин, протягом щонайменше 6 годин, протягом щонайменше 8 годин або протягом щонайменше 24 годин після введення, такого як інтравагінальна вкладка. Перевага цього полягає у тому, що продовжується ефект лікування. Крім того, можна продовжити проміжки часу між введеннями композиції.

Згідно із ще одним варіантом здійснення фармацевтичний склад складають у вигляді тампона, вагіторію, вагінального аерозолю, вагінального ковпачка, вагінального гелю, вагінальної вкладки, вагінального пластиру, вагінального кільця, вагінальної губки, вагінального супозиторію, вагінального крему, вагінальної емульсії, вагінальної піни, вагінального лосьйону, вагінальної мазі, вагінального порошку, вагінального шампуню, вагінального розчину, вагінального спрею, вагінальної суспензії, вагінальної таблетки, вагінальної палички, вагінального диска, вагінального пристрою та будь-якої їх комбінації, або при цьому фармацевтичний склад представлений у гігієнічному виробі, такому як тампон, гігієнічна серветка, урологічний пакет або підгузок, або прокладка, що прикріплюється до нижньої білизни.

Згідно з іншим варіантом здійснення фармацевтичний склад складають у вигляді вагіторію, вагінальної вкладки, вагінального кільця, вагінального супозиторію, вагінальної таблетки, вагінальної палички або вагінального диска.

Згідно з одним варіантом здійснення фармацевтичний склад володіє здатністю зменшувати або попереджувати утворення біоплівки видами Candida. Біоплівка представляє собою групу мікроорганізмів, в якій клітини прикріплені одна до одної. Часто ці клітини прилипають до поверхні, такої як поверхня слизової оболонки. Мікробні клітини, що ростуть у біоплівки, фізіологічно відрізняються від так званих планктонних клітин того самого організму, що представляють собою окремі клітини, які можуть триматися на поверхні або плавати у рідкому середовищі. Види Candida володіють здатністю утворювати біоплівки. При зменшенні або попередженні утворення біоплівки окремі клітини Candida більш не можуть прикріплюватися до слизової оболонки, наприклад, піхви. Отже, попереджається подальше інфікування, і клітини Candida, які більше не утворюють біоплівку, відторгаються, наприклад, з піхви.

Згідно з другим аспектом даного винаходу представлений фармацевтичний склад згідно із зазначеним вище для застосування при попередженні або лікуванні урогенітальної грибкової інфекції.

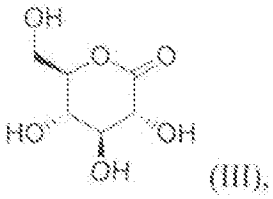
Глюконо-δ-лактон може бути представлений у якості активного інгредієнта в фармацевтичному складі.

Згідно з одним варіантом здійснення урогенітальна грибкова інфекція представляє собою вульвовагінальну грибкову інфекцію.

Згідно з іншим варіантом здійснення урогенітальна грибкова інфекція представляє собою вульвовагінальний кандидоз.

Згідно із ще одним варіантом здійснення вульвовагінальний кандидоз викликаний Candida albicans, Candida glabrata, Candida krusei та/або Candida tropicalis.

Згідно з третім аспектом даного винаходу представлений глюконо-δ-лактон (формула (III)),



(III),

для застосування при попередженні або лікування грибкової інфекції.

Згідно з одним варіантом здійснення грибкова інфекція представляє собою урогенітальну грибкову інфекцію.

Згідно з одним варіантом здійснення урогенітальна грибкова інфекція представляє собою вульвовагінальний кандидоз.

Згідно з іншим варіантом здійснення вульвовагінальний кандидоз викликаний Candida albicans, Candida glabrala, Candida krusei та/або Candida tropicalis.

Крім того, переважні ознаки різних варіантів здійснення даного винаходу визначені у залежних пунктах формули винаходу та у представленому нижче докладному описі.

Докладне розкриття даного винаходу

По оцінкам приблизно 80 % патогенної інфекції у людей пов'язані з утворенням біоплівки, тобто з утворенням складної тривимірної структури хвороботворного мікроорганізму, пов'язаної з клітинними стінками, а також з іншими патогенними клітинами. Показали, що для вульвовагінальних інфекцій Candida потрібне утворення біоплівки [M. M. Harriott, E. A. Lilly, T. E. Rodriguez, P. L. Fidel, M. C. Noverr, Microbiology, 2010, 156, 3635-3644]. Крім того, утворення біоплівки також знижує ефективність протигрибкових засобів у 10-100 разів.

З огляду на важливість утворення біоплівки при вульвовагінальних інфекціях Candida аналіз біоплівки визнали придатним для оцінювання впливу гідроксильованої карбонової кислоти при

націлюванні на вульвовагінальні інфекції Candida. Згідно з повідомленнями у рівні техніки було виявлено, що молочна кислота помірно активна при націлюванні на вульвовагінальні інфекції Candida при аналізі біоплівки (див. приведену нижче експериментальну частину). Оскільки утворення біоплівки залежить як від pH, так і від появи альтернативних джерел вуглеводів, не дивно, що молочна кислота виявляє певний вплив на утворення біоплівки. Крім того, подібні ефекти забезпечували деякі інші гідроксильовані C2-C5 карбонові кислоти. Вважають, що їх ефект пов'язаний з їх підкислювальним ефектом, оскільки більш сильна кислота виявляє декілька більш сильні ефекти.

Несподівано виявили, що полігідроксильовані C6 карбонові кислоти, наприклад, глюконова кислота, забезпечували чудові ефекти у відношенні зменшення утворення біоплівки у порівнянні з близькоспорідненими аналогами C3 та C5 (тобто гліцериновою кислотою та ксилоновою кислотою, відповідно). Крім того, несподівано виявили, що полігідроксильована C6 карбонова кислота, тобто глюконова кислота, перевершила більш кислі гідроксильовані карбонові кислоти, такі як лимонна кислота.

При тому, що ефект інших гідроксильованих карбонових кислот, очевидно, обумовлений тільки їх кислотністю (зниження pH перешкоджає утворенню біоплівки), ефект полігідроксильованих C6 карбонових кислот, наприклад, глюконової кислоти, на утворення біоплівки проявляється вже при pH < 7. Таким чином, схоже, що ефект полігідроксильованої C6 карбонової кислоти, наприклад, глюконової кислоти, у відношенні утворення біоплівки не тільки пов'язаний з її кислотністю, але і з самою сполукою, або, точніше, з пов'язаним з нею 5-лактоном.

У рівні техніки продемонстрували, що D-глюконова кислота, що продукується штамом AN5 Pseudomonas, здійснює вплив на хворобу випрівання пшениці, що викликається грибком Gaeumannomyces graminis var. tritici (R. Kaur et. al., Phytochemistry 67 (2006) 595-604; див. також WO 00/44230 Al). Автори припускають, що здатність D-глюконової кислоти та інших протигрибкових засобів, що продукуються штамами Pseudomonas, наприклад, фенанзин-1-карбонової кислоти (PCA) та 2,4-діацетилфлороглюцинолу (DPG), інгібувати грибок, що викликає випрівання, повинна бути щонайменше частково обумовлена їх здатністю знижувати pH у ризосфері пшениці.

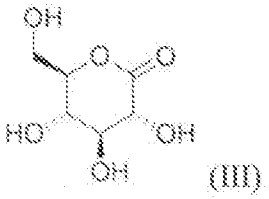
Без поглиблення в теорію, цілком можливо, що наявність глюконової кислоти сприяє утворенню планктонними клітинами біоплівки для видів Candida, оскільки полігідроксильована C6 карбонова кислота, наприклад, глюконова кислота, може бути використана видами Candida та іншими еукаріотами у пентозофосфатному шляху.

У водному розчині глюконова кислота (GA, CAS 526-95-4) знаходиться у рівновазі з глюконо-δ-лактоном (GDA, CAS 90-8-2) та глюконо-у-лактоном (GGA). Глюконову важко отримувати у вигляді твердого кристалічного продукту, та її зазвичай постачають у вигляді 50 % водного розчину.

При тому, що такий водний розчин можна застосовувати для отримування рідкого фармацевтичного складу для вагінального введення, такого як вагінальний крем, вагінальний гель, водний розчин менш придатний для застосування при забезпеченні твердого фармацевтичного складу для вагінального введення, такого як вагінальна таблетка, вагінальний супозиторій або вагінальне кільце.

Щоб вирішити цю проблему, автори даного винаходу досліджували можливість застосування глюконо-δ-лактону (GDA) для отримування твердих фармацевтичних складів. Несподівано, автори даного винаходу виявили, що GDA як такий, тобто сам лактон, виявляє ефект на утворення біоплівки різних видів Candida. Подальші дослідження виявили, що ефект GDA на формування біоплівки та життєздатність видів Candida у порівнянні з ефектом глюконової кислоти означає, що GDA сам по собі діє як активна сполука.

Таким чином, варіант здійснення даного винаходу відноситься до фармацевтичного складу для вагінального введення, що містить сполуку формули (III), яка являє собою глюконо-δ-лактон (GDA).



(III)

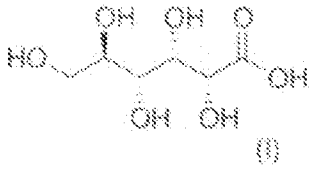
Крім того, фармацевтичний склад містить фармацевтично прийнятний допоміжний засіб для забезпечення складу. У цьому контексті "фармацевтично прийнятний" означає допоміжний

засіб, який у застосовуваних дозуванні та концентрації не викликає ніяких небажаних ефектів у суб'єктів, яким він вводиться. Такі фармацевтично прийнятні допоміжні засоби добре відомі у рівні техніки. їх можна вибрати з групи, що складається з носіїв, розріджувачів, зв'язувальних речовин, засобів, що дезінтегрують, засобів, що покращують плинність, засобів, що регулюють pH, стабілізувальних засобів, засобів, що регулюють в'язкість, консервантів, гелеутворювальних засобів або засобів, що набрякають, поверхнево-активних речовин, емульгаторів, суспендувальних засобів, основ для супозиторіїв, вагіторіїв або песаріїв, основ для кремів, мазей, гелів, лосьйонів, шампунів, піни, спреїв та т. п. Як відомо фахівцю в даній галузі, конкретний вибір фармацевтично прийнятних допоміжних засобів залежить від конкретної форми або складу, наприклад, лікарської форми. Фахівець в даній галузі зможе знайти рекомендації у різних посібниках, наприклад, у Remington: The Science and Practice of Pharmacy, по забезпеченню придатних фармацевтично прийнятних допоміжних засобів. Такий фармацевтичний склад є корисним при лікуванні та/або попередженні вульвовагінальних грибкових інфекцій.

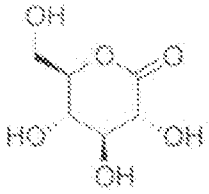
Фармацевтично прийнятний допоміжний засіб може представляти собою ліпофільний або гідрофільний носій. Прикладами ліпофільних носіїв є воски, масла, ізопропілміристат, тверді тригліцериди та масло какао. Прикладами гідрофільних носіїв є гліцерин, пропіленгліколь та поліоксиетиленгліколь.

Крім того, допоміжний засіб може представляти собою наповнювач. Приклади наповнювачів включають у себе сахариди, такі як лактоза, мальтоза та трегалоза. Інші дисахариди, такі як, наприклад, сахароза, лактулоза, целобіоза та т. д., також можуть бути придатними для застосування у даному контексті. У композиції відповідно до даного винаходу дисахарид зазвичай сприяє придатній структурі композиції. Сахариди також можуть допомагати ліофілізації.

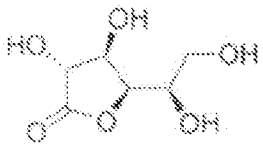
У водному розчині сполуки формули (I) знаходяться у рівновазі з відповідними лактонами, наприклад, 8-лактоном та у-лактоном.



(I)



δ- лактон



γ-лактон

Таким чином, активний інгредієнт фармацевтичного складу може містити невелику кількість кислоти (див. формулу (I)) та/або глюконо-γ-лактону.

Згідно з варіантом здійснення сполука формули (III) частково присутня у фармацевтичному складі у вигляді кислоти (формула (I)) у своїй незарядженій протонованій формі, наприклад, глюконової кислоти, і частково у вигляді відповідної солі приєднання, тобто сполученої основи, наприклад, глюконату. Таким чином, глюконова кислота може слугувати у якості буферу для фармацевтичного складу. Співвідношення між кислотою у її незарядженій протонованій формі та сполученою основою при введенні можна вибирати для забезпечення відповідного pH, такого як 3,5-4,5. Фармацевтичний склад може, таким чином, відновлювати нормальний фізіологічний pH у піхві при введенні. Однак, з огляду на активність сполук формули (III) вже при pH 6,5 або нижче, не потрібно відновлювати pH для забезпечення ефекту фармацевтичного складу. Однак переважно, якщо фармацевтичний склад при введенні забезпечує pH 6,0 або менше, наприклад, 5,0 або менше. Переважно фармацевтичний склад при введенні не повинний забезпечувати pH нижче 3,0, більш переважно не нижче 3,5.

Незважаючи на те, що сполуку формули (III) у формі відповідної кислоти у її незарядженій протонованій формі та/або відповідної солі приєднання, тобто сполученої основи, можна використовувати для забезпечення фармацевтичному складу якостей, що модифікують pH, фармацевтичний склад може містити додаткові буферні засоби або засобі, що регулюють pH. Такі буферні засоби або засобі, що регулюють pH, можуть являти собою фармацевтично

прийнятні буферні засоби, придатні для регулювання pH від приблизно 3 до приблизно 5, наприклад, від 3,5 до 4,5. Приклади буферних засобів або засобів, що регулюють pH, включають у себе молочну кислоту, оцтову кислоту, лимонну кислоту, малонову кислоту, фосфорну кислоту, винну кислоту, малеїнову кислоту і т. д., а також відповідні їм сполучені основи, тобто лактат, ацетат, цитрат, малонат, фосфат, тартрат та малеат.

Крім того, фармацевтичний склад також може містити одну або декілька фармацевтично прийнятних солей, таких як сукцинат, лізинат, ципіонат, валерат, гемісукцинат, бутират або сіль трометамолу, окремо або у комбінації.

Фармацевтичний склад повинен містити фармацевтично активну кількість сполуки формули (III). Згідно з переважним варіантом здійснення фармацевтичний склад містить щонайменше 5 мас. %, наприклад, щонайменше 10 мас. %, 15 мас. %, 20 мас. %, 25 мас. %, 30 мас. %, 40 мас. %, 50 мас. %, 60 мас. % або 75 мас. %, сполуки формули (III). Крім того, фармацевтичний склад може містити не більше 99 мас. %, наприклад, не більше 95 мас. %, 90 мас. %, 80 мас. %, 75 мас. %, 70 мас. %, 60 мас. % або 50 мас. %, сполуки формули (III). Таким чином, фармацевтичний склад може містити від 5 мас. % до 99 мас. % сполуки формули (III). Фахівцю в даній галузі відомо, що діапазон може бути звужений, виходячи з верхньої та нижньої величин, визначених вище, наприклад, 10-95 мас. %, 10-80 мас. %, 15-90 мас. %, 20-75 мас. %, 30-70 мас. %. Фармацевтичний склад може містити від 40 мас. % до 90 мас. % сполуки формули (III). Фармацевтичний склад може містити від 50 мас. % до 80 мас. % сполуки формули (III). Фармацевтичний склад може містити від 60 мас. % до 70 мас. % сполуки формули (III).

Згідно з іншим варіантом здійснення фармацевтичний склад містить глюконо-δ-лактон (III) та при необхідності, але необов'язково, глюконову кислоту (I). У такому варіанті здійснення молярне співвідношення глюконо-δ-лактону (III) та глюконової кислоти (I) у складі може становити щонайменше 9:1 (III:I), переважно щонайменше 49:1 (III:I), більше переважно щонайменше 99:1 (III:I). Оскільки глюконо-δ-лактон (III) буде гідролізований до глюконової кислоти (I), може бути переважною висока доля глюконо-δ-лактону (HI) у фармацевтичному складі. Згідно з таким варіантом здійснення фармацевтичний склад може містити менше 1 мас. % глюконової кислоти (I), наприклад, менше 0,1 мас. %, 0,05 мас. %, 0,01 мас. %, 0,005 мас. % або 0,001 мас. % глюконової кислоти (I).

При вагінальній вкладці фармацевтичного складу лактон буде піддаватися впливу водних умов, що викликають гідроліз. Оскільки гідроліз не наступає негайно, фармацевтичний склад буде вивільняти сполуку формули (III) протягом тривалого періоду часу, продовжуючи його ефект. Крім того, сполука формули (I) може вивільнятися у вигляді вільної кислоти або у вигляді її сполученої основи і, таким чином, додавати ефект, що знижує pH. pH піхви може варіювати від 3,5 до 4,5, а у випадку грибкової або бактеріальної інфекції він може вирости вище 4,5.

Крім того, кваліфікованому фахівцю відомо, що фармацевтичний склад може бути складений для пролонгованого вивільнення, що додатково подовжує ефект. Фармацевтичний склад може бути складений для вивільнення сполуки формули (III) протягом тривалого періоду часу, наприклад, протягом щонайменше 4 годин, протягом щонайменше 6 годин, протягом щонайменше 8 годин або протягом щонайменше 24 годин, після вагінальної вкладки.

Крім того, глюконо-δ-лактон (III) може, крім дії в якості активного інгредієнта, діяти у якості наповнювача та/або носія, полегшуючи складання композиції, що містить глюконо-δ-лактон (III), у фармацевтичний склад, такий як напівтвердий або твердий фармацевтичний склад.

Крім допоміжного засобу фармацевтичний склад може містити додатковий протигрибковий засіб. Протигрибковий засіб можна вибрати з групи, що містить міконазол. терконазол, ізоконазол, фентиконазол, флуконазол, ністатин, кетоконазол, клотримазол, бутоконазол, еконазол, тіоконазол, ітраконазол, 5-фторацил та метронідазол. Кількість протигрибкового засобу на дозу може знаходитися у діапазоні від 0,1 мг до 2000 мг. Сполука формули (III) і такий додатковий протигрибковий засіб можуть діяти синергетично.

Іноді, але не завжди, вульвовагінальні грибкові інфекції також охоплюють бактеріальні інфекції. Глюконова кислота забезпечує дію, подібну дії молочної кислоти на бактеріальні інфекції завдяки її кислотності. Таким чином, на додаток, глюконо-δ-лактон (III) також може виявляти дію у відношенні бактеріальних інфекцій. Однак може бути переважним доповнення фармацевтичного складу одним або декількома додатковими антибактеріальними засобами. Згідно з варіантом здійснення фармацевтичний склад, таким чином, містить один або декілька антибактеріальних засобів. Антибактеріальний засіб можна вибирати з групи, що містить кліндаміцин, тетрациклін, амоксицилін, ампіцилін, еритроміцин, доксициклін, люмефлоксацин, норфлоксацин, афлоксам, ципрофлаксин. азитроміцин, цефлтоксин. Кількість антибактеріального засобу може знаходитися у діапазоні від 5 мг до 1000 мг на дозу.

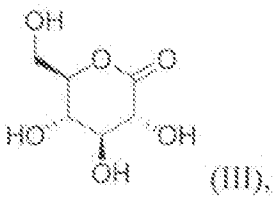
Крім того, фармацевтичний склад може містити один або декілька засобів проти адгезії хвороботворних організмів. Як вже обговорювалося, вульвовагінальні грибкові інфекції включають у себе утворення біоплівки та адгезію грибків до слизової оболонки піхви. Згідно з варіантом здійснення фармацевтичний склад, таким чином, містить один або декілька антиадгезійних засобів, що попереджують мукоадгезію хвороботворних організмів, наприклад, грибків. Антиадгезійними засобами можуть бути засоби, які служать або бар'єром, що перешкоджає адгезії, або засобом, який викликає порушення адгезії у мікроорганізмів, що вже поприлипали. Прикладами антиадгезійних засобів, що викликають порушення адгезії, можуть бути маноза, лактоза, ксиліт та інші цукрові спирти.

Фармацевтичний склад переважно складають для введення у піхву, наприклад, інтравагінально. Згідно з варіантом здійснення фармацевтичний склад, таким чином, отримують у вигляді тампона, вагіторію, вагінального аерозолю, вагінального ковпачка, вагінального гелю, вагінальної вкладки, вагінального пластиру, вагінального кільця, вагінальної губки, вагінального супозиторію, вагінального крему, вагінальної емульсії, вагінальної піни, вагінального лосьйону, вагінальної мазі, вагінального порошку, вагінального шампуню, вагінального розчину, вагінального спрею, вагінальної суспензії, вагінальної таблетки, вагінальної палички, вагінального диска, вагінального пристрою та любої їх комбінації. Переважно фармацевтичний склад складений у вигляді вагіторію, вагінального аерозолю, вагінального ковпачка, вагінального гелю, вагінального кільця, вагінальної губки, вагінального супозиторію, вагінального крему, вагінальної емульсії, вагінальної піни, вагінального лосьйону, вагінальної мазі, вагінального шампуню, вагінального розчину, вагінального спрею, вагінальної суспензії, вагінальної таблетки, вагінальної палички або вагінального диска; більше переважно у вигляді вагіторію, вагінальної вкладки, вагінального кільця, вагінального супозиторію, вагінальної таблетки, вагінальної палички або вагінального диска. Фармацевтичний склад також може представляти собою рідкий склад, наприклад, вагінальний аерозоль, вагінальний гель, вагінальний крем, вагінальну емульсію, вагінальну піну, вагінальний лосьйон, вагінальну мазь, вагінальний шампунь, вагінальний розчин, вагінальний спрей, вагінальну суспензію або будь-яку їх комбінацію.

Згідно з альтернативним, але менше переважним варіантом здійснення фармацевтичний склад представляють у гігієнічному виробі, такому як тампон, гігієнічна серветка, урологічний пакет або підгузок, або прокладка, що прикріплюється до нижньої білизни.

Крім того, фармацевтичний склад може бути складений для пролонгованого вивільнення, тобто для вивільнення сполуки формули (III) та/або (I) протягом тривалого періоду часу, наприклад, протягом щонайменше 4 годин, протягом щонайменше 6 годин, протягом щонайменше 8 годин або протягом щонайменше 24 годин, після введення, наприклад, інтравагінальної вкладки. Сполука формули (I) може вивільнятися у вигляді кислоти в її незарядженій протонованій формі та/або у вигляді відповідного сполученої основи. Крім того, як вже підкреслено, склад може вивільняти глюконо-δ-лактон у негідролізованій формі. За допомогою складання фармацевтичного складу для пролонгованого вивільнення фармацевтичний склад буде виявляти свою дію протягом більш тривалого часу. Це може бути корисним для відновлення нормальних умов у піхві та для лікування та/або попередження вульвовагінальної грибкової інфекції.

Як вже повідомляли, фармацевтичний склад для вагінального введення, що містить сполуку формули (III),



(III),

володіє здатністю зменшувати або навіть попереджувати утворення біоплівки видами Candida. Крім того, такі фармацевтичні склади можуть володіти здатністю зменшувати або навіть розчиняти біоплівки, утворені видами Candida.

Як вже повідомляли, глюконо-5-лактон (HI) можна, таким чином, застосовувати при попередженні або лікуванні урогенітальної грибкової інфекції, такої як вульвовагінальна грибкова інфекція. Таким чином, один варіант здійснення відноситься до фармацевтичного складу, що розкривається у даному документі, для застосування при попередженні або лікуванні урогенітальної грибкової інфекції, такої як вульвовагінальна грибкова інфекція. Як правило, урогенітальна грибкова інфекція представляє собою вульвовагінальний кандидоз, що

включає в себе інфікування видами Candida, такими як Candida albicans, Candida glabrata, Candida krusei та Candida tropicalis.

Вульвовагінальна кандидозна інфекція представляє собою надмірний ріст Candida у піхві, який спричиняє симптоми, пов'язані із запаленням, такі як свербіж, хворобливість або подразнення, почервоніння та набряк вагінальних тканин, біль при сечовипусканні і статевому акті, зазвичай в'язкі білі та грудкуваті, схожі на сир виділення або виділення від нормальних до негустих та рідких.

Подібним чином, один варіант здійснення даного винаходу відноситься до застосування глюконо-δ-лактону для виготовлення фармацевтичного складу, що розкривається у даному документі, для застосування при лікуванні та/або попередженні урогенітальної грибкової інфекції, такої як вульвовагінальна грибкова інфекція. Як правило, урогенітальна грибкова інфекція представляє собою вульвовагінальний кандидоз, пов'язанний з інфікуванням видами Candida, такими як Candida albicans, Candida glabrata, Candida krusei та Candida tropicalis.

Ще один варіант здійснення відноситься до способу попередження та/або лікування урогенітальної грибкової інфекції, такої як вульвовагінальна грибкова інфекція, що передбачає введення ссавцю, у тому числі людині, що потребує такого попередження та/або лікування, терапевтично ефективної кількості фармацевтичного складу, що розкривається у даному документі. Як правило, урогенітальна грибкова інфекція представляє собою вульвовагінальний кандидоз, що включає в себе інфікування видами Candida, такими як Candida albicans, Candida glabrata, Candida krusei та Candida tropicalis.

Фармацевтичну композицію згідно з варіантами здійснення у даному документі можна вводити хворому у фармацевтично ефективній дозі. Термін "фармацевтично ефективна доза" означає дозу, яка є достатньою для здійснення бажаного ефекту по відношенню до стану, з приводу якого її вводять. Точна доза може залежати від способу введення, характеру та тяжкості розладу та/або захворювання та загальних умов, таких як вік та маса тіла хворого.

Згідно з одним варіантом здійснення фармацевтична композиція, що розкривається у даному документі, підлягає введенню щонайменше один раз на добу протягом щонайменше тижня, хоча також можна застосовувати інший режим введення доз.

Застосовуваний у даному документі термін "попереджувати/попередження" не слід тлумачити як такий, що означає, що стан та/або захворювання ніколи не можуть виникнути знову після застосування сполуки або фармацевтичної композиції згідно з варіантами здійснення, що розкриваються у даному документі, для здійснення профілактики. Крім того, цей термін не має тлумачитися як такий, що означає, що стан не може наступити, щонайменше у деякому ступені, після такого застосування для попередження зазначеного стану. Швидше, термін "попереджувати/попередження" означає, що стан, який підлягає попередженню, якщо він наступає, незважаючи на таке застосування, буде менше серйозним, ніж без такого застосування.

Згідно з одним варіантом здійснення лікування також охоплює попереднє лікування, тобто профілактичне лікування.

Хоча даний винахід було описано вище з посиланням на конкретні ілюстративні варіанти здійснення, від не призначений для обмеження конкретною формою, викладеною у даному документі. Будь-яку комбінацію вищезгаданих варіантів здійснення необхідно розуміти, як таку, що входить до об'єму даного винаходу. Напроти, даний винахід обмежується виключно прикладеною формулою винаходу, та інші варіанти здійснення, ніж зазначені вище, однаково можливі у межах об'єму прикладеної формули винаходу.

У формулі винаходу термін "містить/що містить" не виключає наявності інших об'єктів або стадій. Крім того, хоча окремі ознаки можуть бути включені у різні пункти.формули винаходу, вони можуть бути вигідно об'єднані, та включення у різні пункти формули винаходу не означає, що комбінація ознак не є можливою та/або переважною. Крім того, форми однини не виключають множину. Однина і терміни "перший", "другий" і т. д. не виключають множину. Фрази "щонайменше один" або "один або декілька" відносяться до 1 або до числа більше 1, наприклад, до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10.

Короткий опис графічних матеріалів

На фігурі 1 представлені зміни оптичного обертання при гідролізі GDA в дистильованої воді (незаповнені кола), буфері з pH 4 (заповнені квадрати), буфері з pH 5 (незаповнені квадрати) та буфері з pH 7 (заповнені кола).

На фігурі 2 представлено утворення нормалізованої біоплівки Candida albicans у мінімальному середовищі при pH 2,6-6,6 з фосфатним буфером (незаповнені кола, пунктирна лінія) або GDA (заповнені квадрати, суцільна лінія). Біоплівку вимірювали через 24 години, а фарбування проводили за допомогою кристалічного фіолетового.

На фігурі 3a представлено утворення нормалізованої біоплівки Candida albicans, обробленої GDA. Осад GDA додавали до буферного розчину з pH 3,71 (10 мл) при 37 °C. Зразки (4 мл) брали через 1, 2, 3, 4, 5, 6 та 24 години та додавали новий буферний розчин (4 мл). Зразки 50-кратно розбавляли середовищем біоплівки та кількість утвореної біоплівки вимірювали через 24 г.

На фігурі 3b представлено утворення нормалізованої біоплівки Candida glabrata, обробленої GDA. Осад GDA додавали до буферного розчину з pH 3,71 (10 мл) при 37 °C. Зразки (4 мл) брали через 1, 2, 3, 4, 5, 6 та 24 години та додавали новий буферний розчин (4 мл). Зразки 50-кратно розбавляли середовищем біоплівки та кількість утвореної біоплівки вимірювали через 24 г.

На фігурі 4a представлена життєздатність біоплівок C albicans та C. glabrata після обробки GDA у різних концентраціях протягом 24 г. Фарбування біоплівки проводили за допомогою XTT. Оптичну щільність вимірювали при 485 нм. Діагональні полоси показують дані для C. albicans. Заповнені чорні стовпчики показують дані для C. glabrata.

На фігурі 4b представлена життєздатність біоплівок C. albicans та C. glabrata після обробки GDA у різних концентраціях протягом 48 г. Фарбування біоплівки проводили за допомогою XTT. Оптичну щільність вимірювали при 485 нм. Діагональні полоси показують дані для C. albicans. Заповнені чорні стовпчики показують дані для C. glabrata.

На фігурі 5 представлений вплив GDA на зрілу біоплівку C albicans та C. glabrata. Зрілу біоплівку (що вирощували протягом 48 г.) інкубували з GDA протягом 5 г. при 37 °C, а потім клітини при серійному розведенні висівали на чашку з YPD для оцінки виживання клітин.

На фігурі 6a представлено мікрофлюїдне дослідження розвитку біоплівки необробленої C. albicans у мінімальному середовищі з pH 7,0. Необроблені клітини здебільшого утворюють гіфи.

На фігурі 6b представлено мікрофлюїдне дослідження розвитку біоплівки C albicans, обробленої у мінімальному середовищі гідролізатом GDA при x50 кінцевій концентрації з pH 3,8. Додавання GDA приводило до того, що C. albicans росла переважно у вигляді дріжджової форми, а не у вигляді гіф.

Матеріали та методи

Глюконо-δ-лактон

Твердий глюконо-δ-лактон (GDA, CAS 90-8-2) отримували від комерційних постачальників.

Аналіз утворення біоплівки

Штами дріжджів вирощували при 37 °C у повному середовищі YPD (0,5 % (маса/об'єм) дріжджового екстракту, 1 % (маса/об'єм) пептону, 2 % (маса/об'єм) глюкози) або мінімальному середовищі, що складається з YNB (основи азотного агару для дріжджів без амінокислот та сульфату амонію, FORMEDIUM™, CYN0505), доповненому 0,5 % (маса/об'єм) сульфату амонію, 0,2 % (маса/об'єм) глюкози та 100 мМ L-проліну. При необхідності для затвердіння середовища використовували 2 % (маса/об'єм) агару. Для аналізу біоплівки (середовища біоплівки) використовували рідке мінімальне середовище (YNB (основу азотного агара для дріжджів без амінокислот та сульфату амонію, FORMEDIUM™, CYN0505), доповнене 0,5 % сульфату амонію, 0,2 % (маса/об'єм) глюкози та 100 мМ L-проліну).

В експериментах по впливу pH на біоплівку (приклад 2 нижче) отримували значення pH (від 2,6 до 6,6) із застосуванням або різних фосфатнокалієвих буферів при кінцевій концентрації 0,25 М, або шляхом додавання GDA до середовища біоплівки.

Штами дріжджів

Штами, які застосовували в експериментах по формуванню біоплівки, описані в таблиці 1.

Таблиця 1

Дріжджові штами, які застосовували в експериментах з біоплівкою

Оригінальна назва	Позначення лабораторного штаму	Опис	Посилання
Candida albicans SC5314	Y775	Дикого типу, вірулентний у мишиної моделі системної інфекції, секвенований штам	[A. M. Gillum, et al. Moї. Gen. Genet. 1984, 198, 179-182]
Candida glabrata CBS 138	Y1092	Дикого типу, тип штаму, виділеного з людських фекалій, секвенований штам	[B. Dujon, et al. Nature, 2004, 430, 35-44]

Вимірювання біоплівки

Біоплівку вимірювали у рідкій культурі, як описано [K. Scherz et al., G3 (Bethesda), 2014, 4, 1671-1680, I. Serrano-Fujarte et al. Biomed Res Int. 2015;2015:783639], з деякими модифікаціями. Перед аналізом біоплівки дріжджові культури вирощували у рідкому середовищі YPD протягом 24 годин до досягнення клітинами стаціонарної фази, потім осаджували шляхом центрифугування (1699 x g), промивали стерильною водою та клітини далі інокулювали у середовище тестованої біоплівки (YNB (основу азотного агару для дріжджів без амінокислот та сульфату амонію), доповнене 0,5 % сульфату амонію, 0,2 % глюкози та 100 мМ L-проліну з pH 7,0) при кінцевій концентрації 0,2 OD_{600}/мл та інкубували у 96-лункових мікротитровальних полістиролових планшетах з пласким дном (культуральні планшети Sigma Aldrich, Corning® Costar®, CLS3596-50EA) протягом 72 годин у термостаті при 37 °C. У визначені моменти часу до середовища додавали кристалічний фіолетовий (HT901-8FOZ; Sigma Aldrich) при кінцевій концентрації 0,05 %. Крім того, вимірювали загальну біомасу. Після 24 годин фарбування клітин лунки планшета промивали чотири рази 200 мкл води для видалення планктонних клітин (клітин, які не є частиною біоплівки), потім біоплівки висушували та розчиняли у 200 мкл 96 % етанолу. Вимірювання загальної біомаси та біоплівки, пофарбованої кристалічним фіолетовим, проводили при OD_{560} за допомогою пристрою для зчитування планшетів FLUOstar OPTIMA, BMG LABTECH. Вимірювання біоплівки, пофарбованої кристалічним фіолетовим, нормалізували відносно загальної біомаси (OD_{560} біоплівки/OD_{560} загальної біомаси).

Приклади

Приклад 1. Гідроліз глюконо-δ-лактону (GDA)

У водному розчині глюконо-δ-лактон (GDA) знаходиться у рівновазі з глюконовою кислотою (GA, CAS 526-95-4). GDA (200 мг) додавали до дистильованої H_2O (20 мл), буферу з pH 4, буферу з pH 5 або буферу з pH 7 при 37 °C. Оптичне обертання та pH вимірювали протягом часу. Оптичне обертання, що вимірювали при 37 °C, лінія D натрію, C = 10 мг/мл, довжина шляху = 10 см. Оптичне обертання GDA становило приблизно 66°. Оптичне обертання глюконової кислоти становило приблизно 5° [D. T. Sawyer, J. B. Bagger, J. Am. Chem. Soc, 1959, 81, 5302-5306]. Цей експеримент показав, що GDA повільно гідролізується до суміші GDA та GA (фіг. 1). Рівновага залежить від pH, та відповідні концентрації GDA присутні в усіх буферних умовах.

Приклад 2. Утворення біоплівки Candida ulbicuns при різних pH

Як видно на фіг. 2, GDA демонструє сильні ефекти у відношенні утворення біоплівки C. albicam, тоді як ефекти фосфатного буферу виражені значно менше. Крім того, GDA демонструє сильний ефект також при значеннях pH до щонайменше приблизно 6, тоді як ефект буферу зменшується вже при pH 5.

Приклад 3. Утворення біоплівки в моделі станів in vivo із застосуванням GDA

Гранули GDA (2,5 г, дубльовані зразки) додавали до буферного розчину з pH 3,71 (0,5 М КГЬРОд/ортофосфорна кислота, 10 мл) при 37 °C. Зразки (4 мл) брали в фіксовані моменти часу (1, 2, 3, 4, 5, 6 та 24 години) та додавали новий буферний розчин (4 мл). Зразки 50-кратно розбавляли середовищем біоплівки (див. вище) та кількість утвореної біоплівки вимірювали через 24 г., як описано вище. Як видно на фіг. 3a, вивільнений GDA значно зменшує кількість утвореної біоплівки у C. albicans. Крім того, гідроліз гранули, очевидно, достатньо повільний, щоб забезпечити профілактичний ефект протягом щонайменше до 24 годин, ймовірно, набагато більше. У C. glabrata ефект менше виражений (фіг. 3b).

Таблиця 2

Утворення біоплівки C. albicans та C. glabrata, оброблених GDA в моделі станів in vivo. Зразки брали через 1 г., 50-кратно розбавляли середовищем для визначення біоплівки та вимірювали кількість утвореної біоплівки через 24 г.

	Нормована біоплівка (% від контролю), 1 г.
Candida albicans	8,3
Candida glabrata	71

Результати показують, що утворення біоплівки як C. albicans, так і C. glabrata зменшувалося у присутності GDA. На додаток до зменшення утворення біоплівки GDA може впливати на життєздатність зрілої біоплівки C. albicans та C. glabrata.

Приклад 4. Життєздатність зрілих біоплівок C. albicans та C. glabrata, оброблених GDA

Життєздатність біоплівок C. albicans та C. glabrata після обробки GDA у різній концентрації та у різні періоди часу оцінювали за допомогою фарбування клітин за допомогою XTT. XXT представляє собою колориметричний аналіз для кількісного визначення клітинної життєздатності та цитотоксичності. Аналіз оснований на розщепленні солі тетразолію XTT, конверсії, яка відбувається тільки у життєздатних клітинах. Зрілу біоплівку піддавали впливу GDA протягом 24 г. Потім клітини 2 рази промивали PBS, після чого додавали реакційну суміш XTT. Через 30 хвилин вимірювали оптичну щільність при 485 нм.

Аналіз XTT показав значне зниження життєздатності C. glabrata вже після 24 г. інкубації (фіг. 4a). Ефект був менш виражений для C. albicans, але чітко спостерігався через 48 г. (фіг. 4b).

Крім того, зрілу біоплівку (вирощену протягом 48 г. у YNB, 0,2 % глюкози, 100 мМ проліну) C albicans та C. glabrata інкубували з GDA при різних концентраціях (0,05-0,5 г/мл) при 37 °C. Для цього видаляли середовище біоплівки (YNB, 0,2 % глюкози, 100 мМ проліну) та додавали GDA, який розчиняли у воді при концентрації 0,05, 0,1, 0,2 та 0,5 г/мл. Для оцінки виживання клітин після інкубації з GDA протягом 5 г. або 73 г. 5 мкл клітин висівали при серійному розведенні (від 1:10 до 1: 1000) на агаровому середовищі YPD. Посіяні клітини інкубували протягом 24 г. при 37 °C та візуально аналізували. У якості контролю використовували клітини зі зрілої біоплівки, обробленої водою. Виявили, що GDA знижує життєздатність клітин C. albicans та C. glabrata, особливо при високих концентраціях. При концентраціях 0,2 та 0,5 г/мл через 5 г. інкубації життєздатність клітин знижувалася приблизно у 100 разів і для C albicans, і для C glabrata. Після 73 г. інкубації з 0,5 г/мл GDA життєздатність клітин C albicans знижувалася приблизно у 1000 разів (дані не показані). C. glabraia виявилася більш чутливою до GDA (фіг. 5).

Приклад 5. Мікрофлюїдне дослідження розвитку біоплівки

Для моніторингу морфології клітин C. albicans автори даного винаходу вивчали розвиток біоплівки із застосуванням мікроскопії та мікрофлюїдного дослідження. Після того, як дріжджові клітини інокулювали, протягом першої години інкубації у середовищі біоплівки (YNB, доповненому 100 мМ проліну та 0,2 % глюкози, pH 7,0) починали формуватися гіфи. На фіг. 6a показані необроблені клітини через 5 г. Гранулу GDA (2,5 г) додавали до буферного розчину з pH 3,71 (0,5 M KH_2PO_4/ортофосфорна кислота, 10 мл) при 37 °C. Зразок брали через 1 г., 50-кратно розбавляли середовищем біоплівки та додавали до C. albicans. Через 5 г. більшість оброблених клітин являлися плактонними (фіг. 6b).

Приклад 6. Життєздатність різних видів Candida у присутності GDA

Інші досліджувані види Candida також були чутливими (тобто вимірювали життєздатність клітин із застосуванням аналізу з XTT, див. приклад 4) до GDA. Однак вони проявляли різні рівні чутливості. Candida albicans SC5314 показала найменшу сприйнятливість, а силіконовий ізолят Candida krusei A4-1 показав найвищу сприйнятливість. Токсичність GDA опосередкована пошкодженням клітинної стінки, оскільки клітини, що піддавалися впливу GDA, мали більш низьку життєздатність на середовищі з калькофлуором білим у порівнянні із середовищем, доповненим осмотичним стабілізатором (0,5 M сахарозою), та у порівнянні з необробленими клітинами на цих середовищах. У таблиці 3 коротко описані якісні ефекти, які демонструє GDA.

Таблиця 3

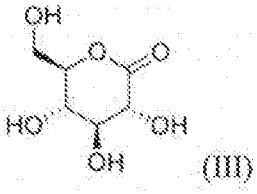
Чутливість різних видів Candida до GDA

Штам	Чутливість до GDA, 24-годинна дія, планшети
C albicans SC5314	+
C. glabrata CBS 138	++++++
силіконовий ізолят C. tropicalis U3-3	++++++++
силіконовий ізолят C. krusei U3-5	++
силіконовий ізолят C tropicalis A6-1	+++
силіконовий ізолят C. krusei U2-12	++++++++
силіконовий ізолят C. krusei A5-2	++
силіконовий ізолят C. krusei A4-1	

На закінчення (i) GDA може руйнувати зрілу біоплівку, утворену C. albicans та C. glabrata, (ii) при дії GDA C. albicans трансформується у дріжджову форму, тоді як виживання C. glabrata знижується, (iii) ефект очевидний навіть по відношенню до інших штамів, тобто C. tropicalis та C. krusei.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Застосування фармацевтичного складу для вагінального введення в попередженні або лікуванні урогенітальної грибкової інфекції, при цьому вказаний склад складається з глюконо-δ-лактону (формула (III))



(III)

та одного або декількох фармацевтично прийнятних допоміжних засобів, при цьому глюконо-δ-лактон присутній у кількості 5-99 мас. % складу.

2. Застосування за п. 1, при цьому глюконо-δ-лактон присутній у кількості, що становить 10-70 мас. % складу, переважно 20-70 мас. % складу.

3. Застосування за п. 1 або 2, при цьому склад містить не більше 10 мас. % води, переважно не більше 5 мас. %.

4. Застосування за будь-яким з пп. 1-3, при цьому фармацевтично прийнятний допоміжний засіб являє собою носій, наповнювач та/або буферний або регулюючий pH агент.

5. Застосування за будь-яким з пп. 1-4, при цьому фармацевтичний склад складений для вивільнення сполуки формули (III) протягом тривалого періоду часу, наприклад протягом щонайменше 4 годин, протягом щонайменше 6 годин, протягом щонайменше 8 годин або протягом щонайменше 24 годин, після введення, такого як інтравагінальна вкладка.

6. Застосування за будь-яким з пп. 1-5, при цьому фармацевтичний склад складений у вигляді тампона, вагіторія, вагінального аерозолю, вагінального ковпачка, вагінального гелю, вагінальної вкладки, вагінального пластиру, вагінального кільця, вагінальної губки, вагінального супозиторія, вагінального крему, вагінальної емульсії, вагінальної піни, вагінального лосьйону, вагінальної мазі, вагінального порошку, вагінального шампуню, вагінального розчину, вагінального спрею, вагінальної суспензії, вагінальної таблетки, вагінальної палички, вагінального диска, вагінального пристрою та будь-якої їх комбінації, або при цьому фармацевтичний склад присутній у гігієнічному виробі, переважно тампоні, гігієнічній серветці, прокладці або підгузку для страждаючих нетриманням, або прокладці, що прикріплюється до нижньої білизни.

7. Застосування за п. 6, при цьому фармацевтичний склад складений у вигляді вагіторія, вагінальної вкладки, вагінального кільця, вагінального супозиторія, вагінальної таблетки, вагінальної палички або вагінального диска.

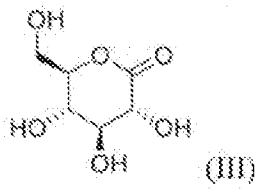
8. Застосування за будь-яким з пп. 1-7, при цьому фармацевтичний склад має здатність зменшувати або попереджувати утворення біоплівки видами Candida.

9. Застосування за будь-яким з пп. 1-8, при цьому урогенітальна грибкова інфекція являє собою вульвовагінальну грибкову інфекцію.

10. Застосування за будь-яким з пп. 1-8, при цьому урогенітальна грибкова інфекція являє собою вульвовагінальний кандидоз.

11. Застосування за п. 10, при цьому вульвовагінальний кандидоз спричинений Candida albicans, Candida glabrata, Candida krusei та/або Candida tropicalis.

12. Застосування глюконо-δ-лактону (формула (III))



(III)

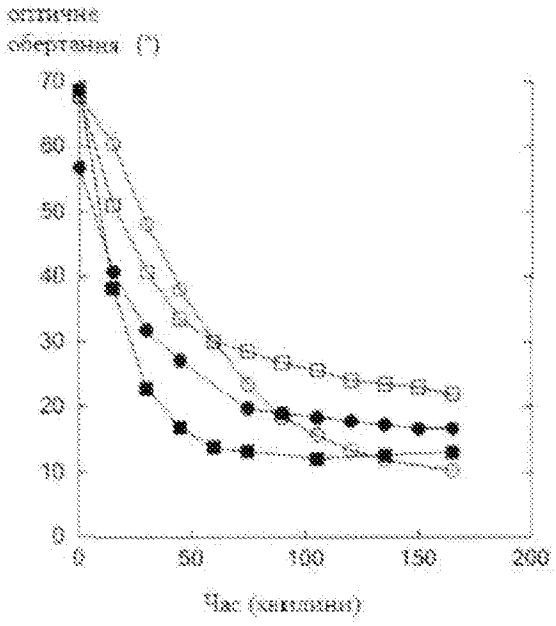
у попередженні або лікуванні грибкової інфекції.

13. Застосування за п. 12, при цьому грибкова інфекція являє собою урогенітальну грибкову інфекцію.

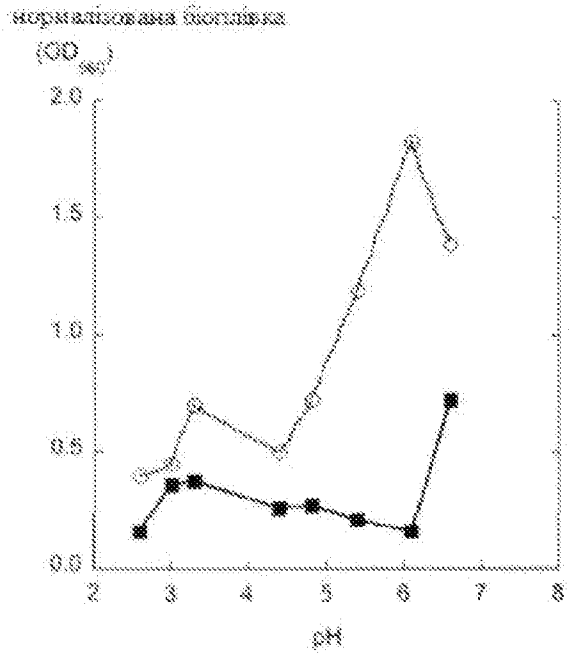
14. Застосування за п. 13, при цьому урогенітальна грибкова інфекція являє собою вульвовагінальний кандидоз.

15. Застосування за п. 14, при цьому вульвовагінальний кандидоз спричинений Candida albicans, Candida glabrata, Candida krusei та/або Candida tropicalis.

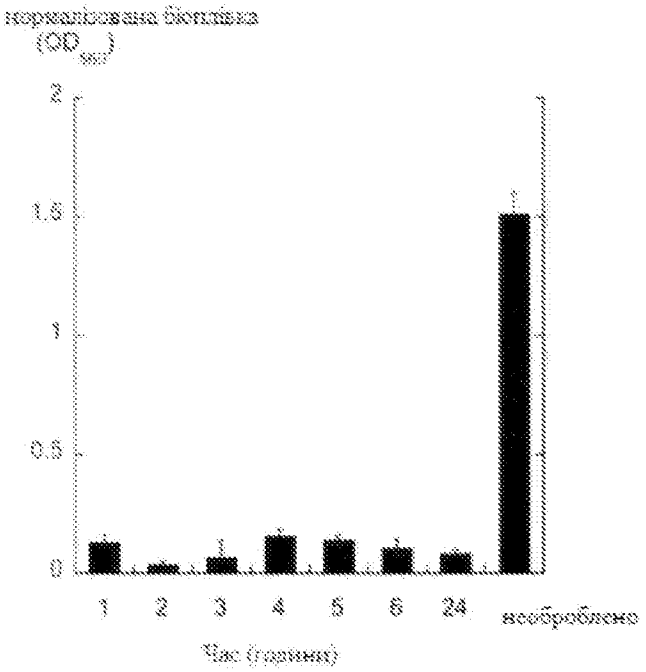
16. Застосування за п. 12, при цьому глюконо-δ-лактон присутній у складі, що складається з глюконо-δ-лактону та одного або декількох фармацевтично прийнятних допоміжних засобів.



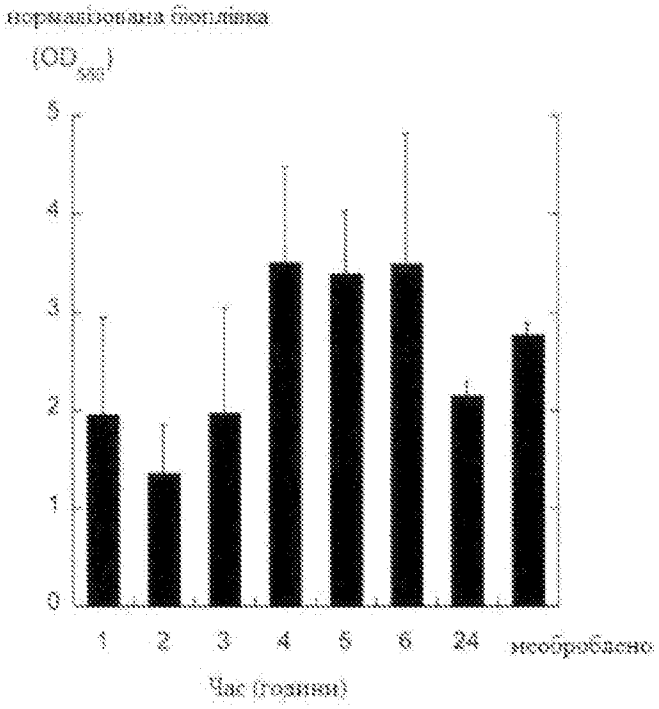
Фіг. 1



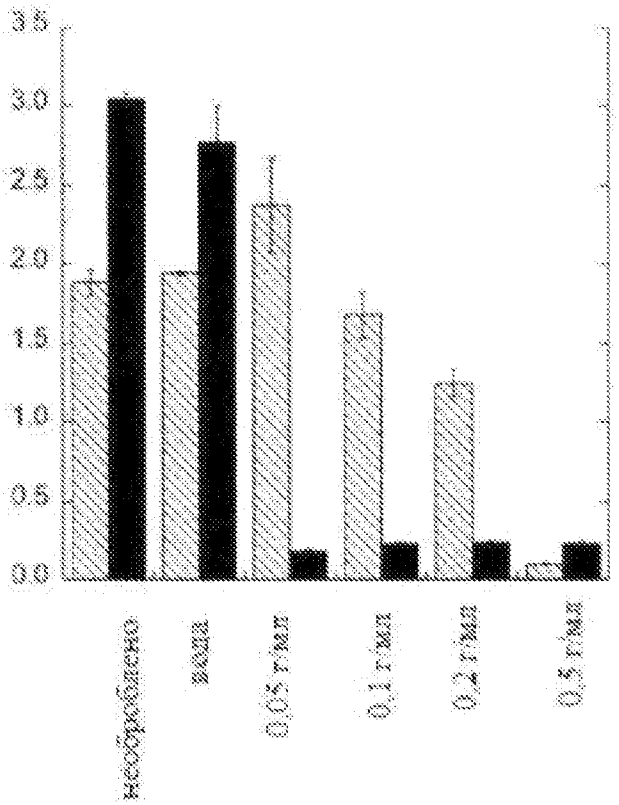
Фіг. 2


кількісна біоплівка
(OD595)
2
1.5
1
0.5
0
1
2
3
4
5
6
24
необроблено
Час (години)

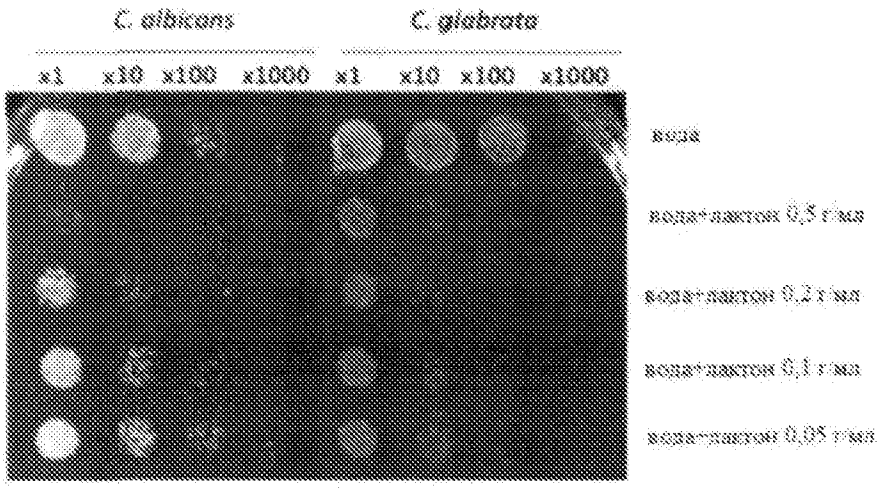
Фіг. 3a


кількісна біоплівка
(OD595)
5
4
3
2
1
0
1
2
3
4
5
6
24
необроблено
Час (години)

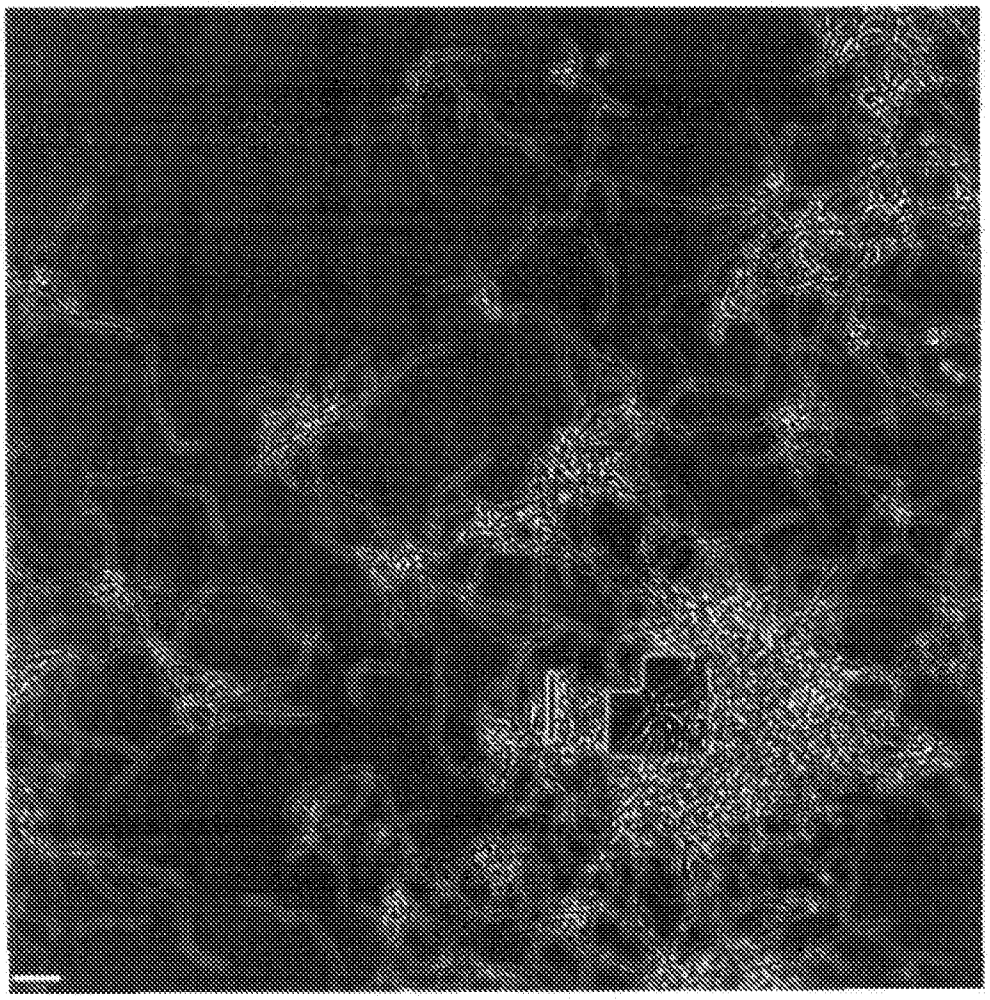
Фіг. 3b


3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
необработано
вода
0,05 г/мл
0,1 г/мл
0,2 г/мл
0,5 г/мл

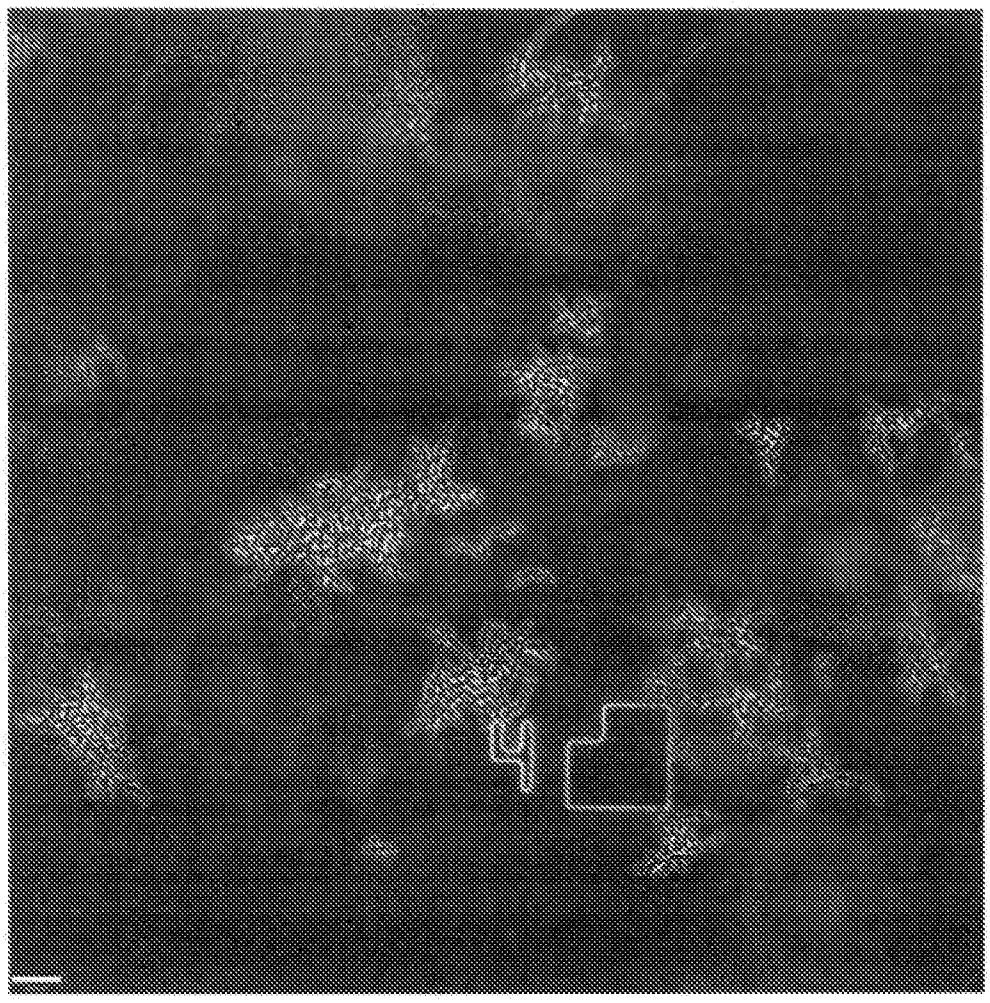
Фіг. 4а


C. albicans
C. glabrata
x1
x10
x100
x1000
x1
x10
x100
x1000
вода
вода+лактон 0,5 г/мл
вода+лактон 0,2 г/мл
вода+лактон 0,1 г/мл
вода+лактон 0,05 г/мл

Фіг. 5



Фіг. 6а



Фіг. 6b

Комп'ютерна верстка О. Рябко

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601