

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **033885**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.12.05

(21) Номер заявки
201700518

(22) Дата подачи заявки
2017.11.23

(51) Int. Cl. **A61K 31/407** (2006.01)
A61K 31/663 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(54) **АНТИМИКРОБНАЯ КОМБИНАЦИЯ В ОТНОШЕНИИ УСТОЙЧИВЫХ К
КАРБАПЕНЕМАМ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ ВИДА ACINETOBACTER
BAUMANNII, ПРОДУЦИРУЮЩИХ МЕТАЛЛО-β-ЛАКТАМАЗУ**

(31) **2016147239**

(32) **2016.12.01**

(33) **RU**

(43) **2018.07.31**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ "САНКТ-
ПЕТЕРБУРГСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ" (СПбГУ) (RU)**

(56) **RU-C2-2462450**

RU-C2-2488394

RU-C2-2521252

WO-A1-1998047895

**TIMOTHY R. WALSH et al. Metallo-β-
Lactamases: the quiet before the storm? Clinical
Microbiology Reviews, 2005, Vol. 18, No. 2, p.
306-325**

(72) Изобретатель:

**Афиногенова Анна Геннадьевна,
Ворошилова Татьяна Михайловна,
Афиногенов Геннадий Евгеньевич
(RU)**

(74) Представитель:

**Матвеев А.А., Матвеева Т.И., Леонов
И.Ф. (RU)**

(57) Изобретение относится к области медицины, в частности к клинической микробиологии, и может быть использовано для преодоления устойчивости грамотрицательных микроорганизмов вида *Acinetobacter baumannii*, продуцирующих металло-β-лактамазу (МβЛ), к карбапенемам. Указанный технический результат достигается тем, что клодроновая или этидроновая кислоты из группы бисфосфонатов ингибируют стандартный реактив - металло-β-лактамазу *P. aeruginosa* рекомбинантную, экспрессированную в *Escherichia coli*. Достигнутый результат позволил выявить антимикробный эффект комбинации клодроновой или этидроновой кислот с карбапенемами (имипенемом или меропенемом) в отношении референс-штамма *A. baumannii* ATCC BAA-747, резистентного к карбапенемам в присутствии стандартного реактива МβЛ, инактивирующего эти антибиотики. Предложенное техническое решение позволяет моделировать получение штаммов грамотрицательных микроорганизмов с различным уровнем резистентности к карбапенемам и оценивать эффективность ингибирования металло-β-лактамаз.

B1**033885****033885****B1**

Изобретение относится к области медицины, в частности к клинической микробиологии, и может быть использовано для преодоления устойчивости к карбапенемам у грамотрицательных бактерий вида *Acinetobacter baumannii*, продуцирующих металло- β -лактамазу (М β Л).

В настоящее время у пациентов, находящихся на стационарном лечении, увеличивается доля грамотрицательных аэробных бактерий как возбудителей инфекций [1]. Это *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Stenotrophomonas maltophilia* и др. Эти микроорганизмы, как правило, обладают низкой чувствительностью к различным классам антибиотиков, а также способностью приобретать резистентность в процессе лечения, что представляет существенные проблемы при проведении антибактериальной терапии, а именно резко ограничивает арсенал применяемых для лечения больных антибактериальных препаратов, в том числе карбапенемов. Основным механизмом устойчивости к карбапенемам у грамотрицательных микроорганизмов является продукция металло- β -лактамаз.

Известна композиция и способы лечения, включающие цефтаролин [2], представляющий собой новый парентеральный цефалоспорин с широким спектром активности против клинически важных внебольничных и внутрибольничных грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов. Однако полученный авторами синергидный эффект применения композиции цефтаролина и антимикробных препаратов не описан в отношении резистентных грамотрицательных микроорганизмов, продуцирующих М β Л.

Известна композиция [3], содержащая халконы в качестве усилителей антимикробных средств, действие которой направлено на предотвращение образования и разрушение сформированных микробных биопленок в полости рта. Синергидный эффект действия композиции халконов и антимикробных агентов авторы оценивали в средствах гигиены полости рта местного действия. Кроме того, авторы не оценивали данный эффект в отношении резистентных грамотрицательных микроорганизмов, продуцирующих М β Л.

Известно изобретение [4] ингибиторов металло- β -лактамазы на основе малеиновой кислоты, которое демонстрирует эффект подавления М β Л грамотрицательных бактерий и усиления действия бета-лактамных антибиотиков. В изобретении описаны способы синтеза различных производных малеиновой кислоты, показан их ингибирующий эффект в отношении М β Л, а также восстановление действия бета-лактамных антибиотиков в отношении устойчивых к ним микроорганизмов. Однако такие производные малеиновой кислоты и их сочетания с антимикробными агентами не применяются в практической медицине в настоящее время.

Известна лекарственная композиция в отношении *Acinetobacter baumannii*, наиболее близкая к заявляемому изобретению по достижению технического результата и выбранная в качестве прототипа [5]. Изобретение представляет лекарственную композицию в отношении *A. baumannii* и ее применение. Лекарственная комбинация состоит из меропенема и сульбактама с весовым соотношением меропенема к сульбактаму 1:2-4. Дизайн исследования воспроизведен методом "шахматной доски". Синергидный антибактериальный эффект комбинированного применения меропенема и сульбактама в отношении карбапенем-чувствительных и лекарственно-устойчивых штаммов *A. baumannii* определяли методом микроразведений в бульоне. Как показано в результатах исследования, вне зависимости от того, какие были протестированы штаммы, меропенем-лекарственно-устойчивые или меропенем-чувствительные, большинство из них показали синергидный или частично синергидный эффект к комбинированному применению меропенема и сульбактама, и количество штаммов, продемонстрировавших синергидный эффект, насчитывало 25%.

Недостатком такой композиции является использование авторами сульбактама как ингибитора бета-лактамаз только у *A. baumannii*, так как по данным литературы известно, что сульбактам является ингибитором сериновых бета-лактамаз, но не ингибирует металло- β -лактамазы. При этом авторы изобретения-прототипа тестировали штаммы *A. baumannii*, не продуцирующие металло- β -лактамазы.

Заявляемое изобретение свободно от указанного недостатка.

Указанный технический результат достигается тем, что клодроновая или этидроновая кислоты из группы бисфосфонатов ингибируют стандартный реактив - металло- β -лактамазу *P. aeruginosa* рекомбинантную, экспрессированную в *Escherichia coli*. Достигнутый результат позволяет выявить антимикробный эффект комбинации клодроновой/этидроновой кислот с карбапенемами (имипенемом/меропенемом) в отношении референс-штамма *A. baumannii* ATCC BAA 747, резистентного к карбапенемам в присутствии стандартного реактива М β Л, инактивирующего эти антибиотики. Предложенное техническое решение позволяет моделировать получение штаммов грамотрицательных микроорганизмов с различным уровнем резистентности к карбапенемам и оценить эффективность ингибирования М β Л.

Далее для достижения технического результата оценивают эффективность антимикробной комбинации карбапенемов (имипенема или меропенема) в сочетании с клодроновой или этидроновой кислотами методом "шахматной доски" [6]. В исследованиях используют микроразведения в бульоне в полистироловых 96-луночных планшетах.

В исследовании используют антибиотики имипенем и меропенем, разведенные стандартным титрованием в бульоне Мюллера-Хинтона [7] от 512 до 2 мкг/мл. Для данного исследования исходный концентрат клодроновой кислоты для приготовления раствора для внутривенного введения с содержанием

60 мг/мл разводят в среде Мюллера-Хинтона методом последовательных двукратных разведений. Этидроновую кислоту из исходного 20% концентрата разводят до 2% раствора в стерильной дистиллированной воде и далее готовят двукратные разведения в среде Мюллера-Хинтона. В ячейки, содержащие по 95 мкл разведения соответствующего антибиотика, вносят по 95 мкл разведения клодроновой или этидроновой кислоты. Таким образом, объем смеси составляет 190 мкл.

Для получения инокулюма тест-штамма *A. baumannii* ATCC BAA-747 готовят исходную суспензию суточной культуры микроба по стандарту 0,5 McFarland, далее суспензию разводят в 31 раз в бульоне Мюллер-Хинтон, при этом полученная взвесь содержит 5×10^6 КОЕ/мл. Далее во все ячейки вносят по 10 мкл микробной взвеси. Таким образом, в каждой ячейке конечная микробная нагрузка тест-штамма составляет 5×10^4 КОЕ в 200 мкл. Всегда присутствует контроль тест-культуры и контроль среды.

Значение минимальной подавляющей концентрации (МПК) тестируемого препарата оценивают в первой ячейке, содержащее которой прозрачное, где отсутствует видимый рост тест-штамма.

В табл. 1 представлены результаты инактивации антибиотика в присутствии стандартного реактива МБЛ. Показано, что фермент в ячейках 1-4 полностью инактивирует антибиотик в количестве от 1 до 512 мкг/мл, при этом в ячейках наблюдается рост тест-культуры *A. baumannii* ATCC BAA-747. Начиная с 5-й ячейки, интенсивность инактивации фермента снижается, и в 8-й ячейке отмечается отсутствие роста тест-культуры на уровне референтного значения чувствительности к меропенему (МПК) - 2 мкг/мл (EUCAST 2015г. [8]).

Таблица 1

Показатели инактивации меропенема в присутствии разных доз стандартного реактива МБЛ в отношении тест-культуры *A. baumannii* ATCC BAA-747

Количество меропенема(мкг/мл)		512	256	128	64	32	16	8	4	2	1
Количество фермента МБЛ		Наличие роста тест-культуры									
№ ячейки		Экспозиция 24 часа, 37°C									
единицы активности/мкл											
1	0,283	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
2	0,142	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
3	0,071	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
4	0,036	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
5	0,018	-	-	-	P	P	P	P	P	P	P
6	0,009	-	-	-	-	P	P	P	P	P	P
7	0,0045	-	-	-	-	-	-	P	P	P	P
8	0,0023	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P

Примечание: "P" - рост чувствительной к меропенему тест-культуры *A. baumannii* ATCC BAA-747;
 "-" - отсутствие роста.

В табл. 2 представлены результаты ингибирования МБЛ клодроновой кислотой в комбинации с имипенемом. В ячейках без клодроновой кислоты отмечается рост тест-культуры *A. baumannii* ATCC BAA-747 за счет инактивации антибиотика МБЛ. Эффект ингибитора отмечен со 2-й ячейки, где он содержится в количестве 469 мкг. Отмечен эффект инактивации МБЛ и отсутствие роста тест-культуры в ячейке 5 с количеством антибиотика 4 мкг/мл и количеством клодроновой кислоты 3750 мкг/мл. Исходя из данных, представленных в ячейке 5 табл. 2, предложена антимикробная комбинация в отношении *A. baumannii*, которая содержит имипенем и ингибитор МБЛ клодроновую кислоту в соотношении 4:3750 (1:938).

Таблица 2

Результаты ингибирования МБЛ клодроновой кислотой в комбинации с имипенемом в отношении тест-культуры *A. baumannii* ATCC BAA-747

Количество имипенема (мкг/мл)		0	512	256	128	64	32	16	8	4	2
Количество клодроновой кислоты		Наличие роста тест-культуры в присутствии МБЛ(в ячейке 5мкл – 0,283 ед.)									
№ ячейки		Экспозиция 24 часа, 37°C									
мкг/мл											
1	0	P	-	-	-	P	P	P	P	P	P
2	469	P	-	-	-	-	-	-	P	P	P
3	938	P	-	-	-	-	-	-	-	P	P
4	1875	P	-	-	-	-	-	-	-	P	P
5	3750	P	-	-	-	-	-	-	-	-	P
6	7500	P	-	-	-	-	-	-	-	-	P
7	15000	P	-	-	-	-	-	-	-	-	P
8	30000	P	-	-	-	-	-	-	-	-	P

Примечание: "P" - рост чувствительной к имипенему тест-культуры *A. baumannii* ATCC BAA-747 в присутствии субстрата МБЛ;
 "-" - отсутствие роста.

В табл. 3 представлены результаты ингибирования МБЛ этидроновой кислотой в комбинации с имипенемом. В ячейках без этидроновой кислоты отмечается рост тест-культуры *A. baumannii* ATCC BAA-747 за счет инактивации антибиотика МБЛ. Эффект ингибитора отмечен со 2-й ячейки, где он содержится в количестве 1563 мкг. Отмечен эффект инактивации МБЛ и отсутствие роста тест-культуры в ячейке 8 с количеством антибиотика 2 мкг/мл и количеством этидроновой кислоты 100000 мкг/мл. Исходя из данных, представленных в ячейке 8 табл. 3, предложена антимикробная комбинация в отношении *A. baumannii*, которая содержит имипенем и ингибитор МБЛ этидроновую кислоту в соотношении 2:100000 (1:50000).

Таблица 3
Результаты ингибирования МБЛ этидроновой кислотой в комбинации с имипенемом в отношении тест-культуры *A. baumannii* ATCC BAA-747

Количество имипенема(мкг/мл)		0	512	256	128	64	32	16	8	4	2
Количество этидроновой кислоты		Наличие роста тест-культуры в присутствии МБЛ(в ячейке 5мкл – 0,283 ед.) Экспозиция 24 часа, 37°C									
№ ячейки	мкг/мл										
1	0	P	-	-	-	P	P	P	P	P	P
2	1563	P	-	-	-	-	P	P	P	P	P
3	3125	P	-	-	-	-	P	P	P	P	P
4	6250	P	-	-	-	-	-	P	P	P	P
5	12500	P	-	-	-	-	-	-	P	P	P
6	25000	P	-	-	-	-	-	-	-	P	P
7	50000	P	-	-	-	-	-	-	-	-	P
8	100000	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечание: "P" - рост чувствительной к имипенему тест-культуры *A. baumannii* ATCC BAA-747 в присутствии субстрата МБЛ;
"- " - отсутствие роста.

В табл. 4 представлены результаты ингибирования МБЛ этидроновой кислотой в комбинации с меропенемом. В ячейках без этидроновой кислоты отмечается рост тест-культуры *A. baumannii* ATCC BAA-747 за счет инактивации антибиотика МБЛ. Эффект ингибитора отмечен со 2-й ячейки, где он содержится в количестве 1563 мкг. Отмечен эффект инактивации МБЛ и отсутствие роста тест-культуры в ячейке 8 с количеством антибиотика 2 мкг/мл и количеством этидроновой кислоты 100000 мкг/мл. Исходя из данных, представленных в ячейке 8 табл. 4, предложена антимикробная комбинация в отношении *A. baumannii*, которая содержит меропенем и ингибитор МБЛ этидроновую кислоту в соотношении 2:100000 (1:50000).

Таблица 4
Результаты ингибирования МБЛ этидроновой кислотой в комбинации с меропенемом в отношении тест-культуры *A. baumannii* ATCC BAA-747

Количество меропенема(мкг/мл)		0	512	256	128	64	32	16	8	4	2
Количество этидроновой кислоты		Наличие роста тест-культуры в присутствии МБЛ (в ячейке 5мкл – 0,283 ед.) Экспозиция 24 часа, 37°C									
№ ячейки	мкг/мл										
1	0	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
2	1563	P	-	-	P	P	P	P	P	P	P
3	3125	P	-	-	-	P	P	P	P	P	P
4	6250	P	-	-	-	P	P	P	P	P	P
5	12500	P	-	-	-	-	P	P	P	P	P
6	25000	P	-	-	-	-	-	-	P	P	P
7	50000	P	-	-	-	-	-	-	-	-	P
8	100000	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечание: "P" - рост чувствительной к меропенему тест-культуры *A. baumannii* ATCC BAA-747 в присутствии субстрата МБЛ;
"- " - отсутствие роста.

В табл. 5 представлены результаты ингибирования МБЛ клодроновой кислотой в комбинации с меропенемом. В ячейках без клодроновой кислоты отмечается рост тест-культуры *A. baumannii* ATCC BAA-747 за счет инактивации антибиотика МБЛ. Эффект ингибитора отмечен со 2-й ячейки, где он содержится в количестве 469 мкг. Отмечен эффект инактивации МБЛ и отсутствие роста тест-культуры в ячейке 5 с количеством антибиотика 2 мкг/мл и количеством клодроновой кислоты 3750 мкг/мл. Исходя из данных, представленных в ячейке 5 табл. 5, предложена антимикробная комбинация в отношении *A. baumannii*, которая содержит меропенем и ингибитор МБЛ клодроновую кислоту в соотношении 2:3750 (1:1875).

Таблица 5

Результаты ингибирования МβЛ клодроновой кислотой в комбинации с меропенемом в отношении тест-культуры *A. baumannii* ATCC BAA-747

Количество меропенема(мкг/мл)		0	512	256	128	64	32	16	8	4	2
Количество клодроновая кислоты		Наличие роста тест-культуры в присутствии МβЛ									
№ ячейки	мкг/мл	(в ячейке 5мл – 0,283 ед.) Экспозиция 24 часа, 37°С									
1	0	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
2	469	P	-	-	-	-	P	P	P	P	P
3	938	P	-	-	-	-	-	-	P	P	P
4	1875	P	-	-	-	-	-	-	-	-	P
5	3750	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	7500	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	15000	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	30000	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечание: "P" - рост чувствительной к меропенему тест-культуры *A. baumannii* ATCC BAA-747 в присутствии субстрата МβЛ;
 "-" - отсутствие роста.

Дозы бисфосфонатов, представленные в соотношениях с карбапенемами, составляют от 3 до 13% суточной дозы клодроновой кислоты и от 8 до 17% суточной дозы этидроновой кислоты.

Технико-экономическая эффективность заявленной антимикробной комбинации состоит в усилении действия антибиотика до уровня референтного значения чувствительности грамотрицательных микроорганизмов, продуцирующих МβЛ, вызывающих инфекционно-воспалительные заболевания у человека, что может улучшить терапевтический эффект проводимой антимикробной химиотерапии карбапенемами.

Использованные источники информации.

1. Шевченко О.В., Эйдельштейн М.В., Степанова М.Н. Металло-β-лактамазы: значение и методы выявления у грамотрицательных неферментирующих бактерий. Клин. микробиол. антимикроб. химиотер., 2007, 9(3):211-19.
2. Композиции и способы лечения, включающие цефтаролин. Патент RU 2524665 C2.
3. Халконы в качестве усилителей антимикробных средств. Патент RU 2521252 C2.
4. Ингибиторы металло-β-лактамазы. Патент RU 2462450 C2.
5. Anti-Acinetobacterbaumannii drug combination and application thereof. Патент CN102475703.
6. Eliopoulos G.M., and R.C. Moellering. 1991. Antimicrobial combinations, p. 432-492. In V. Lorian (ed.), Antibiotics in laboratory medicine. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, MD.
7. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам (Методические указания МУК 4.2.1890-04).
8. EUCAST 2015 г. www.eucast.com.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Антимикробная комбинация сочетанного применения карбапенемов и бисфосфонатов в отношении устойчивых к карбапенемам грамотрицательных бактерий вида *Acinetobacter baumannii*, продуцирующих металло-β-лактамазу (МβЛ), которая приводит к инаktivации МβЛ при следующем весовом соотношении компонентов: 1) имипенем и клодроновая кислота 1:938, или 2) меропенем и клодроновая кислота 1:1875, или 3) имипенем и этидроновая кислота 1:50000, или 4) меропенем и этидроновая кислота 1:50000.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2