

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043623**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.06.06

(51) Int. Cl. *A61K 31/122* (2006.01)
A61K 31/66 (2006.01)

(21) Номер заявки
201692493

(22) Дата подачи заявки
2015.05.29

(54) **ПРОТИВОМИКРОБНЫЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ СО СПОСОБНОСТЯМИ ИНГИБИРОВАНИЯ МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ**

(31) **62/005,128**

(32) **2014.05.30**

(33) **US**

(43) **2017.11.30**

(86) **PCT/US2015/033242**

(87) **WO 2015/184296 2015.12.03**

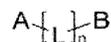
(56) PLOTNIKOV et al. "Protective effect of mitochondria-targeted antioxidants in an acute bacterial infection", PNAS, 2013, p. E3100-E3108, abstract; pg E3106, col. 2, para 6
US-A1-20120094962
US-A1-20090258841
WO-A1-2001007034

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
"МИТОТЕХ" (RU)**

(72) Изобретатель:
**Фридрихс Лоуренс Т. (US), Скулачев
Максим Владимирович, Северин
Федор Федорович, Кнорре Дмитрий
Алексеевич, Караваева Юлия
Евгеньевна, Назаров Павел
Александрович, Антоненко Юрий
Николаевич (RU)**

(74) Представитель:
Фелицына С.Б., Рябов П.Д. (RU)

(57) Изобретение относится к применению ингибитора множественной лекарственной устойчивости (MDR), выбранного из липофильных катионов структурной формулы



где А является антиоксидантной группой; L является линкерной группой, которая представляет собой прямую или разветвленную углеводородную цепь, состоящую из n звеньев; и В является липофильным катионом, и фармакологически приемлемого аниона для лечения микробных инфекций у инфицированного субъекта.

B1

043623

043623

B1

Уровень техники, предшествующий изобретению

Область изобретения

Изобретение относится к фармацевтическим композициям, обладающим противомикробными свойствами. Кроме того, изобретение относится к таким фармацевтическим композициям, обладающим способностями ингибирования множественной лекарственной устойчивости.

Сущность предшествующего уровня техники

Антибиотики представляют одно из величайших достижений медицинской науки в истории. К сожалению, злоупотребление определенными антибиотиками в медицине и в сельском хозяйстве привели к появлению патологических микробов, устойчивых ко многим наиболее широко используемым антибиотикам, приводя к необходимости в структурно отличных антибиотиках, воздействию которых такие микробы не подвергались. Одна из таких форм устойчивости к антибиотику происходит благодаря некоторым антибиотикам, способным активировать системы множественной лекарственной устойчивости (MDR) в различных клетках, включая грибы и бактерии. В результате эти системы MDR откачивают антибиотики, таким образом уменьшая их концентрацию в клетках-мишенях и значительно снижая противомикробный эффект антибиотиков. Например, во многих случаях патогенные грибы обладают надежной системой MDR (см. ссылки [1] и [2]). Развитие безопасных, удобных и универсальных способов ингибирования микробных MDR помп до сих пор является неразрешенной проблемой. Полагают, что эффективный антибиотик, который также является и ингибитором MDR, демонстрирует противобактериальные или противогрибковые свойства, которые менее подвержены MDR-опосредованной устойчивости, потому что он увеличивает концентрацию антибиотика в клетке-мишени посредством сдвига баланса приток/отток этих антибиотиков. В свою очередь этот сдвиг баланса и повышение концентрации антибиотиков должен снизить жизнеспособность клетки-мишени.

Липофильные катионы уже были широко исследованы в течение последних 10-15 лет в качестве фармацевтических средств, направленных на митохондрии. Главным эффектом таких фармацевтических средств является защита клеток-мишеней от окислительного стресса и других стрессовых факторов (см., например, Lukashov et al., 2014). Эти защитные свойства были продемонстрированы для многих соединений семейства SkQ (см. ссылку [3], WO 2011/059355), а также для липофильных катионов, у которых отсутствует антиоксидантная составная группа, например C₁₂TPP, C₁₂R19 и другие (см. WO 2011/162633 и ссылки [15], [16]). Эти направленные на митохондрии (т.е. липофильные и в то же время положительно заряженные) соединения могут накапливаться внутри бактерий и грибов из-за электрического потенциала на наружной мембране клеток этих организмов. Таким образом, как можно предположить, воздействие на бактерии и грибы посредством этих соединений может защитить эти организмы в стрессовых условиях и повысить их жизнеспособность. Таким образом, можно учитывать, что эти липофильные катионные соединения не должны быть использованы в качестве лечения бактериальной или грибковой инфекции. Таким образом, существует необходимость в антибиотиках, которые также обладают MDR-ингибирующими свойствами.

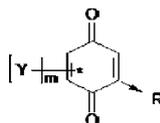
Краткое изложение сущности изобретения

Изобретение относится к фармацевтическим составам антибиотиков, которые также обладают MDR-ингибирующими свойствами, и к способам их применения в качестве противобактериальных и противогрибковых средств. Авторы настоящего изобретения, к удивлению, обнаружили, что липофильные катионные соединения, ранее продемонстрировавшие защитные свойства в отношении клеток, в действительности обладают антибиотическими свойствами в отношении бактерий и грибов и одновременно обладают MDR-ингибирующими свойствами.

Как правило, такие липофильные катионные соединения имеют структурную формулу 1



где А является атомом водорода (H) или антиоксидантной составной группой, имеющей следующую структуру:



и/или его восстановленная форма (т.е. гидрохинон),

где m является целым числом от 0 до 3;

каждый Y представляет собой метил;

L является линкерной группой, которая является либо прямой, либо разветвленной углеводородной цепью, которая может быть необязательно замещена посредством одного или нескольких заместителей и необязательно содержит одну или несколько двойных или тройных связей; и

R является липофильным катионом.

Такие соединения заряжены (катионы), таким образом, они присутствуют в форме соли с любым

фармакологически приемлемым анионом (противоионом).

Способы по изобретению содержат введение индивидууму, имеющему бактериальную или грибковую инфекцию, фармацевтически эффективного количества одного или нескольких липофильных катионных соединений по изобретению, необязательно с другим одним или несколькими противомикробными соединениями или одним или несколькими противомикробными средствами.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показано, что уровень экспрессии Pdr5 влияет на устойчивость к $C_{12}TPP$.

А: представлена химическая структура додецилтрифенилфосфония $C_{12}TPP$ и его производного пластохинона (SkQ1), применяемых в этом исследовании.

В: представлены результаты обработки клеток, выращенных на глюкозе, с применением указанной концентрации $C_{12}TPP$ или SkQ1.

С: представлены результаты обработки клеток, выращенных на галактозе, с применением указанной концентрации $C_{12}TPP$ или SkQ1. * $P < 0,05$ по сравнению с необработанным WT в соответствии с знаковым ранговым критерием Вилкоксона.

На фиг. 2 показано, что $C_{12}TPP$ или энергетическое голодание усиливает накопление родамина 6G в дрожжевых клетках.

А: показано, что окрашивание дрожжевых клеток R6G усилено посредством низкой концентрации $C_{12}TPP$, но не FCCP. Экспоненциально размножающиеся дрожжевые клетки окрашивали с применением 500 нМ R6G в присутствии указанной концентрации $C_{12}TPP$ или FCCP.

В: представлено, что добавление глюкозы приводит к уменьшению общей флуоресценции. Слабые сигналы наблюдают от R6G, удерживаемого в митохондриях (усиленный контраст). (Репрезентативные фотографии; шкалы, 5 мкм).

На фиг. 3 представлено, что $C_{12}TPP$ и SkQ1 предотвращают отток R6G из дрожжевых клеток.

А: представлены косвенные измерения вызванного глюкозой оттока R6G из дрожжевых клеток.

В: представлено, что вызванный глюкозой отток R6G из AD 1-8 (MDR-негативных) клеток является незначительным.

С и D: представлено, что FCCP (2 мкм), $C_{12}TPP$ (2 мкм) или SkQ1 (2 мкм) ингибируют вызванный глюкозой отток R6G из дрожжевых клеток.

Е: представлен количественный анализ результатов. Ордината соответствует соотношению углов наклона в а и b.

F: показано, что FCCP (2 мкм), $C_{12}TPP$ (2 мкм) или SkQ1 (2 мкм) ингибирует вызванный глюкозой отток R6G из дрожжевых клеток, обработанными ранее 10 мМ NaN_3 . * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ по сравнению с необработанными WT в соответствии со знаковым ранговым критерием Вилкоксона.

На фиг. 4 продемонстрировано, что $C_{12}TPP$ усиливает эффекты Pdr 5 субстратов циклогексимида D и клотримазола.

А: представлено количество удвоенных дрожжевых клеток, выросших в присутствии этанола (фиктивный контроль), $C_{12}TPP$ (1 мкм), циклогексимида D (ChD, 0,05 мкм) или обоих химических веществ.

В: представлено, что $C_{12}TPP$ (1 мкм) повышает ингибирующее действие клотримазола (CltrA, 60 мкм). * $P < 0,05$ по сравнению с необработанным WT в соответствии со знаковым ранговым критерием Вилкоксона.

На фиг. 5 продемонстрировано, что сверхэкспрессия гена PDR5 повышает активный отток $C_{12}R1$ из дрожжевых клеток. Чтобы измерить относительную скорость оттока $C_{12}R1$, применяли флуориметрический анализ, как у Кпогге и др. 2014 (<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.07.017>), за исключением того, что вместо R6G клетки, испытывающие энергетическое голодание, окрашивали с применением 10 мкМ $C_{12}R1$. Контрольный лабораторный штамм W303-1A (WT) и штамм P_{GAL} -PDR5 выращивали на среде, содержащей галактозу (условия сверхэкспрессии P_{GAL}). Для подавления гена PDR5 клетки выращивали на богатой среде, содержащей глюкозу (условия подавления P_{GAL}).

На фиг. 6 продемонстрировано, что $C_{12}TPP$ предотвращает отток $C_{12}R1$ из дрожжевых клеток. Скорость оттока $C_{12}R1$ (угол наклона кривой флуоресценции повышается на фиг. 1) количественно определяли в клетках, выращенных или на YPD (дрожжи пептон декстроза; условия подавления P_{GAL}), или YP_{GAL} (дрожжи пептон галактоза; условия сверхэкспрессии P_{GAL}). Измерения проводили с добавлением 10 мкМ $C_{12}TPP$, где указано.

На фиг. 7 продемонстрировано, что $C_{12}R1$ облегчает противогрибковый эффект клотримазола (Cltr) и хлорида бензалкония (BnzCl). Дрожжевые клетки выращивали в жидкой среде YPD с указанными химическими веществами в течение 2 ч, затем клетки высевали на твердый YPD и число появившихся колониеобразующих единиц (КОЕ) рассчитывали через 2 суток. 100% соответствует КОЕ в дрожжевой суспензии до добавления химических веществ, контрольная шкала соответствует числу КОЕ через 2 ч инкубации без химических веществ.

На фиг. 8 представлены кривые роста *B.subtilis* и *E.coli* в присутствии и в отсутствие SkQ1, как измерено посредством абсорбции при 600 нм. Ингибиторы добавляли в момент времени ноль в диапазоне концентраций 1-100 мкМ.

На фиг. 9 представлены эффекты различных концентраций C_nTPP на рост *B.subtilis* и *E.coli*. Момент

ноль обозначает МИС для C_n TPP.

На фиг. 10 представлены эффекты различных соединений по формуле 1 на рост бактерий *B.subtilis* в среде LB, измеренные посредством абсорбции при 600 нм. Ингибиторы добавляли в среду LB в момент времени ноль в диапазоне концентраций 1-100 мкМ.

На фиг. 11 показана противобактериальная активность SkQ1 на рост бактерий Δ TolC и Δ AcgA и Δ AcgB. Ингибиторы добавляли в момент времени ноль.

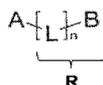
На фиг. 12 показана противобактериальная активность C_n TPP на рост бактерий штамма Δ TolC. Ингибиторы добавлены в момент времени ноль.

На фиг. 13 представлено накопление бромистого этидия в присутствии SkQ1. Для эмульсии протечки клеточной мембраны бактериальные клетки ресуспендировали в деионизированной воде. Бромистый этидий добавляли (20 мкг/мл) и изменение интенсивности флуоресценции записывали на спектрофлуориметр Fluorat-02-Panorama. Для детекции накопления бромистого этидия SkQ1 добавляли до концентрации 50 мкМ.

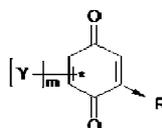
Подробное описание предпочтительных вариантов осуществления

Изобретение относится к фармацевтическим композициям, обладающим противомикробными свойствами и способами их использования для борьбы с инфекциями. Кроме того, изобретение относится к фармацевтическим композициям, обладающим ингибирующими свойствами в отношении систем множественной лекарственной устойчивости. Изобретение относится к фармацевтическим составам антибиотиков, которые также обладают MDR-ингибирующими свойствами, и способы их применения в качестве противобактериальных и противогрибковых средств. Авторы настоящего изобретения, к удивлению, обнаружили, что липофильные катионные соединения, ранее продемонстрировавшие защитные свойства в отношении клеток, в действительности обладают антибиотическими свойствами в отношении бактерий и грибов, в то же время обладая MDR-ингибирующими свойствами.

Как правило, такие липофильные катионные соединения имеют структурную формулу 1



где А является атомом водорода (H) или антиоксидантной составной группой, обладающей следующей структурой:



и/или его восстановленной формой (т.е. гидрохинон),

где m является целым числом от 0 до 3;

каждый Y представляет собой метил;

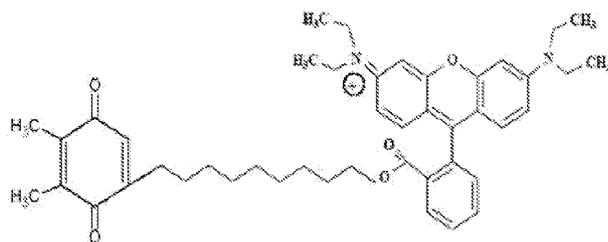
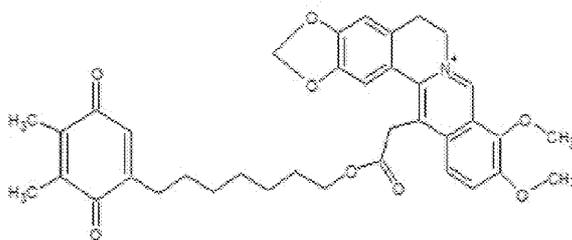
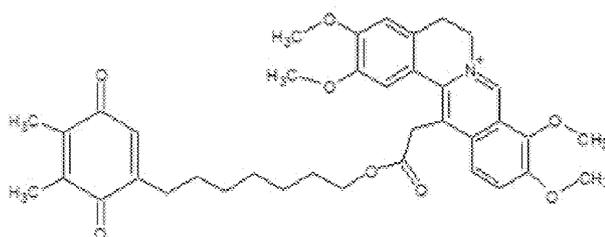
L является линкерной группой, которая является прямой или разветвленной углеводородной цепью, которая может быть необязательно замещена посредством одного или нескольких заместителей и обязательно содержит одну или несколько двойных или тройных связей; и

B является липофильным катионом.

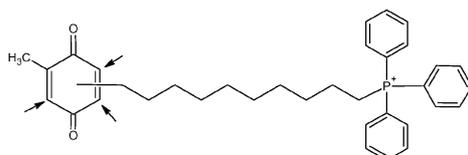
Такие соединения заряжены (катионы), таким образом, они присутствуют в форме солей с любыми фармакологически приемлемыми анионами (противоионами).

Способы по изобретению содержат введение индивидууму, имеющему бактериальную или грибковую инфекцию, фармацевтически эффективного количества одного или нескольких липофильных катионных соединений по изобретению, необязательно с другим одним или несколькими противомикробными соединениями или одним или несколькими противомикробными средствами.

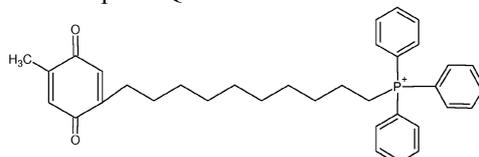
Соединения, пригодные в изобретении, в качестве неограничивающих примеров включают следующие примерные соединения: SkQ1, SkQ3, SkQ4, SkQ5, SkQR1, SkQRB, SkQB1, SkQBP1, SkQT, SkQThy, SkQB, C_n TPP (где n составляет от 5 до 12), C_n R1 (где n составляет от 4 до 12), C_n Berb (где n составляет от 4 до 12) и C_n Palm (где n составляет от 4 до 12). Структурные формулы типичных соединений представлены ниже.

SkQRB**SkQB1****SkQBPI**

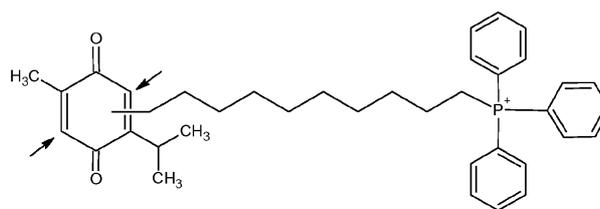
SkQT (смесь изомеров, которые различаются по положению децил линкера, возможные положения указаны с помощью стрелок):



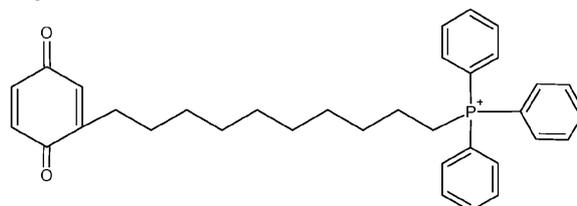
Среди этих SkQT изомеров есть пара-SkQT:



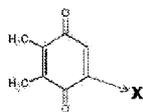
SkQThy (смесь изомеров, которые различаются по положению децил линкера, возможные положения указаны с помощью стрелок):



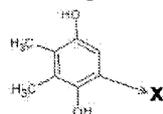
SkQB



Соединения, пригодные по изобретению, также включают восстановленные формы (гидрохинон) упомянутых выше соединений. В этих восстановленных соединениях составная группа хинон:

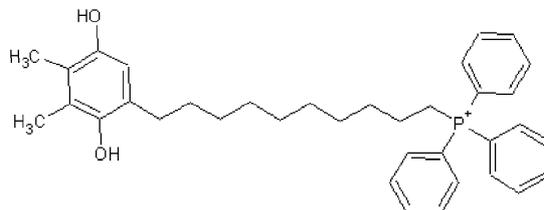


является восстановленной, т.е. замещенной гидрохиноновой составной группой:



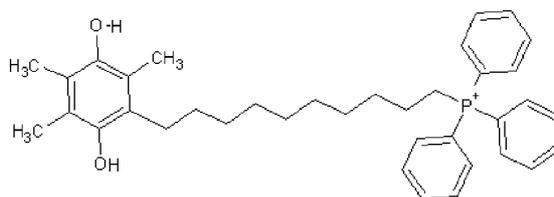
Например, в случае SkQ1 восстановленная форма SkQ1H2 имеет следующую структуру:

SkQ1H2

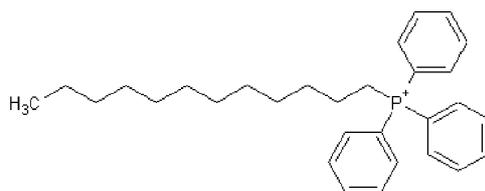


Также в качестве примера в случае SkQ3 восстановленная форма SkQ3H2 имеет следующую структуру:

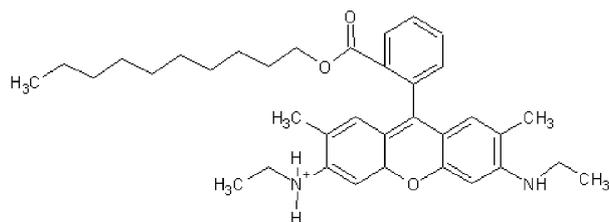
SkQ3H2



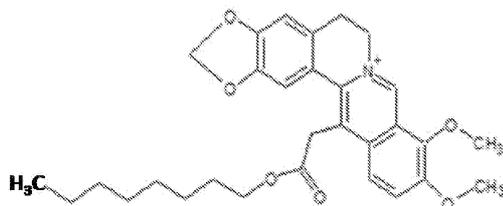
C12TPP (т.е. CnTPP, где n=12)



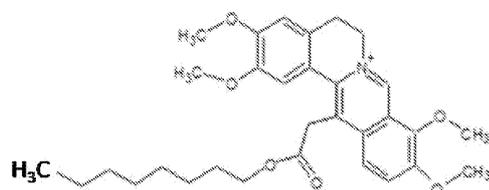
C10R1 (т.е. Cn1, где n=10)



C8Verb (т.е. CnVerb, где n=8)



C8Palm (т.е. CnPalm, где n=8)



Важной чертой соединений общей формулы 1 в качестве противомикробных средств является положительный заряд этих соединений. Точная структура положительно заряженной составной группы не является конкретно важной при условии, что составная группа обладает достаточным гидрофобным характером, чтобы распределить положительный заряд, таким образом, чтобы соединение в целом было липофильным. Поскольку такие соединения исключаются из микробной клетки посредством MDR или другой защитной системы, соединения способны проникать обратно внутрь клетки благодаря электрическому заряду на наружной мембране микроба (с отрицательным зарядом внутри клетки). Эта черта делает соединения общей формулы 1 противомикробными средствами, пригодными для повторного применения.

В проводимых экспериментах авторы неожиданно обнаружили, что различные соединения общей формулы 1 обеспечивают противомикробный (т.е. противобактериальный или противогрибковый) эффект. Частично этот эффект можно объяснить способностью этих соединений подавлять системы MDR в бактериях или грибах. Эти полученные результаты предоставляют новую область применения соединений общей формулы 1. Этой областью применения является лечение различных инфекционных заболеваний, вызванных грибами, бактериями или некоторыми вирусами. Как продемонстрировано в экспериментальных примерах, противомикробные свойства соединений общей формулы 1 обеспечивают, чтобы это лечение было произведено посредством соединения общей формулы 1 в отдельности, т.е. посредством монотерапии. Другой набор экспериментальных примеров продемонстрировал, что соединения общей формулы 1 способны подавлять MDR систему в бактериях или грибах. Таким образом, другим аспектом изобретения является применение соединений общей формулы 1 в комбинации с другим противомикробным средством. Это средство может быть антибиотиком (противобактериальным средством), противогрибковым средством (антимикотическое средство) или антисептиком.

Предварительные исследования липофильных катионов продемонстрировали, что эти соединения обладают противовоспалительными свойствами (WO 2012/167236, WO 2014/116591, WO 2011/162633, Zinovkin R.A. et al., Aging (Albany NY). 2014; 6(8):661-74). Таким образом, другим аспектом настоящего изобретения является применение преимуществ соединений общей формулы 1 в качестве средства, обеспечивающего как противомикробный, так и противовоспалительный эффекты. Однако другим аспектом изобретения является способ лечения пациента, который бы получил преимущество от одновременного подавления инфекции и воспаления.

В объеме настоящего изобретения лечение инфекции может быть системным или местным. Системное лечение в качестве неограничивающих примеров включает пероральное введение, внутривенную инъекцию, назальное введение, ректальное введение соединений общей формулы 1 пациенту. Местное лечение в качестве неограничивающих примеров включает введение в форме глазных капель, гелей, мазей, лосьонов, спреев, бандажей.

Экспериментальные примеры и примеры композиций представлены ниже с единственной целью

проиллюстрировать применимость по изобретению и не должны рассматриваться в качестве примеров, ограничивающих объем по пунктам настоящего изобретения.

Следующие сокращения применяют в примерах:

SkQ1 - пластохинондецилтрифенилфосфоний,

C₁₂TRP - додецилтрифенилфосфоний,

R6G - родамин 6G,

MDR - множественная лекарственная устойчивость,

FCCP - цианид п-трифторметоксифенил гидразон,

ABC - АТФ-связывающие кассеты,

MIC - минимальная концентрация ингибитора.

Примеры композиций

В основном композиции, представленные по изобретению, включают эффективное количество проникающих через мембрану катионов в отдельности и/или с другим противобактериальным или противогрибковым средством. Ниже представлены некоторые неограничивающие примеры возможных композиций:

(1) Композиции, содержащие эффективное количество одного или нескольких проникающих через мембрану катионов по изобретению и эффективное количество одного или нескольких ингибиторов синтеза эргостерола, включая, без ограничений, одно или несколько из кетоконазола или итраконазола, флуконазола, вориконазола, позаконазола, равуконазола, бифоназола, бутконазола, клотидазола, клотримазола, кроконазола, эконазола, фентиконазола, изоконазола, миконазола, нетиконазола, омоконазола, оксиконазола, сертаконазола, сульконазола, тиоконазола, терконазола и гексаконазола.

(2) Композиции, содержащие эффективное количество одного или нескольких катионов, проникающих через мембрану по изобретению, и эффективное количество одного или нескольких эргостероловых дезинтеграторов мембраны, включая, без ограничений, одно или несколько из амфотерицина В, гамицина, натамицина и нистатина.

(3) Композиции, содержащие эффективное количество одного или нескольких проникающих через мембрану катионов по изобретению и эффективное количество одного или нескольких ингибиторов сквален-эпоксидазы, включая, без ограничений, одно или несколько из морфолинов, аморолфина, тербинафина и нафтифина.

(4) Композиции, содержащие эффективное количество одного или нескольких проникающих через мембрану катионов по изобретению и эффективное количество одного или нескольких ингибиторов р-глюкан синтазы, включая, без ограничений, одно или несколько из анидулафунгина, каспофунгина и микафунгина.

(5) Композиции, содержащие эффективное количество одного или нескольких проникающих через мембрану катионов по изобретению и эффективное количество одного или нескольких ингибиторов синтеза хитина, включая, без ограничений, никомидин и полиоксисин.

(6) Композиции, содержащие эффективное количество одного или нескольких проникающих через мембрану катионов по изобретению и эффективное количество одного или нескольких ингибиторов синтеза грибок-специфичных белков, включая, без ограничений, сордарины.

(7) Композиции, содержащие эффективное количество одного или нескольких проникающих через мембрану катионов по изобретению и эффективное количество одного или нескольких ингибиторов тимидилат синтазы, включая, без ограничений, флуцитозин.

(8) Композиции, содержащие эффективное количество одного или нескольких проникающих через мембрану катионов по изобретению и эффективное количество одного или несколько грибок-специфичных ингибиторов митоза, включая, без ограничений, гризеофульвин.

(9) Композиции, содержащие эффективное количество одного или нескольких проникающих через мембрану катионов по изобретению и эффективное количество одного или несколько антимикотиков, включая, без ограничений, одно или несколько из бромхлорсалициланилида, метилрозанилина, трибромметакрезола, ундециленовой кислоты, полиноксалина, хлорфетанола, хлорфенезина, тиклатона, сулбентина, этилпарабена, галопрогина, салициловой кислоты, сульфида селена, циклопирокса, аморолфина, димазола, толнафтата, толциклата и тауролидина.

Экспериментальные примеры

Экспериментальный пример 1. Противогрибковый эффект соединений общей формулы 1.

В этом эксперименте авторы применяли дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* в качестве модельных грибов. Авторы обнаружили, что ABC-транспортер Pdr5p защищает клетки от противогрибковых эффектов C₁₂TRP, соединения общей формулы 1. В соответствии с этим авторы продемонстрировали, что C₁₂TRP усиливает токсические эффекты Pdr5p субстратов циклогексимида D и клотримазола и также ингибирует отток родамина 6G. Это демонстрирует, что C₁₂TRP является эффективным конкурентным ингибитором MDR. Важной чертой C₁₂TRP и других проникающих липофильных катионов является их способность повторно входить в клетки благодаря электрическому заряду на наружной мембране клеток. Таким образом, C₁₂TRP и другие проникающие липофильные катионы действуют в качестве способных к повторному использованию MDR ингибиторов, демонстрирующих высокую эффективность.

Штаммы и условия роста.

В данном примере авторы применяли W303-1A *S. cerevisiae* штаммы и их производные: AD1-8 с делециями восьми MDR генов [W303-1A, *yor1::hisG*, *sng2::hisG*, *pdr5::hisG*, *pdr10::hisG*, *pdr11::hisG*, *ycf1::hisG*, *pdr3::hisG*, *pdr15::hisG*] [4] D, FGAL-PDR5 [W303-1A HIS3::P_{GAL}-PDR5], P_{GAL}-SNQ2 [W303-1A HIS3::P_{GAL}-SNQ2] и VGAL-MIN1 [W303-1A HIS3::P_{GAL}-YOR1] (данное исследование).

Клетки выращивали в среде YPD (2% глюкоза, 1% бактопептон, 1% дрожжевой экстракт) или в YPGal (2% галактоза, 1% бактопептон, 1% дрожжевой экстракт). Для генетического скрининга и поддержания штаммов, экспрессирующих гены при определенных условиях, применяли синтетические среды исключения YNB-Leu или Y B-His в соответствии с Sherman 2000 [5]. Скорости роста измеряли посредством повышения светорассеяния ($\lambda=550$ нм) в жидкой дрожжевой культуре.

Микроскопия.

Клетки, окрашенные R6G, визуализировали с применением непосредственно микроскопа Olympus BX2 и набора фильтров U-MNG2 (возбуждение 530-550 нм, 570 нм светоделительный фильтр, эмиссия >590 нм).

Генетический скрининг.

Дрожжи мутанты W303 штамма *S. Cerevisiae*, несущие мультикопийную плазмиду YEpl3 с вставками 8-10 Kb в BamHI участке рестрикции, были сконструированы посредством трансформации. Проводили три цикла обогащения коллекции мутантов C₁₂TRP устойчивых штаммов. Во время каждого цикла мутанты в логарифмической стадии роста на среде YNB-LEU обрабатывали с применением 18 мкМ C₁₂TRP в течение 3 ч, затем отмывали, разбавляли и выращивали в течение ночи на свежей твердой YNB-LEU. После третьего цикла клетки переносили на твердую среду YNB-LEU. C₁₂TRP устойчивость отдельных колоний сравнивали с диким типом. Чтобы идентифицировать гены, содержащиеся в мультикопийной плазмиде, геномные ДНК выбранных штаммов были трансформированы в *E.coli*. Локусы вставки определяли посредством секвенирования выбранных плазмид с YEpl3-BCTaBKou с применением праймеров YEpl3-DIR 5'-cgctatatgcggtgatgc YEpl3-REV5'-cctgccaccataccacg.

Отток родамина 6G.

Для измерения относительной скорости оттока родамина 6G авторы применяли флуориметрический анализ, примененный Kolaczek et al. [6], с несколькими модификациями. Клетки выращивали в течение ночи в 40 мл в жидкой YPD до плотности $0,5-1 \times 10^7$ клетки/мл, отмывали дважды с применением холодной стерильной воды и ресуспендировали в 10 мл фосфатно-солевого буфера, дополненного 5 мМ 2-дезоксиглюкозы и 2,5 мМ 2,4-динитрофенола. Клеточную суспензию инкубировали в течение 45 мин на ротационном шейкере, затем ингибиторы удаляли посредством двух циклов центрифугирования/ресуспендирования в холодной воде. Лишенные энергии клетки ресуспендировали в 10 мл PBS, а затем окрашивали R6G (10 мкМ) в течение 30 мин. Затем клеточную суспензию осаждали, ресуспендировали в равном объеме PBS и хранили на льду в течение 1-5 ч. Измерения оттока проводили посредством флуориметрической системы FluoroMax-3 с длиной волны возбуждения 480 нм и длиной волны испускания 560 нм. Отток R6G инициировали посредством добавления 0,1% глюкозы, плотность клеток во флуориметрической кювете составляла 10^6 клеток/мл.

Анализ выживаемости.

Экспоненциально растущие клетки брали и обрабатывали с применением указанного количества C₁₂TRP или SKQ1 в течение 3 ч. Затем клеточные суспензии высевали на твердую среду YPD и инкубировали в течение 48 ч, число образовавшихся колоний подсчитывали. 100% относится к числу колониеобразующих единиц (КОЕ) в дрожжевой суспензии в начале эксперимента.

Статистика.

Знаковый ранговый критерий Вилкоксона ($n=3-11$) и углы наклона флуориметрических кривых рассчитывали с применением пакета программного обеспечения R. Величины ошибок на фигурах отражают стандартные ошибки среднего.

Результаты и обсуждение.

Чтобы посмотреть, может ли C₁₂TRP ингибировать активность MDR помпы, авторы в первую очередь решили выявить конкретную помпу, которая изгоняет его из клеток *S. cerevisiae*. Авторы произвели генетический скрининг дрожжей *S. cerevisiae* с применением библиотека генома дрожжей на мультикопийной плазмиде. В результате выявлено, что плазмиды с фрагментом хромосомы II (координирует от 216287 до 222344), экспрессирующим два гена, LDB7 и PDR3, обеспечивала значительное повышение устойчивости до 20 мкМ C₁₂TRP. Pdr3p является фактором транскрипции, ответственным за положительную регуляцию (**повышение экспрессии**) набора ABC-транспортёров, включая три неспецифичных гена MDR помп: PDR5, SNQ2 и YOR1 [7-9]. Эти данные дают веские основания предполагать, что C₁₂TRP является субстратом одной из этих помп. Чтобы выявить специфическую помпу, ответственную за C₁₂TRP детоксикацию, авторы произвели набор мутантных штаммов с соответствующими генами под контролем индуцируемых галактозой, подавляемых глюкозой GAL промоторов.

Как оказалось, экспрессия PDR5 является критической для устойчивости клеток к C₁₂TRP, тогда как подавление SNQ2 или YOR1 не продемонстрировало статистически достоверного эффекта (фиг. 1B).

Таким образом, сверхэкспрессия PDR5 обеспечивала умеренную защиту от высоких концентраций $C_{12}TPP$ (фиг. 1С). Авторы не наблюдали никакого эффекта сверхэкспрессии MDR в случае SkQ1. Возможно, основные уровни экспрессии помп, которые изгоняют SkQ1, являются достаточными для предотвращения его токсичности.

Одним возможным объяснением этих результатов является то, что $C_{12}TPP$ изгоняется посредством Pdr5 из дрожжевых клеток и что $C_{12}TPP$ конкурирует с другими PDR5 субстратами. Фактически, низкие концентрации $C_{12}TPP$ усиливают окрашивание дрожжевых клеток положительно заряженным флуоресцентным красителем родамином 6G (фиг. 2А), который вероятно является Pdr5p субстратом [6]. Таким образом, в лишенных энергии клетках R6G накапливается в высокой концентрации, и после добавления глюкозы флуоресценция внутри клетки повышается и остается в наибольшей степени в поляризованных митохондриях (фиг. 2В). Авторы измеряли отток R6G из интактных дрожжевых клеток посредством флуориметрического способа. Отток визуализировали посредством флуоресцентной спектроскопии: родамин 6G является самогасящимся в клетках, и, таким образом, высвобождение R6G приводит к обнаруживаемому повышению общей флуоресценции красителя (фиг. 3А). Важно, что высвобождение R6G является полностью подавленным в MDR-негативных клетках, не обладающих всеми главными PDR генами (фиг. 3В).

Добавление разобщающего агента FCCP было способно частично предотвращать отток R6G (фиг. 3С), в то время как $C_{12}TPP$ и SkQ1 оказались гораздо более эффективными в этом отношении (фиг. 3Д, Е). Очевидно, что этот эффект липофильных катионов мог быть или из-за непосредственного ингибирования MDR помп или результатом митохондриального разобщения, вызванного снижением концентрации АТФ. Однако снижение концентрации АТФ кажется неочевидным, потому что FCCP является гораздо более мощным разобщающим агентом, чем $C_{12}TPP$ [10]. Кроме того, этот возможный эффект $C_{12}TPP$ может быть исключен, потому что он также способен ингибировать отток R6G в клетках, предварительно обработанных избытком NaN_3 (фиг. 3F). NaN_3 ингибирует как дыхательную цепь [11] и митохондриальную АТФ синтазу [12]. В то же время в отличие от другого ингибитора АТФ синтазы, олигомицина, он не так эффективен в отношении ингибирующей MDR активности в дрожжах [6]. Таким образом, в присутствии 10 мМ NaN_3 вклад митохондрий в снабжение АТФ оказываются минимальными, и эффекты $C_{12}TPP$ и SkQ1 вызваны в основном подавлением MDR.

Является ли возможным индуцировать захват других PDR5 субстратов посредством добавления $C_{12}TPP$? Чтобы проверить это, авторы измеряли скорость роста дрожжевых клеток в присутствии ингибитора синтеза белков циклогексимида D (ChD) который является хорошо известным субстратом Pdr5 [13]. Выявлено, что 1 мкМ $C_{12}TPP$ значительно усиливает ингибирующее действие ChD (фиг. 4А). Кроме того, $C_{12}TPP$ усиливает действие противогрибкового клотримазола (фиг. 4В), который так же, как сообщалось ранее, является субстратом MDR-помп дрожжей [14]. Важно, что авторы не детектировали какой-либо значительной стимуляции токсичности для другого противогрибкового средства - амфотерицина В, который действует в плазматической мембране и не соотносится с субстратами ABC-помп.

В заключение, вместе с предварительными наблюдениями данные демонстрируют, что $C_{12}TPP$ ингибирует множественную лекарственную устойчивость и позволяет предположить, что это ингибирование происходит благодаря футильному циклу его изгнания с последующим возвратом в клетки. Таким образом, это можно использовать для повышения клеточного захвата других субстратов ABC-транспортера (включая другие амфифильные соединения). Примечательно, что ранее было показано, что $C_{12}TPP$ облегчает транспорт анионных молекул через мембраны: флуоресцентного красителя флуоресцеина [15], жирных кислот [16] и анионных разобщающих агентов [10]. Таким образом, $C_{12}TPP$ оказывается универсальным пермеабиллизатором плазматической мембраны. Таким образом, полученные результаты делают его перспективной добавкой для антимикотических лекарственных средств для предотвращения их оттока из клеток.

В следующем эксперименте авторы тестировали додецил родамин $C_{12}RI$ (см. Antonenko et al., 2012; doi: 10, 1074/jbc.M 110,212837). Авторы выявили, что это соединение было накоплено в лишенных энергии дрожжевых клетках сходным путем с родамином 6G. Добавление глюкозы к таким клеткам стимулировало отток $C_{12}RI$. Отток детектировали посредством снижения самогашения во флуориметрической кювете посредством повышения флуоресцентного сигнала (длина волны возбуждения составляла 480 нм, длина волны эмиссии 560 нм). Авторы выявили, что эффективный отток можно было наблюдать только в клетках, сверхэкспрессирующих PDR5 гены (фиг. 5, 6). Этот результат указывает, что, будучи экспортируемыми посредством Pdr5p мультилекарственного эффлюксного насоса, $C_{12}RI$ может быть извлечен из клетки только при условии сверхэкспрессии PDR5. Затем авторы продемонстрировали, что $C_{12}TPP$ предотвращает отток $C_{12}I$. Это подтверждает, что $C_{12}TPP$ и $C_{12}I$ являются субстратами MDR-помпы Pdr5p.

Затем авторы протестировали способность $C_{12}RI$ повышать чувствительность клеток грибов к распространенным противогрибковым средствам. Выявлено, что в нетоксичных концентрациях $C_{12}RI$ повышает токсичность противогрибкового средства клотримазола и хлорид бензалкония (фиг. 7).

Экспериментальный пример 2. Противобактериальный эффект соединений общей формулы 1.

Транспортеры мультилекарственного оттока вызывают серьезные проблемы при лечении бактери-

альных инфекций и противоопухолевой химиотерапии. В грамотрицательных бактериях, таких как *E.coli*, транспортеры, относящиеся к семейству resistance-nodulation-cell division (RND), являются конкретно эффективными при формировании устойчивости, потому что они образуют трехчленный комплекс с периплазматическими белками и белком канала наружной мембраны [Du D. et al. (2014), Structure of the AcrAB-TolC multidrug efflux pump. *Nature*, 509, 512-15]. AcrAB-TolC эффлюксный насос способен транспортировать большое число соединений с небольшим химическим сходством, таким образом обеспечивая устойчивость к широкому спектру антибиотиков [Pos K.M. (2009), Drug transport mechanism of the AcrB efflux pump. *Biochem. Biophys. Acta*, 1794, 782-793; Seeger M.A. et al. (2008), The AcrB Efflux pump: Conformational Cycling and Peristalsis Lead to multidrug resistance. *Current Drug Targets*, 2008, 9, 729-749; Sulavik M.C. et al. (2001) Antibiotic Susceptibility Profiles of Escherichia coli Strains Lacking Multidrug Efflux pump genes. *Susceptibility Profiles of Escherichia. Antimicrob. Agents Chemother*, 45, 4, 1126-1136]. AcrAB-TolC система состоит из RND транспортера AcrB, мембранного белка слияния AcrA и мультифункционального канала наружной мембраны TolC. TolC является универсальным каналом наружной мембраны для экспорта токсинов и оттока лекарственных средств [Andersen C, Hughes C, Igonakis V. (2001) Экспорт белков и отток лекарственных средств через бактериальные каналы. *Curr Opin Cell Biol.*, 13, 412-416]. TolC взаимодействует с разнообразием транспортеров внутренней мембраны и предоставляет возможность *E.coli* вытеснять структурно различные молекулы из клеток. В *E.coli* AcrB, AcrD, AcrEF, MdtABC и MdtEF относятся к RND транспортерам и нуждаются в функционировании TolC. [Horiyama T. и Nishino K. (2014), AcrB, AcrD, and MdtABC Multidrug Efflux Systems Are Involved in Enterobactin Export in Escherichia coli. *PLoS ONE* 9, 9, e10864].

Противобактериальная активность 1 мкМ SkQ1.

Способ роста в жидкой среде выбирали в качестве способа тестирования противобактериальной активности SkQ1. В течение ночи культуры бактериальных клеток разбавляли в свежих LB средах. Бактериальную клеточную культуру (5×10^6 клетка/мл) инокулировали 200 мкл в 96-луночные планшеты (Eppendorf, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) и SkQ1 или C_n TPP добавляли, чтобы достичь различных конечных концентраций в диапазоне от 0,5 до 200 мкМ. Клетки оставляли для роста в течение 21 ч при 37°C. Оптическую плотность при 600 нм измеряли с применением многорежимного считывателя AnthosZenyth 3100 (Anthos Labtec, Austria) во время инкубации.

Авторы выбрали клетки *Escherichia coli* в качестве грамотрицательного модельного организма и клетки *Bacillus subtilis* в качестве грамположительного модельного организма. SkQ1 выбрали в качестве модельного соединения формулы 1 с антиоксидантной составной группой. Чтобы выбрать надлежащую концентрацию соединения формулы 1 авторы произвели анализ ингибирования роста для некоторых концентраций SkQ1 (см. фиг. 8А и В). В результате этого эксперимента можно заключить, что 1 мкМ SkQ1 является минимальной ингибирующей концентрацией (MIC) для клеток *B. subtilis*. Но эта концентрация значительно не ингибировала рост клеток *E.coli*. Было выявлено, что 50 мкМ SkQ1 является MIC для клеток *E.coli*. Эти результаты указывают на то, что SkQ1 обладает сильной противомикробной активностью против грамположительных бактериальных клеток и умеренной противомикробной активностью против грамотрицательных бактерий.

Противобактериальная активность C_n TPP.

Авторы протестировали устойчивость *B.subtilis* к производным трифенилфосфония из выбранных диапазонов концентрации, таких как, додецилтрифенилфосфоний (C_{12} TPP), децилтрифенилфосфоний (C_{10} TPP), октилтрифенилфосфоний (C_8 TPP) и бутилтрифенилфосфоний (C_4 TPP). Авторы произвели анализ ингибирования роста для некоторых концентраций производного трифенилфосфония (см. фиг. 9) и определили MIC для *B. subtilis* для всех используемых производных трифенилфосфония, за исключением C_4 TPP. Наблюдали постепенное повышение ингибирующей концентрации для C_n TPP с растущей длиной углеводородного хвоста. Неожиданным было то, что MIC C_4 TPP не мог быть достигнут в этом эксперименте. Эти результаты указывают на то, что C_n TPPs, за исключением C_4 TPP, обладают противомикробной активностью против грамположительных бактериальных клеток.

Противобактериальная активность других соединений общей формулы 1.

В следующих экспериментах авторы применили различные соединения общей формулы 1, такие как SkQ5, SkQT, SkQThy, SkQT-пара и SkQ3. Авторы произвели анализ ингибирования роста для некоторых концентраций выбранных соединений (см. фиг. 10А и В) и выявили, что все из выбранных производных трифенилфосфония обладают противомикробной активностью. Эти результаты указывают на то, что все выбранные соединения общей формулы 1 обладают противомикробной активностью, основанной на длине углеводородного линкера и антиоксидантной структуре (т.е. переменных величин А, m и n общей формулы 1).

Противобактериальная активность SkQ1 против TolC-требуемых RND эффлюксных насосов (MDR).

В этом эксперименте авторы протестировали, отвечает ли TolC-зависимый транспортер за устойчивость клеток *E.coli* к SkQ1. В эксперименте авторы применили одногенные нокаутные мутанты из коллекции Keio [Baba T., et al. (2006)]. Конструкция одногенных нокаутных мутантов внутри рамки *Escherichia coli* K-12: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* 2, 2006.0008]. Авторы выявили, что мутант с

TolC-делецией потерял устойчивость к SkQ1 и продемонстрировал ту же чувствительность, что и *B. subtilis*, с минимальной бактерицидной концентрацией около 2 мкМ. Сходные результаты наблюдали для мутантов с AcrA и AcrB делецией (см. фиг. 11). Авторы применяли другие нокаутные мутанты генов, кодирующие белки транспортеров, которые требуют TolC для своей функции. Делеция всех транспортерных генов, за исключением AcrA и AcrB, не влияла на устойчивость клеток *E. coli* (данные не показаны). В противоположность, делеция генов *acrA* или *acrB* кардинально изменила чувствительность клеток *E. coli* к SkQ1. Мутанты с AcrA- или AcrB-делецией продемонстрировали сходную чувствительность с мутантом с делецией TolC (см. таблицу). Эти результаты демонстрируют, что устойчивость *E. coli* к SkQ1 может быть результатом AcrAB-TolC транспортной активности.

Противобактериальная активность C_n TPP против TolC-требующих RND эффлюксных насосов.

Авторы протестировали устойчивость мутанта с TolC-делецией к другим соединениям общей формулы 1, таким как додецилтрифенилфосфоний (C_{12} TPP), децилтрифенилфосфоний (C_{10} TPP), октилтрифенилфосфоний (C_8 TPP), бутилтрифенилфосфоний (C_4 TPP). Концентрации соединений выбирали на основе допущения, что минимальная концентрация должна составлять приблизительно минимальную бактерицидную концентрацию соединений для *B. subtilis* (фиг. 12), и максимальная концентрация не должна достигать половины минимальной бактерицидной концентрации соединений для клеток *E. coli* (данные не показаны). Авторы наблюдали, что мутант с TolC-делецией также утратил устойчивость к соединению общей формулы 1 (фиг. 12). Мутант с TolC-делецией обладал чувствительностью к C_n TPP как *B. subtilis*. Эти результаты указывают на то, что все выбранные C_n TPPs обладают противомикробной активностью против мутанта с TolC-делецией, демонстрируя, что АСТ АВ-TolC транспортер является ответственным за отток C_n TPP из клеток.

Результаты анализа ингибирования роста для мутантов с делецией генов, кодирующих белки TolC-требующих

эффлюксных насосов

НЕВОЗМОЖНОСТЬ РОСТА				
	5 мкМ SkQ1	30 мкМ SkQ1	5 мкМ C_{12} -TPP	30 мкМ C_{12} -TPP
<i>E. coli</i>	НЕТ	НЕТ	НЕТ	НЕТ
Δ TolC	ДА	ДА	ДА	ДА
Δ AcrA	ДА	ДА	ДА	ДА
Δ AcrB	ДА	ДА	ДА	ДА
Δ AcrD	НЕТ	НЕТ	НЕТ	НЕТ
Δ AcrE	НЕТ	НЕТ	НЕТ	НЕТ
Δ AcrF	НЕТ	НЕТ	НЕТ	НЕТ
Δ MdtA	НЕТ	НЕТ	НЕТ	НЕТ
Δ MdtB	НЕТ	НЕТ	НЕТ	НЕТ
Δ MdtD	НЕТ	НЕТ	НЕТ	НЕТ
Δ MdtE	НЕТ	НЕТ	НЕТ	НЕТ
Δ MdtF	НЕТ	НЕТ	НЕТ	НЕТ

Делеция штаммов JW5503 (лишенных гена *tolC*), JW0452 (лишенных гена *acrA*), JW0451 (лишенных гена *acrB*), JW2454 (лишенных гена *acrD*), JW3233 (лишенных гена *acrE*), JW3234 (лишенных гена *acrF*), JW5338 (лишенных гена *mdtA*), JW2060 (лишенных гена *mdtB*), JW2061 (лишенных гена *mdtC*), JW3481 (лишенных гена *mdtE*) и JW3482 (лишенных гена *mdtF*) была описана в Baba T., et al. (2006). Конструкция мутантов с одногенным нокаутом внутри рамки *Escherichia coli* - 12: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* 2, 2006.0008.

Эксперимент с накоплением бромистого этидия.

Для подтверждения того, является ли AcrAB-TolC подходящим транспортером, авторы применяли тест на основе измерения утечки бромистого этидия через интактные бактериальные мембраны. Если SkQ1 является субстратом для AcrAB-TolC транспортера, тогда ожидают, что утечка бромистого этидия через бактериальные мембраны будет сравнима с утечкой бромистого этидия во время осмотического шока, когда концентрация SkQ1 составляет приблизительно минимальную бактерицидную концентрацию для *E. coli*. Бактериальные клетки получали и ресуспендировали в PBS. Для эмульсии протечки клеточной мембраны бактериальные клетки ресуспендировали в деионизированной воде (система очистки воды Milli-Q, EMD Millipore, Billerica, MA). Бромистый этидий добавляли (20 мкг/мл) и изменение интенсивности флуоресценции записывали на спектрофлуориметр Fluorat-02-Panorama (Lumex Instruments, Russia). Для повышения накопления бромистого этидия SkQ1 добавляли, чтобы достичь концентрации 50 мкМ. Как правило, клетки *E. coli* дикого типа обладают устойчивостью к бромистому этидию до

800 мкг/мл, таким образом, при концентрации бромистого этидия 20 мкг/мл авторы не ожидали увидеть утечку бромистого этидия через бактериальные мембраны, за исключением случая добавления исчерпывающей концентрации субстрата. Авторы наблюдали накопление бромистого этидия, когда концентрация бромистого этидия была в 40 раз меньше, чем МИС для клеток *E.coli*, что может быть только результатом коллатерального действия SkQ1 и бромистого этидия в качестве субстратов для AcrAB-TolC транспортера. В результате было подтверждено, что SkQ1 является субстратом для AcrAB-TolC транспортера, потому что авторы наблюдали утечку бромистого этидия через бактериальные мембраны, сравнимые с утечкой бромистого этидия во время осмотического шока, когда авторы добавляли SkQ1, чтобы достичь минимальной бактерицидной концентрации для *E.coli* (фиг. 13А и В).

Ссылки для экспериментального примера 1.

[1] S. Shukla, V. Yadav, G. Mukhopadhyay, R. Prasad, Ncb2 is involved in activated transcription of CDR1 in azole-resistant clinical isolates of *Candida albicans*., *Eukaryot. Cell.* 10 (2011) 1357- 66. doi: 10.1128/EC.05041-11.

[2] B.A. McManus, E. McGovern, G.P. Moran, CM. Healy, J. Nunn, P. Fleming, et al, Microbiological screening of Irish patients with autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy reveals persistence of *Candida albicans* strains, gradual reduction in susceptibility to azoles, and incidences of clinical signs of oral candid, *J. Clin. Microbiol.* 49 (2011) 1879-89. doi: 10.1128/JCM.00026-11.

[3] Y.N. Antonenko, A. V Avetisyan, L.E. Bakeeva, B. V Chernyak, V.A. Chertkov, L. V Domnina, et al., Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. 1. Cationic plastoquinone derivatives: synthesis and in vitro studies., *Biochem. BiokhimiiDa.* 73 (2008) 1273-87.

[4] A. Decottignies, A.M. Grant, J.W. Nichols, H. de Wet, D.B. McIntosh, A. Goffeau, ATPase and multidrug transport activities of the overexpressed yeast ABC protein Yor1 p., *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 12612-22.

[5] F. Sherman, Getting started with yeast., *Methods Enzymol.* 350 (2002) 3-41.

[6] M. Kolaczowski, M. van der Rest, A. Cybularz-Kolaczowska, J.P. SoumiUion, W.N. Konings, A.Goffeau, Anticancer drugs, ionophoric peptides, and steroids as substrates of the yeast multidrug transporter Pdr5p., *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 31543-8.

[7] D.J. Katzmann, T.C. Hallstrom, M. Voet, W. Wysock, J. Golin, G. Volckaert, et al, Expression of an ATP-binding cassette transporter-encoding gene (YOR1) is required for

oligomycin resistance in *Saccharomyces cerevisiae*., *Mol. Cell. Biol.* 15 (1995) 6875-83.

[8] D.J. Katzmann, P.E. Burnett, J. Golin, Y. Mahe, W.S. Moye-Rowley, Transcriptional control of the yeast PDR5 gene by the PDR3 gene product., *Mol. Cell. Biol.* 14 (1994) 4653-61.

[9] A. Decottignies, L. Lambert, P. Catty, H. Degand, E.A. Epping, W.S. Moye-Rowley, et al., Identification and characterization of SNQ2, a new multidrug ATP binding cassette transporter of the yeast plasma membrane., *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 18150-7.

[10] Y.N. Antonenko, L.S. Khailova, D.A. Knorre, O. V Markova, T.I. Rokitskaya, T.M. Ilyasova, et al, Penetrating cations enhance uncoupling activity of anionic protonophores in mitochondria., *PLoS One.* 8 (2013) e61902. doi:10.1371/journal.pone.0061902.

[11] W.O. James, The Use of Respiratory Inhibitors, *Annu. Rev. Plant Physiol.* 4 (1953) 59-90. doi: 10.1146/annurev.pp.04.060153.000423.

[12] P. Mitchell, J. Moyle, Activation and inhibition of mitochondrial adenosine triphosphatase by various anions and other agents., *J. Bioenerg.* 2 (1971) 1-11.

[13] G. Leppert, R. McDevitt, S.C. Falco, T.K. Van Dyk, M.B. Ficke, J. Golin, Cloning by gene amplification of two loci conferring multiple drug resistance in *Saccharomyces*., *Genetics.* 125 (1990) 13-20.

[14] J. Golin, S. V Ambudkar, M.M. Gottesman, A.D. Habib, J. Sczepanski, W. Ziccardi, et al, Studies with novel Pdr5p substrates demonstrate a strong size dependence for xenobiotic efflux., *J. Biol.Chem.* 278 (2003) 5963-9. doi: 10.1074/jbc.M210908200.

[15] T.I. Rokitskaya, N. V Sumbatyan, V.N. Tashlitsky, G.A. Korshunova, Y.N. Antonenko, VP. Skulachev, Mitochondria-targeted penetrating cations as carriers of hydrophobic anions through lipid membranes., *Biochim. Biophys. Acta.* 1798 (2010) 1698-706. doi: 10.1016/j.bbame.2010.05.018.

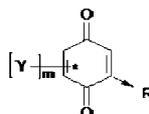
[16] F.F. Severin, I.I. Severina, Y.N. Antonenko, T.I. Rokitskaya, D.A. Cherepanov, E.N. Mokhova, et al., Penetrating cation/fatty acid anion pair as a mitochondria-targeted protonophore., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (2010) 663-8. doi: 10.1073/pnas.0910216107.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение ингибитора множественной лекарственной устойчивости (MDR), выбранного из липофильных катионов структурной формулы 1



где А является антиоксидантной группой, обладающей следующей структурой:



и/или их восстановленной формой (гидрохинон),

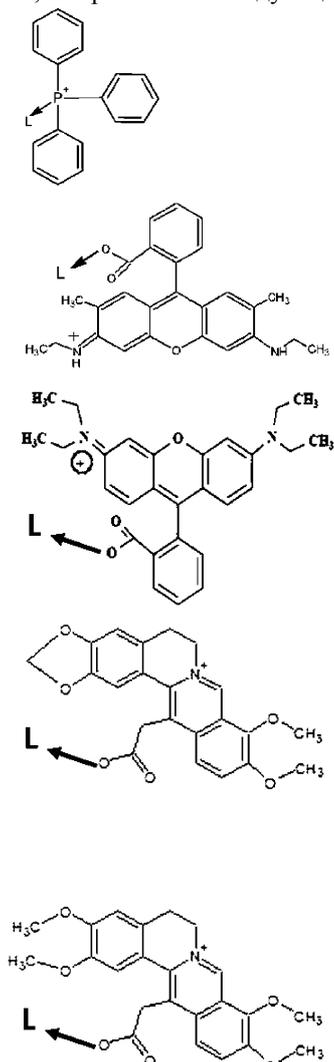
где m является целым числом от 0 до 3;

каждый Y представляет собой метил;

L является линкерной группой, которая представляет собой прямую или разветвленную углеводо-

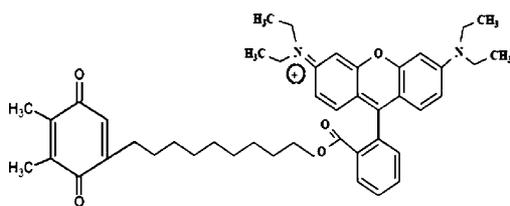
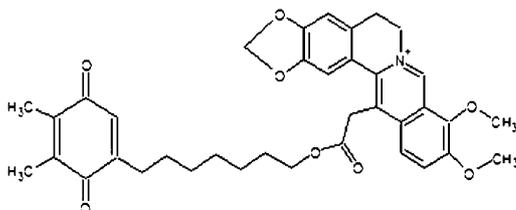
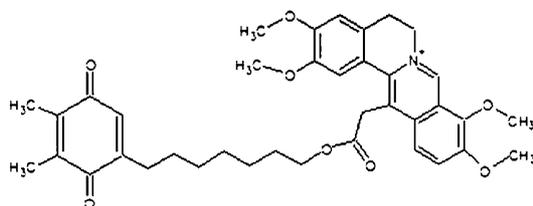
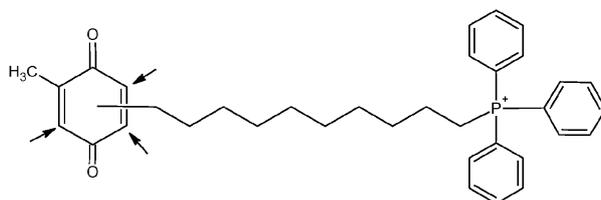
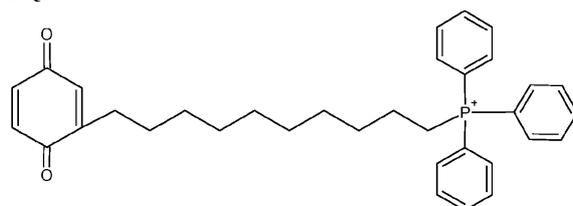
родную цепь, причем n означает длину углеводородного линкера и соответствует целому числу от 5 до 12; и

В является липофильным катионом, выбранным из следующих:

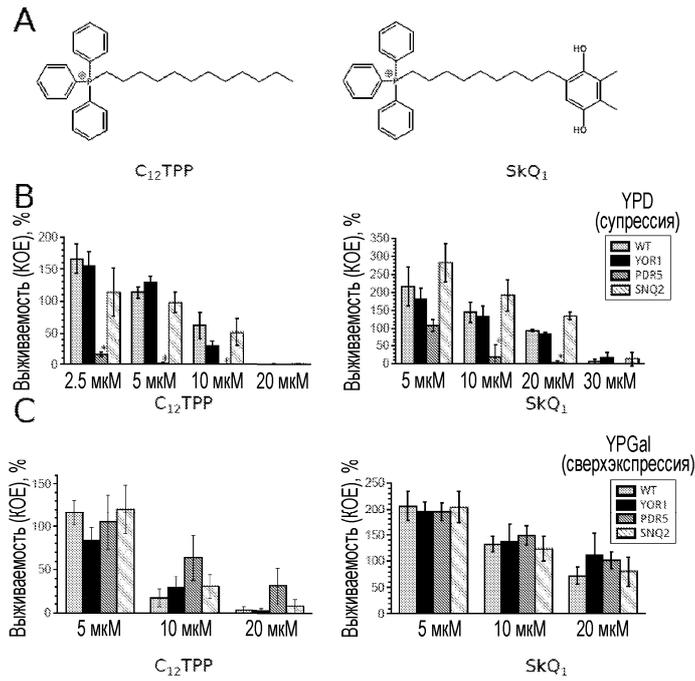


где стрелка означает место присоединения к линкеру L, и фармакологически приемлемого аниона для лечения микробной инфекции у инфицированного субъекта.

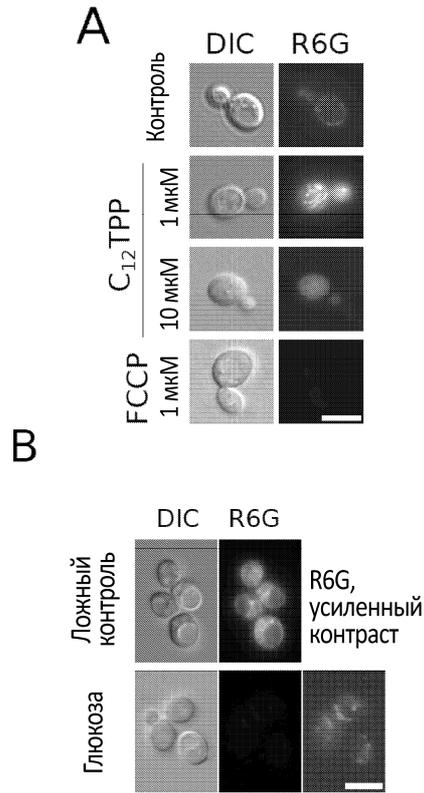
2. Применение по п.1, в котором длина углеводородного линкера n составляет 5, 7 или 10.
3. Применение MDR-ингибитора по п.1 или 2 в комбинации с одним или несколькими дополнительными противомикробными соединениями.
4. Применение по любому из пп.1-3, где один или несколько липофильных катионов является одним или несколькими из SkQ1, SkQ3, SkQ5, SkQR1, SkQRB, SkQB1, SkQBP1, SkQT, SkQB:

SkQRB**SkQB1****SkQBP1****SkQT****SkQB**

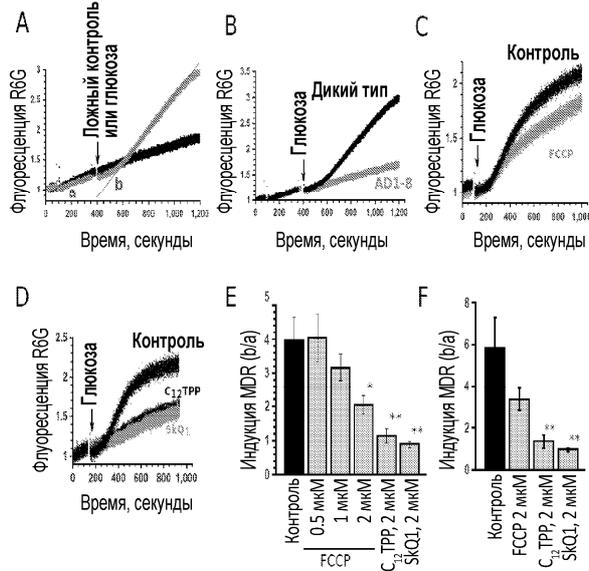
5. Применение по любому из пп.1-4, где микробные инфекции вызваны бактериями.
6. Применение по п.5, где микробные инфекции вызваны грамотрицательными бактериями.
7. Применение по п.5, где микробные инфекции вызваны грамположительными бактериями.
8. Применение по п.5, где микробные инфекции вызваны грамотрицательными бактериями и грамположительными бактериями.
9. Применение по любому из пп.1-4, где микробные инфекции вызваны грибами.
10. Применение по любому из пп.1-4, где микробные инфекции вызваны бактериями и грибами.
11. Применение по п.3 или 4, где дополнительное одно или несколько противомикробных соединений являются одним или несколькими противобактериальными средствами (антибиотиками).
12. Применение по п.3 или 4, где дополнительное одно или несколько противомикробных соединений являются одним или несколькими противогрибковыми соединениями.
13. Применение по п.3 или 4, где дополнительное одно или несколько противомикробных соединений являются одним или несколькими антисептиками.
14. Применение по п.3 или 4, где дополнительное одно или несколько противомикробных соединений являются одним или несколькими ингибиторами MDR помп.
15. Применение по п.3 или 4, где дополнительное одно или несколько противомикробных соединений являются одним или несколькими субстратами MDR помпы.



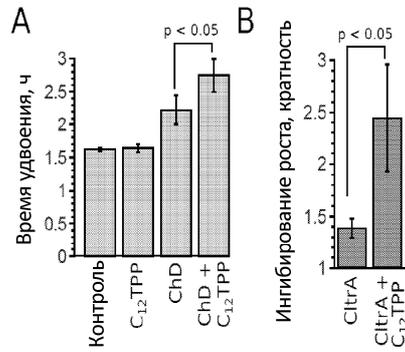
Фиг. 1



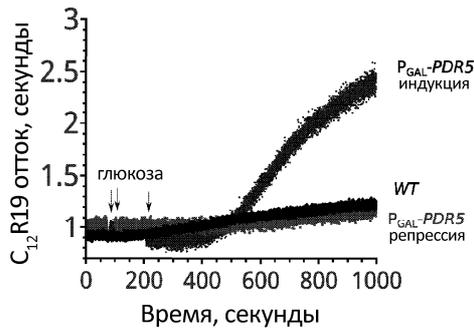
Фиг. 2



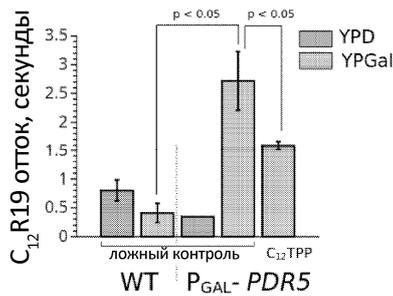
Фиг. 3



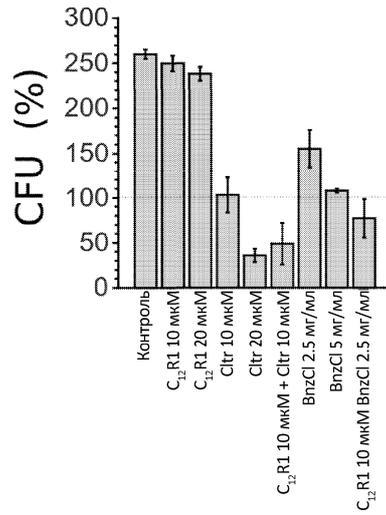
Фиг. 4



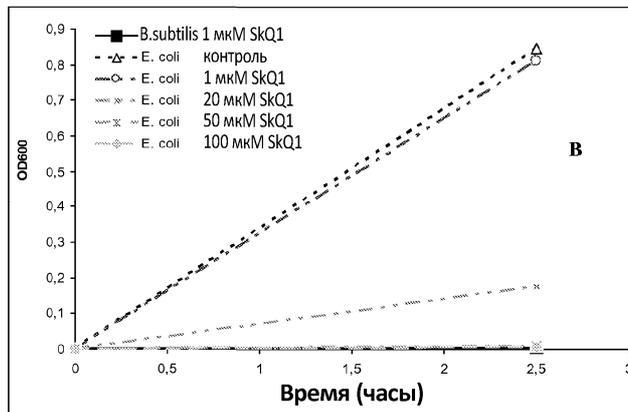
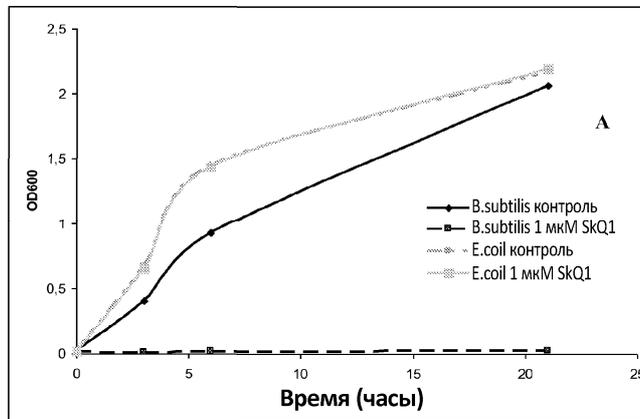
Фиг. 5



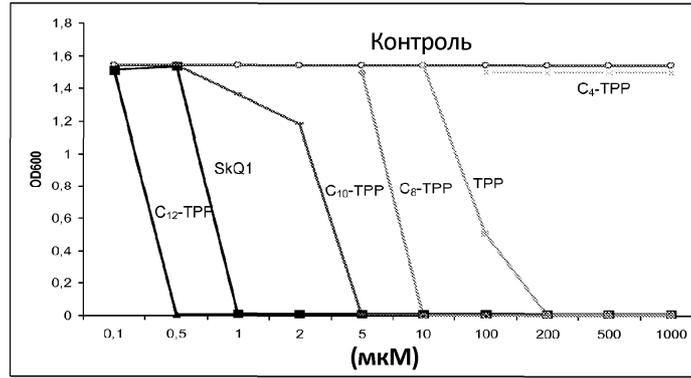
Фиг. 6



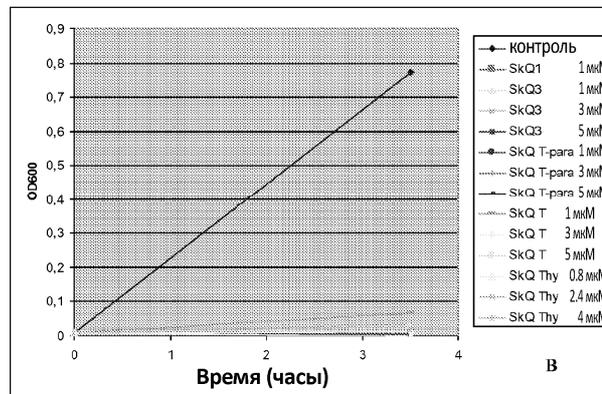
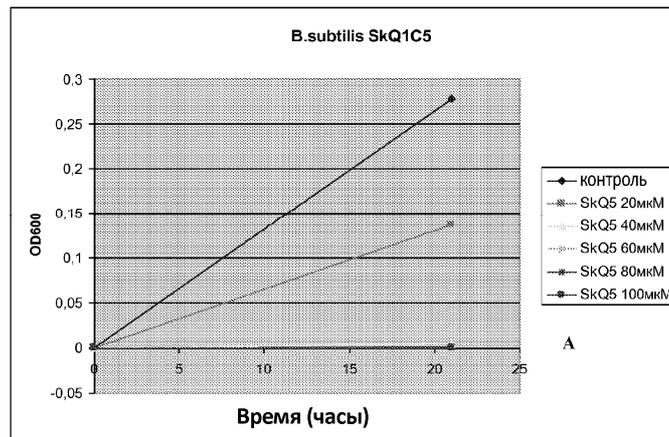
Фиг. 7



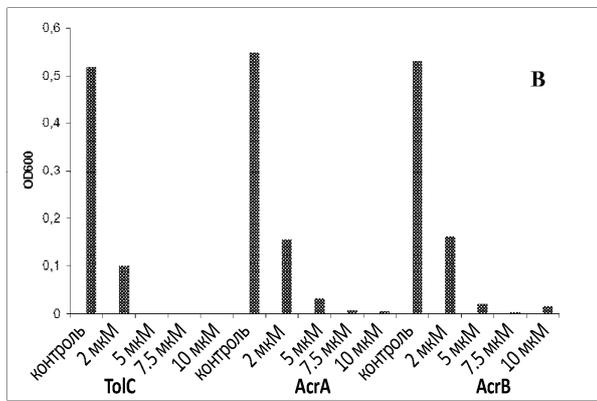
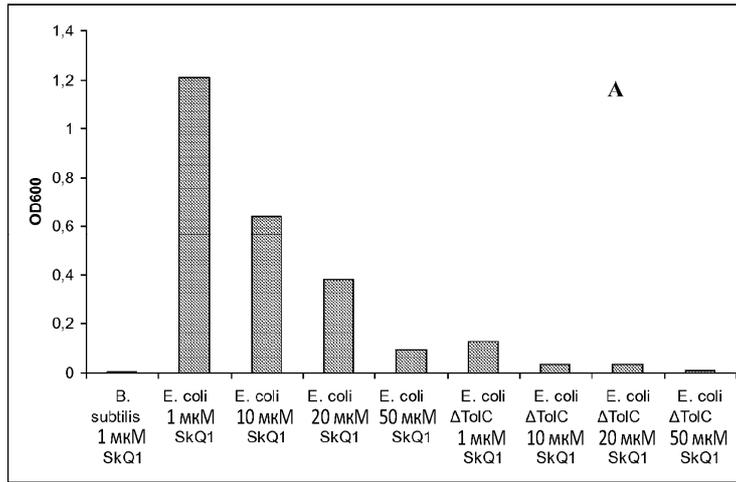
Фиг. 8



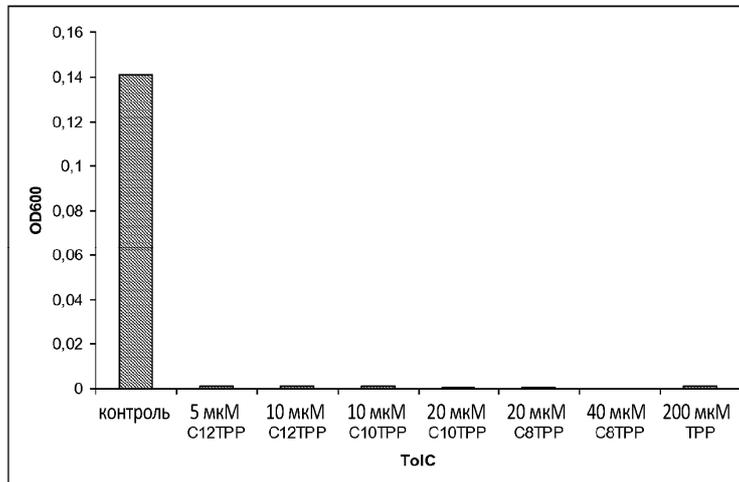
Фиг. 9



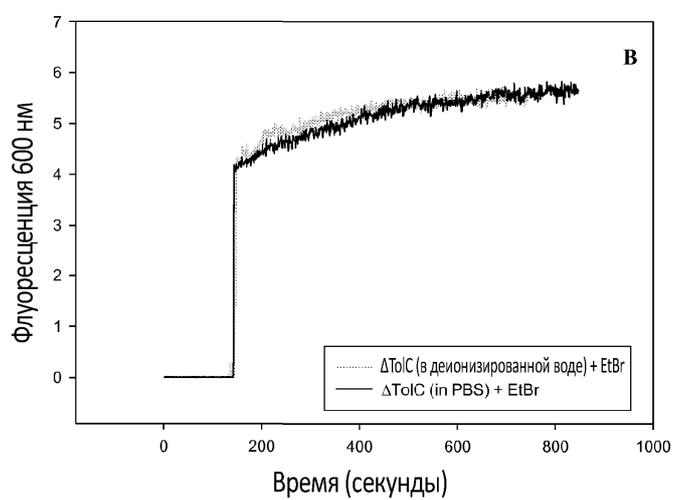
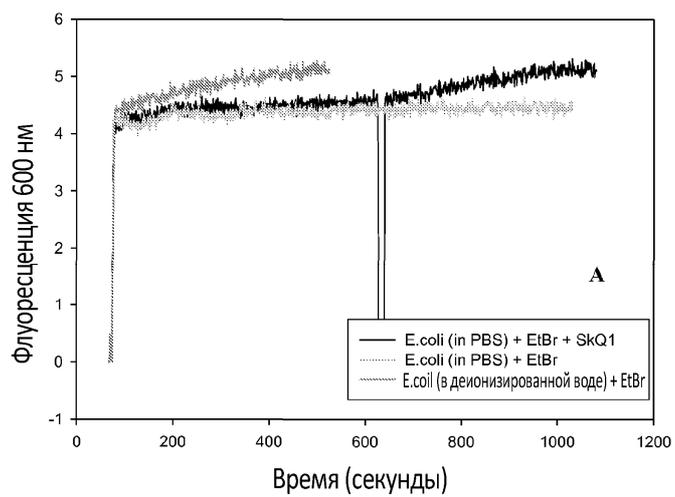
Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13

