



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **82743** (13) **U**
(51) МПК (2013.01)
A61K 31/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2013 00448	(72) Винахідник(и): Лісняк Юрій Володимирович (UA), Скляр Надія Іванівна (UA), Саркіс-Іванова Владислава Вадимівна (UA), Калініченко Світлана Вікторівна (UA), Білозерський Володимир Іванович (UA), Давиденко Марина Борисівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 14.01.2013	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 12.08.2013	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 12.08.2013, Бюл.№ 15	(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, Україна (UA)

(54) ПРОТИМІКРОБНА КОМПОЗИЦІЯ ДЛЯ ІНГІБУВАННЯ БІОПЛІВКОУТВОРЕННЯ PSEUDOMONAS AERUGINOSA

(57) Реферат:

Протимікробна композиція для інгібування біоплівкоутворення *Pseudomonas aeruginosa* містить антимікробний агент - катіонний поліпептид поліміксин. Вона містить додатково антимікробний агент карбопенем іміпенем.

UA 82743 U

Корисна модель належить до медицини, а саме до засобів з антибактеріальною активністю і може бути використана як антисиньогнійна композиція з синергетичною дією, що інгібує біоплівкоутворення *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*).

Грамнегативна бактерія *P. aeruginosa* характеризується величезними адаптаційними можливостями, екологічною пристосованістю і, як наслідок, широким розповсюдженням. В останній час *P. aeruginosa* привертає увагу як один з основних збудників нозокоміальних інфекцій, які характеризуються тяжким станом хворих, приводять до тяжких ускладнень зі смертельними випадками, приносять значні економічні збитки. Клінічно важливою особливістю вказаних бактерій є висока частота резистентності до різноманітних класів протимікробних засобів. В останнє десятиріччя процент пан-антибіотико-резистентних штамів швидко зростає [1].

Іншою не менш важливою особливістю штамів *P. aeruginosa* є надзвичайно висока здатність до формування біоплівки, структура та фізіологічні властивості якої забезпечують підвищену стійкість до протимікробних препаратів та допомагають подолати захисні сили макроорганізму при інфекції. Чутливість бактерій у планктонній формі та у формі біоплівки значно відрізняється - мінімальні інгібуючі концентрації антимікробних агентів зростають у 100-1000 разів, у результаті клітини *P. aeruginosa* стають практично непроникними для антибіотиків у терапевтичних концентраціях [2, 3]. Тобто, навіть адекватна антибіотикотерапія не завжди здатна зупинити інфекцію на етапі формування біоплівки, тому розробка ефективних засобів, що здатні блокувати цей процес є надзвичайно актуальною.

У відсутності нових ефективних препаратів стратегія антисиньогнійної терапії базується сьогодні на застосуванні катіонних поліпептидів поліміксинів [4, 5]. Більшість грамнегативних бактерій (включаючи *P. aeruginosa*) є чутливими до поліміксинів, а формування резистентності до них відбувається повільно і спостерігається значно рідше у порівнянні з іншими антибіотиками [6].

Оскільки, з огляду на можливу нефротоксичність, просте збільшення дози поліміксинів не є способом оптимізації їх активності проти *P. aeruginosa* у формі біоплівки, великі потенційні можливості максимізувати ефективність поліміксинів при мінімізації небезпеки появи резистентності до них може мати комбінована терапія з іншими антибіотиками [7]. При цьому, як відомо, запобігання утворенню біоплівки потребує менших концентрацій антибіотика, ніж знищення уже утвореної біоплівки [8]. Застосування антибіотика, який у сублетальних концентраціях руйнує зовнішню мембрану грамнегативної бактерії, в комбінації з іншим антибіотиком, який через резистентність сам по собі не ефективний, розширює терапевтичні можливості (і тим самим підвищує терапевтичну ефективність) антибіотиків, що застосовуються.

Відома антисептична композиція "Горостен" [9], що включає як активну речовину декаметоксин при наступному співвідношенні компонентів (в/о % %):

декаметоксин	0,025-0,25
спирт етиловий 95 %	15,0-20,0
гліцерин	5,0-10,0
розчин вітралю спиртовий 1 %	0,25-0,5
вода очищена	решта до 100.

Як і в запропонованій корисній моделі використовується композиція протимікробних засобів, що має антисиньогнійну дію.

Причиною, що перешкоджає отриманню технічного результату, є обмежені показання для використання препарату, а саме застосування лише для профілактики та лікування інфекційних уражень шкіри. При цьому використання високих концентрацій декаметоксину (31,2-83,3 мкг/мл) для досягнення бактеріостатичного/бактерицидного ефекту проти тест-штаму *P. aeruginosa* та відсутні дані щодо впливу композиції на процес біоплівкоутворення бактерій обмежують використання засобу.

Відомий спосіб запобігання утворенню біоплівки *P. aeruginosa*, що включає застосування заряджених поліамінних сполук, зокрема позитивно заряджених поліпептидів (поліаргініну, полілізіну та полігістидину) [10].

Ефективне запобігання утворенню біоплівки *P. aeruginosa* здійснювали додаванням до культури *P. aeruginosa* катіонного поліпептиду поліаргініну з молекулярною масою приблизно 11600 дальтон в концентрації 5 і 10 мкМ (58 і 116 мкг/мл, відповідно).

Як і в запропонованій корисній моделі, для запобігання утворенню біоплівки *P. aeruginosa* використовували катіонний поліпептид, який також мав бактерицидну дію.

Причиною, що перешкоджає отриманню технічного результату, є висока концентрація катіонного поліпептиду, що підвищує ризик виникнення побічних ефектів та ускладнень та можливість розвитку резистентності бактерій до монопрепарату.

Відомий спосіб запобігання утворенню біоплівки *P. aeruginosa*, що включає застосування композицій у складі тіол-специфічного реагенту та катіонного поліпептиду [11].

Зниження формування біоплівки *P. aeruginosa* здійснювали додаванням до культури *P. aeruginosa* синергетичної антимікробної композиції у складі тіол-специфічного реагенту у концентрації 12,5÷200 мкг/мл у диметилсульфоксиді (або у метанолі, ацетоні або ацетонітрилі) та катіонного поліпептиду полілізину у концентрації 12,5÷200 мкг/мл в воді.

Як і в запропонованій корисній моделі, для зниження формування біоплівки *P. aeruginosa* використовували антимікробну композицію, де однією із складових був катіонний поліпептид, який у цьому випадку мав незначний вплив на життєздатність бактеріальних клітин.

Причиною, що перешкоджає отриманню технічного результату, є використання як розчинника тіол-специфічного реагенту диметилсульфоксиду (або метанолу, ацетону або ацетонітрилу), що унеможливорює застосування композиції як лікувального препарату для внутрішнього застосування.

Прототипом вибраний засіб інгібування утворення і росту біоплівки *P. aeruginosa*, що включає застосування синергетичної комбінації фіто-фенольної сполуки та антимікробного агенту - катіонного поліпептиду поліміксину [12].

Як і в запропонованій корисній моделі, у відомому засобі для інгібування утворення біоплівки застосовують комбінацію засобів, одним з яких є антибіотик катіонний поліпептид поліміксин.

Причиною, що перешкоджає отриманню технічного результату, є обмеження спектра антисиньогнійної дії композиції одним протимікробним засобом та неможливість зниження мінімальних інгібуючих концентрацій (МІК) по відношенню до тест-штамів *P. aeruginosa*.

В основу корисної моделі поставлена задача створення протимікробної композиції, що інгібує біоплівкоутворення *P. aeruginosa*.

Технічний результат, який може бути отриманий при використанні запропонованої корисної моделі, полягає у розширенні терапевтичних можливостей, зниженні терапевтичної дози (і тим самим підвищенні терапевтичної ефективності) засобу.

Поставлена задача вирішується тим, що протимікробна композиція для інгібування біоплівкоутворення *Pseudomonas aeruginosa*, яка містить антимікробний агент - катіонний поліпептид поліміксин, додатково містить антимікробний агент карбопенем іміпенем при наступному співвідношенні інгредієнтів (мас. частин):

катіонний поліпептид поліміксин	1
карбопенем іміпенем	8-16.

Запропонована корисна модель відрізняється від прототипу тим, що композиція містить додатково антимікробний агент іміпенем при наступному співвідношенні інгредієнтів (масових частин): катіонний поліпептид поліміксин 1 карбопенем іміпенем 8-16.

Поставлена задача вирішується тим, що в композиції використана двокомпонентна комбінація протимікробних засобів з різними та специфічно протилежними механізмами дії на *P. aeruginosa*. У результаті використання двох відомих засобів одержано препарат з синергійною протимікробною активністю, яка перевищує протимікробну дію у порівнянні із засобом-прототипом.

Згідно з представленою корисною моделлю запропонована композиція, яка включає суміш представників карбопенемів, які за природною протипсевдомонадною активністю є одними з найбільш ефективних β-лактамних антибіотиків, та одного з представників катіонних поліпептидів.

Синергетична комбінація, яка запобігає утворенню біоплівки *P. aeruginosa*, складається одночасно з двох протимікробних засобів, а саме β-лактамного антибіотика карбопенему іміпенему (Imipenem) - N-формімідоїлтієнаміцин (або (5S, 6R)-3-[[2-(формімідоїламіноетил)тіо]-6-[R]-1-гідроксіетил]-7-оксо-1-азабіцикло[3.2.0]-гепт-2-ен-2-карбонова кислота) у мінімальних інгібуючих концентраціях та поліміксину В сульфату або поліміксину М сульфату, взятих у субінгібуючих концентраціях.

Головний механізм стійкості *P. aeruginosa* до іміпенему пов'язаний з порушенням проникності мікробної клітини для антибіотика внаслідок втрати поринового каналу OprD у результаті мутацій. На фоні дії іміпенему досить швидко відбувається селекція таких мутантів, бактерії розмножуються та досягають концентрацій, при яких формується біоплівка. У результаті значення МІК іміпенему зростають, що супроводжується клінічною неефективністю лікування [1]. Механізм дії представників катіонних поліпептидів пов'язаний з порушенням цілісності зовнішньої мембрани бактерій за типом дії поверхнево активних речовин, тобто шлях для надходження інших протимікробних речовин, зокрема, іміпенему відкритий. Визначені субінгібуючі концентрації катіонних поліпептидів у складі композиції, що заявляється, є

ефективні для інгібування біоплівкоутворення *P.aeruginosa* та проявляють синергідний протимікробний ефект з іміпенемом.

Композиція створюється таким чином. В основу вноситься розчин іміпенему у мінімальній інгібуючій для штамів *P. aeruginosa* концентрації (2-8 мкг/мл) та розчин катіонного поліпептиду у співвідношенні до іміпенему 1:8-1:16 (концентрація поліміксину субінгібуюча і становить 0,5-1,0 мкг/мл). Суттєвими ознаками корисної моделі слід вважати вибір препарату іміпенему як активного компонента, вибір співвідношення діючих речовин та кількісний склад композиції. Заявлена субінгібуюча концентрація поліміксинів від 0,5 до 1,0 мкг/мл є найбільш оптимальною, оскільки вміст поліміксинів менше 0,5 мкг/мл не забезпечує інгібування біоплівкоутворення штамів *P. aeruginosa*, а вміст більше 1,0 мкг/мл знижує синергідний протимікробний ефект та підвищує ризик виникнення побічних ефектів при застосуванні композиції.

Приклад 1

Протимікробну активність антисиньогнійних препаратів та їх комбінацій з поліміксинами вивчали на референтному штамі *P. aeruginosa* ATCC 27853 та 33 циркулюючих полірезистентних штамів *P. aeruginosa* 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≤0,5 ефект розцінювали як виражений синергідний, при FIC≤0,9 - синергідний, при FIC=1,0 - адитивний, при FIC>1,0 - антагоністичний. Результати досліджень наведені в таблиці 1.

Протимікробна композиція для інгібування біоплівкоутворення *Pseudomonas aeruginosa*

Таблиця 1

Комбінований ефект дії протимікробних препаратів на штам *P.aeruginosa*

Протисиньогнійні препарати	Значення індексу FIC у комбінації з поліміксинами (M±m)	
	М	В
Фторхінолони	1,0±0,1	1,0±0,0
Аміноглікозиди	0,96±0,2	0,99±0,01
Цефалоспорины поколінь III-IV	1,0±0,0	1,0±0,0
Меропенем	0,94±0,4	0,92±0,15
Іміпенем	0,75±0,2	0,6±0,1

Порівняльне вивчення ефективності заявленої композиції стосовно штамів *P. aeruginosa* показало її синергідну активність перед іншими комбінаціями антисиньогнійних препаратів з поліміксинами.

Приклад 2

Заявлена композиція створена шляхом введення розчину поліміксину В сульфату (виробник SIGMA-ALDRICH, Швейцарія) у тверде поживне середовище (агар Мюллера-Хінтона) методом послідовних серійних розведень. На поверхню агару інокулювали суспензії тест-штамів *P. aeruginosa* у концентрації 0,5 одиниць McFarland. Після підсушування на поверхню агару наносили стандартизовані комерційні диски з іміпенемом. Контролями слугували чашки з агаром Мюллера-Хінтона без протимікробних засобів, засіяні тест-штамами (контроль культури); засіяні чашки з агаром Мюллера-Хінтона без поліміксину з внесеними дисками з іміпенемом та чашки з агаром Мюллера-Хінтона з поліміксином, засіяні тест-штамами без нанесення дисків з іміпенемом. Після інкубації проведено облік результатів шляхом вимірювання зон пригнічення росту навколо дисків та наявності росту тест-штамів на контрольних чашках без дисків з іміпенемом. Дослідження проведено у трократних повтореннях. Результати представлені у таблиці 2.

Таблиця 2

Комбінований ефект дії іміпенему та поліміксину В сульфату на тест-штами *P. aeruginosa*

Препарат або протимікробна композиція	Діаметри зон пригнічення росту тест-штамів <i>P. aeruginosa</i> у мм (M±m)		
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>P. aeruginosa</i> № 13	<i>P. aeruginosa</i> № 46
Іміпенем (контроль)	22±1,0	14±0,5	28±1,0

Іміпенем + поліміксин В сульфат 2 мгк/мл	24±2,0	17±1,0	30±2,0*
Іміпенем + поліміксин В сульфат 1 мгк/мл	35±3,0*	33±2,0*	37±1,5*
Іміпенем + поліміксин В сульфат 0,5 мгк/мл	40±2,0*	36±3,0*	40±2,0*
Іміпенем + поліміксин В сульфат 0,25 мгк/мл	34±2,0*	30±2,0*	33±1,0
Поліміксин В сульфат 2 мгк/мл	0	0	0

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

- 5 Поєднане застосування препаратів іміпенему та поліміксину В сульфату у субінгібуючих концентраціях (від 1,0 до 0,25 мгк/мл) достовірно підвищує активність іміпенему та розцінюється як синергійний ефект.

Приклад 3

- 10 Заявлена композиція створена шляхом введення розчину поліміксину В сульфату та іміпенему у рідке поживне середовище (бульйон Мюллера-Хінтона) мікрометодом послідовних серійних розведень у об'ємі 0,2 мл. Для інокуляції використовували суспензію тест-штамів *P.aeruginosa* еквівалентну 0,5 за стандартом МакФарланда, розведену в 100 разів. Формування біоплівки штамами *P. aeruginosa* досліджували фотометричним методом з використанням планшетного фотометра. Встановлено відсутність біоплівкоутворення тест-штамів при концентрації поліміксину від 2,0 до 0,5 мгк/мл.

- 15 Джерела інформації:

1. Яковлев, С. В. Устойчивость *Pseudomonas aeruginosa* к карбапенемам: уроки исследования MYSTIC [Электронный ресурс] /СВ. Яковлев // Фарматека.-2007. - № 8/9. - Режим доступа <http://medi.ru/doc/091122.htm>.
2. 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. - № 7(3). - С. 271-285.
3. Mah, T.-F. C. 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents [Text] / T.-F. C Mah, O'Toole G. A. // Trends Microbiol.-2001. -Vol. 9.-P. 34-39.
- 25 4. Zavascki, A. P. Polymyxin B treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review [Text] / A. P. Zavascki, L. Z. Goldani, J. Li, R. L. Nation // J. Antimicrob. Chemother.-2007. - Vol. 60. - P. 1206-1215.
5. Arnold, T. M. Polymyxin antibiotics for gram-negative infections [Text] / T. M. Arnold, G. N. Forrest, K. J. Messmer // Am. J. Health-System Pharmacy.-2007. -Vol. 64, N 8. -P. 819-826.
- 30 6. Gales, A. C. Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54 731 clinical isolates of Gram-negative bacilli: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2001-2004) [Text] / A. C. Gales, R. N. Jones, H. S. Sader // Clin. Microbiol. Infect.-2006. - Vol. 12. -P. 312-321.
7. Balaji, V. Polymyxins: antimicrobial susceptibility concerns and therapeutic options [Text] / V. Balaji, S. S. Jeremiah, P. R. Baliga // Indian J. Med. Microbiol.-2011. - Vol. 29, N 3. - P. 230-242.
- 35 8. Fernandez-Olmos, A. In vitro prevention of *Pseudomonas aeruginosa* early biofilm formation with antibiotics used in cystic fibrosis patients [Text] / A.Fernandez-Olmos, M. A. Garcia-Castillo, L. Maiz, A. Lamas, F. Baquero, R. Canton // Int. J. Antimicrobial Agents.-2012. - Vol. 40, N 2. - P. 173-176.
- 40 9. Патент на винахід UA 17420, МПК А 61 К 31/14,9/08 Антисептична композиція "Горостен" [Текст] / Г. К. Палій, І. М. Вовк, В. П. Ковальчук, Т. О. Ковет, В. Г. Палій, І. Г. Палій; заявник та патентовласник Г. К. Палій. - № заявки U95031426; заявл. 30.03.1995; опубл. 31.10.1997, Бюл. № 5.
- 10..Patent 2008 0199509 US, Int.Cl. A61K 900FI Methods and Compositions *
- 45 for the Disruption of Biofilms [Text] / Inventors: Nick J. A.; Parks Q. M. Assignees: National Jewish Medical and Research Center. Publication date: 21.08.2008.
11. Patent 2006 7144992 US, Int.Cl. A61K 38/00, C07K 1/00, C07K 14/00. Synergistic antimicrobial compositions and methods for reducing biofilm formation [Text] / Inventors: Madhyastha

S. Assignees: Kane Biotech Inc. Application number 60558132. Application date: 07.04.2004.
Publication date: 05.12.2006.

12. Patent 2012 0088671 US, Int.Cl. A61K 43/90, A61K 31/7048, A61K 38/14. Anti-biofilm compositions and methods for using [Text] / Inventors: Quave C. L., Smeltzer M. S., Compadre C. M., Hendrickson H. Assignees: Board of Trustees University of Arkansas. Application number 13/267696. Application date: 06.11.2011.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 10 Протимікробна композиція для інгібування біоплівкоутворення *Pseudomonas aeruginosa*, що містить антимікробний агент - катіонний поліпептид поліміксин, яка **відрізняється** тим, що вона містить додатково антимікробний агент карбопенем іміпенем при наступному співвідношенні інгредієнтів (масових частин):
катіонний поліпептид поліміксин 1
карбопенем іміпенем 8-16.

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

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