



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **114922** (13) **U**  
(51) МПК (2017.01)  
**A61K 31/00**  
**A61P 31/00**

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

(21) Номер заявки: **u 2016 10245**  
(22) Дата подання заявки: **07.10.2016**  
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: **27.03.2017**  
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **27.03.2017, Бюл.№ 6**

(72) Винахідник(и):  
**Дяченко Валентина Федорівна (UA),**  
**Марющенко Анатолій Михайлович (UA),**  
**Чигиринська Ніла Анатоліївна (UA),**  
**Городницька Наталія Іллівна (UA),**  
**Куцай Наталія Михайлівна (UA)**  
(73) Власник(и):  
**ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ**  
**МІКРОБІОЛОГІЇ ТА ІМУНОЛОГІЇ ІМ. І.І.**  
**МЕЧНИКОВА НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ**  
**МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ",**  
вул. Пушкінська, 14-16, м. Харків, 61057 (UA),  
**Дяченко Валентина Федорівна,**  
вул. Автострадна, 13/1, кв. 14, м. Харків, 61038 (UA),  
**Марющенко Анатолій Михайлович,**  
вул. Гвардійців Широнінців, 23, кв. 17, м. Харків, 61054 (UA),  
**Чигиринська Ніла Анатоліївна,**  
пров. Васнецова, 6, м. Харків, 61046 (UA),  
**Городницька Наталія Іллівна,**  
вул. Тракторобудівників, 130, кв. 206, м. Харків, 61054 (UA),  
**Куцай Наталія Михайлівна,**  
вул. Ушакова, 20, кв. 2, м. Харків, 61001 (UA)

**(54) ПРОТИМІКРОБНА КОМПОЗИЦІЯ ДЛЯ ІНГІБУВАННЯ БІОПЛІВКОУТВОРЕННЯ PSEUDOMONAS AERUGINOSA ТА ENTEROBACTERIACEAE**

**(57) Реферат:**

Протимікробна композиція для інгібування біоплівкоутворення *Pseudomonas aeruginosa* та *Enterobacteriaceae* містить як активний компонент ципрофлоксацин. Ципрофлоксацин застосовується в комбінації з антибіотиком з групи цефалоспоринів 3-го покоління - цефтазидимом.

**UA 114922 U**



Корисна модель належить до медицини, а саме до засобів з антибактеріальною активністю, і може бути використана як протимікробна композиція з синергетичною дією, що інгібує біоплівкоутворення *Pseudomonas aeruginosa* та *Enterobacteriaceae*.

Синьогнійна паличка та ентеробактерії є одними з основних збудників внутрішньолікарняних інфекцій, що обумовлюють широкий спектр гострих та хронічних захворювань. Часто ці захворювання відрізняються тяжким перебігом, у зв'язку з наявністю у збудниках багатьох факторів вірулентності, природної та набутої антибіотикорезистентності, а також високою здатністю до формування біоплівок [1].

Інтенсивне вивчення біоплівок, проведене протягом останніх років, дозволило сформулювати нові уявлення про організацію та життєдіяльність бактерій. Накопичені дані засвідчили особливі якості бактерій в біоплівках. Для практичної медицини найбільш важливим є суттєве зниження їх чутливості до антибіотиків [2, 3].

Таким чином, питання протидії формуванню біоплівок набуває особливої важливості. Існують різні підходи до подолання резистентності збудників в біоплівках за рахунок підвищення доз або комбінування антимікробних препаратів між собою та з різними хімічними сполуками. Як посилювачі антимікробної дії вивчаються похідні вісмуту, срібла, катіонних поліпептидів та інше [4].

Перспективним препаратом в цьому відношенні можливо вважати антибіотик з групи фторхінолонів - цiproфлоксацин. Антибіотик має широкий спектр дії, активний по відношенню до синьогнійної палички та ентеробактерій.

Як і всі препарати цієї групи він глибоко проникає в біоплівки та мікробні клітини. Крім цього препарати цієї групи дуже вигідно відрізняються від інших антибіотиків за співвідношенням ефективності/безпечності [5].

Відома протимікробна композиція, ефективна у відношенні біоплівок *Pseudomonas aeruginosa*, яка включає цiproфлоксацин та катіонний пептид LL-37, що дозволяє знижувати мінімальну інгібуючу концентрацію цiproфлоксацину та його концентрацію, необхідну для ерадикації біоплівок до 8 разів [6].

Ефективні концентрації цiproфлоксацину та катіонного пептиду LL-37 складали відповідно 80-5120 мкг/мл та 640 мкг/мл.

Як і в запропонованій корисній моделі, для запобігання утворення біоплівки *Pseudomonas aeruginosa* використовували антибіотик з групи фторхінолонів - цiproфлоксацин.

Причиною, що перешкоджає досягненню технічного результату є висока концентрація антибіотика (концентрація цiproфлоксацину 5120 мкг/мл перевищує терапевтичну концентрацію цього препарату більше, ніж в 5 тис. раз), що підвищує ризик виникнення побічних ефектів. Крім цього, використаний катіонний поліпептид LL-37 знаходиться на експериментальній стадії вивчення. Дія запропонованої композиції поширюється на біоплівки *Pseudomonas aeruginosa*, про її ефективність щодо ентеробактерій не повідомляється.

Відоме застосування за аналогічним призначенням протимікробної композиції у складі цiproфлоксацину та сполук вісмуту, зокрема колоїдного субцитрату вісмуту, вісмутетандитіолу, трикалію дицитрату вісмуту [7]. У присутності вісмутетандитіолу в концентрації 0,02 мкг/мл ефективна концентрація цiproфлоксацину знижувались для різних штамів від 3 до 50 разів.

Ознакою, спільною з суттєвими ознаками рішення, що заявляється, є використання для запобігання утворенню біоплівок штамми *Pseudomonas aeruginosa* комбінації двох протимікробних засобів, одним з яких є цiproфлоксацин.

Причиною, що заважає досягненню технічного результату, є нестабільність ефекту. Автори повідомляють про можливість протилежного впливу (стимуляції біоплівкоутворення) при використанні вісмутетандитіолу в концентраціях, менших ніж 0,02 мкг/мл. Крім цього токсичність зазначених сполук вісмуту для людини не визначена.

Прототипом вибрана протимікробна композиція для інгібування біоплівкоутворення *Pseudomonas aeruginosa*, що включає застосування синергетичної комбінації катіонного поліпептиду поліміксину та антимікробний агент карбопенем у співвідношенні інгредієнтів (масових частин) 1:8-1:16 [8].

Як і в запропонованій корисній моделі композиція для інгібування біоплівкоутворення *Pseudomonas aeruginosa* складається з двох відомих антибіотиків з різним механізмом антимікробної дії.

Причиною, що перешкоджає отриманню технічного результату, є те, що запропонована композиція не охоплює групу полірезистентних штамів ентеробактерій. Крім цього карбапенеми належать до групи сильних антибіотиків з широким спектром дії, до якого рідко розвивається резистентність, тому показання для комбінування дуже обмежені: коли виявляються стійкі до нього грампозитивні збудники.

В основу корисної моделі поставлена задача розробити протимікробну композицію для інгібування біоплівкоутворення *Pseudomonas aeruginosa* та *Enterobacteriaceae*, в якій за рахунок добору оптимального співвідношення ципрофлоксацину з іншим протимікробним засобом, забезпечити зниження його терапевтичної дози, ефективної у відношенні збудників, що існують у формі біоплівки.

Поставлена задача вирішується застосуванням композиції, що містить ципрофлоксацин, та антибіотик з групи цефалоспоринов 3-го покоління цефтазидим при наступному співвідношенні інгредієнтів, (масових частин):

ципрофлоксацин 1  
цефтазидим 4-8.

До суттєвих ознак корисної моделі, що заявляється, належить застосування комбінації ципрофлоксацину та цефтазидиму як активний компонент та їх співвідношення 1:4-1:8, що забезпечує синергійний ефект.

Означені параметри обґрунтовуються результатами експериментальних досліджень, наведених нижче.

Протимікробну активність комбінацій ципрофлоксацину з іншими антибіотиками різних груп вивчали на референтному штамі *P. aeruginosa* ATCC 27853, 12 циркулюючих полірезистентних штамів *P. aeruginosa*, 10 циркулюючих полірезистентних штамів *E. coli* (сімейство *Enterobacteriaceae*) та 4-х циркулюючих полірезистентних штамів *K. pneumoniae* (сімейство *Enterobacteriaceae*) методом послідовних серійних розведень у рідкому поживному середовищі. Ефект комбінацій оцінювали шляхом визначення індексу FIC (fractional inhibitory concentration) як суму відношень MİK кожної сполуки у комбінації до MİK сполук при використанні окремо. При  $FIC \leq 0,5$  ефект розцінювали як виражений синергійний, при  $FIC < 1,0$  - синергійний, при  $FIC = 1,0$  - адитивний, при  $FIC > 1,0$  - антагоністичний. Результати, наведені в таблиці 1, ілюструють наявність більш вираженого синергійного ефекту у відношенні *P. aeruginosa* та представників сімейства *Enterobacteriaceae* у порівнянні з комбінаціями ципрофлоксацину з іншими групами антибіотиків.

Таблиця 1

Комбінований ефект дії протимікробних препаратів на штами *P. aeruginosa* та *Enterobacteriaceae* (n=27)

Протимікробні препарати	Значення індексу FIC у комбінації з ципрофлоксацином (M±m)
1	2
Аміноглікозиди	1,0±0,1
Карбапенеми	0,97±0,2
Фосфоміцин	0,96±0,1
Доксициклін	1,0±0,0
Цефтазидим	0,72±0,4
Цефазолін	0,96±0,2
Цефуросим	0,92±0,4

Заявлене співвідношення компонентів композиції обґрунтовується даними, наведеними в табл. 2, що демонструють наявність синергійного ефекту навіть при застосуванні ципрофлоксацину в мінімальній бактеріостатичній концентрації (1 мкг/мл) в комбінації з суббактеріостатичною концентрацією цефтазидиму (8 мкг/мл).

Таблиця 2

Комбінований ефект ципрофлоксацину та цефтазидиму на тест-штами мікроорганізмів

Препарат або протимікробна композиція	Діаметри зон пригнічення росту тест - штамів мікроорганізмів у мм (M±m)			
	P. aeruginosa ATCC 27853	P. aeruginosa № 7	E. coli № 19	K. pneumoniae № 4
1	2	3	4	5
Ципрофлоксацин (контроль)	26±1,0	14±0,5	18±1,0	16±0,5
Ципрофлоксацин (1 мкг/мл) + Цефтазидим (2 мкг/мл)	26±2,0	24±1,0*	22±2,0	18±2,0
Ципрофлоксацин (1 мкг/мл)+ Цефтазидим 4 мкг/мл	35±1,5*	38±3,0*	35±2,0*	32±1,5*
Ципрофлоксацин (1 мкг/мл) + Цефтазидим 8 мкг/мл	38±3,0*	32±2,0*	38±3,0*	38±3,0*
Ципрофлоксацин (2 мкг/мл) + Цефтазидим 16 мкг/мл	36±2,0*	30±1,0*	38±3,0*	38±3,0*
Ципрофлоксацин (2 мкг/мл) + Цефтазидим 32 мкг/мл	28±2,0	18±2,0	22±2,0	19±2,0

Примітка \* - достовірна різниця між контролем (p<0,5)

Дослідження впливу заявленої композиції на формування біоплівки штамми P. aeruginosa та Enterobacteriaceae здійснювалось за стандартним методом [9] з використанням планшетного фотометра.

У рідке поживне середовище (бульйон Мюллера-Хінтона) вносили ципрофлоксацин (1-4 мкг/мл) та цефтазидим (4-32 мкг/мл). Для інокуляції використовували суспензію тест-штамів еквівалентну 0,5 за стандартом МакФарланда, розведену в 100 разів. Встановлено відсутність біоплівкоутворення в межах співвідношення компонентів композиції, що заявляється, що підтверджує можливість здійснення КМ.

Джерела інформації:

1. Шагинян, И.А. Неферментирующие грамотрицательные бактерии в этиологии внутрибольничных инфекций: клинические, микробиологические и эпидемиологические особенности [Текст] / И.А. Шагинян, М.Ю. Чернуха // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. - 2005. - Т. 7, № 3. - С. 271-285.

2. Hardy, M. In vitro activity of antibiotic combinations against Pseudomonas aeruginosa biofilm and planktonic cultures. [Text] / M. Hardy, F. Vanderbist, H. Traore [et al.] // Int J Antimicrob Agents. - 2007. - Vol. 31, № 4. - P. 329-336.

3. Cernohorska, L. Antibiotic synergy against biofilm forming Pseudomonas aeruginosa. [Text] / L Cernohorska, M. Votava // Folia Microbial (Praha). - 2008. - Vol. 53, № 1. - P. 57-60.

4. Folsom, J.P. In vitro efficacy of bismuth thiols against biofilms formed by bacteria isolated from human chronic wounds. [Text] / J. P. Folsom, B. Baker // J Appl Microbial. - 2011. - Vol. 111, № 4. - P. 989-996.

5. Фешенко, Ю.И. Фторхинолоновые антибактериальные препараты (общие сведения клиническое применение) [Текст] / Ю.И. Фешенко, Ю.М. Мостовой // Киев. - 2002. - С. 26.

6. Dosler, S. Inhibition and destruction of Pseudomonas aeruginosa biofilms by antibiotics and antimicrobial peptides [Text] / S. Dosler, E. Karaaslan // Peptides. - 2014. - Vol. 62. - P. 32-37.

7. Varposhti, M. Synergistic effects of bismuth thiols and various antibiotics against Pseudomonas aeruginosa biofilm [Text] / M. Varposhti, A. Abdi AH [et al.] // Jundishapur J Microbiol. - 2014. - Vol. 7, № 3. - P. e9142

8. Пат. 82743 UA МКП<sup>51</sup> А61К 31/00 Протимікробна композиція для інгібування біоплівкоутворення *Pseudomonas aeruginosa* [Текст] / Лісняк Ю.В. (UA), Склад Н.І. (UA), Білозерський В.І. (UA); патентовласник Державна установа "Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова національної академії медичних наук України (UA). - № u 2013 00448; заявл. 14.01.2013; опубл. 12.08.2013, Бюл. № 15.

9. A 96-well-plate-based optical method for the quantitative and qualitative evaluation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and its application to susceptibility testing. Mathias Musken, Stefano Di Fiore, Ute Romling & Susanne Haussler// Nature Protocols. - 2010. - V 5. - P. 1460-1469. - doi:10.1038/nprot.2010.110.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Протимікробна композиція для інгібування біоплівкоутворення *Pseudomonas aeruginosa* та *Enterobacteriaceae*, що містить як активний компонент ципрофлоксацин, яка **відрізняється** тим, що ципрофлоксацин застосовується в комбінації з антибіотиком з групи цефалоспоринов 3-го покоління - цефтазидимом, при наступному співвідношенні інгредієнтів, (масових частин):

ципрофлоксацин	1
цефтазидим	4-8.

---

Комп'ютерна верстка В. Мацело

---

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

---

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