



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента

2020.04.14

(21) Номер заявки

201791218

(22) Дата подачи заявки

2015.12.22

(51) Int. Cl. **A61K 45/06** (2006.01)

A61K 38/14 (2006.01)

A61K 31/365 (2006.01)

A61K 31/427 (2006.01)

C12Q 1/18 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ ВАНКОМИЦИН И ОРЛИСТАТ

(31) **14199908.6**

(32) **2014.12.22**

(33) **EP**

(43) **2017.12.29**

(86) **PCT/EP2015/080933**

(87) **WO 2016/102541 2016.06.30**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**УНИВЕРСИТЕТ ЛИБРЕ ДЕ
БРЮССЕЛЬ (BE)**

(72) Изобретатель:

**Фонтейн Вероник, Лефевр Филипп
(BE)**

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(56) **WO-A2-0112168**

GEITER L.J. ET AL.: "United States Public Health Service Tuberculosis Therapy trial 21: Preliminary results of an evaluation of a combination tablet of isoniazid, rifampin and pyrazinamide", TUBERCLE, LONGMAN GROUP UK LTD., HARLOW, GB, vol. 68, 1 June 1987 (1987-06-01), pages 41-46, XP023093868, ISSN: 0041-3879 [retrieved on 1987-06-01], abstract, Material and methods - 2nd paragraph US-A1-2010282247

COLLINS C.H. ET AL.: "IN-VITRO ACTIVITY OF SEVENTEEN ANTIMICROBIAL COMPOUNDS AGAINST SEVEN SPECIES OF MYCOBACTERIA", JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY, OXFORD UNIVERSITY PRESS, GB, vol. 22, no. 6, 1 January 1988 (1988-01-01), pages 857-862, XP009183991, ISSN: 0305-7453, abstract, table 1, Materials and methods: Determination of MICs

MAJUMDAR ANINDITA ET AL.: "Effect of HIV protease inhibitors and Orlistat on mycobacterial ES-31 serine protease, a potential drug target in Mycobacterium tuberculosis", THE INDIAN JOURNAL OF TUBERCULOSIS JAN 2011, vol. 58, no. 1, January 2011 (2011-01), pages 4-10, XP055186014, ISSN: 0019-5707, abstract, MATERIALS AND METHODS: Study of HIV-PIs and Orlistat on M. tuberculosis bacilli in axenic culture; table 2, RESULTS

GAURI WANKHADE ET AL.: "Inhibitory effect of isoniazid and orlistat combination on mycobacterial ES-31 serine protease in vitro and on the growth of

M.tb bacilli in axenic culture", INDIAN JOURNAL OF TUBERCULOSIS, vol. 59, no. 3, 1 July 2012 (2012-07-01), pages 156-161, XP055186016, IN, ISSN: 0019-5707, abstract, MATERIALS AND METHODS: Study of orlistat and Isonazid on M. tuberculosis bacilli in axenic culture (in vivo); table 2B, page 160, left-hand column, last paragraph - right-hand column, paragraph 1

PROVVEDI ROBERTA ET AL.: "Global transcriptional response to vancomycin in Mycobacterium tuberculosis", MICROBIOLOGY (READING), vol. 155, no. Part 4, April 2009 (2009-04), pages 1093-1102, XP002743626, ISSN: 1350-0872, abstract, METHODS: Determination of growth inhibition by disc diffusion assay; figure 1

CHEN FENG-CHI ET AL.: "Pros and Cons of the Tuberculosis Drugome Approach - An Empirical Analysis", PLOS ONE, vol. 9, no. 6, June 2014 (2014-06), XP055209267, abstract, Materials and Methods: Anti-mycobacterial activity of individual drugs Results: Experimental validation of the efficacy of the TB drugome; figure 1, Materials and Methods: Antimycobacterial activity of drug combinations

AGERTT VANESSA ALBERTINA ET AL.: "Evaluation of antimycobacterial activity of a sulphonamide derivative", TUBERCULOSIS (AMSTERDAM), vol. 93, no. 3, May 2013 (2013-05), pages 318-321, XP055209268, ISSN: 1472-9792, abstract, Materials and methods

SCHOONMAKER MAIA K. ET AL.: "Nonclassical Transpeptidases of Mycobacterium tuberculosis Alter Cell Size, Morphology, the Cytosolic Matrix, Protein Localization, Virulence, and Resistance to beta-Lactams", JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 196, no. 7, April 2014 (2014-04), pages 1394-1402, XP002743628, abstract, figure 5; table 1

NZILA ALEXIS ET AL.: "Drug repositioning in the treatment of malaria and TB", FUTURE MEDICINAL CHEMISTRY, LONDON: FUTURE SCIENCE, UK, vol. 3, no. 11, 1 September 2011 (2011-09-01), pages 1413-1426, XP009185837, ISSN: 1756-8927, DOI: 10.4155/FMC.11.95, abstract, page 1419

CAVALIERI S.J. ET AL.: "Synergistic Activities of Clarithromycin and Antituberculous Drugs against Multidrug-Resistant Mycobacterium tuberculosis", ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, vol. 39, no. 7, 1 January 1995 (1995-01-01), pages 1542-1545, XP002311732, ISSN: 0066-4804, abstract, MATERIALS AND METHODS: Antimicrobial susceptibility testing, Combination testing

-
- (57) Изобретение относится к новым комбинациям веществ и новым фармацевтическим композициям для лечения микобактериальных инфекций, а также к вариантам медицинского применения этих комбинаций и композиций. Изобретение также относится к способу скрининга новых соединений, применимых для лечения микобактериальных инфекций и штаммов микобактерий с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) и широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ).

034983 B1

034983 B1

Область, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к новым комбинациям веществ и новым фармацевтическим композициям для лечения микобактериальных инфекций, а также к вариантам медицинского применения этих комбинаций и композиций. Настоящее изобретение также относится к способу скрининга новых соединений, применимых для лечения микобактериальных инфекций и/или для лечения штаммов микобактерий с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) и широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ=XDR, крайне устойчивых).

Уровень техники

Туберкулез (ТБ) является весьма заразным болезненным состоянием, вызываемым инфекцией *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), передающейся воздушно-капельным путем. Mtb представляет собой факультативный внутриклеточный бактериальный патоген, внедряющийся в макрофаги и располагающийся в них. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) более 2 млрд людей во всем мире инфицированы *Mycobacterium tuberculosis*. У большинства из этих людей туберкулез находится в латентной форме, но приблизительно у 1 из 10 (многие из которых являются ВИЧ-положительными) можно ожидать развития активного ТБ на каком-либо этапе жизни. В 2008 г. 1,8 млн человек умерли от туберкулеза.

К сожалению, *Mycobacterium tuberculosis* характеризуется высокой естественной устойчивостью к большинству антибиотиков, применяемых в клинической практике, что значительно ограничивает возможности лечения. Эту естественную устойчивость связывают, в частности, с ее непроницаемой гидрофобной клеточной оболочкой, которая действует как барьер для проникновения некоторых веществ.

Воскообразные компоненты клеточной оболочки на основе миколовых кислот представляют собой разветвленные α -алкил- β -гидроксигирные кислоты, обычно содержащиеся в клеточной стенке в виде сложных эфиров трегалозы или в этерифицированной форме с арабиногалактановой основой клеточной стенки бактерий.

Образованию миколовых кислот способствуют две системы: Fas (синтаза жирных кислот) и Pks (поликетидсинтаза I типа). Многофункциональный белок Fas-I образует короткие, в частности, C_{16,18}-жирные кислоты; Fas-II представляет собой комплекс монофункциональных белков, удлиняющих жирные кислоты, образованные Fas-I, с получением длинноцепочечных жирных кислот, длина которых обычно находится в диапазоне от C₄₈ до C₆₄. Pks, например, конкретно, конденсаза или Pks13 (см. Portevin et al., 2004, PNAS 101(1): 314-9), катализирует конденсацию двух жирных кислот с образованием миколовых кислот. Кроме того, миколитрансферазы отвечают за этерификацию миколовых кислот в клеточной стенке. Такие миколитрансферазы включают, в числе прочего, белки FbpA, FbpB и FbpC *M. tuberculosis*. Nguyen et al., 2005 (J. Bacteriol 187: 6603-11) предполагают, что FbpA вовлечен в естественную устойчивость колоний *M. smegmatis* к некоторым антибиотикам.

Миколовые кислоты в клеточной стенке связаны с рядом экстрагируемых липидов ("свободных липидов"), включая эфиры димикоцерозата (DIM). Биосинтез DIM включает участие Fas-I и ряда белков Pks. Samacho et al., в 2001 (J Biol Chem 276: 19845-54) сообщили, что мутанты Mtb по димикоцерозату фтиодиолона характеризуются повышенной проницаемостью по отношению к детергенту хенодесоксиолату, что подтверждает точку зрения о том, что свободные липиды вносят вклад в барьерную функцию клеточной стенки Mtb. У этих мутантов не нарушена чувствительность к некоторым антибиотикам.

Поскольку миколовые кислоты и свободные липиды клеточной стенки микобактерий, по-видимому, играют ключевую роль в противодействии атаке со стороны организма-хозяина, предлагается использовать элементы путей их биосинтеза в качестве мишеней для разработки новых лекарственных средств против туберкулеза (например, FabG1 в WO 03/082911, (3R)-гидроксиацил-АСР-дегидратазы в WO 2008/129146, PptГ в WO 2007/069089, FbpC в статье в Jackson et al., 1999 (Mol Microbiol 31(5): 1573-1587)). Известно, что один из существующих противотуберкулезных препаратов первой линии (изониазид) функционирует за счет направленного воздействия на фермент InhA комплекса Fas II (Marrakchi et al., 2000 (Microbiology 146: 289-96)).

В соответствии с текущими медицинскими руководствами ВОЗ препараты первой линии для лечения ТБ должны быть основаны на изониазиде, рифампицине, пипразинамиде, стрептомицине, этамбутоле по отдельности (в случае латентной инфекции) или в комбинации (для активной формы ТБ). Полная ликвидация туберкулеза у пациента затруднена из-за необходимости соблюдения жесткой и длительной схемы медикаментозной терапии. Поскольку многие пациенты не могут должным образом соблюдать предписанную дозу или завершить курс лечения, штаммы Mtb с лекарственной устойчивостью возникают все чаще. ТБ с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ ТБ) по определению представляет собой ТБ, устойчивый, по меньшей мере, к изониазиду и рифампицину (наиболее эффективным препаратам первой линии). Препараты второй линии можно применять для адресного воздействия на случаи МЛУ ТБ, однако обладают определенными недостатками, например повышенной стоимостью, токсическими побочными эффектами, более низкой эффективностью по сравнению с препаратами первой линии или необходимостью парентерального введения. Препараты второй линии включают аминогликозиды (например, стрептомицин, амикацин, канамицин), полипептиды (например, капреомицин), фторхинолоны, тиамины, циклосерин и р-аминосалициловую кислоту.

ТБ с широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ ТБ) возникает при развитии устойчивости к препаратам второй линии на фоне МЛУ ТБ. ШЛУ ТБ по определению ВОЗ представляет собой ТБ, устойчивый к любому фторхинолону и по меньшей мере одному из трех препаратов второй линии, вводимых посредством инъекции (капреомицину, канамицину и амикацину).

Поскольку *M. tuberculosis* невосприимчива к большинству антибиотиков и доступный выбор эффективных антибиотиков ограничивается эволюцией лекарственной устойчивости, существует неотложная и неудовлетворенная потребность в разработке новых средств лечения туберкулеза.

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что новые конкретные комбинации первого агента, предпочтительно выбранного из гликопептидов, и второго агента, предпочтительно выбранного из ингибиторов липазы, обладают выраженными микобактериостатическими и/или микобактерицидными свойствами и, таким образом, обеспечивают лечение микобактериальных инфекций. Авторы настоящего изобретения также неожиданно обнаружили, что такие специфические комбинации обладают выраженными микобактериостатическими и/или микобактерицидными свойствами по отношению к МЛУ- или ШЛУ-штаммам микобактерий и, таким образом, обеспечивают лечение микобактериальных инфекций с множественной лекарственной устойчивостью или широкой лекарственной устойчивостью и новый набор способов комбинированной терапии, которые можно применять в качестве альтернативы общепринятым средствам лечения. Авторы настоящего изобретения также неожиданно обнаружили, что гликопептиды сами по себе или такие специфические комбинации можно применять для скрининга новых соединений, пригодных для лечения микобактериальных инфекций или для лечения микобактериальных инфекций с МЛУ или ШЛУ.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к композиции, содержащей: (а) первый агент, выбранный из группы, состоящей из гликопептидных антибиотиков, и (б) второй агент, выбранный из группы, состоящей из ингибиторов липазы.

В конкретном варианте реализации указанный первый агент представляет собой ванкомицин, а указанный второй агент - орлистат.

В конкретном варианте реализации композиция дополнительно содержит по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент. В более конкретном варианте реализации по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент выбран из группы, состоящей по меньшей мере из одного из: гликопептидного антибиотика, бета-лактама, циклосерина, ингибитора синтеза РНК, ингибитора репликации ДНК, нуклеозидного антибиотика, ингибитора синтеза белка, ингибитора синтеза АТФ, ингибитора дигидрофолатредуктазы, ингибитора липазы, статина, ингибитора протеазы, ингибитора белка теплового шока, ингибитора синтеза миколовых кислот или жирных кислот, ингибитора белков, содержащих домен АСР, ингибитора Ag85C, ингибитора образования дисульфидных мостиков и трехзамещенного имидазола.

В конкретном варианте реализации композиция согласно настоящему изобретению дополнительно содержит по меньшей мере один дополнительный потенцирующий агент, предпочтительно выбранный из ингибиторов бета-лактамазы, причем указанный потенцирующий агент повышает микобактериостатические и/или микобактерицидные свойства указанной композиции. В конкретном варианте реализации композиция согласно настоящему изобретению дополнительно содержит клавуланат и/или ампициллин в качестве дополнительного потенцирующего агента.

Настоящее изобретение дополнительно относится к фармацевтической композиции, содержащей композицию согласно вышеприведенному определению и одно или более из фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ.

Настоящее изобретение дополнительно относится к набору компонентов, содержащему указанный первый агент и указанный второй агент согласно вышеприведенному описанию, и дополнительно необязательно содержащей по меньшей мере один дополнительный потенцирующий агент согласно вышеприведенному описанию в одном или в отдельных флаконах вместе с подходящими фармацевтическими вспомогательными веществами, причем указанные первый и второй агенты и необязательно по меньшей мере один дополнительный потенцирующий агент растворены или суспендированы в приемлемом носителе, предпочтительно водном носителе.

Настоящее изобретение дополнительно относится к композиции, фармацевтической композиции или набору компонентов, описанных выше, для применения в качестве лекарственного средства.

Настоящее изобретение дополнительно относится к композиции, фармацевтической композиции или набору компонентов, описанных выше, для применения в качестве средства для лечения микобактериальной инфекции, предпочтительно туберкулеза.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу оценки чувствительности штаммов микобактерий с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) и широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ) к гликопептидам, включающему этапы:

(а) контакта микобактериального штамма с МЛУ или ШЛУ с гликопептидом;

(б) сравнения скорости роста указанного микобактериального штамма с МЛУ или ШЛУ в присутствии и отсутствие указанного гликопептида.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу скрининга синергетических микобактериостатических или микобактерицидных комбинаций агентов, включающему этапы:

(a) контакта микобактериального штамма с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) или широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ) с агентом-кандидатом в присутствии гликопептида;

(b) сравнения скорости роста указанного микобактериального штамма с МЛУ или ШЛУ при воздействии указанного гликопептида в присутствии и отсутствии указанного агента-кандидата.

Определения.

В настоящем изобретении следующие термины имеют следующие значения.

Термин "приблизительно" (примерно) применительно к измеряемому значению, например параметру, количеству, временной продолжительности и т.п., включает вариации указанного и отклонения от него, в частности вариации указанного и отклонения от него, соответствующие $\pm 10\%$ или менее, предпочтительно $\pm 5\%$ или менее, более предпочтительно $\pm 1\%$ или менее и еще более предпочтительно $\pm 0,1\%$ или менее, при условии, что такие вариации(отклонения) не мешают реализации настоящего изобретения.

Подразумевается, что термин "агент" охватывает любое химическое (например, неорганическое или органическое), биохимическое или биологическое вещество, молекулу или макромолекулу (например, биологическую макромолекулу), или любую комбинацию или смесь, а также любой экстракт, полученный из биологических материалов, например клеток или тканей бактерий, растений, грибов или животных. В одном варианте реализации термин "агент" охватывает нуклеиновые кислоты, олигонуклеотиды, рибозимы, пептиды, полипептиды, белки, пептидомиметики, антитела (включая их фрагменты и производные), аптамеры, химические вещества, предпочтительно органические вещества, более предпочтительно низкомолекулярные органические вещества, липиды, углеводы, полисахариды и т.д. и любые их комбинации.

"Агент-антибиотик" обозначает микобактериостатический агент, т.е. агент, способный замедлять или останавливать рост микобактерий, или микобактерицидный агент, т.е. агент, способный уничтожать микобактерии.

Под термином "модулировать" или "модулирующий" подразумевают, что агент для применения в контексте настоящего изобретения способен обеспечивать качественные или количественные изменения, например увеличивать, активировать, уменьшать или ингибировать модулируемую переменную. Указанная модуляция может охватывать увеличение значения указанной переменной по меньшей мере приблизительно на 10%, например по меньшей мере приблизительно на 20%, предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 30%, например по меньшей мере приблизительно на 40%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 50%, например по меньшей мере приблизительно на 75%, и еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 100%, например по меньшей мере приблизительно на 150, 200, 250, 300, 400% или по меньшей мере приблизительно на 500%, по сравнению с эталонной ситуацией без указанной модуляции; или модуляция может охватывать снижение или уменьшение значения указанной переменной по меньшей мере приблизительно на 10%, например по меньшей мере приблизительно на 20%, по меньшей мере приблизительно на 30%, например по меньшей мере приблизительно на 40%, по меньшей мере приблизительно на 50%, например по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 70%, например по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 90%, например по меньшей мере приблизительно на 95%, например по меньшей мере приблизительно на 96, 97, 98, 99 или даже 100% по сравнению с эталонной ситуацией без указанной модуляции. В предпочтительном варианте реализации указанная модуляция активности и/или уровень указанного фактора может быть специфическим или селективным, т.е. активность или уровень указанного фактора можно модулировать без существенного изменения активности и/или уровня случайного, не связанного с ним фактора.

Термин "активность" относится к активности любого пептида, полипептида или белка и может включать любую биологическую, биохимическую, ферментативную, сигнальную или структурную активность. Таким образом, под "модуляцией активности" подразумевают, что указанный первый агент может модулировать уровень данного пептида, полипептида или белка за счет модуляции его экспрессии и/или модуляции экспрессируемого пептида, полипептида или белка.

Термины "синергия" или "синергетический" или "потенцировать" относятся к взаимодействию двух или более агентов, совместное положительное действие которых приводит к получению эффекта, который нельзя получить за счет их действия по отдельности. Синергию эффектов комбинированных лекарственных средств можно количественно определить с использованием различных методик, например путем применения лекарственных средств дозах ниже MIC. Согласно опубликованной методике фракционной ингибирующей концентрации (FIC) (Odds, Antimicrobiol. Chem., 2003) фракционную ингибирующую концентрацию лекарственного вещества А и лекарственного вещества В оценивали следующим образом: FIC лекарственного вещества А = (MIC лекарственного вещества А в комбинации)/(MIC отдельно взятого лекарственного вещества А); FIC лекарственного вещества В = (MIC лекарственного вещества В в комбинации)/(MIC отдельно взятого лекарственного вещества В). Для выявления синергети-

ческой активности между лекарственным веществом А и лекарственным веществом В оценивали индекс фракционной ингибирующей концентрации (FICI) следующим образом: $FICI = FIC \text{ лекарственного вещества А} + FIC \text{ лекарственного вещества В}$. Если $FICI \leq 0,5$, лекарственные вещества А и В считают синергетическими. Если $FICI = 1$, совокупный эффект лекарственных веществ А и В считают аддитивным. Если $FICI \geq 4$, совокупный эффект лекарственных веществ А и В считают антагонистическим. В качестве альтернативы, согласно методологии "x/y" (David, J. Antimicrob. Chemother., 2001), синергию определяют как $x/y < 0,5$, где x - значение индекса роста (GI), полученное для флакона с комбинацией лекарственных веществ, а y - минимальное значение GI, полученное с любым отдельно взятым лекарственным веществом, используемым в составе тестируемой комбинации.

Термины "содержащий", "содержит" и "состоит из" в настоящем документе являются синонимами терминов "включающий", "включает" и являются неисчерпывающими или открытыми и не исключают наличия дополнительных, не указанных членов, элементов или этапов способа. Эти термины также охватывают выражения "состоящий из" и "преимущественно состоящий из".

Термины "субъект" или "пациент" являются взаимозаменяемыми и относятся к животным, например пациентам-людям.

Термин "субъект, нуждающийся в лечении" относится к субъектам, на которых лечение данного состояния было бы полезно. Такие субъекты могут включать, без ограничения, субъектов, которым поставлен диагноз указанного состояния, субъектов, подверженных возникновению или развитию указанного состояния и/или субъектов, у которых следует предотвратить указанное состояние.

Подразумевается, что термины "лечить" или "лечение" охватывают как терапевтическое лечение уже развившегося заболевания или состояния, так и профилактические или превентивные меры, цель которых состоит в предотвращении или снижении вероятности заболевания нежелательным нарушением, например предотвращения вероятности возникновения и прогрессирования заболевания или состояния. Благоприятные или желательные клинические результаты могут включать, без ограничения, снижение выраженности одного или более симптомов или одного или более биологических маркеров, уменьшение степени заболевания, стабилизированное (т.е. не ухудшающееся) состояние заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, облегчение или временное ослабление болезненного состояния и т.п. Термин лечение также может означать увеличение продолжительности жизни по сравнению с ожидаемой продолжительностью жизни при отсутствии лечения.

Термин "терапевтически эффективная доза" обозначает количество указанной фармацевтической композиции, при введении позволяющее получить положительную терапевтическую реакцию по отношению к лечению пациента с микобактериальной инфекцией.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к композиции, обладающей антиминобактериальными свойствами и содержащей (а) первый агент-антибиотик (далее по тексту называемый "первым агентом"), выбранный из группы, состоящей по меньшей мере из одного из: гликопептидного антибиотика, бета-лактама, циклосерина, ингибитора синтеза РНК, ингибитора репликации ДНК, нуклеозидного антибиотика, ингибитора синтеза белка и ингибитора синтеза АТФ, и (b) второй агент (далее по тексту называемый "вторым агентом"), выбранный из группы, состоящей по меньшей мере из одного из: ингибитора липазы, статины, ингибитора протеазы, ингибитора белка теплового шока, ингибитора синтеза миколовых кислот или жирных кислот, ингибитора белков, содержащих домен АСР, ингибитора синтеза этамбутола и трехзамещенного имидазола.

"Первый агент-антибиотик" композиции.

Композиция согласно настоящему изобретению содержит "первый агент-антибиотик", далее по тексту называемый "первым агентом".

В одном варианте реализации указанный первый агент содержит агент-антибиотик, характеризующийся действием против грамположительных бактерий.

В одном варианте реализации указанный первый агент модулирует (прямо или косвенно) активность и/или уровень пептидогликана или одного или более компонентов пептидогликана.

В одном варианте реализации настоящего изобретения указанный первый агент может модулировать активность и/или уровень одной или более микобактериальных клеточных мишеней (например, пептидов, полипептидов или белков, например ферментов), участвующих в биосинтезе (например, биохимическом синтезе, транспортировке или сборке), поддержании или катаболизме пептидогликана или одного или более компонентов пептидогликана. В одном варианте реализации указанный первый агент может ингибировать биосинтез пептидогликана или биосинтез одного или более компонентов пептидогликана.

Компоненты пептидогликана с общим случае известны и могут, в частности, включать N-ацетилглюкозамин (NAM), N-ацетилмурамовую кислоту (MurNAc) и N-гликолилмурамовую кислоту (MurNGly) и полимеры, содержащие NAM, MurNAc и MurNGly, особенно связанные β -(1,4)-гликозидными связями, и могут дополнительно содержать глицин, L- и/или D-аланин, D-глутамат, мезодиаминопимелиновую кислоту и L-лизин и их олигомеры, длина которых обычно составляет приблизи-

тельно 3-5 аминокислот.

Предпочтительные антибиотики, разрушающие пептидогликан, могут представлять собой антибиотики, действующие на более поздних этапах образования пептидогликанового слоя, т.е. действующие после доставки образующегося мономера пептидогликана через цитоплазматическую мембрану, например, веществом-переносчиком дифосфатом ундекапренола. Особенно предпочтительными могут быть антибиотики, прямо или косвенно ингибирующие этап транспептидации при образовании пептидогликана. Кроме того, особенно предпочтительны антибиотики, область действия которых находится за пределами цитоплазматической мембраны.

В одном варианте реализации указанный первый агент представляет собой агонист рецептора глицина, а более предпочтительно циклосерин.

Гликопептидные антибиотики.

В одном варианте реализации указанный первый агент для применения в композиции согласно настоящему изобретению относится к классу гликопептидных антибиотиков. Следует понимать, что гликопептидные антибиотики функционируют посредством стерического ингибирования образования каркасных гликановых цепей из простых субъединиц по мере их продавливания через цитоплазматическую мембрану и тем самым ингибируют последующую реакцию транспептидации.

В одном варианте реализации гликопептидные антибиотики для применения в настоящем изобретении включают ванкомицин, тейкопланин, телаванцин, блеомицин, рамопланин, декапланин, оритаванцин и далбаванцин. В одном варианте реализации указанный первый агент представляет собой ванкомицин или тейкопланин.

В предпочтительном варианте реализации первый агент согласно настоящему изобретению представляет собой ванкомицин.

Бета-лактамы антибиотики.

В одном варианте реализации настоящего изобретения указанный первый агент для применения в композиции согласно настоящему изобретению относится к классу бета-лактамовых антибиотиков, которые ингибируют ферменты, участвующие в транспептидации пептидогликана. Указанный первый агент может относиться к любому из подклассов бета-лактамовых антибиотиков, например, без ограничения, пенамам, цефемам, монобактамам, карбапенемам и пенемам, карбапенемам, клавамам, карбацефемам и оксацефемам.

В одном варианте реализации предпочтительные бета-лактамы антибиотики включают пенамы, предпочтительно пенициллин, аминокпенициллины (например, ампициллин, амоксициллин, бакампициллин, гетациллин, метампициллин, талампициллин, эпициллин или пивампициллин), карбоксипенициллины (например, карбенициллин, тикарциллин или темоциллин) и/или уреидопенициллины (например, азлоциллин, мезлоциллин или пиперациллин).

В одном варианте реализации предпочтительные бета-лактамы антибиотики включают цефемы, предпочтительно цефалоспорины и цефамицины, и более предпочтительно цефазолин, цефацирил, цефадроксил, цефалексин, цефалоглицин, цефалоний, цефалоридин, цефалотин, цефапирин, цефатризин, цефазедон, цефазофлур, цефрадин, цефроксадин, цефтезол, цефуросим, цефаклор, цефамандол, цефминокс, цефонид, цефоранид, цефотиам, цефпрозил, цефбуперазон, цефузонам, цефамицин, цефокситин, цефотетан, цефметазол, цефотаксим, цефиксим, цефтазидим, цефтриаксон, цефкапен, цефдалоксим, цефдинир, цефдиторен, цефетамет, цефменоксим, цефодизим, цефоперазон, цефпимизол, цефпирамид, цефподоксим, цефсулодин, цефтерам, цефтибутен, цефтиолен, цефтизоксим, оксацефем, фломоксеф, латамоксеф, цефепим, цефозопран, цефпиром, цефкином или цефтобипрол.

В одном варианте реализации предпочтительные бета-лактамы антибиотики включают монобактамы, предпочтительно азтреонам, тигемонам, карумонам и нокардицин А.

В одном варианте реализации предпочтительные бета-лактамы антибиотики включают карбапенымы и пенымы, предпочтительно эртапенем, имипенем, меропенем, дорипенем, биापенем, панипенем, разупенем, тебипенем, ленапенем, томопенем и фаропенем.

В одном варианте реализации предпочтительные бета-лактамы антибиотики также включают карбапенымы, клавамы, карбацефемы и оксацефемы.

Ингибиторы синтеза РНК.

В дополнительном варианте реализации настоящего изобретения указанный первый агент может представлять собой ингибитор синтеза РНК и, в частности, ингибитор ДНК-зависимого синтеза РНК у бактерий, способный ингибировать бактериальную ДНК-зависимую РНК-полимеразу. В предпочтительном варианте реализации указанный первый агент представляет собой ингибитор синтеза РНК - рифампицин или его производное, или фидаксомицин.

Ингибиторы репликации ДНК.

В дополнительном варианте реализации настоящего изобретения указанный первый агент может представлять собой ингибитор репликации ДНК и, в частности, ингибитор активности топоизомеразы и/или гиразы, например ингибитор топоизомеразы или ингибитор гиразы. В предпочтительном варианте реализации указанный первый агент ингибирует топоизомеразу I, топоизомеразу II, топоизомеразу IV и/или гиразу. В предпочтительном варианте реализации указанный первый агент представляет собой

хинолон, предпочтительно фторхинолон, или азаметилхинолон. В предпочтительном варианте реализации указанный хинолон выбирают из группы, состоящей из циноксацина, налидиксовой кислоты, оксолиновой кислоты, пиромидовой кислоты, пипемидовой кислоты, розоксацина, ципрофлоксацина, энноксацина, флероксацина, ломефлоксацина, надифлоксацина, норфлоксацина, офлоксацина, пефлоксацина, руфлоксацина, балофлоксацина, грепафлоксацина, левофлоксацина, пазуфлоксацина, спарфлоксацина, темафлоксацина, тосуфлоксацина, клинафлоксацина, гагифлоксацин, гемифлоксацина, моксифлоксацина, ситафлоксацина, тровафлоксацина, прулифлоксацина, делафлоксацина, немоноксацина, данофлоксацина, дифлоксацина, энрофлоксацина, ибафлоксацина, марбофлоксацина, орбифлоксацина или сарафлоксацина.

Нуклеозидные антибиотики.

В дополнительном варианте реализации настоящего изобретения указанный первый агент может представлять собой нуклеозидный антибиотик, например капрезамидин.

Ингибиторы синтеза белка.

В дополнительном варианте реализации настоящего изобретения указанный первый агент может представлять собой ингибитор синтеза белка и, конкретнее, агент, мишенью которого является ранний этап, включающий связывание N-формилметионил-тРНК с рибосомой. В предпочтительном варианте реализации указанный ингибитор синтеза белка представляет собой оксазолидинон, например линезолид, позизолид, тедизолид, радезолид, сутезолид (PNU-100480), AZD5847. В еще одном варианте реализации указанный ингибитор синтеза белка представляет собой аминокликозид, например стрептомицин, канамицин, тобрамицин, гентамицин, неомицин, капреомицин, тигециклин или амикацин.

Ингибиторы синтеза АТФ.

В дополнительном варианте реализации настоящего изобретения указанный первый агент может представлять собой ингибитор синтеза АТФ и предпочтительно представляет собой дарилхинолин, например бедаквилин (TMC207 или R207910).

Фенотиазин или его производные.

В дополнительном варианте реализации настоящего изобретения указанный первый агент может представлять собой фенотиазин или его производные, например хлорпромазин, промазин, трифлупромазин, левопромазин, метотрипремазин, мезоридазин, тиоридазин, флуфеназин, перфеназин, прохлорпемазин или трифлуоперазин.

Ингибиторы дигидрофолатредуктазы.

В дополнительном варианте реализации настоящего изобретения указанный первый агент может представлять собой ингибитор дигидрофолатредуктазы и более предпочтительно парааминосалициловую кислоту (также известную как 4-аминосалициловую кислоту или PAS).

"Второй агент" композиции.

Композиции согласно настоящему изобретению дополнительно содержат "второй агент", действующий синергетически указанному первому агенту-антибиотику.

Ингибиторы липазы.

В конкретном варианте реализации указанный "второй агент" является ингибитором липазы.

В одном варианте реализации настоящего изобретения указанный ингибитор липазы представляет собой орлистат, также известный как тетрагидролипостатин, или THL, название согласно IUPAC - (S)-((S)-1-((2S,3S)-3-гексил-4-оксооксетан-2-ил)тридекан-2-ил)-2-формамид-4-метилпентаноат; номер в реестре CAS 96829-58-2. В одном варианте реализации второй агент согласно настоящему изобретению представляет собой орлистат или его производное.

Статины.

В еще одном варианте реализации указанный второй агент представляет собой ингибитор ГМГ-КоА-редуктазы, предпочтительно по меньшей мере один статин, выбранный из группы, содержащей аторвастатин, церивастатин, флувастатин, ловастатин, мевастатин, питавастатин, правастатин, розувастатин и симвастатин или их смеси.

В одном варианте реализации настоящего изобретения указанный второй агент представляет собой симвастатин, название согласно IUPAC - (1S,3R,7S,8S,8aR)-8-{2-[(2R,4R)-4-гидрокси-6-оксотетрагидро-2H-пиран-2-ил]этил}-3,7-диметил-1,2,3,7,8,8a-гексагидронафтален-1-ил-2,2-диметилбутаноат; номер в реестре CAS 79902-63-9.

Ингибиторы протеаз.

В еще одном варианте реализации указанный второй агент представляет собой ингибитор протеазы и предпочтительно - ингибитор протеазы ВИЧ. Предпочтительные ингибиторы протеаз для применения в композиции согласно настоящему изобретению включают ритонавир, лопинавир и индинавир, предпочтительно ритонавир.

В одном варианте реализации настоящего изобретения указанный второй агент представляет собой ритонавир, название согласно IUPAC - 1,3-тиазол-5-илметил-N-[(2S,3S,5S)-3-гидрокси-5-[(2S)-3-метил-2-[[метил(2-пропан-2-ил)-1,3-тиазол-4-ил]метил]карбамоил]амино]бутанамид]-1,6-дифенилгексан-2-ил]карбамат; номер в реестре CAS 155213-67-5.

Ингибиторы белков теплового шока.

В еще одном варианте реализации указанный второй агент представляет собой ингибитор белка теплового шока и предпочтительно ингибитор белка теплового шока HSP90. В предпочтительном варианте реализации ингибиторы белков теплового шока для применения в настоящем изобретении выбирают из гелданамицина, радицикола и их производных.

Ингибиторы синтеза миколовых кислот или жирных кислот.

В конкретном варианте реализации указанный второй агент является ингибитором синтеза миколовых кислот или жирных кислот. В одном варианте реализации указанный второй агент, в частности, может разрушать клеточную стенку микобактерий, т.е. может разрушать любой компонент из плазматической мембраны, пептидогликанового слоя, арабиногалактанового слоя, слоя миколовых кислот или слоя капсулы микобактерий. В одном варианте реализации указанный второй агент разрушает слой миколовых кислот микобактерий за счет своего действия на миколовые кислоты и/или интеркалирующие свободные липиды указанного слоя миколовых кислот. В одном варианте реализации указанный второй агент разрушает слой, образованный миколовыми кислотами или их солями и сложными эфирами, или слой, образованный димикоцерозатными сложными эфирами (DIM), предпочтительно димикоцерозатными сложными эфирами фтиоцера (PDIM) или гликозилфенолфтиоцерами. В одном варианте реализации указанный второй агент модулирует активность и/или уровень одного или более из компонентов, участвующих в образовании слоя миколовых кислот или их солей и сложных эфиров и/или слоя димикоцерозатных сложных эфиров (DIM), предпочтительно димикоцерозатных сложных эфиров фтиоцера (PDIM) или гликозилфенолфтиоцеров. В одном варианте реализации указанный второй агент модулирует активность и/или уровень одной или более из мишеней клетки микобактерий, которые участвуют в биосинтезе, поддержании или катаболизме свободных липидов и/или миколовых кислот, образующих слой миколовых кислот. В еще одном варианте реализации указанный второй агент специфически связывается с одним или более из компонентов слоя миколовых кислот, конкретнее, с миколовыми кислотами или их солями и сложными эфирами и/или со свободными липидами, например димикоцерозатными сложными эфирами (DIM), димикоцерозатными сложными эфирами фтиоцера (PDIM) или гликозилфенолфтиоцерами. В еще одном варианте реализации указанный второй агент специфически связывается с одной или более из микобактериальных мишеней, участвующих в биосинтезе, поддержании или катаболизме свободных липидов и/или миколовых кислот, образующих слой миколовых кислот. В одном варианте реализации указанный второй агент ингибирует биосинтез миколовых кислот или их солей и сложных эфиров или димикоцерозатных сложных эфиров (DIM), предпочтительно димикоцерозатных сложных эфиров фтиоцера (PDIM) или гликозилфенолфтиоцеров.

В одном варианте реализации указанный второй агент может представлять собой химическое соединение и, конкретнее, химическое соединение, способное ингибировать синтез миколовых кислот и тем самым разрушать слой миколовых кислот. Химические соединения для применения в качестве второго агента в контексте настоящего изобретения включают, в числе прочего, тиолактомицин, церуленин, тиокарбамиды, гидразиды, ингибитор Ag85c или биомолекулы.

Тиолактомицин.

В одном варианте реализации второй агент для применения в композиции согласно настоящему изобретению представляет собой тиолактомицин или его аналоги (например, описанные в статье Douglas JD et al., *Microbiology* 148 (2002): 3101-3109).

Церуленин.

В одном варианте реализации настоящего изобретения второй агент для применения в композиции согласно настоящему изобретению представляет собой церуленин, т.е. химическое соединение с названием согласно ИЮПАК (2R, 3S)-3-[(4E,7E)-нона-4,7-диеноил]оксиран-2-карбоксамид; номер в реестре CAS 17397-89-6.

Тиокарбамиды.

В одном варианте реализации настоящего изобретения второй агент для применения в композиции согласно настоящему изобретению представляет собой тиокарбамид, предпочтительно выбранный из группы, включающей этионамид, протионамид и тиомочевину.

Гидразиды.

В одном варианте реализации настоящего изобретения указанный второй агент для применения в композиции согласно настоящему изобретению представляет собой изониазид или ланиазид, нидразид, изоникотинилгидразид или INH; номер в реестре CAS 54-85-3. Изониазид, в частности, известен как пролекарство, активируемое бактериальной каталазой-пероксидазой под названием KatG, в клетках *M. tuberculosis*. KatG присоединяет ацил изоникотиновой группы к НАДН с образованием комплекса ацил изоникотиновой группы-НАДН. Этот комплекс прочно связывается с протеинредуктазой переносчика еноил-ацильных групп, известной как InhA, тем самым блокируя природный субстрат еноил-AspM и действие синтазы жирных кислот. Этот процесс, в частности, может привести к ингибированию синтеза миколовых кислот, необходимых для образования клеточной стенки микобактерий.

Ингибиторы Ag85c.

В одном варианте реализации настоящего изобретения указанный второй агент для применения в композиции согласно настоящему изобретению представляет собой ингибитор антигена 85C (Ag85C),

миколитрансферазы, обнаруженной в *M. tuberculosis*.

Ингибиторы белков, содержащих домен АСР.

В одном варианте реализации настоящего изобретения указанный второй агент для применения в композиции согласно настоящему изобретению представляет собой ингибитор белка-переносчика ацильных групп (АСР), который представляет собой важный компонент биосинтеза жирных кислот и поликетидов, растущая цепь которых связывается во время синтеза в виде тиолового эфира с дистальным тиолом 4'-фосфопантотеиновой группы. Ингибиторы белков, содержащих домен АСР, для применения в настоящем изобретении включают алоэ-эмодин, антрахинон, содержащийся в соке алоэ, и нимбин, химическое соединение, относящееся к тритерпеноидам и выделенное из *Azadirachta indica*.

Трехзамещенные имидазолы.

В одном варианте реализации настоящего изобретения указанный второй агент для применения в композиции согласно настоящему изобретению представляет собой трехзамещенный имидазол, действующий как ингибитор глутаминсинтазы микобактерий. Трехзамещенные имидазолы для применения в настоящем изобретении включают, например, 2-трет-бутил-4,5-диарилимидазолы.

Ингибиторы образования дисульфидных мостиков.

В одном варианте реализации настоящего изобретения указанный второй агент для применения в композиции согласно настоящему изобретению представляет собой ингибитор образования дисульфидных мостиков, включая, например, ацетилцистеин или карбоцистеин.

Биологические молекулы.

В еще одном варианте реализации настоящего изобретения указанный второй агент для применения в композиции согласно настоящему изобретению представляет собой биологическую молекулу, выбранную из группы, состоящей из нуклеиновой кислоты, олигонуклеотида, рибозима, пептида, полипептида, белка, антитела, пептидомиметика, антитела или его фрагмента или производного и аптамера.

В еще одном конкретном варианте реализации настоящего изобретения указанный второй агент может представлять собой антисмысловый агент (например, антисмысловый олигонуклеотид) или агент, вызывающий РНК-интерференцию (например, миРНК или кшРНК) или рибозим или конструкт или вектор, кодирующий любой из таких агентов. Например, усиления экспрессии можно достичь путем введения рекомбинантных нуклеиновых кислот, кодирующих желательный пептид, полипептид или белок под контролем подходящего промотора. Например, уровень пептида, полипептида или белка можно модулировать за счет модификации его образования (например, фолдинга, взаимодействий), стабильности, разрушения, клеточной локализации и т.д. Под термином "антисмысловый" понимают соединение, строение которого обеспечивает мешающее влияние на экспрессию гена, способное специфически связываться с заданной нуклеотидной последовательностью-мишенью. Антисмысловые агенты хорошо известны специалисту в данной области техники и обычно включают олигонуклеотид или аналог олигонуклеотида, способный специфически гибридизоваться с последовательностью-мишенью, и обычно могут содержать, в основном состоять из или состоять из нуклеотидной последовательности, комплементарной или в значительной степени комплементарной последовательности в составе геномной ДНК, мРНК или кДНК, предпочтительно мРНК или кДНК, соответствующей нуклеиновой кислоте-мишени. Антисмысловые агенты, применимые в настоящем изобретении, обычно могут гибридизоваться с соответствующими мишенями в условиях высокой жесткости и специфически гибридизоваться с мишенью в физиологических условиях.

В контексте изобретения под термином "рибозим" подразумевают молекулу нуклеиновой кислоты, предпочтительно олигонуклеотид или аналог олигонуклеотида, способный каталитически расщеплять полинуклеотид. Предпочтительно "рибозим" может расщеплять мРНК заданного белка-мишени, тем самым ослабляя ее трансляцию.

Опытный читатель должен принимать во внимание, что модуляция должна приводить к увеличению или снижению активности и/или уровня указанного фактора. В качестве неограничивающего примера снижение активности и/или уровня мишеней в клетках микобактерий (например, пептидов, полипептидов или белков, например ферментов), участвующих в биосинтезе или поддержании клеточной стенки микобактерий, конкретнее - в биосинтезе или поддержании слоя миколовых кислот, и еще конкретнее - в биосинтезе или поддержании слоя свободных липидов или слоя миколовых кислот, или их компонентов может привести к разрушению указанных слоев.

В контексте настоящего изобретения под термином "специфически связывающийся" (специфическое связывание) подразумевают, что указанный второй агент связывается с одной или более из желательных мишеней или представляющих интерес лигандов, по существу исключая другие случайные или неродственные молекулы, и, необязательно, в значительной степени исключая другие структурно родственные молекулы. Связывание агента с мишенью можно оценивать, в числе прочего, с использованием общепринятых способов анализа взаимодействий, например совместной иммунопреципитации, иммуноанализа, хроматографии, гель-электрофореза, дрожжевых двойных гибридов или их комбинаций. В контексте настоящего изобретения связывание указанного агента исключительно с заданными мишенями или лигандами не требуется. Например, можно сказать, что указанный второй агент специфически связывается с мишенью, если его сродство к такой заданной мишени в условиях связывания по меньшей

мере приблизительно в 2 раза больше, предпочтительно по меньшей мере приблизительно в 5 раз больше, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно в 10 раз больше, еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно в 25 раз больше, еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно в 50 раз больше, и еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно в 100 раз или более чем в 100 раз больше, чем его сродство к неспецифической молекуле.

В одном варианте реализации указанный второй агент может связываться с заданными мишенями с константой сродства (K_A) такого связывания $K_A \geq 1 \times 10^6 M^{-1}$, более предпочтительно $K_A \geq 1 \times 10^7 M^{-1}$, еще более предпочтительно $K_A \geq 1 \times 10^8 M^{-1}$, еще более предпочтительно $K_A \geq 1 \times 10^9 M^{-1}$ и еще более предпочтительно $K_A \geq 1 \times 10^{10} M^{-1}$ или $K_A \geq 1 \times 10^{11} M^{-1}$.

В дополнительном конкретном варианте реализации настоящего изобретения указанный второй агент представляет собой "антитело" и может представлять собой моноклональное антитело, поликлональное антитело, полиспецифическое антитело (например, биспецифическое антитело) и фрагменты антитела, при условии, что они проявляют желательную биологическую активность. В одном варианте реализации настоящего изобретения указанное антитело может быть образовано с помощью любого химерного или гуманизированного антитела, или может соответствовать любой антиген-связывающей области (фрагменту) интактного антитела, которая сохраняет способность интактного антитела специфически связывать антиген. Примеры антиген-связывающих фрагментов, в частности, включают (i) Fab-фрагмент; (ii) $F(ab')_2$ -фрагмент; (iii) Fd-фрагмент; (iv) Fv-фрагмент; (v) однодоменное антитело ("sdAb", также известное как наноантитело (nanobody®)); (vi) выделенную область, определяющую комплементарность (CDR), или одноцепочечный Fv (scFv).

В дополнительном конкретном варианте реализации настоящего изобретения указанный второй агент может представлять собой аптамер. Под термином "аптамер" подразумевают одноцепочечный или двуцепочечный ДНК-олигонуклеотид, РНК-олигонуклеотид или ДНК/РНК-олигонуклеотид или любой их аналог, способный специфически связываться с молекулой-мишенью. Преимуществами аптамеров, как правило, являются достаточно высокие специфичность и сродство к мишеням (например, K_A порядка $1 \times 10^9 M^{-1}$). Термин "фотоаптамер" относится к аптамеру, содержащему одну или более из фотореактивных функциональных групп, которые могут ковалентно связываться или перекрестно связываться с молекулой-мишенью.

В дополнительном конкретном варианте реализации настоящего изобретения указанный второй агент может представлять собой пептидомиметик. Под термином "пептидомиметик" подразумевают непептидный агент, который является топологическим аналогом соответствующего пептида.

В одном варианте реализации указанный второй агент представляет собой нуклеиновую кислоту или полинуклеотид. Под терминами "нуклеиновая кислота" или "полинуклеотид" подразумевают полимерную молекулу, каркас которой поддерживает основания, способные к образованию водородных связей с типичными полинуклеотидами, где основания располагаются на полимерном каркасе таким образом, который обеспечивает такое специфичное по отношению к последовательности образование водородных связей между полимерной молекулой и типичным полинуклеотидом (например, одноцепочечной ДНК). Такие основания, как правило, представляют собой инозин, аденозин, гуанозин, цитозин, урацил и тимидин. Полимерные молекулы включают дву- и одноцепочечные РНК и ДНК, а также модификации их каркаса, например метилфосфонатные связи. Полинуклеотиды могут быть линейными или кольцевыми, и включают плазмиды, вирусы и другие векторы. Вирусные векторы включают векторы, основанные на ретровирусах, аденовирусах, адено-ассоциированных вирусах (AAV), герпесвирусах, астровирусах, коронавирусах, ортомиксовирусах, паповавирусах, парамиксовирусах, парвовирусах, пикорнавирусах, поксвирусах и тогавирусах.

Предпочтительные мишени клетки микобактерий, участвующие в биосинтезе, поддержании или катаболизме слоя миколовых кислот или его компонентов, включают, без ограничения, членов систем Fas (синтазы жирных кислот), в том числе мишени, рассмотренные в статье Takayama et al., Clin. Microbiol. Reviews (2005), p. 81-101. Примеры генов, кодирующих указанные мишени, включают *fas* (Rv2524c), *fabD* (Rv2243), *acpM* (Rv2244), *fabH* (0533c), *fabZ*, *fabA*, *kasA/kasB* (Rv2245/Rv2246), *fabG1*, *inhA* (Rv1784), *mmaA1-4* (Rv0642c-Rv0645c), *peaA* (Rv0470c), *accD4/accd5* (Rv3299c-Rv0380), *fadD32* (Rv3801c), *pkc13* (Rv3800c), *fbpA* (Rv3804), *fbpB* (Rv1886) и *fbpC* (Rv0129c). Предпочтительно в настоящем документе активность и/или уровень указанных мишеней следует уменьшить.

Предпочтительные мишени клетки микобактерий, участвующие в биосинтезе, поддержании или катаболизме слоя свободных липидов или его компонентов, включают, без ограничения, членов систем поликетидсинтазы, в том числе мишени, рассмотренные в статье Onwueme et al., Progress in Lipid Research 44 (2005), 259-302. Примеры генов, кодирующих указанные мишени, включают любой из генов семейства *pkc*, например *ppsA*, *ppsB*, *ppsC*, *ppsD*, *ppsE*, *pkc6*, *pkc13*, *mas*, *pkc15/1*, *pkc2*, *pkc3/4*, *pkc7*, *pkc8/17*, *pkc9*, *pkc12*, *pkc10*, *pkc11*, *pkc16*. Примеры генов, кодирующих другие потенциальные мишени, включают *papA5*, *fadD26*, *fadD28*, *mmpL7*, *dtrABC*, *lppX* и *hsp60-1*. Предпочтительно в настоящем документе активность и/или уровень указанных мишеней следует уменьшить.

Дополнительный терапевтический агент.

В одном варианте реализации композиция согласно настоящему изобретению дополнительно содержит по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент.

В одном варианте реализации указанный дополнительный терапевтический агент выбран из группы, включающей или состоящей по меньшей мере из одного из: гликопептидного антибиотика, бета-лактама, циклосерина, ингибитора синтеза РНК, ингибитора репликации ДНК, нуклеозидного антибиотика, ингибитора синтеза белка, ингибитора синтеза АТФ, ингибитора дигидрофолатредуктазы, ингибитора липазы, статина, ингибитора протеазы, ингибитора белка теплового шока, ингибитора синтеза миколовых кислот или жирных кислот, ингибитора белков, содержащих домен АСР, ингибитора Ag85С, ингибитора образования дисульфидных мостиков и трехзамещенного имидазола, описанных выше, или их смесей.

Дополнительные потенцирующие агенты.

В одном варианте реализации композиция согласно настоящему изобретению содержит указанный первый и второй агенты, а также дополнительно содержит по меньшей мере один дополнительный агент, возможно, выбранный из категорий, описанных выше для любого из первого или второго агентов, или действующий в качестве агента, потенцирующего эффекты любого из указанных первого или второго агентов. В одном варианте реализации указанный дополнительный агент соответствует ингибитору бета-лактамазы и способен потенцировать действие первого агента, выбранного из класса бета-лактамных антибиотиков. В предпочтительном варианте реализации ингибиторы бета-лактамазы для применения в качестве потенцирующих агентов в настоящем изобретении включают пенициллины, цефтаролин, имипенем, темоциллин, азтреонам, тазобактам или Novexel (также известный как NXL104). Композиция согласно настоящему изобретению может дополнительно содержать потенцирующие агенты, выбранные из телитромицина, пиперациллина или циластатина.

В конкретном варианте реализации композиция согласно настоящему изобретению содержит бета-лактамный антибиотик в качестве первого агента и вторые агенты, а также дополнительно содержит комбинацию клавуланата (также известного как клавулановая кислота) и амоксициллина, имипенема и циластатина или пиперациллина и тазобактама в качестве дополнительных потенцирующих агентов.

Специфические комбинации первого и второго агентов.

В одном варианте реализации композиция согласно настоящему изобретению содержит в качестве первого агента любой агент из ванкомицина, тейкопланина или меропенема, а в качестве второго агента - церуленин, симвастатин, орлистат или ритонавир. В одном варианте реализации композиция согласно настоящему изобретению содержит ванкомицин в качестве первого агента и ритонавир в качестве второго агента. В еще одном варианте реализации композиция согласно настоящему изобретению содержит ванкомицин в качестве первого агента и симвастатин в качестве второго агента. В еще одном варианте реализации композиция согласно настоящему изобретению содержит меропенем в качестве первого агента и орлистат в качестве второго агента. В еще одном варианте реализации композиция согласно настоящему изобретению содержит меропенем в качестве первого агента и орлистат в качестве второго агента, и дополнительно содержит амоксициллин и клавуланат.

В предпочтительном варианте реализации композиция согласно настоящему изобретению содержит ванкомицин в качестве первого агента и орлистат или его производное в качестве второго агента.

В предпочтительном варианте реализации композиция согласно настоящему изобретению содержит ванкомицин и орлистат, причем ванкомицин и орлистат действуют синергетически.

В одном варианте реализации композиция согласно настоящему изобретению представляет собой фармацевтическую композицию. В одном варианте реализации указанная фармацевтическая композиция содержит указанный первый агент (а) и указанный второй агент (b) совместно в одной лекарственной форме с одним или более фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами. В качестве альтернативы указанный первый агент (а) и указанный второй агент (b) можно составить в виде отдельных фармацевтических композиций с одним или более фармацевтическими вспомогательными веществами. В одном варианте реализации настоящего изобретения указанные первый и второй агенты предназначены для раздельного, последовательного или одновременного введения пациенту.

В зависимости от выбранного способа введения фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению можно кондиционировать в соответствии с любой подходящей лекарственной формой, известной специалисту в данной области техники, например таблетками, капсулами, леденцами, порошками, суппозиториями, растворами, суспензиями, спреями, аэрозолями, лосьонами, кремами и кожными пластырями.

Если фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению предназначена для кондиционирования в жидких лекарственных формах, можно использовать различные водные носители, например воду, забуференную воду, 0,8% физиологический раствор, фосфат-содержащие растворы, 0,3% глицин, гиалуроновую кислоту и т.п. Эти композиции можно стерилизовать с использованием обычных способов стерилизации или стерильно фильтровать. Полученные водные растворы можно упаковать для использования как есть, или в лиофилизированном виде, причем лиофилизированный препарат объединяют со стерильным раствором перед введением. Композиции могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, необходимые для приближенного воспроизведения физиологических

условий, например агенты для регуляции рН и буферные агенты, консерванты, агенты для регуляции тоничности, увлажнители и т.п., например ацетат натрия, лактат натрия, хлорид натрия, хлорид калия, хлорид кальция, монолаурат сорбитана, олеат триэтаноламина и т.д. Предпочтительно значение рН композиции находится в физиологическом диапазоне рН, например, в частности, значение рН композиции составляет от приблизительно 5 до приблизительно 9,5, более предпочтительно от приблизительно 6 до приблизительно 8,5, еще более предпочтительно от приблизительно 7 до приблизительно 7,5. Специалистам известны способы получения таких фармацевтических композиций.

В еще одном конкретном варианте реализации настоящего изобретения, если фармацевтическая композиция предназначена для применения в твердой форме, можно использовать обычные нетоксичные твердые носители, включая, например, маннитол, лактозу, крахмал, стеарат магния, сахарин натрия, тальк, целлюлозу, глюкозу, сахарозу, карбонат магния для фармацевтических целей и т.п.

Фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению можно вводить любым путем, известным специалисту в данной области техники. Таким образом, указанную композицию можно вводить посредством парентерального, наружного, орального или местного введения. Их можно вводить, например, внутримышечно, внутривенно, внутривенно, внутривенно, подкожно, трансдермально, внутрикожно, трансмукозально, вагинально, ректально, пульмонально, буккально и назально. В одном варианте реализации фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению вводят парентерально, например внутривенно, подкожно, внутрикожно или внутримышечно.

В одном варианте реализации введение представляет собой пульмональное введение. В одном варианте реализации фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению вводят посредством ингаляции. В одном варианте реализации фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению вводят с помощью аэродинамического ингалятора. В конкретном варианте реализации фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению вводят с помощью ингалятора.

В одном варианте реализации композицию вводят в виде аэрозоля. Для аэрозольного введения фармацевтическую композицию (или ее отдельные компоненты) предпочтительно поставляют в мелко-дисперсной форме вместе с поверхностно-активным веществом и вытеснителем, в виде раствора или суспензии, необязательно с другими обычными фармацевтическими вспомогательными веществами. Квалифицированный врач может определить соответствующие терапевтически эффективные дозы указанных первого и второго агентов в фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению для аэрозольного введения.

Таким образом, настоящее изобретение дополнительно относится к набору компонентов, содержащему указанный первый агент и указанный второй агент в одном или в отдельных флаконах вместе с подходящими фармацевтическими вспомогательными веществами, причем указанные первый и второй агенты растворены или суспендированы в приемлемом носителе, предпочтительно водном носителе. Таким образом, в одном варианте реализации настоящее изобретение относится к разовой дозировке фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению в подходящем количестве водного раствора, например 0,1-3 мл, предпочтительно 0,2-2 мл. Композицию для парентерального применения согласно настоящему изобретению можно поместить в ампулы, одноразовые шприцы или флаконы для многократного приема из стекла или пластика.

Фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению можно вводить в терапевтически эффективной дозе пациенту, нуждающемуся в этом.

Соответствующие терапевтически эффективные дозы указанных первого и второго агентов в фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению зависят от природы указанных агентов, и их может определить квалифицированный врач. Предпочтительные дозировки на 1 кг массы тела пациента, подлежащего лечению, могут составлять от приблизительно 0,1 до приблизительно 100 мг, более предпочтительно от приблизительно 0,5 до приблизительно 50 мг и наиболее предпочтительно от приблизительно 1 до приблизительно 30 мг.

В конкретном варианте реализации при использовании орлистата в качестве второго агента концентрация орлистата в композиции согласно настоящему изобретению такова, что концентрация орлистата в плазме пациента, подвергаемого лечению, находится в диапазоне от приблизительно 0,1 нг/мл до приблизительно 1 мкг/мл и предпочтительно от приблизительно 1 до приблизительно 50 нг/мл.

В конкретном варианте реализации при использовании ванкомицина в качестве первого агента количество ванкомицина, вводимое пациенту, составляет от приблизительно 500 до приблизительно 1000 мг/день, предпочтительно от приблизительно 100 до приблизительно 500 мг/день, более предпочтительно от приблизительно 250 до приблизительно 500 мг/день. В конкретном варианте реализации при использовании ванкомицина в качестве первого агента количество ванкомицина, вводимое пациенту, составляет от приблизительно 1 до приблизительно 50 мг/кг, предпочтительно от приблизительно 5 до приблизительно 20 мг/кг, более предпочтительно от приблизительно 10 до приблизительно 20 мг/кг.

В конкретном варианте реализации при использовании ванкомицина в качестве первого агента концентрация ванкомицина в композиции согласно настоящему изобретению такова, что концентрация ванкомицина в плазме пациента, подвергаемого лечению, находится в диапазоне от приблизительно 1 нг/мл до приблизительно 1 мг/мл и предпочтительно от приблизительно 1 до приблизительно 100 мкг/мл.

В одном варианте реализации, где композицию вводят в виде аэрозоля, концентрация ванкомицина в жидкой среде составляет от приблизительно 25 до приблизительно 400 мг/мл, предпочтительно от приблизительно 30 до приблизительно 120 мг/мл, более предпочтительно от приблизительно 50 до приблизительно 60 мг/мл. В одном варианте реализации, где композицию вводят в виде аэрозоля, количество ванкомицина, доставленное в легкие и/или дыхательную систему, составляет от приблизительно 10 до приблизительно 1000 мг, предпочтительно от приблизительно 40 до приблизительно 600 мг.

В конкретном варианте реализации при использовании меропенема в качестве первого агента концентрация меропенема в композиции согласно настоящему изобретению такова, что концентрация меропенема в плазме пациента, подвергаемого лечению, находится в диапазоне от 1 нг/мл до 1 мг/мл и предпочтительно от 1 до 150 мкг/мл.

В конкретном варианте реализации при использовании клавуланата в качестве дополнительного агента концентрация клавуланата в композиции согласно настоящему изобретению такова, что концентрация клавуланата в плазме пациента, подвергаемого лечению, находится в диапазоне от 1 нг/мл до 1 мг/мл и предпочтительно от 100 нг/мл до 100 мкг/мл, более предпочтительно от 200 нг/мл до 10 мкг/мл.

В конкретном варианте реализации при использовании амоксициллина в качестве дополнительного агента концентрация амоксициллина в композиции согласно настоящему изобретению такова, что концентрация амоксициллина в плазме пациента, подвергаемого лечению, находится в диапазоне от 1 нг/мл до 1 мг/мл и предпочтительно от 100 нг/мл до 100 мкг/мл, более предпочтительно от 1 до 10 мкг/мл.

Если указанный второй агент фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению представляет собой антитело, квалифицированный врач может определить соответствующие терапевтически эффективные дозы указанного терапевтического антитела с учетом природы (включая период полувыведения) антитела, болезненного состояния и его тяжести, а также возраста, размеров и состояния пациента. В одном варианте реализации настоящего изобретения терапевтически эффективная доза антитела предпочтительно находится в диапазоне от приблизительно 0,01 до приблизительно 40 мг/кг, более предпочтительно от приблизительно 0,1 до приблизительно 30 мг/кг, необязательно от приблизительно 3 до приблизительно 20 мг/кг.

Если указанный второй агент фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению представляет собой полипептидный антиген, квалифицированный врач может определить соответствующие терапевтически эффективные дозы указанного полипептидного антигена в фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, однако для начальной иммунизации они обычно находятся в диапазоне от приблизительно 1,0 до приблизительно 5000 мкг пептида на пациента с массой тела 70 кг. Фактическую дозу, вводимую субъекту, часто определяют, исходя из соответствующего количества на 1 кг массы тела субъекта. Например, эффективное количество может составлять от приблизительно 0,1 до 5 мкг/кг массы тела.

Если указанный второй агент фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению представляет собой полинуклеотидный вектор, соответствующие терапевтически эффективные дозы указанного полинуклеотидного вектора в указанной фармацевтической композиции в значительной степени зависят от способа доставки, однако их может определить квалифицированный врач. Обычно указанная доза составляет от приблизительно 0,01 до 50 мг на 1 кг массы тела индивида, которому ее вводят.

В одном варианте реализации антимикобактериальные комбинации, композиции, наборы и способы лечения, описанные в настоящем документе, при необходимости можно комбинировать с веществами, композициями и процедурами, направленными на укрепление или восстановление ослабленной иммунной системы. У субъектов с ослабленной иммунной системой, включая, в числе прочего, бессимптомных ВИЧ-инфицированных (сероположительных) субъектов и пациентов с симптомами СПИД, часто возникают и/или развиваются микобактериальные инфекции, например туберкулез. Соответственно представленные антимикобактериальные фармацевтические композиции, наборы и способы лечения можно надлежащим образом комбинировать с антиретровирусными терапевтическими средствами, предпочтительно терапевтическими средствами против ВИЧ, более предпочтительно с трехкомпонентной терапией для ВИЧ-положительных пациентов. Предпочтительно такая комбинация не снижает эффективность компонентов терапии в значительной степени.

В контексте настоящего изобретения термины "субъект" или "пациент" используются взаимозаменяемо и относятся к животным, предпочтительно теплокровным животным, более предпочтительно к позвоночным, еще более предпочтительно млекопитающим, еще более предпочтительно приматам и, конкретно, включают пациентов-людей и млекопитающих и приматов, не являющихся людьми. Предпочтительные пациенты являются субъектами-людьми.

В настоящем документе предполагается, что микобактериальные инфекции охватывают инфекции субъектов, вызываемые любыми видами *Mycobacterium*, особенно патогенными видами *Mycobacterium*, в частности видами *Mycobacterium*, способными вызывать туберкулез и заболевания легких у субъектов, включая субъектов с ослабленным иммунитетом, например ВИЧ-положительных пациентов (например, комплекс Mtb). В настоящем документе предполагается, что, кроме *M. tuberculosis*, виды *Mycobacterium* могут включать, без ограничения, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. bovis* БЦЖ, *M. avium*, *M. canetti*, *M. caprae*, *M. celatum*, *M. genavense*, *M. haemophilum*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. leprae*, *M. marinum*, *M. microti*,

M. simiae, *M. ulcerans*, *M. vaccae*, *M. fortuitum*, *M. pinnipedii* и *M. scrofulaceum*. Настоящее изобретение, в частности, направлено на инфекцию *M. tuberculosis*.

Инфекции, которые можно лечить согласно настоящему изобретению, включают активные и латентные инфекции. Термин "активные инфекции" относится к инфекциям с проявляющимися симптомами заболевания и/или очагами туберкулеза. Термин "латентные инфекции" относится к инфекциям без проявляющихся симптомов заболевания и/или очагов туберкулеза. Состояние заболевания туберкулезом может представлять собой "первичный туберкулез", который относится к клиническому заболеванию непосредственно после заражения, или "вторичный туберкулез", который относится к повторной активации латентной инфекции. Лечение можно также применять для профилактики или задержки повторной активации туберкулеза. Эти состояния подробно описаны в *Harrison's Principles of Internal Medicine*, Chapter 150, p. 953-966 (16th ed., Braunwald et al., eds., 2005).

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу оценки чувствительности штаммов микобактерий с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) и широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ) к гликопептидам, бета-лактамам или их комбинации, включающему этапы:

(a) контакта микобактериального штамма с МЛУ или ШЛУ с гликопептидом, бета-лактамом или их комбинацией;

(b) сравнения скорости роста указанного микобактериального штамма с МЛУ или ШЛУ в присутствии и отсутствие указанного гликопептида, бета-лактама или их комбинации.

В предпочтительном варианте реализации способ согласно настоящему изобретению предназначен для оценки чувствительности штаммов микобактерий с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) и широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ) к гликопептидам и включает этапы:

(a) контакта микобактериального штамма с МЛУ или ШЛУ с гликопептидом;

(b) сравнения скорости роста указанного микобактериального штамма с МЛУ или ШЛУ в присутствии и отсутствие указанного гликопептида.

В более предпочтительном варианте реализации способ согласно настоящему изобретению предназначен для оценки чувствительности штаммов микобактерий с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) и широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ) к ванкомицину и включает этапы:

(a) контакта микобактериального штамма с МЛУ или ШЛУ с ванкомицином;

(b) сравнения скорости роста указанного микобактериального штамма с МЛУ или ШЛУ в присутствии и отсутствие указанного ванкомицина.

В одном варианте реализации настоящего изобретения гликопептид и/или бета-лактамы для применения в способе согласно настоящему изобретению могут представлять собой любой из гликопептидных или бета-лактамных первых агентов, описанных выше. В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения указанный гликопептид и/или бета-лактамы не могут оказывать микобактериостатические и/или микобактерицидные эффекты, если обрабатываемые микобактерии содержат слой, образованный миколовыми кислотами или их солями и сложными эфирами, и/или слой, образованный димикоцерозатными сложными эфирами (DIM), предпочтительно димикоцерозатными сложными эфирами фтиоцерола (PDIM) или гликозилфенолфтиоцеролами. В конкретном варианте реализации указанный гликопептид или бета-лактамы для применения в способе согласно настоящему изобретению способны значительно задержать или препятствовать росту штамма микобактерий с МЛУ или ШЛУ, не содержащих PDIM, однако не способны или почти не способны задержать или препятствовать росту штаммов микобактерий с МЛУ или ШЛУ, содержащих липидную клеточную стенку и более предпочтительно содержащих PDIM.

В одном варианте реализации гликопептиды для применения в способе оценки чувствительности штаммов микобактерий с МЛУ или ШЛУ предпочтительно включают ванкомицин или тейкопланин. В одном варианте реализации указанный гликопептид применяют в концентрации от приблизительно 0,5 до приблизительно 500 мкг/мл, предпочтительно от приблизительно 1 до приблизительно 100 мкг/мл, более предпочтительно от приблизительно 5 до приблизительно 50 мкг/мл.

Способ оценки согласно настоящему изобретению предоставляет возможность выявления микобактерий с МЛУ или ШЛУ, обладающих высокой чувствительностью к гликопептидам и/или бета-лактамам. Указанный способ, таким образом, избегает лечения пациентов, страдающих от микобактериальных инфекций, связанных с штаммами с МЛУ или ШЛУ, неэффективными комбинациями препаратов и, кроме того, способствует профилактике развития МЛУ или ШЛУ за счет избегания лечения ненужными антибиотиками. В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения, если штамм микобактерий с МЛУ или ШЛУ оказывается чувствительным к гликопептидам и/или бета-лактамам, пациента, инфицированного этим штаммом, можно успешно лечить указанным гликопептидом, бета-лактамом или их комбинацией вместо обычного лечения первой или второй линии или в комбинации с ним.

В контексте настоящего изобретения штамм микобактерий с МЛУ или ШЛУ считают чувствительным к гликопептидам, бета-лактамам или их комбинациям, если рост указанных штаммов микобактерий, подвергаемых воздействию указанных гликопептидов, бета-лактамов или их комбинации, снижается по сравнению с ростом необработанных штаммов микобактерий при разбавлении 1/100.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу скрининга синергетических микобак-

териостатических или микобактерицидных комбинаций агентов, включающему этапы:

(а) контакта микобактериального штамма с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) или широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ) с агентом-кандидатом в присутствии гликопептида, бета-лактама или их комбинации,

(b) сравнения скорости роста указанного микобактериального штамма с МЛУ или ШЛУ при воздействии указанного гликопептида, бета-лактама или их комбинации в присутствии и отсутствие указанного агента-кандидата.

В предпочтительном варианте реализации способ согласно настоящему изобретению предназначен для скрининга синергетических микобактериостатических или микобактерицидных комбинаций агентов и включает этапы:

(а) контакта микобактериального штамма с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) или широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ) с агентом-кандидатом в присутствии гликопептида;

(b) сравнения скорости роста указанного микобактериального штамма с МЛУ или ШЛУ при воздействии указанного гликопептида в присутствии и отсутствие указанного агента-кандидата.

В более предпочтительном варианте реализации способ согласно настоящему изобретению предназначен для скрининга синергетических микобактериостатических или микобактерицидных комбинаций агентов и включает этапы:

(а) контакта микобактериального штамма с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) или широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ) с агентом-кандидатом в присутствии ванкомицина;

(b) сравнения скорости роста указанного микобактериального штамма с МЛУ или ШЛУ после воздействия указанного ванкомицина в присутствии и отсутствие указанного агента-кандидата.

В одном варианте реализации настоящего изобретения гликопептид, бета-лактамы или их комбинация для применения в способе скрининга согласно настоящему изобретению могут представлять собой любой из первых агентов, описанных выше. В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения указанный гликопептид и/или бета-лактамы не может оказывать микобактериостатические и/или микобактерицидные эффекты, если обрабатываемые микобактерии содержат слой, образованный миколовыми кислотами или их солями и сложными эфирами, и/или слой, образованный димикоцерозатными сложными эфирами (DIM), предпочтительно димикоцерозатными сложными эфирами фтиоцерола (PDIM) или гликозилфенолфтиоцеролами. В конкретном варианте реализации указанный гликопептид или бета-лактамы для применения в способе согласно настоящему изобретению способен значительно задержать или препятствовать росту штамма микобактерии с МЛУ или ШЛУ, не содержащих PDIM, однако не способен или почти не способен задержать или препятствовать росту штаммов микобактерии с МЛУ или ШЛУ, содержащих липидную клеточную стенку и более предпочтительно содержащих PDIM.

В одном варианте реализации гликопептиды для применения в способе оценки чувствительности штаммов микобактерии с МЛУ или ШЛУ предпочтительно включают ванкомицин или тейкопланин. В одном варианте реализации указанный гликопептид применяют в концентрации от приблизительно 0,5 до приблизительно 500 мкг/мл, предпочтительно от приблизительно 1 до приблизительно 100 мкг/мл, более предпочтительно от приблизительно 5 до приблизительно 50 мкг/мл.

Способ скрининга согласно настоящему изобретению предоставляет возможность выявления новых соединений, которые являются весьма подходящими для применения в фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, т.е. в комбинации с первым агентом, описанным выше, для лечения микобактериальных инфекций с МЛУ и/или ШЛУ. Таким образом, способ скрининга согласно настоящему изобретению предоставляет возможность выявления новых комбинаций антимикобактериальных средств 1 и 2 линии. Таким образом, указанный способ обеспечивает дешевый, но чрезвычайно мощный инструмент для скрининга и выявления новых соединений, способных лечить штаммы микобактерий с МЛУ и ШЛУ.

При контакте штаммов микобактерий с МЛУ или ШЛУ, проанализированных с помощью способа скрининга согласно настоящему изобретению, с новым соединением, способным синергетически действовать с выбранным гликопептидом, бета-лактамом или их комбинацией, рост указанных штаммов микобактерий, подвергаемых воздействию агента-кандидата в присутствии гликопептида, бета-лактама или их комбинации, снижается по сравнению с ростом штамма, подвергаемого воздействию антибиотика в отсутствие агента-кандидата при разбавлении 1/100.

Напротив, при контакте штаммов микобактерий с МЛУ или ШЛУ, проанализированных с помощью способа скрининга согласно настоящему изобретению, с агентом-кандидатом, не способным синергетически действовать с выбранным гликопептидом, бета-лактамом или их комбинацией, рост указанных штаммов микобактерий, подвергаемых воздействию агента-кандидата в присутствии гликопептида, бета-лактама или их комбинации, аналогичен или более выражен по сравнению с ростом штамма, подвергаемого воздействию гликопептида, бета-лактама или их комбинации в отсутствие соединения-кандидата при разбавлении 1/100.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 представляет собой график, на котором показано влияние нескольких комбинаций первого и второго агентов согласно настоящему изобретению на рост *Mycobacterium bovis* БЦЖ. Результаты, пред-

ставленные на фиг. 1, получены с использованием системы BacT/Alert MP. ДТ-БЦЖ: необработанный и неразбавленный штамм *M. bovis* БЦЖ. 1/100 БЦЖ: необработанный штамм *M. bovis*, разбавленный 1/100. V5 + ДМСО: штамм *M. bovis* БЦЖ, выращенный в присутствии 5 мкг/мл ванкомицина и ДМСО. V100 + ДМСО: штамм *M. bovis* БЦЖ, выращенный в присутствии 100 мкг/мл ванкомицина и ДМСО. V100 + rito100: штамм *M. bovis* БЦЖ, выращенный в присутствии 100 мкг/мл ванкомицина и 100 мкг/мл ритонавира. V5 + rito100: штамм *M. bovis* БЦЖ, выращенный в присутствии 5 мкг/мл ванкомицина и 100 мкг/мл ритонавира. V5 + орлистат 50: штамм *M. bovis* БЦЖ, выращенный в присутствии 5 мкг/мл ванкомицина и 50 мкг/мл орлистата. V5 + орлистат 100: штамм *M. bovis* БЦЖ, выращенный в присутствии 5 мкг/мл ванкомицина и 100 мкг/мл орлистата.

Фиг. 2 представляет собой график, на котором показано влияние нескольких комбинаций первого и второго агентов согласно настоящему изобретению на рост *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Результаты, представленные на фиг. 2, получены с использованием системы BacT/Alert MP. ДТ-Mtb: необработанный и неразбавленный штамм *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Mtb 1/100: необработанный штамм *M. tuberculosis*, разбавленный 1/100. V5 + ДМСО: штамм *M. tuberculosis*, выращенный в присутствии 5 мкг/мл ванкомицина и ДМСО. VI + орлистат 50: штамм *M. tuberculosis*, выращенный в присутствии 1 мкг/мл ванкомицина и 50 мкг/мл орлистата. VI + орлистат 100: штамм *M. tuberculosis*, выращенный в присутствии 1 мкг/мл ванкомицина и 100 мкг/мл орлистата. V5 + орлистат 50: штамм *M. tuberculosis*, выращенный в присутствии 5 мкг/мл ванкомицина и 50 мкг/мл орлистата. V5 + орлистат 100: штамм *M. tuberculosis*, выращенный в присутствии 5 мкг/мл ванкомицина и 100 мкг/мл орлистата. VI + орлистат 50: штамм *M. tuberculosis*, выращенный в присутствии 1 мкг/мл ванкомицина и 50 мкг/мл орлистата. V5 + симвастатин 100: штамм *M. tuberculosis*, выращенный в присутствии 5 мкг/мл ванкомицина и 100 мкг/мл симвастатина. V5 + ритонавир 10: штамм *M. tuberculosis*, выращенный в присутствии 5 мкг/мл ванкомицина и 10 мкг/мл ритонавира.

Фиг. 3 представляет собой гистограмму, на которой показано влияние нескольких комбинаций первого и второго агентов согласно настоящему изобретению на рост *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Результаты, представленные на фиг. 3, получены с использованием стандартного способа анализа чувствительности с разбавлением культуральной среды. Контроль: необработанный и неразбавленный штамм *M. tuberculosis*. Инокулят, разбавленный 1/100: необработанный штамм *M. tuberculosis*, разбавленный 1/100. V100: штамм *M. tuberculosis*, выращенный в присутствии 100 мкг/мл ванкомицина без других агентов. V5: штамм *M. tuberculosis*, выращенный в присутствии 5 мкг/мл ванкомицина без других агентов. O100: штамм *M. tuberculosis*, выращенный в присутствии 100 мкг/мл орлистата без других агентов. O5: штамм *M. tuberculosis*, выращенный в присутствии 5 мкг/мл орлистата без других агентов. O100 + V5: штамм *M. tuberculosis*, выращенный в присутствии 5 мкг/мл ванкомицина и 100 мкг/мл орлистата. O50 + V5: штамм *M. tuberculosis*, выращенный в присутствии 5 мкг/мл ванкомицина и 50 мкг/мл орлистата. O25 + V5: штамм *M. tuberculosis*, выращенный в присутствии 5 мкг/мл ванкомицина и 25 мкг/мл орлистата. O12,5 + V5: штамм *M. tuberculosis*, выращенный в присутствии 5 мкг/мл ванкомицина и 12,5 мкг/мл орлистата. O06,25 + V5: штамм *M. tuberculosis*, выращенный в присутствии 5 мкг/мл ванкомицина и 6,25 мкг/мл орлистата. Рост клеток выражали в процентах по сравнению с контролем. Измерения выполняли в дни 4, 6, 12, 19 и 21.

Фиг. 4 представляет собой график, на котором показано влияние нескольких комбинаций ванкомицина и орлистата на рост *Mycobacterium bovis* БЦЖ. Результаты, представленные на фиг. 4, получены с использованием системы BacT/Alert MP. БЦЖ 1/1: необработанный и неразбавленный штамм *M. bovis* БЦЖ. БЦЖ 1/100: необработанный штамм *M. bovis*, разбавленный 1/100. БЦЖ + ванкомицин 5 мкг/мл: штамм *M. bovis* БЦЖ, выращенный в присутствии 5 мкг/мл ванкомицина. БЦЖ + ванкомицин 5 мкг/мл + THL 5 мкг/мл: штамм *M. bovis* БЦЖ, выращенный в присутствии 5 мкг/мл ванкомицина и 5 мкг/мл орлистата. БЦЖ + ванкомицин 5 мкг/мл + THL 25 мкг/мл: штамм *M. bovis* БЦЖ, выращенный в присутствии 5 мкг/мл ванкомицина и 25 мкг/мл орлистата. БЦЖ + ванкомицин 5 мкг/мл + THL 50 мкг/мл: штамм *M. bovis* БЦЖ, выращенный в присутствии 5 мкг/мл ванкомицина и 50 мкг/мл орлистата.

Фиг. 5 представляет собой график, на котором показано влияние нескольких комбинаций ванкомицина и орлистата на рост *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Результаты, представленные на фиг. 5, получены с использованием системы BacT/Alert MP. H37Rv 1/1: необработанный и неразбавленный штамм *M. tuberculosis* H37Rv. H37Rv 1/100: необработанный и неразбавленный штамм *M. tuberculosis* H37Rv, разбавленный 1/100. H37Rv + ванкомицин 5 мкг/мл: штамм *M. tuberculosis* H37Rv, выращенный в присутствии 5 мкг/мл ванкомицина. H37Rv + ванкомицин 5 мкг/мл + THL 5 мкг/мл: штамм *M. tuberculosis* H37Rv, выращенный в присутствии 5 мкг/мл ванкомицина и 5 мкг/мл орлистата. H37Rv + ванкомицин 5 мкг/мл + THL 25 мкг/мл: штамм *M. tuberculosis* H37Rv, выращенный в присутствии 5 мкг/мл ванкомицина и 25 мкг/мл орлистата. H37Rv + ванкомицин 5 мкг/мл + THL 50 мкг/мл: штамм *M. tuberculosis* H37Rv, выращенный в присутствии 5 мкг/мл ванкомицина и 50 мкг/мл орлистата.

Примеры

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими примерами.

Материалы и методы.

Бактерии и культуры.

Эксперименты выполняли с использованием *M. bovis* БЦЖ GL2 дикого типа, а также *M. tuberculosis* H37Rv (дикого типа).

Десять клинически неродственных изолятов отобрали из коллекции *M. tuberculosis* ($n > 25000$), поддерживаемой и генотипируемой центром туберкулеза научно-исследовательского института общественного здравоохранения (PHRI), штат Нью-Джерси, США. Номенклатура, использованная для классификации штаммов, была основана на профиле полиморфизма длин рестрикционных фрагментов IS6110 и дополнительных методик генотипирования, описанных ранее (Mathema et al., Clin. Microbiol. Rev., 2006).

Микобактерии выращивали на среде 7H9, содержащей 0,05% твин-80, с добавлением 10% альбумин-декстрозного комплекса (Difco Laboratories) без перемешивания или на агаре Миддлбрук 7H11 с добавлением комплекса олеиновая кислота-альбумин-декстроза (Difco Laboratories).

Лекарственные вещества.

Ванкомицин, ритонавир и симвастатин приобрели в Sigma. Орлистат приобрели в Sandoz, Sigma или Сауман. Рабочие растворы ванкомицина, ритонавира и симвастатина получали в воде, не содержащей ДНКазы/РНКазы, ДМСО и ДМСО соответственно. Рабочий раствор орлистата вначале разбавляли ДМСО до 5 мг/мл.

Анализ чувствительности к лекарственным веществам.

Чувствительность к лекарственным веществам исследовали с помощью трех способов: стандартного способа разбавления культуральной среды (Национальный комитет по клиническим лабораторным стандартам (NCCLS, 2003)), способа стандартизированной пропорции агара и способа BacT/Alert MP (Mycobacteria Process), согласно протоколу BioMerieux (Mathys et al., Antimicrob. Agents Chemother., 2009; Werngren et al., J. Clin. Microbiol., 2006; Tortoli et al., Diagn Microbiol Infect Dis., 2000; Singh et al., J. Clin. Microbiol., 2007 и David, J. Antimicrob. Chemother. 2001).

Для стандартного анализа чувствительности с разбавлением культуральной среды (среды BacT/ALERT MP с добавлением жидкости для восстановления МВ/ВасТ) каждое соединение-"второй агент", подлежащее тестированию по отдельности или в комбинации, последовательно разбавляли (0,6 мл в 0,6 мл), а затем анализировали по отдельности или в комбинации с заданным количеством антибиотиков, выбранных из гликопептидов или бета-лактамов (необязательно в дополнительной комбинации с ингибитором бета-лактамазы, например клавуланатом). Затем пробирки, содержащие соединения по отдельности или в комбинации, инокулировали одинаковым количеством инокулята штаммов микобактерий (0,6 мл суспензии с мутностью 1 по Мак-Фарланду, разбавленной 1/24). Рост бактерий визуально оценивали по мутности. Определяли МИС (минимальную ингибирующую концентрацию) каждого соединения/комбинации. МИС по определению равна минимальной концентрации лекарственного вещества, предотвращающей видимый рост популяции бактерий. Штамм считали устойчивым к лекарственному веществу/комбинации лекарственных веществ, если его рост в присутствии указанного лекарственного вещества/комбинации превышал 1% роста необработанного инокулята бактериальных клеток. МИС протестированных лекарственных веществ/комбинаций определяли посредством оценки мутности бактериальной суспензии в различных пробирках по сравнению с 1) контрольной пробиркой, не содержащей лекарственного вещества, с неразбавленным идентичным инокулятом микобактерий и 2) контрольной пробиркой, не содержащей лекарственного вещества, со 100-кратным разбавленным идентичным инокулятом микобактерий, используемым в качестве пропорционального (1/100) контроля роста. Эффекты комбинированных лекарственных веществ исследовали с использованием лекарственных веществ в концентрациях менее МИС, согласно опубликованной методологии фракционной ингибирующей концентрации (FICI) (Odds, Antimicrobiol. Chem., 2003). Вкратце, фракционную ингибирующую концентрацию лекарственного вещества А и лекарственного вещества В оценивали следующим образом:

$FIC \text{ лекарственного вещества } A = (МИС \text{ лекарственного вещества } A \text{ в комбинации}) / (МИС \text{ отдельно взятого лекарственного вещества } A);$

$FIC \text{ лекарственного вещества } B = (МИС \text{ лекарственного вещества } B \text{ в комбинации}) / (МИС \text{ отдельно взятого лекарственного вещества } B).$

Для выявления синергетической активности между лекарственным веществом А и лекарственным веществом В оценивали индекс фракционной ингибирующей концентрации (FICI) следующим образом:

$FICI = FIC \text{ лекарственного вещества } A + FIC \text{ лекарственного вещества } B.$

Если $FICI \leq 0,5$, лекарственные вещества А и В считают синергетическими. Если $FICI = 1$, совокупный эффект лекарственных веществ А и В считают аддитивным. Если $FICI \geq 4$, совокупный эффект лекарственных веществ А и В считают антагонистическим. Для способа стандартной пропорции агара (NCCLS, 2003) суспензию штамма микобактерии (мутность 1 по Мак-Фарланду) использовали для получения серии разведений от 10^{-1} до 10^{-4} , в присутствии и в отсутствие различных концентраций орлистата и ванкомицина по отдельности или в комбинации. МИС по определению была равна минимальной концентрации лекарственного вещества, ингибирующей более 99% популяции бактерий.

В третьем способе, используемом для культивирования клеток, т.е. системе BacT/Alert MP, в тестовые бутылки BacT/ALERT MP (11 мл) с добавлением 0,5 мл жидкости для восстановления вносили 0,1 мл воды (в контрольные бутылки, не содержащие лекарственного вещества) или 0,1 мл раствора лекарствен-

ного вещества/комбинации лекарственных веществ. Культуры микобактерий в возрасте менее 4 недель использовали для получения однородной суспензии, титрованной до мутности 0,5 по Мак-Фарланду. Затем одинаковый объем (0,4 мл) этой суспензии микобактерий вносили во все флаконы BacT/ALERT. 100-кратного разбавленный бактериальный инокулят вводили в контрольный флакон, не содержащий лекарственного вещества, и использовали в качестве пропорционального (1/100) контроля роста. МІС лекарственного вещества/комбинации лекарственных веществ определяли как концентрацию лекарственного вещества/комбинации лекарственных веществ в бутылки, маркированной как положительная, в то же время, что и в контрольной (1/100) бутылки. Затем исследовали эффекты протестированных лекарственных веществ в комбинации с использованием лекарственных веществ в концентрациях менее МІС согласно ранее опубликованной "x/y"-методология (David, J. Antimicrob. Chemother., 2001). Вкратце, синергию определяли как $x/y < 0,5$, где x - значение индекса роста (GI), полученное для флакона с комбинацией лекарственных веществ, а y - минимальное значение GI, полученное с любым отдельно взятым лекарственным веществом, используемым в составе тестируемой комбинации. Для системы BacT/Alert MP (Mycobacteria Process) тестируемые и контрольные бутылки инкубировали при 37°C и регистрировали значения индекса роста (GI) каждые 10 мин. При маркировке контрольного флакона (1:100) и достижении суточного значения ΔGI в контрольном флаконе (1:100), равного по меньшей мере 30, GI считывали в течение по меньшей мере 1 дополнительных суток для вычисления ΔGI за предыдущие сутки. В случае комбинации двух лекарственных веществ частное $\Delta x/\Delta y < 0,5$ указывало на усиление действия лекарственного вещества.

Результаты.

Пример 1. Эффект ванкомицина в комбинации с ритонавиром и синергетический эффект ванкомицина в комбинации с орлистатом на *Mycobacterium bovis*.

Как показано в качестве примера на фиг. 1, эксперименты, выполненные с использованием *M. bovis* БЦЖ и системы BacT/Alert MP, продемонстрировали, что комбинация ванкомицина (в концентрации 5 или 100 мкг/мл) с ритонавиром в концентрации 100 мкг/мл оказывает сильное влияние на рост микобактерий.

Результаты, полученные при использовании комбинации ванкомицина в концентрации 5 мкг/мл с орлистатом в концентрации 50 или 100 мкг/мл, также продемонстрировали сильное влияние на рост микобактерий. Контрольные условия с применением ванкомицина и ДМСО, по-видимому, не ограничивали рост микобактерий. Более того, соотношение "x/y" для 5 мкг/мл ванкомицина в комбинации с 50 мкг/мл орлистата составило приблизительно 0,037, тем самым продемонстрировав весьма значимый синергетический эффект этих двух лекарственных веществ.

Дополнительные эксперименты, показанные на фиг. 4, были выполнены с применением ванкомицина (в концентрации 5 мкг/мл) и орлистата (5, 25 и 50 мкг/мл) и привели к аналогичным результатам, т.е. синергетическому эффекту ванкомицина в комбинации с орлистатом.

С целью подтверждения обусловленности данного ингибирования роста синергетическим эффектом определили МІС и FICI способом макроразбавления. Как показано в табл. 1, МІС орлистата самого по себе составляла 5 мкг/мл и снизилась до 1,25 мкг/мл в комбинации с ванкомицином (10 мкг/мл). Таким образом, FICI составил 0,24, что подтверждает синергетическое действие ванкомицина и орлистата.

Таблица 1

Значения FICI, полученные с помощью способа Checkboard с использованием данных МІС, полученных способом макроразбавления с использованием *M. bovis* БЦЖ

Лекарственные вещества	МІС	FIC	FICI
Только ванкомицин	250		
Только орлистат	5		
Орлистат с фиксированной концентрацией 10 мкг/мл ванкомицина	0,6 - 1,25	0,184	0,24
Ванкомицин с фиксированной концентрацией 1 мкг/мл орлистата	15	0,06	

Таким образом, комбинации ванкомицина с ритонавиром или ванкомицина с орлистатом можно считать новыми терапевтическими композициями для лечения микобактериальных инфекций, тем более что эти лекарственные вещества, по-видимому, обеспечивают значительный эффект в комбинации при концентрациях менее МІС.

В частности, комбинацию ванкомицина с орлистатом можно считать мощной терапевтической композицией для лечения микобактериальных инфекций, поскольку эти лекарственные вещества, по-видимому, обеспечивают значительный синергетический эффект в комбинации при концентрациях менее МІС.

Пример 2. Синергический эффект ванкомицина в комбинации с орлистатом на *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv при использовании стандартного анализа чувствительности с разбавлением культуральной среды.

Как показано в качестве примера на фиг. 3, эксперименты, выполненные с использованием *M. tuberculosis* H37Rv согласно стандартному способу анализа чувствительности с разбавлением культураль-

ной среды, дополнительно продемонстрировали, что комбинация ванкомицина в концентрации 5 мкг/мл с орлистатом в концентрациях 6,25, 12,5, 25, 50 или 100 мкг/мл оказывает сильное влияние на рост микобактерий.

Контрольные эксперименты, выполненные с использованием ванкомицина и орлистата по отдельности, продемонстрировали, что сильные положительные эффекты, наблюдавшиеся при использовании тестируемой комбинации лекарственных веществ, были получены для значительно более низких концентраций лекарственных веществ по сравнению с MIC. Согласно оценкам, FIC орлистата составляла приблизительно 0,065, FIC ванкомицина - приблизительно 0,077, в результате чего FICI ванкомицина в комбинации с орлистатом составил 0,142 (т.е. $\leq 0,5$). Таким образом, получено подтверждение значимой синергичности комбинации ванкомицина с орлистатом, и ее можно считать новой терапевтической композицией для лечения микобактериальных инфекций, тем более что эти лекарственные вещества, по видимому, обеспечивают значительный эффект в комбинации при концентрациях менее MIC.

Пример 3. Эффект ванкомицина в комбинации с ритонавиром или симвастатином и синергетический эффект ванкомицина в комбинации с орлистатом на *Mycobacterium tuberculosis*.

Как показано в качестве примера на фиг. 2, эксперименты, выполненные с использованием *M. tuberculosis* H37Rv и системы BacT/Alert MP, продемонстрировали, что комбинация ванкомицина (в концентрации 1 или 5 мкг/мл) с орлистатом в концентрации 50 или 100 мкг/мл оказывает сильное влияние на рост микобактерий.

Более того, соотношение "x/y" для 1 мкг/мл ванкомицина в комбинации с 50 мкг/мл орлистата составило приблизительно 0,04, тем самым продемонстрировав весьма значимый синергетический эффект этих двух лекарственных веществ.

Дополнительные эксперименты, показанные на фиг. 5, были выполнены с применением ванкомицина (в концентрации 5 мкг/мл) и орлистата (5, 25 и 50 мкг/мл) и привели к аналогичным результатам, т.е. синергетическому эффекту ванкомицина в комбинации с орлистатом.

Как и в предыдущем примере, с целью подтверждения обусловленности данного ингибирования роста синергетическим эффектом определили MIC и FICI способом макроразбавления. MIC орлистата составила 50 мкг/мл при тестировании в отсутствие других агентов и снизилась до 1,25 мкг/мл в комбинации с ванкомицином (10 мкг/мл). На основании этих данных, расчет FICI продемонстрировал синергизм для орлистата с ванкомицином (табл. 2, FICI = 0,236).

Таблица 2

Значения FICI, полученные с помощью способа Checkboard с использованием данных MIC, полученных способом макроразбавления с использованием *M. tuberculosis* H37Rv

Лекарственные вещества	MIC	FIC	FICI
Только ванкомицин	200 - 100		
Только орлистат	50		
Орлистат с фиксированной концентрацией 10 мкг/мл ванкомицина	1,25 - 2,5	0,036	0,236
Ванкомицин с фиксированной концентрацией 1 мкг/мл орлистата	31	0,2	

Наконец, для подтверждения этих данных использовали способ пропорции агара NCCLS. При использовании этого способа MIC орлистата составила 5 мкг/мл и снизилась до 0,62 мкг/мл в комбинации с 2 мкг/мл ванкомицина. Checkerboard позволил рассчитать значение FICI для орлистата с ванкомицином, равное 0,37 (табл. 3).

Таблица 3

Результаты анализа чувствительности *M. tuberculosis* к лекарственным веществам (MIC), полученные способом пропорции агара NCCLS и проанализированные способом Checkboard

Лекарственные вещества	MIC	FIC	FICI
Только ванкомицин	40		
Только орлистат	5		
Орлистат с фиксированной концентрацией 2 мкг/мл ванкомицина	0,62	0,124	0,374
Ванкомицин с фиксированной концентрацией 1 мкг/мл орлистата	10	0,25	

Выявленная синергия четко указывает на то, что орлистат дестабилизировал внешнюю мембрану клеточной стенки, облегчая действие ванкомицина, и поэтому может быть активным и по отношению к штаммам с МЛУ и ШЛУ.

Более того, MIC ванкомицина в отсутствие других агентов составляла приблизительно 25 мкг/мл (Collins and Uttley, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1988, 22:857-861), что является слишком высокой концентрацией для введения пациентам, страдающим туберкулезом, и не показано среди потенциальных способов лечения туберкулеза Всемирной организации здравоохранения. Однако в настоящем документе показано, что MIC ванкомицина снижалась до 2 мкг/мл в комбинации с орлистатом. В такой концентрации ванкомицин можно применять в качестве терапевтического средства против туберкулеза.

Кроме того, сильный положительный эффект также получен при использовании комбинации 5 мкг/мл ванкомицина с 100 мкг/мл симвастатина или 5 мкг/мл ванкомицина с 10 мкг/мл ритонавира. Кон-

трольные условия с применением ванкомицина и ДМСО, по-видимому, не ограничивали рост микобактерий.

Таким образом, комбинации ванкомицина с ритонавиром, орлистатом или симвастатином можно считать новыми терапевтическими композициями для лечения микобактериальных инфекций, тем более что эти лекарственные вещества, по-видимому, обеспечивают значительный эффект в комбинации при концентрациях менее МИС. Определенные МИС ванкомицина, орлистата, ритонавира и симвастатина по отдельности составили 65, 100, 50-25 и 100-50 мкг/мл соответственно.

В частности, комбинацию ванкомицина с орлистатом можно считать мощной терапевтической композицией для лечения микобактериальных инфекций, поскольку эти лекарственные вещества, по-видимому, обеспечивают значительный синергетический эффект в комбинации при концентрациях менее МИС.

Аналогичные эксперименты были выполнены с использованием *M. tuberculosis* H37Rv и комбинации 1 мкг/мл меропенема с 50 мкг/мл или 100 мкг/мл орлистата и, необязательно, 1,25 мкг/мл амоксициллина и 0,25 мкг/мл клавуланата.

Эти эксперименты продемонстрировали, что по отношению к *M. tuberculosis* H37Rv получен синергетический эффект комбинации 1 мкг/мл меропенема с 50 или 100 мкг/мл орлистата и что указанная синергия дополнительно усиливалась в присутствии 1,25 мкг/мл амоксициллина и 0,25 мкг/мл клавуланата.

Пример 4. Синергетический ингибиторный эффект между ванкомицином и церуленином по отношению к клиническим изолятам *M. tuberculosis* с МЛУ и ШЛУ.

Потенциальное клиническое применение ванкомицина в комбинации с лекарственными веществами, мишенью которых является клеточная стенка, исследовали с использованием микобактерий и комбинации ванкомицина и церуленина, мощного ингибитора синтеза длинноцепочечных липидов (Rastogi et al., FEMS Immunol. Med. Microbiol., 1998; Parrish et al., J. Antimicrob. Chemother., 1999). Ванкомицин и церуленин комбинировали в концентрациях менее МИС и тестировали на *M. tuberculosis* H37Rv и клинических изолятах *M. tuberculosis* с МЛУ (множественной лекарственной устойчивостью) и ШЛУ (широкой лекарственной устойчивостью). Комбинация ванкомицина (10 мкг/мл) с церуленином (0,5 мкг/мл) ингибировала 99% роста клеток *M. bovis* БЦЖ (данные не показаны). Интересно, что комбинация ванкомицина (6 мкг/мл) с церуленином (1 мкг/мл) синергетически эффективно ингибировала рост 7 клинических изолятов *M. tuberculosis* с МЛУ и 3 клинических изолятов с ШЛУ, согласно рассчитанным значениям частного x/y (см. табл. 4 ниже).

Таблица 4

Синергический ингибиторный эффект между ванкомицином и церуленином по отношению к клиническим изолятам *M. tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью

Изоляты ^a	FP ^b	TN# ^c	Профиль устойчивости ^d		Синергический эффект
			Лекарственные средства первой линии	Лекарственные средства второй линии	
1	OO1	16054	INH, RIF, EMB, STR	RMC, PAS	+ (0,30)
2	BE	17182	INH, RIF	ETH, PAS	++ (0,10) (V ₃ C _{0,5})
3	W283	14178	INH, RIF, EMB, PZA, STR	KAN, CAP, RFB, PAS	+ (0,43) (V ₃ C _{0,5})
4	OO1	18048	INH, RIF, PZA, STR	RBT, RMC, PAS	+ (0,32)
5	A7	6196	INH, RIF, EMB, PZA, STR	ETH, KAN, PAS	+ (0,32)
6	P	16442	INH, RIF, PZA, STR	RMC, PAS	+ (0,20)
7	P23	16906	INH, RIF, EMB, PZA, STR	ETH, RMC, PAS	+ (0,25)
8	BE	18460	INH, RIF, EMB, STR	ETH, CYC, CIP, KAN, CAP, RFB, RMC, PAS	+++ (0,05)
9	W	2550	INH, RIF, EMB, PZA, STR	ETH, OFX, KAN, CYC, PAS	+ (0,28)
10	HD15	18985	INH, RIF, EMB, PZA, STR	CYC, CIP, OFX, KAN, AMI, CAP, RFB, RMC, PAS	+ (0,13)

^a Изоляты 8-10 представляют собой штаммы с ШЛУ.

^b FP - название "отпечатка пальцев" на основе типирования IS6110 и номенклатуры PHRI.

^c TN - номер отслеживания, уникальный идентификатор PHRI для каждого изолята.

^d Сокращения: AMI - амикацин; CAP - капреомицин; CIP - ципрофлоксацин; CYC - циклосерин; EMB - этамбутанол; ETH - этионамид; INH - изониазид; KAN - канамицин; OFX - офлоксацин; PAS - пара-аминосалициловая кислота; PZA - пипразинамид; RBT - рифабутин; RFB - рифабутин; PIF - рифампин; PIP - рифапентин; RMC - рифамицин; STR - стрептомицин.

Библиография

- Baumann et al., “Cystobactamids: Mycobacterial Topoisomerase Inhibitors Exhibiting Potent Antibacterial Activity”, 2014, *Angew Chem Int Ed Engl.*, 53(52):14605-14609;
- Camacho et al., “Analysis of the phthiocerol dimycocerosate locus of *Mycobacterium tuberculosis*. Evidence that this lipid is involved in the cell wall permeability barrier”, 2001, *J Biol Chem*, 276: 19845-54;
- Collins and Uttley, “In-vitro activity of seventeen antimicrobial compounds against seven species of mycobacteria”, 1988, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.*, 22:857-861;
- David, “Synergic activity of D-cycloserine and *b*-chloro-D-alanine against *Mycobacterium tuberculosis*”, 2001, *J. Antimicrob. Chemother.*, 47:203-206;
- Douglas JD et al., “Analogues of thiolactomycin: potential drugs with enhanced anti-mycobacterial activity”, 2002, *Microbiology*, 148: 3101-3109;
- Jackson et al., “Inactivation of the antigen 85C gene profoundly affects the mycolate content and alters the permeability of the *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope”, 1999, *Mol Microbiol*, 31(5): 1573-1587;
- Kitson et al., “Synthesis of 19-substituted geldanamycins with altered conformations and their binding to heat shock protein Hsp90”, 2013, *Nat. Chem.*, 5(4): 307-314;
- Kitson et al., “Learning from nature: advances in geldanamycin- and radicicol-based inhibitors of Hsp90”, 2013, *J Org Chem.*, 78(11): 5117-41;
- Marrakchi et al., “InhA, a target of the antituberculous drug isoniazid, is involved in a mycobacterial fatty acid elongation system, FAS-II”, 2000, *Microbiology*, 146: 289-96;
- Mathema et al., “Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights”, 2006, *Clin. Microbiol. Rev.*, 19:658-685;
- Mathys et al., “Molecular genetics of para-aminosalicylic acid resistance in clinical isolates and spontaneous mutants of *Mycobacterium tuberculosis*”, 2009, *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:2100-2109;
- Nguyen et al., “FbpA-Dependent biosynthesis of trehalose dimycolate is required for the intrinsic multidrug resistance, cell wall structure, and colonial morphology of *Mycobacterium smegmatis*”, 2005, *J Bacteriol*, 187: 6603-11;
- Odds, “Synergy, antagonism, and what the chequerboard put between them”, 2003 *Antimicrobiol. Chem.*, 52 (1): 1;
- Onwueme et al., “The dimycocerosate ester polyketide virulence factors of mycobacteria”, 2005, *Progress in Lipid Research* 44: 259-302;
- Parrish et al., “Antimycobacterial activity of cerulenin and its effects on lipid biosynthesis”, 1999, *J. Antimicrob. Chemother.*, 43:219-226;
- Portevin et al., “A polyketide synthase catalyzes the last condensation step of mycolic acid biosynthesis in mycobacteria and related organisms”, 2004, *PNAS* 101(1): 314-9;

Rastogi et al., "Synergistic activities of antituberculous drugs with cerulenin and trans-cinnamic acid against *Mycobacterium tuberculosis*", 1998, FEMS Immunol. Med. Microbiol., 21:149-157;

Singh et al., "Comparative evaluation of Löwenstein-Jensen proportion method, BacT/ALERT 3D system, and enzymatic pyrazinamidase assay for pyrazinamide susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*", 2007, J. Clin. Microbiol., 45: 76-80;

Takayama et al., "Pathway to synthesis and processing of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*", 2005, Clin. Microbiol. Reviews, 18(1):81-101;

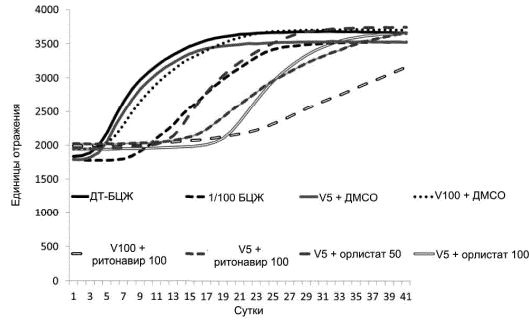
Tortoli et al., "Comparison of *Mycobacterium tuberculosis* susceptibility testing performed with BACTEC 460TB (Becton Dickinson) and MB/BacT (Organon Teknika) systems", 2000, Diagn Microbiol Infect Dis., 38:83-86;

Warrier et al., "Antigen 85C inhibition restricts *Mycobacterium tuberculosis* growth through disruption of cord factor biosynthesis", 2012, Antimicrob Agents Chemother., 56(4):1735-43;

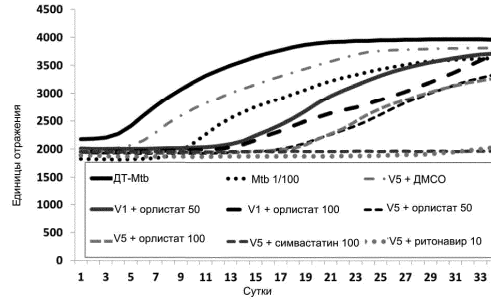
Werngren et al., "Evaluation of a novel kit for use with the BacT/ALERT 3D system for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*", 2006, J. Clin. Microbiol., 44: 2130-2132.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

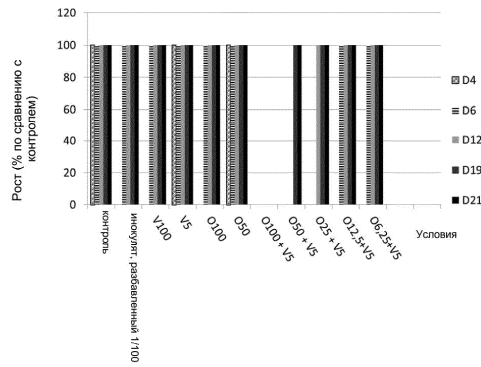
1. Комбинация, содержащая ванкомицин и орлистат в эффективных количествах для лечения микобактериальной инфекции.
2. Комбинация по п.1, дополнительно содержащая по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент.
3. Комбинация по п.1 или 2, дополнительно содержащая по меньшей мере один дополнительный потенцирующий агент.
4. Комбинация по п.3, характеризующаяся тем, что указанный по меньшей мере один дополнительный потенцирующий агент выбран из группы, включающей пенициллины, аминопенициллины, цефтаролин, имипенем, темоциллин, азтреонам, тазобактам или Novoxel, телитромицин, пиперациллин и циластатин.
5. Комбинация по п.3 или 4, содержащая клавуланат и/или ампициллин в качестве дополнительного потенцирующего агента.
6. Комбинация по любому из пп.3-5, содержащая амоксициллин и клавуланат в качестве дополнительных потенцирующих агентов.
7. Фармацевтическая композиция, содержащая ванкомицин и орлистат и одно или более из фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ, для лечения микобактериальной инфекции.
8. Набор компонентов, содержащий ванкомицин и орлистат по любому из пп.1-6, для лечения микобактериальной инфекции.
9. Набор компонентов по п.8, дополнительно содержащий по меньшей мере один дополнительный потенцирующий агент по любому из пп.3-6 в одном или в отдельных флаконах вместе с подходящими фармацевтическими вспомогательными веществами, причем ванкомицин и орлистат и необязательно по меньшей мере один дополнительный потенцирующий агент растворены или суспендированы в приемлемом носителе, предпочтительно водном носителе.
10. Применение комбинации по любому из пп.1-6, фармацевтической композиции по п.7 или набора компонентов по п.8 или 9 в качестве медикамента для лечения микобактериальной инфекции.
11. Применение по п.10, характеризующееся тем, что указанная микобактериальная инфекция представляет собой туберкулез.



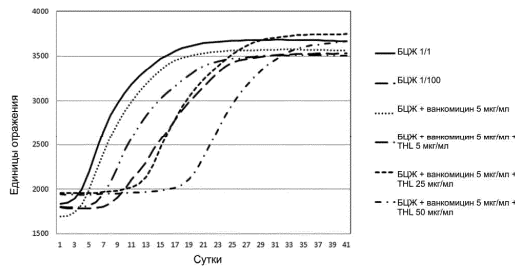
Фиг. 1



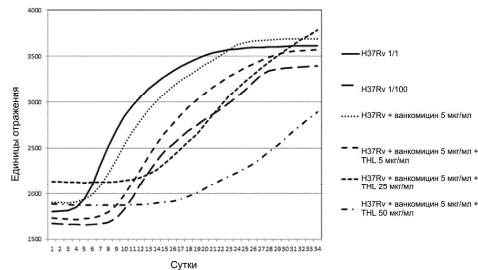
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5

