



УКРАЇНА

(19) UA (11) 57079 (13) C2

(51) 7 A61K31/426, A61P31/04, C07D277/58

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ФАРМАЦЕВТИЧНА КОМПОЗИЦІЯ ТИЗОКСАНІДУ І НІТАЗОКСАНІДУ (ВАРІАНТИ)

1

2

(21) 99126626

(22) 06 05 1998

(24) 16 06 2003

(86) PCT/US98/09229, 06 05 1998

(31) 08/852,447

(32) 07 05 1997

(33) US

(31) 08/887,809

(32) 03 07 1997

(33) US

(31) 08/887,810

(32) 03 07 1997

(33) US

(46) 16 06 2003, Бюл. № 6, 2003 р

(72) Россінол Жан-Франсуа, US

(73) РОМАРК ЛАБОРАТОРІЗ, ЕЛ СІ, US

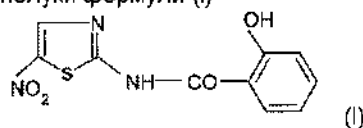
(56) US-A-3 950 351

S-A-5 387 598

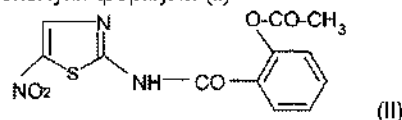
US-A-4 315 018

S-A-5 578 621

(57) 1 Фармацевтична композиція для перорального введення, що містить як активний агент, щонайменше, одну сполуку, вибрану з групи, що складається з сполуки формули (I)



і сполуки формули (II)



2 Композиція за п 1, відповідно до якого вказана активна сполука використовується у вигляді активних частинок, розмір яких складає менше 200 мкм, а їх середній розмір перевищує 10 мкм

3 Композиція за п 2, відповідно до якого середній розмір вказаних активних частинок знаходиться в межах від 10 до 100 мкм

4 Композиція за п 2, відповідно до якого середній розмір вказаних активних частинок знаходиться в межах від 20 до 50 мкм

5 Композиція за п 2, відповідно до якого менше 10% від загальної маси вказаних активних частинок мають розмір, що перевищує 100 мкм

6 Композиція за п 2, відповідно до якого, щонайменше, 50% від загальної маси вказаних активних частинок мають розмір менше 50 мкм

7 Композиція за п 2, відповідно до якого менше 10% від загальної маси вказаних активних частинок мають розмір менше 5 мкм

8 Композиція за п 2, відповідно до якого вказана композиція містить суміш активних частинок сполук формули (I) і формули (II), причому масова частка сполуки формули (I) по відношенню до масової частки сполуки формули (II) і формули (II) вказаної суміші складає від 0,5 до 20%

9 Композиція за п 1, відповідно до якого вказана композиція додатково містить, щонайменше, одну фармацевтично прийнятну кислоту

10 Композиція за п 9, відповідно до якого вказана фармацевтично прийнятна кислота вибрана з групи, що складається з лимонної кислоти, глютамінової кислоти, янтарної кислоти, етансульфонової кислоти, оцтової кислоти, винної кислоти, аскорбінової кислоти, метансульфонової кислоти, фумарової кислоти, адипінової кислоти, яблучної кислоти і їх сумішей

11 Композиція за п 9, відповідно до якого вказаний активний агент використовується у вигляді твердих частинок, що мають розмір менше 200 мкм і середній розмір, що перевищує 10 мкм, і відповідно до якого відношення маси фармацевтично прийнятної кислоти до маси вказаних твердих частинок складає від 0,01 до 0,5

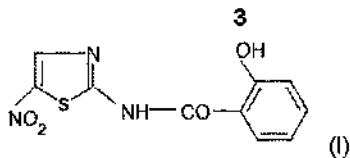
12 Композиція за п 11, відповідно до якого відношення маси фармацевтично прийнятної кислоти до маси вказаних твердих частинок складає від 0,03 до 0,2

13 Спосіб лікування інфекційних захворювань у ссавців з порушеною імунною системою, що викликається мікроорганізмами, вибраними з групи, що складається з *Cryptosporidium parvum*, *Isospora belli*, *Enterocytozoon bienersi*, *Encephalitozoon intestinalis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium intracellulare*, *Pneumocystis carinii* і *Toxoplasma gondii*, який включає введення фармацевтичної композиції, що містить як активний агент щонайменше одну сполуку, вибрану з групи, що складається зі сполуки формули (I)

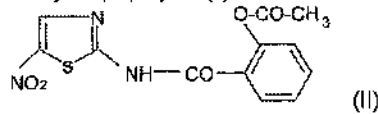
(13) C2

(11) 57079

(19) UA



і сполуки формули (II)



14 Спосіб за п 13, де вказаний активний агент знаходиться у формі активних частинок, що мають розмір менше 200 мкм і середній розмір більше 5 мкм

15 Спосіб за п 13, де вказаний активний агент знаходиться у формі частинок, що мають середній розмір в межах 20-50мкм

16 Спосіб за п 13, де вказана фармацевтична композиція містить щонайменше одну фармацевтично прийнятну кислоту

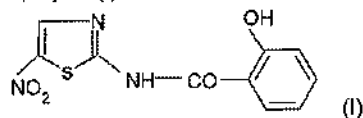
17 Спосіб за п 16, де вказана фармацевтично прийнятна кислота вибрана з групи, що складається з лимонної кислоти, глутамінової кислоти, янтарної кислоти, етансульфонової кислоти, оцтової кислоти, винної кислоти, аскорбінової кислоти, метансульфонової кислоти, фумарової кислоти, адипінової кислоти, яблучної кислоти і їх сумішей

18 Спосіб за п 13, де вказаним активним агентом є сполука формули (I)

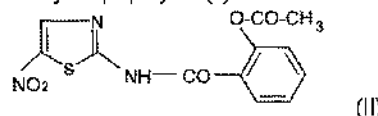
19 Спосіб за п 13, де вказаним активним агентом є сполука формули (II)

20 Спосіб за п 13, де вказаним осавцем є людина і де вказаний активний агент вводять у кількості в межах 500-2000 мг на день

21 Спосіб лікування паразитарних інфекційних захворювань, викликаних трематодами, який включає введення фармацевтичної композиції, що містить як активний агент щонайменше одну сполуку, вибрану з групи, що складається зі сполуки формули (I)



і сполуки формули (II)



22 Спосіб лікування паразитарних інфекційних захворювань, викликаних трематодами, за п 21, де трематоди вибрані з групи, що складається з *Schistosoma*, *Fasciola*, *Fasciolopsis*, *Dicrocoelium*, *Heterophyes* і *Metagonimus*

23 Спосіб лікування паразитарних інфекційних захворювань, викликаних трематодами, за п 21, де трематоди вибрані з групи, що складається з *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma mekongi*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma intercalatum*, *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica*, *Fasciolopsis biskii*, *Dicrocoelium dendriticum*, *Heterophyes heterophyes* і *Metagonimus yokogawa*

24 Спосіб за п 23, де вказаний активний агент знаходиться у формі активних частинок, що мають розмір менше 200мкм і середній розмір більше

5мкм

25 Спосіб за п 24, де вказаний активний агент знаходиться у формі активних частинок, що мають середній розмір в межах 20-50мкм

26 Спосіб за п 23, де вказана фармацевтична композиція містить щонайменше одну фармацевтично прийнятну кислоту

27 Спосіб за п 26, де вказана фармацевтично прийнятна кислота вибрана з групи, що складається з лимонної кислоти, глутамінової кислоти, янтарної кислоти, етансульфонової кислоти, оцтової кислоти, винної кислоти, аскорбінової кислоти, метансульфонової кислоти, фумарової кислоти, адипінової кислоти, яблучної кислоти і їх сумішей

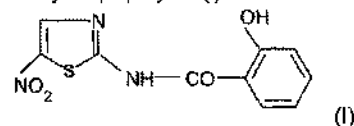
28 Спосіб за п 26, де відношення маси фармацевтично прийнятної кислоти до маси вказаних активних частинок складає від 0,010 до 0,5

29 Спосіб за п 23, де вказаним активним агентом є сполука формули (I)

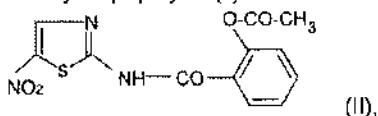
30 Спосіб за п 23, де вказаним активним агентом є сполука формули (II)

31 Фармацевтична паста для локального застосування, що містить

як активний агент тверді частинки, щонайменше, однієї сполуки, вибраної з групи, що складається з сполуки формули (I)



і сполуки формули (II)

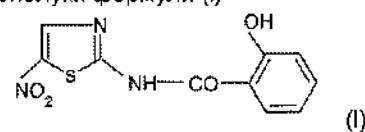


причому вказані частинки мають розмір менше 200 мкм і середній розмір, що перевищує 10 мкм, щонайменше, один загущуючий агент, щонайменше, один змочувальний агент, щонайменше, одну фармацевтично прийнятну кислоту, причому рН пасти знаходиться в межах від 2 до 6

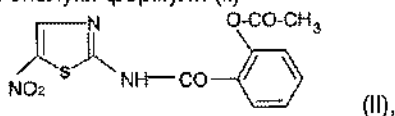
32 Фармацевтична паста за п 31, відповідно до якого вказана паста додатково містить, щонайменше, одну добавку, вибрану з групи, що складається з цетилового спирту, похідних гліцеридів, пропіленгліколю і їх сумішей

33 Фармацевтична композиція для перорального введення, що містить активний агент, підданий грануляції в присутності гранулюючого агента, в якій

вказаний активний агент використовують у вигляді твердих активних частинок, щонайменше, однієї сполуки, вибраної з групи, що складається з сполуки формули (I)



і сполуки формули (II)



і в якій вказані активні частинки мають розмір ме-

ніше 200 мкм і середній розмір, що перевищує 10 мкм

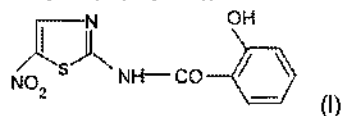
34 Композиція за п 33, відповідно до якого вказаний гранулюючий агент вибраний з групи, що складається з полівінілпіролідону, води, спирту, сахарози, гідроксилцелюлози і їх сумішей

35 Композиція за п 33, відповідно до якого вказані гранульовані активні тверді частинки містять, щонайменше, одну фармацевтично прийнятну кислоту

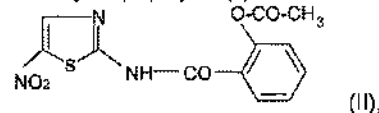
36 Композиція за п 35, відповідно до якого вказана фармацевтично прийнятна кислота вибрана з групи, що складається з лимонної кислоти, глутамінової кислоти, янтарної кислоти, етансульфонових кислоти, оцтової кислоти, винної кислоти, аскорбінової кислоти, метансульфонових кислоти, фумарових кислоти, адипінової кислоти, яблучної кислоти і їх сумішей

37 Композиція за п 35, відповідно до якого відношення маси фармацевтично прийнятої кислоти до маси вказаного активного агента складає від 0,01 до 0,5

38 Фармацевтична композиція для перорального введення, що містить активний агент, змочувальний агент і похідне крохмалю, в якій вказаний активний агент використовується у вигляді твердих активних частинок, щонайменше, однієї сполуки, вибраної з групи, що складається з сполуки формули (I)



і сполуки формули (II)



і в якій вказані активні частинки мають розмір менше 200 мкм і середній розмір, що перевищує 10

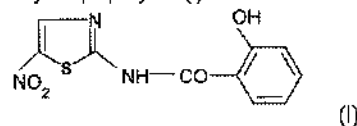
мкм

39 Фармацевтична композиція за п 38, що додатково містить, щонайменше, одну фармацевтично прийнятну кислоту

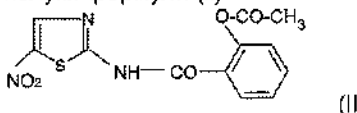
40 Фармацевтична композиція за п 38, відповідно до якого активні частинки піддані грануляції в присутності гранулюючого агента для утворення гранульованого активного агента, що містить вказану активну сполуку і гранулюючий агент, масова частка яких складає відповідно від 2 до 99,97% і від 0,03 до 10%

41 Фармацевтична композиція за п 40, відповідно до якого вказаний гранулюючий агент вибраний з групи, що складається з полівінілпіролідону, води, спирту, сахарози, гідроксилцелюлози та їх сумішей

42 Рідка суспензія активного агента для перорального введення, що містить як активний агент тверді частинки, щонайменше, однієї сполуки, вибраної з групи, що складається з сполуки формули (I)



і сполуки формули (II)

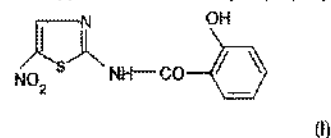


причому вказані частинки мають розмір менше 200 мкм і середній розмір, що перевищує 10 мкм, і щонайменше, одну фармацевтично прийнятну кислоту, причому рН суспензії знаходиться в межах від 2 до 6

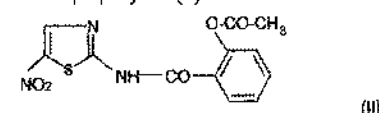
43 Суспензія за п 42, згідно з яким рН суспензії знаходиться в межах від 3 до 5

44 Суспензія за п 42, що додатково містить гранулюючий агент

Даний винахід відноситься до фармацевтичної композиції, що містить як активний агент, щонайменше, одну сполуку, вибрану з групи, що складається із сполук формули (I)



і формули (II)



Активний інгредієнт присутній переважно у вигляді частинок, що мають розмір менше 200 мкм і середній розмір, що перевищує 10 мкм

Винахід відноситься також до фармацевтичних композицій, стабілізованих, щонайменше, однією фармацевтично прийнятною сіллю

Такі фармацевтичні композиції особливо доцільно використати при лікуванні інфекційних

захворювань, викликаних умовно-патогенними мікроорганізмами, у осіб з порушеною або ослабленою імунною системою, а також при лікуванні інфекційних захворювань, викликаних трематодами

Існує нагальна потреба в розробці методів лікування ряду паразитарних і бактерійних інфекційних захворювань у людей з порушеною імунною системою (хворих СНІДом, раком, старезних і старіючих, пацієнтів з трансплантованими органами, приймаючих імуносупресивні лікарські препарати) Іншою релевантною областю є інфекційні захворювання, що викликаються трематодами, особливо в умовах тропічного клімату Таким чином, існує потреба в створенні фармацевтичної композиції, до якої могли б виявляти толерантність люди навіть з порушеною імунною системою і дієвість, при зберіганні якої характеризувалося б стабільністю навіть в умовах тропічного клімату

Більш конкретно, *Toxoplasma gondii* є представником найпростіших і відноситься до числа найбільш поширених в світі причин латентної

інфекції центральної нервової системи. Від цього паразита заражаються багато здорових людей, однак, як правило, імунна система допомагає організму справитися з цією інфекцією. *T. gondii* є найбільш поширеним умовно-патогенним мікроорганізмом в мозку хворих СНІДом. У цей час токсоплазмоз стає набуваючим все більш великі масштаби проблемою не тільки через СНІД, але також і в зв'язку з більш широким застосуванням імуносупресивних лікарських препаратів (наприклад таких, що вводяться пацієнтам з трансплантованими органами). Токсоплазмоз лікується звичайно із застосуванням комбінації піриметаміну і сульфадіазину. Незважаючи на свою ефективність, ці лікарські речовини не знищують захисні оболонки паразита, внаслідок чого лікування приймає вигляд безперервного прийому підтримуючих доз лікарського засобу. Токсичність, що має місце при такому лікуванні, часто приводить до припинення дії лікарської речовини, особливо у людей з ослабленою імунною системою, і до рецидивів хвороби. Статистика погана: повідомляється про коефіцієнт смертності порядку 70% серед хворих з імунodefіцитом і про середнє дожиття порядку чотирьох місяців.

Криптоспори́діоз викликається мікроскопічним паразитом *Cryptosporidium parvum*, що відноситься до найпростіших. У осіб з нормальними імунними функціями діарея, викликана *C. parvum*, може бути інтенсивною і тривалою, однак є самообмежуючою. У хворих СНІДом криптоспори́діальна діарея часто небезпечна для життя. Встановлено, що 15-20% хворих СНІДом страждають саме з цієї причини. До цього часу не розроблена послідовно ефективна або загальноприйнята методика лікування криптоспори́діозу.

Патогенним мікроорганізмом, який найчастіше виявляється у хворих СНІДом, є *Enterocytozoon bieneusi* - мікроскопічний паразит, який був знайдений у майже чверті хворих цією хворобою. У наш час представляється, що цей крихітний паразит може виявитися причиною великої частини багатьох нез'ясованих випадків синдрому недостатності всмоктування, діареї та виснаженості, що спостерігаються у хворих, інфікованих вірусом імунodefіциту людини. Ефективний метод лікування в цьому випадку також до цього часу не відомий.

Хворі з позитивною реакцією на ВІЛ-інфекцію можуть бути уражені і деякими іншими видами мікроспори́дій, включаючи *Encerphalitozoon hellem* і *cuniculi*, а також новими видами, що визначаються як *Septata intestinalis*. Останні повідомлення свідчать про значне збільшення числа мікроспори́дичних інфекцій, що розносяться.

Інфекційне захворювання, що викликається паразитом *Isospora belli*, клінічно невідмінне від криптоспори́діозу. Будучи поширеним в країнах з тропічним кліматом, *I. belli* був виявлений і у менш, ніж 1% хворих в США, хоч фактична частота захворювань, можливо, перевищує цей процент.

Pneumocystis carinii взагалі прокласифікований як паразит, що відноситься до найпростіших. Результати деяких досліджень свідчать про те, що він може бути грибом, з яким він розділяє

певні генетичні послідовності. Р сапілі уражає, як правило, легкі (пневмонія, викликана *Pneumocystis carinii* (PCP)). Повідомляється про успішні результати лікування у 40-60% хворих, що супроводжується, однак, деякими проблемами, включаючи інтоксикацію лікарськими засобами, особливо хворих з порушеною імунною системою. Серед багатьох серйозних виявів інфекційного захворювання, викликаного вірусом імунodefіциту людини (ВІЛ), PCP стоїть в особливому ряду в зв'язку з її високим процентом поширеності, унікального розподілу серед вікових груп і високого процента смертності. PCP є найбільш серйозним інфекційним захворюванням, викликаним умовно-патогенними мікроорганізмами, у ВІЛ-інфікованих дітей. Частота захворювань PCP серед ВІЛ-інфікованих дітей молодшого віку, що не забезпечуються профілактикою, складає щонайменше 12% в перший рік життя. Багато дітей швидко вмирають відразу після розвитку PCP.

Комплекс, викликаний мікобактерією *Avium*, (MAC) відноситься до інфекційних захворювань, що викликаються сімейством велими схожих мікобактеріальних мікроорганізмів *Mycobacterium avium* і *M. intracellulare*. Коли MAC з'являється у людей з непорушеною імунною системою, він протікає звичайно в формі інфекційного захворювання дихального тракту. У хворих СНІДом MAC часто дисемінує (дисемінований MAC або DMAC), причому хвороба може розповсюдитися майже на будь-яку систему органів. За даними останніх досліджень бактерії, що викликають MAC, були виявлені у 43% хворих, що жили протягом 2 років після встановлення діагнозу СНІД. Для дисемінованого MAC не створений який-небудь стандартний метод лікування. Звичайно прописуються комбінації відповідних лікарських засобів, і якщо це має успіх, потрібно, щоб таке лікування продовжувалося все життя. Існує нагальна необхідність в більш ефективному методі лікування.

ВІЛ-інфіковані особливо схильні до інфекційного захворювання, викликаного *Mycobacterium tuberculosis*, при цьому хід хвороби прискорюється. У той час, як позалегенева форма туберкульозу невпастива ВІЛ-неінфікованим хворим, вона часто зустрічається у людей з позитивною реакцією на ВІЛ-інфекцію. Центр з контролю захворюваності (США) випустив керівництво по лікуванню туберкульозу, в якому вказується на зростаюче поширення туберкульозу, що протистоїть впливу багатокомпонентних лікарських препаратів (MDR-TB). Смертність серед хворих СНІДом з MDR-TB велими висока (приблизно 80%), причому хвороба прогресує надзвичайно швидко.

Отже, існує нагальна потреба в розробці методу лікування цих інфекційних захворювань, які до такої міри поширені серед людей і тварин і які загрожують їх життю.

Існує також потреба в створенні лікарського препарату з широким спектром дії, призначеного для спрощення процесу лікування інфекційних захворювань, викликаних трематодами. У цей час, як правило, необхідно діагностувати патогенний чинник конкретної трематоди, а потім наз-

начити курс лікування лікарськими засобами, вибраними саме для цієї трематоди. Багато менш розвинених країн не мають спеціального обладнання для діагностування конкретної трематоди. Розробка лікарського препарату широкого спектра дії дозволила б усунути необхідність такого діагностування.

Schistosoma mansoni - шистосома - є етіологічним чинником шистосомозу - другого (після малярії) найбільш серйозного тропічного паразитарного захворювання людини і найбільш серйозного інфекційного захворювання людини, що викликається трематодами. *Schistosoma haematobium* є іншим важливим видом, що є причиною інфікування людини. У всьому світі від шистосомозу страждає більше 200 мільйонів чоловік, включаючи декілька сотень тисяч в Сполучених Штатах.

Fasciola hepatica - звичайна печінкова двуостка - є, насамперед, причиною хвороби овець, але люди є факультативним хазяїном. Цьому паразиту вдається вижити в присутності жорсткої імунної реакції хазяїна. Для лікування був запропонований бітенол, однак застосування його на території Сполучених Штатів не було схвалено.

Таким чином, існує потреба в створенні фармацевтичної композиції, яка володіла б стабільністю при зберіганні навіть в умовах тропічного клімату і широким спектром дії проти трематод.

При проведенні досліджень на тварин і клінічних досліджень при лікуванні людини було встановлено, що ефективність лікування з використанням сполук формул (I) і (II) залежить від розміру частинок активної лікарської речовини і стабільності сполук.

Описані фармацевтичні композиції доцільно використовувати для лікування трематодних інфекційних захворювань людини і тварин, викликаних *Schistosoma*, наприклад, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma mekongi*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma intercalatum*, *Fasciola*, наприклад, *Fasciola hepatica* і *Fasciola gigantica*, *Fasciolopsis* *bisleri*, і *Dicrocoelium dendriticum*, *Heterophyes heterophyes* і *Metagonimus yokogawa*.

Ці фармацевтичні композиції ефективні також для лікування інфекційних захворювань у людей з порушеною імунною системою, викликаних умовно-патогенними мікроорганізмами, наприклад, *Cryptosporidium parvum*, *Isospora belli*, *Enterocytozoon bieneusi*, *Enterocytozoon intestinalis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium intracellulare*, *Pneumocystis carinii* і *Toxoplasma gondii*.

Фармацевтична композиція може бути приготувана в формі, зручній для перорального прийому, наприклад, у вигляді твердої лікарської форми, рідкої суспензії або паст.

Для більш повного розуміння суті і цілей даного винаходу наведені нижче докладний опис, що супроводжується кресленнями, на яких представлені:

фіг 1 - процент інгібування і життєздатність клітини-хазяїна нїтазоксаниду по відношенню до *E. intestinalis*,

фіг 2 - процент інгібування і життєздатність

клітини-хазяїна нїтазоксаниду по відношенню до *V. corneae*,

фіг 3 - процент інгібування і життєздатність клітини-хазяїна альбендазолу по відношенню до *E. intestinalis*,

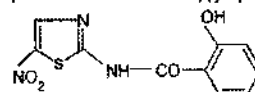
фіг 4 - процент інгібування і життєздатність клітини-хазяїна альбендазолу по відношенню до *V. corneae*,

фіг 5 і 6 - графік залежності значень оптичної щільності, отриманих для кожної ямки культури *T. gondii*, від концентрації лікарської речовини в культурі,

фіг 7 - діаграма, складена на основі аналізу ефективності нїтазоксаниду у відношенні мікобактерій, що вирощуються в рідкому живильному середовищі,

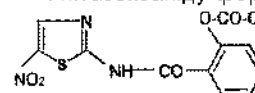
фіг 8 - процентний вміст активних частинок, що мають розмір менше 0 мкм.

Метод лікування інфекційних захворювань, запропонований відповідно до даного винаходу, включає введення фармацевтичної композиції, що містить як активний агент, щонайменше, одну сполуку, вибрану з групи, що складається з дезацетил-нїтазоксаниду формули (I)



(I)

і нїтазоксаниду формули (II)



(II)

Нїтазоксанид (NTZ) - сполука формули (II) - є непатентованим найменуванням для 2-(ацетолілокси)-N-(5-нітро-2-тіазолі)бензаміду - сполуки, вперше синтезованої Россінолем (Ros-signol) і Кав'є (Cavier) в 1975р. 2Мг нїтазоксаниду можна розчинити в 1мл диметилсульфоксиду (ДМСО). Нїтазоксанид легко засвоюється при пероральному прийомі.

До цього часу не було яких-небудь даних, які свідчать про те, що сполуки формули (I) і/або (II) могли б широко і ефективно застосовуватися при лікуванні інфекційних захворювань, викликаних трематодами, або ж були б досить нетоксичними з тим, щоб перенестися людьми навіть з порушеним імунітетом.

Способи отримання і деякі області застосування нїтазоксаниду розкриті в патенті США №3,950,351, а також в публікаціях автора даного винаходу. Дезацетил-нїтазоксанид - сполука формули (I) - іноді іменується тизоксанидом або d-NTZ і є метаболітом нїтазоксаниду.

У міжнародній публікації WO 95/28393 автором даного винаходу був розкритий спосіб отримання чистої сполуки формули (II), а також спосіб використання композиції, що містить суміш сполук формул (I) і (II).

Було встановлено, що тверді частинки сполуки формули (I), сполуки формули (II) або їх сумішей, що мають розмір в межах 170-520мкм (середній розмір частинок =352мкм), володіють вельми обмеженою ефективністю при пероральному введенні тваринам або людям. Ефектив-

ність таких частинок поступається ефективності існуючих фармацевтичних продуктів і, отже, неприйнятна для регламентаційних або комерційних цілей

Внаслідок випробувань, проведених на собаках, було встановлено також, що пероральне введення разової дози, рівної 50мг на 1кг твердих частинок сполуки формули (I) і сполуки формули (II), що мають розмір менше 5мкм, викликало у тварин сильні побічні реакції

Крім того, було встановлено, що з метою забезпечення ефективного і токсично безпечного лікування інфекційних захворювань, викликаних паразитами, бактеріями, грибами і вірусами у людей і тварин, фармацевтична композиція - або в твердій лікарській формі, або у вигляді водної суспензії - повинна містити ефективну кількість активного агента у вигляді твердих частинок, що мають розмір менше 200мкм і що містять сполуку формули (I) і/або сполуку формули (II), при цьому середній розмір активних твердих частинок перевищує 10мкм

Наявність високого вмісту частинок активного агента, що мають розмір понад 200мкм, в порівнянні з частинками, що мають розмір в межах 5-200мкм, значно знижує хіміотерапевтичну активність цих сполук. У переважному варіанті здійснення винаходу масова частка активних твердих частинок, що мають розмір понад 200мкм, в фармацевтичних композиціях, запропонованих відповідно до винаходу, не перевищує 5%. У найбільш переважному варіанті фармацевтичної композиції, запропоновані відповідно до винаходу, не містять активних твердих частинок, що мають розмір понад 200мкм

Наявність високого вмісту частинок активного агента, що мають розмір менше 5мкм, в порівнянні з частинками, що мають розмір в межах 5-200мкм, може привести до небажаної дії лікарського препарату на тварин або людей. Крім того, було встановлено, що частинки, які мають розмір менше 5мкм, більш швидко всмоктуються з шлунково-кишкового тракту в кров'яне русло і, отже, неефективні проти паразитів, бактерій, грибків і вірусів, які, як правило, мешкають в шлунково-кишковому тракті тварини або людини

Кваліфікований фахівець не зміг би прийти до висновку, що розмір частинок сполуки формули (I) і сполуки формули (II) міг би мати такий значний вплив на антимікробну активність у тварин і людей. Так, наприклад, в процесі досліджень, проведених автором даного винаходу, такі антипаразитарні сполуки, як, наприклад, альбендазол, мебендазол, никлозамід, празиквантел і метронідазол, не виявили якої-небудь помітної відмінності в антипаразитарній активності у тварин або людей, яка залежала б від розміру їх частинок. Крім того, кваліфікований фахівець не зміг би прийти і до висновку про те, що розмір частинок сполуки формули (I) і сполуки формули (II) міг би мати такий негативний вплив на здатність тварин або людей перенести введення вказаного активного агента

Сполука(и) формули (I) і (II) можуть вводитися або у вигляді твердого лікарського форми, або у вигляді водної суспензії, причому переважно є

та обставина, щоб фармацевтична композиція містила ефективну дозу активного агента у вигляді твердих частинок сполуки формули (I) і/або (II), що мають розмір менше 200мкм, причому середній розмір вказаних активних твердих частинок складає понад 10 мкм, як це визначене за допомогою обладнання Coulter® Counter LS 100. У цьому обладнанні використовуються лазерний світловий пучок з довжиною хвилі 750 нм, що дозволяє визначати розмір частинок діаметром в межах від 0,4 до 900 мкм шляхом дифракції світла. Виміри зразків виготовляються у воді з невеликою кількістю Triton X-100, що застосовується для підвищення змочуваності і дефлукції порошку

Доцільно, щоб середній розмір вказаних активних твердих частинок знаходився в межах від 10 до 100мкм, переважно від 20 до 50мкм. Прикладами переважних композицій є

- композиція, для якої масова частка вказаних активних твердих частинок, що мають розмір понад 100мкм, складає менше 10%,

- композиція, для якої масова частка вказаних активних твердих частинок, що мають розмір менше 50мкм, складає, щонайменше, 50%

Доцільно, щоб середній розмір вказаних активних твердих частинок знаходився в межах від 10 до 100мкм, переважно від 20 до 50мкм. Відповідно до переважного варіанту здійснення винаходу в запропонованій композиції розмір менше 5мкм мають менше 10% вказаних активних твердих частинок

Активний агент або агенти, що використовуються у вигляді твердого лікарського форми або суспензії, являють собою переважно суміш твердих частинок сполук формули (I) і формули (II), розмір яких складає менше 200мкм, причому масова частка сполуки формули (I) по відношенню до загальної маси сполук формули (I) і формули (II) вказаної суміші знаходиться в межах від 0,5 до 20%, переважно від 0,5 до 10%

Винахід відноситься також до описаних вище фармацевтичних композицій, які містять переважно, щонайменше, одну фармацевтично прийнятну кислоту. Прикладами таких кислот є лимонна кислота, глютамінова кислота, янтарна кислота, етансульфонова кислота, оцтова кислота, винна кислота, аскорбінова кислота, метансульфонова кислота, фумарова кислота, адипінова кислота, яблучна кислота та їх суміші. Найбільш переважною є лимонна кислота. Наявність вказаної кислоти поліпшує стабільність активного агента або агентів

Відношення маси фармацевтично прийнятної кислоти до маси вказаних активних твердих частинок знаходиться в межах переважно між 0,01 і 0,5, переважно між 0,03 і 0,2. Доцільно, щоб кількість кислоти була достатньою для підтримки рН суспензії в межах від 2 до 6, переважно від 3 до 5, і найбільш переважно від 3,5 до 4,5

Техніка приготування і переважні приклади твердого і рідкого лікарських форм фармацевтичної композиції розкриті в міжнародній публікації WO/95/28393, розкриття якої включене в даний опис як посилання. Доцільно, щоб композиції містили змочувальний агент і, при можливості, похі-

дне крохмалю, наприклад, аналогічні розкритим в патенті США №5,578,621, вміст якого включено в даний опис як посилення для розкриття можливих змочувальних агентів і похідних крохмалю. Змочувальний агент в тому вигляді, як він описаний в патенті США №5,578,621, служить як диспергуючий агент.

Такі фармацевтичні композиції, приготовані або у вигляді твердої або рідкої лікарських форм, або у вигляді паст або мазей, можуть, при необхідності, містити додаткові активні агенти, наприклад, антибіотики, противірусні засоби або інгібітори нагнітання протонів. Хоч це і недоцільно, але можливо також, щоб такі фармацевтичні композиції містили активні тверді частинки сполуки формули (I) і/або сполуки формули (II), розмір яких перевищує 200мкм.

Композиції можуть містити наповнювачі, відомі як такі для цілей приготування лікарських форм, зручних для перорального прийому.

Для того, щоб забезпечити високу міру ефективності в межах широкого спектра паразитів, бактерій, грибків і вірусів, доцільно, щоб коефіцієнт розподілу вказаних активних твердих частинок знаходився в межах від 0,8 до 2, переважно від 1,1 до 1,9, і найбільш переважно перевищував 1,5, причому вказаний коефіцієнт розподілу розраховується за наступною формулою

$$F_{90\%} = (\varnothing_{90\%} - \varnothing_{10\%}) / ((\varnothing_{90\%} + \varnothing_{10\%}) / 2)$$

де

- $F_{90\%}$ - коефіцієнт розподілу при 90%,

- $\varnothing_{90\%}$ - максимальний розмір тієї частки частинок, який відповідає 90% вказаних активних твердих частинок,

- $\varnothing_{10\%}$ - максимальний розмір тієї частки частинок, який відповідає 10% вказаних активних твердих частинок.

Відповідно до одного з конкретних варіантів здійснення винаходу отримання частинок сполуки формули (I) і/або (II) здійснюється способами, описаними вище, після чого вони зазнають подібнення з тим, щоб розмір менше 10% вказаних активних частинок перевищував 100мкм, розмір менше 50% вказаних активних частинок перевищував 50мкм і розмір менше 10% вказаних активних частинок був меншим 5мкм, причому середній розмір частинок знаходився в межах від 20 до 50мкм. Потім вказані активні частинки зазнають грануляції з використанням суміші, що містить активні тверді частинки і, щонайменше, один гранулюючий агент. Прикладами гранулюючого агента можуть служити полівінілпіролідон, вода, спирт, сахароза, гідроксипцеллюлоза та їх суміші. Під час процесу грануляції доцільно додати, щонайменше, одну фармацевтично прийнятну кислоту.

Винахід відноситься також до твердих лікарських форм, що містять композицію, запропоновану відповідно до даного винаходу, такого як таблетки, дисперговані таблетки, таблетки з покриттям, матрикси і т.д. Лікарська форма, запропонована відповідно до винаходу, містить, наприклад

- тверді активні частинки з розміром менше 200мкм, причому менше 10% вказаних частинок

мають розмір понад 100мкм, менше 50% вказаних частинок мають розмір понад 50мкм і менше 10% вказаних частинок мають розмір менше 5мкм, а середній розмір частинок знаходиться в межах від 20 до 50мкм,

- щонайменше, один гранулюючий агент,
- щонайменше, один змочувальний агент,
- щонайменше, одне похідне крохмалю,
- щонайменше, одну фармацевтично прийнятну кислоту, яка додається переважно під час процесу грануляції.

Рідкі лікарські форми, наприклад, водні суспензії, запропоновані відповідно до винаходу, містять, наприклад

- як активний агент, тверді частинки, що містять сполуку формули (I) і/або сполуку формули (II) і що мають розмір менше 200мкм, причому менше 10% вказаних частинок мають розмір понад 100мкм, менше 50% вказаних частинок мають розмір понад 50мкм і менше 10% вказаних частинок мають розмір менше 5мкм,

- щонайменше, один гранулюючий агент,
- щонайменше, один змочувальний агент,
- щонайменше, одну фармацевтично прийнятну кислоту, причому рН суспензії знаходиться в межах від 2 до 6, переважно від 3 до 5, найбільш переважно від 3,5 до 4,5,

- щонайменше, один загущуючий агент, наприклад, ксантанову камедь, гуарову камедь, кристалічну целюлозу, карубову камедь, карбоксиметилцелюлозу або їх суміш.

Лікарські форми у вигляді пасти або мазі, запропоновані відповідно до винаходу і призначені для перорального прийому, містять, наприклад

- як активний агент, тверді частинки, що містять сполуку формули (I) і/або сполуку формули (II) і що мають розмір менше 200мкм, причому менше 10% вказаних частинок мають розмір понад 100мкм, менше 50% вказаних частинок мають розмір понад 50мкм і менше 10% вказаних частинок мають розмір менше 5мкм,

- щонайменше, один змочувальний агент,
- щонайменше, одну фармацевтично прийнятну кислоту, причому рН суспензії знаходиться в межах від 2 до 6, переважно від 3 до 5, найбільш переважно від 3,5 до 4,5,

- щонайменше, один загущуючий агент, наприклад, ксантанову камедь, гуарову камедь, кристалічну целюлозу, карубову камедь, карбоксиметилцелюлозу або їх суміш.

Лікарські форми у вигляді пасти або мазі, запропоновані відповідно до винаходу і призначені для локального або штравагінального застосування, містять, наприклад

- як активний агент, тверді частинки, що містять сполуку формули (I) і/або сполуку формули (II) і що мають розмір менше 200мкм, причому менше 10% вказаних частинок мають розмір понад 100мкм, менше 50% вказаних частинок мають розмір понад 50мкм і менше 10% вказаних частинок мають розмір менше 5мкм,

- щонайменше, один змочувальний агент,
- щонайменше, одну фармацевтично прийнятну кислоту, причому рН суспензії знаходиться в межах від 2 до 6, переважно від 3 до 5, найбільш переважно від 3,5 до 4,5,

- цетиловий спирт /або похідні гліцеридів /або пропіленгліколь,

- щонайменше, один загущуючий агент, наприклад, ксантанову камедь, гуарову камедь, кристалічну целюлозу, карубову камедь, карбоксиметилцелюлозу або їх суміш

Суша чиста сполука формули (I) і суша чиста сполука формули (II) були піддані подрібненню і відсортовані за розмірами частинок за допомогою сита

Після подрібнення частинки сполуки формули (I), сполуки формули (II) і їх сумішей мали гранулометричний склад, представлений на фіг 8 На фіг 8 представлений процентний вміст частинок, що мають розмір менше Øмкм

З цієї фігури слідує, що

- масова частка частинок, що мали розмір менш приблизно 5мкм, складає менше 10%,

- масова частка частинок, що мали розмір понад приблизно 70мкм, складає менше 10%,

- середній розмір частинок становить приблизно 40мкм,

- коефіцієнт розподілу частинок складає біля 1,73, причому вказаний коефіцієнт розраховується за наступною формулою

$$F_{90\%} = (\phi_{90\%} - \phi_{10\%}) / ((\phi_{90\%} + \phi_{10\%}) / 2)$$

де

- $F_{90\%}$ - коефіцієнт розподілу при 90%,

- $\phi_{90\%}$ - максимальний розмір тієї частки частинок, який відповідає 90% вказаних активних твердих частинок,

- $\phi_{10\%}$ - максимальний розмір тієї частки частинок, який відповідає 10% вказаних активних твердих частинок

Конкретні приклади таких композицій розкриті в слідуючих нижче таблицях

Таблиця 1

Приклад композиції диспергованих таблеток для перорального прийому, що містить сполуку формули (II) і сполуку формули (I) як активні агенти

Нітазоксандр (99%) + дезацетил-нітазоксандр (1%)	200мг
Мікрокристалічна целюлоза Авіцел рН 102, що поставляється FMC-USA	116мг
Кросповідон	25мг
Стеарат магнію	3мг
Колоїдальний діоксид кремнію	5мг
Лимонна кислота	10мг
Сунишна віддушка №877720, що поставляється Robertet	10мг
Сахаринат натрію	2мг

Таблиця 2

Приклад композиції забезпечених покриттям таблеток для перорального прийому, що містить сполуку формули (II) і сполуку формули (I) як активні агенти

Нітазоксандр	500мг
Кукурудзяний крохмаль	60мг
Заздалепдь желеутворений кукурудзяний крохмаль	70мг
Гідроксипропілметилцелюлоза	5мг
Сахароза	20мг
Натрієвий гліколят крохмалю	30мг
Лимонна кислота	25мг

Тальк	8мг
Стеарат магнію	7мг

Покриття

Гарячий розчин цукру або плівкове покриття, що розпилюється на таблетки або гранули, що містять 500мг активного агента

Таблиця 3

Приклад водної суспензії для перорального прийому, що містить сполуку формули (II) і сполуку формули (I) як активні агенти рН суспензії складала біля 4,1

Нітазоксандр (98%) + дезацетил-нітазоксандр (2%)	2г
Дистильована вода	100мл
Бензоат натрію	0,2г
Сахароза	30,5г
Ксантанова камедь	0,2г
Мікрокристалічна целюлоза і натрійкарбоксиметил-целюлоза Авіцел RS-591, що поставляється FMC-USA	0,8г
Лимонна кислота	0,2г
Дипдратний цитрат натрію	50мг
Сунишна віддушка №877720, що поставляється Robertet	125мг
Червоний барвник №33D і С	1мг

Таблиця 4

Приклад пасти для перорального прийому, що містить сполуку формули (II) і сполуку формули (I) як активні агенти

Нітазоксандр (98%) + дезацетил-нітазоксандр (2%)	500мг
Мінеральне масло	10г
Коричневий цукор	1г
Мікрокристалічна целюлоза і натрійкарбоксиметил-целюлоза Авіцел RS-591, що поставляється FMC-USA	0,8г
Лимонна кислота	0,2г

Таблиця 5

Приклад лікарської форми пасти або мазі для інтраванального або локального введення, причому вказана паста або мазь містить сполуку формули (II) і сполуку формули (I) як активні агенти

Нітазоксандр (98%) + дезацетил-нітазоксандр (2%)	8г
Кремафор А6	2г
Кремафор А25	1,5г
Мінеральне масло	7г
Лювітол ЕНО	7г
Складний моногліцерин	4г
Цетиловий спирт	3г
Симеткон	0,5г
Гермабен II	1г
Пропіленгліколь	3,5г
Дистильована вода	62,5г

Фармацевтичні композиції, запропоновані відповідно до винаходу, являють собою композиції, що мають широкий спектр дії проти паразитів, бактерій, грибків і вірусів, особливо при пероральному введенні

Ефективність і безпека розкритих вище фармацевтичних композицій надзвичайно високі у відношенні як тварин, так і людини. Більш конкретно, при клінічних дослідженнях хворих, було

встановлено, що дієвість описаних вище фармацевтичних композицій значно більш ефективна при лікуванні паразитарних інфекційних захворювань, ніж у таких же лікарських форм, в яких використовується активна сполука, розмір частинок в якій знаходиться в межах від 170 до 520мкм

(середній розмір частинок =352мкм), навіть в тих випадках, коли більш великі частинки вводилися пацієнтам в дозах, що збільшуються триразово, і протягом більш тривалих періодів часу. Приклади отриманих показників ефективності лікування (ПЕЛ) представлені в таблиці 6

Таблиця 6

Порівняння результатів клінічних досліджень хворих при використанні сполук формули (I) і формули (II), маючих розмір частинок в межах від 170 до 520мкм (середній =352мкм), з результатами, отриманими при використанні сполук формули (I) і формули (II), маючих розмір частинок в межах від 5 до 200мкм (середній =34мкм)

Сполука формули (I) (98%) + сполука формули (II) (2%)

Розмір частинок 170-520мкм

Доза=15-50мг/кг/день протягом 3-7 днів

Вилікування/Всі=ПЕЛ,%

Паразит

Blastocystis hominis

Giardia lamblia

Ascans lumbricoides

Trichuris trichiura

Розмір частинок 5-200мкм

Доза=15мг/кг/день протягом 3 днів

Вилікування/Всі=ПЕЛ,%

12/27=44%

11/47=30%

3/69=4%

7/48=15%

10/10=100%

50/73=68%

144/179=80%

58/79=73%

Для кожного з паразитів, перерахованих в таблиці 6, пропорційні показники ефективності лікування були значно краще у відношенні хворих, підданих лікуванню активними частинками з розміром 5-200мкм, ніж у відношенні хворих, які були піддані лікуванню активними частинками з розміром 170-520мкм, причому в кожному випадку статистична значущість складала $p < 0,02$ (із застосуванням стандартного χ^2 -критерію). Це відповідало істині, навіть незважаючи на те, що дози активного агента з більш великим розміром частинок були, як правило, більш високими, а тривалість лікування була часто більш тривалою, ніж у відношенні тих пацієнтів, яким вводилися фармацевтичні композиції активного агента з розміром частинок менше 200мкм. Яка-небудь серйозна побічна дія в тій та іншій групі не спостерігалася.

При випробуваннях препарату на тваринах були отримані результати, аналогічні тим, які описані вище відносно досліджень препарату при лікуванні людей.

Крім того, побічні реакції, що спостерігалися у собак після перорального введення разової дози величиною 50мг/кг сполуки формули (I) і сполуки формули (II), не спостерігалися в процесі обширних досліджень на тваринах із застосуванням сполуки формули (I) і сполуки формули (II), розмір частинок яких знаходився в межах від 5 до 200мкм (середній <10мкм), навіть в тих випадках, коли така ж або більша доза цих сполук вводилася щодня протягом 90 днів або більш.

Крім того, вказані композиції були стабільними (навіть коли зазнавали впливу температур до 40°C і 65%-ній відносній вологості протягом шести місяців або, при використанні рідких суспензій, коли піддавали суспендуванню у воді при таких же умовах протягом трьох місяців), що, тим самим, свідчило про те, що активні інгредієнти не розкладаються і що композиції зберігають свою ефективність протягом певного періоду часу після їх приготування, який задовольняє вимогам як з медичної, так і з комерційної точки зору.

Приведені нижче приклади ілюструють ефективність запропонованих фармацевтичних ком-

позицій

ПРИКЛАД I

CRYPTOSPORIDIUM PARVUM

У процесі попереднього клінічного дослідження 30 хворих СНІДом з діагнозом криптоспоридіальної діареї були піддані лікуванню шляхом щоденного перорального прийому нітазоксаниду дозуванням 500-2000мг.

Група з двадцяти восьми чоловік була піддана курсу лікування тривалістю в два тижні або більш, причому 16 з них були перевірені на терапевтичну реакцію після восьмитижневого курсу лікування. У цій останній групі 12 чоловік мали 50%-ний або більш високий ступінь ослаблення щоденної частоти дефекації, а 10 чоловік мали помітне зменшення (знищення) присутнього в стільці паразита, причому наявність цього мікроорганізму абсолютно неможливо було виявити у чотирьох чоловік. У шістьох пацієнтів були зафіксовані сприятливі показники у відношенні як клінічних, так і паразитологічних аспектів ходу захворювання.

Пацієнти, що отримували великі щоденні дози лікарського препарату протягом більш тривалих проміжків часу, мали більш високі шанси на позитивну реакцію.

Дослідження нітазоксаниду методом відкритого мічення у відношенні криптоспоридіальної діареї, зумовленої СНІДом, дозволило документально зафіксувати зниження частоти дефекації серед хворих, що приймали лікарський препарат з щоденною дозою, рівною 500, 1000, 1500 або 2000мг. Учасники випробувань мали середній CD4+кількість, рівну 42 клітини/мм³ (в діапазоні 0-303 клітини/мм³), середню частоту щоденної дефекації, рівну 6,7 в середньому протягом 15 місяців, овоцити *Cryptosporidium parvum* в калі і ніяких інших явних тонкокишкових патогенних мікроорганізмів. Лікування азитроміцином або паромоміцином майже для всіх учасників випробувань було безуспішним.

Через 23 тижні лікування 9 з 13 пацієнтів виявили повну клінічну сприйнятливості (від однієї до трьох щоденних переважно твердих дефекацій), а 4 з 13 пацієнтів виявили практичну клінічну

сприйнятливості (щонайменше, 50%-не зменшення щоденних дефекацій або зміна в консистенції стільця, внаслідок чого, щонайменше, 75% випорожнень мали тверду форму) До кінця дослідження 8 з 11 пацієнтів повністю позбулися паразита, а у трьох інших було зафіксовано значне зниження рівнів наявності овоцитів Була відмічена тенденція до поліпшення сприйнятливості при введенні щоденних доз величиною 1000 мг і більш і при більш тривалому курсі лікування У двох випробуваних був відмічений пухиристий висип на шкірі, більше 90% хворих дотримувалися схеми дослідження протягом більш чотирьох тижнів

ПРИКЛАД II

CRYPTOSPORIDIUM PARVUM

Дані про дозування in vitro

Нітазоксанид був розчинений в стерильному диметилсульфоксиді (ДМСО) і перевірений на моношарах клітин, заражених овоцитами вихідного *C. parvum*, при концентраціях 100мкг/мл, 10мкг/мл, 1мкг/мл і 0,1мкг/мл Було проведено друге дослідження, в процесі якого нітазоксанид випробовувався при концентраціях 20, 2, 0,2 і 0,02мкг/мл Ці концентрації досягалися шляхом послідовних розріджень повним середовищем Голка, модифікованим за способом Дульбекко, (DMEM) до отримання кінцевої концентрації ДМСО, рівної 0,5% У контакт з 0,5%-ним ДМСО було також і контрольне середовище

У експерименті використовувалася клітинна культура клітин MDBKF5D2, вирощена в 7-міліметрових камерах, а як *Cryptosporidium parvum* - овоцити GCH1 (5×10^4 на ямку), при цьому експеримент проводився з метою порівняння паромоміцину (позитивний контрольний препарат) з нітазоксанидом (експериментальний лікарський препарат) Матеріали містили імунну анти-*Cryptosporidium parvum* спорозонту сироватку кролика (0,1%) і мічене флуоресцином антитіло козла проти кролика (1%)

Аналіз випробувань на токсичність

200Мкл середовища, що містить нітазоксанид

в концентраціях 100, 10, 1 і 0,1мкг/мл, і належні контрольні середовища, були вміщені в дві ямки 96-ямкового планшета, утримуючих моношари клітин, що зливаються MDBKF5D2, і в дві ямки без моношарів Інкубація лікарської речовини на моношарах здійснювалася при 37°C і в атмосфері 8%-ного CO₂ Через 24 години (випробування 1) і через 48 годин (випробування 2) в кожен ямку були додані MTS (розчин Оуена) і PMS (сироватка жеребної кобили) в концентраціях відповідно 333мкг/мл і 25мкмоль Планшет був знов вміщений в інкубатор в темне місце на дві години для продовження інкубації Через дві години 100мкл кожного супернатанту були перенесені в новий титраційний мікропланшет і прочитані планшет-ридером ELISA (призначеного для проведення твердофазного імуноферментативного аналізу) на довжині хвилі 490нм Результати були записані і проаналізовані Процент токсичності розраховувався відніманням середньої величини оптичної щільності (ОЩ) супернатантів лікарської речовини з середньої величини оптичної щільності (ОЩ) супернатантів контрольних середовищ (без лікарської речовини), діленням на величину ОЩ контрольного середовища і множенням на 100

$$\frac{\text{ОЩ середовища} - \text{ОЩ лікарської речовини}}{\text{ОЩ середовища}} \times 100$$

Аналіз вихідних овоцитів *C. parvum*

5×10^4 овоцитів *C. parvum* були піддані інкубації в нітазоксаниді (100, 20, 10, 2, 1, 0,2, 0,1 і 0,02мкг/мл) при 37°C на моношарах клітин MDBKF5D2, що зливаються Рівень інфікування в кожній ямці визначався і аналізувався методом імунофлуоресцентного аналізу через 24-48 годин Процент інгібування розраховувався відніманням середньої кількості паразитів на 10 дільниць в ямках для випробування лікарської речовини з середньої кількості паразитів на 10 дільниць в контрольному середовищі (без лікарської речовини), діленням на кількість паразитів в контрольному середовищі і множенням на 100

$$\frac{\text{Число в контрольному середовищі} - \text{Число у випробуваних ліках}}{\text{Число в контрольному середовищі}} \times 100$$

Результати

Випробування 1 24 години

Сполука	Концентрація	Середнє (+СКО)*	Токсичність, %	Інгібування, %
Інфіковані середовища	0	983,5(±128,2)	0	0
Паромоміцин	2мг/мл	482(±47,1)	23,8	51
	100мкг/мл	Загублені	88,1	н.д. **
	10мкг/мл	55,5(±13,5)	65,1	94,4
NTZ	1мкг/мл	224,5(±28,5)	8,3	77,2
	0,1мкг/мл	474,5(±29,5)	19,3	51,8

*(Середнє квадратичне відхилення) Кількість паразитів на 10 дільниць**Даних немає в зв'язку з наявністю токсичності

Випробування 2 48 годин

Сполука	Концентрація	Середнє(+СКО)*	Токсичність, %	Інгібування, %
Інфіковані середовища	0	2231,25(+90,03)	0	0

	21	57079	22	
Паромоміцин	2 мг/мл	580(+33,42)	40,8	74,01
	20 мкг/мл	68,75(13,77)	92,87	96,92
	2 мкг/мл	113,75(21,36)	24,93	94,90
NTZ	0,2 мкг/мл	1020(+158,48)	16,56	54,29
	0,02 мкг/мл	1041(+191,46)	21,23	53,33

**(Середнє квадратичне відхилення) Кількість паразитів на 10 дільниць

Вплив нїтазоксаниду на початкові овоцити *C. parvum*

У випробуванні 1 застосування нїтазоксаниду в концентраціях 10, 1 і 0,1мкг/мл привело до наступних результатів в рівнях інгібування паразитарної інфекції - відповідно 94,4, 77,2 і 51,8%, а в рівнях токсичності клітин - відповідно 65,1, 8,3 і 19,3%. Хоч при концентрації 10мкг/мл мало місце практично повне інгібування паразитарної інфекції, високий рівень токсичності був очевидний. При концентрації нїтазоксаниду 1мкг/мл інгібування паразитарної інфекції і клітинна токсичність в порівнянні з концентрацією паромоміцину 2мг/мл мали більш сприятливі показники (77,2%-не інгібування паразитарної інфекції і 8,3%-на токсичність клітин для нїтазоксаниду при концентрації 1мкг/мл в порівнянні з 51%-ним інгібуванням паразитарної інфекції і 23,8%-ною токсичністю клітин для паромоміцину при концентрації останнього 2мг/мл).

У випробуванні 2 лікарська речовина була модифікована з метою забезпечення більш ефективного розподілу дози з мінімальною токсичністю. Таким чином, культури залишалися життєздатними протягом 48 годин замість 24 годин, як це спостерігалось у випробуванні 1. Інкубаційний період протягом 48 годин виразився в більш високому відносному рівні токсичності клітин, як це з очевидністю витікає з результатів дослідження паромоміцину в обох випробуваннях. Концентрація нїтазоксаниду, рівна 20мкг/мл, вся ще володіла надмірною токсичністю і через 4 8-го динний інкубаційний період, хоч клітинний моношар був все ще не зачепленим. Можливо, що висока міра токсичності, яка повинна впливати на клітинну функцію, впливає також і на розвиток паразита і, отже, на інтенсивність паразитарної інфекції. При концентрації нїтазоксаниду, рівній 2мкг/мл, спостерігалось істотне інгібування паразитарної інфекції з відносно низьким рівнем клітинної токсичності. Подальші розбавлення привели до більш значної міри інгібування інфекції і до більш низької міри токсичності. При концентрації лікарської речовини, рівній 2мкг/мл, помірна клітинна токсичність і 94,90%-ний інгібуючий ефект свідчать про те, що для інфекційного захворювання, викликаного *C. parvum* in vitro, нїтазоксанид, що використовується в концентрації 2 мкг/мл, перевершує паромоміцин при концентрації останнього, рівній 2 мг/мл (у якого, наприклад, в цьому випадку концентрація в 1000 разів вище).

ПРИКЛАД III

CRYPTOSPORIDIUM PARVUM

Дані про дозування і зберігання in vitro

Партії нїтазоксаниду і дезацетил-нїтазоксаниду (NTZ і NTZdes) були перевірені відносно клітин вихідних овоцитів *C. parvum* і спорозоїтно-інфікованих моношарів із зруйнованою оболонкою в концентраціях 10, 1, 0,1 і 0,01мкг/мл. Кожна

сполука була розчинена в 100%-ному диметилсульфоксиді (ДМСО) і розбавлена до необхідних концентрацій стерильним середовищем Голка, модифікованим за способом Дюльбекко (DMEM). Кожна концентрація нїтазоксаниду і контрольних середовищ містила як постійну величину 0,025%-ний ДМСО.

У експерименті використовувалася клітинна культура клітин MDBKF5D2, вирощена в 7-міліметрових камерах, а як *Cryptosporidium parvum* овоцити GCH1 (5x10 на ямку), при цьому експеримент проводився з метою порівняння паромоміцину (позитивний контрольний препарат) з нїтазоксанидом (експериментальний лікарський препарат). Матеріали містили імунну анти-*Cryptosporidium parvum* спорозоїтну сироватку кролика (0,1%) і мічене флуоресцином антитіло козла проти кролика (1%).

Аналіз випробувань на токсичність

200мкл середовища, що містить нїтазоксанид в згаданих вище концентраціях, і належні контрольні середовища були вміщені в дві ямки 96-ямкового планшета, що містять моношари клітин, що зливаються MDBKF5D2, і в дві ямки без моношарів. Інкубація лікарської речовини здійснювалася на моношарах при 37°C і в атмосфері 8%-ного CO₂. Через 48 годин в кожному ямку були додані MTS (розчин Оуена) і PMS (сироватка жеребної кобили) в концентраціях відповідно 333мкг/мл і 25мкмоль. Планшет був знов вміщений в інкубатор в темне місце на дві години для продовження інкубації. Через дві години 100мкл кожного супернатанту були перенесені в новий титраційний мікропланшет і прочитані планшето-ридером ELISA (призначеного для тверд фаза-ного імуноферментативного аналізу) на довжину хвилі 490nm. Результати були записані і проаналізовані. Процент токсичності розраховувався відніманням середньої величини оптичної щільності (ОЩ) супернатантів лікарської речовини з середньої величини оптичної щільності (ОЩ) супернатантів контрольних середовищ (без лікарської речовини), діленням на величину ОЩ контрольного середовища і множенням на 100.

$$\text{ОЩ середовища} - \text{ОЩ лікарської речовини} \times 100$$

$$\text{ОЩ середовища}$$

Показники цитотоксичності були визначені в наступних межах: 0,5%-на токсичність = 0,6-25%-на токсичність = 1,26-50%-на токсичність = 2,51-75%-на токсичність = 3 і 76-100%-на токсичність = 4. Як стандартна величина, прийнятними рівнями токсичності вважаються показники токсичності, рівні 0 або 1. Показники токсичності, рівні 2, 3 або 4, вважаються високими рівнями токсичності для моношару клітин.

Аналіз вихідних овоцитів *C. parvum*

5x10⁴ овоцитів *C. parvum* були піддані інкубації в нїтазоксаниді в згаданих вище концентраціях

при 37°C (атмосфера 8%-ного CO₂) на моношарах клітин, що зливаються MDBK-F5D2. Рівень інфікування в кожній ямці визначався і аналізувався комп'ютерним методом імунофлуоресцентного аналізу через 48 годин. Процент інгубування розраховувався відніманням середньої кількості

паразитів на дільницю в ямці для випробування лікарської речовини з середньої кількості паразитів на дільницю в контрольному середовищі (без лікарської речовини), діленням на кількість паразитів в контрольному середовищі і множенням на 100

$$\frac{\text{Число в контрольному середовищі} - \text{Число у випробуваних ліках}}{\text{Число в контрольному середовищі}} \times 100$$

Результати

Аналіз активності овоцитів *C. parvum* (48 годин)

Лікарські речовини	Концентрація	Кількість паразитів	±СКО	Токсичність/ОЩ	±СКО	Інгубування, %	Токсичність, %	Показник
Водні середовища	0	681,58	±271,02	2,024	±0,18	0	0	0
Паромоміцин 0,025%	2000	115,75	±44,65	1,219	±0,009	83,02	39,79	2
ДМСО NTZ	0	628,50	±171,94	1,799	±1,45	0	0	0
	10	11,75	±7,33	0,413	±0,13	98,13	77,07	4
	1	39,67	±13,13	1,618	±0,326	93,69	10,09	1
	0,1	643,42	±229,73	1,878	±0,154	0	0	0
	0,01	714,33	±194,79	1,617	±0,072	0	10,12	1
Новий NTZdes	10	13,75	±6,66	0,337	±0,005	97,81	81,27	4
	1	39,92	±13,49	1,710	±0,033	93,65	4,97	0
	0,1	649,86	±152,19	1,506	±0,119	0	16,29	1
	0,01	749,33	±139,49	1,721	±0,144	0	4,36	0

Концентрація - мкг/мл, Кількість паразитів - середня кількість паразитів на дільницю (12 проаналізованих дільниць), Інгубування, % - процент інгубування паразитарної інфекції, Токсичність, % - процент токсичності клітин, зумовленої застосуванням лікарського препарату

З приведених вище даних можна побачити, що інгубуючий ефект NTZdes був таким же, як і у NTZ за прикладом II

Як нгіазоксанид, так і дезацетил-нгіазоксанид були однаково ефективні *in vitro* у відношенні *Cryptosporidium parvum* при паралельних випробуваннях, показавши 98 і 94%-не інгубування, що забезпечується концентрацією 10 і 1 мкг/мл відповідно для кожної сполуки. Для нгіазоксаниду концентрація, рівна 1 мкг/мл, була самої низької із забезпеченням 90%-ного інгубування, в той час як 50%-не інгубування могло бути забезпечено і більш низькими концентраціями нгіазоксаниду, наприклад, 0,2, 0,1 і 0,02 мкг/мл. При таких же експериментальних умовах паромоміцин, що використовується як позитивний контрольний препарат, був в 2000 раз менш ефективним з інгубуючим ефектом в межах від 51 до 83% при концентрації, рівній 2000 мкг/мл.

ПРИКЛАД IV

E. INTESTINALIS V. CORNEA

У культуральні 24-ямкові планшети були додані клітини 2RK-13 (клітинна лінія нирки кролика) в концентрації $2,6 \times 10^5$ клітин на ямку (1,0-мілілітрове середовище, RPMI 1640 з L-глутаміном (2 ммоль) і 5%-ною термоінактивованою фетальною бичачою сироваткою). Планшети були вміщені в CO₂-інкубатор при 37°C на ніч, протягом якої ямки були конфлюентними (при одному подвоєнні концентрація могла б бути визначена рівною 5×10^5 клітин на ямку).

Мікроорганізми *Septata intestinalis* (отримані з

культури тканин) були введені в клітини-хазяї при співвідношенні 3:1 з розрахунковою концентрацією 15×10^6 мікроорганізмів на ямку. Це співвідношення привело до того, що приблизно 50% клітин-хазяїв стали інфікованими.

Лікарські препарати були розчинені в ДМСО, воді або метанолі (в залежності від міри розчинності) з метою отримання декількох партій при концентраціях 1,0 мкг/мл. Партії зберігалися при -70°C. Застосовані в експериментах розчини готувалися в повному середовищі для культивування тканин. Всі розчини перевірялися в потрібній ямці.

Середовище замінювалося кожні три-чотири дні (на утримуючу свіжорозбавлені лікарські речовини).

На шостий день (після додання паразитів і лікарських речовин) клітини досліджувалися на токсичність. Контрольні клітини, яким були додані лікарські речовини, але не паразити, досліджувалися на конфлюентність, морфологію клітин і наявність мертвих або рухомих клітин. Клітини, інкубовані тільки паразитами, досліджувалися на підтвердження інфікуючої здатності паразитів (тобто на наявність паразитофорних вакуолей). Клітини, інкубовані з паразитами і лікарськими речовинами, досліджувалися на токсичність клітини-хазяїна і відносну кількість паразитофорних вакуолей (тобто високу, середню або низьку).

На десятий день в культуральні ямки було додано 100 мкл 10%-ного додецилсульфату натрію (SDS) (0,5% кінцевих концентрацій) з метою розриву мембрани клітини-хазяїна і вивільнення мікроспоридій. Загальна кількість паразитів, що були присутніми в кожній ямці, визначалася шляхом обчислення аліквотної проби на гемоцитометрі. Результати виражені в проценті інгубування (відносно інфікованих клітин, яким не були вве-

дені лікарські речовини)

Результати представлені на фіг 1-4

ПРИКЛАД V

TOXOPLASMA GONDII

Нітазоксанид і деацетил-нітазоксанид були перевірені відносно паразитів, а більш конкретно, у відношенні штаму RH *Toxoplasma gondii*, що підтримується періодичними пасажами в мишах. Клітини культури фібробластів MRC5 (Bio-Merieux, Франція), вирощені в 96-ячковому мікропланшеті, були засіяні *T. gondii*. У кожну культуральну ямку за винятком 8 контрольної ямки (негативна контрольна ямка) були додані 200 свіжозібраних тахізоїтів. Після 4-го динного інкубаційного періоду в культурі були додані лікарські розчини.

Нітазоксанид (NTZ) і деацетил-нітазоксанид (dNTZ) були досліджені при концентраціях в межах від $8 \cdot 10^{-4}$ до 40 мг/л. Лікарські речовини спочатку були розчинені в ДМСО при концентрації 2 мг/мл, після чого в культуральному середовищі був приготований ряд розчинів. Наявність осаду не спостерігалася.

У культурі були додані розчини лікарських препаратів (8 ямок на кожний розчин), після чого культуральні планшети були вміщені в інкубатор на 72 години. Потім культури були закріплені холодним метанолом. Оцінка росту *T. gondii* проводилася методом твердофазного імуоферментного аналізу з використанням міченого пероксидазою анти-*T. gondii* антитіла кролика. Значення оптичної щільності записувалися для кожної ямки.

Результати представлені шляхом побудови графіка залежності значень ОЩ, отриманих для кожної культуральної ямки, від концентрації лікарського препарату в культурі. Статистичний аналіз перебував в регресійному аналізі з 95%-ним довірчим інтервалом і визначенні кривої ефекту дози на основі значень ОЩ, отриманих для кожного лікарського препарату.

Один планшет був забарвлений барвником Giemsa з метою дослідження в культурах цитопатичного ефекту.

Були проведені три окремих експерименти. У кожному експерименті для кожної сполуки були використані два культуральних планшети: в кожному культуральному планшеті для кожної концентрації лікарської речовини використовувалися 8 реплікуючих ямок.

Результати

У трьох серіях експериментів були отримані однакові результати. Графічні представлення результатів одного з найбільш характерних експериментів для кожної лікарської речовини показані на фіг 5a, b, c і 6a, b, c.

Нітазоксанид (Фіг 5a, b, c)

Інгібуюча дія не була відмічена при концентраціях, що коливаються в межах від 10^{-4} мг/л до 0,3 мг/л. Суттєву інгібуючу дію було відмічено при концентраціях $>0,6$ мг/л з повним інгібуванням росту *Toxoplasma* при концентраціях $>2,5$ мг/л. Проте при концентраціях $>2,5$ мг/л була відмічена помітна токсичність моношару клітин.

Результати дослідження моношару під мікроскопом показали, що NTZ при концентрації

1,25 мг/л викликає цитопатичну дію на інфіковані паразитами клітини із збільшенням числа паразитофорних вакуолей і зменшенням кількості внутрішньоклітинних паразитів. За результатами регресійного аналізу 50%-на інгібуюча концентрація могла бути встановлена рівною 1,2 мг/л.

Деацетил-нітазоксанид (Фіг 6a, b, c)

Аналогічні результати були отримані і з деацетил-нітазоксанидом: ніякої інгібуючої дії не було відмічено при концентраціях, що коливаються в межах від 10^{-4} мг/л до 0,3 мг/л, інгібування було відмічено при концентраціях $>0,6$ мг/л, а помітна токсичність була відмічена при концентраціях $>2,5$ мг/л. 50%-на інгібуюча концентрація могла бути встановлена рівною 1,2 мг/л.

Отримані результати були такі, що відтворюються в трьох окремих експериментах з оцінкою інгібуючої дії лікарського препарату на культурах, що повторюються для тієї або іншої концентрації кожного лікарського препарату.

Як для NTZ, так і для dNTZ помітне інгібування росту *Toxoplasma* могло спостерігатися при концентраціях приблизно 1,2 мг/л із зміною паразитофорної вакуолі, але без помітної зміни власне паразита.

Результати свідчать про те, що ці лікарські препарати ефективні у відношенні *T. gondii* і що терапевтичну дію можна очікувати і *in vivo* при концентрації лікарського препарату в сироватці або тканинах, рівній приблизно 1 мг/л.

ПРИКЛАД VI

MYCOBACTERIA

Було встановлено, що нітазоксанид виявляє антимікробну активність відносно мікроорганізмів, що викликають туберкульоз. У представленій нижче таблиці приведені дані аналізу мінімальної інгібуючої концентрації нітазоксаниду і тизоксаниду для *Mycobacterium intracellulare*, проведеного методом розведення в агаровому гелі. Ці результати засновуються на декількох експериментах, проведення кожного з яких для здійснення методу розведення в агаровому гелі з використанням агар-агару, що постачається Middlebrook, зайняло біля трьох тижнів. Дані, отримані з використанням стандартного штаму *Mycobacterium intracellulare* від ATCC і стандартної проби для розведення в агаровому гелі, свідчать про те, що мінімальна інгібуюча концентрація (MIK) нітазоксаниду у відношенні *Mycobacterium* становить 2 мг/мл, а MIK тизоксаниду становить 4 мг/мл.

Мінімальні інгібуючі концентрації нітазоксаниду і тизоксаниду у відношенні *Mycobacterium intracellulare*

MIK*

Нітазоксанид 2 мг/мл

Тизоксанид 4 мг/мл

*MIK визначалися протягом 3 тижнів на основі методу розведення в агаровому гелі з використанням агар-агару Middlebrook 7H11. У експерименті був використаний стандартний штам *M. intracellulare* ATCC 13950.

Фіг 7 являє собою діаграму, складену на основі аналізу ефективності нітазоксаниду у відношенні мікобактерій, що вирощуються в рідкому живильному середовищі. Був застосований коло-

рометричний аналіз MTS, який при використанні методу підрахунку в агаровому гелі дозволив визначити ріст не за 3 тижні, а за 4 години. Дані, представлені на фіг 7, дозволяють побачити, що при додаванні нїтазоксаниду через 72 години після ініціювання зростання культури він надав негайну дію на розвиток культури, що продовжується, в порівнянні з її розвитком в контрольному середовищі. Доза нїтазоксаниду, рівна 3мкг/мл, припиняє ріст на наступні 24 години, після чого спостерігається уповільнене росту, що має місце протягом подальших 2 днів. Доза величиною 50мкг/мл була повністю бактеріостатичною протягом 144 годин існування культури.

ПРИКЛАД VII

CR YPTOSPORIDIUM PAR VUM

Для нїтазоксаниду перевірялася у відношенні *Cryptosporidium parvum* на експериментальне інфікованих мишах. Нїтазоксанид був поставлений Romark Laboratories, L C, Тампа, шт. Флорида, США.

Сумарна доза для людини (1г в день протягом 7 днів, тобто 7г) була модифікована для застосування на мишах відповідно до методики Паже-Барнса (Paget i Barnes). Доза для людини була помножена на 0,0026 для мишей (що важать приблизно 20г) з метою отримання сумарної кількості лікарської речовини, необхідної для кожного організму-носія вранці і увечері протягом 7 слїдуючих один за одним днів. Кожна миша отримувала 2,6мг в день (7000мгх0,0026/7). Дози вводилися перорально з використанням пластмасового шприца, оснащеного голкою з круглим наконечником.

Двадцять (20) 2-денних смокчущих мишат були інфіковані шляхом перорального введення 100000 овоцитів *Cryptosporidium parvum*, отриманих від заражених малят. Перед введенням мишам овоцити були піддані концентрації з використанням цукрового розчину відповідно до методики, описаної Фейером і Еллісом (Fayer i

Ellis). Від кожної миши були отримані ректальні мазки, які зазнавали щоденного дослідження з використанням модифікованого методу фарбування мазків за Нільсеном (Niehl-Neelsen), описаного Грачиком та інш (Graczyk et al). Виділення овоцитів в фекаліях почалося через два дні після перорального інфікування тварин. На третій день після інфікування тварин 10 мишей отримували 1,3г нїтазоксаниду, що вводиться вранці і увечері протягом слїдуючих один за одним 7 днів, а інші 10 мишей були залишені як контрольна група, до якої лікування не застосовувалося. Ректальні мазки отримувалися щодня протягом кожного з 7 днів лікування і протягом кожного з 7 днів після припинення лікування. Овоцити підлягали суспендуванню в маслі, а їх підрахунок проводився під мікроскопом з розрахунку на 100 дільниць.

Результати

Результати, представлені в представленій нижче таблиці, ясно свідчать про те, що нїтазоксанид, що вводиться при щоденній дозі 2,6мг в день протягом 7 слїдуючих один за одним днів, володів, в порівнянні з контрольною групою тварин, ефективністю у відношенні *Cryptosporidium parvum*, яка виявилася в зменшенні кількості овоцитів в фекаліях інфікованих мишей. До кінця третього дня лікування застосування випробуваного лікарського засобу привело до зменшення кількості овоцитів, що виділяються з фекаліями у 6 з 10 підданих лікуванню мишей. У кінці 7-денного курсу лікування було відмічено повне припинення виділення овоцитів, причому всі піддані лікуванню тварини мали негативні результати при дослідженні фекалій в порівнянні з контрольною групою мишей, не підданих лікуванню. Цей ефект зберігав свою дію, щонайменше, протягом 7 днів після лікування, про що свідчили негативні результати перевірки, що проводиться на третій і сьомий дні після завершення лікування.

Таблиця

Миша №	Число овоцитів, виявлених на одну занурену в масло дільницю							
	На 3-й день лікування		На останній день лікування		На 3-й день після лікування		На 7-ий день після лікування	
	КГ*	ЛГ*	КГ*	ЛГ*	КГ*	ЛГ*	КГ*	ЛГ*
1	3,0	0,0	5,0	0,0	4,0	0,0	2,0	0,0
2	4,0	0,0	4,0	0,0	3,0	0,0	1,0	0,0
3	6,0	0,0	5,0	0,0	4,0	0,0	0,5	0,0
4	3,0	2,0	3,0	0,0	2,0	0,0	1,0	0,0
5	5,0	2,0	3,0	0,0	3,0	0,0	0,5	0,0
6	3,0	0,0	4,0	0,0	5,0	0,0	2,0	0,0
7	3,0	0,0	5,0	0,0	4,0	0,0	1,0	0,0
8	5,0	1,0	5,0	0,0	1,0	0,0	0,5	0,0
9	3,0	3,0	3,0	0,0	2,0	0,0	1,0	0,0
10		0,0	5,0	0,0	2,0	0,0	0,5	0,0
Усього	35	8,0	4,2	0,0	30	0,0	10	0,0
Середнє	3,5	0,8	4,2	0,0	3,0	0,0	1,0	0,0
Еф-сть*		60%		100%		100%		100%

*КГ - контрольна група,
ЛГ - група, піддана лікуванню,
Еф-сть - ефективність лікування

ПРИКЛАД VIII MYCOBACTERIUM

Нїтазоксанид порівнювався з антибіотиком ізоніазидом. Схема порівняння передбачала ви-

користання БЦЖ (BCG) - бацила Кальметта і Гирена (Bacille de Calmette et Guérin) - як штам мікробактерій. Чутливість цього штаму була такою ж як і у *M. tuberculosis*, однак цей штам є більш нешкідливим і, таким чином, не вимагав високого рівня вмісту туберкульозного чинника

Мишам вводилася доза лікарського препарату, рівна 4мг в день на мишу, приготована з використанням 0,2мл соняшникової олії. Результати у мишей, підданих лікуванню нгіазоксанидом, були порівнянні з групою, що приймала ізоніазид

10 ⁷			10 ⁹		
Селезінка	Печінка	Легені	Селезінка	Печінка	Легені
NTZ	1575000	1575000	57500	68250	70000
	800000	1550000	122500	65000	87500
	875000	1550000	30000	75000	35000
	950000	750000	75000	60000	60000
INH*	475000	1050000	11000	20000	21250
	255000	750000	5750	15250	2750
	200000	975000	4000	60000	52500
				20000	37500
ЗФР*	1500000	2125000	92500	102500	195000
	1525000	1800000	98000	140000	175000
	1925000	1750000	177500	98000	150000
	1675000	1800000	117000	105000	150000

*INH - (ймовірно, скорочення для ізоніазиду, прим пер),

*ЗФР - забуферений фосфатом фізіологічний розчин

ПРИКЛАД IX FASCIOLA HEPATICA A

Була досліджена ефективність *in vitro* нгіазоксаниду і деацетил-нгіазоксаниду у відношенні *Fasciola hepatica*

Зрілі *Fasciola hepatica* були витягнуті з жовчних протоків печінки 3 телят, забракованих через фасцильоз у Hardy's Meat Packers, Банки, шт. Луїзіана, США, Ветеринарною медичною діагностичною лабораторією штату Луїзіана. Трематоди були промиті в стерильному фізіологічному розчині протягом однієї години і перенесені в стерильний фізіологічний розчин або RPMI (pH 7,4) на додаткові 3 години. Потім трематоди були записані на ніч при 37°C в атмосфері 5%-ного CO₂ в стерильній RPMI-кроплячій сироватці (об'ємне співвідношення 50:50) або в стерильному RPMI (pH 7,4).

Культура *in vitro* (37°C, 5% CO₂) була доведена до потрібного стану з використанням методу модифікації Ібарра-Дженкінса (Ibarra i Jenkins) (Z Parasitenkd 70 655-661, 1984). При дотриманні умов стерильності трематоди були двічі промиті протягом 2-3 хвилин в збалансованому сольовому розчині Хенка (Hank) (pH 7,2) і вміщені окремо в ямки 6-ямкових культуральних планшетів Лінбро (Linbro), що містять 10мл аліквот вказаних розчинів лікарської речовини в культуральному середовищі. Останнє складалося з стерильної RPMI-кроплячої сироватки (об'ємне співвідношення 50:50) з 2%-ною кров'ю кролика плюс 100 проміле пеніциліну і 100 проміле стрептоміцину. Були використані тільки ті трематоди, які мали нормальні показники активності і морфології.

Вихідні розчини нгіазоксаниду (NTZ) або його метаболіту деацетил-нгіазоксаниду (D-NTZ), що постачаються Romark, були розчинені в ДМСО (2000мкг/мл) і розведені в культуральному середовищі з використанням 100-міліметрових мірних колб з метою отримання заданих концентрацій лікарських препаратів (100, 50, 25, 10, 5, 3,

1мкг/мл). У кожну реплікуючу ямку були включені дві контрольні трематоди: одна в культуральне середовище, оброблене еритроцитами (RBC), і одна в культуральне середовище, не оброблене еритроцитами (RBC).

Трематоди були досліджені на ефективність медикаментозного лікування на основі даних про загибель, порушення рухливості або морфологічних змін при порівнянні з трематодами, не обробленими лікарськими речовинами, з використанням панелі із заднім підсвічуванням і освітленим збільшувальним склом із збільшенням 3X.

Результати

Експеримент 1 (для D-NTZ) - трематоди при обробці 50 і 100мкг агонізували або гинули протягом однієї години. Чотири з 7 трематод при обробці 25 мкг агонізували, дві були активними, і після чотирьох годин залишалася живою лише одна в'яла трематода. У 10-мікрограмовій групі зниження активності трематод було відмічено через 1, 3 і 4 години, а через 7 годин всі трематоди агонізували або були мертвими. Знижена активність спостерігалася у деяких особин через 24 години в групах, підданих обробці 5мкг і 3мкг, з деяким уповільненням початком при обробці 3мкг всі були мертві в 3- і 5-мікрограмових оброблених ямках через 50 годин за винятком однієї в'ялої трематоди в кожній групі. Деяке сповільнення активності було відмічено в групі, обробленій 1мкг, через 42-74 години, і лише 3 активних і одна агонізуюча трематоди залишалися живими через 91 годину через 115 годин в 1-мікрограмовій групі залишалася лише одна в'яла трематода. Загибель трематод в контрольній групі, що містить еритроцити (RBC), спостерігалася через 66 годин (одна трематода), 91 година (одна трематода) і 115 годин (чотири трематоди). У контрольній групі, що не містить еритроцити (RBC), всі трематоди залишалися живими через 91 годину, і лише одна загинула через 115 годин.

Експеримент 2 (Для NTZ) - в порівнянні з результатами, отриманими для D-NTZ, відмічена

декілька велика активність, що виявилася в більш ранньому впливі на рухливість і загибель трематод в 8 реплікуючих планшетах. У 100-, 50- і 25-мікрограмових групах всі трематоди були мертвими або агонізували через 1 годину за винятком однієї трематоди в 25-мікрограмовій групі, яка загинула через 3 години. Дозо-залежне зниження рухливості спостерігалось через 1 годину в кожній з інших оброблених лікарськими речовинами груп. У 10-мікрограмовій групі через 16 годин вижила лише одна трематода. У 5-мікрограмовій групі лише 3 трематоди були активними через 6 годин, а через 16 годин жодна не виявляла активності. Через 23 години лише 2 в'ялі трематоди залишалися живими в 3-мікрограмовій групі, які загинули через 41 годину. У 1-мікрограмовій групі одна трематода загинула через 16 годин, три через 41 годину і п'ять через 74 години. 3 трематоди залишалися активними через 91 годину, а одна трематода виявляла активність через 115 годин. У контрольній групі, що містить еритроцити (RBC), 7 з 8 трематод залишалися живими через 74 години, 3 залишалися живими через 91 годину і дві вижили через 115 годин. У контрольній групі, що не містить еритроцити (RBC), 6 з 8 трематод виявляли активність через 74 години, 4 виявляли активність через 91 годину і дві залишалися активними через 115 годин.

Загибель трематод в групах з високим дозуванням (25, 50, 100мкг) була швидкою і виявлялася в зморщенні і вентральному «стисненні». При більш низьких рівнях обробки лікарськими препаратами більшість трематод на деякий час знижували свою активність і були більш розслабленими і «сплощеними» в стані агонізування і загибелі. Починаючи з 91-ї години в деяких реплікуючих планшетах на результати експерименту почало впливати забруднення. Для експерименту з D-NTZ надмірний розвиток бактерій і грибків і пов'язана з цим їх загибель в двох реплікуючих планшетах переважно мали місце через 115 годин.

Для експерименту з NTZ надмірний розвиток і загибель трематод у всіх реплікуючих планшетах мали місце через 91 годину (в двох реплікуючих планшетах) і через 115 годин (в 5 реплікуючих планшетах). Результати спостережень через 139 годин не були взяті до уваги в зв'язку із загальним забрудненням більшої частини планшетів.

Висновки

Результати експериментів свідчать про високу трематодоцидну ефективність обох перевірених лікарських препаратів. У відношенні *F. hepatica* - основного метаболіту, який, як передбачається, виявляє активність на рівні печінки - нїтазоксандрі володіє трохи більшою трематодоцидною активністю, ніж дезацетил-нїтазоксандрі.

Швидка загибель трематод має місце протягом 1 години при величині дози медикаментозної обробки D-NTZ *in vitro*, що перевищує 50мкг, протягом 4 годин при величині дози 25мкг, і протягом 6-7 годин при величині дози 10мкг. Десять мікрограм може вважатися відповідною величиною дози для доставки цільової лікарської речовини при одноразовій обробці, якщо фармакокінетичні

дані свідчать про те, що рівні життєдіяльності тканин підтримуються протягом більше 6-8 годин після одноразової обробки.

Висока трематодоцидна активність через 74 години (три дні) спостерігалася для обох сполук при величинах дози, рівних 3 і 5мкг. При рівні дозування 1 мкг спостерігалася тривала виживаність трематод, що наближається до показників (але не однакова з ними) тієї контрольної групи, яка не зазнавала обробки лікарськими препаратами. Доставка цієї дози лікарської речовини до трематод в печінкові тканини протягом 3-4 днів може, отже, мати на паразитів неадекватну терапевтичну дію.

ПРИКЛАД X

FASCIOLA GIGANTICA

Нїтазоксандрі був перевірений у відношенні незрілих і зрілих *Fasciola gigantica* на експериментальне інфікованих кроликах.

На целофановий лист були зібрані інцистовані метацеркарії (ИМЦ) *Fasciola gigantica* через 28-35 днів після інфікування равликів *L. calludi* мірацидієм *Fasciola gigantica* з використанням методики, описаної Абдель-Гані (Abdel-Ghany), у відповідності до якої равлики щодня зазнавали впливу штучного освітлення протягом 30хв в чистій дехлорованій водопровідній воді. Отримані інцистовані метацеркарії (ИМЦ) зберігалися під водою в холодильнику при 4°C протягом 5-8 днів до моменту їх використання для інфікування експериментальних тварин.

У експеримент були включені сорок (40) кроликів Боската (Boscat), кожний з яких важив від 1,5 до 2кг, розбитих на дві випробувані групи по 20 тварин в кожній.

Тварини з групи 1 були інфіковані шляхом перорального введення 35-40 інцистованих метацеркарій, загорнених в лист латуні, який був вміщений на корінь язика кожної тварини. Роти кроликів підтримувалися в закритому стані вручну доти, поки інцистовані метацеркарії не були проковтнуті. Ці тварини з групи 1 були використані для перевірки ефективності нїтазоксандрі у відношенні незрілих (4-5-тижневих) *Fasciola gigantica*.

Тварини з групи 2 були інфіковані за допомогою описаного вище перорального введення 10-15 інцистованих метацеркарій і використані для перевірки ефективності нїтазоксандрі у відношенні трематод на ранній стадії їх зрілості (більше 10 тижнів).

Десять тварин з групи 1 отримували 35мг нїтазоксандрі вранці і увечері протягом 7 слідуючих один за одним днів через 4 тижні після їх інфікування на стадії незрілості паразита в циклі його розвитку. Інші десять тварин з групи 1 були залишені як контрольна група, в якій вони не піддавалися лікуванню.

Десять тварин з групи 2 отримували 35мг нїтазоксандрі вранці і увечері протягом 7 слідуючих один за одним днів через 10 тижнів після їх інфікування на стадії зрілості паразита в циклі його розвитку. Інші десять тварин з групи 2 були залишені як контрольна група, в якій вони не піддавалися лікуванню.

Всі тварини приймали корм у вигляді сухого

раціону до кінця експерименту

Через сім днів після введення останньої дози нітазоксаниду всі кролики з кожної групи були умертвлені. Поверхня печінки була досліджена на наявність омертвілих мігруючих складок, особливо на стадії незрілості паразита в циклі його розвитку. Ці омертвілі ділянки були досліджені за допомогою двох хірургічних голок для витягання незрілих мігруючих трематод відповідно до методики, описаної Ель-Бахи (El-Bahy). Печінка була розрізана на дрібні шматочки, особливо навколо мігруючих складок, які були міцерирувані під мікроскопом з метою витягання присутніх трематод. Черевна порожнина і вісцеральні поверхні були промиті теплою водою. Потім вода була зібрана, проціджена і досліджена з метою виявлення незрілих трематод. Всі зібрані паразити, а також їх частини, були перераховані в обох групах 1 і 2 тварин, як підданих, так і не підданих лікуванню. Живі трематоли мали рожеве забарвлення, були прозорими, демонстрували непошкоджену оболонку, що легко витягується з тканини печінки з використанням теплої води, в той час як мертві трематоли мали сірувате забарвлення, були рихлими і мали розірвану омертвілу поверхню. Ефективність нітазоксаниду розраховувалася за допомогою наступної нижче формули:

$$\text{Ефективність, \%} = \frac{a - b}{a} \times 100$$

де

a = кількість трематод, виділених з фекалій тварин з контрольної групи,

b = кількість трематод, виділених з фекалій тварин з лікувальної групи

Результати

Результати досліджень, як це витікає з таблиці 7, свідчать про помітне зменшення кількості незрілих трематод, виділених з печінки кроликів з лікувальної групи, в порівнянні з контрольною групою. Середній процент зменшення кількості трематод був визначений рівним 48,77% (в межах від 40 до 60%)

Таблиця 7

Ефективність нітазоксаниду у відношенні незрілих (4-тижневих) *F. gigantica* у експериментальне інфікованих кроликів

Кількість трематод, витягнутих з печінки кроликів			
Кролик №	Контрольна група	Лікувальна група	Еф-ність, %
1	7	4	42%
2	7	4	42%

вигляді щоденної дози величиною 2,6мг протягом 7 слідуєчих один за одним днів, був більш ефективним у відношенні *Schistosoma hematobium*, де спостерігалось 82,85%-не знищення збудників, ніж у відношенні *Schistosoma mansoni*, де міра знищення збудників досягла лише 59,91% в порівнянні з контрольною групою мишей. Ці резуль-

тати співставні з результатами, отриманими Абазою (Abaza) та інш при лікуванні пацієнтів, коли нітазоксандр не був ефективним у відношенні *S. mansoni*, про що свідчили позитивні підрахунки яєць після проходження курсу лікування нітазоксандром

Таблиця 9

Ефективність нітазоксанду у відношенні зрілих (13-тижневих) *Schistosoma mansoni* у мишей

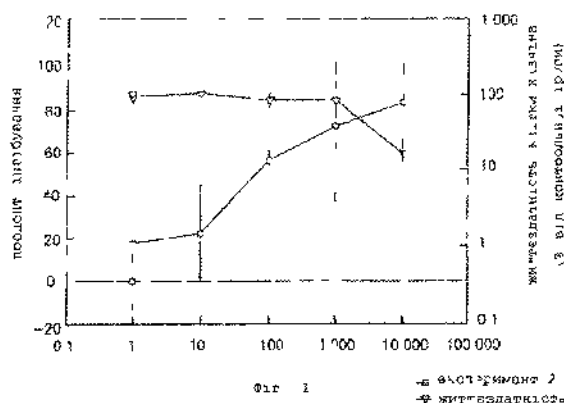
Кількість трематод, виділених з печінки мишей		
Миша №	Контрольна група	Лікувальна група
1	21	10
2	29	9
3	32	10
4	26	11
5	24	13
6	19	10
7	20	9
8	24	12
9	22	8
10	30	7
Усього	247	99
Середнє/Миша	24,7	9,9
Ефективність		59,91

Таблиця 10

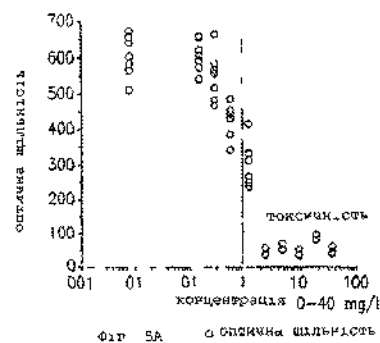
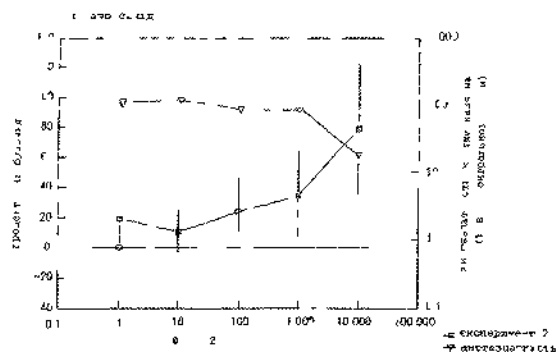
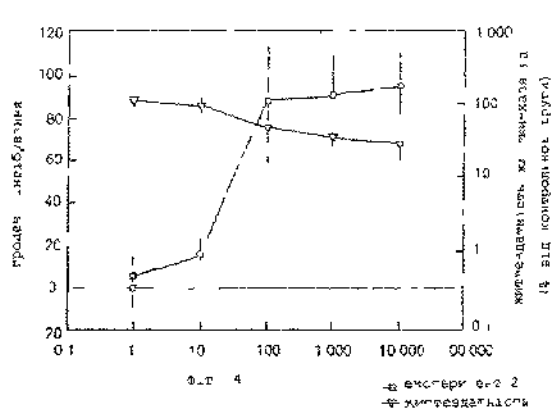
Ефективність нітазоксанду у відношенні зрілих (13-тижневих) *Schistosoma hematobium* у мишей

Кількість трематод, виділених з печінки мишей		
Миша №	Контрольна група	Лікувальна група
1	18	3
2	16	3
3	14	2
4	19	2
5	12	4
6	10	4
7	13	2
8	12	2
9	17	0,0
10	9	2
Усього	140	24
Середнє/Миша	14	2,4
Ефективність		82,85

Нітазоксандр



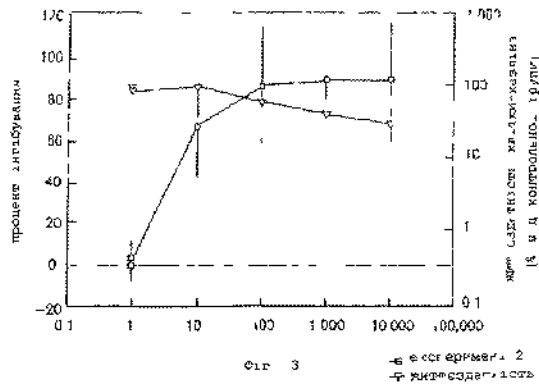
Дельсептазол



37

57079

Умсе да 07



38

