



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 106743

(13) C2

(51) МПК

A61K 38/04 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21)	Номер заявки:	а 2011 10832	(74)	Представник:	Крилова Надія Іванівна, реєстр. №30
(22)	Дата подання заявки:	31.03.2010	(56)	Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 2007/050565 A2, 03.05.2007 WO 2008/093058 A2, 07.08.2008 OOSTERHOF J J H ET AL: "THE INFLUENCE OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES AND MUCOLYTICS ON THE INTEGRITY OF BIOFILMS CONSISTING OF BACTERIA AND YEASTS AS AFFECTING VOICE PROSTHETIC AIR FLOW RESISTANCES", BIOFOULING (CHUR), HARWOOD ACADEMIC PUBLISHERS, CHUR, CH, vol. 19, no. 6, 1 December 2003 (2003-12-01), pages 347-353 JAYARAMAN A ET AL: "INHIBITING SULFATE-REDUCING BACTERIA IN BIOFILMS BY EXPRESSING THE ANTIMICROBIAL PEPTIDES INDOLICIDIN AND BACTENECIN", JOURNAL OF INDUSTRIAL MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, BASINGSTOKE, GB, vol. 22, 1 January 1999 (1999-01-01), pages 167-175 BECKLOFF NICHOLAS ET AL: "Activity of an antimicrobial peptide mimetic against planktonic and biofilm cultures of oral pathogens", ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, vol. 51, no. 11, November 2007 (2007-11), pages 4125-4132
(24)	Дата, з якої є чинними права на винахід:	10.10.2014			
(31)	Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	0905451.1, 61/165,396			
(32)	Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	31.03.2009, 31.03.2009			
(33)	Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	GB, US			
(41)	Публікація відомостей про заявку:	25.11.2011, Бюл.№ 22			
(46)	Публікація відомостей про видачу патенту:	10.10.2014, Бюл.№ 19			
(86)	Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/GB2010/000631, 31.03.2010			
(72)	Винахідник(и):	О'Ніл Дебора (GB), Мерсер Деррі (GB), Шарп'є Седрік (GB)			
(73)	Власник(и):	НОВАБАЙОТІКС ЛІМІТЕД, The Cruickshank Building, Craibstone, Aberdeen AB21 9TR, United Kingdom (GB)			

(54) ЗАСТОСУВАННЯ ЦИСТЕАМІНУ ЯК ПРОТИМІКРОБНОГО АГЕНТА

(57) Реферат:

Заявлений винахід стосується способу лікування або запобігання утворенню біоплівки із застосуванням цистеаміну як антимікробного пептиду.

UA 106743 C2

Винахід стосується продуктів, композицій, способів та застосувань, які можуть бути корисними для запобігання та усунення біоплівки.

Мікробна біоплівка є колонією мікробних клітин, що вбудована у позаклітинний матрикс полімерних субстанцій та прикріплюється до біологічної або небіологічної поверхні. У цих біоплівках може бути знайдений цілий ряд мікроорганізмів (бактерії, гриби, та/або протозоа, з відповідними бактеріофагами та іншими вірусами). Біоплівки, поширені повсюдно в природі, звичайно знаходять у різних середовищах. Залучення біоплівок до багатьох інфекцій, та особливо їх внесок у невіддатливість інфекційного лікування зараз отримує все більше визнання у науковому та медичному суспільстві.

Біоплівки є етіологічними агентами для цілого ряду хворобливих станів у ссавців та беруть участь у 80 % інфекцій людини. Наприклад, шкірні та ранові інфекції, інфекції середнього вуха, інфекції шлунково-кишкового тракту, інфекції перитонеальної мембрани, сечостатевого тракту, м'яких тканин ротової порожнини, утворення зубного нальоту, очні інфекції (в тому числі забруднення контактних лінз), ендокардити, інфекції при муковісцидозі, та інфекції від медичних пристроїв, що знаходяться у тілі постійно, як-то від суглобних протезів, зубних імплантатів, катетерів та серцевих імплантатів.

Планктонні мікроби (тобто мікроорганізми, суспендовані в рідкому середовищі, або що там підросуються) звичайно застосовуються у якості моделей для дослідження антимікробної чутливості, як описано Інститутом клінічних та лабораторних стандартів (CLSI) та Європейським комітетом по чутливості до антимікробних препаратів (EUCAST). Мікроби у біоплівках є значно більш стійкими до антимікробної обробки, ніж їх планктонні аналоги. Проте, зараз не існує стандартизованого способу для вивчення антибіотичної сприйнятливості біоплівок мікробів.

Створення біоплівки не обмежується лише здатністю мікробів прикріплюватися до поверхні. Мікроби, що зростають у біоплівці можуть більш активно взаємодіяти між собою, ніж мікроби з самого субстрату, на якому ця біоплівка була спочатку створена. Наприклад, цей феномен сприяє кон'югативному перенесенню гена, яке трапляється з більшою мірою між клітинами у біоплівці, ніж між планктонними клітинами. Це надає додаткові можливості для горизонтального перенесення генів між бактеріями, та є важливим, тому що може сприяти перенесенню антибіотичної стійкості або генів вірулентної детермінанти від стійких до сприйнятливих мікробів. Бактерії можуть підтримувати зв'язок між собою за допомогою системи, що відома як "відчуття кворуму", через яку сигнальні молекули потрапляють в навколишнє середовище та їх концентрація може бути виявлена навколишніми мікробами. "Відчуття кворуму" дозволяє бактеріям координувати свою поведінку, підвищуючи тим самим їх здатність вижити. Прояви "відчуття кворуму" охоплюють адаптацію до наявності споживних речовин, захист проти інших мікроорганізмів, які можуть конкурувати за ці споживні речовини та уникнення токсичних компонентів, які є потенційно небезпечними для бактерій. Для патогенної бактерії протягом інфекції хазяїна (наприклад, людини, інших тварин або рослин) є дуже важливим координувати свою вірулентність, щоб уникнути імунної відповіді хазяїна для того, щоб мати можливість створити успішне зараження.

Формування біоплівки грає ключову роль у багатьох інфекційних захворюваннях, як-то муковісцидоз та періодонтит, у інфекціях крові та сечостатевого тракту та як наслідок наявності медичних пристроїв, що знаходяться у тілі постійно. За припущенням, механізми, за допомогою яких пов'язані з біоплівкою мікроорганізми викликають хвороби своїх хазяїв охоплюють наступне: (i) затримка проникнення антимікробного агенту крізь матрикс біоплівки, (ii) відокремлення клітин або клітинних агрегатів від введених медичних пристроїв біоплівками, (iii) продукування ендотоксинів, (iv) стійкість до імунної системи хазяїна, (v) надання ніші для створення резистентних організмів шляхом горизонтального переносу генів стійкості до протимікробних препаратів та/або генів вірулентної детермінанти, та (vi) зміненого темпу зростання (тобто метаболічного спокою) (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).

Останні експериментальні дані свідчать про існування в межах біоплівки невеликої субпопуляції спеціалізованих, не-метаболізуючих резистентних клітин (сплячих клітин). Вважається, що ці клітини можуть бути відповідальними за високу стійкість / толерантність біоплівки до антимікробних агентів. Клітини, толерантно-стійкі до декількох ліків є присутніми як у планктонної, так і у біопліркової популяціях, та здається, що у дріжджів та у бактерій розвивалися аналогічні стратегії, які забезпечують функцію виживання цієї субпопуляції. Захист, який надається полімерним матриксом дозволяє резистентним клітинам ухилятися від елімінації та бути джерелом репопуляції. Існує доказ, що такі клітини можуть бути значною мірою відповідальними за толерантність мікробної біоплівки до багатьох ліків (LaFleur et al.,

Antimicrob Agents Chemother. 50: 3839-46, 2006; Lewis, Nature Reviews Microbiology 5, 48-56 (2007).

Тому залишається необхідність кращої терапії для упередження створення біоплівки та лікування станів, пов'язаних з мікробними біоплівками.

Відповідно до першого аспекту заявленого винаходу пропонується продукт, що містить не менше двох антибіоплівкових агентів, де принаймні один з антибіоплівкових агентів є антимікробним пептидом. Інший антибіоплівковий агент може бути диспергатором або антиадгезивним агентом.

Термін "антибіоплівковий агент" застосовується тут для описання агенту, який є здатним руйнувати або інгібувати ріст мікробної біоплівки. Антибіоплівковий агент може бути здатним до порушення структури біоплівки, наприклад, позаклітинного слизового матриксу, або може бути здатним до руйнації або інгібування росту мікробних клітин у біоплівці.

Винахід крім того надає спосіб запобігання створення біоплівки у середовищі, що має етап введення до середовища антимікробного пептиду. Переважно, спосіб має етап введення до середовища продукту відповідно до винаходу.

Винахід також надає спосіб лікування мікробної інфекції, а особливо мікробної біоплівки шляхом профілактики або терапії, що містить введення терапевтично ефективного рівню антимікробного пептиду, наприклад, катіонного пептиду. Типовий спосіб має послідовне або комбіноване введення терапевтично ефективної кількості:

- Першого антибіоплівкового агенту; та
- Другого антибіоплівкового агенту, що відрізняється від першого; де принаймні один перший та другий антибіоплівкові агенти є антимікробними пептидами, наприклад, катіонними пептидами.

Вищевказані активні агенти можуть бути введені у якості вільних або зафіксованих комбінацій. Вільні комбінації можуть бути надані у вигляді наборів комбінацій, що містять всі активні речовини у вільній комбінації. Зафіксовані комбінації звичайно надаються у вигляді пігулок або капсул.

Винахід також містить застосування у виробництві лікарського засобу для лікування мікробної інфекції, а особливо мікробної біоплівкової інфекції, шляхом профілактики або терапії антимікробними пептидами, або комбінаціями вищевказаних активних агентів.

Ці продукти мають перевагу, тому що вони проявляють антибактеріальну активність проти, зокрема, резистентних клітин, присутніх у біоплівці, що є суттєвим кроком у напрямку викорінювання біоплівок.

Агенти винаходу можуть бути введені у вигляді фармацевтично прийнятних солей. Фармацевтично прийнятні солі заявленого винаходу можуть бути синтезовані з вихідного компонента, який містить основні або кислі групи традиційними хімічними способами. Головним чином, такі солі можуть бути приготовані шляхом реагування вільних кислотних або основних форм цих компонентів з стехіометричною кількістю відповідної основи або кислоти у воді або у органічному розчиннику, або у суміші обох; головним чином, бажано у неводномусередовищі, як-то етер, етилацетат, етанол, ізопропанол, або ацетонітрил. Перелік прийнятних солей наведено у Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., US, 1985, p. 1418, що включено тут у якості посилання; див. також Stahl et al, Eds, "Handbook of Pharmaceutical Salts Properties Selection and Use", Verlag Helvetica Chimica Acta and Wiley-VCH, 2002. Фраза "фармацевтично прийнятні", що застосована тут, має відношення до тих компонентів, матеріалів, композицій, та/або видів дозування, які є, за медичними висновками, придатними для застосування у контакті з тканинами людини або, залежно від обставин, тварин без надмірної токсичності, хворобливої чутливості, алергічної реакції, або інших проблем або ускладнень, співрозмірних з розумним співвідношенням користь / ризик.

Отже, винахід містить фармацевтично прийнятні солі зазначених компонентів, де батьківський компонент є модифікований створенням його кислоти або солі основи, традиційної нетоксичної солі або четвертинної солі амонію, яка утворюється, наприклад, від неорганічних або органічних кислот або основ. Приклади таких кислотно-адитивних солей охоплюють ацетат, адипат, альгинат, аспартат, бензоат, бензенсульфонат, бісульфат, бутират, цитрат, камфорат, камфосульфат, циклопентанпропіонат, диглюконат, додецилсульфат, етансульфонат, фумарат, глюконтануат, гліцерофосфат, хемісульфат, гептаноат, гексаноат, гідрохлорид, гідробромід, гідройодід, 2-гідроксіетансульфонат, лактат, малеат, метансульфонат, 2-нафталенсульфонат, нікотинат, оксалат, памоат, пектинат, персульфат, 3-фенілпропіонат, пікрат, піволат, пропіонат, сукцинат, тартрат, тіоціанат, тозілат, та ундеканоат. Основні солі охоплюють солі амонію, солі лужних металів, як-то солі натрію та калію, солі лужноземельних металів, як-то солі магнію та кальцію, солі з органічними основами, як-то солі діциклогексіламіна,

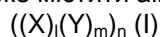
N-метил-D-глюкаміна, та солі з амінокислотами, як-то аргініном, лізином, та ін. Також, базові групи, що містять нітроген, можуть бути кватернізовані такими агентами, як нижчі галоїдні алкіли, як-то метил, етил, пропіл, та бутилхлориди, броміди та йодиди; діалкілсульфати, як-то диметил, діетил, дибутил; та діамілсульфати, довголанцюгові галогеніди, децил, лаурил, муристил, та стеарил хлориди, броміди та йодиди, аралкілові галогеніди, як-то бензил та фенетилброміди та ін.

Отже, винахід стосується фармацевтичних продуктів, що головним чином містять принаймні:

- перший антибіоплівковий агент; та

- другий антибіоплівковий агент, що відрізняється від першого, де принаймні один перший та другий антибіоплівкові агенти є антимікробним пептидом, наприклад, катіонним пептидом.

Перший антибіоплівковий агент може бути антимікробним пептидом, наприклад, антибактеріальним пептидом. Переважно, перший антибіоплівковий агент є антимікробним пептидом, в подальшому знаний як "перший антимікробний агент". Перший антимікробний агент може містити амінокислоти формули I:



Де l та m є цілими числами від 1 до 10, наприклад, від 1 до 5; n є цілим числом від 1 до 10; X та Y, які можуть бути однаковими або різними, є незалежно гідрофобною або катіонною амінокислотою.

Переважно, перший антимікробний агент містить амінокислоти формули (I) де X та Y є катіонною амінокислотою.

Антимікробний пептид може містити від 2 до 200 амінокислот, наприклад, від 3, 4, 5, 6, або 7, до 100 амінокислот, в тому числі, 3, 4, 5, 6, або 7, до 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 або 50 амінокислот. Відповідно до одного втілення, антимікробний пептид містить від 3 або 4 до 50 амінокислот. Альтернативно, пептид може містити більш ніж 27 амінокислот, звичайно від 27 до 300 амінокислот, відповідно від 27 до 200 амінокислот.

Пептид може містити від 100 до 200 амінокислот, від 20 до 100, 20 та 45 амінокислот, як-то 20, 25, 30, 35, 40, 42 або 45 амінокислот. Пептид може містити від 3 до 15 амінокислот, наприклад, від 5 до 15 амінокислот.

Як тут застосовано, термін "гідрофобний" має відношення до амінокислот, що мають боковий ланцюг, який є незарядженим при фізіологічному рН, є неполярним, та який звичайно відштовхується від водного розчину.

Як тут застосовано, термін "катіонний" має відношення до амінокислот, що мають сумарний заряд, який більше або дорівнює 0. Головним чином термін "катіонний" має відношення до амінокислот що мають сумарний заряд, який є більше 0.

Головним чином, гідрофобний амінокислотний залишок має гідрофобність більше або рівну -1.10 та заряд більше або рівний 0.

Гідрофобні амінокислоти можуть охоплювати лейцин, фенілаланін, пролін, аланін, триптофан, валін, ізолейцин та метіонін.

Переважно, X та/або Y є катіонними амінокислотами, наприклад, вибраними з групи, що містить гістидин, аргінін та лізин. Переважно ще, X та/або Y є аргініном або лізином. X та/або Y можуть бути вибрані з амінокислот, які не зустрічаються в природі, наприклад, катіонної амінокислоти орнітину.

X та/або Y можуть бути оптичними ізомерами катіонних амінокислот, як це визначено тут, наприклад, D або L- амінокислотами. Більш того, X та/або Y можуть бути амінокислотами, що змінюють одна одну.

Амінокислоти можуть бути природними або синтетичними. Винахід також стосується відомих ізомерів (структурних, стерео-, конфірмаційних та конфігураційних) та структурних аналогів вищезгаданих амінокислот, та такі, що змінені або природнім шляхом (наприклад, пост-трансляційною модифікацією) або хімічно, в тому числі, але не тільки, фосфорилуванням, глікозилюванням, сульфонуванням та/або гідроксилюванням.

Відповідно до одного втілення пептид може містити одне або більше заміщень катіонних або гідрофобних амінокислот X та Y. Проте, пептид буде переважно містити катіонні або гідрофобні амінокислоти X та Y. Звичайно пептид може містити від 1 до 5 заміщень, відповідно від 1 до 3 заміщень, головним чином одне заміщення. Ці заміщення можуть бути термінальні або нетермінальні.

Заміщення можуть складатися з амінокислот, або не амінокислот. Заміщення можуть бути аряджені або незаряджені. Звичайно одне або більше заміщень є незарядженими амінокислотами. Альтернативно або додатково одне або більше заміщень може бути не амінокислотами, як-то цистеамін.

Переважно, X та Y є однаковими, та є лізином або аргініном.

Відповідно до одного втілення, пептид переважно містить аргінінову амінокислоту, яка може бути заміщена на одну або більше амінокислот, які не є аргініном.

Головним чином, пептид містить від 7 до 20 аргінінових амінокислот, необов'язково заміщених 1 – 5 неаргініновими амінокислотами, звичайно 3 – 5 неаргініновими заміщеннями.

Альтернативно, пептид може містити 7 – 20 лізинових амінокислот, необов'язково заміщених 1 – 5 нелізиновими амінокислотами, звичайно на від 3 до 5 нелізиновими заміщеннями.

Згідно ще одного втілення, пептид може містити від 27 до 300 лізинових амінокислот, головним чином від 27 до 200 лізинових амінокислот. Звичайно пептид не містить нетермінальні заміщення з нелізинових амінокислот.

У пептиді Формули(I) I та m можуть бути 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10 та n можуть бути 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10.

У пептиді Формули(I) I може бути 1, n може бути 1 та m може бути між 4 та 9, наприклад, m може бути 3, 4, 5, 6, 7, 8 або 9.

У пептиді Формули(I) I, n та/або m може бути між 1 та 5, наприклад, 1, 2, 3, 4 або 5.

У пептиді Формули(I) I та m може бути цілим числом між 0 та 7 та n може бути ціле число між 1 та 10.

У пептиді Формули(I) I та m може бути 0, 1 або 2 та n може бути цілим числом між 1 та 10.

У пептиді Формули(I) X та Y можуть бути однаковими, I може бути 0, m може бути 1 та n може бути 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10.

У пептиді Формули(I) X та Y можуть бути однаковими, I та m можуть бути 1 та n може бути 2, 3, 4 або 5.

У пептиді Формули(I) X та Y можуть бути однаковими, I може бути 1, m може бути 2 та n може бути 1, 2, 3 або 4.

У пептиді Формули(I) X та Y можуть бути однаковими, I та m може бути 2 та n може бути 1, 2, 3 або 4.

Переважно, перший антимікробний агент містить пептидну послідовність, вибрану з групи, що охоплює полілізин та поліаргінін.

У одному втіленні, перший антимікробний агент містить полілізин.

У альтернативному втіленні, перший антимікробний агент містить поліаргінін.

Відповідно до іншого аспекту заявленого винаходу, надано застосування першого антимікробного агента у процедурі запобігання виникненню біоплівки.

Звичайно, перший антимікробний агент є у вигляді продукту винаходу, як описано нижче.

Другий антибіоплівковий агент може бути будь-яким агентом, який інгібує створення біоплівки. Як приклад, другий антибіоплівковий агент може інгібувати бактеріальну адгезію, гідрофобність або виробництво слизу. Другий антибіоплівковий агент може бути вибраний від диспергаторів та антиадгезивних агентів.

Відповідно до одного втілення заявленого винаходу другий антибіоплівковий агент не є пептидом.

Під терміном "диспергатор" мається на увазі будь-який агент, здатний до диспергування частин біоплівки. Зокрема, диспергатор може сприяти дисперсії слизу, виробленого мікробами, такими як бактерії, слиз яких утворює частину біоплівки наприклад, слиз, що продукується клітинами, до яких прикріплюються біоплівкові мікроби, та біоплівковими мікробами, такими як бактерії.

Диспергатор може бути муколітичним агентом. Муколітичний агент може бути, наприклад, ферментом, ДНКазою, альгіназою, протеазою або карбогідроазою. Альтернативно, муколітичний агент може бут малою молекулою, наприклад, аміном, як-то амінотіол або кислотою, як-то етилендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТА). Амін може бут вибраний від ацетилцистеїну та цистеаміну.

Під терміном "антиадгезивний агент" мається на увазі будь-який агент, здатний до інгібування адгезії між клітинами, білками та організмами, наприклад, мікробами, тим самим запобігаючи створення біоплівки або що сприяє саморуйнуванню біоплівки. Зокрема, антиадгезивний агент може запобігати адгезії до поверхні або субстрату всіх типів клітин, що зустрічаються у мікробній біоплівці, зокрема вільноживучих мікробів, тобто планктонних клітин. Антиадгезивні агенти можуть містити, але без обмеження, гіалуронан, гепарин або Карбопол 934.

Другий антибіоплівковий агент може бути антибактеріальним агентом. Антибактеріальний агент може бути муколітичним агентом, наприклад, муколітичним агентом, що має як

муколітичну, так і антибактеріальну активність. Переважно, антибактеріальний агент є цистеаміном.

Продукт заявленого винаходу може містити антимікробний пептид.

Бажаний продукт містить антимікробний пептид та муколітичний агент.

Співвідношення першого антибіоплівкового агенту до другого антибіоплівкового агенту у продуктах винаходу може бути від 1:10 до 10:1; головним чином принаймні 2:1, наприклад, принаймні 3:1 або 4:1. Відповідно до одного втілення, співвідношення першого антибіоплівкового агенту до другого антибіоплівкового агенту є приблизно 1:1. Переважно, перший антибіоплівковий агент є катіонним пептидом та другий антибіоплівковий агент є муколітичним агентом та співвідношення катіонного пептиду до муколітичного агенту сягає від 2:1 до 4:1. Відповідно до іншого втілення, співвідношення може дорівнювати приблизно 1:1.

Активні агенти можуть бути введені одночасно, послідовно або окремо. Активні агенти бути надані у вигляді пакетного комплекту. Пакетний комплект може містити продукт винаходу разом з інструкціями для одночасного, окремого або послідовного введення кожного з активних агентів. Для послідовного введення, активні агенти можуть бути введені в будь-якому порядку.

Активні агенти продукту винаходу можуть бути надані у вигляді фармацевтичних композицій, що додатково містять один або більше фармацевтично прийнятних розріджувачів, наповнювачів та/або носіїв. Це відноситься як до фіксованих, так і до вільних комбінацій.

Активні агенти заявленого винаходу можуть бути введені будь-яким прийнятним відомим фахівцям шляхом, переважно, у вигляді фармацевтичних композицій, адаптованих до такого шляху, та у ефективному для призначеного лікування дозуванні. Активні компоненти та композиції можуть, наприклад, бути введені парентерально, перорально, інтраназально, внутрішньобронхіально, ентерально, трансдермально, сублінгвально, ректально, вагінально, окулярно або топікально. Передбачене як місцеве, так і системне введення.

Для парентерального введення (термін "парентеральне", як тут застосовано, має відношення до способів введення, що охоплюють застосування внутрішньовенних, внутрішньом'язевих, ентеральних, внутрішньочеревинних, інтрастернальних, підшкірних та внутрішньосуглобових ін'єкцій та вливань (де більш бажаним є внутрішньовенне (у тому числі довготривале внутрішньовенне введення) розчинів у водному пропіленгліколі, а також стерильних водних розчинів відповідних розчинних у воді солей. Такі водні розчини можуть бути, у разі необхідності, відповідно буферизовані, та рідкий розріджувач спочатку робиться ізотонічним з достатньою кількістю фізіологічного розчину або глюкозою. Ці водні розчини є особливо придатними для внутрішньовенних, внутрішньом'язевих, підшкірних та внутрішньочеревинних ін'єкцій. У зв'язку з цим, застосоване стерильне водне середовище можна легко отримати за допомогою стандартних методів, добре відомих фахівцям.

Продукти винаходу також можуть бути введені інтраназально або шляхом інгаляції та звичайно поставляються у вигляді інгалятора з сухим порошком або аерозольного спрею з герметичним контейнером, насосом, розпилювачем, атомайзером, небулайзером, з або без застосування прийнятного пропеленту.

Альтернативно, продукти винаходу можуть бути введені у вигляді супозиторій або пессарій, або вони можуть бути застосовані місцево у вигляді гелю, гідрогелю, лосьйону, розчину, крему, мазі або порошку. Продукти винаходу можуть бути введені через шкіру або трансдермально, наприклад, застосуванням пов'язок на шкіру, ін'єкцією речовини сповільненої всмоктування або підшкірною ін'єкцією. Вони також можуть бути введені легенеvim шляхом або ректально.

Для перорального введення, фармацевтичні композиції можуть бути у вигляді; наприклад, пігулок, капсул, суспензії або рідини. Фармацевтичні композиції є переважно, зроблені у вигляді одиниць дозування, що містять певну кількість активного інгредієнту. Прикладами таких одиниць дозування є капсули, пігулки, порошки, гранули або суспензії, з традиційними добавками, як-то лактоза; манітол, зерновий або картопляний крохмаль; з оболонками, як-то кристалічна целюлоза, похідні целюлози, акація, зерновий крохмаль або желатини; з дезінтеграторами як-то зерновий або картопляний крохмаль або натрій карбоксиметилцелюлоза; та з мастилами, як-то тальк або стеарат магнію. Активний інгредієнт може також бути введений ін'єкцією композиції, у якій, наприклад, фізіологічний розчин, декстроза або вода можуть бути застосовані у якості прийнятного носія.

Продукти винаходу можуть також знайти застосування у пероральних препаратах, де продукт є разом з носієм, наприклад, вибраним з плівок, стрічок, гелів, мікросфер, пастилок, жувальної гумки, зубних паст та рідини для полоскання рота.

Кількість введеного терапевтично активного компоненту та схема прийому лікарського засобу для лікування хворобливого стану разом з компонентами та/або композиціями цього винаходу залежить від багатьох факторів, в тому числі від віку, ваги, статі та медичного стану

суб'єкту, суворості хвороби, способу та частоти введення, окремих застосованих компонентів, а також від фармакокінетичних властивостей індивідуального лікування, та таким чином може відрізнятися одне від одного. Дозування буде, звичайно, нижче якщо компоненти вводяться локально, а не системно, та для запобігання, а не для лікування. Такі процедури можна

5 проводити в міру необхідності та протягом часу, що визначається лікарем. Будь-якому фахівцю зрозуміло, що схема дозування або терапевтично ефективна кількість інгібітору для введення може бути оптимізована для кожного суб'єкта. Фармацевтичні композиції можуть містити активний інгредієнт у кількості від 0.1 до 2000 мг, бажано у кількості від близько 0.5 до 500 мг та ще більш бажано у кількості між 1 та 200 мг. Щоденна доза може дорівнювати від 0.01 до 100 мг

10 / кг маси тіла, бажано в діапазоні від 0.1 та 50 мг / кг маси тіла та ще більш бажано, приблизно від 1 до 20 мг / кг маси тіла. Щоденна доза може бути введена дозами від одної до чотирьох на добу.

Продукти винаходу переважно вводять крізь дихальні шляхи. Отже, заявлений винахід також стосується аерозольних фармацевтичних препаратів, що містять продукт винаходу.

15 Також надається розпилювач або інгалятор, що містить продукт винаходу.

Додатково, продукти винаходу можуть бути пристосовані до препаратів з сповільненим вивільненням лікарських форм та подібних. Препарати можуть бути влаштовані так, що вони вивільняють активні агенти, наприклад, у певну частину кишкового або дихального тракту, можливо протягом періоду часу. Покриття, оболонки та захисні матриці можуть бути створені,

20 наприклад, з полімерних субстанцій, як-то полілактид-глюколати, ліпосоми, мікроемульсії, мікрочастинки, наночастинки, або віски. Ці покриття, оболонки, та захисні матриці є придатними до покриття пристроїв, що знаходяться у тілі постійно, наприклад, стентів, катетерів, трубок перитонеального діалізу, дренажних пристроїв та под.

Продукти винаходу можуть містити синергічно ефективні кількості кожного визначеного тут активного агенту. Тому винахід включає в себе продукти, що містять синергічно ефективну кількість (i) першого антибіоплівкового агенту, (ii) другого антибіоплівкового агенту, який відрізняється від першого антибіоплівкового агенту та звичайно є антимікробним пептидом. Продукт може бути призначений для застосування у виробництві ліків, для одночасного, окремого або послідовного введення вказаних агентів у лікуванні мікробної інфекції, наприклад,

30 біоплівкової інфекції. Поняття "синергічно", як тут застосовано, може описувати дію двох або більше агентів продукту винаходу, що працюють разом, виробляючи більший ефект, ніж очікуваний сукупний ефект агентів, що застосовуються по окремі.

У додатковому аспекті винаходу був наданий субстрат, до якого продукт винаходу є прикладеним або прикріпленим. Як правило, субстрат є придатним для застосування до ран або доставки до місць поранень. Як правило, субстрат дозволяє перенесення активних агентів продукту винаходу від субстрату до поверхні рани для досягнення їх антибіоплівкової дії. Субстрат може бути перев'язаним, наприклад, рановою перев'язкою. Перев'язка може містити тканевий матеріал або це може бути колагеноподібний матеріал. Субстрат може бути у будь-якому придатному вигляді для застосування до ран, звичайно субстрат може бути у вигляді

40 гідрогелю, колоїду, мазі, крему, гелю, піни або спрею.

Продукти винаходу можуть також знаходити застосування як/у дезінфікуючий засіб або біоцид. У такому контексті, пептид або фармацевтичні композиції винаходу можуть бути прикладені, або самостійно, або у комбінації з іншими дезінфікуючими агентами, на поверхню для оброблення. Як тут застосовано, "поверхня для оброблення" може бути субстратом, як

45 визначено тут, та може містити медичні пристрої та пристрої, що знаходяться у тілі постійно, наприклад, стенти, катетери, трубки перитонеального діалізу, дренажні пристрої, суглобні протези, зубні імплантати та под.

Винахід надає спосіб запобігання створення біоплівки у навколишньому середовищі, що включає етап введення в навколишнє середовище продукту відповідно до винаходу. Спосіб

50 може бути *in vivo* або *ex vivo*.

Відповідно до одного втілення, спосіб має етап введення антимікробного пептиду.

Переважно спосіб має етапи введення

- першого антибіоплівкового агенту; та

- другого антибіоплівкового агенту, що відрізняється від першого, де принаймні один перший та другий антибіоплівкові агенти є антимікробним пептидом, наприклад, катіонним пептидом.

55

Навколишнє середовище може містити будь-який мікроорганізм, що формує біоплівку, вибраний від бактерій, грибів, дріжджів, вірусів та протозоа.

Звичайно мікроорганізм є бактерією, наприклад, грам-позитивною або грам негативною бактерією. Бактеріальний патоген може бути отриманий з видів бактерій, вибраних з групи, що охоплює: *Staphylococcus* spp., наприклад, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*;

60

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 груп A або B, Streptococcus pneumoniae; Helicobacter spp., наприклад, Helicobacter pylori; Neisseria spp., наприклад, Neisseria gonorrhea, 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, бактерії можуть охоплювати 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. Бажано, бактерії є вибраними від Pseudomonas spp., наприклад, Pseudomonas aeruginosa та Staphylococcus spp., наприклад, Staphylococcus aureus та Staphylococcus epidermidis.

Вірусний патоген може мати походження від вірусу, вибраного з групи, що охоплює: вірус імунodefіциту людини (HTVI & 2); Т- лімфотропний вірус людини (HTLV 1 & 2); вірус Ебола, вірус папіломи людини (наприклад, HPV-2, HPV-5, HPV-8 HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-52, HPV-54 та HPV-56); паповавірус; риновірус; поліовірус; вірус герпесу; аденовірус; вірус Епштейна - Барра; вірус грипу, віруси гепатиту В та С, вірус віспи, ротавірус або SARS коронавірус.

Паразитичний патоген може бути отриманий від паразитичних патогенів, вибраних з групи, що охоплює Trypanosoma spp. (Trypanosoma cruzi, Trypanosoma brucei), Leishmania spp., Giardia spp., Trichomonas spp., Entamoeba spp., Naegleria spp., Acanthamoeba spp., Schistosoma spp., Plasmodium spp., Cryptosporidium spp., Isospora spp., Balantidium spp., Loa Loa, Ascaris lumbricoides, Dirofilaria immitis, Toxoplasma spp., наприклад, Toxoplasma gondii.

Грибковий патоген може бути отриманим від патогенів грибків роду Candida spp., (наприклад, C.albicans), Epidermophyton spp., Exophiala spp., Microsporiim spp., Trichophyton spp., (наприклад, T.rubrum та T.interdigitale), Tinea spp., Aspergillus spp., Blastomyces spp., Blastoschizomyces spp., Coccidioides spp., Cryptococcus spp., Histoplasma spp., Paracoccidiomyces spp., Sporotrix spp., Absidia spp., Cladophialophora spp., Fonsecaea spp., Phialophora spp., Lacazia spp., Arthrographis spp., Acremonium spp., Actinomyces spp., Apophysomyces spp., Emmonsia spp., Basidiobolus spp., Beauveria spp., Chrysosporium spp., Conidiobolus spp., Cunninghamella spp., Fusarium spp., Geotrichum spp., Graphium spp., Leptosphaeria spp., Malassezia spp., Mucor spp., Neotestudina spp., Nocardia spp., Nocardiosis spp., Paecilomyces spp., Phoma spp., Piedraia spp., Pneumocystis spp., Pseudallescheria spp., Pyrenochaeta spp., Rhizomucor spp., Rhizopus spp., Rhodotorula spp., Saccharomyces spp., Scedosporium spp., Scopulariopsis spp., Sporobolomyces spp., Syncephalastrum spp., Trichoderma spp., Trichosporon spp., Ulocladium spp., Ustilago spp., Verticillium spp., Wangiella spp.

Відповідно до додаткового втілення, мікроорганізм може бути грибками, зокрема Candida.

Спосіб винаходу може бути використаний для мінімізації та, бажано, для запобігання утворення біоплівки у різноманітних середовищах, в тому числі, але без обмеження, домашньому господарстві, робочому місці, лабораторії, промислового середовищі, водному середовищі (наприклад, у трубопровідних системах), у медичних пристроях, в тому числі, тих, що знаходяться у тілі постійно як-то визначено тут, стоматологічних пристроях або зубних імплантатах, у тілі тварини, наприклад, людини.

Отже, спосіб винаходу може бути застосованим у роті для запобігання утворення зубного нальоту або карієсу на зубах людини або зубному імплантаті, наприклад, протезі.

Спосіб винаходу може бути застосований для запобігання або обмеження утворення біоплівки у тілі людини, особливо у лікуванні мікробних інфекцій. Стани, пов'язані з біоплівковими інфекціями можуть охоплювати місцеві інфекції, пероральні інфекції та системні інфекції. Місцеві інфекції можуть охоплювати рани, виразки та ушкодження, наприклад, шкірні рани, як-то порізи або опіки, та відповідні хворобливі стани.

Пероральні інфекції можуть охоплювати гінгівіт, періодонтит та мукозит.

Системні інфекції можуть охоплювати муковісцидоз та інші хворобливі стани, пов'язані з інфекціями слизових оболонок, наприклад, шлунково-кишкового тракту, сечостатевої та респіраторних інфекцій.

Інший аспект винаходу полягає у способах лікування, запобігання або затримки прогресування хвороби або хворобливого стану пов'язаного з присутністю мікробної біоплівкової інфекції у ссавця, особливо людини, шляхом введення терапевтично ефективної кількості продукту винаходу до ссавця.

Під "ефективною" кількістю або "терапевтично ефективною кількістю" мається на увазі кількість одної або декількох активних субстанцій, яка, в рамках медичних висновків, є достатня для забезпечення бажаної дії без надмірної токсичності, хворобливої чутливості, алергічної реакції, або інших проблем або ускладнень, співрозмірних з розумним співвідношенням користі до ризику.

Відповідно до одного аспекту заявленого винаходу, спосіб має етап введення антимікробного пептиду.

Переважно спосіб має етап введення

- першого антибіоплівкового агенту; та

- другого антибіоплівкового агенту, що відрізняється від першого, де принаймні один перший та другий антибіоплівкові агенти є антимікробним пептидом, наприклад, катіонним пептидом.

Винахід також стосується застосування продукту винаходу у виробництві ліків для лікування мікробної інфекції, а особливо мікробної біоплівкової інфекції, шляхом профілактики або терапії комбінацією активних агентів, описаних вище.

Додатково заявлений винахід полягає у застосуванні описаного вище антимікробного пептиду у виробництві ліків для лікування мікробної інфекції, а особливо мікробної біоплівкової інфекції, шляхом профілактики або терапії.

Отже продукт винаходу може бути корисним у запобіганні, затримці прогресування, або лікування хвороби або стану, що вибрані з групи, яка охоплює інфекції шкіри та ранові інфекції, інфекції середнього вуха, шлунково-кишкові інфекції, інфекції перитонеальної мембрани, урогенітальні інфекції, інфекції м'яких тканин ротової оболонки, утворення зубного нальоту, очні інфекції (в тому числі, зараження контактних лінз), ендокардити, муковісцидозні інфекції, та інфекції медичних пристроїв, що знаходяться у тілі постійно, які описано тут.

Винахід також стосується способів лікування, де продукт винаходу вводять ссавцю разом з одним або декількома іншими антибактеріальними агентами, наприклад, антибіотиками.

Винахідники несподівано знайшли, що певні диспергатори, зокрема муколітичні агенти, інгібують ріст резистентних клітин біоплівки. Отже, винахід також стосується способу лікування/попередження створення біоплівки у навколишньому середовищі, до якого входить введення до вказаного середовища муколітичного агенту, наприклад, цистеаміна. Муколітичний агент може бути введений самостійно або у комбінації з іншими антимікробними агентами, наприклад, антимікробним пептидом.

Винахід також надає спосіб лікування мікробної інфекції, а особливо мікробної біоплівки, шляхом профілактики або терапії, що містить введення терапевтично ефективної кількості диспергатору, зокрема муколітичного агенту, наприклад, цистеаміна.

Винахід, крім того, полягає у застосуванні диспергатору, зокрема муколітичного агенту, наприклад, цистеаміна, у виробництві ліків для лікування мікробної інфекції, а особливо біоплівкової мікробної інфекції.

Активні агенти, зазначені у цієї специфікації, можуть існувати у різних формах, як-то у вигляді вільних кислот, вільних основ, естерів та інших проліків, солей та таутомерів, та винахід містить всі варіантні форми агентів.

Протягом цього опису та Формули винаходу застосована одна охочлює також множину, якщо контекст не вимагає іншого.

Слід розуміти, що особливості, цілі числа, характеристики, компоненти, хімічні групи або групи, що наведені у поєднанні з конкретним аспектом, втіленням або прикладом винаходу можуть бути застосовані до будь-якого іншого аспекту, втілення або прикладу, що тут наведений, за виключенням несумісності з ними.

Протягом цього опису та Формули винаходу, слова "включати" та "містити" та варіанти слів, наприклад, "що містить" та "включає в себе", означають "в тому числі, але без обмеження", та не призначені до виключення інших фрагментів, додатків, компонентів, цілей або етапів.

Головним чином термін "приблизно" призначений для охоплення діапазону у 10 % або менше будь-якого чисельного значення, до якого це застосовано.

Крім того, аспекти та втілення винаходу викладені у наступному описі та Формулі винаходу.

Далі винахід буде описано за допомогою прикладів тільки з посиланням до наступних Фігур, у яких:

Фіг. 1: Антибактеріальна активність NP108 та NM001 (цистеамін) проти планктонних клітин *P. aeruginosa* ATCC BAA-47.

Фіг. 2: Антибактеріальна активність NP108 та NM001 (цистеамін) комбінацій проти планктонних клітин *P. aeruginosa* ATCC BAA-47.

Фіг. 3: Антибактеріальна активність NP108 та NM001 (цистеамін) проти планктонних клітин *S. aureus* DSM 11729.

5 Фіг. 4: Антибактеріальна активність NP108 та NM001 (цистеамін) комбінацій проти планктонних клітин *S. aureus* DSM 11729.

Фіг. 5: Активність NP339 проти клітин біоплівки грам-позитивних та грам-негативних бактерій.

10 Фіг. 6: Активність NP339 проти резистентних клітин грам-позитивних та грам-негативних бактерій.

Фіг. 7: Активність NP341 проти клітин біоплівки грам-позитивних та грам-негативних бактерій.

Фіг. 8: Активність NP341 проти резистентних клітин грам-позитивних та грам-негативних бактерій.

15 Фіг. 9: Активність NM001 (цистеамін) проти клітин біоплівки грам-позитивних та грам-негативних бактерій.

Фіг. 10: Активність NM001 (цистеамін) проти резистентних клітин грам-позитивних та грам-негативних бактерій.

20 Фіг. 11: Антибактеріальна активність NP108 та NM001 (цистеамін) комбінацій проти клітин біоплівки *P. aeruginosa* ATCC BAA-47.

Фіг. 12: Антибактеріальна активність NP108 та NM001 (цистеамін) проти резистентних клітин *P. aeruginosa* ATCC BAA-47.

Фіг. 13: Антибактеріальна активність NP108 та NM001 (цистеамін) комбінацій проти резистентних клітин *P. aeruginosa* ATCC BAA-47.

25 Фіг. 14: Антибактеріальна активність NP339 та NM001 (цистеамін) комбінацій проти клітин біоплівки (a) *P. aeruginosa* DSM 1128, (b) *P. aeruginosa* ATCC BAA-47, (c) *P. aeruginosa* DSM 1299 та (d) *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Фіг. 15: Антибактеріальна активність NP339 та NM001 (цистеамін) комбінацій проти резистентних клітин (a) *P. aeruginosa* DSM 1128 та (b) *P. aeruginosa* ATCC BAA-47.

30 Фіг. 16: Антибактеріальна активність NP108 та NM001 (цистеамін) проти клітин біоплівки *S. aureus* DSM 11729.

Фіг. 17: Антибактеріальна активність NP108 та NM001 (цистеамін) комбінацій проти клітин біоплівки *S. aureus* DSM 11729.

35 Фіг. 18: Антибактеріальна активність NP108 та NM001 (цистеамін) проти резистентних клітин *S. aureus* DSM 11729.

Фіг. 19: Антибактеріальна активність NP108 та NM001 (цистеамін) комбінацій проти резистентних клітин *S. aureus* DSM 11729.

40 Фіг. 20 та 21: Активність муколітичних агентів N-ацетилцистеїну (Фіг. 20(a) та 20(b)) та NM001 (цистеамін) (Фіг. 21(a) та 21(b)) поодиночі та у комбінації з NP341 проти планктонних клітин *P. aeruginosa* 27853.

Фіг. 22a: Необроблений контроль біоплівки *S. aureus* після 24 годин.

Фіг. 22b: Біоплівка *S. Aureus* через 24 годин після обробки 2 мг/мл NM001 (цистеамін).

Фіг. 22c: Біоплівка *S. Aureus* через 24 годин після обробки 0.2 мг/мл колістином (колістин).

Фіг. 22d: Біоплівка *S. Aureus* через 24 годин після обробки 0.2 мг/мл пептидом NP108.

45 Фіг. 23a: Необроблений контроль - біоплівка *S. Aureus* після 24 годин.

Фіг. 23b: Біоплівка *S. Aureus* через 24 годин після обробки 2 мг/мл NM001 (цистеамін).

Фіг. 23c: Біоплівка *S. Aureus* через 24 годин після обробки 0.2 мг/мл колістином.

Фіг. 23d: Біоплівка *S. Aureus* через 24 годин після обробки 0.2 мг/мл пептидом NP108.

Фіг. 24a: Необроблений контроль - біоплівка *P. aeruginosa* після 24 годин.

50 Фіг. 24b: Біоплівка *P. aeruginosa* через 24 годин після обробки 2 мг/мл NM001 (цистеамін).

Фіг. 24c: Біоплівка *P. aeruginosa* через 24 годин після обробки 0.2 мг/мл колістином.

Фіг. 24d: Біоплівка *P. aeruginosa* через 24 годин після обробки 2 мг/мл пептидом NP108.

Фіг. 25a: Необроблений контроль - біоплівка *P. aeruginosa* після 24 годин.

Фіг. 25b: Біоплівка *P. aeruginosa* через 24 годин після обробки 2 мг/мл NM001 (цистеамін).

55 Фіг. 25c: Біоплівка *P. aeruginosa* через 24 годин після обробки 0.2 мг/мл колістином.

Фіг. 25d: Біоплівка *P. aeruginosa* через 24 годин після обробки 2 мг/мл пептидом NP108.

Фіг. 26: Активність NP432 поодиночі та у комбінації з NM001 (цистеамін) або у комбінації з NP108 проти біоплівки *P. aeruginosa* PAO1.

60 Фіг. 27: Активність NP445 поодиночі та у комбінації з NM001 (цистеамін) або у комбінації з NP108 проти біоплівки *P. aeruginosa* PAO1.

Фіг. 28: Активність NP458 поодинці та у комбінації з NM001 (цистеамін) або у комбінації з NP108 проти біоплівки *P.aeruginosa* PAO1.

Фіг. 29: Активність NP462 поодинці та у комбінації з NM001 (цистеамін) або у комбінації з NP108 проти біоплівки *P.aeruginosa* PAO1.

5 Фіг. 30: Активність NP432 поодинці та у комбінації з NM001 (цистеамін) або у комбінації з NP108 проти біоплівки *S.aureus* ATCC25923.

Фіг. 31: Активність NP445 поодинці та у комбінації з NM001 (цистеамін) або у комбінації з NP108 проти біоплівки *S.aureus* ATCC25923.

10 Фіг. 32: Активність NP458 поодинці та у комбінації з NM001 (цистеамін) або у комбінації з NP108 проти біоплівки *S.aureus* ATCC25923.

Фіг. 33: Активність NP462 поодинці та у комбінації з NM001 (цистеамін) або у комбінації з NP108 проти біоплівки *S.aureus* 25923.

Таблиця 1: Сумарна активність тестованих антимікробних агентів проти грам негативних штамів *P aeruginosa* та грам-позитивного *Staphylococcus spp*

15 Таблиця 2: Сумарна активність тестованих антимікробних агентів проти *S epidermidis*, *S aureus*, та *P aeruginosa*

Таблиця 2

MIC (мкг/мл) при pH 7		Експ #1-2					
NP	послідовність	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. aureus</i> DSMZ 11729	<i>P. aeruginosa</i> DSMZ 1128	<i>P. aeruginosa</i> DSMZ 1299	<i>P. aeruginosa</i> ATCCBAA-47
NP432	RRRFRFFFFRFR	<7.8	31.25	62.5	62.5	15.6	15.6
NP438	HHHFRFFFFRFR	<7.8	>500	>500	>500	500	>500
NP441	HHPRRKPRRPKRHH	>500	>500	>500	>500	>500	>500
NP445	KKFPWRLRLRYGRR	<7.8	500	500	62.5	31.25	31.25
NP449	KKPRRKPRRPKRKK-cyst	31.25	250	125	250	125	250
NP451	HHPRRKPRRPKRHH-cyst	125	500	500	>500	>500	>500
NP457	RRRRR-cyst	31.25	125	125	>500	>500	250
NP458	RRRRRHH-cyst	31.25	500	250	250	125	62.5

MBC (мкг/мл) після MIC при pH 7		Експ#3					
NP	<i>P. aeruginosa</i> DSMZ1299	<i>S. epidermidis</i> ATCC12228	<i>S. aureus</i> ATCC25923	<i>S. aureus</i> DSMZ11729	<i>P. aeruginosa</i> DSMZ1128	<i>P. aeruginosa</i> DSMZ1299	<i>P. aeruginosa</i> ATCCBAA-47
NP432		16	250	500	250 (2)	32 (2)	250
NP438		125	>500	>500	>500	>500	>500
NP441	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
NP445		62.5	>500	>500	250	125	250
NP449		125	>500	250	500 (2)	250 (2)	>500
NP451	>500	125	>500	>500	>500	>500	>500
NP457	>500	125 (2)	62.5	125 (2)	>500	>500	>500
NP458		500	125	250	>500	>500	>500

Експ #4				Експ #3		Експ #4			
MIC (мкг/мл) pH5.5				MIC (мкг/мл) pH5.5, 320mM NaCl		MBC (мкг/мл) pH5.5		MBC (мкг/мл) pH5.5, 320 mM NaCl	
NP	P. aeruginosa DSMZ 1299	S. aureus 11729	P. aeruginosa ATCCBAA-47	S. aureus 11729	P. aeruginosa ATCCBAA-47	S. aureus 11729	P. aeruginosa ATCCBAA-47	S. aureus 11729	P. aeruginosa ATCCBAA-47
NP432		>500	125	>500	125	>500	125	>500	>500
NP438		>500	125	>500	62.5	>500	>500	>500	>500
NP441	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
NP445		>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
NP449		>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
NP451	>500	>500	>500	>500	>500	>500	250	>500	>500
NP457	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
NP458		>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500

Приклади

У цьому дослідженні застосували штами бактерій *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *P. aeruginosa* BAA-47 (PAO1), *P. aeruginosa* DSM1128, *P. aeruginosa* DSM1299 та *S. epidermidis* ATCC35984, *S. epidermidis* ATCC12228 *Staphylococcus aureus* 25923 та стійкий до метициліну штам *Staphylococcus aureus* DSM 11729 (MRSA) (DSMZ, Braunschweig, Germany). Для тестування на антимікробну сприйнятливість отримали та застосували чотири клінічних ізолята *P. aeruginosa* (NH57388A-D, Hoffmann et al., 2005, 2007).

Тестований у цьому дослідженні антимікробний агент був катіонним пептидом NP108, який являє собою 10 - 20 кДа полі-L-лізин, гідробромід та цистеамін (NM001). Обидва агенти були отримані від Sigma-Aldrich (Gillingham, UK) та маточні розчини готували при 20 мг/мл у 14-18 MΩ.cm чистої води (система очищення води Purite HP40, Охон, UK). Після розчинення, препарати були стерилізовані фільтрацією з застосуванням 0.22 мкм фільтрів (Millipore, Watford, England) та зберігалися при -20°C.

Були також досліджені наступні антимікробні пептиди NovaBiotics:

NP339	dRdRdRdRdRdRdRdRdRdRdRdRdR
NP340	Ac-dRdRdRdRdRdRdRdRdRdRdRdRdR-CONH
NP341	dRdRdRdRdRdRdRdRdRdRdRdRdR-CONH
NP352	RRRRRRRRRRRRRRRR
NP432	RRRFRFFFRFRRR
NP438	HHHFRFFFRFRRR
NP441	HHPRRKPRRPKRHH
NP445	KKFPWRLRLRYGRR
NP449	KKPRRKPRRPKRKK - цистеамін
NP451	HHPRRKPRRPKRHH - цистеамін
NP457	RRRRR - цистеамін
NP458	RRRRRHH - цистеамін

Антимікробні пептиди NovaBiotics були синтезовані на NeoMPS (Strasbourg, France) з застосуванням Fmoc-синтезу та були принаймні 95 % чистоти.

Бактеріальний інокулят був створений з застосуванням способу розведення від активно зростаючих культур у бульйоні Мюллера-Хінтона, стандартизованих з 0.5 стандартом каламутності Макфарланда, як описано у CLSI, спосіб M26-A.

Визначення мінімальної інгібувальної концентрації (MIC).

Для визначення запобігання утворення біоплівки, бактеріальний інокулят та антимікробні агенти були одночасно додані до планшетів. Планшети інкубували при 37°C протягом 34 годин та оптичну густину читували при 625 нм на мікротитровому планшет-рідері (BioTek Powerwave XS, Winooski, USA). MIC був отриманий як найнижча концентрація антимікробності, що показує totale інгібування бактеріального росту.

Визначення фракціональної інгібувальної концентрації (FIC).

FIC являє собою коефіцієнт взаємодії, що показує, чи є комбінація антимікробних агентів синергетичною, адитивною, антагоністичною або нейтральною. FIC визначається шляхом порівняння активності агенту у комбінації (MIC агенту A + агент B) з активністю окремо взятого агенту (MIC агенту A або агент B), як вказано далі (Singh et al., 2000):

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

Аддитивна комбінація двох антимікробних агентів позначається індексом FIC 1, тоді як індекс $FIC < 1$ вказує на синергетичні комбінації. Нейтральні комбінації будуть давати FIC між 1 та 4, та індекс FIC вище ніж 4 вказує на антагоністичні дії між двома антимікробними агентами.

Був також обчислений FIC для оцінки взаємодії двох антимікробних агентів у комбінації проти бактеріальної біоплівки. Таку ж саме формулу склали з застосуванням MBEC замість MIC.

Обчислення мінімальної концентрації знищення біоплівки (MBEC).

Загальний обсяг 100 мкл бактеріального інокуляту в агарі Мюллера-Хінтона додали до кожної лунки 96-лункових імунологічних планшетів та планшети інкубували при 37°C протягом 34 годин на гіроторній платформі для збовтування (Grant-bio PS-3D, Shepreth, England) при 24 об/хв для забезпечення створення біоплівки.

Далі імунологічні планшети один раз промили стерильним PBS (1x) та до них додали дворазові серійні розведення антимікробних агентів в агарі Мюллера-Хінтона. Планшети інкубували при 37°C протягом 34 годин на гіроторній платформі для збовтування (Grant-bio PS-3D, Shepreth, England) при 24 об/хв.

Далі супернатанти від кожного імунологічного планшета перенесли у свіжій планшет та була виміряна оптична густина при 625 нм з застосуванням мікротитрового планшет-рідера (BioTek Powerwave XS, Winooski, USA). MBEC був отриманий, як найнижча антимікробна концентрація, яка показує відсутність бактеріального росту.

Після перенесення супернатанту від імунологічних планшетів, біоплівки одноразово промили стерильним PBS (1x) та до лунок імунологічних планшетів додали 100 мкл розчину для флуоресцентного фарбування BacLight live/dead (Invitrogen, Paisley, UK), що містив 4 мкМ SYTO9 та 20 мкМ пропідію йодиду (PI) у стерильному PBS (1x). Планшети інкубували у темряві при кімнатній температурі протягом 15 хв та флуоресценцію читали при 485(ex)/528(em) та 485(ex)/645(em) для SYTO9 та PI флуоресценції, відповідно на флуоресцентному мікротитровому планшет-рідері (BioTek Synergy HT, Winooski, USA) з встановленою чутливістю 50 та нижнім положенням оптики. Безпосереднє спостереження біоплівки на флуоресцентному мікроскопі Axiovert 40 (Zeiss, Gottingen, Germany) дозволило виявити присутність живих та мертвих бактерій та фотографії біоплівки були зроблені при 100-400-кратному збільшенні.

Відносну життєздатність резистентних клітин визначили співвідношенням вимірювань флуоресценції живих/мертвих клітин та для підтвердження присутності або відсутності живих клітин були застосовані мікроскопічні спостереження.

Результати.

Для оцінки запобігання утворення біоплівки як грам-позитивними, так і грам-негативними бактеріями, бактеріальний інокулят та антимікробні агенти додавали у планшет одночасно. Діапазон концентрацій антимікробних агентів був 0-500 мкг/мл (NP108) та 0-320 мкг/мл (цистеамін) проти грам-негативної бактерії *P. aeruginosa* ATCC BAA-47 та 0-1000 мкг/мл (NP108) та 0-320 мкг/мл (цистеамін) проти грам-позитивної MRSA.

MIC NP108 був 62.5 мкг/мл, та для цистеаміну він дорівнював 320 мкг/мл. NP108 мав бактерицидну дію при 250 мкг/мл, тоді як цистеамін був не бактерицидним до 320 мкг/мл (дані не наведені).

У присутності 160 мкг/мл цистеаміну MIC NP108 скоротився до 31.25 мкг/мл. Коли концентрацію цистеаміну подвоїли (тобто до 320 мкг/мл), ріст не спостерігався, незалежно від концентрації NP108.

Обчислення FIC для цієї комбінації свідчить, що антимікробні агенти мають адитивні дії ($FIC=1$). Більш того, бактерицидна активність була отримана у присутності 125 мкг/мл NP108 та 320 мкг/мл цистеаміну (дані не наведені), що підтверджує адитивну дію цих агентів.

MIC NP108 дорівнював 125 мкг/мл та був більш ніж 320 мкг/мл для цистеаміну. NP108 був бактерицидним при 125 мкг/мл, тоді як цистеамін був не бактерицидним до 320 мкг/мл (дані не наведені).

Зростання концентрацій цистеаміну показує підвищене інгібування росту для будь-якої обраної концентрації NP108. У присутності 40 мкг/мл цистеаміну MIC NP108 скоротився до 31.25 мкг/мл та впав ще до 15.625 мкг/мл, коли було додано 320 мкг/мл цистеаміну.

Обчислення FIC для цієї комбінації вказує на те, що антимікробні агенти мають принаймні адитивні дії ($FIC < 1$). Більш того, бактерицидна активність була отримана у присутності 31.25

мкг/мл NP108 та ≥ 160 мкг/мл цистеаміну, так само, як і 62.5 мкг/мл NP108 та ≥ 80 мкг/мл цистеаміну (дані не наведені), що підтверджує адитивну дію цих агентів.

Додаток 1 показує залежну від часу активність коротких лінійних аргінінових пептидів (NP339, NP340, NP341 та NP352) проти планктонних клітин *S. aureus* DSM 11729.

5 Додаток 2 наводить стислий виклад активності NP108, цистеаміну, обох компонентів у комбінації так само, як і активності NP339 та NP341 проти планктонних клітин *S. aureus* DSM 11729 та *P. aeruginosa* BAA-47.

10 Оцінка активності NP108 та цистеаміну проти бактеріальної біоплівки була проведена з 24-годинними біоплівками та також була визначена активність обох компонентів у комбінації. Активність антимікробних агентів проти бактеріальної біоплівки визначали по їх активності проти клітин біоплівки та проти резистентних клітин.

15 Фіг. 5 показує високу активність NP339 проти біоплівки трьох видів *Staphylococcus*, в результаті чого MBEC дорівнював 156-625 мкг/мл. Підвищення оптичної густини при максимальній дозі NP339 проти *S. aureus* 25923, швидше за все, є артефактом через складну та гетерогенну природу мікробної біоплівки.

На відміну, NP339 скорочує ріст *P. aeruginosa* BAA-47 (PAO1), але навіть найвища тестована доза (тобто 5 мг/мл) була недостатня для інгібування 100 % клітин біоплівки.

20 Фіг. 6 надає докази того, що NP339 є активним проти резистентних клітин. На відміну до активності NP339 проти клітин біоплівки чотирьох тестованих штамів, він був менш активним проти резистентних клітин видів *Staphylococcus*, ніж проти *P. aeruginosa* BAA-47 (PAO1). NP339 був здатен до інгібування життєздатності резистентних клітин *P. aeruginosa* BAA-47 (PAO1) при 625 мкг/мл.

25 Подібно до NP339 (Фіг. 5), NP341 показав значне скорочення життєздатності клітин біоплівки. MBEC для MRSA 11729 та *S. epidermidis* 12228 був 625 мкг/мл. NP341 скоротив життєздатність клітин біоплівки MRSA 11729 та *P. aeruginosa* BAA-47 (PAO1) в 2 – 3 рази.

Як у випадку з NP339, життєздатність резистентних клітин *P. aeruginosa* була повністю інгібована при 625 мкг/мл NP341. Життєздатність резистентних клітин трьох видів *Staphylococcus species* зменшилася на 25 – 50 %.

30 Фіг. 9 надає свідчення того, що цистеамін має антимікробну активність проти клітин біоплівки тестованих грам-позитивних та грам-негативних бактерій.

Фіг. 10 показує активність цистеаміну проти резистентних клітин тестованих грам-негативних та грам-позитивних бактерій.

35 Наведені тут результати показують наявність антимікробної активності лінійних коротких катіонних пептидів NP339 та NP341 проти біоплівок грам-позитивних та грам-негативних бактерій. Ці компоненти були проявили себе більш ефективними проти клітин біоплівки грам-позитивних бактерій ніж грам-негативних бактерій, тоді як навпаки – проти резистентних клітин. Цистеамін показав активність проти клітин біоплівки при високих концентраціях, проте, він пригнічував життєздатність як грам-позитивних, так і грам-негативних резистентних клітин при найнижчій тестованій концентрації (тобто 6.25 мг/мл).

40 Комбінація NP108 та цистеаміну показала повне інгібування бактеріального росту у присутності 250 мкг/мл NP108 та 62.5 – 500 мкг/мл цистеаміну. Додавання 31.25 мкг/мл цистеаміну до 500 мкг/мл NP108 мало подібну дію, тоді як 31.25 мкг/мл цистеаміну разом з 250 мкг/мл NP108 показали тільки часткове інгібування бактеріального росту.

45 FIC, отриманий з цих обсягів MBEC ($MBEC_{NP108[окремо]} > 500$ мкг/мл, $MBEC_{NP108[комбінація]} = 250$ мкг/мл, $MBEC_{цистеамін[комбінація]} = 62.5$ мкг/мл, $MBEC_{цистеамін[окремо]} = > 100.00$ мкг/мл) дорівнював ~ 0.5 , що вказує на синергетичну дію між цими двома антимікробними агентами. Це узгоджується зі спостереженнями за активністю комбінації NP108 / цистеамін проти планктонних клітин (Фіг. 2).

50 Активність NP108 та цистеаміну проти резистентних клітин оцінювали з застосуванням способу флуоресцентного фарбування для визначення відносної життєздатності клітин. Застосованими флуоресцентними молекулами, що зв'язують нуклеїнову кислоту були SYTO9 та PI, які проникають у всі бактеріальні клітини (зелена флуоресценція) та клітин зі зруйнованою мембраною (червона флуоресценція), відповідно. Тому співвідношення зеленого (живі) / червоного (мертві) флуоресцентного випромінювання надає індикацію відносно життєздатності бактеріальної популяції та застосовується для оцінки присутності залишкових живих клітин відповідно до резистентних клітин у біоплівці.

Фіг. 12 показує, що відносна життєздатність біоплівок, оброблених або NP108, або цистеаміном залишилося значною, що свідчить про відсутність активності цих компонентів проти резистентних клітин *P. aeruginosa* ATCC BAA-47.

Фіг. 13 надає свідчення того, що комбінація NP108 та цистеаміну показує найвищу активність проти резистентних клітин *P. aeruginosa* ATCC BAA-47, ніж кожен компонент поодиноці (Фіг. 12). Найбільш ефективними комбінаціями проти цих клітин були 250-500 мкг/мл NP108 та 62.5-500 мкг/мл цистеаміну. Ці комбінації показали низьку відносну життєздатність у межах біоплівки. Подібні результати були отримані з 31.25 мкг/мл NP108 та 500 мкг/мл цистеаміну, з

тільки частковим інгібуванням спостерігалось з 250 мкг/мл цистеаміну. Активність цих компонентів проти резистентних клітин показує подібності до схеми оптимальних комбінацій, отриманих проти клітин біоплівки (Фіг. 11). Більш того, прямі мікроскопічні спостереження флуоресцентно забарвлених біоплівок підтверджує активність цих комбінацій проти резистентних клітин, як неживих, що може спостерігатися у присутності 250-500 мкг/мл NP108 та 62.5-500 мкг/мл цистеаміну (дані не наведені).

Фіг. 14(a)-(d) показують активність трьох концентрацій NP339: 1 мкг/мл, 10 мкг/мл та 100 мкг/мл у комбінації зі зростанням концентрації цистеаміну до 10 мг/мл проти чотирьох штамів *Pseudomonas aeruginosa*.

Ці дані ясно демонструють підвищену антимікробну активність проти клітин біоплівки *P. aeruginosa* NP339 у комбінації з цистеаміном. Наступні фігури відображають приклади активності цих комбінацій проти резистентних клітин двох з цих штамів.

Фіг. 16 показує активність NP108 та цистеамін проти клітин біоплівки *S. aureus* DSM 11729. MBEC для цистеаміну був 250 мкг/мл, тоді як NP108 інгібував ріст цих клітин при 125 мкг/мл.

Комбінація NP108 з цистеаміном показала повне інгібування бактеріального росту у присутності 31.25 мкг/мл NP108 та 62.5 мкг/мл цистеаміну та часткове інгібування з нижчими концентраціями кожного компонента (Фіг. 17). Отже, FIC отриманий з цих MBEC ($MBEC_{NP108[окремо]} = 125$ мкг/мл, $MBEC_{NP108[комбінація]} = 31.25$ мкг/мл, $MBEC_{цистеамін[окремо]} = 250$ мкг/мл, $MBEC_{цистеамін[комбінація]} = 62.5$ мкг/мл) був 0.5, що тим самим свідчить про синергетичну дію між цими двома антимікробними агентами проти біоплівок цих грам-позитивних бактерій. Подібні результати спостерігалися також для грам-негативної бактеріальної біоплівки (Фіг. 11). Це є також сумісним зі спостереженнями активності комбінації NP108 / цистеамін проти планктонних клітин *S. aureus* DSM 11729 (Фіг. 4).

Подібно до втрати активності, спостережену проти резистентних клітин *P. aeruginosa* ATCC BAA-47 (Фіг. 12), відносна життєздатність біоплівки *S. aureus* DSM 11729, що була оброблена або NP108, або цистеаміном залишається значною, що свідчить про втрату активності цих компонентів при низьких концентраціях проти резистентних клітин цих грам-позитивних бактерій (Фіг. 18).

Комбінація NP108 та цистеаміну показала найвищу активність проти резистентних клітин *S. aureus* DSM 11729 ніж кожен компонент окремо (Фіг. 19). Найбільш ефективними комбінаціями проти цих клітин були 250-500 мкг/мл NP108 та 125-250 мкг/мл цистеаміну. Ці комбінації показали найнижчу відносну життєздатність у біоплівці. Подібні результати були отримані з 62.5 мкг/мл NP108 та 500 мкг/мл цистеаміну. Комбінації з нижчими концентраціями кожного компонента показали високу відносну життєздатність у біоплівці.

На відміну від грам-негативних резистентних клітин, прямі мікроскопічні спостереження флуоресцентно забарвлених біоплівок *S. aureus* DSM 11729 зазначили присутність залишкових живих клітин при найвищих комбінованих концентраціях NP108 та цистеаміну (дані не наведені).

Таблиця 1 наводить стислий виклад активності коротких аргінінових пептидів NP339, NP341, полі-L-лізину NP108, цистеаміну та комбінації NP108 з цистеаміном проти грам-позитивних та грам-негативних бактерій.

Таблиця 1

Стислий виклад активності тестованого антимікробного агенту проти штамів грам-негативної *P. aeruginosa* та грам-позитивного *Staphylococcus spp.* Число в дужках вказує на максимальну кількість тестованих штамів. MIC: мінімальна концентрація інгібування; MBEC: мінімальна концентрація знищення біоплівки; FIC: фракціональна інгібувальна концентрація.

		Штами <i>P. aeruginosa</i> (7)	<i>Staphylococcus spp</i> (4)
	MIC (мкг/мл)		
	NP108	31.25-500	16-125
	NP339	62.5	4-128
	NP341	31.25	250
	Цистеамін	300-2,500	300-625
	NP108 / Цистеамін	31.25 / 160	31.25 / 40
FIC:	NP108 / Цистеамін	1	0.6
	MBEC (мкг/мл)		
	NP108	250 - >500	125-250
	NP339	>5,000	156-625
	NP341	>5,000	625 - >5,000
	Цистеамін	>5,000	> 25,000
	NP108 / Цистеамін	125/125-250/62.5	31.25/62.5-125/125
FIC:	NP108 / Цистеамін	≤0.75	0.5-1
	Persisters (мкг/мл)		
	NP108	250 - >500	>500
	NP339	625	625 - >5,000
	NP341	625	625 - >5,000
	Цистеамін	500-6,250	6,250-12,500
	NP108 / Цистеамін	62.5/250-250/62.5	>250/>250
FIC:	NP108 / Цистеамін	0.75-1	≤0.5

Зауваження:

1 - додаток 1 показує MIC тестованих коротких аргінінових антимікробних агентів проти *Staphylococcus aureus* DSM 11729.

2 - додаток 2 показує активність муколітичних агентів цистеаміну та N-ацетилцистеїну у комбінації з NP341 проти *P. aeruginosa* ATCC27853.

Додаток 1: дані (не показані) демонструють активність коротких лінійних аргінінових пептидів протягом більше 48-годинного періоду проти планктонних клітин стійкого до метициліну *S. aureus* (MRSA) DSM 11729. Діапазон тестованих концентрацій у позначках наведений у мг/мл. Дані (не показані) демонструють активність коротких лінійних аргінінових пептидів протягом більше 48-годинного періоду проти планктонних клітин стійкого до метициліну *S. aureus* (MRSA) DSM 11729. Активність, що залежить від часу свідчить, що інгібування бактеріального росту залежить від дози антимікробного агенту та від часу його впливу на клітини. Повна бактерицидна активність спостерігалася для NP339, NP 340 та NP352 при концентраціях вище 0.5 мг/мл для 48-годинного періоду; 0.125 та 0.25 мг/мл показали повне інгібування для принаймні 24 годин, та нижчі концентрації, як-то 0.06 та 0.03 мг/мл показали повне інгібування для принаймні 20 год. та 15 год., відповідно. Подібні результати були отримані з NP341, за виключенням того, що концентрація 0.25 мг/мл показала повне інгібування для 48-годинного періоду.

Додаток 2: У комбінації з 3-6 мг/мл N-ацетилцистеїну, проте, було необхідно тільки 205 мкг/мл NP341 для досягнення MBEC (Фіг. 20a). Подібна підвищена активність для комбінації цих двох компонентів спостерігалася проти резистентних клітин: 1024 мкг/мл NP341+3128 мкг/мл N-ацетилцистеїну інгібували приблизно 75 % резистентних клітин, що є значно вищим інгібуванням, ніж отримане від кожного з двох компонентів по окремі (Фіг. 20b).

Комбінація цистеаміну або N-ацетилцистеїну з NP341 демонструє підвищення антибактеріальної активності у порівнянні з активністю кожного компонента по окремі. MBEC

одного NP341 проти *P. aeruginosa* ATCC27853 був більш ніж 2 мг/мл та був більш ніж 100 мг/мл для цистеаміну (Фіг. 21a). Це вказує на те, що тут відсутня кооперативна дія між двома компонентами проти клітин біоплівки *P. aeruginosa* ATCC27853. Проте, така кооперація спостерігалася проти резистентних клітин: 205 мкг/мл NP341+3 мг/мл цистеаміну інгібували

приблизно 75 % резистентних клітин, що значно вище, ніж будь-який з двох компонентів по окремості (Фіг. 21b).

При застосовуванні комбінації з NP339, ми спостерігали, що додавання цистеаміну навіть у малій кількості допомагає скоротити МВЕС значень NP339 (Фіг. 14a-d). Ще більш цікаво те, що комбінація NP339 та цистеаміну також показала підвищену активність проти резистентних клітин *P. aeruginosa* DSM1128 та *P. aeruginosa* BAA-47 (Фіг. 15a-b).

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб лікування або запобігання утворенню біоплівки у навколишньому середовищі, що включає введення у навколишнє середовище ефективної кількості цистеаміну.

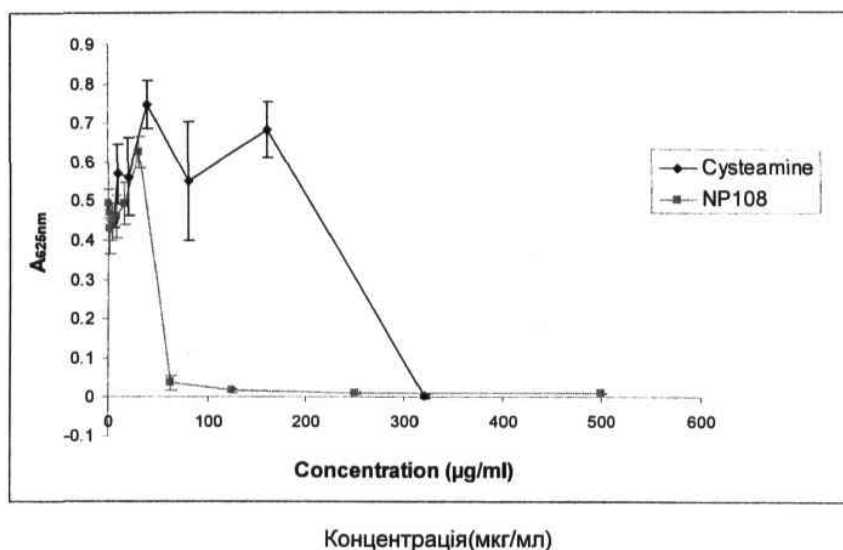
2. Застосування цистеаміну у лікуванні мікробної інфекції, зокрема мікробної біоплівкової інфекції.

3. Застосування за п. 2, де лікування являє собою лікування стану, асоційованого з біоплівковою інфекцією, де стан є вибраним з місцевих інфекцій, інфекцій ротової порожнини та системних інфекцій.

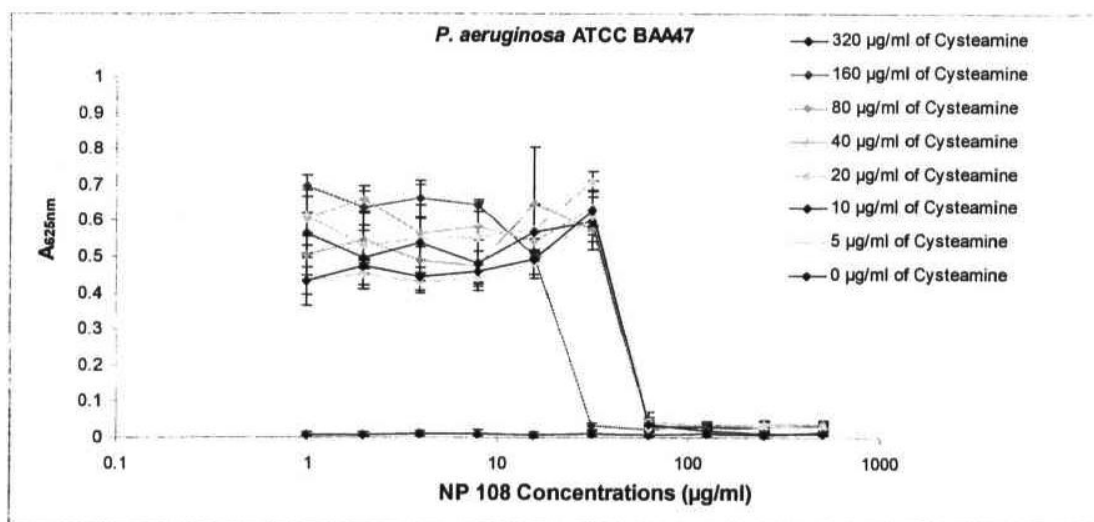
4. Застосування за п. 3, де місцеві інфекції включають рани, виразки та пошкодження, зокрема шкірні рани, такі, як порізи або опіки, та стани, які з ними асоційовані.

5. Застосування за п. 3, де інфекції ротової порожнини включають гінгівіт, пародонтит та мукозит.

6. Застосування за п. 3, де системні інфекції включають муковісцидоз та інші стани, які асоціюються з інфекціями слизової оболонки, зокрема шлунково-кишковими, сечостатевими або респіраторними інфекціями.

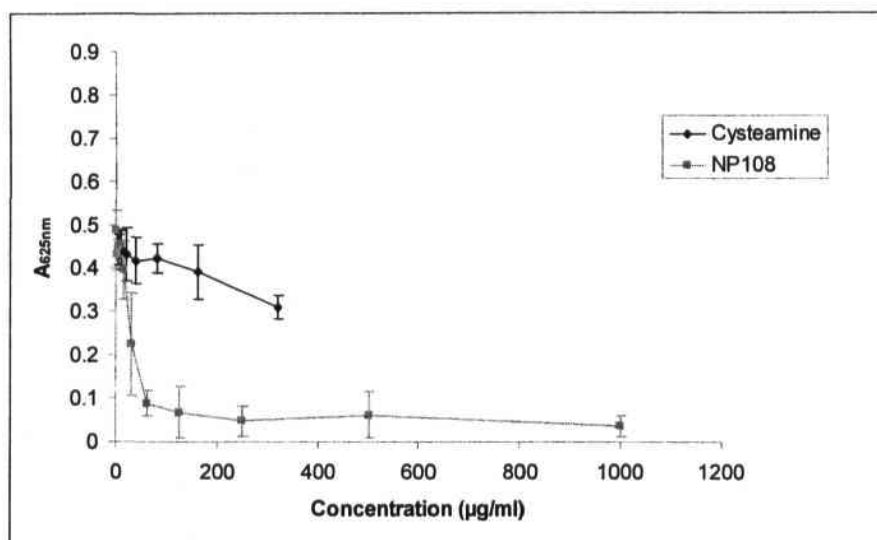


Фіг. 1



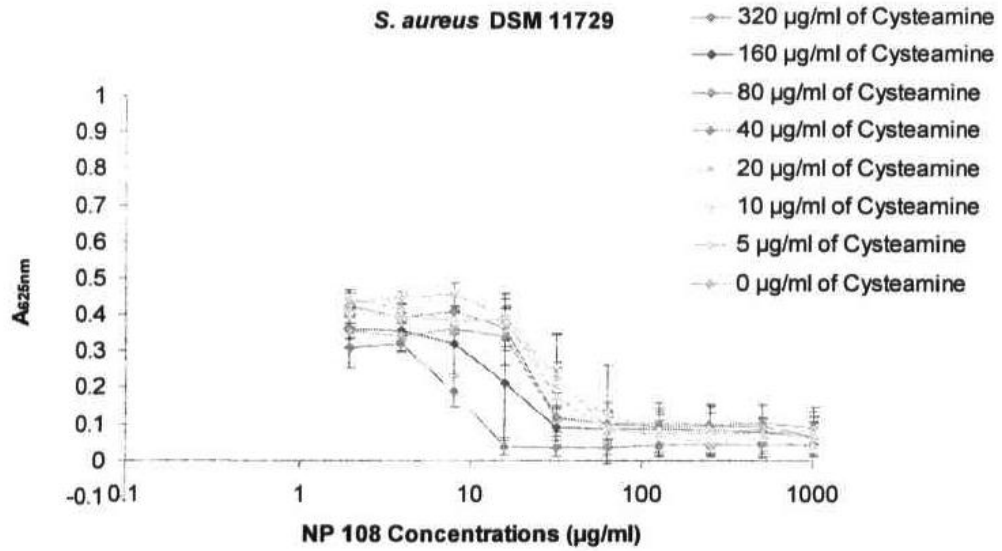
Концентрації NP108 (мкг/мл)

Fig. 2



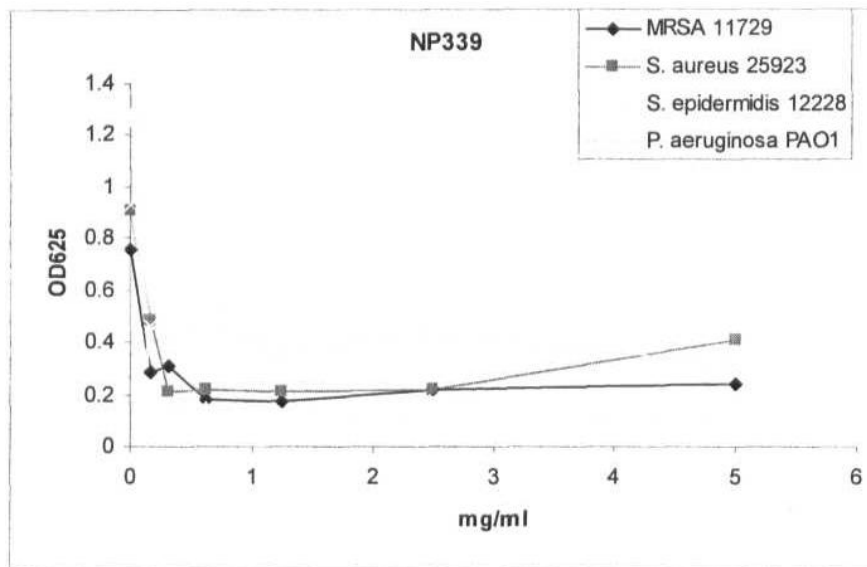
Концентрація(мкг/мл)

Fig. 3



Концентрації NP108 (мкг/мл)

Фиг. 4



Фиг. 5

Відсоток
життєздат-
ності
резистентних
клітин

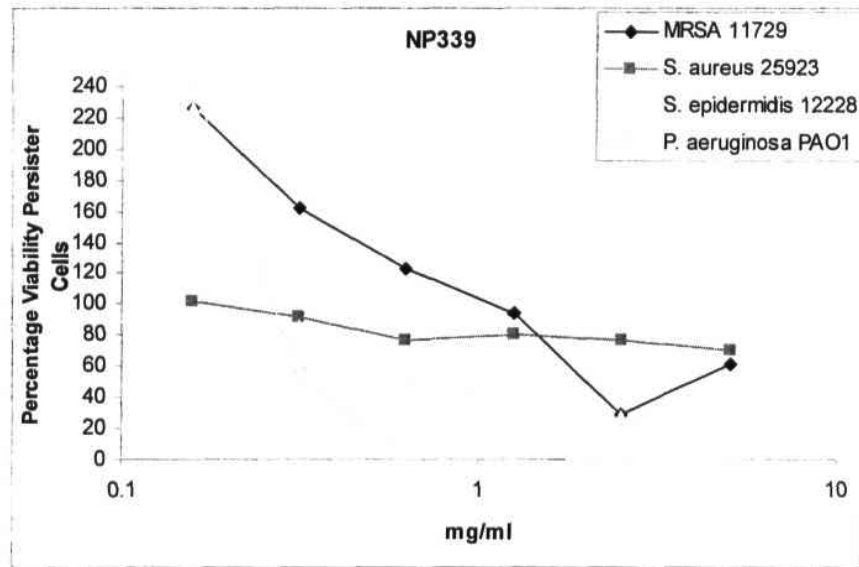


Fig. 6

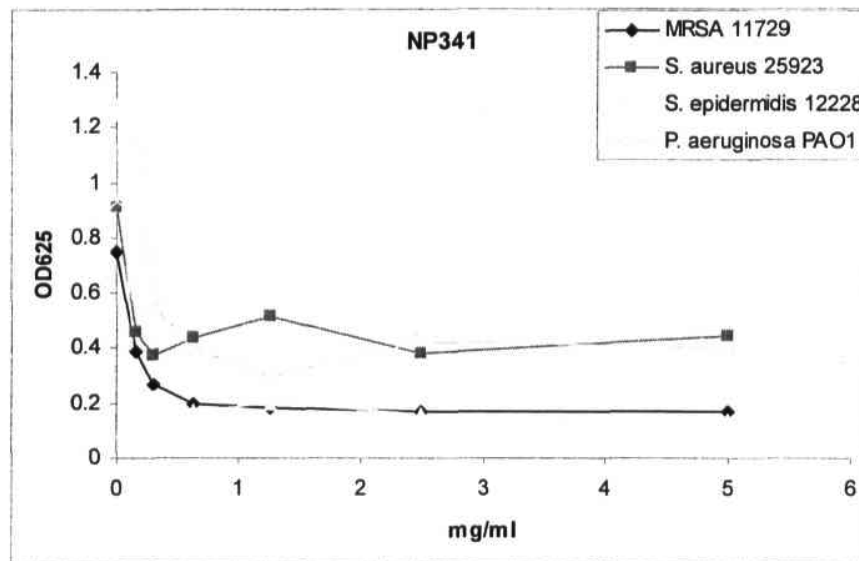


Fig. 7

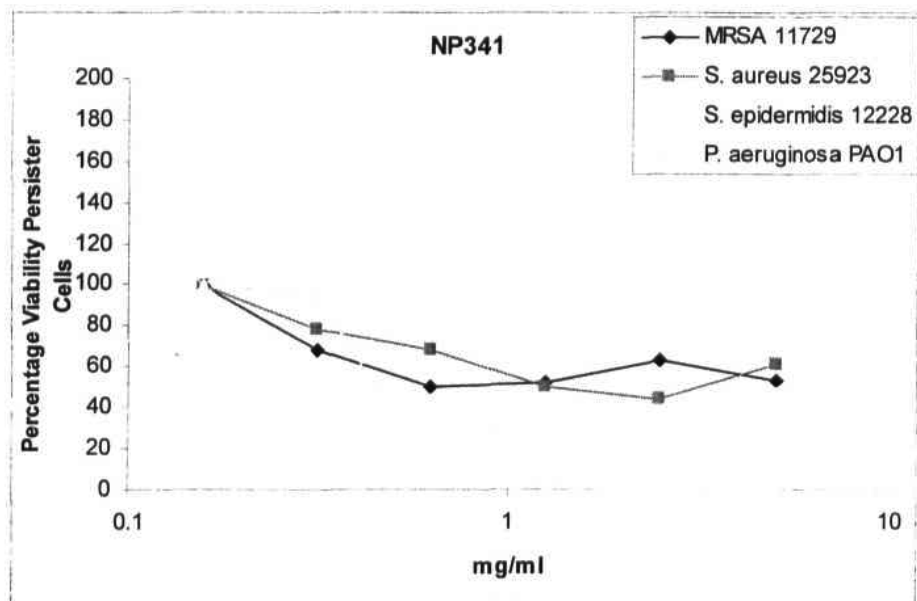


Fig. 8

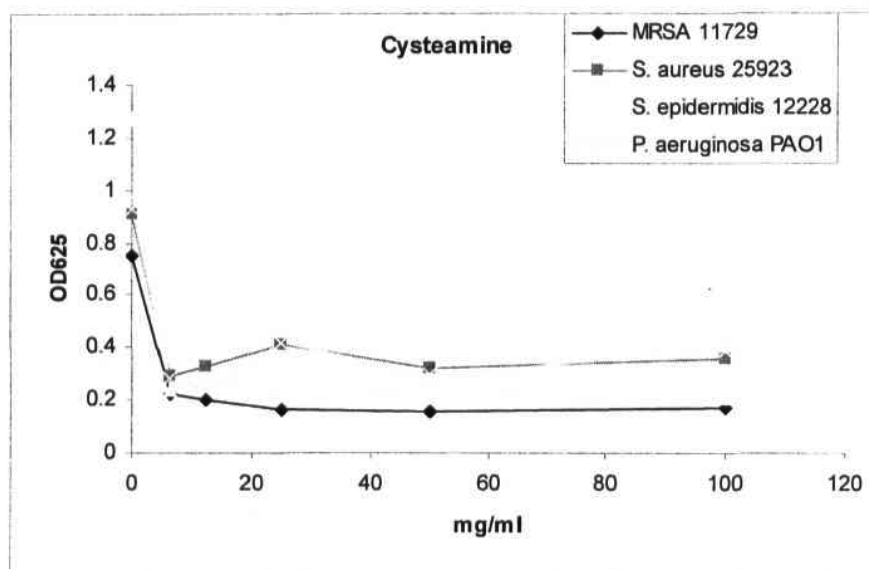


Fig. 9

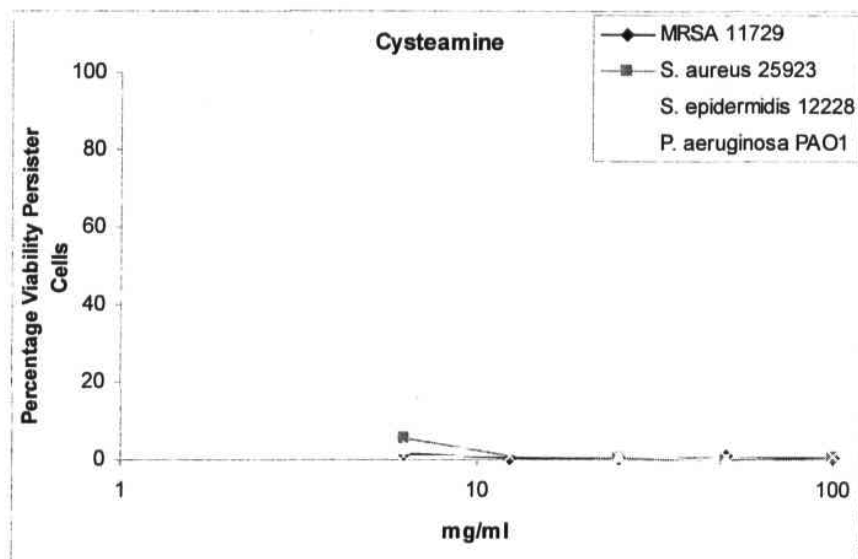


Fig. 10

Активність комбінацій проти клітин біоплівки *P. Aeruginosa* BAA47

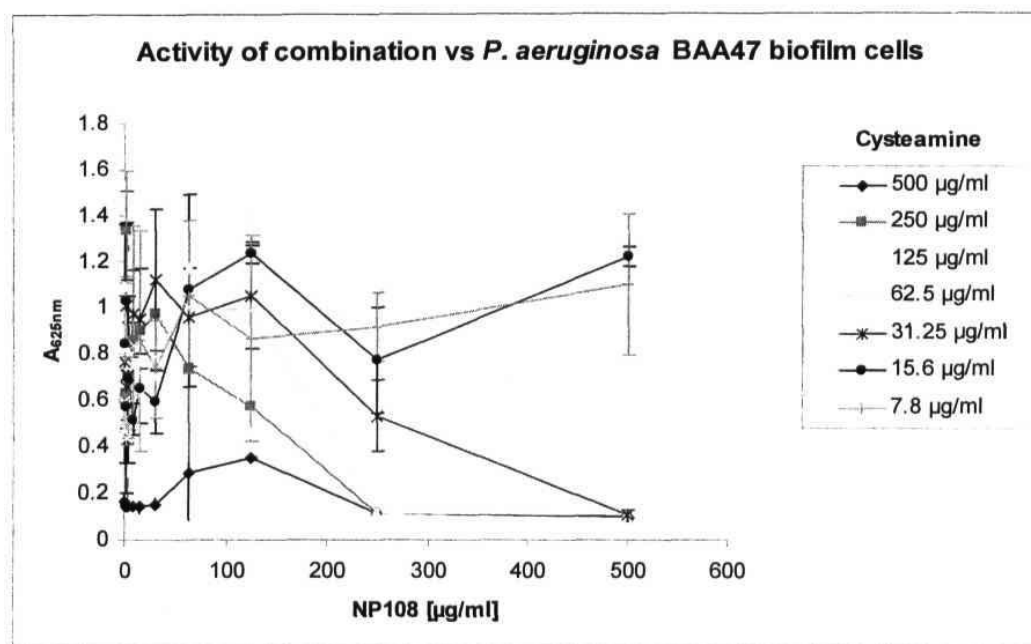
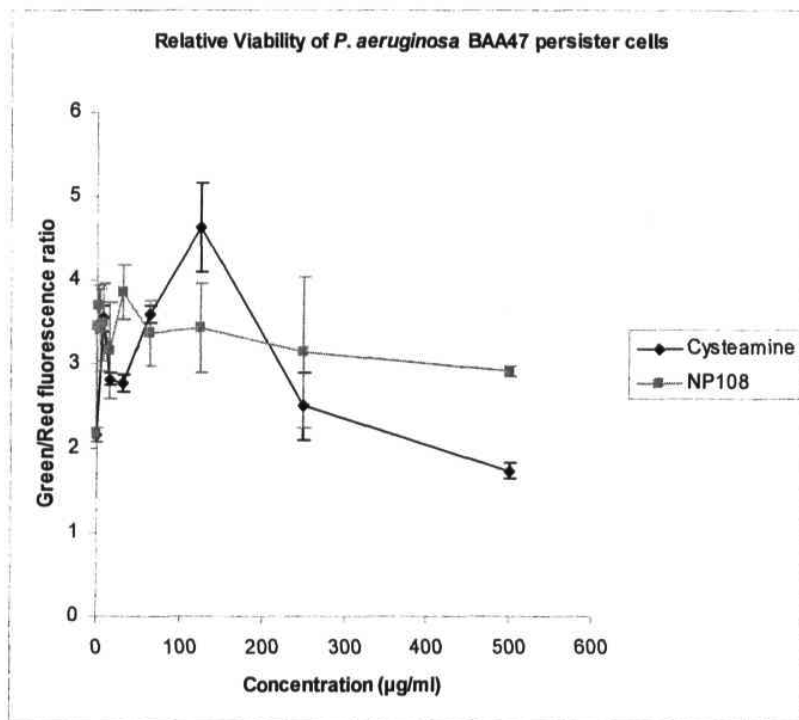


Fig. 11

Відносна життєздатність резистентних клітин *P. Aeruginosa* BAA47



Концентрація(мкг/мл)

Fig. 12

Активність комбінації NP108/цистеамін проти резистентних клітин *P. Aeruginosa* BAA47

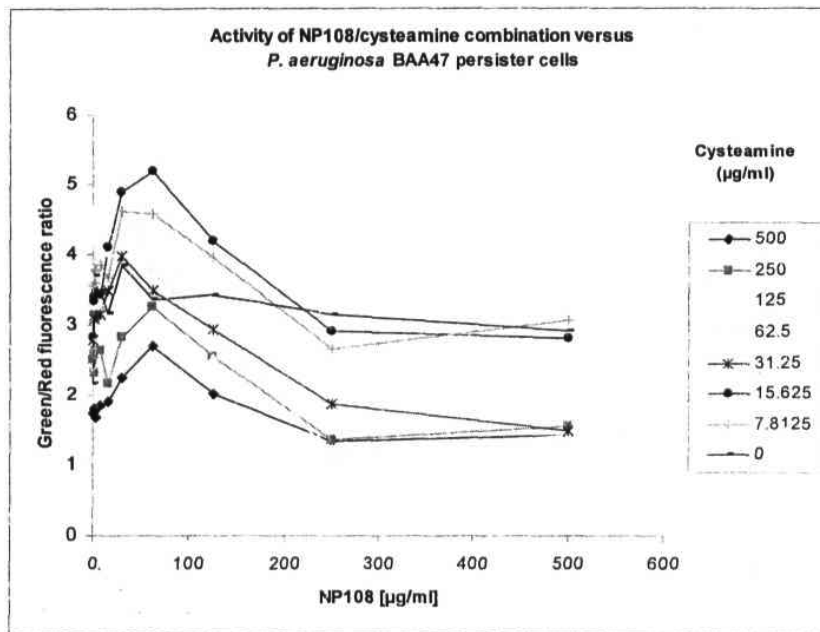


Fig. 13

(a)

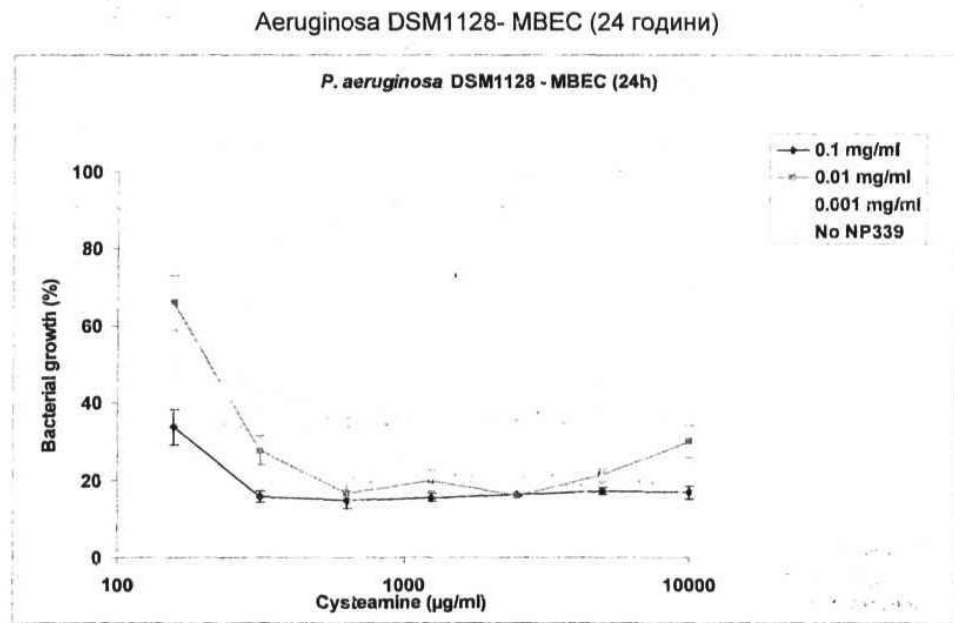
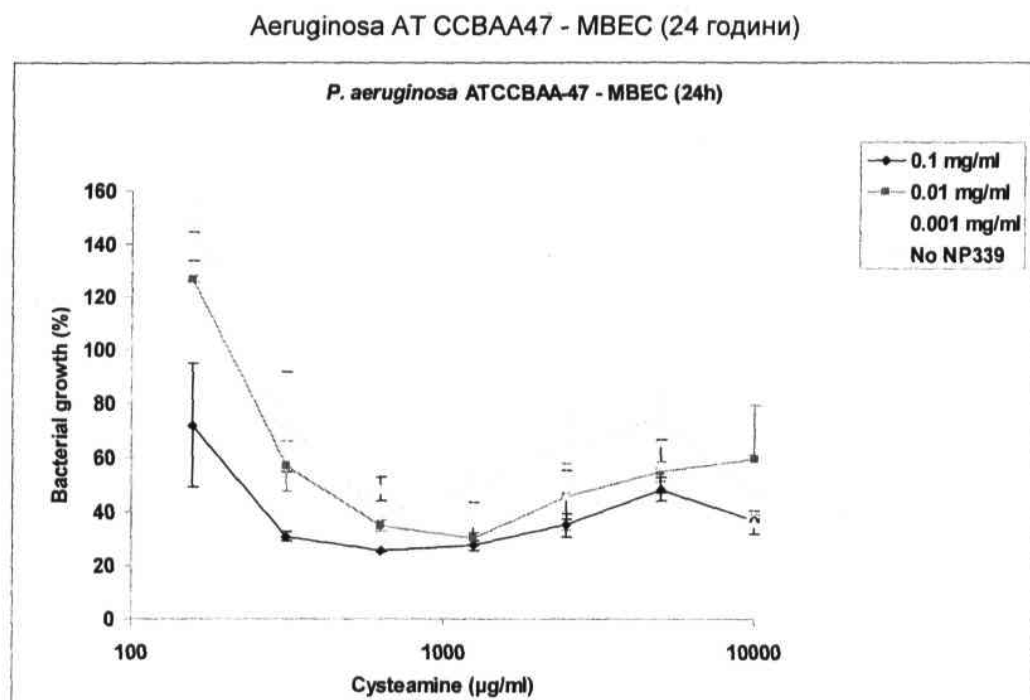


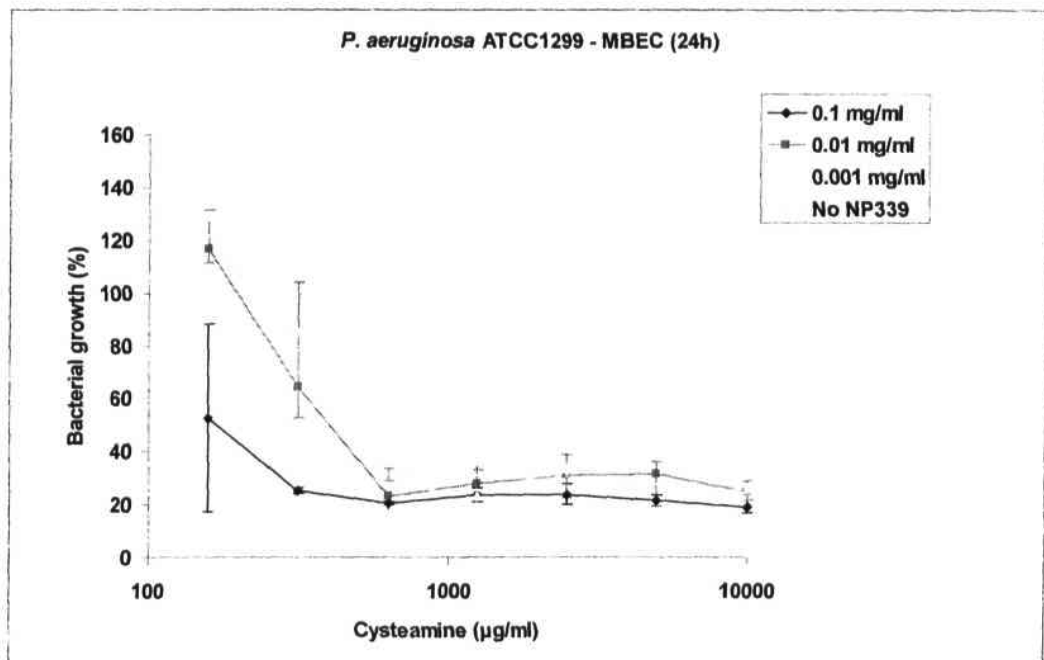
Fig. 14

(b)



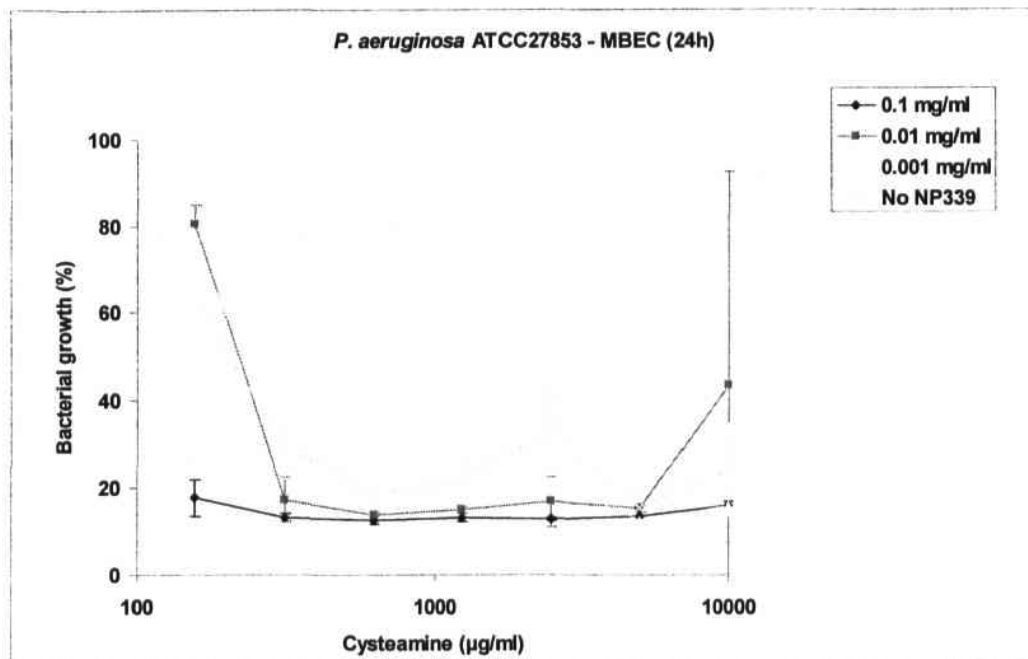
(c)

Aeruginosa AT CC1299 - MBEC (24 години)



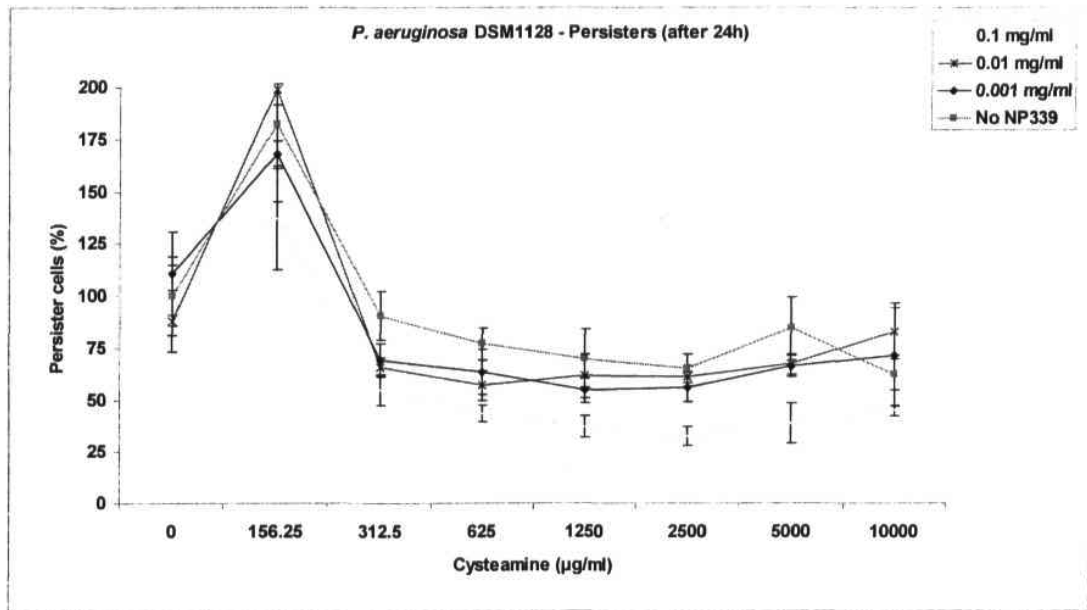
(d)

Aeruginosa ATCC27853 - MBEC (24 години)



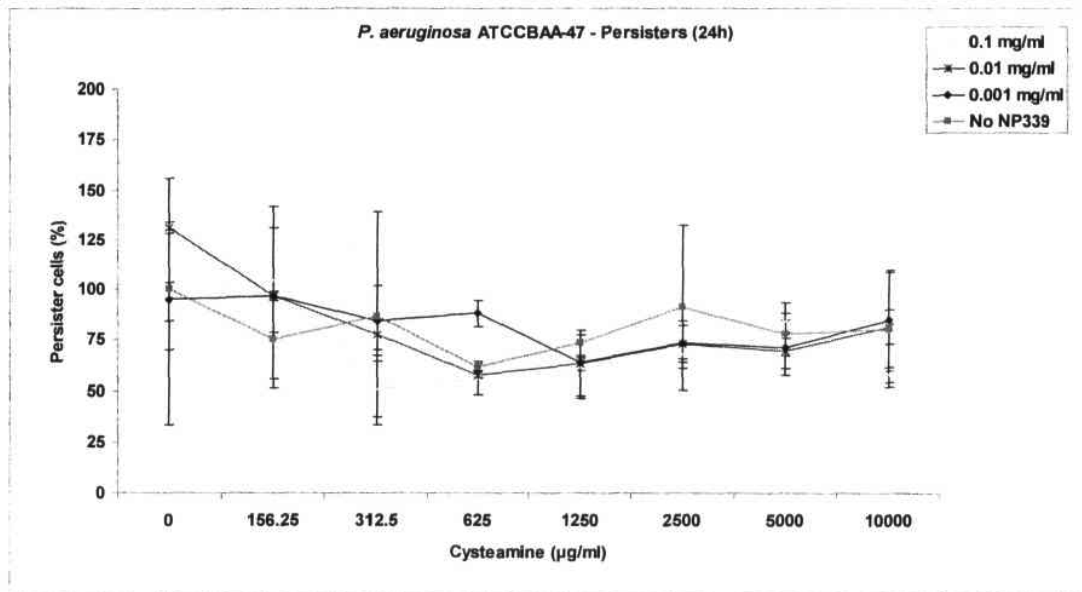
(a)

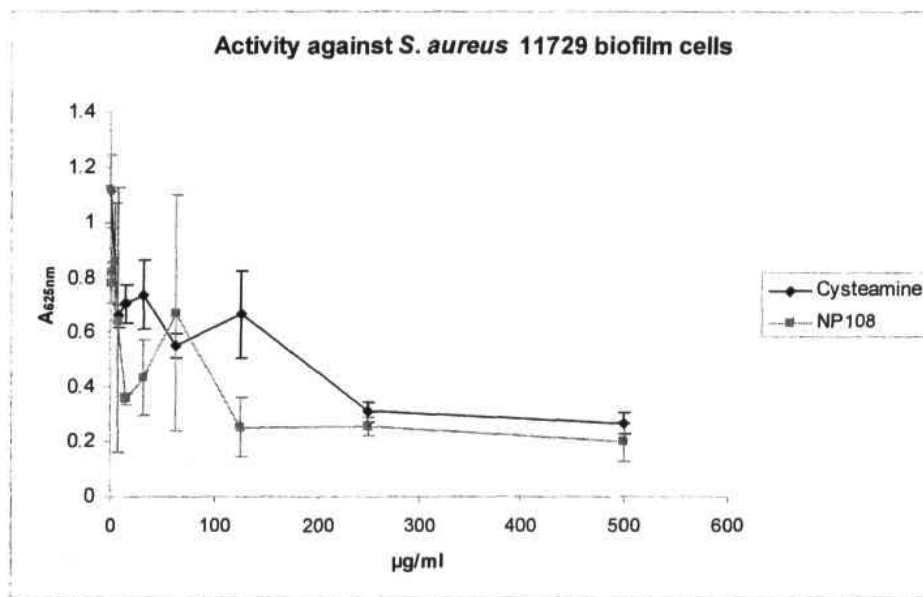
Aeruginosa DSM1128- резистентні клітини (після 24 годин)



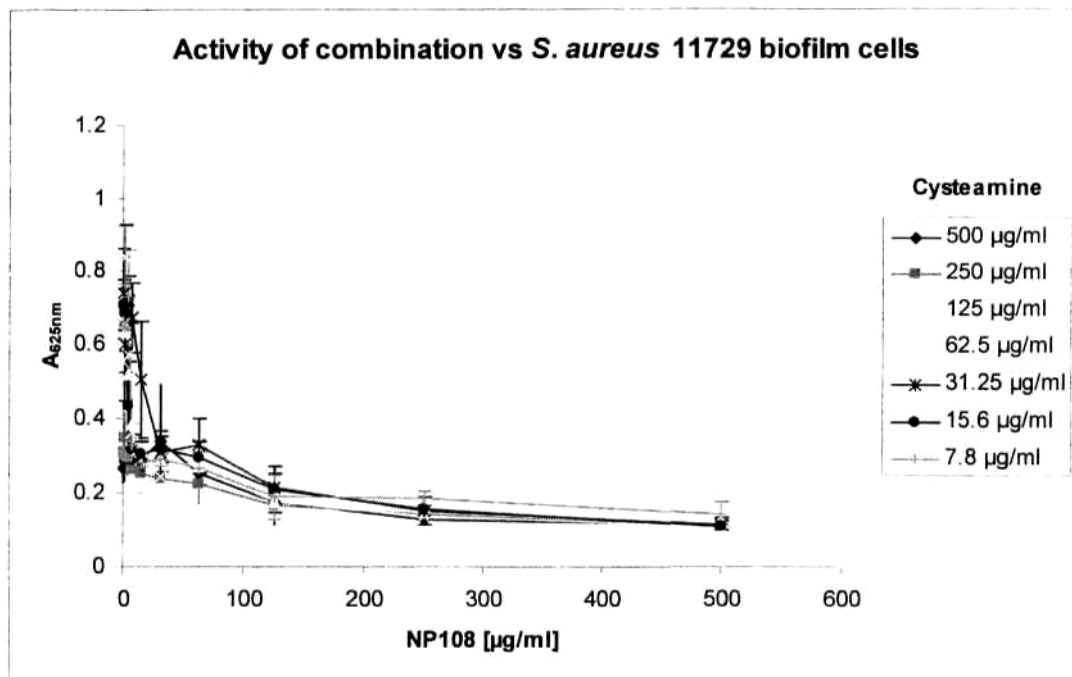
Фиг. 15

(b)



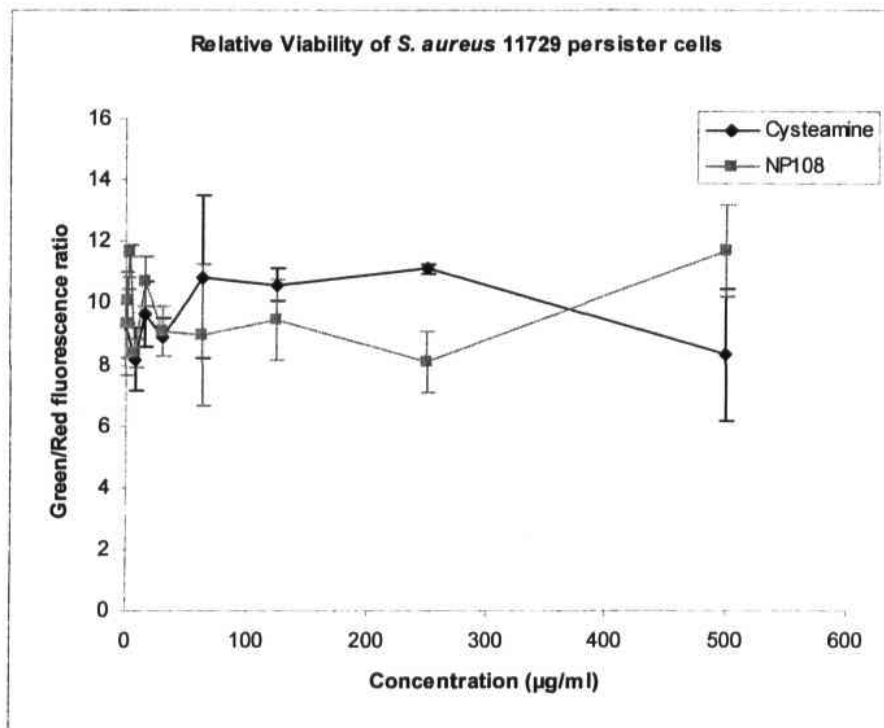
Активність проти клітин біоплівки *S. aureus* DSM 11729

Фиг. 16

Активність комбінації проти клітин біоплівки *S. aureus* DSM 11729

Фиг. 17

Відносна життєздатність резистентних клітин *S. aureus* DSM 11729



Концентрація(мкг/мл)

Fig. 18

Активність комбінації NP108/цистеамін проти резистентних клітин *S. aureus* DSM 11729

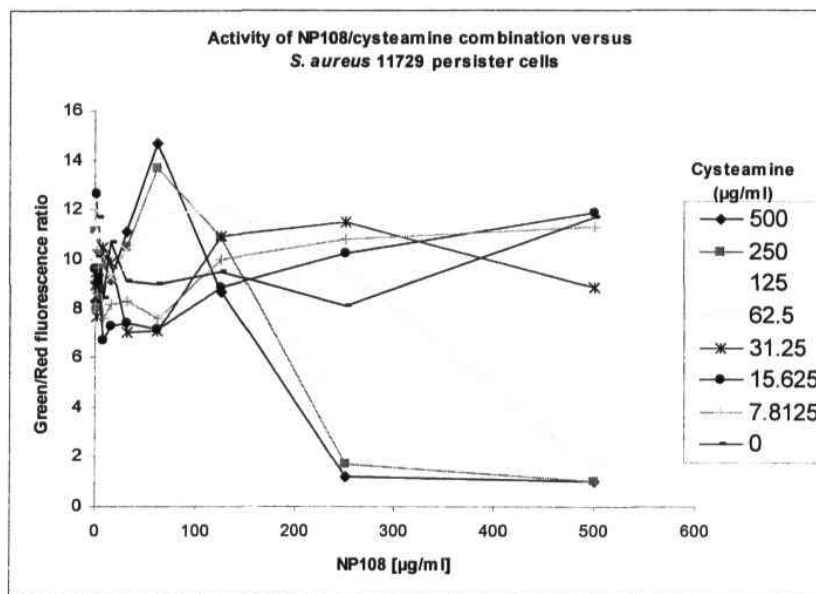


Fig. 19

(a)

P. Aeruginosa 27853- комбінація NP341+ N-ацетилцистеїн

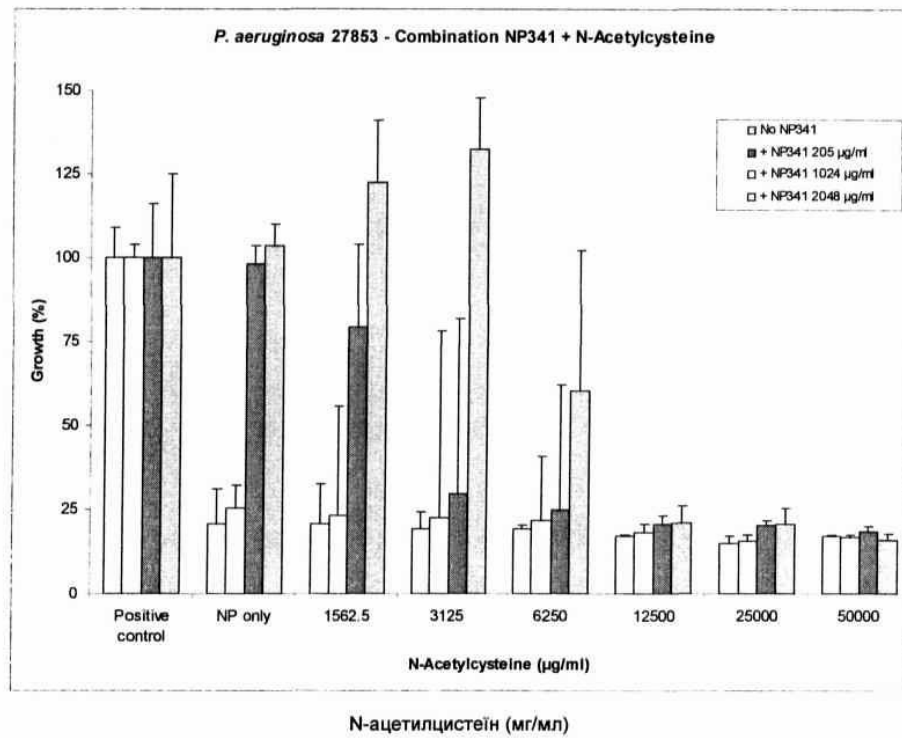
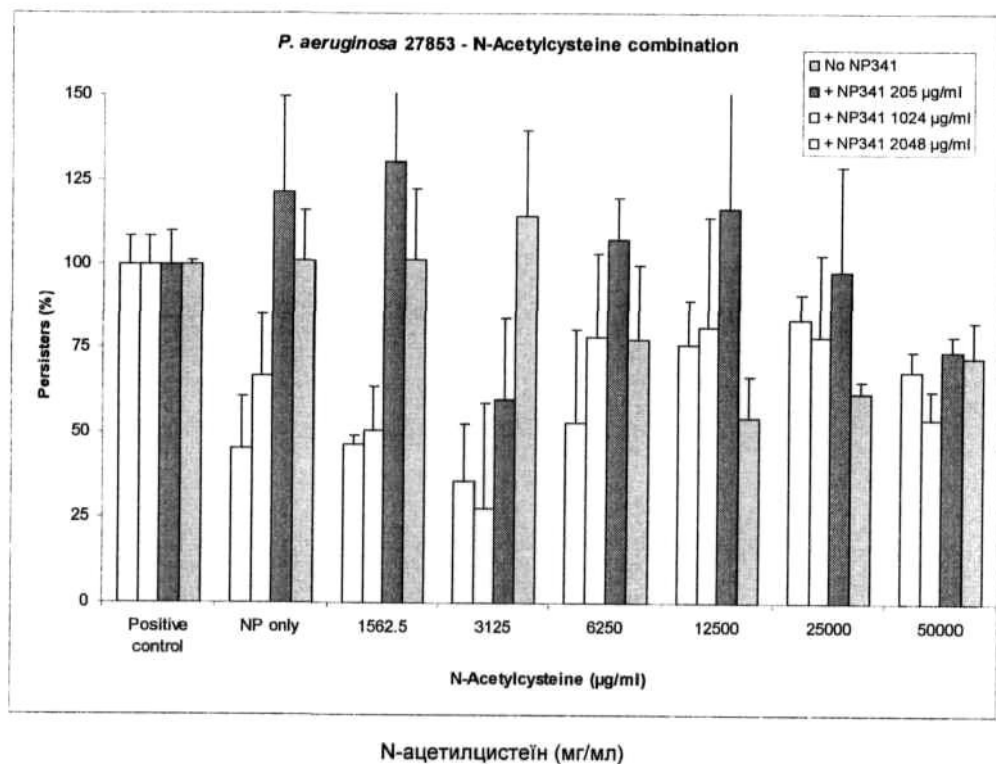


Fig. 20

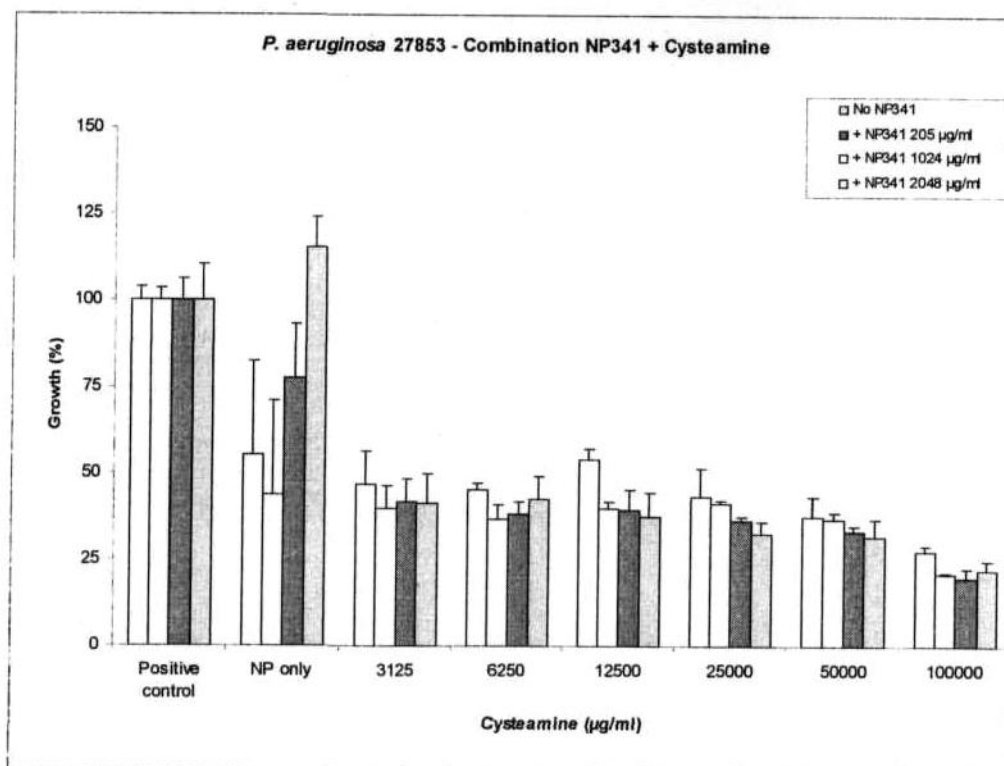
(b)

P. Aeruginosa 27853- комбінація N-ацетилцистеїн



(a)

Aeruginosa 27853- комбінація NP341-цистеамін

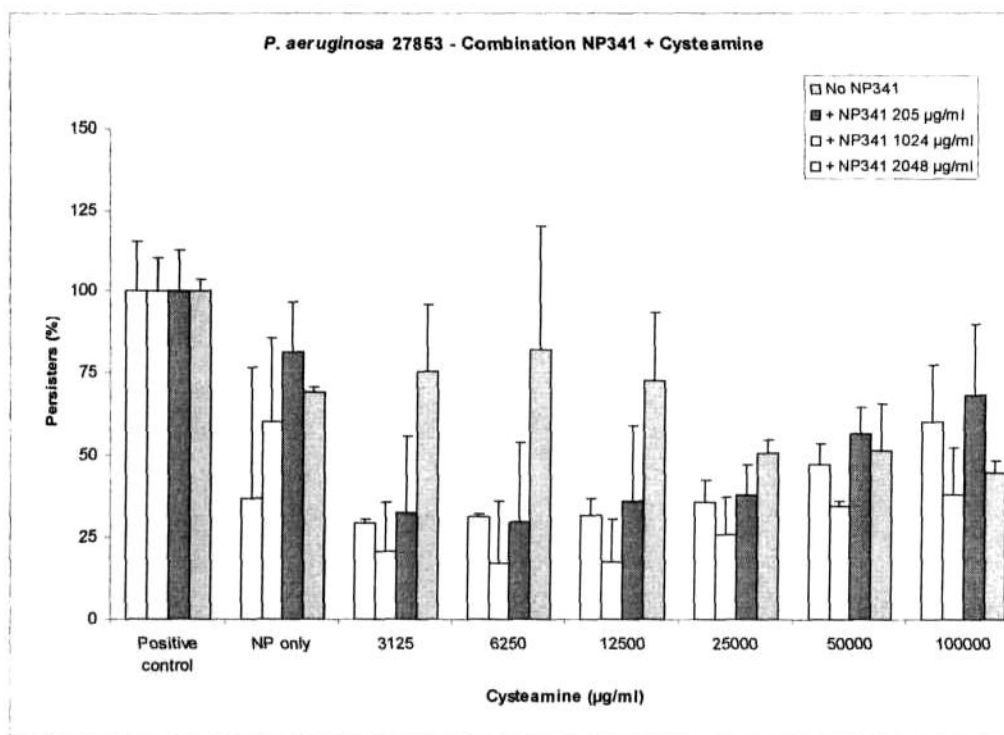


Цистеамін (мг/мл)

Fig. 21

(b)

Aeruginosa 27853- комбінація NP341-цистеамін



Цистеамін (мг/мл)

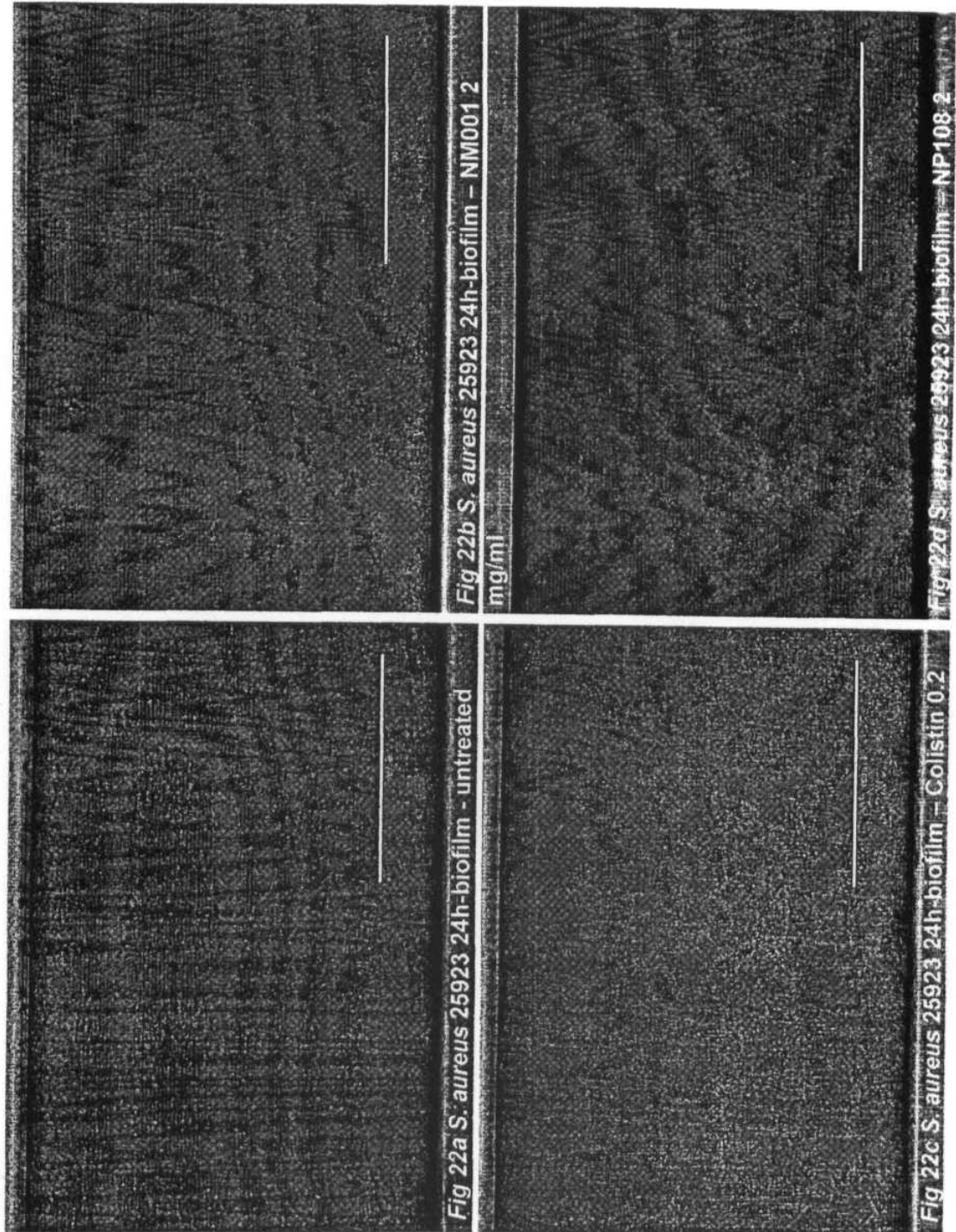


Fig. 22 (a-d)

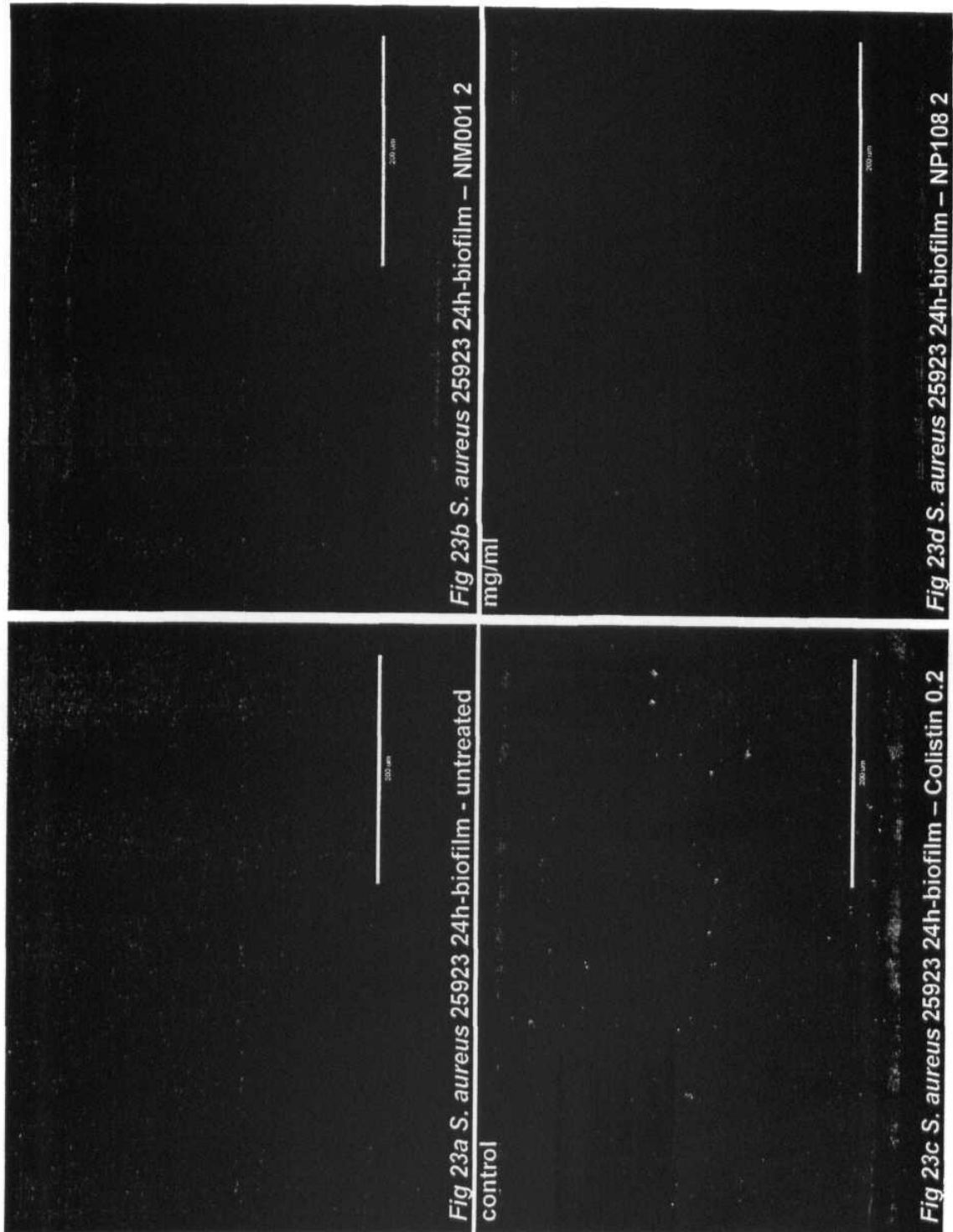


Fig. 23 (a-d)

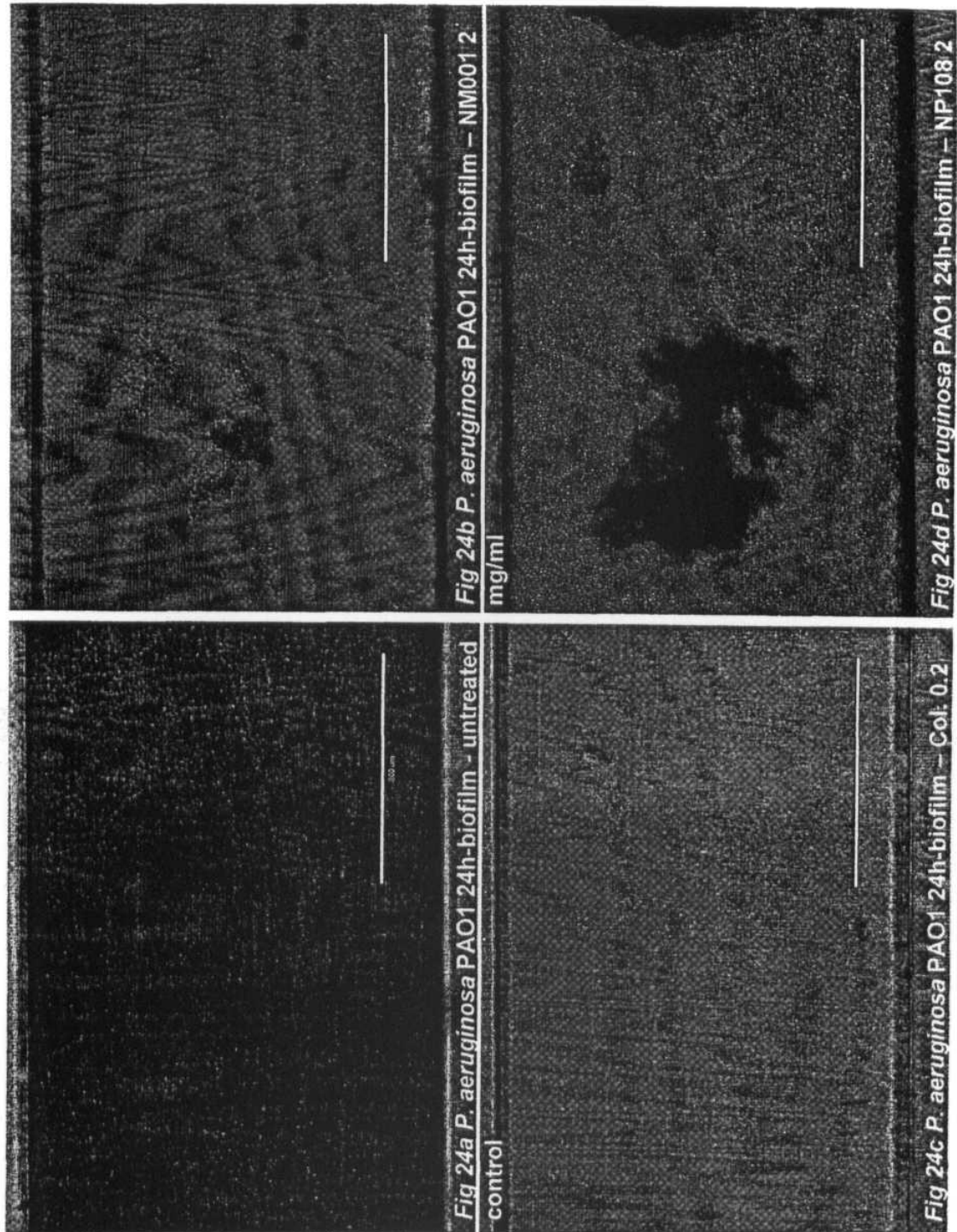


Fig. 24 (a-d)

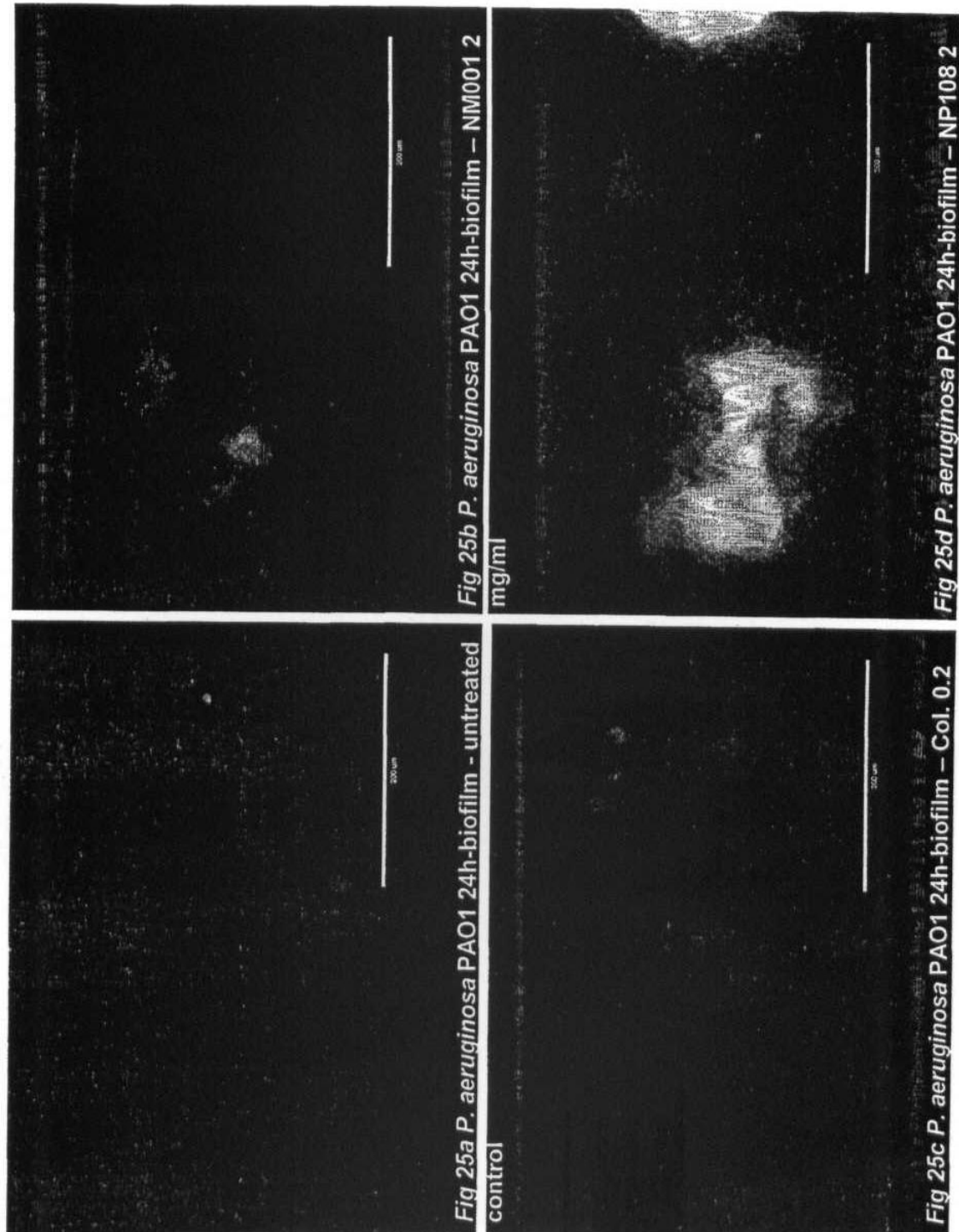


Fig. 25 (a-d)

Комбінації NP432 проти біоплівки *P. Aeruginosa* PAO1

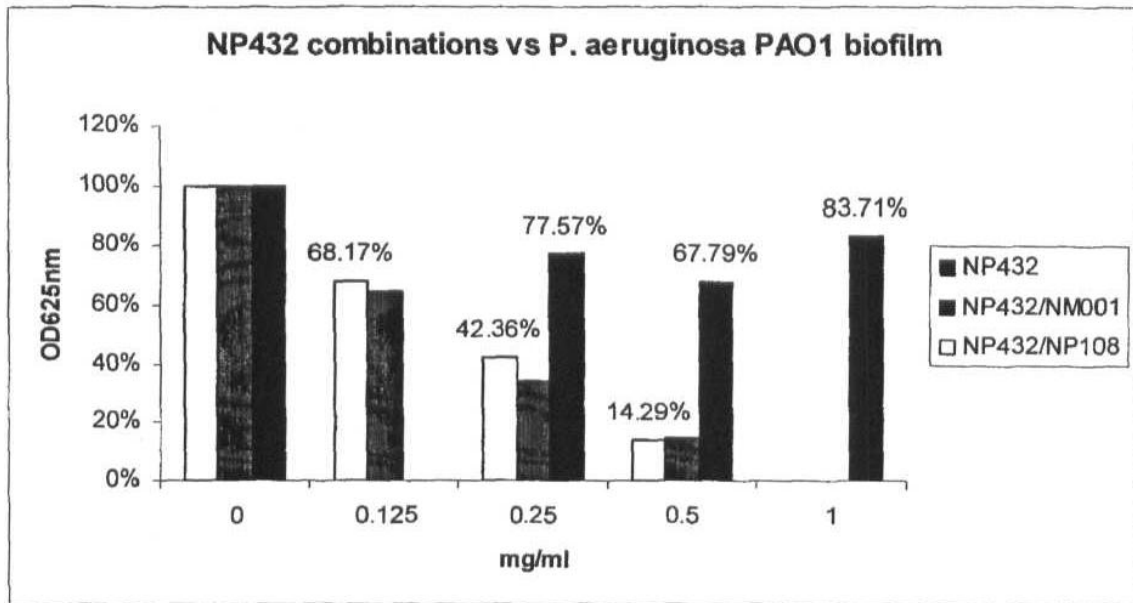


Fig. 26

Комбінації NP445 проти біоплівки *P. Aeruginosa* PAO1

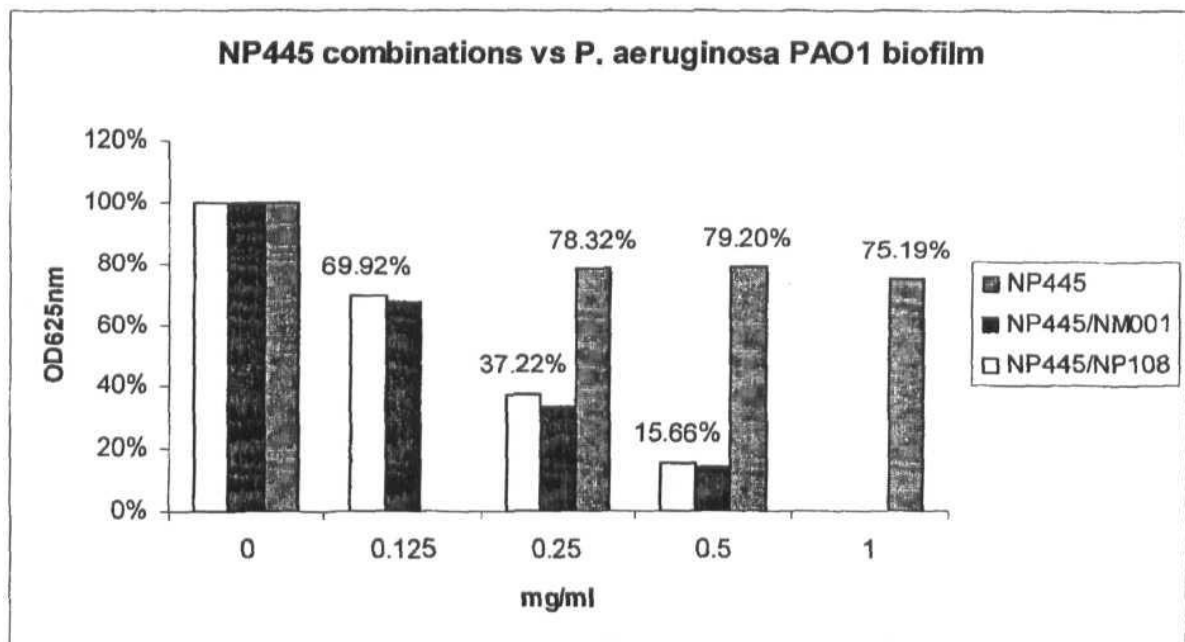


Fig. 27

Комбінації NP458 проти біоплівки *P. Aeruginosa* PAO1

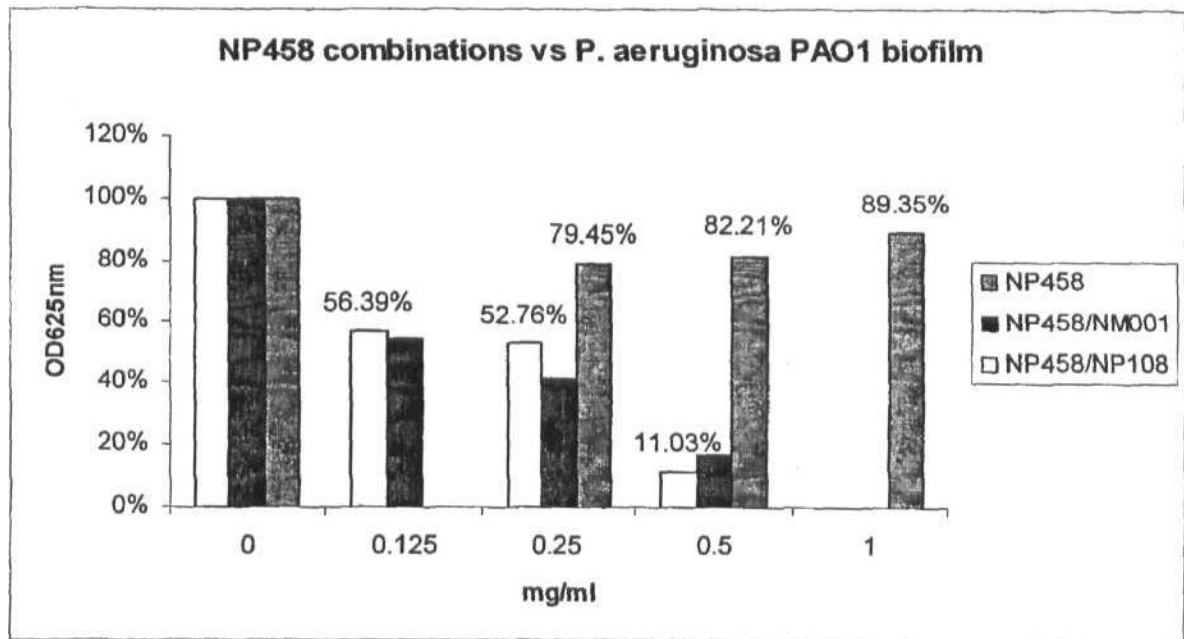


Fig. 28

Комбінації NP462 проти біоплівки *P. Aeruginosa* PAO1

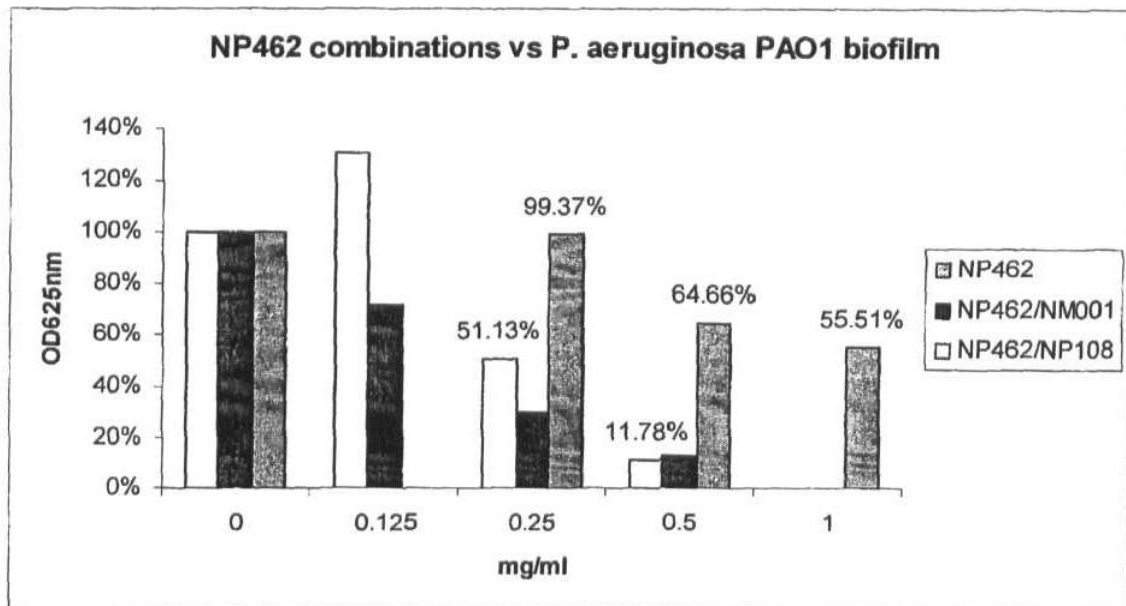
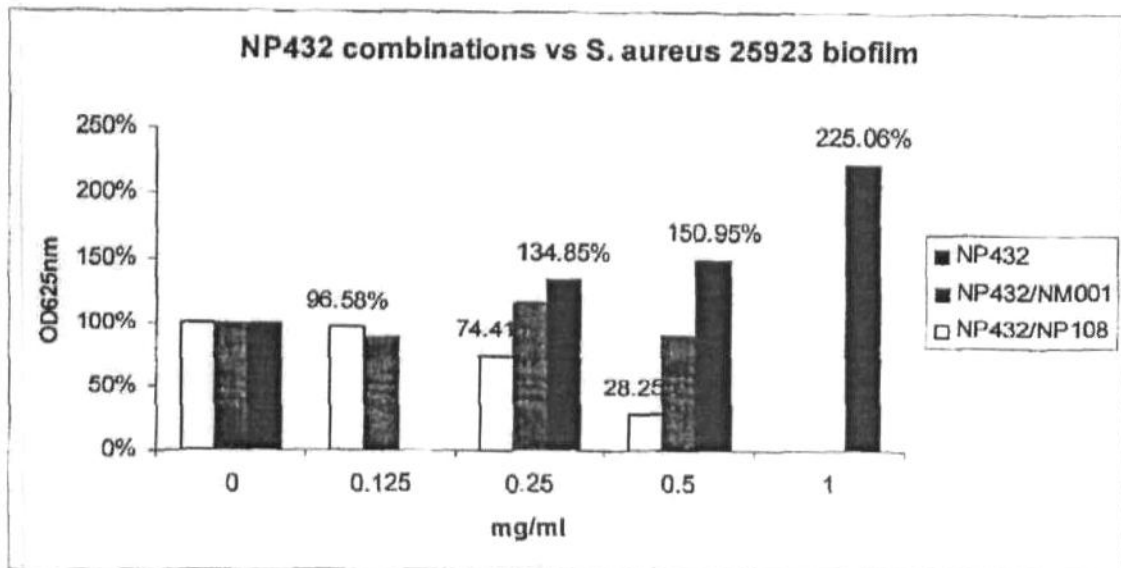


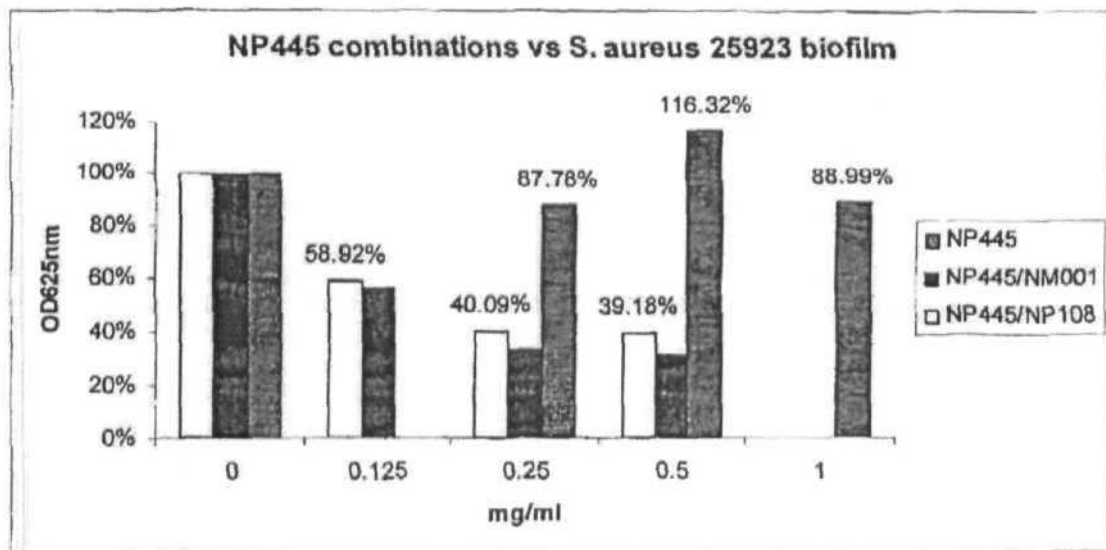
Fig. 29

Комбінації NP432 проти біоплівки *S. Aureus* 25923



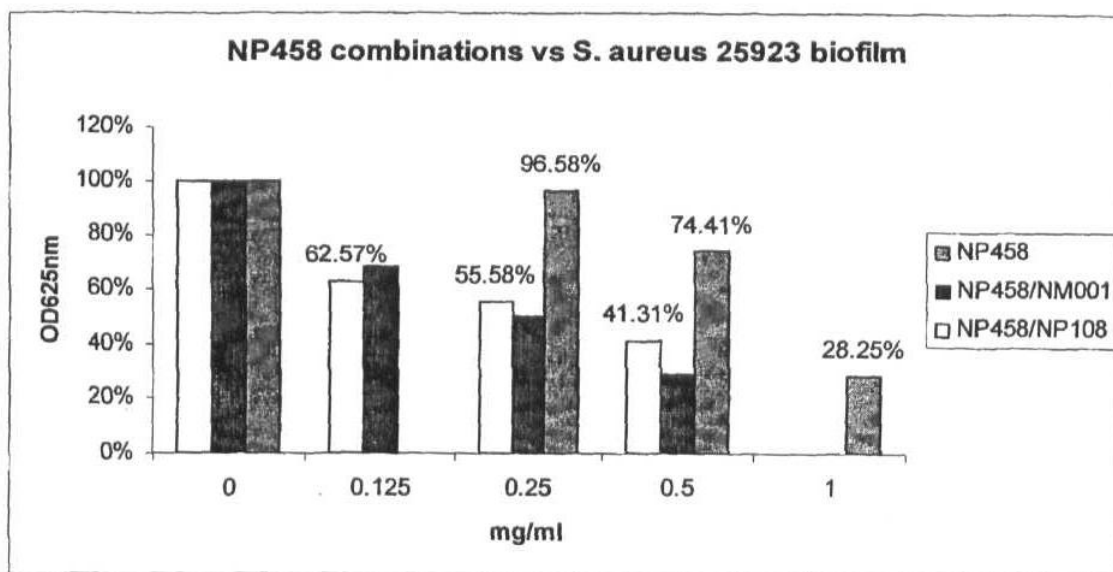
Фіг. 30

Комбінації NP445 проти біоплівки *S. Aureus* 25923



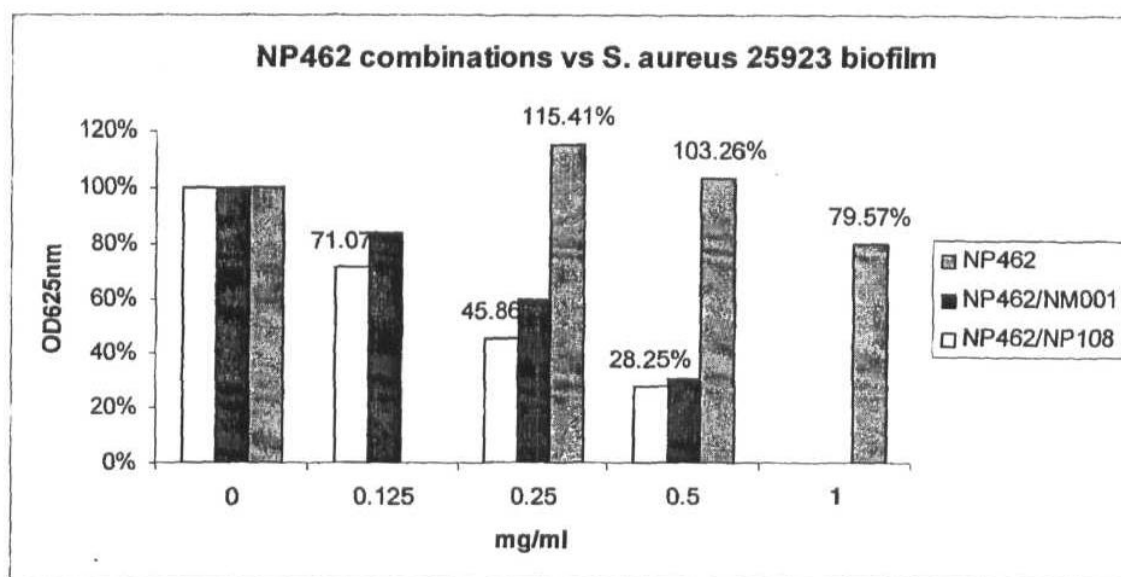
Фіг. 31

Комбінації NP445 проти біоплівки S. Aureus 25923



Фіг. 32

Комбінації NP445 проти біоплівки S. Aureus 25923



Фіг. 33

Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

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