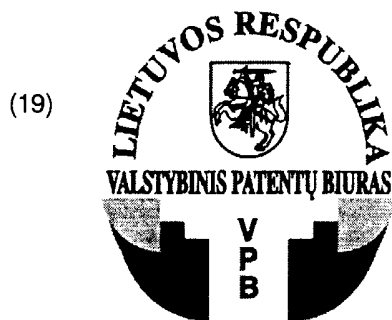




(10) **LT 4751 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

- (11) Patento numeris: **4751** (51) Int. Cl.⁷: **A61K 31/425**
C07D277/58
- (21) Paraiškos numeris: **99-141**
- (22) Paraiškos padavimo data: **1999 12 06**
- (41) Paraiškos paskelbimo data: **2000 08 25**
- (45) Patento paskelbimo data: **2001 01 25**
- (62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —
- (86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/US98/09229**
- (86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **1998 05 06**
- (85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: **1999 12 06**
- (30) Prioritetas: **852447, 1997 05 07, US**
887809, 1997 07 03, US
887810, 1997 07 03, US
- (72) Išradėjas:
Jean-Francois ROSSIGNOL, US
- (73) Patento savininkas:
ROMARK LABORATORIES, L. C., Suite 870, 6200 Courtney Campbell
Causeway, Tampa, FL 33607, US
- (74) Patentinis patikėtinis:
Reda ŽABOLIENĖ, UAB "Metida", Pilies g. 8/1-2, 2600 MTP Vilnius, LT

- (54) Pavadinimas:
Tizoksanido ir nitazoksanido farmacinės kompozicijos

- (57) Referatas:

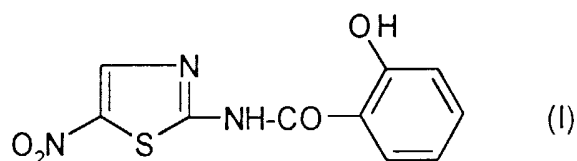
Farmacinė kompozicija, kurioje kaip veiklusis agentas yra bent vienas junginys, pasirinktas iš grupės, susidedančios iš tizoksanido ir nitazoksanido darinių.

Pageidautina, kad šis veiklusis agentas būtų dalelių formos, kurių dydžiai yra mažesni nei 200 μm, o vidutinis dalelių dydis didesnis nei 10 μm. Pageidautina šias farmacines kompozicijas stabilizuoti bent viena farmaciškai priimtina rūgštimi. Šios farmacinės kompozicijos yra ypatingai tinkamos gydyti asmenų turinčių susilpnintą arba nuslopintą imuninę sistemą, ligoms, susijusioms su santykinai patogeniniais mikrobais, ir trematodinių infekcijų gydymui.

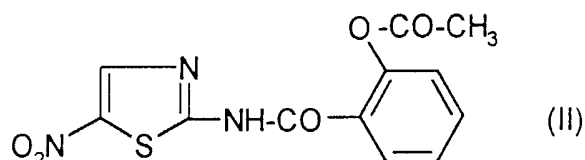
IŠRADIMO PAGRINDAS

Išradimo sritis

Šis išradimas yra susijęs su farmacine kompozicija, kurioje, kaip veiklusis agentas, yra bent vienas junginys, pasirinktas iš grupės, susidedančios iš formulės (I):



ir formulės (II):



junginių.

Pageidautina, kad veiklusis ingredientas būtų dalelių formos, šių dalelių dydžiai būtų mažesni nei 200 μm , o vidutinis dalelės dydis - didesnis nei 10 μm .

Šis išradimas taip pat yra susijęs su farmacinėmis kompozicijomis, stabilizuotomis bent viena farmaciškai priimtina rūgštimi.

Šios farmacinės kompozicijos yra ypatingai tinkamos gydymui tam tikrų infekcijų asmenims, turintiems susilpnintą arba nuslopintą imuninę sistemą, ir trematodinių infekcijų gydymui.

Žinomas technikos lygis

Formulės (II) junginio gamybos būdas ir panaudojimas buvo aprašytas U.S. patente Nr. 3950351. Pareiškėjas gryno formulės (I) junginio gavimą buvo aprašęs PCI paraiškoje 95/28393, o taip pat ir formulės (I) ir formulės

(II) junginių mišinio panaudojimą. Tačiau dabar buvo pastebėta, kad gydymo efektyvumas, naudojant aprašytus junginius, priklauso nuo vaisto veikliosios medžiagos dalelių dydžio ir junginių stabilumo.

Būtina neatidėliotinai vystyti daugelio parazitinių ir bakterinių infekcijų gydymo būdus žmonėms, turintiems susilpnintą imuninę sistemą (AIDS, vėžiu sergantys pacientai, pagyvenę, senstantys, pacientai po organų transplantavimo, naudojantys imunosupresinius vaistus). Kita gimininga sritis yra trematodų infekcijos, ypač tropinio klimato šalyse. Todėl yra reikalingos farmacinės kompozicijos, kurias galėtų toleruoti net ir susilpnintą imuninę sistemą turintys žmonės, ir tokios, kurios būtų stabilios, laikant tropinėje aplinkoje.

Konkrečiau kalbant, *Toxoplasma gondii* yra pirmuonis, kuris yra viena iš plačiausiai paplitusių centrinės nervų sistemos latentinės infekcijos priežasčių visame pasaulyje. Daug sveikų žmonių yra užsikrėtę šiuo parazitu, bet paprastai imuninė sistema kontroliuoja organizmą. *T. gondii* yra labiausiai paplitęs santykinis patogenas AIDS pacientų smegenyse. Pastaruoju metu toksoplazmozė tampa vis didėjanti problema ne tik dėl AIDS, bet ir dėl plataus imunosupresinių vaistų vartojimo (pvz. skiriama pacientams, kuriems transplantuojami organai). Toksoplazmozė paprastai yra gydoma derinant pirimetaminą ir sulfadiaziną. Nors šie vaistai yra veiksmingi, jie neužmuša parazito cistų, taigi gydymą reikia tęsti, naudojant palaikomąsias dozes. Toksiškumas dažnai verčia nutraukti vaisto vartojimą, ypač imunosupresijos atveju, ir gaunamas atkritimas. Statistika nėra gera; ji rodo, kad maždaug 70 procentų imunodeficitą turinčių pacientų miršta, o vidutinio išgyvenimo trukmė yra keturi mėnesiai.

Kriptosporidiozę sukelia mikroskopinis parazitas-pirmuonis *Cryptosporidium parvum*. Asmenims su normalia imunine funkcija *C. parvum* sukelta diarėja gali būti intensyvi ir ilgai trunkanti, bet ji savaime praeina. AIDS pacientams kriptosporidinė diarėja dažnai yra pavojinga gyvybei. Nustatyta, kad 15-20 procentų AIDS pacientų kenčia nuo šios būklės. Iki šiol nebuvo pakankamai efektyvios arba patvirtintos kriptosporidiozės terapijos.

Dažniausiai identifikuojamas patogenas AIDS pacientams yra *Enterocytozoon bieneusi* - parazitas-pirmuonis, kuris buvo rastas beveik vieno ketvirtadalio pacientų organizme. Neseniai pasirodė, kad šis mažytis parazitas gali būti daugelio ŽIV turinčių pacientų neišaiškintų įsiurbimo sutrikimo, diarėjos ir išsekimo atvejų priežastis. Efektyvus gydymas iki šiol nežinomas.

Keletas kitų mikrosporidijų rūšių infekuoja ŽIV-teigiamus pacientus, įskaitant *Encephalitozoon hellem* ir *cuniculi*, ir naują rūšį, pavadintą *Septata intestinalis*. Nesenoje publikacijoje teigiama, kad išsisėjusių mikrosporidinių infekcijų reikšmė vis didėja.

Infekcijos parazitą *Isospora belli* yra kliniškai neatskiriamos nuo kriptosporidiozės. Šis parazitas yra dažniau sutinkamas tropiniame klimate, ir buvo pranešta, kad JAV yra mažiau nei 1 % tokių pacientų, nors jų faktiškas kiekis tikriausiai yra didesnis.

Pneumocystis carinii paprastai klasifikuojamas kaip parazitas-pirmuonis; kai kurie tyrimai parodė, kad jis gali būti grybelis, su kuriuo jis turi bendras kai kurias genų sekas. *P. carinii* paprastai infekuoja plaučius (*Pneumocystis Carinii Pneumonia (PCP)*). Pranešama, kad gydymas yra veiksmingas 40-60 % pacientų, ir susijęs su toksiškumo problemomis ypatingai pacientams su susilpninta imunine sistema. Tarp rimčiausių žmogaus imunodeficito viruso (ŽIV) infekcijų pasireiškimų vaikams, PCP išsiskiria savo plačia apimtimi, unikaliu pasiskirstymu pagal amžių ir dažnu mirtingumu. PCP yra labiausiai paplitusi santykinai patogeninių mikroorganizmų sukeliama infekcija tarp vaikų su ŽIV infekcija; nustatyta PCP apimtis ŽIV infekuotų, negavusių profilaktikos priemonių kūdikių tarpe yra mažiausiai 12 % pirmaisiais gyvenimo metais. Atsiradus PCP, dauguma vaikų neužilgo miršta.

Mycobacterium Avium kompleksu (MAC) yra vadinamos infekcijos labai panašių mikobakterinių organizmų šeima - *Mycobacterium avium* ir *M. intracellulare*. Jeigu MAC atsiranda neturintiems susilpnintos imuninės sistemos žmonėms, ji paprastai pasireiškia kvėpavimo trakto infekcijos forma. AIDS sergantiems pacientams MAC yra dažniausiai išsisėjęs (išsisėjęs MAC

arba DMAC), ir gali būti apimtas beveik kiekvienas organas. Nesename darbe pranešta, kad MAC bakterijos buvo rastos 43 % pacientų, kurie išgyveno 2 metus po AIDS diagnozavimo, atveju. Išsisėjusiam MAC nebuvo rasta jokie standartinio gydymo. Paprastai yra skiriamas vaistų derinys ir, jeigu jis yra veiksmingas, gydymą reikia tęsti visą gyvenimą. Todėl neatidėliotinai yra reikalingas efektyvesnis gydymo būdas.

Infekuotieji ŽIV yra ypatingai imlūs infekcijai *Mycobacterium tuberculosis*, ir šios ligos eiga yra pagreitinta. Nors ekstrapulmonarinė tuberkuliozė yra reta neinfekuotiems ŽIV pacientams, ji dažnai atsiranda ŽIV-teigiamiems žmonėms. CDC paskelbė nurodymus kaip gydyti TB, kuriuose pabrėžiamas didėjantis paplitimas daugeliui vaistų atsparios TB (MDR-TB). Mirtingumas tarp AIDS pacientų su MDR-TB yra labai didelis (apie 80 %) ir ligos progresavimas yra be galo greitas.

Taigi yra reikalinga nedelsiant surasti tokių infekcijų, taip paplitusių ir grėsmingų žmonėms ir gyvūnams, gydymo būdus.

Taip pat yra reikalingas plataus veikimo vaistas trematodinių infekcijų gydymui supaprastinti. Dabartiniu metu reikia diagnozuoti specifinį trematodinį patogeną ir tada paskirti gydymą vaistais, būdingais šiai trematodai. Dauguma mažiau išsivysčiusių šalių neturi priemonių konkrečios trematodos diagnozavimui. Plataus veikimo vaisto suradimas pašalintų diagnozės poreikį.

Schistosoma mansoni - kraujo trematoda - yra šistosomozę, antrąją iš svarbiausių žmogaus tropinių parazitinių ligų (po maliarijos) ir svarbiausią trematodinę žmonių infekciją, sukeliantis agentas. *Schistosoma haematobium* yra kita svarbi žmogų infekuojanti rūšis. Šistosomoze pasaulyje serga daugiau nei 200 milijonų individų, įskaitant keletą šimtų tūkstančių Jungtinėse Valstijose.

Fasciola hepatica, įprasta kepenų trematoda, yra pirminė avių liga, bet kartais ją turi ir žmonės. Parazitas įsigudrina išgyventi ir esant intensyviai šeiminingo imuniniam atsakui. Gydymui buvo pasiūlytas bitionolis, bet jis nėra priimtas vartojimui Jungtinėse Valstijose.

Tokiu būdu yra reikalinga farmacinė kompozicija, kuri būtų atspari laikymui tropinėmis sąlygomis, ir kuri turėtų platų veikimą prieš trematodas.

Išradimo santrauka

Tyrimuose su gyvuliukais ir žmonių klinikiniuose tyrimuose buvo pastebėta, kad gydymo efektyvumas, naudojant (I) ir (II) formulės junginius, priklauso nuo vaisto veikliosios medžiagos dalelių dydžio ir junginių stabilumo.

Aprašytosios farmacinės kompozicijos tinka žmonių ir gyvulių trematodinių infekcijų, kurias sukelia *Schistosoma*, kaip antai *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma mekongi*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma intercalatum*; *Fasciola*, kaip antai *Fasciola hepatica* ir *Fasciola gigantica*, *Fasciolopsis biski*; ir *Dicrocoelium dendriticum*, *Heterophyes heterophyes* ir *Metagonimus yokogawa*, gydymui.

Šios farmacinės kompozicijos yra taip pat tinkamos santykinai patogeninių mikroorganizmų *Cryptosporidium parvum*, *Isospora belli*, *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon intestinalis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium intracellulare*, *Pneumocystis carinii* ir *Toxoplasma gondii* infekcijų gydymui esant susilpnintai imuninei sistemai.

Šios farmacinės kompozicijos gali būti peroraliniam vartojimui tinkamoje formoje, tokioje kaip kieta dozuota forma, skysta suspensija arba pasta.

TRUMPAS BRĖŽINIŲ APRAŠYMAS

Pilnesniam šio išradimo prigimties ir objekto supratimui reikėtų susipažinti su toliau duodamu smulkiu aprašymu ir prie jo pridedamais brėžiniais, kuriuose:

Fig.1 parodyta procentinė inhibicija ir šeimininko ląstelių gyvybingumas paveikus nitazoksanidu prieš *E. intestinalis*.

Fig.2 parodyta procentinė inhibicija ir šeimininko ląstelių gyvybingumas paveikus nitazoksanidu prieš *V. corneae*.

Fig.3 parodyta procentinė inhibicija ir šeimininko ląstelių gyvybingumas paveikus albendazolu prieš *E. intestinalis*.

Fig.4 parodyta procentinė inhibicija ir šeimininko ląstelių gyvybingumas paveikus albendazolu prieš *V. corneae*.

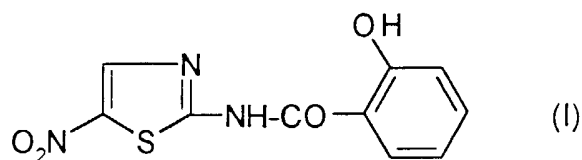
Fig.5 ir 6 parodytas OD reikšmių, gautų kiekvienai *T. gondii* kultūros duobutei, priklausomybės nuo vaisto koncentracijos kultūroje grafikas.

Fig.7 yra diagrama, gauta remiantis nitazoksanido efektyvumo prieš mikobakterijas, auginamas skystame buljone, bandymais.

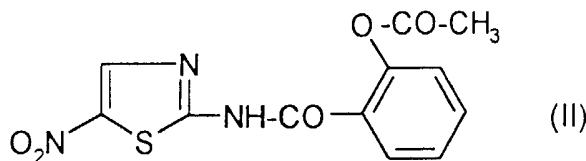
Fig.8 parodyti aktyvių dalelių, turinčių mažesnę nei $\varnothing \mu\text{m}$ dydį, procentai.

Smulkus išradimo aprašymas

Šio išradimo infekcijų gydymo būdas apima farmacinės kompozicijos, kurioje kaip veiklioji medžiaga yra bent vienas junginys, pasirinktas iš grupės, susidedančios iš deacetil-nitazoksanido, kurio formulė (I):



ir nitazoksanido, kurio formulė (II):



vartojimą.

Nitazoksanidas (NTZ) - (II) formulės junginys - yra 2-(acetiloksi)-N-(5-nitro-2-tiazolil)benzamido - junginio, kurį pirmą kartą susintetino Rossignol ir Cavier 1975 m.- trivialus pavadinimas. 2 mg nitazoksanido galima ištirpinti 1 ml DMSO. Nitazoksanidas yra lengvai absorbuojamas peroraliniu būdu.

Iki šiol nebuvo duomenų, kad (I) ir/arba (II) formulės junginiai gali būti plačiai veiksmingi prieš trematodines infekcijas, arba kad jie būtų pakankamai netoksiški ir juos galėtų vartoti net susilpnintą imuninę sistemą turintys žmonės.

Nitazoksanido gavimas ir kai kurie jo panaudojimo atvejai aprašyti US Patente Nr. 3,950,351, o taip pat ir šio išradėjo publikacijose. Deacetil-nitazoksanidas - (I) formulės junginys - kartais yra vadinamas tizoksanidu arba d-NTZ ir yra nitazoksanido metabolitas.

WO 95/28393 šis išradėjas aprašo gryno (II) formulės junginio gavimo būdą bei kompozicijos, kurioje yra (I) ir (II) formulių junginių mišinys, panaudojimą.

Dabar buvo pastebėta, kad (I) formulės junginio, (II) formulės junginio arba jų mišinių dalelės, kurių dydžiai yra tarp 170 ir 520 μm (vidutinis dalelių dydis = 352 μm) turi labai ribotą efektyvumą, kai jos įvedamos peroraliniu būdu gyvuliams arba žmonėms. Tokių dalelių efektyvumas yra mažesnis nei esančių farmacinių produktų efektyvumas, ir todėl jos yra nepriimtinos reguliaciniams arba komerciniams tikslams.

Taip pat buvo pastebėta bandymuose su šunimis, kad įvedus (I) formulės junginio ir (II) formulės junginio, kurių dalelių dydžiai mažesni už 5 μm , vienkartinę 50 mg kilogramui dozę peroraliniu būdu, gyvuliukams yra sukeliam sunki priešiška reakcija.

Dabar buvo atrasta, kad norint efektyviai ir saugiai gydyti parazitų, bakterijų, grybelių ir virusų sukeltas infekcijas žmonėms ir gyvuliams, tiek kietos dozuotos formos, tiek ir vandeninių suspensijų pavidalo farmacinėse kompozicijose veikliojo agento efektyvi dozė turi būti kietų dalelių formoje, kurių dydžiai turi būti mažesni nei 200 μm , ir turėti (I) ir/arba (II) formulės junginių, kurių veikliosios kietos medžiagos vidutinis dalelių dydis yra didesnis už 10 μm .

Didelio kiekio veikliojo agento dalelių, kurios yra didesnės nei 200 μm , buvimas, lyginant su kiekiu dalelių, kurių dydžiai yra tarp 5 ir 200 μm , labai sumažina šių junginių chemoterapinį aktyvumą. Pageidautina, kad šio išradimo farmacinėse kompozicijose nebūtų daugiau nei 5 masės %

veikliosios kietos medžiagos dalelių, kurių dydžiai didesni nei 200 μm . Dar geriau, kai šio išradimo farmacinėse kompozicijose iš esmės nėra didesnių nei 200 μm veikliosios kietos medžiagos dalelių.

Didelio kiekio veikliojo agento dalelių, kurios yra mažesnės nei 5 μm , buvimas, lyginant su kiekiu dalelių, kurių dydžiai yra tarp 5 ir 200 μm , gali turėti nepalankų poveikį gyvuliams arba žmonėms. Be to, buvo pastebėta, kad dalelės, kurių dydžiai yra mažesni nei 5 μm , greičiau absorbuojamos iš virškinimo trakto į kraują ir todėl nėra tokios veiksmingos prieš parazitus, bakterijas, grybelius ir virusus, kurie paprastai gyvena gyvulių ir žmonių virškinimo trakte.

Patyręs mokslininkas negali numatyti, kad (I) formulės ir (II) formulės junginių dalelių dydis galėtų turėti tokią svarbią įtaką į jo priešmikrobinį aktyvumą gyvuliams ir žmonėms. Pavyzdžiui, išradėjo atliktuose tyrimuose junginiai, tokie kaip albendazolas, mebendazolas, niklozamidas, prazikvantelis ir metronidazolas, nerodė tokių didelių priešparazitinio aktyvumo skirtumų gyvuliams ir žmonėms priklausomai nuo jų dalelių dydžio. Be to, patyręs mokslininkas negali numatyti, kad (I) formulės ir (II) formulės junginių dalelių dydis galėtų turėti tokį nepalankų poveikį į gyvulių arba žmonių sugebėjimą toleruoti minėto veikliojo agento vartojimą.

(I) ir (II) formulės junginys(iai) gali būti vartojami arba kieta dozuota forma, arba kaip vandeninės suspensijos, ir pageidautina, kad farmacinėje kompozicijoje būtų veikliojo agento - (I) ir/arba (II) formulės junginio turinčio mažesnės nei 200 μm kietas daleles - efektyvi dozė, ir kad minėtos veikliosios kietos medžiagos vidutinis dalelių dydis būtų didesnis nei 10 μm , matuojant Coulter® skaičiuokliu LS 100. Šis įrenginys naudoja 750 nm lazerio šviesą nustatyti nuo 0,4 iki 900 μm skersmens dalelėms pagal šviesos difrakciją. Mėginiai matuojami vandenyje su nedideliu kiekiu tritono X-100, kad milteliai būtų geriau sudrėkinami ir nesukibę.

Pageidautina, kad vidutiniai veikliosios kietos medžiagos dalelių dydžiai būtų tarp 10 ir 100 μm , geriau tarp 20 ir 50 μm . Tinkamiausių kompozicijų pavyzdžiais yra.

- kompozicija, kurioje mažiau nei 10 masės % minėtos veikliosios kietos medžiagos dalelių yra didesnės nei 100 μm ;
- kompozicija, kurioje mažiausiai 50 masės % minėtos veikliosios kietos medžiagos dalelių yra mažesnės nei 50 μm .

Pageidautina, kad vidutinis veikliosios kietos medžiagos dalelių dydis būtų tarp 10 ir 100 μm , geriau tarp 20 ir 50 μm . Pagal tinkamiausią kompozicijos įgyvendinimo variantą mažiau nei 10 % minėtos veikliosios kietos medžiagos dalelių yra mažesnės nei 5 μm .

Pageidautina, kad veiklusis agentas arba veiklieji agentai, naudojami kietoje dozuotoje formoje arba suspensijoje, būtų (I) formulės ir (II) formulės junginių, mažesnių nei 200 μm kietų dalelių mišinys, kuriame (I) formulės junginio masės kiekis (I) ir (II) formulės junginių masės atžvilgiu šiame mišinyje yra tarp 0,5 ir 20 %, geriausia tarp 0,5 ir 10 %.

Šis išradimas taip pat yra susijęs su aukščiau aprašytais farmacinėmis kompozicijomis, kuriose pageidautina, kad būtų bent viena farmaciškai priimtina rūgštis. Tokių rūgščių pavyzdžiais yra: citrinos rūgštis, glutamo rūgštis, gintaro rūgštis, etansulfonrūgštis, acto rūgštis, vyno rūgštis, askorbo rūgštis, metansulfonrūgštis, fumaro rūgštis, adipo rūgštis, obuolių rūgštis ir jų mišiniai. Labai tinkama yra citrinos rūgštis. Minėtų rūgščių buvimas pagerina veikliojo agento arba agentų stabilumą.

Pageidautina, kad farmaciškai priimtinos rūgštys ir minėtos veikliosios kietos medžiagos masių santykis būtų tarp 0,01 ir 0,5, geriausia tarp 0,03 ir 0,2. Pageidautina, kad rūgštys kiekio pakaktų suspensijos pH gauti tarp 2 ir 6, geriau tarp 3 ir 5, o visų geriausia tarp 3,5 ir 4,5.

Farmacinių kompozicijų pagaminimo metodikos, tinkamiausi pavyzdžiai, kietos ir skystos dozotos formos yra aprašytos WO/95/28393, kuris čia duodamas kaip literatūros šaltinis. Pageidautina, kad kompozicijose būtų drėkinimo agento ir, galimas daiktas, krakmolo darinio, tokio kaip aprašytas US patente Nr. 5,578,621, kuris čia duodamas kaip literatūros šaltinis galimiems drėkinimo agentams ir krakmolo dariniams parinkti. US Patente Nr. 5,578,621 aprašytas drėkinimo agentas yra ir dispergiklis.

Tokiose farmacinėse kompozicijose arba kaip kietose, arba kaip skystose dozuotose formose, arba kaip pastose, arba kaip tepaluose gali būti papildomų veikliųjų agentų, tokių kaip antibiotikai, priešvirusiniai agentai arba protonų pumpavimo inhibitoriai. Nors ir nėra naudinga, tačiau tokiose farmacinėse receptūrose gali būti (I) formulės junginio ir/arba (II) formulės junginio veiklių kietų dalelių, kurios yra didesnės už 200 µm.

Kompozicijose gali būti pagalbinių medžiagų, kurios tinka peroralinio vartojimo formoms pagaminti.

Norint gauti puikų efektyvumą prieš platų parazitų, bakterijų, grybelių ir virusų spektrą, pageidautina, kad minėtų veikliųjų kietų dalelių pasiskirstymo faktorius būtų tarp 0,8 ir 2, geriau - tarp 1,1 ir 1,9, geriausia - didesnis nei 1,5, o šis pasiskirstymo faktorius yra išskaičiuojamas pagal tokią formulę:

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

kurioje

- $F_{90\%}$ yra 90 % pasiskirstymo faktorius;
- $\phi_{90\%}$ yra frakcijos dalelių, atitinkančios 90 % minėtų aktyvios kietos medžiagos dalelių, maksimalus dalelių dydis ir
- $\phi_{10\%}$ yra frakcijos dalelių, atitinkančios 10 % minėtų aktyvios kietos medžiagos dalelių, maksimalus dalelių dydis.

Pagal konkretų šio išradimo įgyvendinimo variantą (I) formulės junginys ir/arba (II) formulės junginys pagaminami aukščiau aprašytais būdais, po to sumalami taip, kad mažiau nei 10 % minėtų veikliųjų dalelių būtų didesnės nei 100 µm, mažiau nei 50 % minėtų dalelių būtų didesnės nei 50 µm ir mažiau nei 10 % minėtų dalelių būtų mažesnės nei 5 µm, vidutiniam dalelių dydžiui esant tarp 20 ir 50 µm. Po to minėtos veikliosios dalelės yra granuliuojamos, naudojant veikliosios kietos medžiagos dalelių mišinį ir bent vieną granuliavimo agentą. Granuliavimo agento pavyzdžiais yra: polivinilpirolidonas, vanduo, alkoholis, sacharozė, hidroksilceliuliozė ir jų mišiniai. Granuliavimo procese pageidautina pridėti bent vieną farmaciškai priimtina rūgštį.

Šis išradimas susijęs su kietomis dozuotomis formomis, kuriose yra šio išradimo kompozicija, tokiomis kaip tabletės, suyrančios tabletės,

padengtos tabletės, matricos ir t.t. Šio išradimo dozuotose formose yra, pavyzdžiui:

- kietos veikliosios dalelės, kurių dydžiai yra mažesni nei 200 μm , esant mažiau nei 10 % minėtų dalelių didesnių nei 100 μm , mažiau nei 50 % minėtų dalelių didesnių nei 50 μm ir mažiau nei 10 % minėtų dalelių, mažesnių nei 5 μm , ir vidutiniam dalelių dydžiui esant tarp 20 ir 50 μm ;

- bent vienas granuliavimo agentas;
- bent vienas drėkinantis agentas;
- bent vienas krakmolo darinys, ir
- bent viena farmaciškai priimtina rūgštis, kurią geriausia pridėti granuliavimo proceso metu.

Šio išradimo skystose dozuotose formose, kaip antai vandeninėse suspensijose yra, pavyzdžiui:

- kaip veiklusis agentas - (I) formulės junginio ir/arba (II) formulės junginio kietos dalelės, kurių dydžiai yra mažesni nei 200 μm , esant mažiau nei 10 % minėtų dalelių didesnių nei 100 μm , mažiau nei 50 % minėtų dalelių didesnių nei 50 μm ir mažiau nei 10 % minėtų dalelių, mažesnių nei 5 μm , ir vidutiniam dalelių dydžiui esant tarp 20 ir 50 μm ; ir

- bent vienas granuliavimo agentas;
- bent vienas drėkinantis agentas;
- bent viena farmaciškai priimtina rūgštis, esant suspensijos pH tarp 2 ir 6, geriau - tarp 3 ir 5, ir visų geriausia - tarp 3,5 ir 4,5;

- bent vienas tirštinimo agentas, pavyzdžiui ksantano derva, agaro derva, kristalinė celiuliozė, karubos derva, karboksimetilceliuliozė arba jų mišiniai.

Šio išradimo pastų arba tepalų, tinkamų peroraliniam vartojimui, formose yra, pavyzdžiui:

- kaip veiklusis agentas - (I) formulės junginio ir/arba (II) formulės junginio kietos dalelės, kurių dydžiai yra mažesni nei 200 μm , esant mažiau nei 10 % minėtų dalelių, didesnių nei 100 μm , mažiau nei 50 % minėtų dalelių,

didesnių nei 50 μm ir mažiau nei 10 % minėtų dalelių, mažesnių nei 5 μm , ir vidutiniam dalelių dydžiui esant tarp 20 ir 50 μm ; ir

- bent vienas drėkinantis agentas;
- bent viena farmaciškai priimtina rūgštis, esant suspensijos pH tarp 2 ir 6, geriau - tarp 3 ir 5, ir visų geriausia - tarp 3,5 ir 4,5;
- bent vienas tirštinimo agentas, pavyzdžiui ksantano derva, agaro derva, kristalinė celiuliozė, karubos derva, karboksimetilceliuliozė arba jų mišiniai.

Šio išradimo pastų arba tepalų vietiniam arba intravaginaliniam vartojimui, formose yra, pavyzdžiui:

- kaip veiklusis agentas - (I) formulės junginio ir/arba (II) formulės junginio kietos dalelės, kurių dydžiai yra mažesni nei 200 μm , esant mažiau nei 10 % minėtų dalelių, didesnių nei 100 μm , mažiau nei 50 % minėtų dalelių, didesnių nei 50 μm ir mažiau nei 10 % minėtų dalelių, mažesnių nei 5 μm , ir vidutiniam dalelių dydžiui esant tarp 20 ir 50 μm ;
- bent vienas drėkinantis agentas;
- bent viena farmaciškai priimtina rūgštis, esant suspensijos pH tarp 2 ir 6, geriau - tarp 3 ir 5, ir visų geriausia - tarp 3,5 ir 4,5;
- cetilo alkoholis ir/arba gliceridai, ir/arba propilenglikolis;
- bent vienas tirštinimo agentas, pavyzdžiui ksantano derva, agaro derva, kristalinė celiuliozė, karubos derva, karboksimetilceliuliozė arba jų mišiniai.

Farmacinių kompozicijų pagaminimo aprašymas

Sausas grynas (I) formulės junginys ir sausas grynas (II) formulės junginys sumalami ir milteliai paskirstomi pagal dalelių dydžius tinkliniu sietu.

Po sumalimo (I) formulės junginio, (II) formulės junginio ir jų mišinių dalelės turėjo fig.8 parodytą pasiskirstymą pagal dydį. Fig.8 parodyta procentai dalelių, turinčių mažesnę nei $\varnothing$ μm dydį.

Iš šios figūros matyti, kad:

- mažiau nei 10 masės % dalelių turi mažesnius nei maždaug 5 µm dydžius;
- mažiau nei 10 masės % dalelių turi didesnius nei maždaug 70 µm dydžius;
- vidutinis dalelių dydis yra maždaug 40 µm;
- dalelių pasiskirstymo faktorius yra maždaug 1,73, ir šis pasiskirstymo faktorius buvo išskaičiuotas pagal tokią formulę:

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

kurioje

- $F_{90\%}$ yra 90 % pasiskirstymo faktorius;
- $\varnothing_{90\%}$ yra frakcijos dalelių, atitinkančios 90 % minėtų aktyvios kietos medžiagos dalelių, maksimalus dalelių dydis ir
- $\varnothing_{10\%}$ yra frakcijos dalelių, atitinkančios 10 % minėtų aktyvios kietos medžiagos dalelių, maksimalus dalelių dydis.

Tokių kompozicijų konkretūs pavyzdžiai yra duoti tolimesnėse lentelėse.

1 lentelė. Peroralinio vartojimo suyrančių tablečių, kuriose kaip veiklieji agentai yra (II) formulės junginys ir (I) formulės junginys, sudėties pavyzdys

Nitazoksanidas (99%) + deacetil-nitazoksanidas (1%)	200 mg
Mikrokristalinė celiuliozė	
Avicel pH 102, parduodama FMC-USA	116 mg
Krospovidonas	25 mg
Magnio stearatas	3 mg
Koloidinis silicio dioksidas	5 mg
Citrinų rūgštis	10 mg
Žemuogių kvapas Nr.877720, parduodamas Robertet	10 mg
Natrio sacharinatas	2 mg

2 lentelė. Peroralinio vartojimo padengtų tablečių, kuriose kaip veiklieji agentai yra (II) formulės junginys ir (I) formulės junginys, sudėties pavyzdys

Nitazoksanidas	500 mg
Kukurūzų krakmolas	60 mg
Želatinintas kukurūzų krakmolas	70 mg

Hidroksipropilmetilceliuliozė	5 mg
Sacharozė	20 mg
Krakmolo natrio glikoliatas	30 mg
Citrinų rūgštis	25 mg
Talkas	8 mg
Magnio stearatas	7 mg

Dangos: Karštas cukraus tirpalas arba padengimo plėvelė užpurškiama ant tablečių arba granulių, turinčių 500 mg veikliosios medžiagos.

3 lentelė. Peroralinio vartojimo vandeninės suspensijos, kurioje kaip veiklieji agentai yra (II) formulės junginys ir (I) formulės junginys, pavyzdys. Suspensijos pH yra apie 4,1.

Nitazoksanidas (98%) + deacetil-nitazoksanidas (2%)	2 g
Distiliuotas vanduo	100 ml
Natrio benzoatas	0,2 g
Sacharozė	30,5 g
Ksantano derva	0,2 g
Mikrokristalinė celiuliozė ir natrio karboksimetilceliuliozė	
Avicel RC-591, parduodama FMC-USA	0,8 g
Citrinų rūgštis	0,2 g
Natrio citrato dihidratas	50 mg
Žemuogių kvapas Nr.877720, parduodamas Robertet	125 mg
Raudoni dažai Nr.33D ir C	1 mg

4 lentelė. Peroralinio vartojimo pastos, kurioje kaip veiklieji agentai yra (II) formulės junginys ir (I) formulės junginys, pavyzdys.

Nitazoksanidas (98%) + deacetil-nitazoksanidas (2%)	500 mg
Mineralinė alyva	10 g
Rudasis cukrus	1 g
Mikrokristalinė celiuliozė ir natrio karboksimetilceliuliozė	
Avicel RC-591, parduodama FMC-USA	0,8 g
Citrinų rūgštis	0,2 g

5 lentelė. Intravaginalinio arba vietinio vartojimo pastos arba tepalo, kuriuose kaip veiklieji agentai yra (II) formulės junginys ir (I) formulės junginys, pavyzdys.

Nitazoksanidas (98%) + deacetil-nitazoksanidas (2%)	8 g
Kremaforas A6	2 g
Kremaforas A25	1,5 g
Sacharozė	30,5 g
Mineralinė alyva	7 g

Luvitolis EHO	7 g
Glicerolio monoesteris	4 g
Cetilo alkoholis	3 g
Simetikonas	0.5 g
Germabenas II	1 g
Propilenglikolis	3,5 g
Distiliuotas vanduo	62,5 g

Šio išradimo farmacinės kompozicijos yra kompozicijos, kurios turi platų veikimo spektrą į parazitus, bakterijas, grybelius ir virusus, ypatingai jeigu jos yra vartojamos peroraliniu būdu.

Aukščiau aprašytų farmacinių kompozicijų efektyvumas ir saugumas gyvuliams ir žmonėms buvo puikus. Konkrečiau, žmonių klinikiniuose tyrimuose buvo pastebėta, kad aukščiau aprašytų farmacinių kompozicijų efektyvumas yra daug didesnis gydant parazitines infekcijas nei tokių pačių receptūrų, kuriose veikliojo junginio dalelių dydžiai yra tarp 170 ir 520 μm (vidutinis dalelės dydis = 352 μm) net ir tuo atveju, kai pacientams buvo skiriamos tris kartus didesnės didelių dalelių dozės ir ilgesnį laiką. Gautų išgydymo procentų pavyzdžiai parodyti toliau duodamoje 6 lentelėje.

6 lentelė. Žmonių klinikinių tyrimų, naudojant (I) formulės ir (II) formulės junginius, kurių dalelių dydžiai yra nuo 170 iki 520 μm (vidurkis = 352 μm) rezultatų palyginimas su rezultatais, gautais naudojant (I) formulės ir (II) formulės junginius, kurių dalelių dydžiai yra nuo 5 iki 200 μm (vidurkis = 34 μm).

(I) formulės junginys (98 %) + (II) formulės junginys (2 %)

	Dalelių dydžiai 170-520 μm Dozė = 15-50 mg/kg/per dieną, gydoma 3-7 dienas Išgydytų skaičius/viso = išgydymo %	Dalelių dydžiai 5-200 μm Dozė = 15 mg/kg/per dieną, gydoma 3 dienas Išgydytų skaičius/viso = išgydymo %
Parazitas		
<i>Blastocystis hominis</i>	12/27 = 44 %	10/10 = 100 %
<i>Entamoeba</i> <i>histolytica</i>	29/47 = 62 %	106/133 = 80 %
<i>Gardia lamblia</i>	11/37 = 30 %	50/73 = 68 %

<i>Ascaris lumbricoides</i>	3/69 = 4 %	144/179 = 80 %
<i>Trichuris trichuria</i>	7/48 = 15 %	58/79 = 73 %

Kiekvieno iš 6 lentelėje nurodytų parazitų atveju proporciniai išgydymo procentai yra daug geresni pacientams, gydytiems aktyviomis 5-200 μm dalelėmis, nei pacientams, gydytiems aktyviomis 170-520 μm dydžio dalelėmis, kiekvienu atveju esant statistiniam patikimumui $p < 0,02$ (naudojant standartinį X^2 testą). Taip buvo net ir tuo atveju, kai veikliojo agento didesnių dalelių dozės buvo paprastai didesnės, o gydymo trukmė dažniausiai ilgesnė, nei pacientų, gavusių farmacinės kompozicijas, kuriose buvo mažesnės nei 200 μm veikliojo agento dalelės. Nei vienai pacientų grupei nebuvo pastebėta rimtų nepageidaujamų efektų.

Rezultatai, panašūs į aukščiau aprašytus bandymuose su žmonėmis, buvo taip pat stebimi ir bandymuose su gyvuliais.

Be to, nepageidaujamos reakcijos, pastebėtos bandymuose su šunimis, įvedus peroraliniu būdu 50 miligramų kilogramui (I) formulės junginio ir (II) formulės junginio vienkartinę dozę, plačiuose tyrimuose su gyvuliais, naudojant (I) formulės junginį ir (II) formulės junginius, kurių dalelių dydžiai 5-200 μm (vidurkis $> 10 \mu\text{m}$) nebuvo pastebėta, netgi jei tokia pati arba didesnė šių junginių dozė buvo įvedama kasdien 90 dienų arba ir ilgiau.

Be to, šios kompozicijos buvo stabilios (net ir laikant 40 °C temperatūroje ir esant 65 % santykinei drėgmei šešis mėnesius arba skystų suspensijų atveju, kai suspenduota vandenyje - 3 mėnesius), tokiu būdu užtikrinant, kad veiklieji ingredientai nesuskyla, ir kad po pagaminimo kompozicija išlaiko savo efektyvumą tokį laiko tarpą, kuris yra tinkamas medicininiams ir komerciniams tikslams.

Toliau bus parodytas šių farmacinių kompozicijų efektyvumas.

I pavyzdys

CRYPTOSPORIDIUM PARVUM

Preliminariniame klinikiname bandyme 30 AIDS pacientų, sergančių chroniška kriptosporidine diarėja, buvo gydomi peroraline kasdienine 500-

2000 mg nitazoksanido doze. Jeigu diarėja tęsėsi, pacientai gavo dar keturias savaites nitazoksanido iki 2000 mg per dieną.

Dvidešimt aštuoni žmonės gydymą baigė per dvi arba daugiau savaičių, ir 16 iš jų buvo įvertintas terapinis atsakas aštuntą gydymo savaitę. Pastarojoje grupėje 12 individų turėjo 50 procentų arba didesnę tuštinimosi dažnio per dieną sumažėjimą, 10 individų turėjo pastebimą parazitų kiekio sumažėjimą arba išnykimą išmatose, o keturiems išvis parazito neberasta. Šešiams pacientams ir klinikinio ir parazitologinio atsako kriterijai rodė gydymo naudą.

Atrodo, kad pacientai, kurie gavo didesnes vaisto dienos dozes ilgesnį laikotarpį, parodė teigiamą atsaką.

Platūs nitazoksanido tyrimai su AIDS susijusios kriptosporidinės diarėjos atžvilgiu parodė sumažintą tuštinimosi dažnį žmonėms, gavusiems 500, 1000, 1500 arba 2000 mg vaisto per dieną. Bandymo dalyvių vidutinis CD4+ skaičius buvo 42 ląstelės/mm³ (intervalas 0-303 ląstelės/mm³), vidutiniškai 6,7 tuštinimosi per dieną vidutiniškai 15 mėn., *Cryptosporidium parvum* oocistos išmatose ir jokių kitų pastebimų enterinių patogenų. Beveik visiems dalyviams gydymas azitromicinu arba paromomicinu buvo nesėkmingas.

Po 23 savaičių 9 iš 13 turėjo pilną klinikinį atsaką (nuo vieno iki trijų daugiausia suformuotų tuštinių per dieną), o 4 iš 13 turėjo dalinį klinikinį atsaką (mažiausiai 50 procentų sumažėjęs tuštinimosi kartų kiekis per dieną arba išmatų konsistencijos pasikeitimas taip, kad bent 75 procentai jų yra suformuotos). Tyrimo pabaigoje 8 iš 11 buvo visiškai išnykęs parazitas, o kitiems trims buvo labai sumažintas oocistų kiekis. Stebima geresnio atsako tendencija, naudojant 1000 mg per dieną arba didesnes dozes ir ilgiau gydant. Du iš bandymo dalyvių turėjo urtikarinius odos išbėrimus; daugiau nei 90 procentų laikėsi tyrimų režimo daugiau nei keturias savaites.

II pavyzdys

CRYPTOSPORIDIUM PARVUM

Informacija apie dozes *in vitro*

Nitazoksanidas buvo ištirpintas steriliame dimetilsulfoksido (DMSO) ir bandytas prieš *C. parvum* oocistų infekuotų ląstelių monosluoksnius, imant 100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml ir 0,1 µg/ml koncentracijas. Buvo atliktas antrasis bandymas, kuriame nitazoksanidas tiriamas imant papildomas 20, 2, 0,2 ir 0,02 µg/ml koncentracijas. Šios koncentracijos buvo gautos panaudojant eilę skiedimų pilna DMEM terpe ir davė galutinę 0,5 % DMSO koncentraciją. Į kontrolinę terpę taip pat pridėta 0,5 % DMSO.

Eksperimente buvo naudota MDBKF5D2 Cells ląstelių kultūra, išauginta 7 mm skyreliuose, ir kaip *Cryptosporidium parvum*: GCH1 oocistos, 5×10^4 duobutei, ir eksperimentas vykdomas norint palyginti paromomiciną (teigiama kontrolė) su nitazoksanidu (eksperimentinis vaistas). Kitos medžiagos buvo: imuninis anti-*Cryptosporidium parvum* sporozoitinis triušio serumas (0,1 %) ir ožkos anti-triušio antikūnai, konjuguoti su fluoresceinu (1 %).

Toksiškumo nustatymo bandymas:

200 µl terpės, turinčios 100, 10, 1 ir 0,1 µg/ml nitazoksanido, ir reikiamo kontrolinio tirpalo, supilama į dvi 96 duobučių plokštelės duobutes, kuriose yra susijungiantys MDBKF5D2 ląstelių monosluoksniai ir dvi duobutės be monosluoksnių. Vaistas inkubuojamas ant monosluoksnių 37 °C temperatūroje, esant 8 % CO₂. Po 24 valandų (1 bandymas) ir 48 valandų (2 bandymas) į kiekvieną duobutę pridedama MTS (Oveno tirpalas) ir PMS, kurių koncentracijos yra atitinkamai 333 µg/ml ir 25 µM. Plokštelė vėl padedama į inkubatorių tamsoje ir auginama dvi valandas. Po dviejų valandų 100 µl kiekvieno nuopilo perkeliama į naują mikrotitrų plokštelę ir matuojama ELISA matuokliu esant 490 nm bangos ilgiui. Rezultatai užrašomi ir analizuojami. Toksiškumo procentai apskaičiuojami atimant vaisto nuopilų vidutinį optinį tankį (OD) iš kontrolinės terpės nuopilų (vaisto nėra) vidutinio optinio tankio (OD), padalinant iš kontrolinės terpės OD ir padauginant iš 100.

$$\frac{OD_{\text{terpės}} - OD_{\text{vaisto}}}{OD_{\text{terpės}}} \times 100$$

Sveikų *C. parvum* oocistų bandymas

5×10^4 *C. parvum* oocistų duobutei inkubuojama nitazoksanide (100, 20, 10, 2, 1, 0,2, 0,1 ir 0,02 µg/ml) 37 °C temperatūroje (8 % CO₂) ant susijungiančių MDBKF5D2 ląstelių monosluoksnių. Po 24 ir 48 val nustatomas ir analizuojamas infekcijos lygis kiekvienoje duobutėje, panaudojant imunofluorescencijos testą. Inhibicijos procentai apskaičiuojami atimant vidutinį parazitų skaičių/10-je laukelių vaisto duobutėse iš vidutinio parazitų skaičiaus/10-je laukelių kontrolinėje terpėje (vaisto nėra), padalinant iš vidutinio kontrolės skaičiaus ir po to padauginant iš 100.

$$\frac{\text{Vidutinis kontrolės skaičius} - \text{tiriama vaisto skaičius}}{\text{Vidutinis kontrolės skaičius}} \times 100$$

Rezultatai:

1 bandymas: 24 val.

Junginys	Konc.	Vidurkis (±SN)*	Toksiškumo procentai	Inhibicijos procentai
Infekuota terpė	0	983,5(±128,2)	0	0
Paromomicinas	2 mg/ml	482(±47,1)	23,8	51
NTZ	100 µg/ml	prarasta	88,1	NA**
	10 µg/ml	55,5 (±13,5)	65,1	94,4
	1 µg/ml	224,5(±28,5)	8,3	77,2
	0,1 µg/ml	474,5(±29,5)	19,3	51,8

* Parazitų skaičius/10-je laukelių

** Negalima nustatyti dėl toksiškumo

2 bandymas: 48 val.

Junginys	Konc.	Vidurkis ($\pm$ SN)*	Toksiškumo procentai	Inhibicijos procentai
Infekuota terpė	0	2231,25($\pm$ 90,03)	0	0
Paromomicinas	2 mg/ml	580($\pm$ 33,42)	40,8	74,01
NTZ	20 μ g/ml	68,75($\pm$ 13,77)	92,87	96,92
	2 μ g/ml	113,75($\pm$ 21,36)	24,93	94,90
	0,2 μ g/ml	1020($\pm$ 158,48)	16,56	54,29
	0,02 μ g/ml	1041($\pm$ 191,46)	21,23	53,33

* Parazitų skaičius/10-je laukelių

Nitazoksanido poveikis i sveikas *C. parvum* oocistas

1 bandyme, esant 10, 1 ir 0,1 koncentracijoms, gaunami atitinkamai 94,4, 77,2 ir 51,8 % inhibicijos lygiai ir toksiškumo ląstelėms lygiai 65,1, 8,3 ir 19,3 %. Nors esant 10 μ g/ml koncentracijai gaunama beveik pilna parazito infekcijos inhibicija, yra akivaizdus didelis toksiškumo procentas. Imant 1 μ g/ml nitazoksanido, parazito inhibicija ir toksiškumas ląstelėms yra geresni nei paromomicino, kurio koncentracija 2 mg/ml (77,2 % parazito inhibicijos ir 8,3 % toksiškumo nitazoksanido atveju, kurio koncentracija 1 μ g/ml, lyginant su 51 % parazito inhibicijos ir 23,8 toksiškumo ląstelėms paromomicino atveju, kurio koncentracija 2 mg/ml).

2 bandyme vaistas buvo modifikuotas norint gauti geresnį dozės pasiskirstymą ir minimalų toksiškumą. Todėl kultūros liko gyvybingos 48 valandas vietoj 24 valandų, kaip buvo 1 bandyme. Inkubavimas 48 valandas aiškiai davė didesnį santykinį toksiškumą ląstelėms, kaip matyti iš paromomicino tyrimo abiejuose bandymuose. Nitazoksanido 20 μ g/ml koncentracija vis dar yra per daug toksiška laikant 48 valandas, nors pasirodo, kad ląstelių monosluoksnis yra dar nepalietas. Gali būti, kad didelis toksiškumas, kuris turėtų veikti ląstelių funkciją, taip pat veikia parazito infekciją/vystymąsi. Esant 2 μ g/ml nitazoksanido koncentracijai, buvo žymi

parazito infekcijos inhibicija ir palyginti mažas toksiškumas ląstelėms. Kiti praskiedimai taip pat rodė žymią inhibiciją ir mažą toksiškumą. Esant 2 µg/ml vaisto koncentracijai, vidutinis toksiškumas ląstelėms ir 94,90 % inhibicinis aktyvumas rodo, kad nitazoksanidas, kurio koncentracija 2 µg/ml, yra pranašesnis už paromomiciną, kurio koncentracija 2 mg/ml, *in vitro* *C. parvum* infekcijos atveju (pvz. 1000 kartų didesnė koncentracija).

III pavyzdys

CRYPTOSPORIDIUM PARVUM

Dozės *in vitro* ir informacija apie laikymą:

Nitazoksanido ir deacetil-nitazoksanido (NTZ ir NTZdes) tirpalai buvo tirti prieš *C. parvum* oocistų ir eksistinių sporozoitų infekuotų ląstelių monosluoksnius, imant 10, 1, 0,1 ir 0,01 µg/ml koncentracijas. Kiekvienas junginys buvo ištirpintas 100 % dimetilsulfoksido (DMSO) ir praskiedžiamas iki norimos koncentracijos steriliu DMEM. Kiekvienos nitazoksanido koncentracijos tirpale ir kontrolinėje terpėje buvo pastovus kiekis (0,025 %) DMSO.

Eksperimente naudota MDBKF5D2 Cells ląstelių kultūra išauginta 7 mm skyreliuose, ir kaip *Cryptosporidium parvum*: GCH1 oocistos, 5×10^4 duobutei, ir eksperimentas buvo vykdomas norint palyginti paromomiciną (teigiama kontrolė) su nitazoksanidu (eksperimentinis vaistas). Kitos medžiagos buvo: imuninis anti-*Cryptosporidium parvum* sporozoitinis triušio serumas (0,1 %) ir ožkos anti-triušio antikūnai, konjuguoti su fluoresceinu (1 %).

Toksiškumo nustatymo bandymas:

200 µl terpės, turinčios aukščiau minėtas nitazoksanido koncentracijas, ir reikiamų kontrolinių tirpalų, supilama į dvi 96 duobučių plokštelės duobutes, kuriose yra susijungiantys MDBKF5D2 ląstelių monosluoksniai ir dvi duobutės be monosluoksnių. Vaistas inkubuojamas ant monosluoksnių 37 °C temperatūroje, esant 8 % CO₂. Po 48 valandų į kiekvieną duobutę

pridedama MTS (Oveno tirpalas) ir PMS, kurių koncentracijos yra atitinkamai 333 µg/ml ir 25 µM. Plokštelė vėl padedama į inkubatorių tamsoje ir auginama 2 valandas. Po 2 valandų 100 µl kiekvieno nuopilo perkeliama į naują mikrotitrų plokštelę ir matuojama ELISA matuokliu esant 490 nm bangos ilgiui. Rezultatai užrašomi ir analizuojami. Toksiškumo procentai apskaičiuojami atimant vaisto nuopilų vidutinį optinį tankį (OD) iš kontrolinės terpės nuopilų (vaisto nėra) vidutinio optinio tankio (OD), padalinant iš kontrolinės terpės OD ir padauginant iš 100.

$$\frac{OD_{\text{terpės}} - OD_{\text{vaisto}}}{OD_{\text{terpės}}} \times 100$$

Citotoksiškumo įvertinimas taškais buvo toks: 0,5 % toksiškumas = 0; 6-25 % toksiškumas = 1; 26-50% toksiškumas = 2; 51-75% toksiškumas = 3 ir 76-100% toksiškumas = 4. Paprastai laikoma, kad citotoksiškumas, įvertintas 0 arba 1 tašku, yra priimtinas. Laikoma, kad citotoksiškumas, įvertintas 2, 3 arba 4 taškais, yra didelis toksiškumas ląstelių monoslouksniui.

Sveikų *C. parvum* oocistų bandymas

5x10⁴ *C. parvum* oocistų duobutei inkubuojama aukščiau minėtų nitazoksanido koncentracijų tirpaluose 37 °C temperatūroje (8 % CO₂) ant susijungiančių MDBKF5D2 ląstelių monoslouksnių. Panaudojant imunofluorescencijos testą, nustatomas infekcijos lygis kiekviename duobutėje ir analizuojamas kompiuteriu. Inhibicijos procentai apskaičiuojami atimant vidutinį parazitų skaičių/laukelyje vaisto duobutėse iš vidutinio parazitų skaičiaus/laukelyje kontrolinėje terpėje (vaisto nėra), padalinant iš vidutinio kontrolės skaičiaus ir po to padauginant iš 100.

$$\frac{\text{Vidutinis kontrolės skaičius} - \text{tiriama vaisto skaičius}}{\text{Vidutinis kontrolės skaičius}} \times 100$$

Rezultatai:

C. parvum oocistų bandymas (48 val.)

Vaistai	Konc.	Para- zитай	±SN	Toks/ OD	±SN	Inh.%	Toks. %	Taš- kai
Vande- ninė terpė	0	681,58	±271,02	2,024	±0,18	0	0	0
Paro- momi- cinas	2000	115,75	±44,65	1,219	±0,00 9	83,02	39,79	2
0,025% DMSO terpė	0	628,50	±171,94	1,799	±1,45	0	0	0
NTZ	10	11,75	±7,33	0,413	±0,13	98,13	77,07	4
	1	39,67	±13,13	1,618	±0,32	93,69	10,09	1
	0,1	643,42	±229,73	1,878	6	≤0	≤0	0
	0,01	714,33	±194,79	1,617	±0,15	≤0	10,12	1
					4 ±0,07 2			
Naujas NTZdes	10	13,75	±6,66	0,337	±0,00	97,81	81,27	4
	1	39,92	±13,49	1,710	5	93,65	4,97	0
	0,1	649,86	±152,19	1,506	±0,03	≤0	16,29	1
	0,01	749,33	±139,49	1,721	3	≤0	4,36	0
					±0,11 9 ±0,14 4			

Konc. - µg/ml; Parazitai - vidutinis parazitų skaičius laukelyje (analizuota 12 laukelių). Inh.% - parazitų infekcijos inhibicijos procentai; Toks.% - vaisto procentinis toksiškumas ląstelėms.

Iš aukščiau pateiktų duomenų matyti, kad NTZdes inhibicinis aktyvumas yra toks pat kaip ir II pavyzdžio NTZ. Ir nitazoksanas, ir deacetil-nitazoksanas, kai yra tiriami lygiagrečiai, yra vienodai efektyvūs *in vitro* prieš *Cryptosporidium parvum*, ir rodo 98 ir 94 % inhibiciją, imant kiekvieno junginio atitinkamai 10 ir 1 µg/ml koncentracijas. Nitazoksano atveju 1 µg/ml buvo mažiausia koncentracija, duodanti daugiau nei 90 % inhibiciją, bet 50 % inhibiciją galima gauti imant mažesnes nitazoksano koncentracijas, kaip antai 0,2, 0,1 ir 0,02 µg/ml. Tomis pačiomis eksperimentinėmis sąlygomis paromomicinas, naudojamas kaip teigiama kontrolė, buvo 2000 kartų mažiau efektyvus, esant inhibicijos procentams 51-83 % ribose, kai jo koncentracija 2000 µg/ml.

IV pavyzdys

E. *INTESTINALIS* IR V. *CORNEA*

2RK-13 ląstelės (triušio inkstų ląstelių linija) sudedamos į 24 duobučių kultivavimo plokšteles, imant $2,6 \times 10^5$ ląstelių/duobutei (1,0 ml terpės RPMI 1640 su 2 mM L-glutamino ir 5 % šiluma inaktyvuoto fetalinio veršiuko serumo). Ląstelės inkubuojamos 37 °C temperatūroje CO₂ inkubatoriuje per naktį; per šį laiką duobutės susilieja (vienas padvigubėjimas, nustatyta 5×10^5 ląstelių/duobutei).

Į šeimininko ląsteles 3:1 santykiu, lyginant su nustatytais šeimininko ląstelėmis, arba $1,5 \times 10^6$ organizmų duobutei pridedama *Septata intestinalis* (išvesti iš audinių kultūrų) organizmų.

Vaistai ištirpinami DMSO, vandenyje arba metanolyje (priklausomai nuo tirpumo), pagaminant 1,0 mg/ml pagrindinius tirpalus. Pagrindiniai tirpalai laikomi -70 °C temperatūroje. Eksperimente naudojami praskiesti tirpalai pagaminami pilnoje audinių kultūrų terpėje. Kiekvienas praskiestas tirpalas tiriamas trijose duobutėse.

Terpė keičiama kas 3-4 dienas (terpėje yra tik ką praskiesti vaistai).

Šeštą dieną (po parazito ir vaistų pridėjimo) nustatomas toksiškumas ląstelėms. Tiriamas kontrolinių ląstelių, gavusių vaistus, bet negavusių parazito, susilieėjimas, ląstelių morfologija ir nustatoma, ar yra negyvų arba plūduriuojančių ląstelių. Ląstelės, inkubuotos tik su parazitais, tiriamos nustatant ar parazitai yra infekciniai (t.y. nustatoma, ar yra parazitoforinių vakuolių). Ląstelių, inkubuotų su parazitais ir vaistais, atveju įvertinamas toksiškumas šeimininko ląstelėms ir santykinis parazitoforinių vakuolių skaičius (t.y. didelis, vidutinis arba mažas).

Dešimtą dieną į kultivavimo duobutes pridedama 100 µl 10 % SDS (galutinė koncentracija 0,5 %), kad būtų suardytos ląstelių membranos ir išlaisvinamos mikrosporidijos. Bendras kiekvienoje duobutėje esančių parazitų skaičius nustatomas skaičiuojant akikvotą hematocitometru. Rezultatai išreiškiami inhibicijos procentais (lyginant su infektuotomis ląstelėmis, negavusiomis vaisto).

Rezultatai parodyti fig. 1-4.

V pavyzdys

TOXOPLAZMA GONDII

Nitazoksanidas ir deacetil-nitazoksanidas buvo tiriami prieš parazitus, konkrečiau prieš *Toxoplasma gondii* RH kamieną, išlaikytą perkeliant iš vienos pelės į kitą keletą kartų. MRC5 fibroblastų (Bio-Merieux, Prancūzija) ląstelių kultūros, kultivuojamos 96 duobučių mikroplokštelėse, inokuliuojamos *T. gondii*. Į kiekvieną kultivavimo duobutę pridedama 200 tik ką išskirtų tachizoitų, išskyrus 8 kontrolines duobutes (neigiama kontrolė). Po 4 valandų inkubavimo į kultūras pridedama praskiestų vaistų tirpalų.

Nitazoksanidas (NTZ) ir deacetil-nitazoksanidas (dNTZ) buvo tirti, imant koncentracijas $8 \cdot 10^{-4}$ - 40 mg/l intervale. Vaistai iš pradžių ištirpinami DMSO, pagaminant 2 mg/l koncentracijos tirpalą, po to atliekama serija praskiedimų kultivavimo terpe. Nuosėdų nepastebėta.

Praskiesti vaistų tirpalai supilstomi į kultūras (8 duobutės vienam tirpalui), ir kultivavimo plokštelės inkubuojamos 72 val. Po to kultūros fiksuojamos šaltu metanoliu. *T. gondii* augimas įvertinamas ELISA metodu, naudojant peroksidaze žymėtą triušio anti-*T.gondii* antikūną. Išmatuojamas optinis tankis kiekvienoje duobutėje.

Rezultatai pateikti braižant kiekvienos kultivavimo duobutės OD priklausomybę nuo vaisto koncentracijos kultūroje. Statistikinę analizę sudarė regresinė analizė su 95 % patikimumo intervalu ir nustatymas dozės-atsako kreivių iš OD reikšmių, gautų kiekvienam vaistui.

Viena plokštelė buvo nudažyta Giemsa, norint ištirti citopatologinį efektą kultūrose.

Buvo atlikti trys atskiri eksperimentai. Kiekviename eksperimente kiekvienam junginiui buvo naudojamos dvi kultivavimo plokštelės; kiekvienoje kultivavimo plokštelėje kiekvienai vaisto koncentracijai buvo naudojami 8 dublikatai.

Rezultatai:

Visose trijose eksperimento serijose buvo gauti panašūs rezultatai. Vieno būdingo eksperimento rezultatų grafinis atvaizdavimas yra duotas fig.5 a, b, c ir fig.6 a, b, c.

Nitazoksanidas (fig.5 a, b, c).

Jokio inhibicinio poveikio nebuvo pastebėta 10^{-4} - 0,3 mg/l koncentracijų intervale. Žymus poveikis buvo pastebėtas esant $\geq 0,6$ mg/l koncentracijoms, o esant $\geq 2,5$ mg/l koncentracijoms gaunama visiška *Toxoplasma* augimo inhibicija. Tačiau esant $\geq 2,5$ mg/l koncentracijoms pastebėtas žymus toksiškumas ląstelių monosluoksniui.

Šio monosluoksniu mikroskopinis tyrimas parodė, kad 1,25 mg/l NTZ koncentracija sukėlė citopatologinį efektą parazituoams ląstelėms, kuriose padidėjo parazitoforinė vakuolė ir sumažėjo viduląstelinio parazitų skaičius. Pagal regresinę analizę 50 % inhibicijos koncentracija yra 1,2 mg/l.

Deacetil-nitazoksanidas (fig.7 a, b, c):

Panašūs rezultatai buvo gauti su deacetil-nitazoksanidu: 10^{-4} - 0,3 mg/l koncentracijų intervale inhibicinio poveikio nėra, inhibicija stebima, esant $\geq 0,6$ mg/l koncentracijai, ir žymus toksiškumas - esant $\geq 2,5$ mg/l koncentracijai. Nustatyta 50 % inhibicijos koncentracija yra 1,2 mg/l.

Gauti rezultatai pasikartojo trijuose atskiruose bandymuose, kuriuose buvo nustatomas vaisto inhibicinis poveikis pakartojant kultivavimą kiekvienai vaisto koncentracijai.

Ir NTZ, ir deacetil-NTZ atveju, imant maždaug 1,2 mg/l koncentracijas, galima pastebėti žymią *Toxoplasma* augimo inhibiciją ir parazitoforinės vakuolės pasikeitimą, bet pats parazitas nesikeičia.

Šie rezultatai rodo, kad šie vaistai yra gana aktyvūs prieš *T. gondii* ir kad *in vivo* galima laukti terapinio efekto, remiantis tuo, kad serume arba audiniuose turėtų būti gaunama maždaug 1 mg/ml koncentracija.

VI pavyzdys

MYCOBACTERIA

Buvo rasta, kad nitazoksanidas pasižymi priešmikrobiniu aktyvumu prieš TB organizmus. Toliau duodamoje lentelėje parodytos nitazoksanido ir tizoksanido MIK reikšmės bandyme prieš *Mycobacterium intracellular*, panaudojant agarą praskiedimų metodiką. Šie rezultatai paremti keliais eksperimentais; kiekvienas eksperimentas buvo vykdomas apie 3 savaites agarą praskiedimų metodu, panaudojant Middlebrook agarą. Gauti duomenys rodo, kad nitazoksanido MIK prieš *Mycobacteria* yra 2 µg/ml, o tizoksanido MIK yra 4 µg/ml, naudojant standartinį *Mycobacterium intracellular* iš ATCC kamieną ir standartinį agarą praskiedimų testą.

Nitazoksanido ir tizoksanido MIK *Mycobacteria intracellulare*

MIK	
Nitazoksanidas	2 µg/ml
Tizoksanidas	4 µg/ml

*MIK buvo nustatytos standartiniu agarą praskiedimų metodu, naudojant Middlebrook 7H11 agarą 3 savaites.

Eksperimente naudotas *M. intracellular* ATCC 13950 (standartinis kamienas).

Fig.7 duota diagrama, paremta nitazoksanido efektyvumo prieš mycobacteria augimą skystame buljone tyrimu. Mes panaudojome MTS kalorimetrinį testą, kuris leido nustatyti augimą 4 val. laikotarpyje vietoj 3 savaičių, kurių reikėjo skaičiavimų agarą metodu. Kaip galima matyti iš fig.7 duomenų, kai nitazoksanidas pridedamas praėjus 72 val. nuo kultivavimo pradžios, tuoj pat gaunamas poveikis į augimą, lyginant su vien tik kontroline terpe. Nitazoksanido 3 µg/ml dozė sustabdo augimą tolimesnėms 24 valandoms, o po to kitas 2 dienas stebimas lėtas augimas. 50 µg/ml dozė buvo visiškai bakteriostatinė per 144 kultivavimo valandas.

VII pavyzdys***CRYPTOSPORIDIUM PARVUM***

Buvo tirtas nitazoksanido efektas prieš *Cryptosporidium parvum* eksperimentiškai infekuotose pelėse. Nitazoksanidas buvo gautas iš Romark Laboratories, L.C. in Tampa, Florida.

Visa žmonėms skiriama dozė (1 g/per dieną, 7 dienos, t.y. 7 g) buvo pritaikyta panaudojimui pelėms pagal Paget ir Barnes. Žmonėms skiriama dozė buvo padauginta iš 0,0026 pelėms (sveriančioms maždaug 20 gramų), gaunant bendrą vaisto kiekį, kurio reikia kiekvienam individui rytą ir vakarą 7 dienas iš eilės. Kiekviena pelė gavo 2,6 mg/per dieną ($7000 \text{ mg} \times 0,0026/7$). Dozės buvo įvedamos per gerklę, naudojant plastikinį švirkštą su apvalų galą turinčia adata.

Dvidešimt dviejų dienų amžiaus žindančios pelės buvo infekuotos įvedant peroraliniu būdu 100000 *Cryptosporidium parvum* oocystų, gautų iš infekuotų veršelių. Prieš įvedant pelėms, oocistos buvo sukonzentruotos, panaudojant cukraus tirpalą pagal Fayer ir Ellis aprašytą metodiką. Iš kiekvienos pelės buvo imami tepinėliai iš tiesiosios žarnos ir tiriama kasdien, naudojant modifikuotą Niehl-Neelsen nudažymo metodiką, kurią aprašė Graczyk et al. Praėjus 2 dienoms po peroralinio infekavimo, išmatose pasirodė oocystų apvalkalai. Trečią dieną po gyvuliukų infekavimo 10 pelių gavo 1,3 mg nitazoksanido ryte ir vakare 7 dienas iš eilės, o 10 likusių pelių buvo laikoma kontrolei be gydymo. Kasdien buvo imami tepinėliai iš tiesiosios žarnos 7 gydymo dienas ir 7 dienas po gydymo. Oocistos buvo suspenduojamos alyvoje ir mikroskopu skaičiuojamas jų kiekis 100 laukelių.

Rezultatai:

Rezultatai, parodyti toliau duodamoje lentelėje, aiškiai rodo, kad nitazoksamido 2,6 mg/per dieną dozė, vartojama 7 dienas iš eilės, buvo efektyvi prieš *Cryptosporidium parvum*, sumažindama oocystų apvalkų skaičių infekuotų pelių išmatose, lyginant su kontroliniais gyvuliukais. Tiriamasis vaistas sumažino oocistų apvalkų skaičių 6 iš 10 gydytų pelių

trečiosios gydymo dienos gale. Septintosios gydymo dienos gale visiškai sumažėjo oocistų apvalkalų kiekis, visų gydytų gyvuliukų išmatų tyrimas buvo neigiamas, lyginat su negydytomis kontrolinėmis pelėmis. Šis efektas tęsėsi mažiausiai 7 dienas po gydymo, kas buvo parodyta gaunant neigiamus rezultatus, tiriant trečią ir septintą dieną po gydymo pabaigos.

Pelės Nr.	Oocistų, rastų alyvos imersiniame laukelyje, skaičius							
	3-čią gydymo dieną		paskutinę gydymo dieną		3-čią dieną po gydymo		7-tą dieną po gydymo	
	kontr. grupė	gydyt a grupė	kontr. grupė	gydyt a grupė	kontr. grupė	gydyt a grupė	kontr. grupė	gydyt a grupė
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
Viso	35	8,0	42	0,0	30	0,0	10	0,0
Vidurkis	3,5	0,8	4,2	0,0	3,0	0,0	1,0	0,0
Efektyvumas		60 %		100 %		100 %		100 %

VIII pavyzdys

MYCOBACTERIUM

Nitazoksanidas buvo lyginamas su antibiotiku izoniazidu. Metodikoje mycobacterium kamieniu naudota BCG (Bacile de Calmette et Guerin). Šio kamieno jautrumas buvo toks pat kaip ir *M. tuberculosis*, bet šis kamienas yra mažiau kenksmingas ir todėl nereikalauja didelių tuberkuliozinio agento kiekių.

Pelėms buvo duodama 4 mg/pelei per dieną preparato 0,2 ml saulėgrąžų aliejaus. Pelių gydymo nitazoksanidu rezultatai buvo lyginami su grupe, gavusia izoniazidą.

	10 ⁷			10 ⁵		
	Blužnis	Kepenys	Plaučiai	Blužnis	Kepenys	Plaučiai
Nitazo	1575000	1575000	57000	68250	70000	50
	800000	1550000	122500	65000	87000	75
	875000	1550000	30000	75000	35000	150
	950000	750000	75000	60000	60000	50
INH	475000	1050000	11000	20000	21250	50
	255000	750000	5750	15250	27500	125
	200000	975000	4000	60000	52500	50
				20000	37500	50
PBS	1500000	2125000	92000	102500	195000	750
	1525000	1800000	98000	140000	175000	800
	1925000	1750000	177500	98000	150000	500
	1675000	1800000	117500	105000	150000	750

IX pavyzdys

FASCIOLA HEPATICA

Buvo tirtas nitazoksanido ir deacetil-nitozaksanido efektyvumas *in vitro* prieš *Fasciola hepatica*.

Subrendusios *F. hepatica* buvo išgautos iš 3 veršelių, pasmerktų kristi dėl fascioliozės Luizianos veterinarinės medicininės diagnostikos laboratorijoje Hardy Meat Packers, Bunkie, LA, kepenų tulžies lataką. Trematodos buvo plaunamos steriliu fiziologiniu tirpalu 1 val., po to sudedamos į sterilų fiziologinį tirpalą arba RPMI (pH 7,4) ir palaikomos dar 3 val. Tada trematodos laikomos steriliame RPMI-triušio serume (50:50 t/t) arba steriliame RPMI (pH 7,4) per naktį 37 °C temperatūroje, esant 5 % CO₂.

Kultivavimas *in vitro* (37 °C, 5 % CO₂) vykdomas pagal modifikuotą Ibarra and Jenkins (Z. Parasitenkd. 70:655-661, 1984) metodą. Naudojant sterilią metodiką, trematodos buvo plaunamos du kartus 2-3 min. Hank'o subalansuotu druskos tirpalu (pH 7,2) ir sudedamos atskirai į 6 duobučių Linbro kultivavimo plokštelių duobutes, kuriose yra 10 ml alikvotos norimos koncentracijos vaisto tirpalo kultivavimo terpėje. Ši terpė buvo sterilus 50:50 t/t RPMI-triušio serumas su 2 % triušio kraujo plus 100 m.d. penicilino ir 100 m.d. streptomidino. Buvo naudojamos tik tos trematodos, kurios turėjo normalų aktyvumą ir morfologiją.

NTZ arba jo metabolito D-NTZ, gautų iš Romark, pagrindiniai tirpalai buvo pagaminti DMSO (2000 mg/ml) ir praskiesti kultivavimo terpe, naudojant 100 ml talpos matavimo kolbas, gaunant tiksliai apibrėžtas vaisto koncentracijas (100, 50, 25, 10, 5, 3, 1 $\mu\text{g/ml}$). Kiekvienam dublikatui imamos dvi kontrolinės trematodos - viena kultivavimo terpėje su RBC be vaisto ir viena kultivavimo terpėje be RBC ir be vaisto.

Norint nustatyti gydymo vaistu efektą, buvo tiriamas trematodų žuvinimas, judrumo sutrikimai arba morfologiniai pokyčiai, lyginant su nepaveiktomis vaistu kontrolinėmis trematodomis, naudojant apšviestą iš priešingos pusės panelę ir 3x didinančius lęšius.

Rezultatai:

1 eksperimentas: D-NTZ atveju 50 ir 100 μg apdorotos trematodos buvo negyvybingos arba negyvos per vieną valandą. Apdorojus 25 μg , 4 iš 7 trematodų buvo negyvybingos, dvi buvo aktyvios, o viena buvo nerangi pirmąją valandą; po trijų valandų visos buvo negyvos, išskyrus dvi nerangias trematodas, o po keturių valandų liko tik viena nerangi trematoda. Imant 10 μg , sumažėjęs aktyvumas buvo pastebėtas po 1, 3 ir 4 val., ir visos buvo negyvybingos arba negyvos po 7 val. Sumažintas kai kurių individų aktyvumas buvo stebimas po 24 val. 5 μg ir 3 μg grupėse, esant šiek tiek lėtesniam efektui 3 μg grupėje; po 50 val. 3 μg ir 5 μg grupėse visos trematodos buvo negyvos išskyrus po vieną nerangią trematodą kiekvienoje grupėje. Šioks toks aktyvumo sulėtėjimas buvo pastebėtas 1 μg grupėje po 42-74 valandų, o 91 val. išliko gyvos tik 3 aktyvios ir viena negyvybinga trematoda; po 115 valandų tik viena nerangi trematoda liko 1 μg grupėje. Nugaišimas kontrolinėje grupėje su RBC buvo pastebėtas 66 val. (viena trematoda), 91 val. (viena trematoda) ir 115 val. (keturios trematodos). Kontrolinėje grupėje be RBC 91 val. visos trematodos buvo gyvos ir viena negyva 115 val.

2 eksperimentas: NTZ atveju šiek tiek didesnis aktyvumas buvo pastebėtas pradiniam laikotarpiui i judrumo rodiklį ir nugaišima 8-se dublikatuose, lyginant su D-NTZ rezultatais. 100, 50 ir 25 μg grupėse visos

trematodos buvo negyvos arba negyvybingos per 1 val., išskyrus vieną 25 µg grupėje, kuri buvo negyva 3 val. Kiekvienoje kitoje vaistu paveiktoje grupėje, pradedant nuo 1 val., buvo matomas priklausantis nuo dozės judrumo sumažėjimas. Paveikus 10 µg, tik viena trematoda išgyveno iki 16 val. Penkių µg grupėje tik 3 trematodos buvo aktyvios 6 val. ir nei vienos nebuvo aktyvios 16 val. Po 23 val. 3 µg grupėje tik 2 nerangios trematodos liko gyvos; jos nugaišo 41 val. Vieno µg grupėje viena trematoda nugaišo 16 val., trys - 41 val. ir penkios - 74 val; 3 trematodos išliko aktyvios iki 91 val ir viena trematoda buvo aktyvi 115 val. Kontrolinėje grupėje su RBC 7 iš 8 kirmėlių buvo gyvos 74 val., 3 buvo gyvos 91 val. ir 2 išgyveno iki 151 val. Kontrolinėje grupėje be RBC 6 iš 8 trematodų buvo aktyvios iki 74 val., 4 buvo aktyvios iki 91 val. ir 2 išliko aktyvios iki 115 val.

Trematodų nugaišimas didelių dozių (25, 50, 100 µg) grupėse buvo greitas ir susijęs su susitraukimu ir ventraliniu "susivijimu". Esant mažesniems vaisto kiekiams, dauguma trematodų tam tikrą laiką sulėtėjo ir buvo labiau atsipalaidavę ir "susiploję", kai buvo negyvybingos arba negyvos. Kai kuriuose dublikatuose, pradedant nuo 91 valandos, eksperimentinius rezultatus limitavo užsiteršimas. D-NTZ bandymo atveju dviejose dublikatinėse plokštelėse 115 val. užaugo daug bakterijų ir grybelių ir atsirado su tuo susijęs nugaišimas. NTZ eksperimento atveju nenormaliai greitas užaugimas ir trematodų nugaišimas ištisose dubliuotose plokštelėse atsirado 91 (du dubliai) ir 115 (5 dubliai) valandą. 139 val. stebėjimai laikomi nebevertingais dėl daugelio plokštelių bendro užteršimo.

Išvados:

Eksperimentiniai duomenys rodo abiejų vaistų stiprų prieštrematodinį efektyvumą. Buvo pastebėtas šiek tiek didesnis nitazoksanido prieštrematodinis efektyvumas prieš *F. hepatica*, lyginant su pagrindiniu jo metabolitu - deacetil-nitazoksanidu, kuris laikomas aktyviu kepenų lygmenyje.

Greitas trematodų nugaišimas atsiranda per 1 val. *in vitro*, esant D-NTZ >50 µg, per 4 val. - 25 µg ir per 6-8 val. - 10 µg. Dešimt µg gali būti tinkama

vienkartinė tikslinio vaisto įvedimo norma, jeigu farmakokinetiniai duomenys rodo, kad po vienkartinio įvedimo audiniuose jis išsilaiko >6-8 val.

Abiejuose eksperimentuose, imant 3 ir 5 µg dozes, pastebėtas stiprus prieštrematodinis aktyvumas per 74 val (3 dienas). Imant 1 µg dozes, buvo pastebėta pailgėjusi išgyvenimo trukmė, artėjanti (bet nelygi) kontrolinėms trematodoms; todėl šio vaisto kiekio įvedimas kepenų audiniuose esančioms trematodoms 3-4 dienų laikotarpyje gali turėti neadekvatų terapinį efektą į parazitus.

X pavyzdys

FASCIOLA GIGANTICA

Buvo tiriamas nitazoksanido poveikis į nesubrendusias ir subrendusias *Fasciola gigantica* eksperimentiškai infekuotuose triušiuose.

Fasciola gigantica inkapsuliuotos metacerkarijos (EMC) buvo surinktos ant celofano lapo praėjus 28-35 dienoms po *L. calludi* gyvačių užkrėtimo *Fasciola gigantica* miracidijumi, panaudojant Abdel-Ghany aprašytą metodiką, kurioje gyvatės buvo palaikomos kasdien dirbtinėje šviesoje 30 min. švariame dechlorintame vandentiekio vandenyje. Gautos inkapsuliuotos metacerkarijos buvo laikomos 4 °C temperatūroje šaldytuve 5-8 dienas po vandeniu iki panaudojimo eksperimentiniams gyvuliukams infekuoti.

Tyrimui buvo panaudota 40 Boscat veislės triušių, sveriančių po 1,5-2 kg, kurie buvo padalinti į dvi grupes po 20 gyvuliukų.

Pirmos grupės gyvuliukai buvo infekuoti peroraliniu būdu, įstumiant 35-40 suvyniotų į salotos lapą inkapsuliuotų metacerkarijų ant gyvuliukų liežuvio šaknies. Gyvuliukų žiaunos buvo užčiaupiamos ranka ir laikomos tol, kol jie praryja inkapsuliuotas metacerkarias. Šios I grupės gyvuliukai buvo naudojami tirti nitazoksanido efektyvumui prieš nesubrendusių stadijų (4-5 savaičių amžiaus) *Fasciola gigantica*.

Antros grupės gyvuliukai buvo infekuoti aukščiau aprašytu peroraliniu būdu 10-15 inkapsuliuotų metacerkarijų ir buvo naudojami tirti nitazoksanido efektyvumui prieš ankstyvosios brandos (>10 savaičių amžiaus) trematodas.

Dešimt I grupės gyvuliukų gavo 35 mg nitazoksanido ryte ir vakare 7 dienas iš eilės praėjus 4 savaitėms po jų užkrėtimo nesubrendusios stadijos parazitui. Dešimt likusių I grupės gyvuliukų buvo laikomi kontrolei.

Dešimt II grupės gyvuliukų gavo 35 mg nitazoksanido ryte ir vakare 7 dienas iš eilės praėjus 10 savičių po jų užkrėtimo subrendusios stadijos parazitui. Dešimt likusių II grupės gyvuliukų buvo laikomi kontrolei.

Visi gyvuliukai buvo šeriami sausu pašaru iki eksperimento pabaigos.

Praėjus 7 dienoms po paskutinės nitazoksamido dozės įvedimo, visi kiekvienos grupės triušiai buvo papjauti. Buvo tiriamas kepenų paviršius, norint nustatyti ar yra nekrozinų keliaujančių vagelių, ypač nesubrendusio parazito stadijoje. Šie nekroziniai ploteliai buvo tiriami naudojant dvi chirurgines adatas, norint išimti jaunas keliaujančias trematodus pagal El-Bahy aprašytą metodiką. Po to kepenys raikomos mažais gabaliukais, ypač apie keliaujančias vageles, ir mirkomos po mikroskopu, norint ištraukti esančias trematodus. Pilvo ertmė ir vidurių paviršiai plaunami šiltu vandeniu. Po to vanduo surenkamas, perleidžiamas per tinklėlį, ir tiriama, ar yra trematodų jauniklių. Visi surinkti parazitai, o taip pat ir jų dalys suskaičiuojamos gydytiems ir negydytiems gyvuliukams abiejose I ir II grupėse. Gyvos trematodos yra ryškiai rožinės spalvos, permatomos, turi sveiką apvalkalą, yra lengvai išimamos iš kepenų audinio panaudojant šiltą vandenį, tuo tarpu negyvos trematodos yra pilkšvos spalvos, palaidos ir turi suardytą nekrozinį paviršių. Nitazoksanido efektyvumas apskaičiuojamas panaudojant žemiau duotą formulę:

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

kurioje: a = išgautų iš kontrolinių gyvuliukų atmatų trematodų skaičius,
b = išgautų iš gydytų gyvuliukų atmatų trematodų skaičius.

Rezultatai:

Tyrimų rezultatai, kaip matyti iš 7 lentelės, rodo žymų nesubrendusių trematodų, išgautų iš gydytos grupės triušių kepenų, skaičiaus sumažėjimą.

lyginant su kontroline grupe. Apskaičiuotas vidutinis procentinis sumažėjimas yra 46,77 % (40-60 % intervalas).

7 lentelė: Nitazoksanido efektyvumas prieš nesubrendusias (4 savaičių amžiaus) *F. gigantica* eksperimentiškai infekuotiems triušiams

Išimtų iš kepenų trematodų skaičius:			
Triušio Nr.	Kontroliniai triušiai	Gydyti triušiai	Efektyvumo %
1	7	4	42 %
2	7	4	42 %
3	6	3	50 %
4	8	4	50 %
5	5	3	40 %
6	5	2	60 %
7	5	3	40 %
8	6	3	50 %
9	8	4	50 %
10	5	3	40 %
Vidurkis	6,2	3,3	46,77 %

Ankstyvoje jų infekcijos subrendimo stadijoje nitazoksanidas turėjo pilną poveikį (100 % sumažinimas) ir jokių trematodų nebuvo rasta ištyrus gydytų triušių kepenis, lyginant su negydytais kontroliniais gyvuliukais, kaip parodyta 8 lentelėje.

8 lentelė: Nitazoksanido efektyvumas prieš ankstyvosios brandos (10 savaičių amžiaus) *F. gigantica* eksperimentiškai infekuotiems triušiams

Išimtų iš kepenų trematodų skaičius:			
Triušio Nr.	Kontroliniai triušiai	Gydyti triušiai	Efektyvumo %
1	4	0,0	100 %
2	4	0,0	100 %
3	3	0,0	100 %
4	3	0,0	100 %
5	2	0,0	100 %
6	2	0,0	100 %
7	2	0,0	100 %
8	3	0,0	100 %
9	3	0,0	100 %
10	3	0,0	100 %
Vidurkis	2,9	0,0	100 %

Nitazoksanidas, duodamas 70 mg/per dieną dozėmis 7 dienas iš eilės yra vidutinio efektyvumo prieš nesubrendusios stadijos *Fasciola gigantica* ir pilnai efektyvus prieš subrendusios stadijos parazitą.

XIII pavyzdys

SCHISTOSOMA

Buvo tiriamas nitazoksanido poveikis prieš *Schistosoma mansoni* ir *Schistosoma hematobium* eksperimentiškai infekuotose pelėse.

Keturiasdešimt baltųjų pelių, sveriančių po 30-50 g, buvo padalinta į dvi eksperimentines grupes po 20 gyvuliukų. Pirmos grupės gyvuliukai buvo infekuoti 300-500 *Schistosoma mansoni* laisvomis aktyviomis cercarijomis, suspenduotomis 0,25 ml distiliuoto vandens, suleidžiant po pilvaplėve kiekvienai pelėi. Antroji grupė buvo infekuota tokiu pačiu būdu tik *Schistosoma hematobium* cercarijomis. Šios grupės buvo laikomos laboratorijoje 70 dienų.

Praėjus 70 dienų po gyvuliukų užkrėtimo, po 10 pelių iš kiekvienos grupės buvo gydoma 7 dienas iš eilės peroraliniu būdu 1,3 mg nitazoksanido doze, įvedama ryte ir vakare. Praėjus 7 dienoms nuo gydymo pabaigos, didelės pelės buvo numarinamos ir iš kiekvieno gyvuliuko kepenų išimamos kirmėlės perfuzijos būdu panaudojant drungną vandenį (37 °C). Išimtos šistosomos suskaičiuojamos visiems gydytiems ir kontroliniams gyvuliukams. Nitazoksanido efektyvumas apskaičiuojamas panaudojant žemiau duotą formulę:

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

kurioje: a = išgautų iš kontrolinių gyvuliukų atmatų šistosmų skaičius,

b = išgautų iš gydytų gyvuliukų atmatų šistosomų skaičius.

Rezultatai:

Rezultatai, pateikti 9 ir 10 lentelėse, aiškiai rodo, kad nitazoksanidas, duodant jo 2,6 mg/per dieną dozę 7 dienas iš eilės, buvo efektyvesnis prieš

Schistosoma hematobium, kur buvo stebimas 82,85 % kirmėlių skaičiaus sumažėjimas lyginant su kontroliniais gyvuliukais, tuo tarpu kai bandyme prieš *Schistosoma mansoni* kirmėlių skaičiaus sumažėjimas siekė tik 59,91 %, lyginant su kontrolinėmis pelėmis. Šie rezultatai atitinka Abaza et al. aprašytus rezultatus, kur nitazoksanidas buvo neefektyvus prieš *S. mansoni*, kaip parodė teigiamų kiaušinėlių skaičiavimas po gydymo nitazoksanidu.

9 lentelė: Nitazoksanido efektyvumas prieš subrendusius (13 savaičių amžiaus) *Schistosoma mansoni* pelėms

Išimtų iš kepenų trematodų skaičius:		
Pelės Nr.	Kontrolinės pelės	Gydytos pelės
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
Viso	247	99
Vidurkis/pelei	24,7	9,9
Efektyvumas		59,91

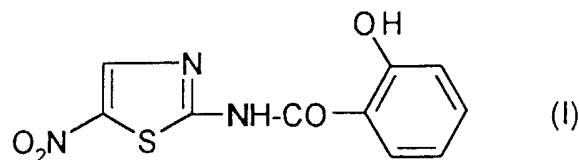
10 lentelė: Nitazoksanido efektyvumas prieš subrendusius (13 savaičių amžiaus) *Schistosoma hematobium* pelėms

Išimtų iš kepenų trematodų skaičius:		
Pelės Nr.	Kontrolinės pelės	Gydytos pelės
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
Viso	140	24
Vidurkis/pelei	14	2,4
Efektyvumas		82,85

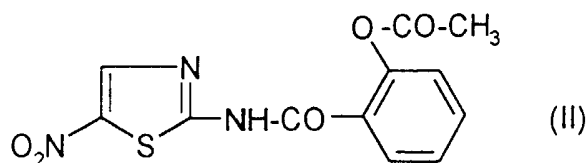
IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Peroralinio vartojimo farmacinė kompozicija, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad joje, kaip veiklusis agentas, yra bent vienas junginys, pasirinktas iš grupės, susidedančios iš:

junginio, kurio formulė (I):



ir junginio, kurio formulė (II):



2. Kompozicija pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėtas veiklusis junginys yra aktyviųjų dalelių formos, kurių dydžiai yra mažesni nei 200 μm , o vidutinis dalelių dydis yra didesnis nei 10 μm .

3. Kompozicija pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėtų aktyviųjų dalelių vidutinis dydis yra tarp 10 ir 100 μm .

4. Kompozicija pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėtų aktyviųjų dalelių vidutinis dydis yra tarp 20 ir 50 μm .

5. Kompozicija pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad joje mažiau nei 10 masės % minėtų aktyviųjų dalelių yra didesnės nei 100 μm dydžio.

6. Kompozicija pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad joje bent 50 masės % minėtų aktyviųjų dalelių yra mažesnės nei 50 μm dydžio.

7. Kompozicija pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad joje mažiau nei 10 masės % minėtų aktyviųjų dalelių yra mažesnės nei 5 μm dydžio.

8. Kompozicija pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad į ją įeina (I) formulės ir (II) formulės junginio aktyviųjų dalelių mišinys, kuriame (I)

formulės junginio masės kiekis (I) formulės ir (II) formulės junginių masės kiekių atžvilgiu yra tarp 0,5 ir 20 %.

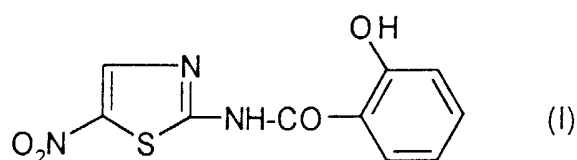
9. Kompozicija pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad joje yra dar ir bent vienos farmaciškai priimtinos rūgšties.

10. Kompozicija pagal 9 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėtą farmaciškai priimtina rūgštį pasirenka iš grupės, susidedančios iš citrinų rūgšties, glutamo rūgšties, gintaro rūgšties, etansulfonrūgšties, acto rūgšties, vyno rūgšties, askorbo rūgšties, metansulfonrūgšties, fumaro rūgšties, adipo rūgšties, obuolių rūgšties ir jų mišinių.

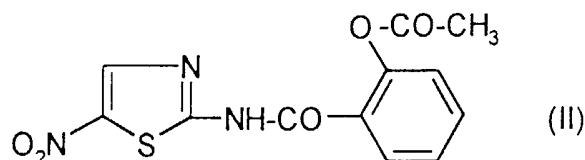
11. Kompozicija pagal 9 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad joje minėtas veiklusis agentas yra aktyvių dalelių formos, kurių dydžiai yra mažesni nei 200 μm , vidutinis dalelių dydis yra didesnis nei 10 μm , o farmaciškai priimtinos rūgšties ir minėtų kietų dalelių masių santykis yra tarp 0,01 ir 0,5.

12. Kompozicija pagal 11 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad joje farmaciškai priimtinos rūgšties ir minėtų aktyviųjų kietų dalelių masių santykis yra tarp 0,03 ir 0,2.

13. Farmacinės kompozicijos, kurioje kaip veiklusis agentas yra bent vienas junginys, pasirinktas iš grupės, susidedančios iš junginio, kurio formulė (I):



ir junginio, kurio formulė (II):



panaudojimas vaisto susilpnintą imuninę sistemą turinčių žinduolių infekcijų, kurias sukelia mikroorganizmai, pasirinkti iš grupės, susidedančios iš *Cryptosporidium parvum*, *Isospora belli*, *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon intestinalis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium*

avium intracellulare, *Pneumocystis carinii* ir *Toxoplasma gondii*, gydymui, gamyboje.

14. Farmacinės kompozicijos panaudojimas pagal 13 punktą, b e s i -s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas veiklusis agentas yra dalelių formos, kurių vidutinis dydis yra tarp 10 ir 200 μm .

15. Farmacinės kompozicijos panaudojimas pagal 13 punktą, b e s i -s k i r i a n t i s tuo, minėtas veiklusis agentas yra dalelių formos, kurių vidutinis dydis yra tarp 20 ir 50 μm .

16. Farmacinės kompozicijos panaudojimas pagal 13 punktą, b e s i -s k i r i a n t i s tuo, kad minėtoje farmacinėje kompozicijoje yra bent vienos farmaciškai priimtinos rūgštis.

17. Farmacinės kompozicijos panaudojimas pagal 16 punktą, b e s i -s k i r i a n t i s tuo, kad minėtą farmaciškai priimtina rūgštį pasirenka iš grupės, susidedančios iš citrinų rūgštis, glutamo rūgštis, gintaro rūgštis, etansulfonrūgštis, acto rūgštis, vyno rūgštis, askorbo rūgštis, metansulfonrūgštis, fumaro rūgštis, adipo rūgštis, obuolių rūgštis ir jų mišinių.

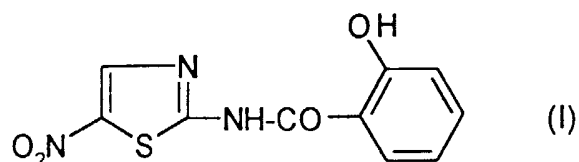
18. Farmacinės kompozicijos panaudojimas pagal 13 punktą, b e s i -s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas veiklusis agentas yra (I) formulės junginys.

19. Farmacinės kompozicijos panaudojimas pagal 13 punktą, b e s i -s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas veiklusis agentas yra (II) formulės junginys.

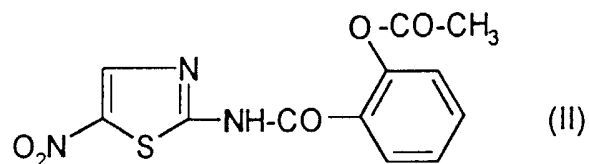
20. Farmacinės kompozicijos panaudojimas pagal 13 punktą, b e s i -s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas žinduolis yra žmogus ir kad skiriamas minėto veikliojo agento kiekis yra 500-2000 mg per dieną.

21. Farmacinės kompozicijos panaudojimas pagal 20 punktą, b e s i -s k i r i a n t i s tuo, kad skiriamas minėto veikliojo agento kiekis yra 1000-1500 mg per dieną.

22. Farmacinės kompozicijos, kurioje kaip veiklusis agentas yra bent vienas junginys, pasirinktas iš grupės, susidedančios iš junginio, kurio formulė (I):

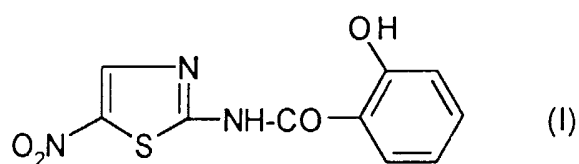


ir junginio, kurio formulė (II):

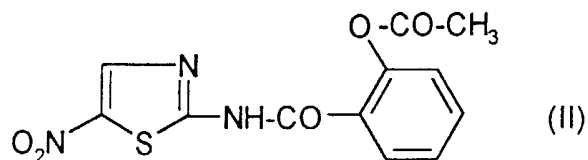


panaudojimas vaisto parazitinių infekcijų, kurias sukelia trematodos, pasirinktos iš grupės, susidedančios iš *Schistosoma Fasciola*, *Fasciolopsis*, *Dicrocoelium*, *Heterophyes* ir *Metagonimus*, gydymui, gamyboje.

23. Farmacinės kompozicijos, kurioje kaip veiklusis agentas yra bent vienas junginys, pasirinktas iš grupės, susidedančios iš junginio, kurio formulė (I):



ir junginio, kurio formulė (II):



panaudojimas vaisto parazitinių infekcijų, kurias sukelia trematodos, pasirinktos iš grupės, susidedančios iš *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma mekongi*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma intercalatum*, *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica*, *Fasciolopsis biski*, *Dicrocoelium dendriticum*, *Heterophyes heterophyes* ir *Metagonimus yokogawa*, gydymui, gamyboje.

24. Farmacinės kompozicijos panaudojimas pagal 23 punktą, b e s i - s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas veiklusis agentas yra dalelių formos, kurių vidutinis dydis yra tarp 10 ir 200 μm .

25. Farmacinės kompozicijos panaudojimas pagal 24 punktą, b e s i -s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas veiklusis agentas yra dalelių formos, kurių vidutinis dydis yra tarp 20 ir 50 μm .

26. Farmacinės kompozicijos panaudojimas pagal 23 punktą, b e s i -s k i r i a n t i s tuo, kad minėtoje kompozicijoje yra bent vienos farmaciškai priimtinos rūgšties.

27. Farmacinės kompozicijos panaudojimas pagal 26 punktą, b e s i -s k i r i a n t i s tuo, kad minėtą farmaciškai priimtina rūgštį pasirenka iš grupės, susidedančios iš citrinų rūgšties, glutamo rūgšties, gintaro rūgšties, etansulfonrūgšties, acto rūgšties, vyno rūgšties, askorbo rūgšties, metansulfonrūgšties, fumaro rūgšties, adipo rūgšties, obuolių rūgšties ir jų mišinių.

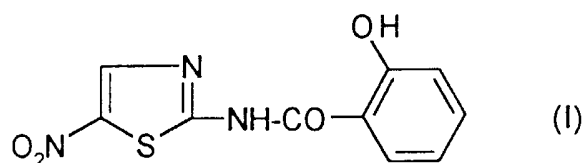
28. Farmacinės kompozicijos panaudojimas pagal 26 punktą, b e s i -s k i r i a n t i s tuo, kad šioje kompozicijoje farmaciškai priimtinos rūgšties ir minėtų aktyviųjų kietų dalelių masių santykis yra tarp 0,01 ir 0,5.

29. Farmacinės kompozicijos panaudojimas pagal 23 punktą, b e s i -s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas veiklusis agentas yra (I) formulės junginys.

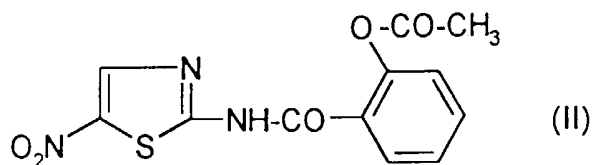
30. Farmacinės kompozicijos panaudojimas pagal 23 punktą, b e s i -s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas veiklusis agentas yra (II) formulės junginys.

31. Vietinio vartojimo farmacinė pasta, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad j ją, kaip veiklusis agentas, įeina bent vieno junginio, pasirinkto iš grupės, susidedančios iš:

junginio, kurio formulė (I):



ir junginio, kurio formulė (II):



kietos dalelės, kurių dydžiai yra mažesni nei 200 μm , o vidutinis dalelių dydis yra didesnis nei 10 μm ;

bent vienas tirštinimo agentas;

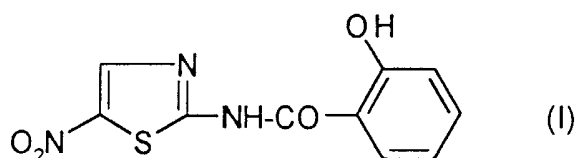
bent vienas drėkinimo agentas; ir

bent viena farmaciškai priimtina druska; šios pastos pH yra tarp 2 ir 6.

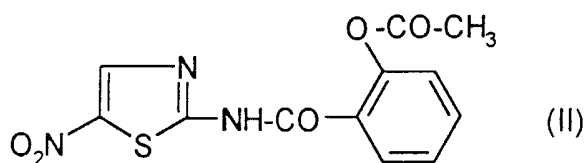
32. Farmacinė pasta pagal 31 punktą, **b e s i s k i r i a n t i** tuo, kad į ją įeina dar ir bent vienas priedas, pasirinktas iš grupės, susidedančios iš cetilo alkoholio, gliceridų, propilenglikolio ir jų mišinių.

33. Peroralinio vartojimo farmacinė kompozicija, **b e s i s k i r i a n t i** tuo, kad į ją įeina veiklusis agentas, granuluotas esant granuliavimo agentui, kurioje minėtas veiklusis agentas yra bent vieno junginio, pasirinkto iš grupės, susidedančios iš:

junginio, kurio formulė (I):



ir junginio, kurio formulė (II):



kietų dalelių formos, ir kurioje minėtų aktyviųjų dalelių dydžiai yra mažesni nei 200 μm , o vidutinis dalelių dydis yra didesnis nei 10 μm .

34. Kompozicija pagal 33 punktą, **b e s i s k i r i a n t i** tuo, kad minėtą granuliavimo agentą pasirenka iš grupės, susidedančios iš polivinilpirolidono, vandens, alkoholio, sacharozės, hidroksilceliuliozės ir jų mišinių.

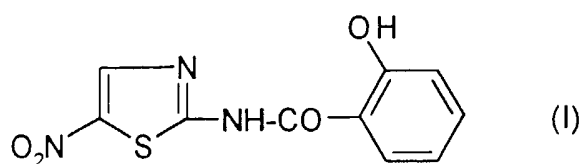
35. Kompozicija pagal 33 punktą, **b e s i s k i r i a n t i** tuo, kad minėtose granuluotose aktyviosiose dalelėse yra bent vienos farmaciškai priimtinos rūgšties.

36. Kompozicija pagal 35 punktą, **b e s i s k i r i a n t i** tuo, kad minėtą farmaciškai priimtina rūgštį pasirenka iš grupės, susidedančios iš citrinų rūgšties, glutamo rūgšties, ginkaro rūgšties, etansulfonrūgšties, acto rūgšties,

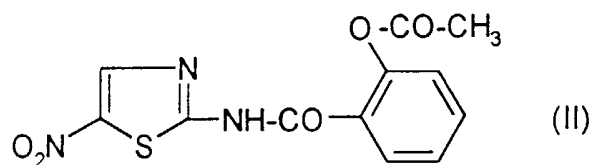
vyno rūgštis, askorbo rūgštis, metansulfonrūgštis, fumaro rūgštis, adipo rūgštis, obuolių rūgštis ir jų mišinių.

37. Farmacinė kompozicija pagal 35 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad farmaciškai priimtinos rūgštis ir minėto veikliojo agento masių santykis yra tarp 0,01 ir 0,5.

38. Peroralinio vartojimo farmacinė kompozicija, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad į ją įeina veiklusis agentas, drėkinimo agentas ir krakmolo darinys, kurioje minėtas veiklusis agentas yra bent vieno junginio, pasirinkto iš grupės, susidedančios iš:
junginio, kurio formulė (I):



ir junginio, kurio formulė (II):



kietų dalelių formos ir kurioje minėtų aktyviųjų dalelių dydžiai yra mažesni nei 200 μm , o vidutinis dalelių dydis yra didesnis nei 10 μm .

39. Farmacinė kompozicija pagal 38 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad joje yra dar ir bent vienos farmaciškai priimtinos rūgštis.

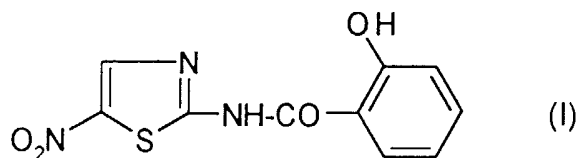
40. Farmacinė kompozicija pagal 38 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad aktyviosios dalelės yra granuluotos esant granuliavimo agentui, gaunant granuluotą veiklųjį agentą, turintį nuo 2 iki 99,97 masės % minėto veikliojo junginio ir nuo 0,03 iki 10 masės % granuliavimo agento.

41. Farmacinė kompozicija pagal 40 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėtą granuliavimo agentą pasirenka iš grupės, susidedančios iš polivinilpirolidono, vandens, alkoholio, sacharozės, hidroksilceliuliozės ir jų mišinių.

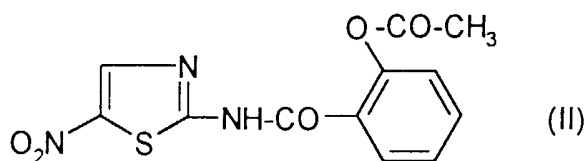
42. Peroralinio vartojimo skysta veikliojo agento suspensija, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad į ją įeina:

- kaip veiklusis agentas, bent vieno junginio, pasirinkto iš grupės, susidedančios iš:

junginio, kurio formulė (I):



ir junginio, kurio formulė (II):



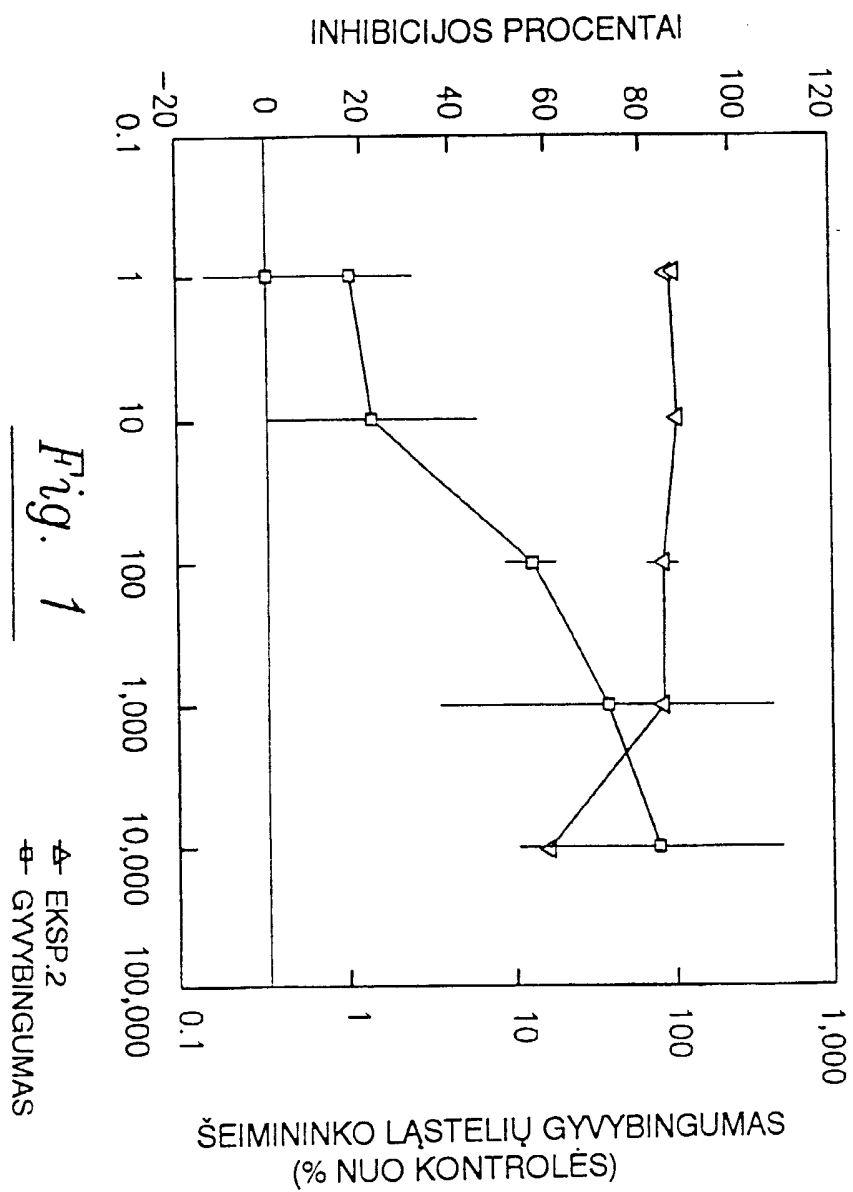
kietos dalelės, kurių dydžiai yra mažesni nei 200 μm , o vidutinis dalelių dydis yra didesnis nei 10 μm ; ir

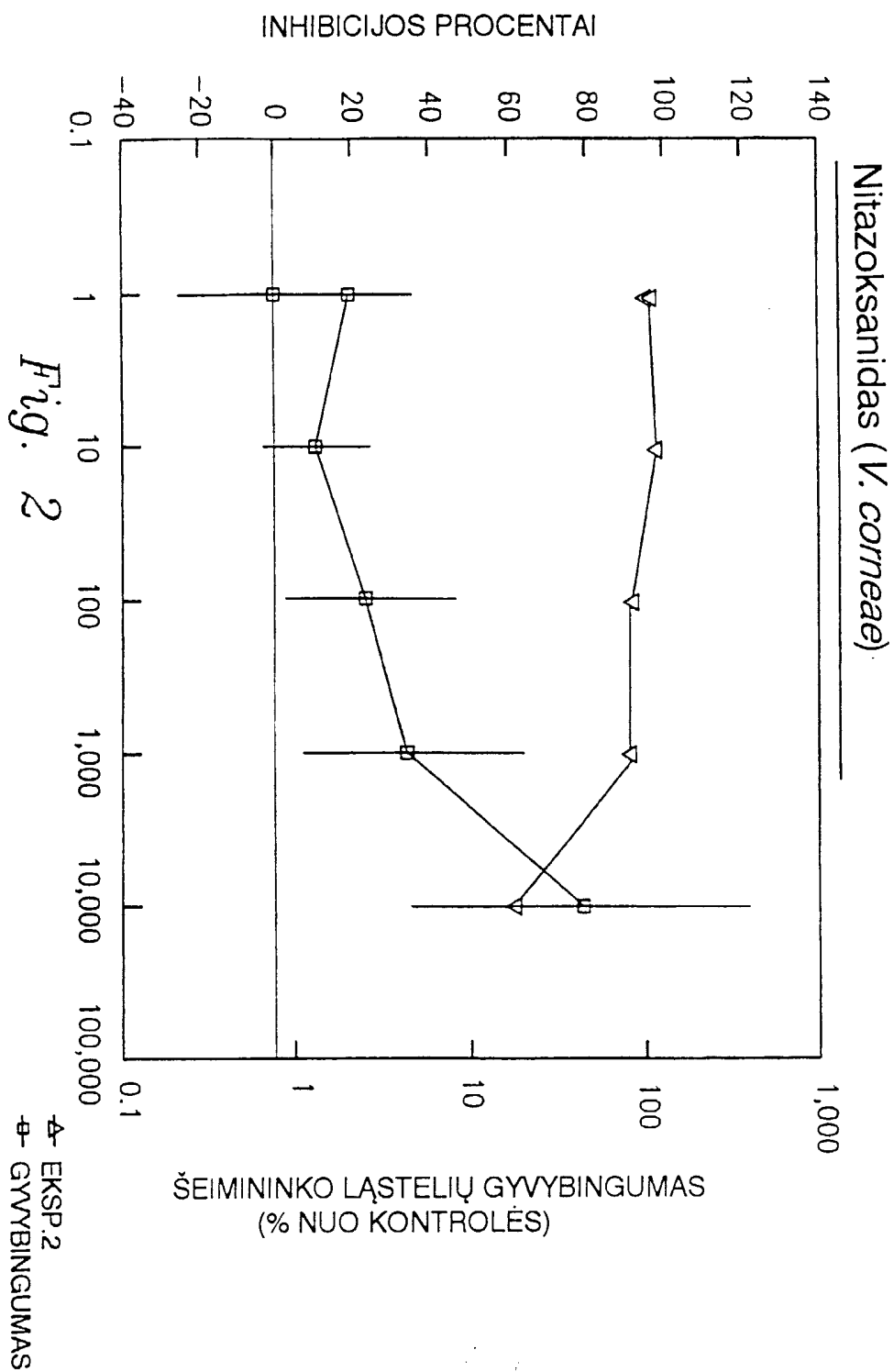
- bent viena farmaciškai priimtina rūgštis; šios suspensijos pH yra tarp 2 ir 6.

43. Suspensija pagal 42 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad jos pH yra tarp 3 ir 5.

44. Suspensija pagal 42 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad joje yra dar ir granuliavimo agento.

Nitazoksanidas (*E. intestinalis*)





Albendazolis (*E. intestinalis*)

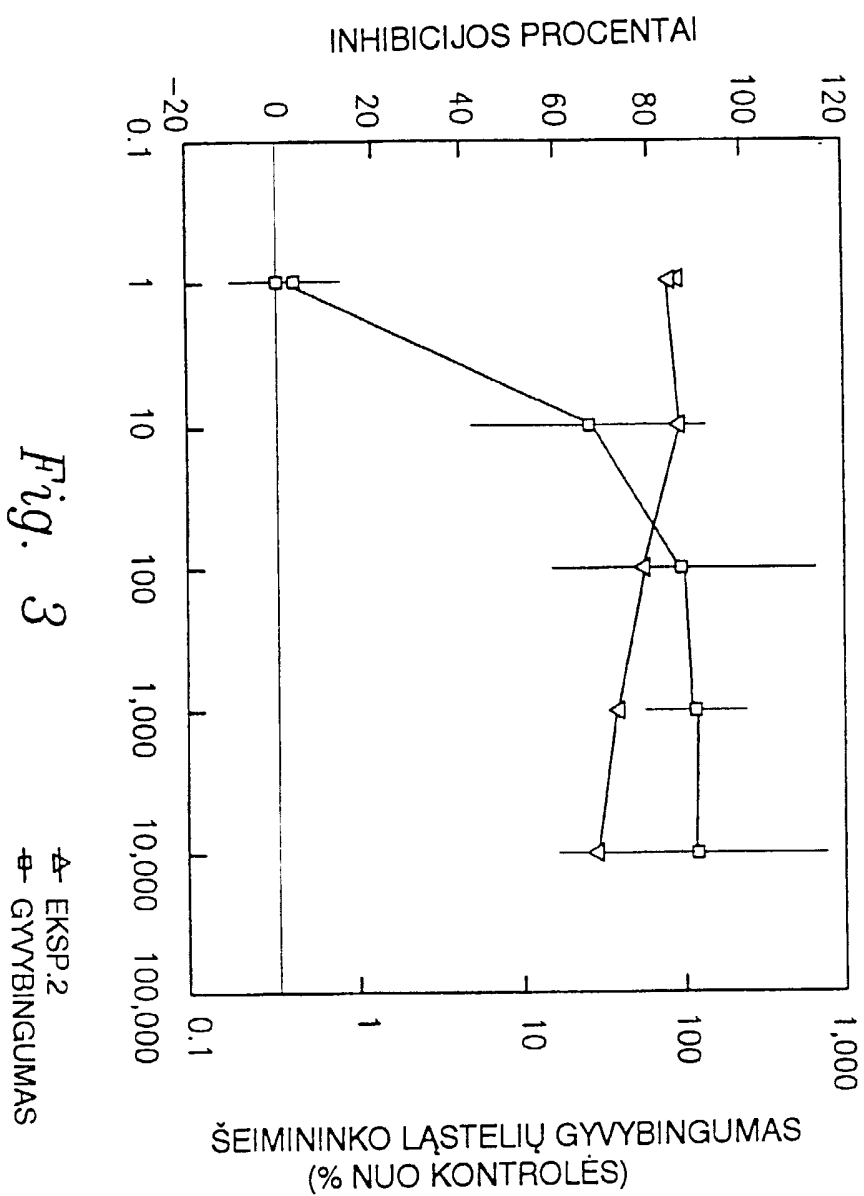
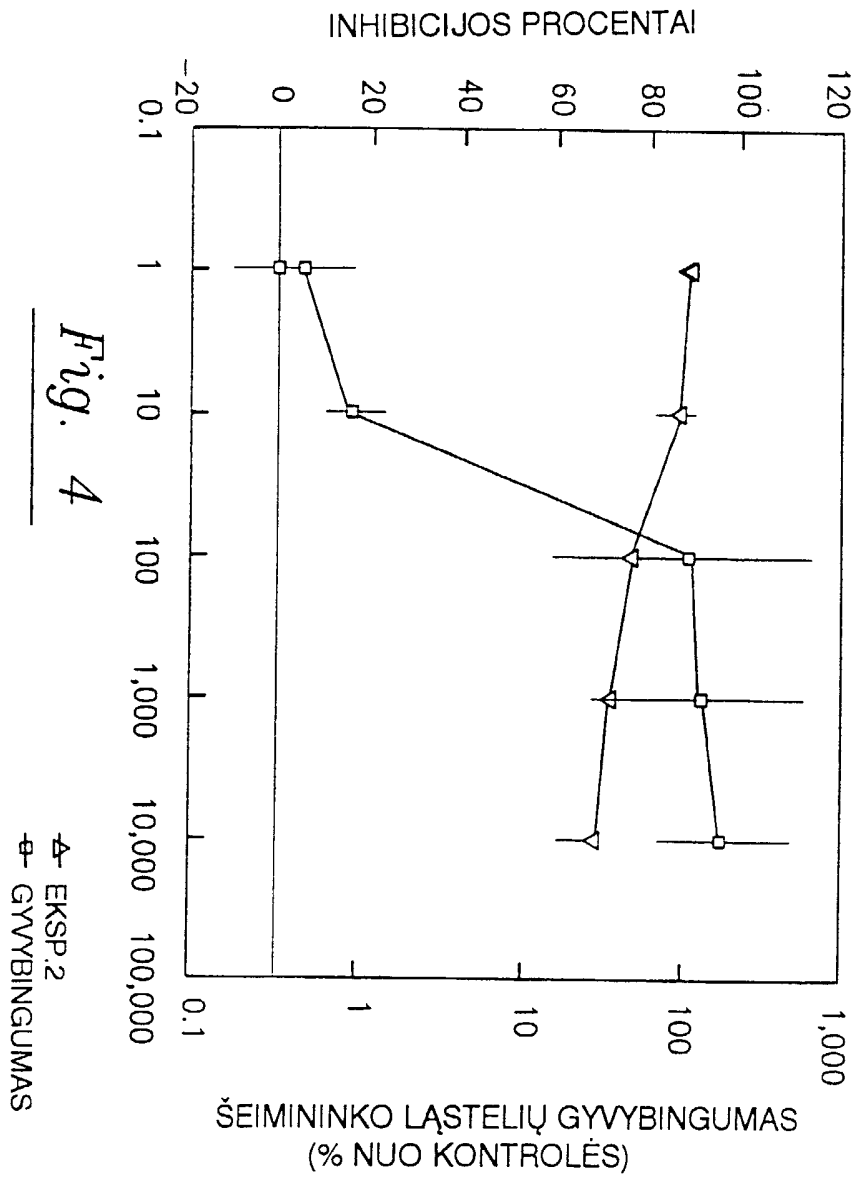


Fig. 3

Albendazolis (*V. corneae*)



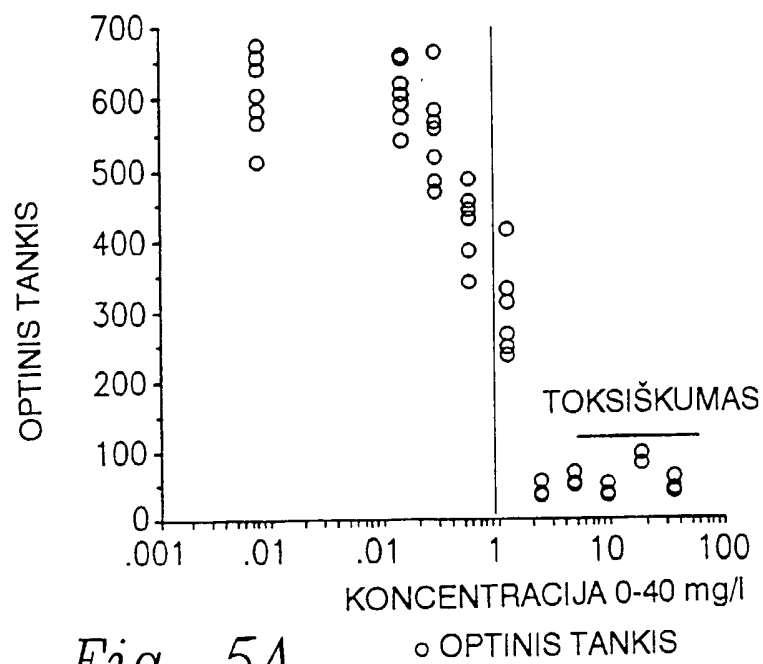


Fig. 5A

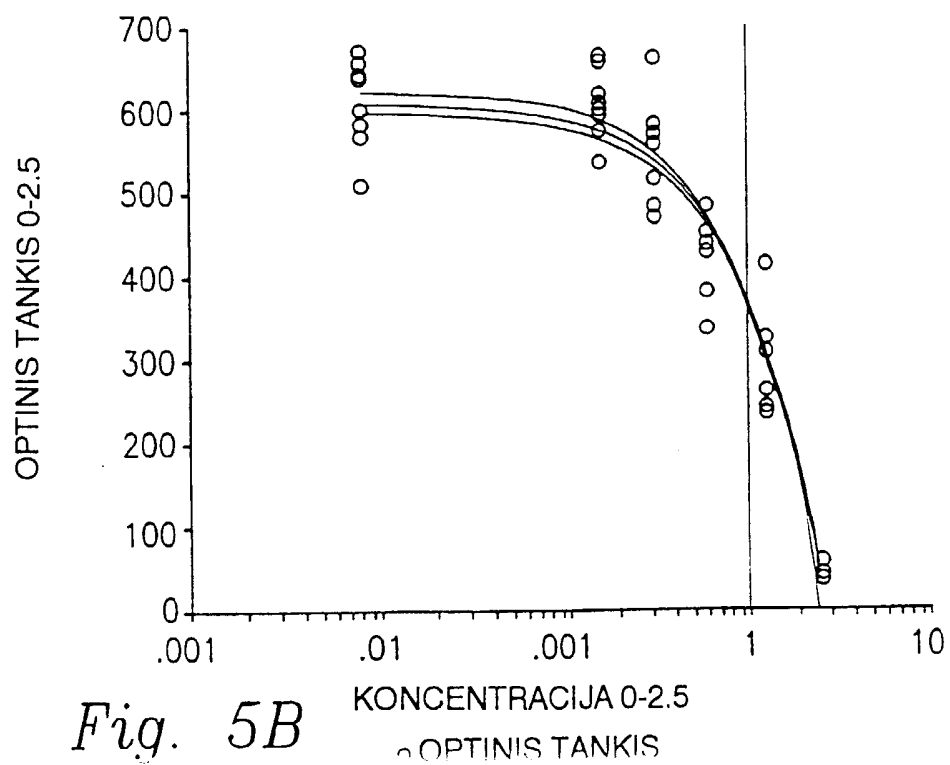


Fig. 5B

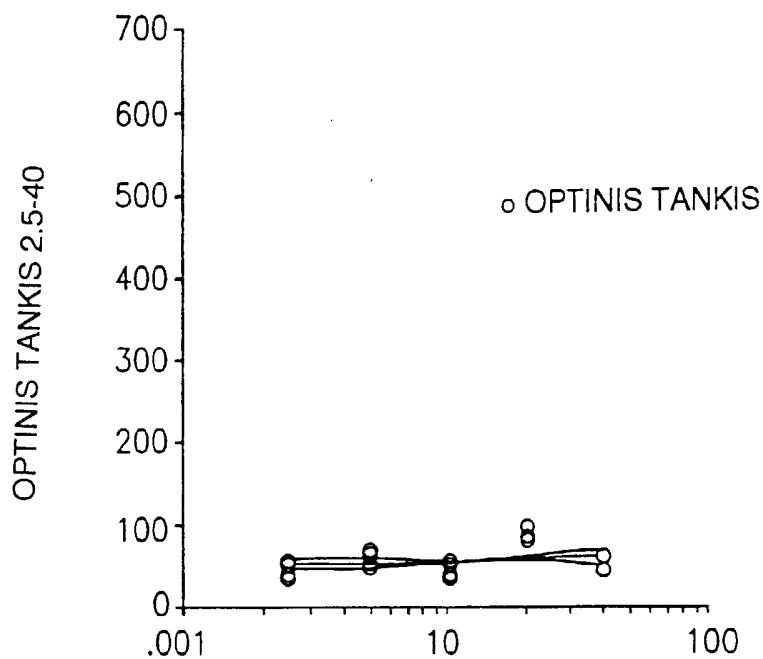


Fig. 5C KONCENTRACIJA 2.5-40

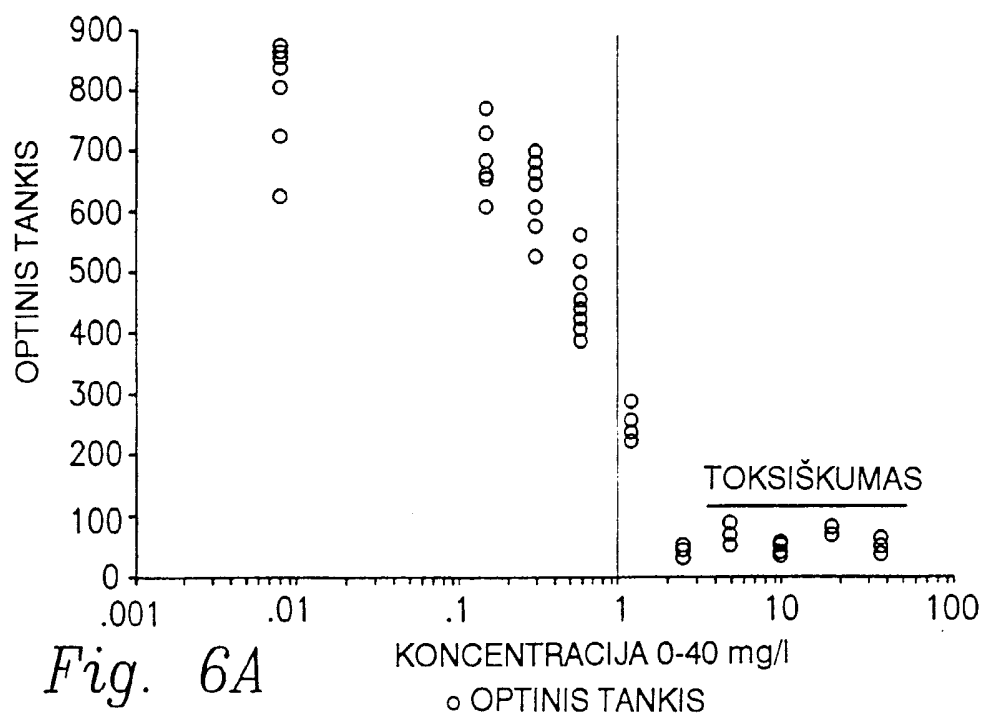
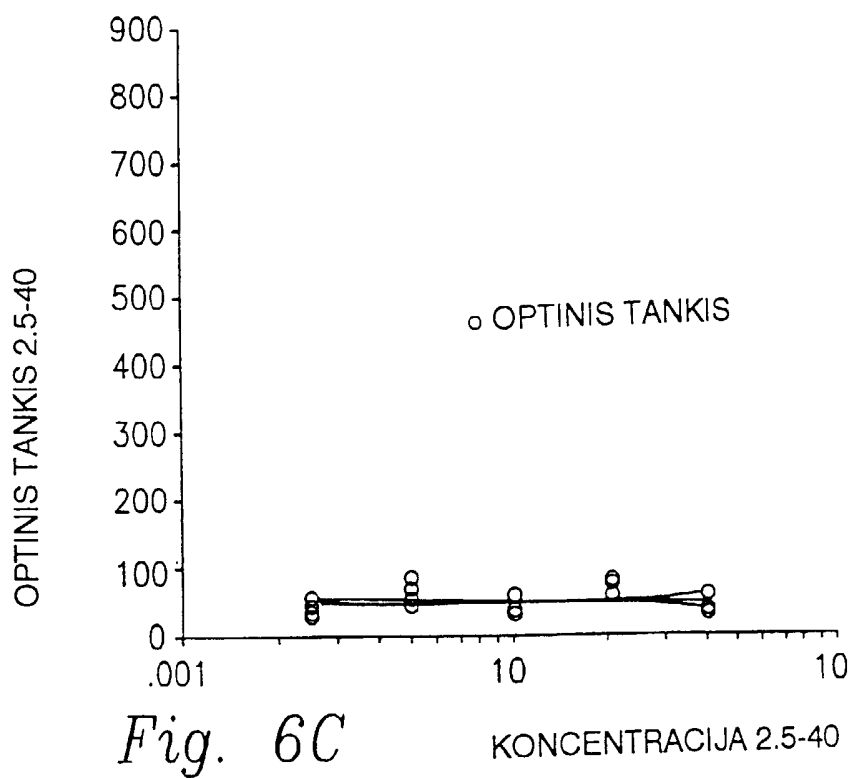
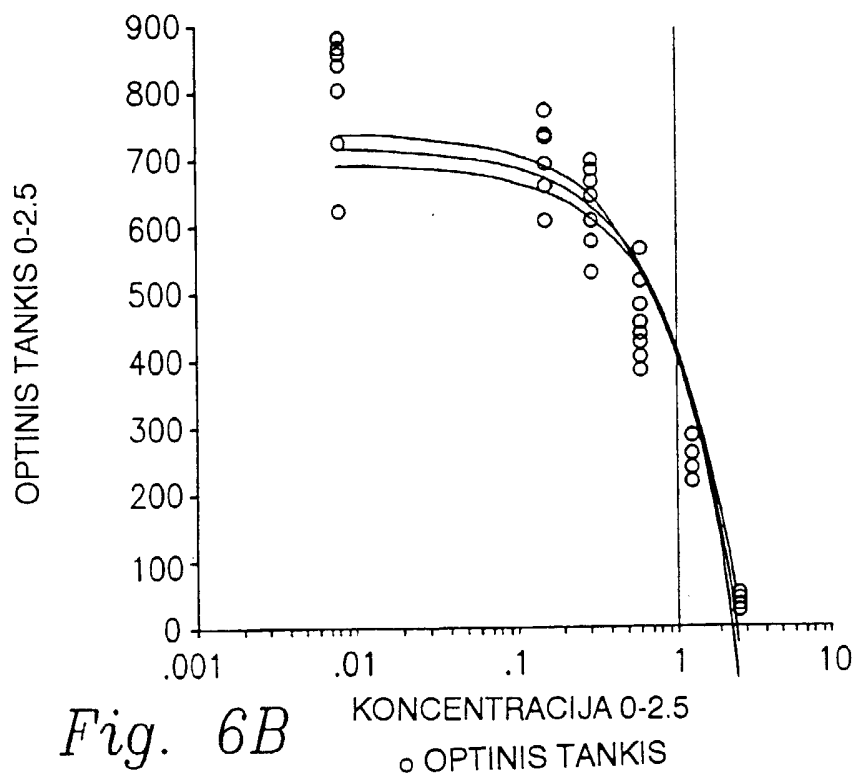


Fig. 6A



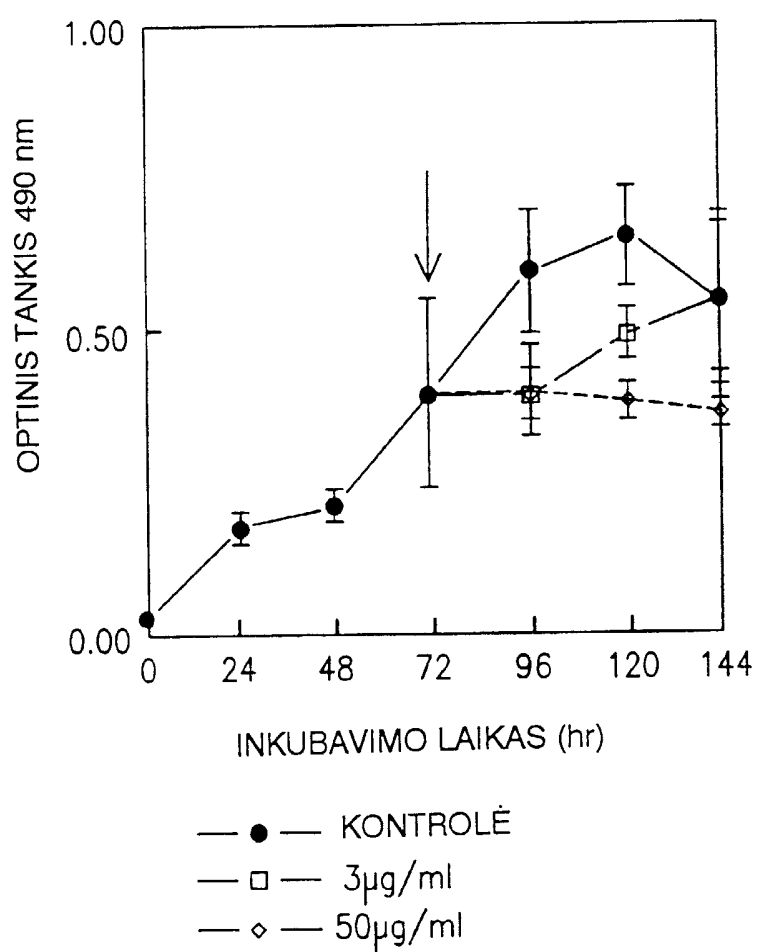


Fig. 7

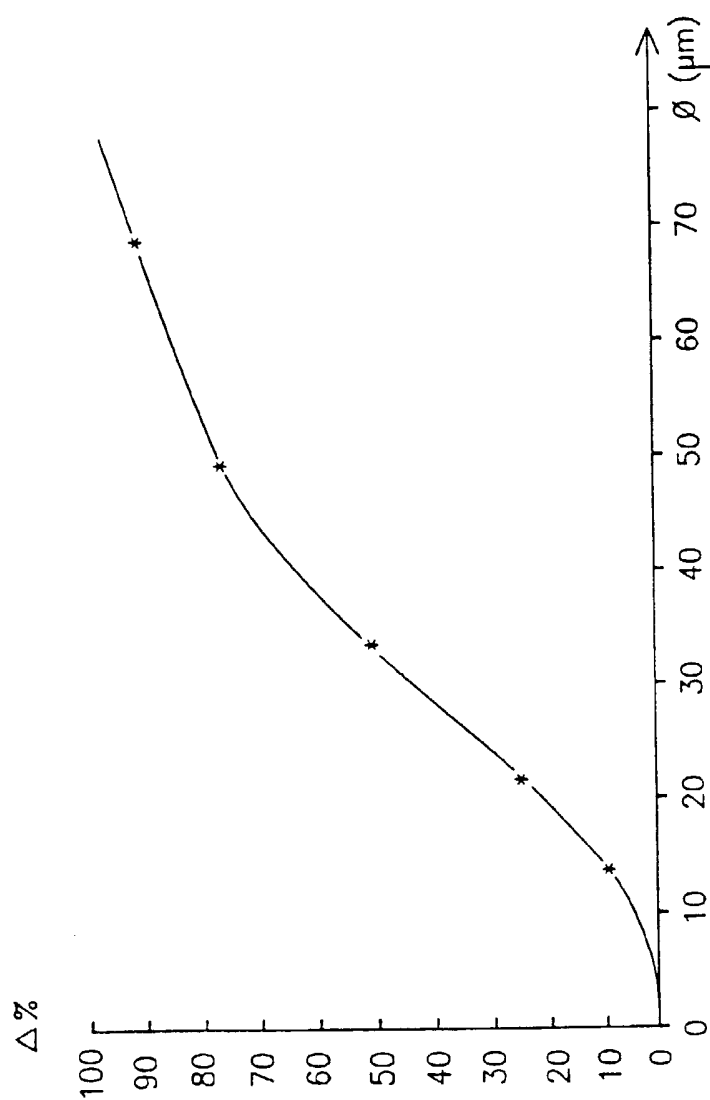


Fig. 8