

RZECZPOSPOLITA  
POLSKA



Urząd Patentowy  
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **219802**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **399978**

(22) Data zgłoszenia: **16.07.2012**

(51) Int.Cl.

**A61K 31/19 (2006.01)**

**A61K 47/26 (2006.01)**

**A61P 31/10 (2006.01)**

(54)

**Zastosowanie kompozycji 3-bromopirogronianu do wytwarzania leku  
do zapobiegania i leczenia kryptokokozy**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

**20.01.2014 BUP 02/14**

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

**31.07.2015 WUP 07/15**

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet Wrocławski, Wrocław, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**MARIUSZ DYLAŁG, Wrocław, PL**

**PAWEŁ LIS, Suchy Bór, PL**

**YOUNG H. KO, Maryland, US**

**PETER L. PEDERSEN, Maryland, US**

**ANDRE GOFFEAU, Overijse, BE**

**STANISŁAW UŁASZEWSKI, Suchy Dwór, PL**

(74) Pełnomocnik:

**rzecz. pat. Magdalena Drozd-Rudnicka**

**PL 219802 B1**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest zastosowanie kompozycji zawierającej 3-bromopirogronian (3-BP) do wytwarzania leku drugiego zastosowania w terapii kryptokokozy (cryptococcosis).

Aktualne możliwości terapii przeciwgrzybiczej, w tym terapii kryptokokozy są znacznie ograniczone, podczas gdy liczba poważnych inwazyjnych infekcji grzybiczych rośnie z roku na rok. Tylko w latach 1987–1996 śmiertelność w wyniku inwazyjnej aspergilozy wzrosła o 357%, a *Aspergillus fumigatus* wciąż pozostaje najczęstszym czynnikiem etiologicznym tego typu infekcji [*Clin Infect Dis* 2001; 33:641; *Jpn J Med. Mycol* 2007; 48:1]. Jednocześnie wśród pacjentów z zaburzoną odpornością *Cryptococcus neoformans* jest jednym z najczęstszych czynników mikrobiologicznych powodujących śmiertelność. Według statystyk każdego roku spośród 625 tysięcy chorych pacjentów na AIDS około jeden milion zapada na kryptokozę mózgu prowadzącą do śmierci [*AIDS* 2009; 23:525]. Inny istotny problem w terapii infekcji grzybiczych wynika ze wzrostu prewalencji zakażeń gatunkami *nonalbicans* przy jednoczesnym wzroście liczby opornych szczepów. Podczas gdy prewalencja zakażeń gatunkami *non-albicans* w latach 1970–90 wynosiła 10–40%, w latach 1991–1998 gatunki te stanowiły już 35–65% wszystkich przypadków infekcji grzybiczych powodowanych przez gatunki z rodzaju *Candida* [*J Hosp Infect* 2002; 50:243]. Dlatego pożądane jest poszukiwanie nowych aktywnych środków przeciwgrzybiczych.

Autorzy wynalazku bazując na przedstawionej wcześniej i opatentowanej kompozycji przeciwnowotworowej leku pierwszego zastosowania zaproponowali kompozycję przeciwgrzybiczą, która cechuje się wysoką aktywnością wobec licznych patogennych gatunków grzybów oraz jest bezpieczna w stosowaniu u ludzi i zwierząt. Dodatkowo obecny w proponowanej kompozycji przeciwgrzybiczej 3-BP nie stanowi substratu dla białek błonowych z rodziny ABC transporterów [*J Bioenerg Biomembr* 2012; 44:155], dlatego w odróżnieniu od innych obecnie stosowanych leków przeciwgrzybiczych nie generuje fenotypów wielorakiej oporności i nie może być usuwany z komórki na tej drodze [*Science* 2008; 321:367; *Clin Microbiol Rev* 2009; 22:291].

Przedmiotem wynalazku jest zastosowanie kompozycji 3-bromopirogronianu (3-BP) składającej się z: wodnego, sterylnego roztworu 3-bromopirogronianu sporządzanego bezpośrednio przed zamierzonym użyciem; co najmniej jednego źródła węgla wybranego z grupy obejmującej: mannitol, erytrol, izomalt, laktitol, maltitol, sorbitol, ksylitol, dulcitol, rybitol, inozytol i glicerol, stabilizującego związek aktywny; roztworu buforowego wolnego od jonów potasu i wybieranego z grupy obejmującej: bufor cytrynianowy, bufor fosforanowy i bufor octanowy, zapewniającego odpowiednie pH w zakresie 5,5–8,0 do wytwarzania leku do zapobiegania i/lub leczenia kryptokokozy (cryptococcosis). Kompozycja wg wynalazku zawiera inhibitor syntezy DOPA-melaniny produkowanej przez *Cryptococcus neoformans* w warunkach indukcji, w tym w ustroju człowieka lub DHN-melaniny syntetyzowanej w sposób konstytutywny przez grzyby z rodziny *Dematiaceae* i/lub inhibitor syntezy glutationu (GSH). Inhibitor syntezy melaniny według wynalazku stanowi kwas para-aminobenzoowy (PABA) stosowany w stężeniu 1–3 mM i/lub tricyklazol stosowany w stężeniu 0,1–0,2 mM do zastosowania synergistycznego z 3-BP. Inhibitor syntezy glutationu (GSH) według wynalazku stanowi BSO (buthionine sulfoximine) stosowany w stężeniu 1–10 mM, hamujący syntezę i obniżający poziom wewnątrzkomórkowego glutationu (GSH), do zastosowania synergistycznego z 3-BP. Kompozycja wg wynalazku służy do wytworzenia leku do zapobiegania i/lub leczenia kryptokokozy (cryptococcosis) skórnej, mózgu, opon mózgowych, ośrodkowego układu nerwowego (OUN), płuc i ogólnoustrojowej, której czynnikiem etiologicznym jest *Cryptococcus neoformans* u pacjentów: z HIV/AIDS lub po transplantacjach lub z immunosupresją lub z nowotworami powikłanymi infekcjami grzybiczymi.

Zastosowanie kompozycji 3-BP wg wynalazku obejmuje następujące drogi podania: doustną (per os), dożylną (intravenous), dokanałową (intrathecal), podskórną (subcutaneous), dopochwową (intravaginal), domięśniową (intramuscular), wziewną (inhalational), miejscową (topical), oraz postaci leku takie jak: tabletki, czopki, zawiesiny doustne, maści, kremy, lakiery, szampony oraz żele.

Działanie 3-BP polega na hamowaniu procesów oddychania tlenowego i beztlenowego, a w konsekwencji drastycznego obniżenia wewnątrzkomórkowego poziomu ATP, co w ostateczności prowadzi do śmierci komórki [*Anticancer Res* 2009; 29:4909]. Aktywność związku wynika z jego alkilujących i oksydacyjnych właściwości [*J Bioenerg Biomembr* 2012; 44:39; *J Bioenerg Biomembr* 2008; 40:607]. Jego selektywne działanie przeciwgrzybicze jest wynikiem różnej akumulacji oraz gatunkowo zróżnicowanego poziomu glutationu i melaniny w komórkach.

W kompozycji przeciwgrzybiczej zakłada się użycie odpowiedniego źródła węgla, stabilizującego 3-BP. Ponadto, kompozycja przeciwgrzybicza zawiera roztwór buforowy w proporcjach zapewnia-

jących przynajmniej częściowe odkwaszenie związku przeciwgrzybiczego oraz neutralizację ewentualnych produktów ubocznych jego metabolizmu. Zakłada się też możliwość włączenia do kompozycji dodatkowych składników w postaci znanych inhibitorów syntezy glutationu (GSH) między innymi BSO (buthionine sulfoximine) [Cancer Res 1989; 49:511–515] i/lub inhibitorów syntezy melaniny takich jak PABA [Brooks *et al.*, US Patent no. 2010/0197612A1, 23.12.2010], i/lub tricyklazol [Enzyme Microb Tech 1996; 19:311–317] wykazujących działanie synergistyczne z 3-BP.

Obecnie 3-BP (i jego chemiczne pochodne) są objęte prawem patentowym Stanów Zjednoczonych Ameryki jako aktywne leki przeciwnowotworowe pierwszego zastosowania.

Przeprowadzona *in vitro* ocena biologicznej aktywności 3-BP wobec 110 szczepów z 32 różnych gatunków grzybów jednoznacznie wskazuje na przeciwgrzybiczą aktywność tego związku. Wykazano gatunkowo zróżnicowaną wrażliwość na ten związek oraz wynikającą z tego grzybobójczą lub wyłącznie grzybostatyczną aktywność. Ocenę przeciwgrzybiczej aktywności 3-bromopirogronianu wraz z określeniem najniższych stężeń hamujących (MIC) przeprowadzono zarówno w oparciu o zalecaną przez CLSI metodę mikrorozcieńczeń (M27-2A, M38-2A i M38-2P) jak też metodę seryjnych rozcieńczeń związku w podłożu (ang. spot tests) [Methods In Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual, 2005].

3-bromopirogronian jako inhibitor produkcji energii komórkowej w znaczącym stopniu obniża poziom wewnątrzkomórkowego ATP. Dla *C. neoformans* wyraźny spadek ilości ATP obserwowano przy stężeniach 3-BP równych 1/8 i 1/16 wartości MIC. Uzyskane wyniki w doświadczeniach z użyciem znakowanego izotopowo 3-BP potwierdzają wysoki poziom jego akumulacji w komórkach *C. neoformans* *varietas neoformans*. W przeciwieństwie do innych obecnie wykorzystywanych cytostatyków, związków grzybostatycznych i grzybobójczych, takich jak pochodne azolowe czy też amfoterycyna B, wykazano, że 3-BP nie jest substratem dla transporterów błonowych z rodziny białek ABC, co pozwala wykluczyć możliwość generowania fenotypu oporności na tej drodze.

W świetle obecnego stanu techniki: Chen Z., *et al.*, Biochim Biophys Acta; 2009, 1787:553–560; Walter AZ., *et al.*, J Pharm Sci. 1964; 53(11):1421–1422 oraz opis patentowy WO 2011/127200 A2 autorstwa Geschwind J-F. i Vali M. autorzy niniejszego zgłoszenia (P. 399978) wykazali nieoczywistość rozwiązań przedstawionych w tych dokumentach.

Aktualny stan wiedzy na temat przeciwgrzybiczej aktywności 3-bromopirogronianu stanowi licząca zaledwie 1,5 strony (A4) publikacja Walter AZ, Tellis AM. „3-bromopyruvic acid, highly selective antimicrobial agent against certain yeasts” J Pharm Sci. 1964; 53(11):1421–1422. Autorzy tej pracy ograniczyli badanie biologicznej aktywności 3-bromopirogronianu do niereprezentatywnej grupy grzybów (tylko 13 szczepów z rodzaju *Candida* oraz trzech z gatunków: *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula anomala* i *Geotrichum candidum*). Należy podkreślić, że autorzy tej pracy nie uwzględnili w badaniach nad przeciwgrzybiczą aktywnością 3-BP żadnego z przedstawicieli gromady *Basidiomycota* (w tym gatunków z rodzaju *Cryptococcus*). W przeciwieństwie do autorów niniejszego zgłoszenia opisane w cytowanej publikacji wyniki uzyskano przy zastosowaniu niereferencyjnej metody (analiza pomiarów gęstości optycznej OD<sub>620nm</sub>). Ponadto, testy wrażliwości komórek grzybów przeprowadzono w podłożu płynnym z glukozą (dekstrozą). W związku z represją glukozową białka Jenlp zaangażowanego w transport tego związku do komórek takie postępowanie należy uznać za nieprawidłowe a przedstawione w tej pracy wyniki są niedokładne.

Mechanizmy biologicznej aktywności 3-BP na poziomie molekularnym opisane w pierwszej części zgłoszenia są o wiele bardziej złożone niż pierwotnie zostało to opisane w pracy Chen Z., *et al.*: Role of mitochondria-associated hexokinase II in cancer cell death induced by 3-bromopyruvate. Biochim Biophys Acta; 2009, 1787:553–560. Przede wszystkim te opisane w niniejszym zgłoszeniu dotyczą modelu komórek patogennego grzyba *Cryptococcus neoformans*, dla którego wyznaczono minimalne stężenia bójcze związku. W przeciwieństwie do wspomnianej już publikacji w zgłoszeniu uwzględniono wyniki dotyczące selektywnej akumulacji 3-BP w komórkach taksonomicznie różnych grzybów. Wykazano też, że 3-BP nie stanowi substratu dla białek błonowych z rodziny ABC transporterów, co wyklucza mechanizm wielorakiej oporności. Ponadto, autorzy zgłoszenia wykazali bezpośredni związek między fenotypem wrażliwości komórek grzybów na 3-BP a wewnątrzkomórkowym stężeniem glutationu (GSH) oraz obecnością melaniny w ścianach komórkowych licznych gatunków grzybów. Było to podstawą do poszukiwania związków obniżających poziom lub hamujących syntezę glutationu (GSH) i/lub melaniny. W wyniku przeprowadzonych badań zaproponowano wykorzystanie BSO (sulfoksyminy butioniny) i PABA (kwasu para-aminobenzoowego) jako związków przejawiających efekt synergistyczny z 3-bromopirogronianem.

Zgłoszenie patentowe P. 399978 w przeciwieństwie do opisu patentowego WO 2011/127200 A2 autorstwa Geschwind J-F. i Vali M., poparte jest wynikami rzetelnych badań. Niniejszy dokument nie jest oparty wyłącznie na domniemaniach i deklaracjach „a priori” ze strony zgłaszających. Przede wszystkim zamieszczono wyniki konkretnych doświadczeń (spektrum działania, zakres aktywnych stężeń 3-BP, molekularny mechanizm działania) mających odzwierciedlenie w późniejszych publikacjach. Autorzy tego zgłoszenia zastrzegają wykorzystanie biologicznej aktywności 3-BP w wąskim zakresie obejmującym gatunki z rodzaju *Cryptococcus*. W tym kontekście jest to zasadnicza różnica w odniesieniu do opisu patentowego Geshwind J-F. i Vali M., w którym zastrzega się „a priori” zbyt szerokie spektrum działania 3-BP obejmujące wszystkie bakterie Gram+ i Gram-, gatunkowo liczne spektrum grzybów i pasożytów. Tego typu założenia mają charakter bardziej spekulacyjny niż naukowy ponieważ nie wszystkie gatunki mikroorganizmów są wrażliwe na 3-BP. Możliwość zastosowania 3-bromopirogronianu w terapii infekcji grzybiczych została potraktowana bardzo powierzchownie i bez uzasadnienia. Autorzy opisu patentowego WO 2011/127200 A2 zastrzegają możliwość wykorzystania 3-BP w terapii (cytuję) „cryptococcus” oraz „nail fungus”. W tym aspekcie treść tego zgłoszenia dowodzi braku znajomości problematyki mykologicznej, co przejawia się użyciem błędnych merytorycznie terminów. Tak więc *de facto* autorzy tego opisu nie zastrzegli wykorzystania 3-bromopirogronianu w terapii kryptokokozy (cryptococcosis). Ponadto, w niniejszym zgłoszeniu zastrzeżono szczególną kompozycję przeciwgrzybiczną 3-BP do wytwarzania leku do zastosowania w terapii kryptokokozy (cryptococcosis), a nie tylko pojedynczy związek 3-BP.

W kontekście powyższej argumentacji zgłoszony przez nas wynalazek jest oryginalny i nowatorski.

Wynalazek niniejszy opisano w następujących przykładach. Prezentowane przykłady służą zobrazowaniu przedmiotowego rozwiązania.

#### **Przykład 1.**

Ocenę przeciwgrzybiczej aktywności 3-bromopirogronianu wraz z określeniem minimalnych stężeń hamujących (MIC) przeprowadzono zarówno w oparciu o zalecaną przez CLSI metodę mikrorozcieńczeń (M27-2A, M38-2A i M38-2P) jak też metodę seryjnych rozcieńczeń związku w minimalnym podłożu syntetycznym SD (0,67% YNB, 2% glukoza lub sacharoza, 2% Bacto agar, pH 5,5). Wartości MIC wyznaczone metodą seryjnych rozcieńczeń związku w agarze dla badanych szczepów patogennych grzybów drożdżopodobnych z rodzajów *Candida*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*, *Geotrichum*, dermatofitów z rodzajów *Trichophyton*, *Microsporum* i *Epidermophyton* oraz wybranych przedstawicieli *Glomeromycota* mieściły się w przedziale 1,8–3,6 mM. Wykazano znacznie wyższą wrażliwość w przypadku klinicznych szczepów *Cryptococcus neoformans*, a wśród gatunków z rodzaju *Aspergillus* znacznie wyższą wrażliwością cechowały się *A. fumigatus* i *A. clavatus*. Szczególnie wysoką skuteczność 3-BP obserwowano wobec klinicznych szczepów *C. neoformans varietas neoformans*. Wartości MIC wyznaczone dla tych szczepów w oparciu o metodę mikrorozcieńczeń (w płynnym podłożu RPMI 1640) mieściły się w przedziale 0,15–0,23 mM oraz 0,12–0,15 mM w przypadku metody seryjnych rozcieńczeń związku w agarze (Tabela 1). Ponadto przy stężeniach odpowiadających 2x i 4x wartości MIC związek wykazywał także działanie grzybobójcze, co było obserwowane odpowiednio po 24 i 50 godzinach inkubacji ze związkiem (Rycina 1).

**Tabela 1.** Wrażliwość 110 szczepów grzybów na 3-bromopirogronian (oceniana metodą seryjnych rozcieńczeń związku w agarze\*).

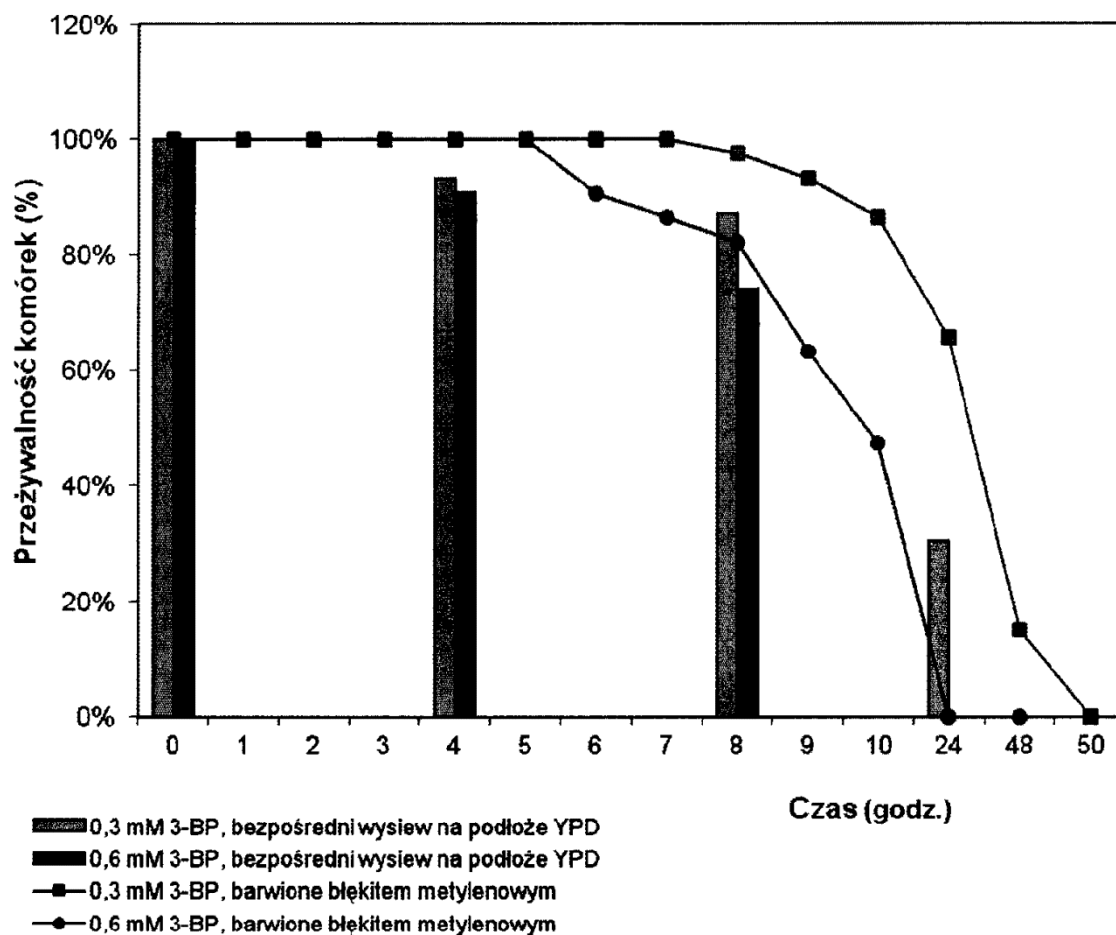
| <b>Gatunki grzybów</b><br>(liczba testowanych szczepów) | <b>Wartości MIC</b><br>w mM 3BP (źródło węgla#) |
|---------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| 1                                                       | 2                                               |
| <i>Cryptococcus neoformans varietas neoformans</i> (4)  | 0,12–0,15 (Sacharoza)                           |
| <i>Cryptococcus uniguttulatus</i> (2)                   | 2,4–3,6 (Sacharoza)                             |
| <i>Candida lusitaniae</i> (4)                           | 2,4–3,6 (Sacharoza)                             |
| <i>Candida guilliermondii</i> (5)                       | 2,4–3,6 (Sacharoza)                             |
| <i>Candida famata</i> (4)                               | 2,4–3,6 (Sacharoza)                             |
| <i>Rhodotorula glutinis</i> (2)                         | 2,4–3,0 (Glicerol + Etanol)                     |

cd. tabeli 1

| 1                                                                 | 2                           |
|-------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| <i>Rhodotorula rubra</i> (3)                                      | 3,0–3,6 (Glicerol + Etanol) |
| <i>Candida lipolytica</i> (2)                                     | 1,8–2,4 (Glicerol + Etanol) |
| <i>Candida krusei</i> (5)                                         | 1,2–1,8 (Glicerol + Etanol) |
| <i>Candida albicans</i> (5)                                       | 2,4–3,6 (Galaktoza)         |
| <i>Candida glabrata</i> (5)                                       | 2,4–3,6 (Trehaloza)         |
| <i>Candida tropicalis</i> (3)                                     | 2,4–3,6 (Trehaloza)         |
| <i>Exophiala (Wangiella) dermatitidis</i> (4)                     | 8,4–9,6 (Sacharoza)         |
| <i>Aureobasidium pullulans</i> (4)                                | 7,2–8,4 (Sacharoza)         |
| <i>Trichophyton mentagrophytes</i> var. <i>mentagrophytes</i> (2) | 1,8–2,4 (Sacharoza)         |
| <i>Trichophyton rubrum</i> (4)                                    | 1,8–2,4 (Sacharoza)         |
| <i>Trichophyton tonsurans</i> (3)                                 | 1,8–2,4 (Sacharoza)         |
| <i>Microsporum canis</i> (2)                                      | 3,0 (Sacharoza)             |
| <i>Microsporum gypseum</i> (2)                                    | 3,0–3,6 (Sacharoza)         |
| <i>Cladosporium cladosporioides</i> (6)                           | 7,2–8,4 (Sacharoza)         |
| <i>Ulocladium chartarum</i> (3)                                   | 6,0–7,2 (Sacharoza)         |
| <i>Alternaria tenuissima</i> (2)                                  | 7,2–8,4 (Sacharoza)         |
| <i>Fusarium graminearum</i> (2)                                   | 6,0–7,2 (Sacharoza)         |
| <i>Trichoderma viride</i> (4)                                     | 7,2–8,4 (Sacharoza)         |
| <i>Absidia glauca</i> (5)                                         | 1,8–3,0 (Sacharoza)         |
| <i>Rhizopus nigricans</i> (4)                                     | 1,8–3,0 (Sacharoza)         |
| <i>Chaetomium globosum</i> (3)                                    | 1,8–3,0 (Sacharoza)         |
| <i>Aspergillus clavatus</i> (2)                                   | 7,2–8,4 (Sacharoza)         |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> (4)                                  | 6,0–7,2 (Sacharoza)         |
| <i>Fusarium oxysporum</i> (4)                                     | 8,4–9,6 (Sacharoza)         |
| <i>Aspergillus niger</i> (3)                                      | 22,8–24,0 (Sacharoza)       |
| <i>Penicillium chrysogenum</i> (3)                                | 22,8–24,0 (Sacharoza)       |

\* Wrażliwość na 3-BP oceniana metodą seryjnych rozcieńczeń związku w agarze oraz w przypadku grzybów strzępkowych metodą pomiarów średnicy kolonii.

# Hodowla prowadzona na podłożu SD zawierającym wskazane źródło węgla.

Ryc. 1. Przeżywalność komórek *C. neoformans* w zależności od czasu i stężenia 3-BP.**Przykład 2.**

Hamowanie wzrostu grzybów powodowane przez 3-BP zależy także od naturalnego, wewnątrzkomórkowego poziomu zredukowanego glutationu (GSH), którego ilość w oparciu o opisaną w literaturze przedmiotu metodę [Arch Biochem Biophys 1959, 82:70; Yeast 1997, 13:1347] oznaczono dla wybranych szczepów grzybów. W przypadku hodowli prowadzonych w podłożu pełnym, zawierającym pepton stwierdzano najwyższy poziom GSH wewnątrz komórek grzyba, który korelował z odpowiednio wyższymi wartościami MIC. Najniższy poziom GSH w komórkach hodowanych w pożywce minimalnej SD, bez aminokwasów towarzyszył najniższym wartościom MIC uzyskiwanym w przypadku doświadczeń przeprowadzanych w tym podłożu. Zastosowano jednocześnie podawanie kompozycji 3-bromopirogronianu (3-BP) składającej się z: wodnego, sterylnego roztworu 3-bromopirogronianu sporządzanego bezpośrednio przed zamierzonym użyciem; co najmniej jednego źródła węgla wybranego z grupy obejmującej: mannitol, erytrol, izomalt, laktitol, maltitol, sorbitol, ksylitol, dulcytol, rybitol, inozytol i glicerol, stabilizującego związek aktywny; roztworu buforowego wolnego od jonów potasu i wybieranego z grupy obejmującej bufor cytrynianowy, bufor fosforanowy i bufor octanowy, zapewniającego odpowiednie pH, w zakresie 5,5–8,0 razem z inhibitorem syntezy glutationu (GSH) takim jak BSO (buthionine sulfoximine) [Carcinogenesis 2006; 27:240; Oncol Rep 2009; 22:385] w celu osiągnięcia efektu synergistycznego i obniżenia wartości MIC.

W przypadku *Exophiala dermatitidis* czy też *Aureobasidium pullulans* obserwowano mniejszą wrażliwość na 3-BP wynikającą z ochronnej roli produkowanej w sposób konstytutywny DHN-melaniny. Podobną zależność zaobserwowano w przypadku *Cryptococcus neoformans* zdolnego do wytwarzania DOPA-melaniny w warunkach indukcji na podłożu CAA (agar z kwasem kawowym) [J Clin Microbiol 1975; 2:115]. Produkcja DOPA-melaniny jest swoista dla tego gatunku grzyba, wyróżnia go wśród innych z rodzaju *Cryptococcus* i stanowi istotny czynnik w patomechanizmie zakażenia [J Exp Med 1996; 184:377; Antimicrob Agents Ch 2002; 46:3394]. W oparciu o uzyskane wyniki

w doświadczeniach z kwasem para-aminobenzoowym (PABA) oraz BSO sugeruje się jednoczesne wykorzystanie opisanej w zastrzeżeniu 1 kompozycji przeciwgrzybiczej wraz z odpowiednim inhibitorem syntezy melaniny i/lub BSO w celu wytworzenia leku, który pozwoli osiągnąć efekt terapeutyczny przy znacznie niższych wartościach stężeń 3-bromopirogronianu (Tabela 2).

Ocenę wrażliwości badanych szczepów na 3-BP w połączeniu z inhibitorami (BSO, PABA) przeprowadzono na podłożach SD i CAA w oparciu o metodę seryjnych rozcieńczeń związku w agarze opisaną w przykładzie 1.

**T a b e l a 2.** Wpływ inhibitorów syntezy glutationu (BSO) i melaniny (PABA) na wrażliwość wybranych klinicznych szczepów *C. neoformans* na 3-bromopirogronian.

| Wartości MIC<br>mM 3-BP   | Podłoże hodowlane           |
|---------------------------|-----------------------------|
| <i>C. neoformans</i> (4)* |                             |
| 0,12–0,15                 | SD + sacharoza              |
| 0,3–0,36                  | (CAA)                       |
| 0,1–0,15                  | CAA + 3 mM PABA             |
| 0,08–0,1                  | CAA + 10 mM BSO             |
| 0,05–0,07                 | CAA + 10 mM BSO + 3 mM PABA |

\* liczba testowanych szczepów

W podsumowaniu, biorąc pod uwagę niską toksyczność 3-BP wobec komórek ssaczych w porównaniu z nefrotoksycznym i hepatotoksycznym działaniem amfoterycyny B stosowanej obecnie w leczeniu kryptokokozy [*Clin Microbiol Rev* 1999; 12:501], 3-BP może stanowić alternatywę jako związek o właściwościach nie tylko grzybobójczych, ale także przeciwgrzybiczych. Ponadto, uwzględniając rosnący odsetek szczepów patogennych grzybów opornych na obecnie stosowane leki przeciwgrzybicze, a w szczególności azolowe, związek ten niebędący substratem dla ABC transporterów może stanowić istotny komponent do wytwarzania leków skutecznych również w terapii innych rodzajów infekcji grzybiczych. Przeprowadzone badania na modelu komórki prokariotycznej (*Salmonella typhimurium* – test Ames'a) oraz komórki eukariotycznej (*Saccharomyces cerevisiae* – indukcja cytoplazmatycznych mutantów oddechowych) nie wykazały mutagennego działania 3-BP (badania własne).

## Zastrzeżenia patentowe

**1.** Zastosowanie kompozycji 3-bromopirogronianu (3-BP) składającej się z: wodnego, sterylnego roztworu 3-bromopirogronianu (3-BP) sporządzanego bezpośrednio przed zamierzonym użyciem; co najmniej jednego źródła węgla **wybranego z grupy obejmującej: mannitol, erytrol, izomalt, laktitol, maltitol, sorbitol, ksylitol, dulcitol, rybitol, inozytol i glicerol**, stabilizującego związek aktywny; roztworu buforowego wolnego od jonów potasu i wybieranego z grupy obejmującej bufor cytrynianowy, bufor fosforanowy i bufor octanowy, zapewniającego odpowiednie pH w zakresie 5,5-8,0 **do wytwarzania leku** do zapobiegania i/lub leczenia kryptokokozy (cryptococcosis).

**2.** Zastosowanie kompozycji 3-BP według zastrz. 1, **znamiennie tym**, że kompozycja ta zawiera związek chemiczny hamujący syntezę DOPA-melaniny produkowanej przez *Cryptococcus neoformans* w warunkach indukcji, w tym w ustroju człowieka i/lub inhibitor syntezy glutationu (GSH).

**3.** Zastosowanie związku chemicznego hamującego syntezę melaniny według zastrz. 2, **znamiennie tym**, że stanowi go kwas para-aminobenzoowy (PABA) stosowany w stężeniu 1-3 mM do zastosowania synergistycznego z 3-BP w zapobieganiu i/lub leczeniu kryptokokozy (cryptococcosis).

**4.** Zastosowanie związku chemicznego hamującego syntezę glutationu (GSH) według zastrz. 2, **znamiennie tym**, że stanowi go BSO (buthionine sulfoximine) stosowany w stężeniu 1–10 mM, obniżający poziom wewnątrzkomórkowego glutationu (GSH) do zastosowania synergistycznego z 3-BP w zapobieganiu i/lub leczeniu kryptokokozy (cryptococcosis).

5. Zastosowanie kompozycji 3-BP według zastrz. 1 do zapobiegania i/lub leczenia kryptokokozy (cryptococcosis) skórnej, mózgu, opon mózgowych, ośrodkowego układu nerwowego (OUN), płuc i ogólnoustrojowej, której czynnikiem etiologicznym jest *Cryptococcus neoformans*.

6. Zastosowanie kompozycji 3-BP według zastrz. 1 do zapobiegania i/lub leczenia kryptokokozy (cryptococcosis) u pacjentów: z HIV/AIDS i/lub po transplantacjach i/lub z immunosupresją i/lub z nowotworami powikłanymi tego typu infekcją.

7. Zastosowanie kompozycji 3-BP według zastrz. 1 obejmujące następujące drogi podania: doustną (per os), dożylną (intravenous), dokanałową (intrathecal), podskórną (subcutaneous), dopochwową (intravaginal), domięśniową (intramuscular), wziewną (inhalational), miejscową (topical), oraz postaci leku takie jak: tabletki, czopki, zawiesiny doustne, maści, kremy, lakiery, szampony oraz żele.