ČESKÁ REPUBLIKA

(19)

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

# ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU (12)

(22) 30.10.92
(32) 31.10.91
(31) 91/785666
(33) US
(40) 15.12.94

(21) 1057-94
(13) A3
5(51) A 61 K 37/02

(71) APOTHEKERNES LABORATORIUM A.S., Oslo, NO;

(72) Andrews Barry John, Oslo, NO;
Bjorvatn Bjarne, Paradis, NO;
Pedersen Steinar, Asker, NO;
Rünnevig Jörgen Rikard, Oslo, NO;
Yule Alexander, Harrow, GB;

## (54) Použití soli bacitracinu s dvojmocným kovem k výrobě léčiva pro léčení protozoální infekce

(57) Je popsáno použití soli bacitracinu s dvojmocným kovem (jako je například kobaltnatá, kademnatá, měďnatá, manganatá, nikelnatá a zinečnatá sůl) k výrobě léčiva pro léčení protozoální infekce člověka nebo zvířete. Toto léčivo obsahuje a( od 150 do 259 mG mikrokrystalické celulosy, b) od 10 do 40 mg polyvinylpyrrolidonu, c) od 5 do 10 mg stearátu hořečnatého a d) doplněk obsahující zinečnatou bacitracinu. Mezi pathogeny, které lze těmito solemi patří Trichomonas vaginalis, Tritrichomonas foetus, Tritrichomonas gallinae, Cryptosyporidium sp., Giardia lamblia a Entamoeba histolycica.

1057-94



# Použití soli bacitracinu s dvojmocným kovem k výrobě léčiva pro léčení protozoální infekce

## Oblast techniky

Tento vynález se týká použití solí bacitracinu s dvojmocným kovem k výrobě léčiv pro léčení jakékoliv parazitické nebo neparazitické protozoální infekce

## Dosavadní stav techniky

Protozoa (prvoci) jsou jednobuněčné eukaryotické mikroorganismy, kterým chybí buněčné stěny. Jsou obvykle bezbarvá a pohyblivá. Protozoa se od bakterií odlišují obvykle větší velikostí a eukaryotickou povahou, od řas chybějícím chlorofylem, od kvasinek a dalších hub jejich pohyblivostí a nepřítomností buněčné stěny a od slizovitých plísní tím, že netvoří plodné těleso.

Protozoa obvykle získávají potravu trávením jiných organismů nebo organických částic. Protozoa se nalézají v rozmanitých čerstvých vodách a mořských lokalitách. Velká část parazituje v jiných živočiších, včetně člověka. Některá protozoa se vyskytují v půdě nebo ve vzduchu, jako například na povrchu stromů.

Jak odpovídá organismům, které "chytají" svoji potravu, protozoa jsou většinou pohyblivá. Mechanismy jejich pohyblivosti jsou klíčovými vlastnostmi, které se používají pro jejich dělení do hlavních taxonomických skupin. Protozoa, která se pohybují améboidním pohybem, se nazývají Sarcodina (obecný název: améby), ty, která používají bičík, se nazývají Mastigophora (bičíkovci, flageláty) a ty, která používají řasinky (cílie), se nazývají Ciliophora (řasovky). Sporozoa, čtvrtá skupina, jsou obvykle nepohyblivá. Všechna protozoa jsou parazitickými pro vyšší živočichy.

Typickým představiteli skupiny Mastigophora jsou Trypanosoma (způsobující africkou spavou nemoc), Giardia, Leishmania, Trichomonas a Tritrichomonas. Členové této protozoální skupiny jsou pohybliví působením bičíků.

Do skupiny Sarodina patří Amoeba a Entamoeba, která jsou ve vegetativní fázi vždy nahá. Dobrým příkladem těchto parazitických forem je Entamoeba histolytica.

Ciliophora jsou označována ta protozoa, která mají v některém stadiu jejich životního cyklu řasinky. Typickými představiteli jsou Balantidium a Paramecium. Balantidium coli je primárně parazitem domácích zvířat, případně však infikuje střevní trakt lidí a dochází tak k zažívacím příznakům podobným těm, které způsobuje Entamoeba histolytica.

Sporozoa zahrnují velkou skupinu prvoků, z nichž všechny jsou nutně parazity. Typickými sporozoa jsou Plasmodium (způsobující malarii), Toxoplasma a Cryptosporidium.

Místa, kde endoparazité žijí, jsou různá. Někteří jsou intracelulární, jsko jsou například malarioví parazité u obratlovců. Jiní parazité, jako je Entamoeba histolytica, vnikají do tkání, ale nikoliv do jednotlivých buněk. Většina Trypanosom žije v krvi obratlovcových hostitelů. Mnoho dalších parazitů žije v lumenu (průchodu) zažívacího traktu nebo někdy v coleomových dutinách bezobratlých, jak je tomu u některých společenství.

Volně žijící, neparazitická, a parazitická protozoa jsou příčinou mnoha onemocnění a infekcí u lidí a zvířat. Například o protozoálním parasitu Entamoeba histolytica se ví, že je jím infikováno téměř 480 milionů lidí. Není znám zvířecí hostitel tohoto parazita. I když větší část infekcí E. histolytica je nepathogenní povahy, přes 36 milionů případů vede ke klinické chorobě.

Hlavní část klinických případů infekcí E. histolytica je přítomna ve formě amébní dizentérie. Améby tvoří nádory v tlustém střevu. To způsobuje diareu a krvácení do lumenu.

Klinické projevy infekce E. histolytica jsou většinou omezeny na tlusté střevo. Jestliže se však neléčí, mohou některé z těchto infekcí způsobit perforaci tlustého střeva a za extrémních podmínek smrt z peritonitidy.

V jiných případech infekce E. histolytica může dojít k invasi mimo střevo. Parazit projde krevním nebo lymfatickým systémem do abdominálních a dalších orgánů a produkuje amébní abscesy. Za mimořádných podmínek mohou tyto infekce vést také k těžkému onemocnění nebo smrti.

Jedním z léčiv, které si lze zvolit pro léčení E. histolytica, je metronidazol, o jehož účinnosti bylo poprvé referováno v roce 1966 (Powel a spol.: Lancet 2, 1329 (1966).). Akutní diarea a abscesy na játrech související s infekcí E. histolytica dobře odpovídají na metronidazol. Bylo však zjištěno, že metronidazol je méně účinný v asymptomatických případech (Spillman a spol.: Am. J. Trop. Med. Hyg. 25, 549 (1976).).

Selhání léčení infekcí E. histolytica metronidazolem bylo popsáno u jednotlivých pacientů mezinárodní letecké obsluhy (Weber a spol.: Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 84, 803 (1990).). Náhodná studie padesáti jihoafrických pacientů s amébiázou odhalila, že v 55 % případů došlo při standardním léčení metronidazolem dávkou 2,4 g denně po dobu 5 dnů k selhání léčení s přetrvávajícím onemocněním (Jackson a spol.: Symposium on Amoebiasis, New Delhi, Indie (1990).).

I když metronidazol je účinný při léčení infekcí E. histolytica, má několik nežádoucích vedlejších účinků. Například se nemůže podávat těhotným ženám, které jsou v prvním trimestru těhotenství. Navíc je užitečnost metronidazolu vážně poškozena jeho interferencí s metabolismem alkoholu. Je mutagenní v Ame-

sově testu (Vogd a spol.: Mutat. Res. 26, 483 až 490 (1974).). Kvůli jeho toxickým vedlejším účinkům se metronidazol kovalentně váže na silikagelové perličky, aby se odstranilla absorpce léčiva při léčení střevní amébiázy. I když je krátkodobé užívání metronidazolu relativně bezpečné, byly u krys pozorovány toxické účinky testikulární atrofie, ataxie a polyneuropathie. Byla pozorována také kovová chuť, bolest hlavy a periferní neuropathie.

Vzhledem k problémům, které souvisejí s používáním metronidazolu existuje potřeba alternativního způsobu léčení protozoálních infekcí.

Bylo ukázáno, že antibiotický bacitracin má omezenou schopnost zabíjet jak pathogenní tak nepathogenní formy střevních amébních infekcí (Most a spol.: Am. J. Trop. Med. 30, 491 až 497 (1950).). Například u 51 pacienta došlo k parazitologickému vyléčení v 66 % případů po léčení dávkami od 40 000 do 160 000 jednotek po dobu 10 až 20 dnů. Prodloužení léčení nad 10 dnů nebo zvýšení dávky na asi 80 000 jednotek nezvýšilo významným způsobem pravděpodobnost vyléčení nad 66 %. Marginální účinnost bacitracinu při léčení amébiázy nevedla k dalšímu použití této látky při léčení amébiázy E. histolytica.

Jinou obvyklu chorobou, kterou způsobují prvoci (protozoa), je hovězí trichomoniáza. Hovězí trichomoniáza je sexuálně přenášené onemocnění způsobené bičíkovitým prvokem Tritrichomonas foetus. Infekce T. foetus vede k podstatným ekonomickýmn ztrátám ve většině oblastí světa, kde se chvá dobytek a kde je spoléháno na přirozené oplodnění.

Infekce T. foetus je známa jaká významná příčina neplodnosti hovězího dobytka. Tato infekce se dotýká každá složky čistého příjmu výrobce. Zvláště se snižuje jak celkový počet produkovaných mláďat tak doba, po které se produkuje mléko. Navíc infekce T. foetus vede k tomu, že mláďata se produkují později v sezoně, čímž se získají lehčí mláďata, jejichž věk

a hmotnost je méně jednotná. Za těchto podmínek pak produkce mláďat nevede k realizaci plné hodnoty na trhu. Navíc se pak zvyšují ceny za krmení, léčení a náhradu chovu. Celkově shrnuto lze odhadnout, že v roce 1992 infekce způsobené T. foetus stály průmysl hovězího dobytka v USA přibližně 500 milionů amerických dolarů.

T. foetus se přenáší téměř výlučně koitem. Infekce tohoto typu je omezena na reprodukční trakt. Výhodnými místy infekce u býka je prepuciální kavita a ústí močové trubice. Převaha infekce T. foetus býků se obvykle zvyšuje s věkem. Je připisována prohloubení chodbiček v prepuciálním epithelu starších býků.

Pro léčení infekce T. foetus u býků byla navržena různá povrchová léčení. Mezi příklady takových léčení patří aplikace akriflavinových mastí, chlorhexidinu a metronidazolu. U většiny měly tyto způsoby léčení pouze okrajovou účinnost.

Při léčení infekce T. foetus byla zjištěna terapeutická hodnota několika 5-nitroimidazolových sloučenin. I když se násobné orální dávky dimetridazolu ukázaly jako mírně účinné, vedly k nežádoucím vedlejším účinkům, jako je městnání bachoru a anorexie. Mírně účinným se ukázalo také jediné intravenosní podání dimetridazolu. Toto podání však může způsobit nežádoucí vedlejší účinky, jako jsou dýchací obtíže, ataxie a kolaps plic.

I když léčení infekce T. foetus 5-nitroimidazolovými sloučeninami může být mírně účinné, je neúnosně drahé. Například v roce 1991 cena každého orálního podání byla přibližně 100 USA dolarů na býka, cena intramuskulárního podání byla přibližně 50 USA dolarů na býka. Navíc používání 5-nitroimidazolových sloučenin není schváleno USA úřadem pro potravu a léčiva (U.S. Food and Drug Administration). Jedna taková sloučenina, ipronidazol, byla označena jako podezřelý karcinogen.

Jak je vidět, je kontrola hovězí trichomoniázy velkým pro-

blémem i u relativně dobře vedených stád hovězího dobytka ve Spojených státech. Tento problém vyrostl do takových rozměrů, že spojené úsilí asociací Californian Cattlemen's Association, U.S. Animal Health Association a laboratoře Livestock Disease Research Laboratory dalo výzkumu hovězí trichomoniázy nejvyšší prioritu.

Mezi další příklady neparazitujících a parazitujících prvoků, kteří infikují lidi a zvířata, patří (bez omezení) Trichomonas vaginalis, Tritrichomonas gallinae, Giardia lamblia, Cryptosporidium parvum, Cryptosporidium sp. a Plasmodium sp. Je známo, že tyto a další protozoální organismy způsobují následující choroby: trichomoniázu, diardiosu, kryptosporidiosu, malarii, babesiosu, theileriosu, toxoplasmosu a leishmaniózu vedle všech dalších střevních a systémových protozoálních infekcí.

Je potřeba účinné léčení neparazitických a parazitických protozoálních infekcí lidí a zvířat. Takové léčení nejen že nesmí mít škodlivé vedlejší účinky metronidazolu, ale musí také být účinnější než bacitracin.

Podstata vynálezu

Je popsán způsob léčení infekce lidí nebo zvířat, která je způsobena neparazitickými nebo parazitickými prvoky. Tento způsob se vyznačuje tím, že se takovému infikovanému člověku nebo zvířeti podává efektivní množství soli bacitracinu s dvojmocným kovem.

Tento vynález se také týká použití těchto bacitracinových solí k výrobě léčiv použitelných pro léčení infekcí lidí nebo zvířat způsobených neparazitujícími nebo parazitujícími prvoky.

Zjistili jsme, že jestliže se soli bacitracinu s dvojmocným kovem podávají lidem nebo zvířatům s volně žijícími (neparazitujícími) a/nebo parazitujícími prvoky, tyto soli bacitra-

cinu jsou ve většině případů účinnější než nekomplexovaný bacitracin.

Pojmy "léčit", "léčení", "zpracování" a "potřeba takového léčení" tak, jak se zde používají, se týkají jak profylaxe asymptomatického člověka nebo zvířete vystaveného možné protozoální infekci tak terapeutického léčení infikovaného člověka nebo zvířete.

Pojem "bacitracin" tak, jak je zde používán, znamená všechny různé formy bacitracinu a jakoukoliv jejich směs. Patří sem, bez omezení, bacitracin A, $B_1$, $B_2$, $B_3$, $C_1$, $C_2$ a $C_3$.

Pojmy "soli bacitracinu s dvojmocným kovem" a "soli bacitracinu" tak, jak se zde používají, jsou vzájemně zaměnitelné a znamenají všechny různé formy bacitracinu a jejich směsi, které jsou komplexovány s dvojmocným iontem kovu. Mezi příklady dvojmocných iontů kovů, které mohou být komplexovány s bacitracinem za vzniku bacitracinových solí podle tohoto vynálezu, patří, bez omezení, kobaltnatý, kademnatý, měďnatý, manganatý, nikelnatý a zinečnatý ion.

Komerční bacitracin je směsí několika různých bacitracinů, které se principiálně odlišují ve složení aminokyselin. Typická komerční směs obsahuje následující aktivní bacitracinové formy (hmotnostní procenta): Bacitracin A (54,0), bacitracin $B_1$ (14,0), bacitracin $B_2$ (12,0), bacitracin $B_3$ (11,0) a další bacitraciny (9,0). Jak bylo ukázáno nukleární magnetickou resonancí, převládající forma, bacitracin A ($C_{66}H_{103}N_{17}O_{16}S$), komplexuje s dvojmocným iontem kovu (zinečnatým) interakcí čtyř skupin v peptidu. Jsou to následující skupiny: a) thiazolový kruh mezi Ile-1 a Cys-2, b) karboxylová skupina Glu-4, c) imidazolový kruh His-10 a d) aminová skupina Ile-1. Během komplexace se uvolní dva protony. Empirický vzorec solí bacitracinu s dvojmocným kovem se tedy liší od vzorce bacitracinu A. Hodnota pKa aminokyselinových zbytků zahrnutých ve vazbě s iontem kovu a také pKa sousedících zbytků se sníží. Obvykle je celkovým efektem

navázání iontu kovu to, že se molekula stane neutrálnější.

V nepřítomnosti dvojmocného iontu kovu nese bacitracin A hydrofilní slupku aromatických zbytků a dostatečně hydrofilní vnější část. To způsobuje, že bacitracin A má vysokou rozpustnost v polárních rozpouštědlech. Avšak po komplexaci s dvojmocným iontem kovu elektrostatické interakce způsobí, že peptid se "zavine" kolem atomu kovu. Tím se změní distribuce hydrofilních a hydrofobních zbytků. Komplex kovu tedy pak vykazuje nízkou rozpustnost ve vodě a zvýšenou afinitu k hydrofobním strukturám, jako jsou například membrány.

Zvýšená hydrofobní struktura bacitracinových solí zvyšuje jejich tendenci procházet buněčnou membránou. Tyto soli mají tedy zvýšenou antimikrobiální aktivitu při srovnání s jejich nekomplexovaným protějškem.

Studie nukleární magnetické resonance bacitracinu A odhalily, že bacitracin A je v roztoku konformačně nestálý. Tato molekula má flexibilní strukturu složenou ze serií různých konformací, které navzájem velmi rychle přecházejí. Na druhou stranu podobné studie zinečnaté soli bacitracinu odhalily, že tato sůl má mnohem stabilnější konformaci. U této látky je menší konformační flexibilita než u bacitracinu A. Je tomu tak díky komplexaci s dvojmocným iontem kovu.

Bacitracin A a jeho soli s dvojmocným kovem se liší také v jejich relativní chemické stabilitě. Například nekomplexovaný bacitracin A podléhá oxidaci a konversi na bacitracin F, který má malou antimikriobiální aktivitu. Na druhé straně zinečnatá sůl bacitracinu je proti oxidaci resistentní (Froeyshov: "The Bacitracins: Properties, Biosynthesis, and Fermentation" v "Biotechnology of Industrial Antibiotics" (Vandamme E.J., red.), Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., str. 665 (1984).).

Navíc navázání N-koncové aminokyselinové skupiny (Ile-1) na zinek také zabraňuje deaminaci. Studie nukleárně magnetickou

resonancí potvrdily navázání $Zn^{2+}$ bacitracinovým zbytkem Ile-1.

Souhrnně tyto NMR výsledky odhalily, že bacitracin A a zinečnatá sůl bacitracinu jsou různé, pokud jde o strukturu, konformaci a chemii.

Byla demonstrována účinnost bacitracinu jako antibakteriálního činidla. Proto až dosud bylo obecně předpokládáno, že bacitracinové působení na prvoky (např. E. histolytica) existuje díky tomu, že toto léčivo snižuje střevní bakterie, na kterých améby žijí. Pokusy jsme však potvrdili studii Gillina a Diamonda: J. Antimicrob. Chemother. 8, 305 (1981), že bacitracin je přímo účinný na parazitické prvoky i v nepřítomnosti bakterií. Těmito pokusy jsme také poprvé demonstrovali, že většina solí bacitracinu s dvojmocnými kovy je alespoň řádově účinnější na protozoa než nekomplexovaný bacitracin.

Sůl bacitracinu se zinkem je výhodnou bacitracinovou solí pro léčení protozoální infekce. Na rozdíl od metronidazolu, jednoho z dnes používaných léčiv pro léčení infekcí E. histolytica, je zinečnatá sůl bacitracinu nemutagenní, jak bylo ukázáno řadou předcházejících studií. Zinečnatá sůl bacitracinu nemá mutagenní potenciál v histidinových auxotrofech Salmonella typhimurium v nepřítomnosti i v přítomnosti aktivačního systému krysích jater. V jiné studii zinečnatá sůl bacitracinu neindukovala významné zvýšení frekvence mutace v místě TK genu mutačního systému myších lymfomatických buněk s a bez aktivace. V ještě jiné studii zinečnatá sůl bacitracinu neindukovala žádné poškození chrosomální struktury lidských periferních lymfocytů, dokonce ve vysokých koncentracích při nichž dochází ke značnému snížení buněčného dělení. Ve studiích in vivo subakutní orální podávání zinečnaté soli bacitracinu krysám po dobu 5 dnů v množstvích 10, 50 a 250 mg/kg živé hmotnosti, ekvivalentní dietním koncentracím 100, 500 a 2500 mg/kg, neprodukovalo žádné podstatné poškození chromosomální struktury v buňkách kostní dřeně krys. A konečně, zinečnatá sůl bacitracinu neměla významný vliv na semikonzervativní DNA syntézu, neplánovanou DNA syntézu (DNA

opravná) a sacharosovou sedimentaci nukleoidu ("superhelixu" DNA) isolovaného z buněk sleziny krys, jimž bylo podáváno 8,3 a 41 mg/kg (živé hmotnosti) zinečnaté soli bacitracinu za den, což je ekvivalentní dietním koncentracím 136 a 833 mg/kg, po dobu 7 dnů. Bylo pozorováno pouze malé snížení rychlosti sedimentace nukleoidu po 24 hodinách inkubace při vyšších hodnotách podávání.

Jelikož zinečnatá sůl bacitracinu není absorbována ze střeva, její orální toxicita je zcela nízká. Bylo ukázáno, že je netoxická jak v subchronických tak chronických orálních studiích toxicity u krys v dávkách až 1 000 ppm, což je dostatečně nad efektivní koncentrací potřebnou pro léčení infekce E. histolytica. Zvířata tolerovala všechny dávky bez zřejmého chorobného vlivu. V játrech žádného testovaného zvířete nebyla nalezena detegovatelná množství zinečnaté soli bacitracinu. Nekropsie zvířat, která zemřela během testu, neodhalila žádné účinky související s tímto léčivem, které by mohly být zodpovědné za smrt zvířete.

Bacitracinové soli se mohou připravovat jako směsi s konvenčními farmaceutickými nosiči podle konvenčních způsobů přípravy farmaceutických prostředků. Nosiče mohou mít různé formy. Například dávkové formy pro orální podávání mohou jako nosiče obsahovat škroby, cukry, ředidla, granulační činidla, mazadla, vazebná činidla, desintegrační činidla a podobná. Mezi dávkové formy patří prášky, tobolky a tablety. Mohou se používat také formy pro regulované uvolňování. Kvůli snadnosti podávání představují tablety a tobolky nejvýhodnější jednotkovou dávkovou formu pro orální podávání. Jestliže je to žádoucí, mohou být tablety standardním způsoby potaženy cukrem nebo může jít o enterosolventní tablety.

Podle výhodného uspořádání se zinečnatá sůl bacitracinu podává jako tableta, v níž základní tabletovací činidlo obsahuje celulosu, výhodněji mikrokrystalickou celulosua. Výhodná forma tablety má následující složení:

| | |
|---|---|
| zinečnatá sůl bacitracinu (nesterilní) | asi 380 mg (25 000 mezinár. jednotek) |
| mikrokrystalická celulosa | 150 až 250 mg |
| zesíťovaný polyvinylpyrrolidon | 10 až 40 mg |
| stearát hořečnatý | 5 až 10 mg |
| hmotnost tablety | 545 až 680 mg |

Zinečnatá sůl bacitracinu má typicky obsah zinku asi 5 hmotnostních %. Potence, definovaná jako antimikrobiální aktivita na citlivý kmen Micrococcus luteus, je typicky v rozmezí od asi 65 do asi 70 mezinárodních jednotek (IU) na mg.

Při praktické aplikaci tohoto vynálezu je výhodné léčit infekci Entamoeba histolytica, Giardia lamblia a Cryptosporidia sp. orálním podáváním bacitracinové soli, s výhodou ve formě tablet. Jeden z příkladů přípravy vhodných tablet je uveden výše.

Pro léčení infekce Tritrichomonas foetus podle tohoto vynálezu je výhodné dodávat bacitracinovou sůl jako emulzi, pěnu nebo masťové ředidlo. Ředidlo by mělo být schopno dodávat efektivní množství do chodbiček penisu býka a mělo by mít dostatečnou viskozitu, aby ulpělo na penisu a prepuciální kavitě zvířete. Mělo by být dostatečně kapalné, aby se mohlo dodávat za nízkého tlaku. Žádoucí vlastnosti mají emulze, expandující pěna a/nebo mast.

I když se může používat emulze buď oleje ve vodě nebo vody v oleji, druhá z uvedených možností je výhodnou možností vzhledem ke své vyšší viskozitě. Emulze oleje ve vodě se mohou připravovat z minerálních, rostlinných nebo živočišných olejů, stabilizovaných jako kapičky ve vodné fázi emulgačními činidly, jako je například stearát sodný, stearát triethanolaminu a stearylsulfát sodný, v koncentraci až do 1 %. Emulgační činidlo může obsahovat také polysorbáty, kterými jsou polyoxyethylenové estery mastných kyselin. Emulgační činidlo může s výhodou obsa-

hovat monooleát polyoxyethylen(20)sorbitanu, který je obecně znám jako polysorbát 80.

Emulze vodě v oleji se mohou připravovat z minerálních, rostlinných nebo živočišných olejů, kde vodná fáze je stabilizována jako kapičky v olejové fázi emulgačními činidly, jako jsou lecithin, stearylalkoholy, cholesterol a sorbitan, v koncentracích až 5 %. Emulgační činidla mohou s výhodou obsahovat také jeden částečný ester mastné kyseliny a sorbitalanhydridů, jako je monooleát sorbitanu.

Pro místní podávání bacitracinové soli se mohou používat buď vodné nebo nebo nevodné pěny. Obě tyto pěny mají poněkud odlišné vlastnosti, pokud jde o expanzní objem, přilnavost k povrchu a reaktivitu solí bacitracinu s dvojmocnými kovy. Nevodné pěny se typicky připravují z polyalkoholů, jako je propylenglykol nebo glycerol. Jsou stabilizovány emulgačními činidly, jako jsou emulgační vosky dostupné od firmy Croda, Inc. pod obchodním označením Polawax(R) nebo polyoxyethylenethery vyšších alifatických alkoholů dostupné od ICI Americas, Inc. pod obchodním označením Brij(R). Jako hnací plyn se může používat isobutan nebo jiné v polyalkoholu rozpustné plyny. Vodné pěny se mohou připravovat ze směsi polyalkoholů (propylenglykol, glycerol atd.) a vody a stabilizovat emulgačními činidly, jako jsou emulgační činidla "Softigen", která jsou dostupná od firmy Huls AG, Polawax(R), a/nebo "Montawax".

Podle ještě jiného uspořádání může dodávané ředidlo obsahovat mast připravenou ze směsi olejů a vosků, a kvantitativně doplněnou tak, aby se získaly žádoucí fyzikální, chemické a mechanické vlastnosti.

Dodávání těchto prostředků bacitracinových solí pro léčení infekcí T. foetus se dosáhne hnacími činidly, jako je například stlačený vzduch nebo inertní plyn. Stlačený vzduch nebo inertní plyn dodává prostředek aplikátorem vloženým do zvířecí prepuciální kavity. Alternativně lze použít injekční stříkačku.

U většiny trichomoniázových infekcí by měl dodávaný objem v rozmezí mezi asi 50 až 100 ml zajistit léčení veškeré plochy povrchu. S výhodou by měl aplikátor během léčení rotovat v prepuciální kavitě.

Pro léčení lidského parazita Trichomonas vaginalis by se měl prostředek bacitracinové soli s výhodou připravit ve formě tvarovaného pesaru.

Při léčení infekce Cryptosporidia sp. je výhodný způsob podávání bacitracinových solí stejný jako u E. histolytica, to znamená, že jde o orální tablety. Léčící dávka by však u infekcí Cryptosporidia sp. měla být obvykle v rozmezí mezi asi 0,5 až asi 5 gramy za den. Navíc může být nutné prodloužit léčení na více než 20 dnů.

Při léčení infekcí Tritrichomonas gallinae u kurovitých ptáků (tj. ptáků, kteří mají vole), je výhodné podávat bacitracinovou sůl v ptačí potravě. Léčivo by se mělo podávat tak, aby se zadrželo ve voleti. Výhodnou dávkou je obvykle dávka v rozmezí mezi asi 100 až asi 500 gramy bacitracinu na tunu ptačí potravy.

Soli bacitracinu s dvojmocnými kovy se mohou podávat podle tohoto vynálezu v jakémkoliv množství, které je postačující k tomu, aby se dosáhlo zmírnění příslušné protozoální infekce. Takové množství závisí zčásti na rozsahu a stavu onemocnění a/nebo infekci, věku, sexu, velikosti a hmotnosti pacienta a/nebo na tom, jestli jde o léčení profylaktické nebo terapeutické. Jelikož soli bacitracinu s dvojmocnými kovy, jako je zinečnatá sůl bacitracinu, mají při orálním podávání malou toxicitu, je rozumné jejich používání pro profylaxi v místech, kde jsou přítomni někteří prvoci.

Odborníci by měli být schopni stanovit příslušnou denní dávku a příslušný režim léčení vhodný pro specifické okolnosti. Obvyklou denní dávkou pro člověka je dávka v rozmezí od asi 0,5

do asi 5,0 gramů účinné složky za den, s výhodou od asi 1,0 do asi 3,0 gramů za den. Obvykle se v léčení pokračuje po dobu od asi 3 do asi 10 dnů. Podle potřeby lze použít větší nebo menší množství léčiva a delší nebo kratší intervaly léčení. Například podle výsledků klinických studií, které jsou uvedeny dále, dávování asi 1,5 gramu zinečnaté soli bacitracinu za den během asi tří až asi pěti dnů je účinné pro zlikovidování infekce E. histolytica u člověka v různých stadiích infekce.

Podle tohoto vynálezu se sůl bacitracinu s dvojmocným kovem může používat pro účinné léčení lidí nebo zvířat infikovaných neparazitickými a/nebo parazitickými prvoky. Mezi jejich příklady patří, bez omezení, Entamoeba histolytica, Trichomonas vaginalis, Tritrichomonas foetus, Tritrichomonas gallinae, Giardia lamblia, Cryptosporidium parvum, Cryptosporidium sp. a Plasmodium sp. Tyto a další protozoální organismy jsou zodpovědné za takové chorobné stavy, jako je amébní dyzentérie, hovězí trichomoniáza, babesiosa, theileriosa, toxoplasmosa, leishmaniáza, giardiasa, kryptosporidiosa a všechny formy malarie (lidské i veteriární). Jakýkoliv z těchto chorobných stavů lze léčit podle tohoto vynálezu.

Následující příklady ukazují léčení infekcí souvisejících s prvoky solemi bacitracinu s dvojmocnými kovy a srovnávají citlivost některých prvoků na bacitracinové soli a na bacitracin.

Je třeba si uvědomit, že tyto příklady jsou zde zamýšleny jako ukázka selektivních uspořádání podle tohoto vynálezu a nejsou v žádném případě zamýšleny jako omezení rozsahu tohoto vynálezu.

Příklady provedení vynálzeu

Příklad 1

Testování Entamoeba histolytica

Tato in vitro studie ukazuje, že zinečnatá sůl bacitracinu je mnohonásobně aktivnější na E. histolytica než bacitracin.

Studie na xenické kultuře

Isoláty E. histolytica představující tři různé zymodymy (I, II nebo XIV) byly odvozeny od oblasti geografického výskytu. Pacienti, z nichž byly tyto isoláty získány, byli buď pathogenní (tj. měli dyzenterii) nebo nepathogennmí (tj. neměli dyzenterický stupeň infekce charakterizovaný průchodem cyst nebo trofozoitů). Následující tabulka identifikuje isoláty E. hystolytica podle shora uvedených kriterií:

Tabulka I
Identifikace isolátů Entamoeba histolytica

| isolát | původ | pathogenní/ nepathogenní | zymodymy |
|---|---|---|---|
| T2K | Afrika | NP[1] | ND[3] |
| T4 | Afrika | NP | I |
| T6 | Afrika | NP | I |
| 418 | Indie | NP | I |
| 70k | Norsko | NP | I |
| 116k | Norsko | NP | I |
| AiDO | Afrika | NP | I |
| 1 | Norsko | NP | I |
| OMAk | Norsko | NP | I |
| MS | Afrika | NP | I |
| BiLO | Afrika | NP | I |
| GS | Afrika | NP | I |

Tabulka I (pokračování)
Identifikace isolátů Entamoeba histolytica

| isolát | původ | pathogenní/ nepathogenní | zymodymy |
|---|---|---|---|
| URU1 | Afrika | NP | I |
| URU19 | Afrika | NP | I |
| SI | Anglie | P[2] | II |
| 1246 | Anglie | P | II |
| DA | Afrika | P | II |
| DOGO | Afrika | P | II |
| Sh2 | Indie | P | XIV |
| C1 | Indie | P | XIV |
| C2 | Indie | P | XIV |

[1]Isolát z pacienta s cystami nebo trofozoity, ale nikoliv dyzenterií.
[2]Isolát z pacienta s dyzenterií.
[3]Zymodym nestanoven.

Každý isolát byl xenickou kulturou, tj. obsahoval vedle améby E. histolytica normálně se vyskytující pacientovu fekální mikrofloru. Tyto kultury byly uchovávány způsobem podle Robinsona: Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 62, 285 (1968). Bacitracin (70 mezinár. jedn./mg) a jeho zinečnatá sůl (65 mezinár. jedn./mg) byly získány z Apothekernes Laboratorium A.S. (Oslo, Norsko). Po standardizaci mikrotitrovacího testování a poloprovozního testování léčiv (výsledky nejsou uvedeny) byl vypracován následující postup testování. Bacitracin byl testován v rozmezí 20,0 až 0,625 mg/ml dvojnásobným zřeďováním. Bylo zkoumáno také 30 mg/ml bacitracinu. Zinečnatá sůl bacitracinu byla analyzována dvojnásobným zřeďováním v rozmezí 10,0 až 0,156 mg/ml. Zbývající jamky byly ponechány jako kontrola. Původní zásobní roztok bacitracinu 75 mg/ml bacitracinu se připraví v Robinsonově mediu bez škrobu (SFRM). Po naplnění první řady jamek se zásoba zředí SFRM na roztok o koncentrraci 50 mg/ml,

který se použije pro zbývající koncentrace. Zinečnatá sůl bacitracinu se rozpustí na koncentraci 250 mg/ml v okyselené destilované vodě (60 $\mu$l konc. HCl/ml destilované vody) a potom se přikape k 9 ml SFRM (25 mg/ml). Objem léčiva (100 $\mu$l) se pak dvojnásobně zředí v SFRM, takže se získají 2,5x koncentráty požadovaných konečných koncentrací na mikrotitrovací desce. Do každé jamky se pak přidá 50 $\mu$l 25% (mg%) roztoku škrobu (BDH) (v SFRM). 16 až 18 hodin před koncem potřebné 48-hodinové kultivační doby se amébové isoláty pasážují do čerstvých zkumavek obsahujících Robinsonovo medium bez škrobu. Na konci této kultivační doby se améby isolují v malých objemech media a resuspendují se v alespoň 20 objemech SFRM. Tyto suspenze se pak odstřeďují při 1000 otáček za minutu po dobu pěti minut před tím, než se resuspendují v čerstvém mediu. Spočítají se v modifikované Neubauerově komoře. Améby se odstřeďují jak shora uvedeno a peleta se resupenduje na koncentraci $2.5.10^4$/ml SFRM. 10$\mu$l podíly se pak odpipetují do příslušných jamek. Získají se tak duplikátové kultury každého isolátu pro každou testovanou koncentraci. Tyto destičky se pak umístí do anaerobní komory (HP11, Oxoid) na dobu 24 hodin při teplotě 37 °C. I když tento postup poskytuje dostatek škrobu pro améby, koncentrace byla taková, že po 24 hodinách byly tyto desky snadno čitelné a kvantifikovatelné přímým pozorováním inversním mikroskopem. Životaschopnost byla posuzována přidáním trypanové modře na konečnou koncentraci 0,1 %.

Tabulky II (bacitracin) a III (zinečnatá sůl bacitracinu) ukazují výsledky tří studií na 21 xenických kulturách isolátů E. histolytica. Hodnoty v těchto studiích byly získány odečtením ze tří pokusů, aby se snížily případné odchylky. Minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální smrtelné (lethální) dávky (MLC) jsou udávány v mg/ml.

Tabulka II

Minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální smrtelné (letální) koncentrace (MLC) bacitracinu v xenických kulturách Entamoeba histolytica

| isolát | pokus č.1 | | pokus č.2 | | pokus č.3 | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | MIC | MLC | MIC | MLC | MIC | MLC |
| T2K | 2,5 | 30,0 | 2,5 | 30,0 | 0,63 | 30,0 |
| T4 | 5,0 | 30,0 | 2,5 | 30,0 | 0,63 | 30,0 |
| T6 | 2,5 | 30,0 | 2,5 | 20,0 | 2,5 | 20,0 |
| 418 | 5,0 | 30,0 | 0,63 | 20,0 | 0,63 | 20,0 |
| 70k | 5,0 | 30,0 | 5,0 | 20,0 | 10,0 | 30,0 |
| 116k | 10,0 | 30,0 | 1,25 | 30,0 | 1,25 | 30,0 |
| AiDO | 10,0 | 30,0 | 2,5 | 30,0 | 2,5 | 30,0 |
| 1 | 5,0 | 30,0 | 10,0 | 30,0 | 5,0 | 30,0 |
| OMAk | 2,5 | 30,0 | ND | ND | 1,25 | 30,0 |
| MS | 5,0 | 30,0 | 2,5 | 20,0 | 1,25 | 20,0 |
| BiLO | 5,0 | 30,0 | ND | ND | 1,25 | 20,0 |
| GS | 2,5 | 30,0 | 1,25 | 20,0 | 0,63 | 30,0 |
| URU1 | 2,5 | 30,0 | 2,5 | 20,0 | 1,25 | 30,0 |
| URU19 | 2,5 | 30,0 | ND | ND | ND | ND |
| SI | 2,5 | 30,0 | ND | ND | 2,5 | 20,0 |
| 1246 | 2,5 | 30,0 | 10,0 | 20,0 | 0,63 | 20,0 |
| DAK | 2,5 | 30,0 | 5,0 | 30,0 | 0,63 | 20,0 |
| DOGO | 2,5 | 30,0 | 2,5 | 20,0 | 0,63 | 10,0 |
| Sh2 | --- | ---- | 5,0 | 20,0 | 2,5 | 20,0 |
| C1 | 10,0 | 30,0 | 5,0 | 20,0 | 1,25 | 20,0 |
| C2 | 2,5 | 30,0 | 5,0 | 20,0 | 2,53 | 30,0 |

Tabulka III

Minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální smrtelné (letální) koncentrace (MLC) zinečnaté soli bacitracinu v xenických kulturách Entamoeba histolytica

| isolát | pokus č.1 | | pokus č.2 | | pokus č.3 | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | MIC | MLC | MIC | MLC | MIC | MLC |
| T2K | 0,63 | 5,0 | 0,31 | 5,0 | 0,16 | 2,5 |
| T4 | 0,31 | 2,5 | 0,31 | 2,5 | 0,16 | 2,5 |
| T6 | 0,31 | 2,5 | 0,63 | 2,5 | 0,31 | 2,5 |
| 418 | 0,63 | 5,0 | 0,31 | 2,5 | 0,31 | 2,5 |
| 70k | 0,63 | 2,5 | 0,63 | 2,5 | 0,63 | 2,5 |
| 116k | 0,63 | 2,5 | 0,31 | 1,25 | 0,31 | 2,5 |
| AiDO | 0,63 | 2,5 | 0,16 | 2,5 | 0,16 | 2,5 |
| 1 | 0,63 | 2,5 | 1,25 | 2,5 | 0,31 | 2,5 |
| OMAk | 0,31 | 2,5 | ND | ND | 0,16 | 2,5 |
| MS | 0,63 | 2,5 | 0,63 | 1,25 | 0,63 | 2,5 |
| BiLO | 0,31 | 2,5 | ND | ND | 0,31 | 2,5 |
| GS | 0,63 | 2,5 | 0,63 | 2,5 | 0,31 | 2,5 |
| URU1 | 0,63 | 2,5 | 1,25 | 2,5 | 0,63 | 2,5 |
| URU19 | 0,63 | 2,5 | ND | ND | 0,31 | 2,5 |
| SI | 0,63 | 2,5 | ND | ND | 0,63 | 2,5 |
| 1246 | 0,16 | 2,5 | 0,63 | 2,5 | 0,31 | 1,25 |
| DAK | 0,63 | 2,5 | 0,63 | 2,5 | 0,63 | 2,5 |
| DOGO | 0,16 | 2,5 | 0,31 | 2,5 | 0,31 | 1,25 |
| Sh2 | 0,63 | 2,5 | 0,63 | 2,5 | 0,31 | 2,5 |
| C1 | 1,25 | 2,5 | 0,31 | 2,5 | 0,31 | 2,5 |
| C2 | 0,63 | 2,5 | 0,63 | 2,5 | 0,31 | 2,5 |

I když hodnoty MIC bacitracinem ošetřených kultur byly různé (0,63 až 10,0 mg/ml) od isolátu k isolátu a od studie ke studii, hodnoty MLC byly snadno reprodukovatelné (20 nebo 30 mg/ml). Kultury s MLC 30 mg/ml obvykle vykazovaly pouze několik žijících parazitů při 20 mg/ml. Naproti tomu kultury ošetřené zinečnatou solí bacitracinu byly citlivější a reprodukovatel-

nější s hodnotami MIC 0,16 až 1,25 a hodnotami MLC 1,25 až 5,0 mg/ml. Při koncentracích zinečnaté soli bacitracinu 5 mg/ml a vyšších však dochází ke srážení.

Jelikož data z tabulek II a III byla založena na dvojnásobném zřeďování léčiva, studovali jsme citlivost E. histolytica v užším rozmezí koncentrace léčiva. Výsledky jedné studie jsou uvedeny v tabulce IV. Ve stejném testu byly studovány dva další isoláty, ale vzhledem ke slabé kontrole jsme je opustili. Minimální lethální koncentrace jsou uvedeny v mg/ml.

Tabulka IV
Minimální lethální koncentrace bacitracinu a zinečnaté soli bacitracinu v xenických kulturách Entamoeba histolytica

| | MLC bacitracinu | MLC zinečnaté soli bacitracinu |
|---|---|---|
| isolát 1 | 21 | 1,6 |
| isolát C1 | 24 | 1,4 |

Jak je vidět z dat v tabulce IV, zinečnatá sůl bacitracinu byla v xenické kultuře třináctkrát aktivnější než bacitranin.

Příklad 2

Testování Entamoeba histolytica

Tato studie ukazuje, že zinečnatá sůl bacitracinu zabijí E. histolytica spíše přímým toxickým účinkem na améby než pouhým odstraněním střevních bakterií, na nichž se tyto organismy živí.

Studie axenické kultury

Axenické kultury jsou isoláty améb, které se adaptovaly na růst v nepřítomnosti bakterií, tj. obsahují sterilní kultu-

ry. Axenické kultury E. histolytica (NIH:200) se uchovávají způsobem podle Diamonda: J. Parasitol. 54, 1047 (1968) v mediu TP-S-1 upraveném tak, že se vitaminový roztok nahradí 2,5 % NCTC 135. Zkumavky s plochými stranami (10 ml) se naočkují $2.10^5$ améb a přenesou se do inkubátoru o teplotě 37 °C na 1 hodinu před přidáním 1 ml 10x zásobního roztoku léčiva (bacitracin nebo zinečnatá sůl bacitracinu). Améby se pak isolují tak, že se zkumavky chladí na 4 °C po dobu 20 minut v ledové lázni, potom se odstřeďují při 1000 otáček za minutu po dobu 8 minut při stejné teplotě. Testy se provádějí během 36 až 48 hodin spíše než po 24 hodinách používaných u xenických kultur, vzhledem k delší době dělení axenických kultur. Všechny testy byly prováděny třikrát.

Všechny améby byly zabity během 48 hodin v přítomnosti 20 mg/ml bacitracinu. Jestliže byly zkumavky inkubovány s 2,5, respektive s 5 mg/ml bacitracinu, došlo ke snížení počtu buněk o 76,4 %, respektive o 92,3 % ve srovnání s kontrolou. Toto snížení se zvýšilo na 97,7 % při koncentraci bacitracinu 10 mg/ml a na 99,9 % při koncentraci bacitracinu 15 mg/ml. Naproti tomu zinečnatá sůl bacitracinu poskytla snížení 68,3 % při koncentraci 1 mg/ml, 90,6 % při 2 mg/ml a snížení přes 99,5 % při 5 mg/ml. I když tyto výsledky naznačují, že u axenických kultur ve srovnání s xenickými amébními kulturami je zapotřebí 2 až 3-násobná koncentrace zinečnaté soli bacitracinu, byl zjištěn přímý toxický účinek na E. histolytica. Tento účinek bacitracinů na améby není jednoduše sekundárním účinkem odstranění střevní flory, na níž se E. histolytica udržuje.

Příklad 3

Klinické studie amébiázy

Pacientům (člověk) byla podána zinečnatá sůl bacitracinu ve formě tablet o 25 000 mezinár. jedn. v jednotkové denní dávce 100 000 mezinár. jednotek. Všichni pacienti měli klinické příznaky onemocnění a laboratorní znaky amébiázy. Cysty a tro-

fozoité E. histolytica byly detegovány původně prosetím fekálií postupem za mokra a později potvrzeny formol-etherovým způsobem. Celé parazitologické léčení bylo založeno na přítomnosti 1 až 2 negativních vzorků stolice během jednoho týdne po léčení.

V jedné části této studie vlivu dávky byly léčeny dvě skupiny pacientů se symptomatickými E. histolytica cystami nebo trofozoity buď po dobu 10 nebo 5 dnů. Tuto pacienti docházeli na kliniku kvůli abdominálním bolestem jako ambulantní pacienti. Výsledky jsou uvedeny v tabulce V.

Tabulka V
Studium vlivu dávky u symtomatických pacientů s cystami a trofozoity

| počet dnů léčení | počet pacientů | počet odpovídajících | počet s recidivou |
|---|---|---|---|
| 10 | 9 | 9 | 0 |
| 5 | 5 | 5 | 0 |

Při studiích doby trvání dávkování byly pozorovány tři skupiny pacientů: skupina 1 - pacienti se symptomatickými cystami a trofozoity, skupina 2 - dyzenteričtí pacienti s krvavou diareou a skupina 3 - pacienti s asymptomatickými cystami. Výsledky jsou uvedeny dále v tabulkách VI až VIII.

Tabulka VI
Studie pacientů se symptomatickými cystami a trofozoity v závislosti na době léčení

| počet dnů léčení | počet pacientů | počet odpovídajících | počet s recidivou |
|---|---|---|---|
| 5 | 5 | 5 | 1 |
| 3 | 12 | 12 | 2 |
| 2 | 9 | 5 | 3 |
| 1 | 2 | 1 | 1 |

Tabulka VII
Studie případů dyzentérie v závislosti na době léčení

| počet dnů léčení | počet pacientů | počet odpovídajících | počet s recidivou |
|---|---|---|---|
| 3 | 5 | 5 | 1 |

Tabulka VIII
Studie symptomatických pacientů s cystami v závislosti na době léčení

| počet dnů léčení | počet pacientů | počet odpovídajících | počet s recidivou |
|---|---|---|---|
| 5 | 9 | 9 | 4 |
| 3 | 9 | 8 | 2 |

Při studiích vlivu dávkování bylo léčeno 9 pacientů po dobu 10 dnů se stupněm vyléčení 100 %. Při kontrole nebyly zjištěny žádné klinické nebo parazitologické recidivy (tabulka V). Pět pacientů bylo léčeno 5 dnů a všichni byli zbaveni své nemo-

ci.

V 1. skupině pacientů studie závislosti na době léčení (symptomatičtí pacienti s cystami a trofozoity) bylo zahrnuto 5 případů léčených 5 dnů s úplným účinkem až na jednoho pacienta s recidivou 12. den po léčení (tabulka VI). U 12 pacientů léčených 3 dny byl stupeň vyléčení 100 %, ale u dvou pacientů došlo k recidivě 6. a 10. den (16 %). U 9 pacientů léčených dva dny byl stupeň vyléčení 55 % a stupeň recidivy 60 %. Dva pacienti byli léčeni 1 den bez úspěchu.

Ve 2. skupině pacientů studie závislosti na době době léčení (dyzenteričtí pacienti s krvavou diareou) 5 případů odpovědělo při třídenním režimu plným klinickým a parazitologickým vyléčením, u jednoho pacienta však došlo 12. den k parazitologické recidivě (tabulka VII).

Ve 3. skupině pacientů studie závislosti na době léčení (asymptomatičtí pacienti s cystami) bylo zahrnuto 9 pacientů v pětidenním režimu. Všech devět bylo bez parazitů mezi 2. a 4. dnem (tabulka VIII). Po dvou týdnech 44 % vykazovalo ve stolici opět parazity. V třídenním režimu bylo 9 pacientů. Jeden z nich neodpovídal na léčení. Dva pacienti měli recidivu.

Klinické výsledky ukazují, že jednotlivci jak s asymptomatickou amébiázou tak syptomatickým onemocněním a rovněž tak i pacienti s příznaky mukosálního invasivního onemocnění s krvavou diareou jsou léčitelní zinečnatou solí bacitracinu. Nebyly popsány žádné vedlejší účinky.

Tyto výsledky, ukazující 100% vyléčení denní dávkou 100 000 mezinárodních jednotek zinečnaté soli bacitracinu podávaných po dobu 3 až 5 dnů, mohou být srovnány s dřívější studií Mosta a spol.: Am. J. Trop. Med. 30, 491 (1950), v níž se nedosáhlo 100% vyléčení stejnou denní dávkou bacitracinu při 10 dnech podávání.

Příklad 4

Testování Trichomonas vaginalis

Tato studie srovnává citlivost T. vaginalis na bacitracin a na zinečnatou sůl bacitracinu.

Z lidských subjektů se získají isoláty T. vaginalis. Z těchto isolátů jich 12 bylo citlivých na metronidazol a 6 jich nebylo citlivých na metronidazol. Na všechny isoláty bylo působeno buď bacitracinem nebo zinečnatou solí bacitracinu. Toto působení se provádělo podle způsobu popsaného J. G. Meingassnerem a J. Thurnerem: "Strains of Trichomonas Vaginalis Resistant to Metronidazole and Other 5-Imidazoles", Antimicrobial Agents and Chemotherapy 15, 254 (1979).

Před zředěním mediem se bacitriciny rozpustí ve vodě na koncentraci 250 mg/ml. Zinečnatá sůl se rozpustí v okyselené vodě (60 µl HCl/ml). Připraví se duplikátní desky každého isolátu. Jedna řada desek se vystaví aerobním podmínkám, druhá řada anaerobním podmínkám. Pro přípravu anaerobních podmínek se použije anaerobní plynová komůrka Oxoid HP 11 a sestava BR 38 gas generating kit. Spíše než dvojnásobné zřeďování jako u metronidazolu se v případě bacitracinů používá seriálové zředění, tedy jak u bacitracinu (tj. 500 až 3500 m.j. (mezinárodních jednotek, IU) v intervalech 500 m.j.) tak u zinečnaté soli bacitracinu (tj. 100 až 400 m.j. v intervalu 50 m.j.). Výsledky jsou uvedeny v tabulce IX (výraz mj v tabulce IX je zkrácené označení m.j., tj. pojem mezinárodní jednotka).

Tabulka IX

Cittlivost isolátů Trichomonas vaginalis citlivých na metronidazol a necitlivých na metronidazol na bacitracin a zinečantou sůl bacitracinu

| citlivost na metronidazol | isolát | bacitracin | | zinečnatá sůl bacitracinu | | metronidazol | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | anaer. MLC (mj/ml) | aerob. MLC (mj/ml) | anaer. MLC (mj/ml) | aerob. MLC (mj/ml) | anaer. MLC (μg/ml) | aerob. MLC (μg/ml) |
| ano | 1031 | 2000 | 2000 | 350 | 250 | 4 | 40 |
| | 1043 | 2000 | 2500 | 350 | 350 | <1 | 20 |
| | 1044 | 2000 | 2000 | 300 | 250 | <1 | <10 |
| | 1064 | 1500 | 1500 | 300 | 250 | <1 | - |
| | 1065 | 2000 | 2000 | 400 | 300 | <1 | <10 |
| | 1165 | 2000 | 2000 | 250 | 350 | <1 | 40 |
| | 1910 | 2000 | 2000 | 350 | 400 | 2 | 40 |
| | 6950 | 2000 | 2000 | 400 | 350 | 2 | 20 |
| | UCH-1 | 2000 | 2000 | 400 | 400 | 4 | 40 |
| | UCH-2 | 2500 | 2500 | 400 | 350 | 2 | <10 |
| | UCH-M1 | 2000 | 2000 | 250 | 250 | 4 | 20 |
| | UOB-1 | 2000 | 2000 | 400 | 400 | <1 | 20 |
| ne | 89532.2 | 2000 | 2000 | 350 | 350 | 2 | 200 |
| | 90576 | 2000 | 2500 | 350 | 250 | 2 | 80 |
| | CDC85 | 2000 | 1500 | 350 | 350 | 20 | 200 |
| | IR78 | 2000 | 2000 | 300 | 300 | 4 | 200 |
| | PHLS289 | 2500 | 2000 | 250 | 200 | 8 | 60 |
| | STH-1 | 2000 | 2000 | 350 | 250 | 8 | 60 |

Jak lze vidět z tabulky 9, isoláty citlivé na metronidazol (tj. takové, které mají MLC < 40 μg metronidazolu za aerobních kultivačních podmínek) vykazují bacitracinové MLC v rozmezí od 1 500 do 2 500 m.j./ml (tj. 21,44 až 35,71 mg/ml) a MLC zinečnaté soli bacitracinu v rozmezí od 200 do 350 m.j./ml (tj. 3,13

až 5,47 mg/ml). Zinečnatá sůl bacitracinu je tedy na infekci T. vaginalis přibližně čtyřikrát až desetkrát účinnější než bacitracin.

Účinnost bacitracinů na axenické kultury T. vaginalis naznačuje, že tato léčiva jsou účinná přímo na parazita, účinnost není tedy zprostředkována sekundární cestou (např. nedostatkem výživy účinkem léčiva na bakterie). Ze skutečnosti, že bacitraciny jsou účinné jak na isoláty citlivé na metronidazol tak na isoláty necitlivé na metronidazol vyplývá, že bacitraciny působí jiným mechanismem než metronidazol.

Příklad 5

Testování Trichomonas vaginalis

Tato studie ukazuje účinnosti jiných solí bacitracinu na isoláty T. vaginalis.

Zopakuje se postup z příkladu 4 s tím, že se zinečnatá sůl bacitracinu nahradí následujícími solemi bacitracinu: nikelnatou, kademnatou, kobaltnatou, manganatou, měďnatou a železnatou. MLC těchto solí bacitracinu byla mimo rozmezí. MIC však ukazují, že s výjimkou železnaté soli bacitracinu se komplexací bacitracinu se solí dvojmocného kovu zvýší aktivita bacitracinu. Výsledky jsou uvedeny v tabulce X.

Tabulka X

Minimální inhibiční koncentrace bacitracinu a solí dvojmocného kovu s bacitracinem na isoláty Trichomonas vaginalis

| léčivo | MIC na isolát (mg/ml) | |
|---|---|---|
| | UCH1 | 1910 |
| bacitracin | 10,00 | 10,00 |
| zinečanatá sůl bacitracinu | 2,50 | 2,50 až 5,00 |
| nikelnatá sůl bacitracinu | 1,25 | 2,50 |
| kademnatá sůl bacitracinu | 0,31 | 0,15 |
| kobaltnatá sůl bacitracinu | 1,25 | 1,25 |
| měďnatá sůl bacitracinu | 2,50 | 1,25 |
| manganatá sůl baitracinu | 0,15 | 1,26 |
| železnatá sůl bacitracinu | >10,00 | >10,00 |

Příklad VI

Tvarovaný pesar zinečnaté soli bacitracinu

Typický pesar zinečnaté soli bacitracinu pro léčení T. vaginalis má následující složení:

| účinná složka: | | specifikace: |
|---|---|---|
| zinečnatá sůl bacitracinu | 27 500 m.j. (EP) | Ph.Eur. |
| excipient: | | |
| ztužený tuk (Novata BD) | 1 450 mg | Ph.Eur. |
| hmotnost pesaru | 1 830 mg | |

Množství zinečnaté soli bacitracinu a tuku se podle síly zinečnaté soli bacitracinu upraví tak, aby každý tvarovaný pesar obsahoval 27 500 m.j. (EP) (včetně 10% nadbytku).

Příklad 7

Testování Tritrichomonas foetus

V tomto příkladu je demonstrována účinnost léčení hovězí trichomiázy bacitracinem a srovnání s účinností léčení bacitracinovými solemi.

Připraví se isoláty T. foetus a působí se na ně bacitracinem nebo zinečnatou solí bacitracinu podle postupu z příkladu 4. Pět z těchto isolátů T. foetus bylo isolováno z geograficky oddělených epidemií hovězí trichomoniázy v Severní Kalifornii (tj. isoláty č.: TF.7, TF.3741, S10, 138 a 121). Jeden z isolátů T. foetus pocházel z Americké sbírky typů kultur (tj. isolát č.: ATCC 30166).

Byly připraveny duplikátní desky každého isolátu. Jedna řada desek byla vystavena aerobnímu prostředí, druhá řada desek byla vystavena anaerobním podmínkám. Pro přípravu anaerobního prostředí byla použita anaerobní plynová komůrka Oxoid HP 11 a sestava BR 38 gas generating kit. Bylo použito sekvenční ředění bacitracinu 97 až 49 mg/ml) a zinečnaté soli bacitracinu (1,5 až 7,5 mg/ml). Výsledky jsou uvedeny v tabulce XI.

Tabulka XI
Citlivost isolátů Tritrichomonas foetus na bacitracin a zinečnatou sůl bacitracinu

| isolát | bacitracin | | zinečnatá sůl bacitracinu | |
|---|---|---|---|---|
| | anaerob. MLC (mg/ml) | aerob. MLC (mg/ml) | anaerob. MLC (mg/ml) | aerob. MLC (mg/ml) |
| ATCC 30166 | 28 | 28 | 6 | 6 |
| TF.7 | 28 | 28 | 6 | 6 |
| FT.3741 | 28 | 28 | 5 | 6 |
| S10 | 28 | 28 | 6 | 6 |
| 138 | 28 | 28 | 6 | 6 |
| 121 | 28 | 28 | 6 | 6 |

Tato data ukazují, že zinečnatá sůl bacitracinu je pětkrát účinnější než bacitracin na T. foetus. Účinnost bacitracinů na axenické kultury T. foetus opět ukázaly, že léčiva jsou přímo účinná na parazita, účinnost tedy není zprostředkována sekundární cestou (např. nedostatkem výživy účinkem léčiv na bakterie). Ze skutečnosti, že účinnosti jak bacitracinu tak zinečnaté soli bacitracinu jsou nezávislé na stavu kultury, vyplývá, že tato léčiva působí jiným mechanismem než metronidazol.

Příklad 8

Emulze zinečnaté soli bacitracinu typu olej ve vodě

Emulze zinečnaté soli bacitracinu typu olej ve vodě, která je vhodná pro léčení hovězí trichomoniázy, se připraví z následujících složek:

| | |
|---|---|
| parafinový olej | 10,0 g |
| polysorbát 80 (Tween(R) 80) | 0,5 g |
| voda | 84,5 g |

zinečnatá sůl bacitracinu 5,0 g

Zinečnatá sůl bacitracinu se smíchá s parafinem a polysorbátem 80. Směs bacitracinu s olejem se pak emulgačním zařízením disperguje ve vodné fázi.

Příklad 9

Emulze zinečnaté soli bacitracinu typu voda v oleji

Emulze zinečnaté soli bacitracinu typu voda v oleji, která je vhodná pro léčení hovězí trichomoniázy, se připraví z následujících složek:

| | |
|---|---|
| parafinový olej | 60,0 g |
| monooleát sorbitanu (Span(R) 80) | 2,0 g |
| voda | 28,0 g |
| zinečnatá sůl bacitracinu | 10,0 g |

Zinečnatá sůl bacitracinu se smíchá s parafinovým olejem a monooleátem sorbitanu. V olejové fázi se pak emulgačním zařízením disperguje voda.

Příklad 10

Nevodná pěna zinečnaté soli bacitracinu

Nevodná pěna zinečnaté soli bacitracinu se připravuje z následujících složek:

| | |
|---|---|
| emulgační vosk (Polawax(R)) | 0,74 g |
| polyoxyethylenstearylether (Brij(R)76) | 2,99 g |
| propylenglykol | 80,77 g |
| isobutan | 5,50 g |
| zinečnatá sůl bacitracinu | 10,00 g |

Všechny složky, s výjimkou isobutanu a zinečnaté soli bacitracinu, se smíchají (tj. pevné sloučeniny se roztaví a smíchají se s kapalinami). Po ochlazení se přidá zinečnatá sůl ba-

citracinu. Tato směs se naplní do plechovek, které se zataví. Za vysokého tlaku se ventilem plechovky přidá hnací plyn (isobutan). Obsahy se pak řádně promíchají. Tento produkt se může použít pro léčení hovězí trichomoniázy.

Příklad 12

Vodná pěna zinečnaté soli bacitracinu

Vodná pěna zinečnaté soli bacitracinu se připravuje z následujících složek:

| | |
|---|---|
| Polawax(R) | 1,70 g |
| "Montawax" | 1,80 g |
| "Softigen" | 17,00 g |
| propylenglykol | 36,00 g |
| voda | 28,00 g |
| isobutan | 5,50 g |
| zinečnatá sůl bacitracinu | 10,00 g |

Všechny složky, s výjimkou isobutanu a zinečnaté soli bacitracinu se smíchají (tj. pevné sloučeniny se roztaví a smíchají se s kapalinami). Po ochlazení se přidá zinečnatá sůl bacitracinu. Tato směs se naplní do plechovek, které se zataví. Za vysokého tlaku se ventilem plechovky přidá hnací plyn (isobutan). Obsahy se pak řádně promíchají. Tento produkt se může použít pro léčení hovězí trichomoniázy.

Příklad 13

Mast se zinečnatou solí bacitracinu

Mast zinečnaté soli bacitracinu se připravuje z následujících složek:

| | |
|---|---|
| vaselina | 75 g |
| parafinový olej | 15 g |
| zinečnatá sůl bacitracinu | 10 g |

Vaselina se roztaví při 70 °C. Přidá se parafinový olej a zinečnatá sůl bacitracinu se řádně vmíchá do uhlovodíkového základu. Tento produkt je užitečný pro léčení hovězí trichomoniázy.

Příklad 14

Testování Tritrichomonas gallinae

Tato studie srovnává aktivitu bacitracinu a zinečnaté soli bacitracinu na Tritrichomonas gallinae.

Isoluje se jeden isolát T. gallinae a nechá se na něj působit bacitracin nebo zinečnatá sůl bacitracinu podle postupu uvedeného v příkladu 4.

Byly připraveny duplikátní desky isolátu. Jedna řada desek byla vystavena aerobnímu prostředí, druhá řada desek byla vystavena anaerobním podmínkám. Spíše než zdvojnásobované ředění jako u metronidazolu bylo použito postupné (sekvenční) ředění bacitracinu (500 až 3 500 m.j. v intervalu 500 m.j.) a zinečnaté soli bacitracinu (100 až 400 m.j. v intervalu 50 m.j.). Zinečnatá sůl bacitracinu se před zředěním mediem rozpustí v okyselené vodě (60 µl HCl/ml) na koncentraci 250 mg/ml. Výsledky jsou uvedeny v tabulce XII.

Tabulka XII
Citlivost (MLC v IU/ml) isolátů Tritrichomonas gallinae na bacitracin, zinečnatou sůl bacitracinu a na metronidazol

| | bacitracin | | zinečnatá sůl bacitracinu | | metronidazol |
|---|---|---|---|---|---|
| isolát | anaer. | aerob. | anaer. | aerob. | |
| GH85 | 1500 | 2000 | 300 | 250 | 2 |

Podle tabulky XII je MLC bacitracinu v rozmezí od 1 500 do 2 000 m.j./ml (tj. 21,43 až 28,57 mg/ml), podle kultivačních podmínek. MLC zinečnaté soli bacitracinu je však v rozmezí 250 až 300 m.j./ml (tj. 3,91 až 4,87 mg/ml). Zinečnatá sůl bacitracinu je tedy na T. gallinae přibližně 5 až 8-krát účinnější než bacitracin.

Tato data také ukazují, že bacitraciny jsou účinné přímo na parazita, nepůsobí tedy sekundární cestou (např. tím, že způsobují nedostatek výživy působením na bakterie).

Příklad 15

Testování Giardia lamblia

Tato studie srovnává účinky bacitracinu a zinečnaté soli bacitracinu na isoláty Giardia lamblia.

Postupem podle příkladu 4 se nechá působit bacitracin a zinečnatá sůl bacitracinu na portlandský isolát G. lamblia.

Pro přípravu anaerobního postředí byla použita anaerobní plynová komůrka Oxoid HP 11 a sestava BR 38 gas generating kit. Spíše než zdvojnásobování ředění jako u metronidazolu bylo použito postupné ředění bacitracinu (tj. 500 až 3 500 m.j. v intervalu 500 m.j.) a zinečnaté soli bacitracinu (tj. 100 až 400 m.j. v intervalu 50 m.j.). Zinečnatá sůl bacitracinu se před ředěním mediem rozpustí v okyselené vodě (60 µl HCl/ml) na koncentraci 250 mg/ml. Parazité se inkubují v přítomnosti léčivého činidla po dobu 24 hodin. Životaschopnost parazitů byla založena na morfologii a pohyblivosti. Výsledky jsou uvedeny v tabulce XIII.

Tabulka XIII

Citlivost isolátů Giardia lamblia (MLC) na bacitracin, zinečnatou sůl bacitracinu a na metronidazol a minimální inhibiční koncentrace bacitracinu, zinečnaté soli bacitracinu a metronidazolu

| | bacitracin | | zinečnatá sůl bacitracinu | | metronidazol | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| isolát | MIC (mj/ml) | MLC (mj/ml) | MIC (mj/ml) | MLC (mj/ml) | MIC (μg/ml) | MLC (μg/ml) |
| port- | | | | | | |
| landský | 2500 | >3500 | 400 | >400 | <1 | 2 |
| | 2000 | >3500 | 150 | 300 | <1 | <1 |

Hodnoty MIC 2,3 až 6,3 mg/ml pro zinečnatou sůl bacitracinu při srovnání s hodnotami 28,6 až 35,7 mg/ml bacitracinu potvrzují, že za uvedených podmínek je na G. lamblia zinečnatá sůl bacitracinu přibližně pětkrát účinnější než bacitracin.

Příklad 16

Klinická studie s G. lamblia

Pacienti ve Švédsku a v Rumunsku infikovaní G. lamblia byli léčeni 200 000 mezinárodních jednotek (m.j., mj, IU) zinečnaté soli bacitracinu ve formě tablet každý den (tj. 25 000 m.j. na tabletu, 4 tablety dvakrát denně) po dobu 10 dnů. Na tento režim dávkování odpovědělo 6 z 10 pacientů ve Švédsku, kteří byli resistentní na metronidazol. Vedle toho na tento režim odpověděli všichni z 11 nevybraných pacientů v Rumunsku. Osm z těchto 11 pacientů zůstalo bez parazitů po celou dobu studia.

Příklad 17

Studie paceinta s Cryptosporidium parvum

Tímto pacientem byl dvanáctiletý chlapec o hmotnosti přibližně 30 kg. Léta trpěl tento pacient mírnou diareou. Před léčením zinečnatou solí bacitracinu byla pacientova stolice při testování opakovaně positivní na střevní Cryptosporidium.

Pacient byl nejdříve léčen 30 000 jednotkami zinečnaté soli bacitracinu třikrát denně. V pravidelných intervalech během léčení a po léčení byly odebírány vzorky stolice pro parazitologické testování. Po 8 následných dnech byla léčba zinečnatou solí bacitracinu přerušena kvůli přidruženému horečnatému onemocnění podobného chřipce. Při přerušení byl pacientovi kvůli chřipce podán sulfonamid a cefalexin. Léčení zinečnatou solí bacitracinu pokračovalo přibližně po jednom měsící a trvalo dva týdny.

Po této době léčení bylo pozorováno, že léčivo je pacientem dobře snášeno. Během léčení nebyli ve stolici zjištěni žádní parazité, což ukazuje na účinnost proti tomuto onemocnění. Avšak týden po ukončení léčení začal být pacient opět positivní v testu na střevní Cryptosporidium. To naznačuje, že při optimálním dávkovém režimu zinečnaté soli bacitracinu je možné úplné zlikvidování cryptosporidia u jinak nevyléčitelného onemocnění.

Tento vynález může mít i jiné specifické formy, aniž by se tyto odchylovaly od ducha nebo podstatných vlastností tohoto vynálezu. Pokud jde o rozsah vynálezu, je třeba vzít v úvahu připojené nároky spíše než předcházející spis.

1057-94



# PATENTOVÉ NÁROKY

1. Použití soli bacitracinu s dvojmocným kovem k výrobě léčiva pro léčení protozoální infekce.

2. Použití podle nároku 1 bacitracinové soli, která obsahuje sůl alespoň jednoho bacitracinu, který je vybrán ze skupiny sestávající z bacitracinu A, bacitracinu $B_1$, bacitracinu $B_2$, bacitracinu $B_3$, bacitracinu $C_1$, bacitracinu $C_2$, bacitracinu $C_3$ a jakékoliv jejich kombinace.

3. Použití podle nároku 1 bacitracinové soli, která je vybrána ze skupiny bacitracinových solí sestávající z kobaltnaté, kademnaté, měďnaté, manganaté, nikelnaté a zinečnaté soli a jakékoliv jejich kombinace.

4. Použití podle nároku 3 bacitracinové soli, která obsahuje zinečnatou sůl bacitracinu.

5. Bacitracinová sůl podle nároku 1 pro léčení infekce Trichomonas vaginalis.

6 Bacitracinová sůl podle nároku 1 pro léčení infekce Tritrichomonas foetus.

7 Bacitracinová sůl podle nároku 1 pro léčení infekce Tritrichomonas gallinae.

8. Bacitracinová sůl podle nároku 1 pro léčení infekce Cryptosporidium sp.

9. Bacitracinová sůl podle nároku 1 pro léčení infekce Giardia lamblia.

10. Bacitracinová sůl podle nároku 1 pro léčení infekce Entamoeba histolytica.

11. Použití podle nároku 1 bacitracinové soli pro výrobu léčiva, které obsahuje sůl bacitracinu s dvojmocným kovem a farmaceuticky přijatelné ředidlo.

12. Použití podle nároku 11 zinečnaté soli bacitracinu pro výrobu léčiva, které obsahuje zinečnatou sůl bacitracinu, mikrokrystalickou celulosu, polyvinylpyrrolidon a stearát hořečnatý.

13. Použití podle nároku 12 zinečnaté soli bacitracinu pro výrobu léčiva, které obsahuje:

a) od 150 do 250 mg mikrokrystalické celulosy,

b) od 10 do 40 mg polyvinylpyrrolidonu,

c) od 5 do 10 mg stearátu hořečnatého a

d) doplněk obsahující zinečnatou sůl bacitracinu.

Zastupuje: