

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202291989** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.01.18

(51) Int. Cl. *A61K 31/431* (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.12.22

(54) **ЛЕЧЕНИЕ МИКРОБНОГО ДИСБИОЗА**

(31) 62/952,874; 62/958,979

(32) 2019.12.23; 2020.01.09

(33) US

(86) PCT/US2020/066656

(87) WO 2021/133821 2021.07.01

(71) Заявитель:
ЭНТАСИС ТЕРАПЕУТИКС, ИНК.
(US)

(72) Изобретатель:

Иер Рамкумар, Шапиро Адам, Мусса
Самир (US)

(74) Представитель:

Костюшенкова М.Ю., Христофоров
А.А., Угрюмов В.М., Прищепный С.В.,
Гизатуллина Е.М., Строкова О.В.,
Гизатуллин Ш.Ф., Джермакян Р.В.
(RU)

(57) В настоящем изобретении предлагаются способы применения темоциллина для контроля микробного дисбиоза, возникающего в определенных случаях из-за чрезмерного роста энтеробактерий, такого как чрезмерный рост адгезивно-инвазивной *E.coli* (AIEC). В настоящем изобретении рассматриваются способы применения темоциллина для лечения кишечных нарушений и их симптомов, вызванных микробным дисбиозом, а также других нарушений.

A1

202291989

202291989

A1

ЛЕЧЕНИЕ МИКРОБНОГО ДИСБИОЗА

ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Эта заявка испрашивает приоритет в отношении предварительной заявки США № 62/952 874, поданной 23 декабря 2019 г., полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] Желудочно-кишечный тракт человека (ЖКТ) содержит сложную и динамичную популяцию размером более 100 триллионов микроорганизмов. Совокупность бактерий, архей и эукариот, колонизирующих ЖКТ, известна как микробиота кишечника. Микробиота кишечника устанавливает сложные и взаимовыгодные отношения с организмом хозяина, *т.е.*, человеком-носителем, и обеспечивает много полезных свойств благодаря множеству физиологических функций, таких как укрепление целостности кишечника, формирование кишечного эпителия, сбор энергии, защита от патогенов и регулирование иммунитета хозяина. С появлением современных технологий стало очевидным влияние микробиоты кишечника на различные кишечные и внекишечные состояния. См., *например*, Schroeder *et al.*, Nat. Med. 22, 1079–1089 and Chang *et al.*, Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol. 30, 3–15.

[0003] Микробный дисбиоз (также называемый дисбактериозом) представляет собой термин, который относится к нарушению или дисбалансу нормального содержания микробиома в желудочно-кишечном тракте. Этот дисбаланс может быть связан с приобретением или потерей одного или большего количества микробов с функциями, вредными для организма хозяина, или с потерей одного или большего количества микробов с полезными для организма хозяина функциями. В любом случае, если его не лечить, дисбиоз может способствовать множеству патологических состояний, начиная от кишечных нарушений (*например*, синдром раздраженного кишечника, болезнь Крона, диарея путешественников, колит, язвенный колит и дивертикулит) и заканчивая нарушениями развития нервной системы. См., *например*, Guinane *et al.*, 2013, Therap Adv Gastroenterol. 6, 295–308.

[0004] У пациентов с кишечными нарушениями, возникающими в результате микробного дисбиоза, наблюдались более высокие популяции протеобактерий, таких как Enterobacteriaceae. См., *например*, Zeng *et al.*, Mucosal Immunol. 2017 Jan; 10(1): 18–26 и Serino J Mol Biol. 2018 Mar 2;430(5):581-590. В частности, недавно полученные данные свидетельствуют о том, что нарушение микробного сообщества способствует появлению адгезивно-инвазивной *E. coli* (AIEC) которая может увеличивать частоту и тяжесть воспаления кишечника в контексте болезни Крона и язвенного колита (см. BioMed Research International, Vol. 2014, Article ID 567929, 16 стр.), а также играет роль в патогенезе колоректального рака и кишечных заболеваний у животных. См., *например*, Rahmouni *et al.*, Gut Pathogens 2018, 10:23. Два фило типа AIEC (B2 и D) были описаны как более распространенные у пациентов с IBD (см. PLoS One, 2019, 14(4): e0216165 и Gut, 2007, 56:669-675).

[0005] AIEC влияют на процессы в клетке-хозяине, такие как синтез белка, передача сигнала, клеточное деление, секреция ионов, транскрипция, функция цитоскелета и функция митохондрий. Они особенно трудно поддаются лечению и способны прикрепляться к слизистой оболочке кишечника путем связывания с молекулами адгезии клеток, родственными карциноэмбриональному антигену 6 (CEACAM6), проникать в эпителиальные клетки кишечника с помощью актиновых микрофиламентов и микротрубочек клетки-хозяина, реплицироваться внутриклеточно, перемещаться через кишечный барьер человека и проникать в более глубокие ткани. AIEC также способны выживать в макрофагах, стимулировать продукцию TNF- α и способствовать гранулематозному воспалительному ответу.

ЛЕЧЕНИЕ МИКРОБНОГО ДИСБИОЗА

ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Эта заявка испрашивает приоритет в отношении предварительной заявки США № 62/952 874, поданной 23 декабря 2019 г., и предварительной заявки США № 62/958 979, поданной 9 января 2020 г., полное содержание каждой из которых включено в данный документ посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] Желудочно-кишечный тракт человека (ЖКТ) содержит сложную и динамичную популяцию размером более 100 триллионов микроорганизмов. Совокупность бактерий, архей и эукариот, колонизирующих ЖКТ, известна как кишечная микробиота. Микробиота кишечника устанавливает сложные и взаимовыгодные отношения с организмом хозяина, *т.е.*, человеком-носителем, и обеспечивает много полезных свойств благодаря множеству физиологических функций, таких как укрепление целостности кишечника, формирование кишечного эпителия, сбор энергии, защита от патогенов и регулирование иммунитета хозяина. С появлением современных технологий стало очевидным влияние микробиоты кишечника на различные кишечные и внекишечные состояния. См., например, Schroeder *et al.*, *Nat. Med.* 22, 1079-1089 и Chang *et al.*, *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 30, 3-15.

[0003] Микробный дисбиоз (также называемый дисбактериозом) представляет собой термин, который относится к нарушению или дисбалансу нормального содержания микробиома в желудочно-кишечном тракте. Этот дисбаланс может быть связан с приобретением или потерей одного или большего количества микробов с функциями, вредными для организма хозяина, или с потерей одного или большего количества микробов с полезными для организма хозяина функциями. В любом случае, если его не лечить, дисбиоз может способствовать множеству патологических состояний, начиная от кишечных нарушений (*например*, синдром раздраженного кишечника, болезнь Крона, диарея путешественников, колит, язвенный колит и дивертикулит) и заканчивая нарушениями развития нервной системы. См., например, Guinane *et al.*, 2013, *Therap Adv Gastroenterol.* 6, 295-308.

[0004] У пациентов с кишечными нарушениями, возникающими в результате микробного дисбактериоза, наблюдались более высокие популяции протеобактерий, таких как Enterobacteriaceae. См., например, Zeng *et al.*, *Mucosal Immunol.* 2017 Jan; 10(1): 18-26 и Serino *J Mol Biol.* 2018 Mar 2;430(5):581-590. В частности, недавно полученные данные свидетельствуют о том, что нарушение микробного сообщества способствует появлению адгезивно-инвазивной *E. coli* (AIEC) которая может увеличивать частоту и тяжесть воспаления кишечника в контексте болезни Крона и язвенного колита (см. *BioMed Research International*, Vol. 2014, Article ID 567929, 16 стр.), а также играет роль в патогенезе колоректального рака и кишечных заболеваний у животных. См. также Rahmouni *et al.*, *Gut Pathogens* 2018, 10:23. Два фило типа AIEC (B2 и D) были описаны как более распространенные у пациентов с IBD (см. *PLoS One*, 2019, 14(4): e0216165 и *Gut*, 2007, 56:669-675).

[0005] AIEC влияют на процессы в клетке-хозяине, такие как синтез белка, передача сигнала, клеточное деление, секреция ионов, транскрипция, функция цитоскелета и функция митохондрий. Они особенно трудно поддаются лечению и способны прикрепляться к слизистой оболочке кишечника путем связывания с молекулами адгезии клеток, родственными карциноэмбриональному антигену 6 (CEACAM6), проникать в эпителиальные клетки кишечника с помощью актиновых микрофиламентов и микротрубочек клетки-хозяина, реплицироваться внутриклеточно, перемещаться через кишечный барьер человека и проникать в более глубокие ткани. AIEC также способны выживать в макрофагах, стимулировать продукцию TNF- α и способствовать гранулематозному воспалительному ответу.

[0006] Из-за их переизбытка при микробном дисбиозе, инвазивности и отсутствия чувствительности к различным антибиотикам (см. Dogan *et al.*, Inflamm Bowel Dis. 2013 Jan;19(1):141-50., возникающих последствий, ассоциированных с кишечными и другими нарушениями, необходимо контролировать чрезмерный рост АИЕС.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0007] В настоящее время обнаружено, что темоциллин является эффективным модулятором чрезмерного роста адгезивно-инвазивной *E. coli* (АИЕС) и в некоторых случаях действует лучше, чем ципрофлоксацин, внесенный в существующий стандарт лечения. См., например, **Фиг. 1**, которая демонстрирует, что темоциллин был эффективен в снижении нагрузки АИЕС в желудочно-кишечном тракте мышей, и в **Таблице 1**, где представлены данные, показывающие более низкие значения МИС для темоциллина (МИС₅₀ = 4 или 8 мкг/мл), чем для ципрофлоксацина (МИС₅₀ >8 мкг/мл) против штаммов АИЕС *in vitro*.

[0008] В другом аспекте было обнаружено, что темоциллин мало или совсем не влияет на нормальную флору желудочно-кишечного тракта, например, было определено, что он щадит микробиом по меньшей мере относительно Firmicutes, Actinobacteria и Bacteroidetes. Этот механизм отличается от действия ципрофлоксацина, рифаксимина и метронидазола, каждый из которых обладал широкой мощной антибактериальной активностью в отношении Firmicutes, Actinobacteria и Bacteroidetes. См., например, **Таблицу 2**. Это еще одно дополнительное преимущество лечения темоциллином, заключающееся в том, что он не вызывает значительной встревоженности относительно отсутствия восстановления нормальной здоровой флоры.

[0009] В другом аспекте было обнаружено, что темоциллин более эффективен в снижении вероятности рецидива чрезмерного роста АИЕС после лечения. См., например, **Фиг. 1**, где уровень роста бактерий АИЕС оставался низким в течение по меньшей мере 7 дней после воздействия темоциллином. Ципрофлоксацин, однако, продемонстрировал эффект рикошета. См., например, **Фиг. 1**.

[0010] Таким образом, в настоящем изобретении предлагается применение темоциллина или его фармацевтически приемлемой соли для лечения микробного дисбиоза.

[0011] Также в настоящем изобретении предлагается применение темоциллина или его фармацевтически приемлемой соли для лечения кишечного нарушения у субъекта, страдающего микробным дисбиозом.

[0012] Также предлагаются способы модулирования чрезмерного роста энтеробактерий (например, избыточного роста АИЕС) у субъекта, страдающего микробным дисбиозом или кишечным нарушением, или и тем, и другим.

[0013] Также в настоящем изобретении предлагаются способы лечения одного или большего количества симптомов, ассоциированных с микробным дисбиозом.

[0014] Кроме того, в настоящем изобретении предлагаются способы лечения одного или большего количества симптомов нарушения, вызванного микробным дисбиозом.

[0015] В одном аспекте вышеупомянутый микробный дисбиоз вызывается чрезмерным ростом энтеробактерий (*например*, чрезмерным ростом АИЕС). Другие применения темоциллина и дополнительные аспекты подробно описаны ниже.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0016] **Фиг. 1** демонстрирует log₁₀ бактериальную нагрузку в фекалиях *относительно* количества дней, полученную из модельного исследования деколонизации АИЕС в ЖКТ мышей с применением

темоциллина и ципрофлоксацина.

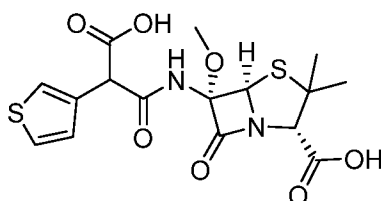
[0017] **Фиг. 2А** демонстрирует количество OTU (показатель обогащения), полученных в результате измерения состояния микробиома после лечения темоциллином и ципрофлоксацином у мышей.

[0018] **Фиг. 2В** демонстрирует энтропийный индекс Шеннона (показатель разнообразия), полученный в результате измерения состояния микробиома после лечения темоциллином и ципрофлоксацином у мышей.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

А. Определения

[0019] В контексте данного документа темоциллин относится к соединению, имеющему формулу:



Если не указано иное, темоциллин включает стереоизомер, изображенный выше, а также все другие возможные стереоизомеры и смеси стереоизомеров. Однако в одном аспекте, описанные в данном документе применения относятся к изображенному стереоизомеру 2*S*,5*R*,6*S* со стереохимическим обогащением или молярным избытком по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%.

[0020] Enterobacteriaceae включают, помимо прочего, *Escherichia coli* (*E. coli*), *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella* и *Yersinia pestis*.

[0021] В контексте данного документа АИЕС относится к адгезивно-инвазивной *E. coli*. В одном аспекте АИЕС могут прикрепляться к культивируемым эпителиальным клеткам кишечника и проникать в них, выживать и размножаться в макрофагах без экспрессии факторов вирулентности или генов, ассоциированных с диареогенными патотипами *E. coli* и уропатогенными *E. coli* (UPEC). В одном аспекте характеристики АИЕС включают, помимо прочего, (i) способность прикрепляться к эпителиальным клеткам кишечника и проникать в них, (ii) способность выживать и активно размножаться в макрофагах, не вызывая гибели клеток-хозяев, (iii) вызывают значительно повышенную экспрессию TNF-альфа и цитокинов, (iv) отсутствие традиционных механизмов вирулентности/инвазии типа III, связанных с известными инвазивными детерминантами. См., например, J Crohns Colitis. 2015 May;9(5):410-20; Lab Invest. 2012 Mar;92(3):411-9; и Lab Invest. 2012 Mar;92(3):411-9. Характеризация АИЕС может быть выполнена с помощью обычных процедур, известных специалисту в данной области техники, или процедур (например, анализ адгезии, анализ инвазии и анализ генотипирования вирулентности), описанных в Rehmouni et al., Gut Pathogens, 2018, 10:23.

[0022] Термин «кишечные нарушения» относится к состояниям или заболеваниям, которые возникают в кишечнике или поражают его. Кишечные нарушения включают, помимо прочего, синдром раздраженного кишечника (IBS) (например, синдром раздраженного кишечника, ассоциированный с диареей (d-IBS), синдром раздраженного кишечника с запором (c-IBS), синдром раздраженного кишечника с чередованием запоров и диареи), болезнь Крона, диарею путешественников, колит, язвенный колит и дивертикулит.

[0023] В контексте данного документа термины «субъект» и «пациент» могут использоваться взаимозаменяемо и означают млекопитающее, нуждающееся в лечении, например, домашние животные (например, собаки, кошки и т. п.), сельскохозяйственные животные (например, коровы, свиньи, лошади,

овцы, козы и т. п.) и лабораторные животные (*например*, крысы, мыши, морские свинки и т. п.). Как правило, субъектом является человек, нуждающийся в лечении.

[0024] В контексте данного документа термин «воздействие» или «лечение» относится к достижению необходимого фармакологического и/или физиологического эффекта. Эффект может быть терапевтическим, что включает достижение, частично или по существу, одного или большего количества из следующих результатов: частичное или полное снижение степени тяжести заболевания, нарушения или синдрома; нормализацию или улучшение клинического симптома или показателя, ассоциированного с нарушением; или замедление, ингибирование или уменьшение вероятности прогрессирования заболевания, нарушения или синдрома. В одном аспекте, лечение также можно продолжать после устранения симптомов, например, для предотвращения или замедления возникновения их рецидива. «Воздействие» или «лечение» также относится к ингибированию и/или замедлению возникновения рецидива инфекции или симптомов инфекции.

[0025] В контексте данного документа термин «модулировать» означает уменьшение, ингибирование, контролирование, купирование или поддержание.

[0026] Конкретная доза и схема лечения для любого отдельного пациента будут зависеть от множества факторов, включая активность конкретно применяемого соединения, возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол, диету, время введения, скорость выделения, комбинацию лекарственных средств и суждение лечащего врача, а также степень тяжести конкретного заболевания, которое подвергается лечению. Однако в одном аспекте, темоциллин, описанный в настоящих способах, вводят в «эффективном количестве» или «терапевтически эффективном количестве». Это относится к количеству темоциллина, которое вызовет биологический или клинический ответ субъекта, например, доза от 0,01 до 100 мг/кг массы тела/день.

[0027] В определенных аспектах темоциллин, описанный в настоящих способах, можно вводить перорально, местно, ректально, назально, трансбуккально или через имплантированный резервуар. В контексте данного документа термин «парентеральный» включает подкожную, внутривенную, внутримышечную, внутрисуставную, интрасиновиальную, интрастернальную, интратекальную, внутривенную, внутриочаговую и внутричерепную инъекцию или инфузионные методики. В некоторых вариантах осуществления темоциллин, описанный в настоящих способах, вводят перорально или ректально. В одном аспекте темоциллин, описанный в настоящих способах, вводят перорально.

[0028] Темоциллин, описанный в настоящих способах, может быть составлен таким образом, чтобы обеспечить быстрое, продолжительное или отсроченное высвобождение темоциллина после введения пациенту с применением процедур, известных в данной области техники. В одном аспекте темоциллин, описанный в настоящих способах, готовят в виде пероральной композиции с отсроченным высвобождением.

[0029] Соли темоциллина, описанные в данном документе, относятся к нетоксичным «фармацевтически приемлемым солям». Фармацевтически приемлемые солевые формы включают фармацевтически приемлемые кислые/анионные или основные/катионные соли. Пригодные фармацевтически приемлемые кислотные-аддитивные соли включают, например, соли неорганических кислот (таких как соляная кислота, бромистоводородная, фосфорная, азотная и серная кислоты) и органических кислот (таких как уксусная кислота, бензолсульфокислота, бензойная, метансульфокислота и *p*-толуолсульфокислота). Пригодные фармацевтически приемлемые основные соли включают, например, соли аммония, соли щелочных металлов (такие как соли натрия и калия) и соли щелочноземельных металлов (такие как соли магния и кальция). В одном аспекте фармацевтически приемлемая соль представляет собой натриевую соль.

[0030] Термин «чрезмерный рост» применяют, когда речь идет об увеличении количества одной или более бактерий, превышающем ожидаемое у здоровых людей, придерживающихся типичной западной диеты.

В. Применения

[0031] В первом варианте осуществления настоящего изобретения предлагается способ модулирования (например, снижения) микробного дисбиоза у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение указанному субъекту эффективного количества темоциллина или его фармацевтически приемлемой соли. В одном аспекте микробный дисбиоз по первому варианту осуществления вызывается чрезмерным ростом энтеробактерий, например, чрезмерным ростом АИЕС.

[0032] Во втором варианте осуществления настоящего изобретения предлагается способ лечения кишечного нарушения у субъекта, страдающего микробным дисбиозом, включающий введение указанному субъекту эффективного количества темоциллина или его фармацевтически приемлемой соли. В одном аспекте микробный дисбиоз по второму варианту осуществления вызывается чрезмерным ростом энтеробактерий, например, чрезмерным ростом АИЕС.

[0033] В третьем варианте осуществления настоящего изобретения предлагается способ уменьшения одного или большего количества из следующих симптомов: воспаления, диареи, лихорадки, утомляемости, болей и спазмов в животе, потери веса и анемии у субъекта, страдающего микробным дисбиозом, включающий введение указанному субъекту эффективного количества темоциллина или его фармацевтически приемлемой соли. В одном аспекте микробный дисбиоз по третьему варианту осуществления вызывается чрезмерным ростом энтеробактерий, например, чрезмерным ростом АИЕС.

[0034] В четвертом варианте осуществления настоящего изобретения предлагается способ уменьшения одного или большего количества из следующих симптомов: воспаления, диареи, лихорадки, утомляемости, болей и спазмов в животе, потери веса и анемии у субъекта с кишечным нарушением, который также имеет микробный дисбиоз, при этом указанный способ включает введение указанному субъекту эффективного количества темоциллина или его фармацевтически приемлемой соли. В одном аспекте микробный дисбиоз по четвертому варианту осуществления вызывается чрезмерным ростом энтеробактерий, например, чрезмерным ростом АИЕС.

[0035] Во пятом варианте осуществления настоящего изобретения предлагается способ лечения кишечного нарушения у субъекта, имеющего чрезмерный рост адгезивно-инвазивной *E. coli* (АИЕС) в кишечнике, включающий введение указанному субъекту эффективного количества темоциллина или его фармацевтически приемлемой соли. В одном аспекте кишечное нарушение по пятому варианту осуществления выбирают из синдрома раздраженного кишечника (IBS) (например, синдрома раздраженного кишечника, ассоциированного с диареей (d-IBS), синдрома раздраженного кишечника с запором (c-IBS), синдрома раздраженного кишечника с чередованием запоров и диарей), болезни Крона, диарей путешественников, колит, язвенного колита и дивертикулита. В одном аспекте кишечное нарушение по пятому варианту осуществления представляет собой болезнь Крона.

[0036] В шестом варианте осуществления настоящего изобретения предлагается способ модулирования (например, снижения) чрезмерного роста адгезивно-инвазивной *E. coli* (АИЕС) у субъекта, нуждающегося в этом, включающий этап введения указанному субъекту эффективного количества темоциллина или его фармацевтически приемлемой соли. В одном аспекте чрезмерный рост АИЕС в шестом варианте осуществления происходит в кишечнике субъекта. В одном аспекте субъект по шестому варианту осуществления страдает кишечным нарушением. В одном аспекте субъект по шестому варианту

осуществления имеет кишечное нарушение и чрезмерный рост АИЕС в кишечнике. В одном аспекте субъект по шестому варианту осуществления имеет кишечное нарушение, выбранное из следующих патологических состояний: синдром раздраженного кишечника (IBS) (например, синдром раздраженного кишечника, ассоциированный с диареей (d-IBS), синдром раздраженного кишечника с запором (c-IBS), синдром раздраженного кишечника с чередованием запоров и диареи), болезнь Крона, диарея путешественников, колит, язвенный колит и дивертикулит. В одном аспекте субъект по шестому варианту осуществления имеет кишечное нарушение, выбранное из следующих патологических состояний: синдром раздраженного кишечника (IBS) (например, синдром раздраженного кишечника, ассоциированный с диареей (d-IBS), синдром раздраженного кишечника с запором (c-IBS), синдром раздраженного кишечника с чередованием запоров и диареи), болезнь Крона, диарея путешественников, колит, язвенный колит и дивертикулит, а также имеет чрезмерный рост АИЕС в кишечнике. В одном аспекте субъект по шестому варианту осуществления имеет болезнь Крона. В одном аспекте субъект по шестому варианту осуществления имеет болезнь Крона и чрезмерный рост АИЕС в кишечнике. В одном аспекте субъект по шестому варианту осуществления имеет кишечное нарушение, выбранное из следующих патологических состояний: синдром раздраженного кишечника (IBS) (например, синдром раздраженного кишечника, ассоциированный с диареей (d-IBS), синдром раздраженного кишечника с запором (c-IBS), синдром раздраженного кишечника с чередованием запоров и диареи), болезнь Крона, диарея путешественников, колит, язвенный колит, резервуарный илеит и дивертикулит. В одном аспекте субъект по шестому варианту осуществления имеет кишечное нарушение, выбранное из следующих патологических состояний: синдром раздраженного кишечника (IBS) (например, синдром раздраженного кишечника, ассоциированный с диареей (d-IBS), синдром раздраженного кишечника с запором (c-IBS), синдром раздраженного кишечника с чередованием запоров и диареи), болезнь Крона, диарея путешественников, колит, язвенный колит, резервуарный илеит и дивертикулит, а также имеет чрезмерный рост АИЕС в кишечнике.

[0037] В седьмом варианте осуществления настоящего изобретения предлагается способ уменьшения воспаления кишечника, вызванного чрезмерным ростом адгезивно-инвазивной *E. coli* (АИЕС) у нуждающегося в этом субъекта (например, страдающего болезнью Крона), включающий этап введения указанному субъекту эффективного количества темоциллина или его фармацевтически приемлемой соли.

[0038] В восьмом варианте осуществления настоящего изобретения предлагается способ уменьшения одного или большего количества из следующих симптомов: диареи, лихорадки, утомляемости, болей и спазмов в животе, потери веса и анемии у субъекта, имеющего болезнь Крона, включающий пероральное введение указанному субъекту эффективного количества темоциллина или его фармацевтически приемлемой соли. В одном аспекте субъект по восьмому варианту осуществления имеет чрезмерный рост адгезивно-инвазивной *E. coli* (АИЕС) в кишечнике.

[0039] В девятом варианте осуществления, субъекту согласно описанным способам вводят фармацевтически приемлемую соль темоциллина.

[0040] В десятом варианте осуществления темоциллин или его фармацевтически приемлемая соль, описанные в настоящих способах, вводят перорально.

[0041] В одиннадцатом варианте осуществления способы, описанные в настоящем документе, ингибируют чрезмерный рост Enterobacteriaceae (например, чрезмерный рост АИЕС) без ингибирования роста бактерий из Firmicutes или Actinobacteria, или обоих.

[0042] В двенадцатом варианте осуществления введение темоциллина снижает вероятность рецидива чрезмерного роста Enterobacteriaceae (например, чрезмерного роста АИЕС) в течение по меньшей мере 7

дней после лечения.

[0043] Настоящее изобретение можно дополнительно понять со ссылкой на следующие типовые примеры, которые предназначены для иллюстрации неограничивающих вариантов осуществления изобретения.

ПРИВЕДЕНИЕ ПРИМЕРА

Общие способы

[0044] Динатриевая соль темоциллина была приобретена у компании BOC Sciences (45-16 Ramsey Road, Ширли, 11967 штат Нью-Йорк, США) и у Bellen Chemistry (1 Caida, 3rd Street MaoHua Garden, Пекин, Китай 101300) и представляла собой смесь 2 диастереомеров (R, S) в соотношении (60, 40). Гидрохлорид ципрофлоксацина был получен от USP-U.S. (Роквилл, штат Мэриленд, США). Темоциллин для всех тестирований *in vivo* и *in vitro* растворяли в 0,9% хлориде натрия, а растворителем ципрофлоксацина была вода. Штаммы адгезивно-инвазивной *E. coli* (AIEC) были приобретены в Thomas S. Whittam STEC Center (194 Food Safety and Toxicology, Университет штата Мичиган, MIC 48824).

Пример 1

[0045] **Активность темоциллина в отношении AIEC**

[0046] Антибактериальную активность темоциллина тестировали в отношении AIEC и сравнивали с ципрофлоксацином. Вкратце, темоциллин или ципрофлоксацин дважды разводили и инкубировали с соответствующим штаммом в 96-луночных стерильных полистироловых микропланшетах при 35 °C. Планшеты считывали визуально через 16-18 часов инкубации для определения значений минимальной ингибирующей концентрации (MIC). Как продемонстрировано в **Таблице 1**, темоциллин эффективен в дозе 4–8 мкг/мл *относительно* по меньшей мере 50 % протестированных клинических изолятов AIEC при болезни Крона и сохраняет антибактериальную активность *относительно* изолятов, устойчивых к ципрофлоксацину.

Таблица 1

Изоляты AIEC при болезни Крона	#14	#32	#40	#51	#35	#49
Соединение	MIC, мкг/мл					
Темоциллин	16	4	8	8	16	4
Ципрофлоксацин	>8	>8	>8	>8	>8	8

Пример 2

[0047] **Исследование на мышинной модели деколонизации с применением темоциллина и ципрофлоксацина**

[0048] Исследования на мышинной модели деколонизации GI AIEC проводили с использованием описанной ранее мышинной модели в качестве основы и осуществляли в соответствии с этическими принципами исследований на животных во внешней исследовательской организации по контракту. Здоровым мышам C57BL/6J сначала вводили стрептомицин через пероральный желудочный зонд. Штамм AIEC (филотип D) затем вводили в дозе приблизительно $1-5 \times 10^6$ КОЕ на мышь через пероральный желудочный зонд, и учитывали фекальные гранулы относительно нагрузки AIEC. После стабильной колонизации (обычно через 48 ч после введения AIEC) мышей разделяли на три группы по 4 животных в каждой. Одной группе вводили ципрофлоксацин, а другой вводили темоциллин перорально через

желудочный зонд (оба по 30 мг/кг). Третья группа была контрольной и получала эквивалентный объем стерильного физиологического раствора через пероральный зонд. Фекальные гранулы извлекали в разное время, как продемонстрировано на оси X на Фиг. 1, и нагрузку АИЕС определяли количественно путем разбавления и посева. Для достаточной достоверности данных из каждой мыши на группу две извлекали последовательные фекальные гранулы.

[0049] Темоциллин был эффективен в снижении нагрузки АИЕС в желудочно-кишечном тракте мышей и действовал так же, как и антибиотик, включенный в существующий стандарт лечения, ципрофлоксацин (Фиг. 1). Особое значение имеет то, что темоциллин был эффективен в поддержании низкой нагрузки АИЕС в течение нескольких дней после прекращения лечения, тогда как у мышей, получавших ципрофлоксацин, эффект «отскока» начинался на день 7 после прекращения лечения (Фиг. 1). Это подтверждает способность темоциллина снижать вероятность повторного чрезмерного роста АИЕС после лечения.

Пример 3

[0050] **Сохраняющая микробном природа темоциллина**

[0051] Представителей анаэробных комменсалов кишечника человека, принадлежащих к 3 основным типам, Firmicutes, Actinobacteria и Bacteroidetes, тестировали в стандартных антибактериальных анализах с разведением агара, проводимых в анаэробных условиях. Работа была выполнена внешней микробиологической исследовательской организацией по контракту, и результаты представлены в Таблице 2. Firmicutes и Actinobacteria являются частью здоровой микрофлоры кишечника человека, и их уровни снижены у пациентов с болезнью Крона. Как продемонстрировано, темоциллин мало влияет (МИС >256 мкг/мл) на некоторые Firmicutes, Actinobacteria и Bacteroidetes.

Таблица 2

Firmicutes	МИС, мкг/мл			
	Темоциллин	Ципрофлоксацин	Рифаксимин	Метронидазол
<i>MMX 1722 Lactobacillus casei</i>	>256	1	0,25	>64
<i>MMX 6660 Streptococcus intermedius</i>	>256	1	0,5	>64
<i>ATCC 23272 Lactobacillus reuteri</i>	>256	32	0,06	>64
<i>MMX 9797 Clostridium innocuum</i>	>256	4	>32	1
Actinobacteria				
<i>ATCC 15702 Bifidobacterium infantis</i>	>256	4	0,125	8
<i>ATCC 25986 Collinsella aerofaciens</i>	>256	0,5	≤0,03	1
<i>MMX 10069 Bifidobacterium adolescentis</i>	>256	32	0,5	8
Bacteroidetes				
<i>ATCC 12290 Bacteroides thetaiotaomicron</i>	>256	1	≤0,03	0,25
<i>MMX 9711 Bacteroides salyersiae</i>	>256	16	0,5	2
<i>MMX 3478 Bacteroides fragilis</i>	256	16	0,25	8
Proteobacteria				
Пациент с болезнью Крона #32 АИЕС	4	>8	н/д	н/д
Пациент с болезнью Крона #40 АИЕС	8	>8	н/д	н/д

<i>Пациент с болезнью Крона #49 АИЕС</i>	4	8	н/д	н/д
<i>Пациент с болезнью Крона #51 АИЕС</i>	8	>8	н/д	н/д

Пример 4

[0052] Измерение состояния микробиома после лечения темоциллином и цiproфлоксацином у мышей

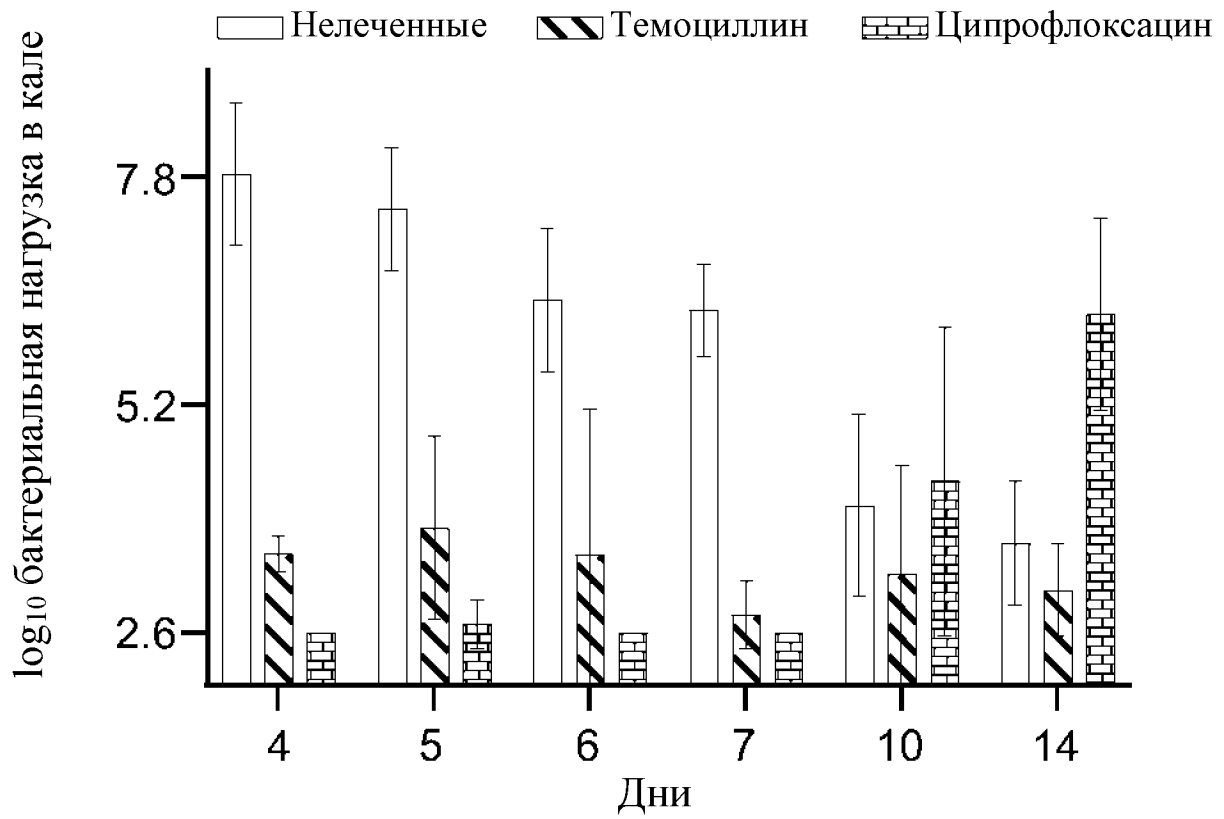
[0053] Мышам вводили 30 мг/кг (через пероральный зонд) либо темоциллина, либо цiproфлоксацина. Дозу вводили один раз в день в течение 3 дней подряд после стабильной колонизации ЖКТ АИЕС. Фекальные гранулы от четырех мышей (1-2 на мышь) объединяли, подвергали обогащению бактериальной ДНК и анализировали с помощью Illumina MiSeq 2. Численность и разнообразие бактерий определяли количественно с применением данных секвенирования гена 16S rРНК, анализировали и сравнивали с интактными мышами. Показатели обогщения (Фиг. 2А, количество OTU, $p < 0,05$) и разнообразия (Фиг. 2В, индекс Шеннона, $p < 0,05$) у мышей, получавших темоциллин, были сравнимы с нелеченными (интактными) мышами и были выше, чем у мышей, получавших цiproфлоксацин.

[0054] Содержание всех ссылок (включая ссылки на литературные источники, выданные патенты, опубликованные заявки на патенты и одновременно рассматриваемые заявки на патенты), цитируемых в данной заявке, настоящим включено в данный документ в полном объеме посредством ссылки. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют значения, известные специалисту в данной области техники.

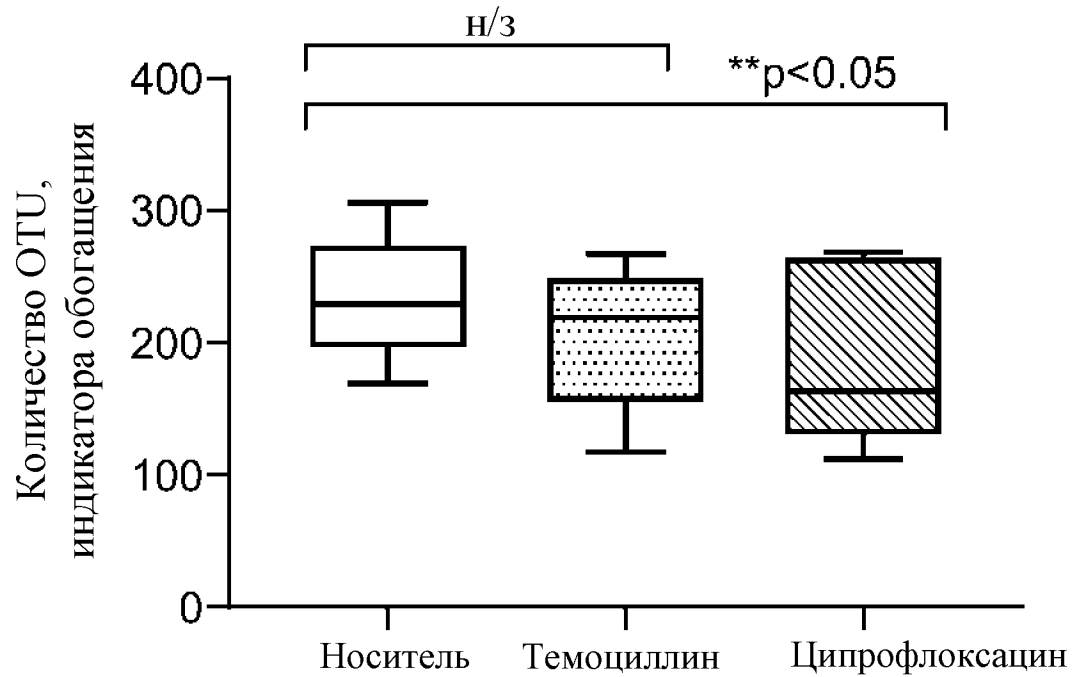
Формула изобретения

1. Способ лечения кишечного нарушения у субъекта, имеющего чрезмерный рост адгезивно-инвазивной *E. coli* (AIEC) в кишечнике, включающий введение субъекту эффективного количества темоциллина или его фармацевтически приемлемой соли.
2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанное кишечное нарушение выбирают из следующих патологических состояний: синдром раздраженного кишечника (IBS) (например, синдром раздраженного кишечника, ассоциированный с диареей (d-IBS), синдром раздраженного кишечника с запором (c-IBS), синдром раздраженного кишечника с чередованием запоров и диареи), болезнь Крона, диарея путешественников, колит, язвенный колит, резервуарный илеит и дивертикулит.
3. Способ по п. 1 или п. 2, отличающийся тем, что указанное кишечное нарушение представляет собой болезнь Крона.
4. Способ по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что субъекту вводят фармацевтически приемлемую соль темоциллина.
5. Способ по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что темоциллин или его фармацевтически приемлемую соль вводят перорально.
6. Способ модулирования чрезмерного роста адгезивно-инвазивной *E. coli* (AIEC) у субъекта, нуждающегося в этом, включающий этап введения указанному субъекту эффективного количества темоциллина или его фармацевтически приемлемой соли.
7. Способ по п. 6, отличающийся тем, что чрезмерный рост AIEC происходит в кишечнике субъекта.
8. Способ по п. 6 или 7, отличающийся тем, что субъект имеет кишечное нарушение.
9. Способ по любому из пп. 6-8, отличающийся тем, что субъект имеет кишечное нарушение, выбранное из следующих патологических состояний: синдром раздраженного кишечника (IBS) (например, синдром раздраженного кишечника, ассоциированный с диареей (d-IBS), синдром раздраженного кишечника с запором (c-IBS), синдром раздраженного кишечника с чередованием запоров и диареи), болезнь Крона, диарея путешественников, колит, язвенный колит и дивертикулит.
10. Способ по любому из пп. 6-9, отличающийся тем, что субъект имеет болезнь Крона.
11. Способ по любому из пп. 6-10, отличающийся тем, что модулирование включает уменьшение чрезмерного роста AIEC.
12. Способ по любому из пп. 6-11, отличающийся тем, что темоциллин или его фармацевтически приемлемую соль вводят перорально.
13. Способ уменьшения воспаления кишечника, вызванного чрезмерным ростом адгезивно-инвазивной *E. coli* (AIEC) у субъекта, нуждающегося в этом, включающий этап введения указанному субъекту эффективного количества темоциллина или его фармацевтически приемлемой соли.
14. Способ по п. 13, отличающийся тем, что субъект имеет болезнь Крона.
15. Способ уменьшения одного или более из следующих симптомов: диареи, лихорадки, утомляемости, болей и спазмов в животе, потери веса и анемии у субъекта, имеющего болезнь Крона, включающий пероральное введение указанному субъекту эффективного количества темоциллина или его фармацевтически приемлемой соли.
16. Способ по п. 15, отличающийся тем, что у субъекта наблюдается чрезмерный рост адгезивно-инвазивной *E. coli* (AIEC) в кишечнике.
17. Способ по любому из пп. 13-16, отличающийся тем, что темоциллин или его фармацевтически приемлемую соль вводят перорально.

ФИГ. 1



ФИГ. 2А



ФИГ. 2В

