

(19)



(10) **LT 3158 B**

(12)

## **PATENTO APRAŠYMAS**

---

(11) Patento numeris: **3158**

(51) Int.Cl.<sup>5</sup>: **A61K 37/02**

(21) Paraiškos numeris: **IP223**

(22) Paraiškos padavimo data: **1992 10 30**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1994 06 15**

(45) Patento paskelbimo data: **1995 01 31**

(31,32,33) Prioritetas: **07/785666, 1991 10 31, US**

(72) Išradėjas:

**Barry John Andrews, NO**  
**Bjarne Bjortvatn, NO**  
**Steinar Pedersen, NO**  
**Joergen Rikard Roennevig, NO**  
**Alexander Yule, GB**

(73) Patento savininkas:

**Apothekernes Laboratorium A. S., Harbitzalleen 3-5, N-0275 Oslo, NO**

(74) Patentinis patikėtinis:

**Liudmila Gerasimovič, 9, J.Basanavičiaus g. 16/5-41, 2009 Vilnius, LT**

---

(54) Pavadinimas:

**Priemonė pirmuonių sukeltai infekcijai paveikti**

(57) Referatas:

Pirmuonių sukeltos žmonių ir gyvulių infekcijos yra paveikiamos bacitracino divalenčio metalo druska. Kai kurie infekciniai agentai, jautrūs tam poveikiui, apima tokius žmogaus patogenus, kaip Entamoeba histolytica, Trichomonas vaginalis, Giardia lamblia, Cryptosporidium parvum, ir tokius gyvulių patogenus, kaip Tritrichomonas foetus ir Tritrichomonas gallinae.

Išradimas apima bacitracino dvivalenčių metalų druskų poveikį į kai kurių parazitinių bei laisvai gyvenančių pirmuonių sukeltas infekcijas.

5 Pirmuonys yra vienaląsčiai eukariotiniai mikroorganizmai, neturintys ląstelės sienelės. Dažniausiai jie bespalviai ir judrūs. Pirmuonys nuo bakterijų paprastai skiriasi savo didesne apimtimi ir eukariotine prigimtimi, nuo jūros dumblių - chlorofilo  
10 neturėjimu, nuo mielių bei kitų grybų - savo judrumu bei ląstelės sienelės neturėjimu, nuo gleivėtų pelėsių - vaisiakūnių neformavimu.

Paprastai pirmuonys maitinasi prarydami kitus  
15 organizmus bei organines medžiagas. Pirmuonys dažnai randami ir jūros vandenyse. Dauguma jų yra kitų gyvūnų parazitai, įskaitant žmones. Kai kurie pirmuonys randami dirvožemyje arba ore, pavyzdžiui, ant medžių paviršiaus.

20 Kaip būdinga organizmams, kurie "gaudo" savo maistą, dauguma pirmuonių yra judrūs. Jų judėjimo mechanizmai yra požymis, skirstant juos į dideles sistemines grupes. Pirmuonys, kurie juda amebiniais judesiais, yra  
25 priskiriami Sarcodina (bendrinis pavadinimas: amebos); tie, kurie juda žiuželių pagalba - Mastigophora (žiuželiniai); tie, kurie juda blakstienų pagalba - Ciliophora (blaksteliniai). Sporagyviai, ketvirta klasė, paprastai yra nejudrūs ir visi yra aukštesnių  
30 gyvūnų parazitai.

Tipiški Mastigophora grupės atstovai yra *Trypanosoma* (sąlygojanti afrikietiškąją miego ligą), *Giardia*, *Leishmania*, *Trichomonas* ir *Tritrichomonas*. Šios  
35 pirmuonių grupės nariai juda žiuželių pagalba.

Tarp sarkodinių yra tokie organizmai kaip *Amoeba* ir *Entamoeba*, kurie visada yra neizoliuoti vegetatyvinėje fazėje. *Entamoeba histolytica* yra tipiškas pavyzdys šios parazitinės formos.

5

Blaksteliniai pirmuonys yra tie pirmuonys, kurie tam tikrame savo gyvenimo etape įgyja blakstienas. Tipiški jų atstovai yra *Balantidium* ir *Paramecium*. *Balantidium coli* visų pirma yra naminių gyvūnų parazitas, bet retkarčiais jis infekuoja ir žmogaus žarnyną, sukeldamas žarnų simptomus, panašius į tuos, kuriuos sukelia *Entamoeba histolytica*.

10

Sporagyviai apima didelę pirmuonių grupę, kurios visi nariai yra obligatiniai parazitai. Tipiškas sporagyvių atstovas yra *Plasmodium* (maliarijos sukėlėjas), *Toxoplasma* ir *Cryptosporidium*.

15

Endoparazitų buveinės yra įvairios. Vieni jų yra viduląsteliniai, kaip, pavyzdžiui, stuburinių maliarijos parazitai. Kiti parazitai, kaip, pavyzdžiui, *Entamoeba histolytica* pakenkia audinius, o ne individualias ląsteles. Dauguma tripinosomų gyvena stuburinių šeimininkų kraujyje. Daugelis kitų parazitų gyvena virškinimo trakto kraujagyslių spindyje arba kartais bestuburių celominėse ertmėse, kur sudaro tikrus sambūrius.

20

25

Laisvai gyvenantys parazitiniai pirmuonys yra daugelio žmonių bei gyvūnų ligų ir infekcijų priežastis. Pavyzdžiui, pirmuonių parazitas *Entamoeba histolytica* yra aptiktas beveik pas 480 milijonų žmonių. Nėra žinomas gyvūnas - šeimininkas šiam parazitui. Nors didesnioji dalis *E. histolytica* infekcijų yra nepatogeninės kilmės, apie 36 milijonų atvejų tai baigiasi klinikine liga.

30

35

Didesnioji dalis *E. histolytica* infekcijos klinikinių atvejų pasireiškia amebinės dizenterijos forma. Ameba sąlygoja opas storajoje žarnoje. Tai iššaukia viduriavimą ir kraujavimą į kraujagyslių spindį.

5

*E. histolytica* klinikiniai požymiai dažniausiai apsiriboja storose žarnose. Be to, jei negydyti, kai kurios iš šių infekcijų gali baigtis storajo žarnyno prakiurimu, o ekstremaliomis sąlygomis - net mirtimi nuo peritonito.

10

Kitais *E. histolytica* infekcijų atvejais gali pasitaikyti parazito ekstra-žarnyninė invazija. Parazitas per kraują bei limfinę sistemą praeina į pilvo bei kitus organus, sudarydamas amebinius pūlinius. Esant ekstremaliomis sąlygomis, šios infekcijos taip pat gali baigtis rimta liga arba mirtim.

15

Metronidazolas tapo vaistu, pasirinktu gydyti *E. histolytica* infekciją nuo pirmo paskelbto pranešimo apie jo efektyvumą 1966 m. (Powel et al., Lancet 2, 1329-31 (1966)). Aštri diarėja bei kepenų abscesai, susiję su *E. histolytica* infekcija, gerai gydomi metranidazolu. Tačiau metranidazolas yra mažiau efektyvus nesimptominiiais atvejais (Spillman et al., Am. J. Trop. Med. Hyg. 25, 549-51 (1976)).

20

25

Apie *E. histolytica* infekcijų gydymo metranidazolu nesėkmę pranešė atskiri pacientai kartu su tarptautiniu skraidymo personalu. (Weber et al., Trans. Roy. Soc. Med. Hyg. 84, 803-5 (1990)).

30

Atsitiktinai parinktų penkiasdešimties Pietų Afrikos pacientų, sergančių amebine dizenterija, tyrimas parodė 55 % gydymo nesėkmę, esant aštriai ligai, naudojant standartinę metronidazolo terapiją 2.4 g/dienai, gydant

35

5 dienas (Jackson et al., Symposium on Amoebiasis, New Delhi, India (1990)).

Nors metronidazolas yra efektyvus gydant *E. histolytica* infekcijas, jis turi kai kurių nepageidaujamų pašalinių efektų. Pavyzdžiui, jo negalima naudoti nėščioms moterims, kurios yra padėtyje pirmus 3 mėnesius. Be to, metronidazolo naudingumas yra griežtai priklausomas nuo alkoholio metabolizmo išikišimo. Vaistai rodo mutageniškumą Ames teste (Vogd et al., Mutat. Res. 26, 483-90 (1974)). Dėl savo toksiškų pašalinių efektų metronidazolas buvo kovalentiškai sujungtas su kvarco dalelytėmis, kad panaikintų vaistų absorbciją, gydant amebinę žarnų dizenteriją. Nors trumpas metronidazolo vartojimo periodas yra reliatyviai saugus, yra stebimi žiurkių sėklidžių atrofijos, judesių koordinacijos sutrikimo bei polineuropatijos reiškiniai. Taip pat yra pastebėta metalo skonis, galvos skausmai ir periferinė neuropatija.

Kadangi problemos surištos su metronidazolo naudojimu, yra būtini alternatyviniai pirmuonių infekcijų paveikimo būdai.

Antibiotinis bacitracinas parodė ribotą pajėgumą, užmušant abi - patogeninę ir nepatogeninę - amebinės žarnų infekcijos formas (Most et al., Am. J. Trop. Med. 30, 491-497 (1950)). Pavyzdžiui stebint 51 pacientą, parazitologinis pasveikimas gautas 66 % atvejų, skiriant preparatą 10-20 dienų ir naudojant 40,000 - 160,000 vienetų dozę. Terapijos pratęsimas daugiau 10 dienų arba dozės padidinimas iki beveik 80,000 vienetų žymiai nepadidino pasveikimo galimybės už 66 % ribos. Nežymus bacitracino efektyvumas amebinės dizenterijos atžvilgiu neleido šio vaisto toliau panaudoti kaip priemonės prieš *E. histolytica* amebinę dizenteriją.

Kitas dažnai pasitaikęs pirmuonių sąlygojamas susirgimas yra jaučių trichomonozė. Jaučių trichomonozė yra lytiniu keliu perduodamas susirgimas, sąlygojamas žiuželinių *Tritrichomonas foetus* pirmuonių. *T. foetus* infekcija visais atžvilgiais duoda didžiulius ekonomikos nuostolius tose galvijų auginimo pasaulio zonose, kur yra išplitęs natūralus gyvulių auginimas.

*T. foetus* infekcija yra pripažinta kaip svarbi gyvulių nevaisingumo priežastis. Ši infekcija liečia kiekvieną gamintojo pajamų komponentą. Būdinga, kad ji mažina abu - bendrą apsiveršiausių gyvulių skaičių ir žinduklių auginimo periodą. Be to, *T. foetus* infekcija sąlygoja vėlesnę galvijų reprodukciją sezono metu, tuo būdu duoda mažesnio svorio jauniklius, kurie yra nevienodi savo amžiumi ir svoriu. Esant šioms sąlygoms, abejotina, kad jaunikliai gali būti realizuojami savo pilna pardavimo kaina. Be to, padidėję maitinimo, gydymo, brokavimo ir veislės atstatymo išlaidos sąlygoja nuostolį. Nuostolis, kokį turės JAV skerdienos pramonė 1992 m. dėl *T. foetus* infekcijų, sudarys apie 500 milijonų JAV dolerių.

*T. foetus* perdavimas beveik išimtinai vyksta lytiniu keliu. Šio tipo infekcija apsiriboja dauginimosi organais, pasirinkdama jaučių prepucialinę ertmę ir šlapimkanalio angą. Dažniausiai bulių *T. foetus* infekcijos paplitimas su amžiumi didėja ir yra laikytinas pagilėjusios ertmės prepucialiniame epitelyje priežastimi pas vyresnio amžiaus jaučius.

Buvo pasiūlytos įvairios vietinės priemonės prieš *T. foetus* sukeltą jaučių infekciją. Tokių priemonių pavyzdžiai susideda iš akriflavino balzamo, chloroheksidino ir metronidazolo. Dažniausiai šios priemonės yra tikrai nežymiai efektyvios.

Kai kurių 5-nitroimidazolo junginių terapinė vertė yra nustatyta, juos naudojant prieš *T. foetus* infekciją. Daugkartinių oralinių dimetridazolo dozių vartojimas patvirtino jų vidutinį efektyvumą, tuo tarpu jos gali sąlygoti nepageidaujamus pašalinius efektus, kaip, pavyzdžiui, skrandžio stazę ir apetito nebuvimą. Atskiras intraveninis dimetridazolo įvedimas taip pat patvirtino vidutinį efektyvumą. Be to, tai taip pat gali iššaukti nepageidaujamus pašalinius efektus, tokius, kaip kvėpavimo apsunkinimas, judesių koordinacijos sutrikimas ir plaučių kolapsas.

Nors 5-nitroimidazolo junginių poveikis į *T. foetus* infekciją gali būti vidutinio efektyvumo, jis yra pernelyg brangus. Pavyzdžiui, 1991 m. kiekvieno oralinio vaistų davimo kaina buvo apytiksliai 100.00 JAV dolerių 1 buliui, o intraraumeninio įvedimo - 50.00 JAV dolerių 1 buliui. Be to, 5-nitroimidazolo junginių naudojimas nėra aprobuotas JAV Maisto ir vaistų ministerijoje. Vienas toks junginys, ipronidazolas, yra įtariamas kaip kancerogenas.

Kaip galima matyti, jaučių trichomonozės kontrolė sudaro didžiulę problemą net, palyginti, gerai sutvarkytame JAV jaučių bandų ūkyje. Ši problema taip išaugo, kad jungtinės specialios paskirties pajėgos, tokios, kaip Kalifornijos Gyvulių augintojų asociacija, JAV Gyvūnų sveikatos asociacija bei Naminių gyvulių ligų tyrimo laboratorija, paskelbė jaučių trichomonozės tyrimus kaip turinčius aukščiausią prioritetą.

Kiti laisvai gyvenančių bei parazituojančių pirmuonių, kurie infekuoja žmones bei gyvūnus, pavyzdžiai apima be apribojimų *Trichomonas vaginalis*, *Tritrichomonas gallinae*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium sp.* ir *Plasmodium sp.* Šie ir kiti pirmuonys yra žinomi kaip sekančių ligų priežastys:

trichomonozių, lambliozių, kryptosporodiozių, maliarijos, babeziozių, teileriozių, toksoplazmozių bei leišmaniozės, pridedant visas kitas žarnyno bei sisteminės pirmuonių infekcijas.

5

Būtina rasti efektyvią priemonę prieš laisvai gyvenančių bei parazitinių pirmuonių žmonėms ir gyvūnams sukeltas infekcijas. Tokia priemonė negali turėti ne tik žalingo pašalinio metronidazolo poveikio, bet taip pat turi būti efektyvesnė už bacitraciną.

10

Pateikta žmonių bei gyvulių infekcijų, sukeltų laisvai gyvenančių bei parazitinių pirmuonių, poveikio priemonė. Šios priemonės esmė - efektyvaus bacitracino dvivalenčio metalo druskos kiekio skyrimas infekuotam žmogui ar gyvuliui.

15

Išradimas taip pat susietas su tokių bacitracino druskų panaudojimu preparatų gamybai, kurie yra naudingi žmonių bei gyvulių infekcijoms, sukeltoms laisvai gyvenančių bei parazitinių pirmuonių, paveikti.

20

Mes nustatėme, kad, įvedus bacitracino dvivalenčių metalų druskas į infekuotus laisvai gyvenančiais bei parazitininiais pirmuonimis žmones bei gyvūnus, daugeliu atveju bacitracino druskos yra efektyvesnės už nekompleksinę bacitraciną.

25

Kaip čia panaudota, terminas "bacitracinas" nurodo į visas įvairias bacitracino formas ir iš to gaunamus bet kokius mišinius. Tai apima, be apribojimų, bacitraciną A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> ir C<sub>3</sub>.

30

Kaip čia panaudota, terminas "bacitracino dvivalenčių metalų druskos" ir "bacitracino druskos" yra panaudoti pasikeistinais ir remiasi įvairiomis bacitracino formomis bei jo mišiniais, kuris sudaro kompleksus su

35



dvivalenčio metalo jonu. Dvivalenčių metalų jonų, kurie gali sudaryti kompleksus su bacitracinu, duodami bacitracino druską su esamu išradimu, pavyzdžiai apima, be apribojimų,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  ir  $\text{Zn}^{2+}$ .

5

Komercinis bacitracinas yra mišinys keleto skirtingų bacitracinų, kurie vienas nuo kito skiriasi amino rūgščių sąstatu. Tipiškas komercinis mišinys susideda iš sekančių aktyvių bacitracino formų (sv. %):

10 bacitracino A (54.0), bacitracino  $B_1$  (14.0), Bacitracino  $B_2$  (12.0), bacitracino  $B_3$  (11.0) ir kitų bacitracinų (9.0). Kaip parodė branduolinis magnetinis rezonansas, dominuojanti bacitracino A ( $\text{C}_{66}\text{H}_{103}\text{N}_{17}\text{O}_{16}\text{S}$ ) forma sudaro su dvivalenčiu metalo jonu ( $\text{Zn}^{2+}$ )

15 kompleksą, sąveikaudamas per 4 peptido grupes. Tos grupės yra sekančios: (a) tiazolo žiedas tarp  $\text{Ile}_1$  ir  $\text{Cys}_2$ ; (b) karboksilinė grupė iš  $\text{Glu}_4$ ; (c)  $\text{His}_{10}$  imidazolo žiedas ir (d)  $\text{Ile}_1$  amino grupė. Komplekso susidarymo metu atsilaisvina du protonai. Atitinkamai,

20 bacitracino dvivalenčių metalų druskų empirinė formulė skiriasi nuo bacitracino A formulės. Amino rūgščių liekanų, dalyvaujančių ryšyje su metalo jonais, pKa, taip pat ryšiui artimų liekanų pKa yra sumažėjęs. Aplamai, visaapimanti metalo jono ryšio pasekmė yra

25 molekulė, kuri yra labiau neutrali.

Nesant dvivalenčio metalo jonui, bacitracinas A turi aromatinių liekanų hidrofobinį centrą ir pakankamai hidrofilinę išorę. Tai nulemia bacitracino A platų

30 tirpumą poliariniuose tirpikliuose. Nežiūrint to, sudarant kompleksą su dvivalenčio metalo jonu, elektrostatinės sąveikos sąlygoja peptido susisukimą spirale apie metalo atomą. Tai invertuoja hidrofilinių bei hidrofobinių liekanų pasiskirstymą. Atitinkamai,

35 metalo kompleksas rodo žemą tirpumą vandenyje bei padidėjusį giminingumą hidrofobinėms struktūroms, tokioms, kaip membranos.

Padidėjusi hidrofobinė bacitracino druskų sandara didina jų įėjimo į membranos sienelę tendenciją. Todėl šios druskos turi stipresnį antimikrobinį aktyvumą, lyginant su jų nekompleksiniu antrininku.

5

Bacitracino A branduolinio magnetinio rezonanso tyrimai parodė, kad jis tirpale yra struktūriškai nestabilus. Ši molekulė turi lanksčią struktūrą, susidedančią iš skirtingų konformacijų serijų, kurios labai greitai interkonvertuoja. Iš kitos pusės, cinko bacitracino panašūs tyrimai parodė, jog jis turi žymiai stabilesnę struktūrą. Jis yra mažiau struktūriškai lankstus negu bacitracinas A. Tai priklauso nuo komplekso su divalenčio metalo jonu sudarymo.

15

Bacitracinas A bei jo divalenčių metalų druskos taip pat skiriasi savo atitinkamu cheminiu stabilumu. Pavyzdžiui, nekompleksinis bacitracinas A yra objektas, kurį galima oksiduoti ir paversti į bacitraciną F, turintį mažą antimikrobinį aktyvumą. Iš kitos pusės, cinko bacitracinas priešinas oksidacijai (Foreyshov, "The Bacitracins: Properties, Biosynthesis, and Fermentation, In: Biotechnology of Industrial Antibiotics (Vandamme, E. J., ed.) Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., p. 665-694 (1984)).

25

Be to, N-terminalinės amino rūgšties liekanos (Ile<sub>1</sub>) ryšys su cinku taip pat trukdo dezamininimui. Branduolinio magnetinio rezonanso tyrimai patvirtino Zn<sup>2+</sup> ryšį su bacitracino Ile<sub>1</sub> liekana.

30

Reziumuojant, šie branduolinio magnetinio rezonanso tyrimai parodo, kad bacitracinas A ir cinko bacitracinas skiriasi vienas nuo kito struktūra, forma, chemija.

35

- Yra parodytas bacitracino, kaip antibakterinio agento efektyvumas. Taigi, iki šiol buvo bendrai žiūrima, kad bacitracino veikimas į pirmuonis (pav., *E. histolytica*) buvo priklausomas nuo žarnyno bakterijų, kuriomis minta
- 5 ameba, vaistų sumažinimo. Tačiau eksperimentuojant, mes patvirtinome Gillin ir Diamond tyrimus (J. Antimicrob. Chemother. 8, 305-16 (1981)), kad bacitracinas yra tiesiogiai aktyvus prieš parazitinius pirmuonis, net ir nesant bakterijų. Taip pat eksperimentų metu mes
- 10 pirmiausia parodėme, kad dauguma bacitracino dvivalenčių metalų druskų yra mažiausiai vienu eilės dydžiu aktyvesnės prieš pirmuonis, lyginant su nekompleksiniu bacitracinu.
- 15 Cinko bacitracinas yra labiausiai tinkama bacitracino druska, naudojama kaip priemonė prieš pirmuonių infekciją. Skirtingai nuo metronidazolo, dabartinė pasirinkta priemonė prieš *E. histolytica* infekciją - cinko bacitracinas yra nemutageniškas, kaip parodyta
- 20 serijoje ankstesnių tyrimų. Cinko bacitracinas neturi mutageninio poveikio *Salmonella typhimurium* histidino auktotrofuose, nesant ir esant žiurkės kepenis aktyvuojančiai sistemai. Kituose tyrimuose cinko bacitracinas sukelia nežymų padidėjimą TK geno lokuso
- 25 mutacinių dažnių pelių limfinių ląstelių mutacijos sistemoje su ar be aktyvavimo. Bet kaip parodyta kituose tyrimuose cinko bacitracinas neindukuoja jokio nuostolio žmogaus periferinių limfocitų chromosominėje struktūroje, kaip tik aukštose konferencijose stebimas
- 30 žymus ląstelių dalijimosi sumažėjimas. *In vivo* tyrimuose apyštris oralinis cinko bacitracino davimas žiurkėms 5 dienas dozėmis 10, 50 ir 250 mg/kg gyvo svorio, ekvivalentiškai maisto davimo koncentracijoms 100, 500 ir 2500 mg/kg, sąlygoja nežymius nuostolius
- 35 žiurkių kaulų smegenų ląstelių chromosomų struktūroje. Pagaliau cinko bacitracinas turi nežymų poveikį į pusiau konservatyvinės DNR sintezę, neplaninės DNR

sintezę (reparacinę DNR) ir nukleotidų sedimentaciją sacharozės gradientu ("supersusukta" DNR), išskirtas iš žiurkės, maitintos 8.3 ir 41 mg/kg (gyvo svorio) cinko bacitracinu dienai, kas atitinka maisto davinio koncentraciją 136 ir 833 mg/kg 7 dienom, blužnies ląstelių. Tik nedidelis sumažėjimas nukleotidų sedimentacijos greityje yra pastebėtas po 24 valandų inkubacijos prie aukštesnio vaistų davimo lygio.

10 Kadangi cinko bacitracinas nėra absorbuojamas iš žarnyno, jo oralinis toksiškumas yra pakankamai žemas. Buvo parodytas jo netoksiškumas abiejuose subchroniškuose ir chroniškuose toksiškumo tyrimuose, tiriant žiurkės, esant maitinimo lygiui iki 1.000 m.d. kuris  
15 yra pilnai efektyvi koncentracija, reikalinga *E. histolytica* infekcijos paveikimui. Gyvūnai toleruoja visas dozes be matomų žalingų pasekmių. Patikrintų kai kurių gyvūnų kepenyse neaptikta cinko bacitracino. Gyvūnų, kurie mirė tyrimo metu, lavonų skrodimai  
20 parodė, jog ne nuo vaistų poveikio ištiko mirtis.

Bacitracino druskos gali būti suderinamos su įprastiniais farmacijoje naudojamais užpildais, sutinkamai su bendrai priimta farmacijos technika. Užpildai gali  
25 įgauti įvairias formas. Pavyzdžiui, kietoms oralinių dozių formoms, užpildais gali būti krakmolai, cukrūs, skiedikliai, granuliuojantys agentai, tepalai, rišlios medžiagos, dezintegruojantys agentai ir į juos panašios medžiagos. Be to, dozės gali būti miltelių, kapsulių ar  
30 tablečių pavidale. Kontroluojamos išsiskiriančios formos gali būti taip pat panaudotos. Tabletės bei kapsulės dėl savo patogumo skiriant vaistus pateikiamos kaip labiausiai naudinga oralinės dozės vieneto forma. Jei pageidaujama, tabletės gali būti padengtos cukrumi  
35 arba enterosoliubizuotu apvalkalu, sutinkamai su standartine technika.

Sutinkamai su viena pageidautina išraiška, cinko bacitracinas skiriamas kaip tabletė, kurioje pagrindinis tabletės agentas yra celiuliozė, ypač mikrokristalinė celiuliozė.

5

Tinkamiausia tabletės forma turi sekančią sudėtį:

Cinko bacitracinas

(nesterilus) išsk. sv. 380 mg (25,000 T. V.)

Mikrokristalinė

celiuliozė 150-250 mg

Polivinilpirolidonas,

skersai sujungtas 10-40 mg

Magnio stearatas 5-10 mg

---

Tabletės svoris 545-680 mg

10 Charakteringa, jog cinko bacitracinas turi apie 5 svorio % cinko. Galia, nustatyta kaip antimikrobinis aktyvumas prieš jautrų *Micrococcus luteus* štamą, svyruoja tarp 65-70 TV/mg.

15 Išbandant šį išradimą, šiuo metu tinkamiausia priemonė prieš *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* ir *Cryptosporidia sp.* sukeltas infekcijas yra oraliniu būdu tabletėmis skiriama bacitracino druska. Vienas pavyzdys atitinkamos tabletės yra pateiktas aukščiau.

20 Taikant priemonę prieš *Tritrichomonas foetus* infekciją, sutinkamai su šiuo išradimu, šiuo metu pirmenybė atiduodama pateikti bacitracino druską emulsijos, putų ar tepalo nešėjo pavidalu. Nešėjas turi sugebėti išnešioti efektyvią dozę į jaučio lytinio organo ertmę ir turėti pakankamą klampumą, kad prisitvirtintų prie gyvūno lytinio organo ir prepuliacinės ertmės. Jis turi būti pakankamai skystas, kad būtų išnešiojamas, esant žemam slėgimui. Emulsija,

25

besiplečiančios putos ir/arba tepalas turės pageidaujamas savybes.

Nors abi - aliejaus vandenyje ar vandens aliejuje -  
 5 emulsijos gali būti naudojamos, pirmenybė atiduodama  
 pastarajai dėl jos aukštesnio klampumo. Aliejaus  
 vandenyje emulsijos gali būti paruoštos iš mineralinių,  
 augalinių bei gyvulinių aliejų, stabilizuotų vandens  
 fazėje lašelių pavidalu, emulgatorių, tokių kaip natrio  
 10 stearatas, trietanolamino stearatas bei natrio  
 stearilsulfatas, pagalba, juos naudojant iki 1%  
 koncentracijos. Emulgatorius gali taip pat turėti vieną  
 iš polisorbato, kurie yra polioksietileno riebiųjų  
 rūgščių eteriai. Ypač emulgatoriui gali būti naudingas  
 15 polioksietileno (20) sorbitanmonooleatas, bendrai  
 daugiau žinomas kaip polisorbato 80.

Vandens aliejuje emulsijos gali būti paruoštos iš  
 mineralinių, augalinių bei gyvulinių aliejų, kur  
 20 vandens fazė yra stabilizuota kaip lašeliai aliejaus  
 fazėje, naudojant tokius emulgatorius, kaip lecitinas,  
 stearilo alkoholiai, cholesterolinas ir sorbitas  
 koncentracijose iki 5%. Emulgatoriui gali būti naudinga  
 taip pat turėti vieną iš sorbito anhidrido riebiųjų  
 25 rūgščių nepilną eterį, kaip pvz., sorbito monooleatą.

Abejos - vandeninės ir nevandeninės putos - gali būti  
 panaudotos vietiniam bacitracino druskų išnešiojimui.  
 Šios dvi putos turi šiek tiek skirtingas savybes  
 30 tūrio padidėjimo, sukibimo paviršiaus ir reaktyvumo  
 tarp bacitracino divalenčių metalų druskų atžvilgiu.  
 Nevandeninės putos tipiškai yra paruošiamos iš  
 polialkoholių, tokių kaip glikolis ar glicerinas, ir  
 stabilizuojamos emulgatoriais, tokiais, kaip  
 35 emulguojantys vaškai, gauti iš Croda, Inc. su firmos  
 ženklu Polawax<sup>o</sup> arba bet kokiais aukštesniųjų  
 alifatinių alkoholių polioksietileno eteriais, gautais

iš ICI Americas, Inc. su firmos ženklu Brij°. Izobutanas ar kitos polialkoholyje tirpios dujos gali būti panaudotos kaip nešėjai. Vandeninės putos gali būti paruošiamos sumaišant polialkoholius (propileno glikolį, gliceriną ir t.t.) ir vandenį bei stabilizuojant tokiais emulgatoriais, kaip "Softigen", gautu iš Hüls AG, Polawax° ir/arba "Montawax".

Sutinkamai su dar kita išraiška, nešėjas gali susidaryti iš tepalo, paruošto iš aliejaus bei vašku mišinio ir kiekybiškai išbalansuoto, kad būtų galima gauti pageidaujamas fizikines, chemines ir mechanines savybes.

Šių bacitracino formuluočių, taikomų prieš *T. foetus* infekcijas, tiekimas gali būti įgyvendintas tokių agentų pagalba, kaip suspaustas oras ar inertinės dujos. Suspaustas oras ar dujos išneš formuluotes pro aplikatorių, įstatytą į gyvulio prepuliacinę ertmę. Alternatyviai galima panaudoti švirkštą.

Daugumos jaučių trichomonozių infekcijų atvejų išnešimo tūris svyruoja 50-100 ml ribose, kas turi užtikrinti viso paviršiaus ploto apribojimą. Apdorojimo metu pageidautina aplikatorių sukinėti prepuliacinės ertmės viduje.

Taikant bacitracino druskos formuluotę prieš žmogaus parazitą *Trichomonas vaginalis*, tinkamiausia ją pateikti suformuoto supozitorijaus formoje.

Naudojant bacitracino druskas prieš *Cryptosporidia sp.* infekciją, šiuo metu tinkamiausias jų skyrimo būdas yra toks pats, kaip ir *E. histolytica* atveju, t.y., oraliniu būdu duodama tabletė. Tačiau veikimo prieš *Cryptosporidia sp.* infekcijas dozė bendrai gali

svyruoti nuo 0.5 iki 5 gramų per dieną. Be to gali būti būtina tęsti skyrimą ilgiau 20 dienų.

Naudojant bacitracino druską prieš vištinių paukščių  
5 (t.y. paukščių, turinčių gurklius) *Tritrichomonas gallinae* infekcijas, šiuo metu tinkamiausia skirti bacitracino druską su paukščių lesalu. Vaistai turi būti duodami tokiu būdu, kad jie galėtų susilaikyti gurklyje. Aplanai, pageidautina dozė turi būti nuo 100  
10 iki 500 gramų bacitracino druskos 1 tonai paukščių lesalo.

Kad pasiekti individualios pirmuonių infekcijos sumažėjimą, sutinkamai su išradimu, bacitracino  
15 dvivalenčių metodų druskos gali būti skiriamos bet kokiais kiekiais. Tie kiekiai gali būti įvairūs, dalinai priklausomi nuo ligos sunkumo bei paciento svorio ir/ar skyrimas yra profilaktinis ar terapinis. Dėl žemo bacitracino dvivalenčių metalų druskų, tokių,  
20 kaip cinko bacitracinas, toksiškumo, duodant oraliniu būdu, yra patartinas jų profilaktinis panaudojimas pirmuonių lokalizavimosi vietose.

Šio reikalo specialistai gali nustatyti tinkamą dienos  
25 dozę bei veikimo režimą, atsižvelgiant į specifines aplinkybes. Aplanai, bacitracino druskos oralinė dozė žmogui turi būti nuo 0.5 iki 5.0 gramų dienai, pageidautina nuo 1.0 iki 3.0 gramų per dieną. Bendrai veikimas turi tęstis nuo 3 iki 10 dienų. Didesni ar  
30 mažesni vaistų kiekiai bei veikimo intervalai gali būti naudojami, kaip bus laikoma reikalinga. Pavyzdžiui, sutinkamai su klinikinių tyrimų rezultatais, pateiktais žemiau, 1.5 gramo cinko bacitracino dozė dienai, esant kursui nuo 3 iki 5 dienų, įrodo žmogaus *E. histolytica*  
35 sukeltos infekcijos, esančios įvairiose stadijose, efektyvų išnaikinimą.



Sutinkamai su šiuo išradimu kaip priemonė prieš infekuotus žmones bei gyvulius laisvai gyvenančiais bei parazitiniiais pirmuonimis gali būti naudojamos bacitracino dvivalenčių metalų druskos. Tokie pavyzdžiai, be apribojimų, apima *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis*, *Tritrichomonas foetus*, *Tritrichomonas gallinae*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium sp.* ir *Plasmodium sp.* Šie bei kiti pirmuonių organizmai sukelia tokius susirgimus, kaip amebinė dizenterija, jaučių trichomonozė, babeziozė, teileriozė, toksoplazmozė, leišmaniozė, lambliozė, kryptosporodiozė ir visos maliarijos formos (žmogaus ir veterinarinės), bet kuriems iš šių susirgimų gali būti taikoma išrastoji priemonė.

Sekantys pavyzdžiai nurodo į bacitracino dvivalenčių metalų druskų taikymą prieš pirmuonių sukeltas infekcijas ir lygina kai kurių pirmuonių jautrumą bacitracino druskoms bei bacitracinui.

Reikia pažymėti, kad pavyzdžiai ketina parodyti išradimo atrinktas išraiškas ir nėra jokių būdų skirti apriboti jo apimtį.

1 Pavyzdys

#### ***Entamoeba histolytica* analizės rezultatai**

Šis *in vitro* tyrimas parodo, kad cinko bacitracinas yra daug kartų aktyvesnis prieš *E. histolytica* negu bacitracinas.

#### **Nesterilios kultūros tyrimas**

*E. histolytica* izoliatai, atstovaujantys tris skirtingus žimodimus (I, II ar XIV), buvo išskirti iš eilės geografinių vietovių. Pacientai, iš kurių

5 izoliatai buvo gauti, buvo arba patogeniški (pav., turėjo dizenteriją) arba nepatogeniški (pav., turėjo infekcijos nedizenterinę stadiją, charakterizuojama cistų bei trofozیتų perdavimu). Sekanti lentelė identifikuoja *E. histolytica* izoliatus pagal aukščiau išdėstytus kriterijus:

**1 Lentelė**

10 *Entamoeba histolytica* izoliatų identifikavimas

| Izoliatas | Šalis     | Patogeniškas/nepatoge<br>niškas | Zimodimas       |
|-----------|-----------|---------------------------------|-----------------|
| T2k       | AFRIKA    | NP <sup>1</sup>                 | ND <sup>3</sup> |
| T4        | AFRIKA    | NP                              | I               |
| T6        | AFRIKA    | NP                              | I               |
| 418       | INDIJA    | NP                              | I               |
| 70k       | NORVEGIJA | NP                              | I               |
| 116k      | NORVEGIJA | NP                              | I               |
| AiDO      | AFRIKA    | NP                              | I               |
| 1         | NORVEGIJA | NP                              | I               |
| OMak      | NORVEGIJA | NP                              | I               |
| MS        | AFRIKA    | NP                              | I               |
| BiLO      | AFRIKA    | NP                              | I               |
| GS        | AFRIKA    | NP                              | I               |
| URU1      | AFRIKA    | NP                              | I               |
| URU19     | AFRIKA    | NP                              | I               |
| SI        | ANGLIJA   | P <sup>2</sup>                  | II              |
| 1246      | ANGLIJA   | P                               | II              |
| DA        | AFRIKA    | P                               | II              |
| DOGO      | AFRIKA    | P                               | II              |
| Sh2       | INDIJA    | P                               | XIV             |
| C1        | INDIJA    | P                               | XIV             |
| C2        | INDIJA    | P                               | XIV             |

<sup>1</sup> Išskirta iš paciento, perduodančio cistas ar trofozitus, bet nesergančio dizenterija.

<sup>2</sup> Išskirta iš sergančio dizenterija paciento.

<sup>3</sup> Zimodimas nenustatytas.

Kiekvienas izoliatas buvo nesterili kultūra, t.y., be *E. histolytica* amebų ji turėjo normaliai pas pacientą pasitaikančią fekalinę mikroflorą. Kultūros buvo palaikomos pagal Robinson metodą (Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 62, 285-94, (1968)). Bacitracinas (70 TV/mg) ir jo cinko druska (65 TV/mg) buvo gauti iš Apothekernes Laboratorium A.S (Oslo, Norvegija). Laikantis mikrotitro testo standartizacijos ir pagalbinio vaistų testavimo (duomenys nepateikti), yra nustatyta sekanti analizės procedūra. Bacitracinas buvo aptiktas, esant koncentracijai diapazone 20.0-0.625 mg/ml, atlikus dvigubą skiedimą. 30 mg/ml bacitracino koncentracija taip pat buvo tyrinėta. Cinko bacitracinas buvo aptiktas prie koncentracijų diapazono 10.0-0.156 mg/ml, atliekant dvigubą skiedimą. Likę šaltiniai dalyvavo kaip kontroliniai. Pradinis bazinis 75 mg/ml koncentracijos bacitracino tirpalas buvo ruošiamas krakmolo neturinčioje Robinson terpėje (KNRT). Sekant pirmos pasėjamosios kiuvetėje užnešimu, bazinis tirpalas buvo skiedžiamas KNRT pagalba iki 50 mg/ml koncentracijos, kuri buvo naudojama ruošiant likusias koncentracijas. Cinko bacitracinas buvo tirpinamas iki 250 mg/ml koncentracijos parūgštintame destiliuotame vandenyje (60 µl konc. HCl/ml destiliuoto vandens) ir vėliau lašinamas į 9 ml KNRT (25 mg/ml). 100 µl abiejų vaistų tūriai tada buvo dvigubai praskiesti KNRT-ėje, kad būtų galima paruošti reikalingų galutinių koncentracijų 2.5X koncentratų mikrotitro lėkštelėse. 50 µl 25 mg % krakmolo (BDH) tirpalo (KNRT-ėje) tada buvo pridėdama į kiekvieną kiuvetę. 16-18 valandų prieš reikalingą 48 valandų kultivavimo periodą amebų izoliatai buvo perkelti į švarius mėgintuvėlius, turinčius Robinsono terpę, laisvą nuo krakmolo. Kultivavimo periodo pabaigoje amebos buvo perkeltos mažame terpės tūryje ir vėl suspenduotos mažiausiai 20-yje KNRT tūrių. Suspensijos buvo centrifuguojamos 5 min. prie 1000 rpm, prieš tai

resuspendavus šviežioje terpėje ir suskaičiavus modifikuotoje Neubauer kameroje. Amėbos buvo centrifuguojamos kaip anksčiau ir nuosėdos resuspenduojamos iki  $2.5 \times 10^4$  /ml koncentracijos KNRT. 100  $\mu$ l kiekiai tada  
5 buvo pipete lašinami į atitinkamas kiuvetes, kad galima būtų paruošti dviem egzemplioriais kiekvieno izoliato kultūros kiekvienai tiriamai koncentracijai. Tada lėkštelės buvo patalpintos į anaerobinę kamerą (HP11, Oxoid) 24 valandoms prie 37°C. Nors ši procedūra  
10 užtikrino amėboms pakankamą krakmolo kiekį, koncentracija buvo tokia, kad 24-ą valandą lėkštelės buvo lengvai studijuojamos ir kiekybiškai įvertinamos tiesioginiu stebėjimu, naudojant invertinį mikroskopą. Gyvybingumas buvo įvertintas pridėjus Trypan mėlynojo  
15 iki galutinės 0.1% koncentracijos.

2 Lentelė (bacitracinas) ir 3 Lentelė (cinko bacitracinas) pateikia *E. histolytica* izoliatų 21 nesterilios kultūros trijų tyrimų rezultatus. Kiekvieno  
20 šių tyrimų parodymai buvo surinkti ir saugomi iki tol, kol visi trys eksperimentai buvo baigti, kad sumažinti bet kokius nukrypimus vėlesniuose aiškinimuose. Minimalios inhibitorinės ir minimalios letalinės koncentracijos yra gautos mg/ml.

25

## 2 Lentelė

5 Bacitracino minimali inhibitorinė koncentracija (MIK)  
ir minimali letalinė koncentracija (MLK) *Entamoeba*  
*histolytica* nesteriliose kultūrose

| Izoliatas | 1 eksperimentas |      | 2 eksperimentas |      | 3 eksperimentas |      |
|-----------|-----------------|------|-----------------|------|-----------------|------|
|           | MIK             | MLK  | MIK             | MLK  | MIK             | MLK  |
| 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 |
| DA        | 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             | 30.0 |
| C1        | 10.0            | 30.0 | 5.0             | 20.0 | 1.25            | 20.0 |
| C2        | 2.5             | 30.0 | 5.0             | 20.0 | 2.5             | 30.0 |

## 3 Lentelė

Cinko bacitracino minimali inhibitorinė koncentracija (MIK) ir minimali letalinė koncentracija (MLK) *Entamoeba histolytica* nesteriliose kultūrose

| Izoliatas | 1 eksperimentas |     | 2 eksperimentas |      | 3 eksperimentas |      |
|-----------|-----------------|-----|-----------------|------|-----------------|------|
|           | MIK             | MLK | MIK             | MLK  | MIK             | MLK  |
| 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 |
| DA        | 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  |

Nežiūrint to, kad bacitracinu apdorotų kultūrų MIK kito ribose (0.63-10.0 mg/ml), pereinant nuo vieno izolianto prie kito ir nuo vieno tyrimų prie kitų, MLK buvo lengvai atgaminamos (20-30 mg/ml). Kultūros su 30 mg/ml MLK bendrai atstovauja tik tai keletą gyvų prie 20 mg/ml koncentracijos parazitų. Kaip kontrastas, cinko bacitracinu paveiktos kultūros yra labiau jautrios ir

atstatomos, turinčios MIK 0.16-1.25 mg/ml ribose ir MLK - 1.25-5.0 mg/ml ribose. Tačiau precipitacija įvyksta, esant 5 mg/ml ir aukštesnei cinko bacitracino koncentracijai.

5

Taip kaip 2 ir 3 Lentelių duomenys rėmėsi vaistų dvigubais skiedimais, mes tyrėme *E. histolytica* jautrumą virš siauresnio vaistų koncentracijos diapazono. Vieno tyrimo rezultatai yra pateikti 4

10 Lentelėje. Du kiti izoliatai dalyvavo tame pačiame bandyme, bet buvo atmesti kaip sąlygojantys blogas kontroles. Minimalios letalinės koncentracijos buvo gautos mg/ml.

#### 15 4 Lentelė

Bacitracino ir cinko bacitracino minimalios letalinės koncentracijos *Entamoeba histolytica* nesteriliose kultūrose

20

|              | Bacitracino MLK | Cinko bacitracino MLK |
|--------------|-----------------|-----------------------|
| Izoliatas 1  | 21              | 1.6                   |
| Izoliatas C1 | 24              | 1.4                   |

Kaip galima matyti iš 4 Lentelės duomenų, nesterilioje kultūroje cinko bacitracinas buvo apie trylika kartų aktyvesnis negu bacitracinas.

25

## II Pavyzdys

### *Entamoeba histolytica* analizės rezultatai

30 Šie tyrimai rodo, kad cinko bacitracinas žudo *E. histolytica* savo tiesioginiu toksiniu poveikiu į amebas, iki tam tikro laipsnio paprastai naikindamas žarnyno bakterijas, kuriomis organizmas maitinasi.

**Grynos kultūros tyrimas**

Grynos kultūros yra amebų izoliatai, kurie adaptuoti augti, nesant bakterijų, pav., jos apima sterilias kultūras. *E. histolytica* grynos kultūros (NIH: 200) buvo palaikomos sutinkamai su Diamond metodu (J. Parasitol. 54, 1047-56 (1968)) TP-S-1 terpėje, modifikuotoje pakeičiant 2.5% NCTC 135 vitamino tirpalą. Mėgintuvėliai (10 ml, lygiais kraštais) pripildyti su  $2 \times 10^5$  amebomis ir patalpinti 1 valandai į inkubatorių prie 37°C, prieš tai pridėjus 1 ml 10X bazinio vaistų tirpalo (bacitracino ar cinko bacitracino). Amebos buvo perkeltos į atšaldytus prie 4°C mėgintuvėlius 20 min., patalpinant juos ledo vonioje, prieš tai nucentrifugavus prie 1,000 rpm ir 4°C 8 min. Mėginiai buvo išlaikomi virš 36-48 valandų, skirtingai negu nesterilioms kultūroms naudojamas 24 valandų periodas, ryšium su daugiau ištestu sterilių kultūrų dalijimosi laiku. Visi bandymai buvo atlikti tris kartus.

Visos amebos buvo sunaikintos per 48 valandas, esant 20 mg/ml bacitracino koncentracijai. Ląstelių skaičiaus sumažėjimas 76.4% ir 92.3%, palyginus su kontrole, yra pastebėtas, kada ląstelės buvo inkubuojamos su 2.5 ir 5 mg/ml bacitracino koncentracijomis atitinkamai. Šis sumažėjimas išauga iki 97.7% prie 10 mg/ml bacitracino koncentracijos ir iki 99.9%, esant 15 mg/ml bacitracino koncentracijai. Palyginus, cinko bacitracinas duoda 68.3% sumažėjimą prie 1 mg/ml koncentracijos, 90.6% sumažėjimą prie 2 mg/ml koncentracijos ir virš 99.5% sumažėjimą prie 5 mg/ml koncentracijos. Kadangi šie rezultatai rodo, kad steriliose kultūrose letališkumui pasiekti reikia 2-3 kartus didesnės cinko bacitracino koncentracijos negu nesteriliose amebų kultūrose, yra nustatytas tiesioginis toksinis poveikis į *E. histolytica*. Bacitracinų poveikis į amebas nėra tik



žarnyno floros, ant kurios *E. histolytica* išsilaiko, eliminavimo antrinis efektas.

### III Pavyzdys

5

#### Amebiozių klinikiniai tyrimai

Pacientai - žmonės gaudavo cinko bacitraciną 25,000 TV tabletėmis, 1 žmogui dieninė dozė sudarė 100,000TV.

10 Visi pacientai turėjo klinikinę susirgimą ir laboratorinius amebiozės požymius. *E. histolytica* cistos ir trofozیتai iš pradžių buvo nustatyti, darant šlapius išmatų preparatus ir vėliau patvirtinti formalino - eterio metodika. Pilnas parazitologinis

15 pasveikimas rėmėsi 1-2 neigiamų išmatų pavyzdžių buvimu, praėjus vienai savaitei po preparato skyrimo nutraukimo.

Dozės - efekto tyrimo dalyje dviems grupėms simptomiškų

20 *E. histolytica* cistų ir trofozیتų nešiotųjų, slaugomų klinikoje ligonių dėl pilvo skausmų, preparatas buvo skiriamas 10 arba 5 dienas. Rezultatai yra pateikti 5 Lentelėje:

#### 25 5 Lentelė

Dozės - efekto į simptomiškus cistų ir trofozیتų nešiotojus tyrimas

| Skyrimo<br>dienos | Pacientų<br>skaičius | Reaguojančių<br>skaičius | Recidyvų<br>skaičius |
|-------------------|----------------------|--------------------------|----------------------|
| 10                | 9                    | 9                        | 0                    |
| 5                 | 5                    | 5                        | 0                    |

30

Dozės veikimo trukmė tyrimuose buvo stebimos trys pacientų grupės: 1 grupė - simptomiški cistų ir trofozیتų nešiotojai; 2 grupė - dizenteriniai pacientai

su kruvinu viduriavimu; 3 grupė - asimptomiški cistų nešiotojai. Rezultatai yra pateikti 6-8 lentelėse.

**6 Lentelė**

5

Dozės veikimo trukmės į simptomiskus cistų ir trofozیتų nešiotojus tyrimas

| Skyrimo<br>dienos | Pacientų<br>skaičius | Reaguojančių<br>skaičius | Recidyvų<br>skaičius |
|-------------------|----------------------|--------------------------|----------------------|
| 5                 | 5                    | 5                        | 1                    |
| 3                 | 12                   | 12                       | 2                    |
| 2                 | 9                    | 5                        | 3                    |
| 1                 | 2                    | 1                        | 1                    |

10

**7 Lentelė**

Dozės veikimo trukmės dizenterijos atvejais tyrimas

| Skyrimo<br>dienos | Pacientų<br>skaičius | Reaguojančių<br>skaičius | Recidyvų<br>skaičius |
|-------------------|----------------------|--------------------------|----------------------|
| 3                 | 5                    | 5                        | 1                    |

15

**8 Lentelė**

Dozės veikimo trukmės asimptomiškus cistų nešiotojus tyrimas

| Skyrimo<br>dienos | Pacientų<br>skaičius | Reaguojančių<br>skaičius | Recidyvų<br>skaičius |
|-------------------|----------------------|--------------------------|----------------------|
| 5                 | 9                    | 9                        | 4                    |
| 3                 | 9                    | 8                        | 2                    |

20

Dozės - efekto tyrime 9 pacientai gavo preparatą 10 dienų ir 100% pasveiko. Ten, kur tirta, nebuvo klinikinių ar parazitologinių recidyvų (5 Lentelė).

Penki pacientai naudojo preparatą 5 dienas ir visi pasveiko.

5 Dozės veikimo trukmės tyrimas 1 grupės pacientams (simptomiškai cistų ir trofozیتų nešiotojai) apima 5 atvejus, skiriant preparatą 5 dienas ir pasiekiant pilną efektą, išskyrus vieno paciento recidyvą 12-tą dieną, (6 Lentelė). Skiriant preparatą 12 pacientų 3 dienas, pradinis pasveikimo laipsnis buvo 100%, bet 2  
10 pacientai turėjo recidyvus 6-tą ir 10-tą dienomis (16%). 9 pacientams naudojant preparatą 2 dienas, pasveikimo laipsnis buvo 55%, o recidyvų laipsnis 60%. 2 pacientai gavo preparatą 1 dieną, bet nepasveiko.

15 2 grupės pacientų (dizenteriniai pacientai su kruvinu viduriavimu) dozės veikimo trukmės tyrimuose 5 atvejai atitinka pilną klinikinį ir parazitologinį pasveikimą, vartojant preparatą 3 dienas, bet 1 pacientas turėjo parazitologinį recidyvą 12-ą dieną (7 Lentelė).

20 3 grupės (asimptomiškų cistų nešiotojai) dozės veikimo trukmės tyrimai apėmė 9 asmenis, skiriant preparatą 5 dienas. Visi 9 asmenys pasveiko tarp 2 ir 4 dienų (8 Lentelė). Po 2 savaičių 44% atvejų vėl buvo aptikti  
25 parazitai jų išmatose. 3 dienų preparato vartojimas apėmė 9 atvejus. 1 asmuo nepasveiko. 2 pacientams buvo recidyvai.

30 Klinikiniai rezultatai rodo, kad cinko bacitracinas yra veiksminga priemonė tiek prieš asimptomišką amebiozę, tiek prieš simptomišką susirgimą, o taip pat prieš mukozinę invazinę ligą su kruvinu viduriavimu. Pašalinių efektų neduodama.

35 Šie rezultatai, nurodantys 100% pasveikimą, naudojant cinko bacitracino 100,000 T.V. dienos dozę, juos skiriant 3-5 dienas, gali būti palyginti su

ankstesniais Most ir kt. tyrinėjimais (Am. J. Trop. Med. 30, 491-497 (1950)), kur 100% pasveikimo laipsnis nebuvo gautas, skiriant virš 10 dienų tokią pačią dienninę bacitracino dozę.

5

#### IV Pavyzdys

##### *Trichomonas vaginalis* analizės rezultatai

10 Šie tyrimai lygina *T. vaginalis* jautrumą bacitracinui ir cinko bacitracinui.

*T. vaginalis* izoliatai buvo surinkti iš žmonių. 12 iš šių izoliatų buvo jautrūs metronidazolui, o 6 - jam  
15 nejautrūs. Visi izoliatai buvo veikiami arba bacitracinu, arba cinko bacitracinu. Veikimas buvo atliekamas pagal metodą, aprašytą Meingassner, J. G. ir Thurner, J., "Strains of *Trichomonas vaginalis* resistant to metronidazole and other 5-imidazoles",  
20 Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 15, pp. 254-257 (1979).

Prieš skiedžiant su terpe bacitracinas iš pradžių buvo ištirpintas vandenyje iki 250 mg/ml koncentracijos.  
25 Cinko druska buvo ištirpinta parūgštintame vandenyje (60  $\mu$ l HCl/ml). Kiekvienam izoliatui buvo paruoštos dublikatinės lėkštelės. Vienas lėkštelių komplektas buvo patalpintas aerobinėje aplinkoje, o kitas komplektas - anaerobinėje aplinkoje. Oxoid HP11  
30 anaerobinių dujų kamera ir BR 38 dujas gaminantis įrengimas buvo naudojami anaerobinių sąlygų sudarymui. Sekantis bacitracino skiedimas (pav., 500-3,500 TV su 500 TV intervalais) ir cinko bacitracino (pav., 100-400 TV su 50 TV intervalais) skiedimas buvo labiau  
35 naudojami, negu dvigubi skiedimai metronidazolo atveju. Rezultatai pateikti 9 lentelėje.

9 Lentelė

Metronidazolui jautrių ir metronidazolui nejautrių *Trichomonas vaginalis* izoliatų jautrumas bacitracinui ir cinko bacitracinui

| Jautrumas metronidazolui | Izoliatas        | Bacitracinas           |                      | Cinko bacitracinas     |                      | Metronidazolas         |                      |
|--------------------------|------------------|------------------------|----------------------|------------------------|----------------------|------------------------|----------------------|
|                          |                  | Anaerobinė MLK (TV/ml) | Aerobinė MLK (TV/ml) | Anaerobinė MLK (TV/ml) | Aerobinė MLK (TV/ml) | Anaerobinė MLK (µg/ml) | Aerobinė MLK (µg/ml) |
| Jautrūs                  | 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                   |
| Nejautrūs                | 89532.2          | 2000                   | 2000                 | 350                    | 350                  | 2                      | 200                  |
|                          | 90576            | 2000                   | 2500                 | 350                    | 250                  | 2                      | 80                   |
|                          | CDC <sub>5</sub> | 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                   |

Kaip galima matyti iš 9 Lentelės, metronidazolui jautrūs izoliatai (pav., turintys MLK < 40 µg / metronidazolo prie aerobinių kultūros sąlygų) turi MLK bacitracinui, svyruojančią nuo 1,500 iki 2,500 TV/ml (pav., 21.44-35.71 mg/ml) ir MLK cinko bacitracinui, svyruojančią nuo 200 iki 350 TV/ml (pav., 3.13-5.47

mg/ml). Tokiu būdu, cinko bacitracinas yra apytikriai 4-10 kartų efektyvesnis prieš *T. vaginalis* infekciją negu bacitracinas.

- 5 Bacitracinų aktyvumas prieš sterilias *T. vaginalis* kultūras rodo, kad vaistai yra tiesiogiai aktyvūs prieš parazitą, kas prieštarauja nuomonei jį esant aktyvų per antrinį kelią (pav., maitinimo nutrūkimas dėl vaistų poveikio į bakterijas). Faktas, kad bacitracinai buvo
- 10 efektyvūs prieš abu - metronidazolui jautrius ir metronidazolui nejautrius - izoliatus, rodo, kad bacitracinai veikia skirtingu mechanizmu, lyginant su metronidazolu.

15 **V pavyzdys**

***Trichomonas vaginalis* analizės rezultatai**

- 20 Šie tyrimai rodo kitų bacitracino druskų efektyvumą prieš *T. vaginalis* izoliatus.

- Buvo pakartota IV pavyzdžio procedūra, pakeičiant bacitracino druskos cinką sekančiais metalais: nikeliu, kadmiu, kobaltu, manganu, variu ir geležimi.
- 25 Bacitracino druskų MLK yra išėję iš ribų. Vienok, MIK rodo, kad, išskyrus geležies bacitraciną, kompleksų su divalenčių metalų druska sudarymas padidino bacitracino aktyvumą. Rezultatai pateikti 10 Lentelėje:

10 Lentelė

Bacitracino ir bacitracino dvivalenčių metalų druskų minimalios inhibitorinės koncentracijos prieš  
5 *Trichomonas vaginalis* izoliatus

| Vaistas               | Izoliatas           |                     |
|-----------------------|---------------------|---------------------|
|                       | UCM1 MIK<br>(mg/ml) | 1910 MIK<br>(mg/ml) |
| Bacitracinas          | 10.00               | 10.00               |
| Cinko bacitracinas    | 2.50                | 2.50-5.00           |
| Nikelio bacitracinas  | 1.25                | 2.50                |
| Kadmio bacitracinas   | 0.31                | 0.15                |
| Kobalto bacitracinas  | 1.25                | 1.25                |
| Vario bacitracinas    | 2.50                | 1.25                |
| Magnio bacitracinas   | 0.15                | 1.26                |
| Geležies bacitracinas | >10.00              | >10.00              |

VI pavyzdys

10 Cinko bacitracino suformuotas makšties supozitorijus

Tipiškas cinko bacitracino makšties supozitorijus prieš  
*T. vaginalis* infekciją turi sekančią kompoziciją:

| Aktyvus ingredientas             |               | Specifikacija |
|----------------------------------|---------------|---------------|
| Cinko bacitracinas               | 27,500 TV(EP) | Ph. Eur.      |
| <b>Užpildas</b>                  |               |               |
| Sunkieji riebalai<br>(Novata BD) | 1,450 mg      | Ph. Eur.      |
| Supozitorijaus svoris            | 1,830 mg      |               |

15

Cinko bacitracino ir riebalų kiekiai yra dedami, atsižvelgiant į cinko bacitracino stiprumą, kad būtų užtikrinta, jog kiekvienas suformuotas supozitorijus turėtų 27,500 TV (EP) (įskaitant 10% perteklių).

20

## VII pavyzdys

*Tritrichomonas foetus* analizės rezultatai

- 5 Yra parodyta priemonės prieš trichomonozę efektyvumas, bacitraciną lyginant su bacitracino druska.

- 10 *T. foetus* izoliatai buvo surinkti ir veikiami bacitracinu ar cinko bacitracinu sutinkamai su IV pavyzdžio procedūra. Penki iš apdorotų *T. foetus* izoliatų buvo išskirti iš geografiškai skirtingų jaučių trichomonozių protrūkio vietų Šiaurės Kalifornijoje (pav., izoliatų Nr.: TF.7, TF.3741, 810,138 ir 121). Vienas iš apdorotų *T. foetus* izoliatų kilęs iš Amerikos
- 15 Kultūrų štamų kolekcijos grupės (pav., izoliato Nr. ATCC 30166).

- Kiekvienam izoliatui buvo paruoštos dublikatinės lėkštelės. Vienas lėkštelių komplektas buvo patalpintas
- 20 į aerobinę aplinką, o antras - anaerobinę aplinką. Oxoid HP11 anaerobinių dujų kamera ir BR 38 dujas gaminantis įrengimas buvo naudojami anaerobinių sąlygų sudarymui. Buvo naudojamas sekantis bacitracino (7-49 mg/ml) ir cinko bacitracino (1.5-7.5 mg/ml) skiedimas.
- 25 Rezultatai yra pateikti 11 Lentelėje.



11 Lentelė

*Trichomonas foetus* izoliatų jautrumas bacitracinui ir cinko bacitracinui

5

| Izoliatas | Bacitracinas |             | Cinko bacitracinas |             |
|-----------|--------------|-------------|--------------------|-------------|
|           | Anaerobinė   | Aerobinė    | Anaerobinė         | Aerobinė    |
|           | MLK (mg/ml)  | MLK (mg/ml) | MLK (mg/ml)        | MLK (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           |

Duomenys rodo, jog cinko bacitracinas yra 5 kartus efektyvesnis už bacitraciną, veikiant *T. foetus*. Bacitracinų efektyvumas prieš sterilias *T. foetus* kultūras vėl rodo, jog vaistai yra tiesiogiai aktyvūs prieš parazitą, kas prieštarauja nuomonei juos esant aktyvius per antrinį kelią (pav., maitinimo nutrūkimas dėl vaistų poveikio į bakterijas). Faktas, kad tiek bacitracino tiek cinko bacitracino aktyvumas yra nepriklausomas nuo kultūros būvio, rodo, jog šie vaistai veikia skirtingais mechanizmais, lyginant su metronidazolu.

VIII pavyzdys

20

Cinko bacitracino aliejaus vandenyje emulsija

Cinko bacitracino aliejaus vandenyje emulsija, kaip priemonė prieš trichomonozę, gali būti paruošta derinant sekančius komponentus:

25

Parafino aliejus

10.0 g

Polisorbatas 80 (Tvinas<sup>o</sup> 80)

0.5 g

Vanduo

84.5 g

Cinko bacitracinas

5.0 g

5 Cinko bacitracinas yra maišomas su parafinu ir polisorbatu 80. Bacitracino/aliejaus mišinys tada yra disperguojamas vandeninėje fazėje emulsijos sudarymo būdu.

### **IX pavyzdys**

#### **Cinko bacitracino vandens aliejuje emulsija**

10

Cinko bacitracino vandens aliejuje emulsija, kaip priemonė prieš trichomozę, gali būti paruošta derinant sekančius komponentus:

Parafino aliejus

60.0 g

Monooleato sorbitanas (Span<sup>o</sup> 80)

2.0 g

Vanduo

28.0 g

Cinko bacitracinas

10.0 g

15

Cinko bacitracinas yra maišomas su parafino aliejumi ir monooleato sorbitanu. Vanduo tada yra disperguojamas aliejaus fazėje emulsijos sudarymo būdu.

20

### **X pavyzdys**

#### **Cinko bacitracino nevandeninės putos**

25 Cinko bacitracino nevandeninės putos, turinčios sekančią kompoziciją, gali būti paruoštos:

Emulsijos vaškas (Polawax<sup>o</sup>)

0.74 g

Polioksietileno-stearilo

eteris 2.99 g

(Brij<sup>o</sup> 76)

|                    |         |
|--------------------|---------|
| Propileno glikolis | 80.77 g |
| Izobutanas         | 5.50 g  |
| Cinko bacitracinas | 10.00 g |

- Visi komponentai, išskyrus izobutaną ir cinko bacitraciną, yra sumaišomi (pav., kieti komponentai yra susmulkinami ir sumaišomi su skysčiais). Cinko bacitracinas yra dedamas po atšaldymo. Tada mišiniu yra pripildomos metalinės dėžutės, kurios hermetiškai uždaromos. Dujos-nešėjos (izobutanas) yra įleidžiamos per dėžutės vožtuvą, panaudojant aukštą slėgimą. Dėžučių turiniai tada yra kruopščiai sumaišomi. Preparatas gali būti naudojamas prieš jaučių trichomonozę.

## **XII pavyzdys**

### **15 Cinko bacitracino vandeninės putos**

Cinko bacitracino vandeninės putos, turinčios sekančią kompoziciją, gali būti paruoštos:

|                      |         |
|----------------------|---------|
| Polawax <sup>o</sup> | 1.70 g  |
| "Montawax"           | 1.80 g  |
| "Softigen"           | 17.00 g |
| Propileno glikolis   | 36.00 g |
| Vanduo               | 28.00 g |
| Izobutanas           | 5.50 g  |
| Cinko bacitracinas   | 10.00 g |

20

- Visi komponentai, išskyrus izobutaną ir cinko bacitraciną, yra sumaišomi (pav., kieti komponentai yra susmulkinami ir sumaišomi su skysčiais). Cinko bacitracinas yra dedamas po atšaldymo. Tada mišiniu yra pripildomos metalinės dėžutės, kurios hermetiškai uždaromos. Dujos-nešėjos (izobutanas) yra įleidžiamos per dėžutės vožtuvą, panaudojant aukštą slėgimą.

25

Dėžučių turiniai tada yra kruopščiai sumaišomi. Preparatas gali būti naudojamas prieš jaučių trichomonozę.

5 **XIII pavyzdys**

**Cinko bacitracino tepalas**

10 Cinko bacitracino tepalas, turintis sekančią kompoziciją, yra paruošiamas:

|                    |      |
|--------------------|------|
| Vazelinas          | 75 g |
| Parafino aliejus   | 15 g |
| Cinko bacitracinas | 10 g |

15 Vazelinas yra išlydomas prie 70°C. Yra pridedamas parafino aliejus ir cinko bacitracinas kruopščiai sumaišomas angliavandenilių bazėje. Preparatas gali būti skiriamas prieš jaučių trichomonozę.

**XIV pavyzdys**

20 ***Tritrichomonas gallinae* analizės rezultatai**

Šie tyrimai lygina bacitracino ir cinko bacitracino aktyvumą prieš *Tritrichomonas gallinae*.

25 Vienintelis *T. gallinae* izoliatas buvo gautas ir apdorotas bacitracinu ir cinko bacitracinu sutinkamai su IV pavyzdžio procedūra.

30 Buvo paruoštos dublikatinės lėkštelės izoliatui. Viena lėkštelė buvo patalpinta į aerobinę aplinką. Antra lėkštelė buvo patalpinta į anaerobinę aplinką. Nuoseklus bacitracino skiedimas (500-3,500 TV su 500 TV intervalais) ir cinko bacitracino skiedimas (100-400 TV su 50 TV intervalais) buvo labiau naudojami, negu

dvigubi skiedimai, naudojami metronidazolo atveju. Iš pradžių cinko bacitracinas buvo tirpinamas iki 250 mg/ml koncentracijos parūgštintame vandenyje (60 µl HCl/ml) prieš skiedžiant su terpe. Rezultatai yra  
5 pateikiami 12 Lentelėje:

# 12 Lentelė

*Tritrichomonas gallinae* izoliatų jautrumas  
10 bacitracinui, cinko bacitracinui ir metronidazolui

|                  | Bacitracinas                   |                              | Cinko bacitracinas             |                              | Metroni-<br>dazolas            |
|------------------|--------------------------------|------------------------------|--------------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| Izolia-<br>tas   | Anaero-<br>binė MLK<br>(TV/ml) | Aerobi-<br>nė MLK<br>(TV/ml) | Anaero-<br>binė MLK<br>(TV/ml) | Aerobi-<br>nė MLK<br>(TV/ml) | Anaero-<br>binė MLK<br>(µg/ml) |
| GH <sub>85</sub> | 1500                           | 2000                         | 300                            | 250                          | 2                              |

Pagal 12 Lentelę bacitracino MLK randasi ribose 1,500-  
2,000 TV/ml (pav., 21.43-28.57 mg/ml), priklausomai nuo  
15 kultūros būvio. Iš kitos pusės, cinko bacitracino MLK  
yra ribose 250-300 TV/ml (pav., 3.91-4.87 mg/ml).  
Atitinkamai, cinko bacitracinas yra apytikriai nuo 5  
iki 8 kartų efektyvesnis prieš *T. gallinae*, negu  
bacitracinas.

20 Duomenys taip pat rodo, kad vaistai yra tiesiogiai  
aktyvūs prieš parazitą, kas prieštarauja nuomonei juos  
esant aktyvius per antrinį kelią (pav., maitinimo  
nutrūkimas dėl vaistų poveikio į bakterijas).

25

## XV pavyzdys

### *Giardia lamblia* analizės rezultatai

30 Šie tyrimai lygina bacitracino ir cinko bacitracino  
aktyvumą prieš *Giardia lamblia* izoliatus.

*G. lamblia* izoliatas iš Protlendo buvo veikiamas bacitracinu ir cinko bacitracinu sutinkamai su IV pavyzdžio procedūra.

5

Oxoid HP11 anaerobinių dujų kamera ir BR 38 dujas gaminantis įrengimas buvo naudojami anaerobinių sąlygų sudarymui. Nuoseklus bacitracino skiedimas (pav., 500-3,500 TV su 500 TV intervalais) ir cinko bacitracino (pav., 100-400 TV su 50 TV intervalais) skiedimas buvo labiau naudojami, negu dvigubi skiedimai, naudojami metronidazolo atveju. Cinko bacitracinas iš pradžių buvo tirpinamas iki 250 mg/ml koncentracijos parūgštintame vandenyje (60 µl HCl/ml). Prazitai buvo inkubuojami su veikimo medžiaga 24 valandas. Parazitų gyvybingumas buvo grindžiamas morfologija ir judrumu. Rezultatai pateikti 13 Lentelėje.

15

### 13 Lentelė

20

*Gardia lamblia* izoliatų jautrumas bacitracinui, cinko bacitracinui ir metronidazolui bei šių medžiagų minimalios inhibitorinės koncentracijos

|        | Bacitracinas   |                | Cinko<br>bacitracinas |                | Metronidazolas |                |
|--------|----------------|----------------|-----------------------|----------------|----------------|----------------|
|        | MIK<br>(TV/ml) | MLK<br>(TV/ml) | MIK<br>(TV/ml)        | MLK<br>(TV/ml) | MIK<br>(µg/ml) | MLK<br>(µg/ml) |
| Izo-   |                |                |                       |                |                |                |
| liatas |                |                |                       |                |                |                |
| Port-  |                |                |                       |                |                |                |
| lendas | 2500           | >3500          | 400                   | >400           | <1             | 2              |
|        | 2000           | >3500          | 150                   | 300            | <1             | <1             |

25

2.3-6.3 mg/ml MIK cinko bacitracinui palyginus su 28.6-35.7 mg/ml MIK bacitracinui patvirtina, kad šiomis sąlygomis cinko bacitracinas yra apytikriai 5 kartus efektyvesnis už bacitraciną, veikiant *G. lamblia*.

30

**XVI pavyzdys*****G. lamblia* klinikiniai tyrimai**

5 Klinikiniam vartojimui prieš *G. lamblia* infekcijas  
pacientai buvo veikiami 200,000 TV cinko bacitracino  
tabletėmis kiekvieną dieną/ po keturias 25,000 vienetų  
tabletes du kartus per dieną/ 10 dienų laikotarpyje.  
Šio režimo pasekoje 6 iš 10 Švedijos pacientų, atsparių  
10 metronidazolui, pasveiko nuo infekcijos. Be to, 21  
pacientas, esantis aukščiausiam nuo asimptominės  
cistos iki simptominio blogos absorbcijos sindromo  
infekcijos laipsnyje, buvo veikiami Rumunijoje. Kaip  
nustatyta II dieną, visi pacientai reagavo į šį veikimo  
15 režimą. Du pacientai iš 21 turėjo recidyvą, stebint  
įvertinimą. Iš likusių 19 pacientų, pateikusių ma-  
žiausiai du išmatų pavyzdžius 2 savaitių laikotarpyje,  
pasibaigus veikimo periodui, tiksliai 1 pacientas /5,26%/  
patyrė recidyvą; šis pacientas buvo žinomas kaip  
20 nesutinkąs kad būtų veikiamas cinko bacitracinu.

**XVII pavyzdys*****Cryptosporidium Parvum* paciento tyrimai**

25 Pacientas buvo 12 metų amžiaus berniukas, sveriantis  
apytiksliai 30 kg. Pacientas metų metais kentėjo nuo  
nestipraus viduriavimo. Prieš skiriant cinko  
bacitraciną, paciento išmatos buvo pakartotinai  
30 testuotos ir rodė teigiamą reakciją, tiriant žarnyno  
*Cryptosporidia*.

Pradžioje pacientas vartojo cinko bacitraciną tris  
kartus per dieną po 30,000 vienetų. Vartojimo metu ir  
35 jį baigus išmatų pavyzdžiai buvo reguliariai tiriami  
parazitologiškai. Po 8 nuoseklių dienų cinko  
bacitracino davimas buvo nutrauktas dėl panašios į

gripą karštligės išplitimo. Pacientas gavo sulfonamidą ir cefaleksiną gydymui nuo gripo, sustabdžius cinko bacitracino davimą. Cinko bacitracino vartojimas atnaujintas apytiksliai po vieno mėnesio ir tęstas po 5 to 2 savaites.

Po vartojimo periodo pastebėta, jog vaistai buvo gerai paciento toleruoti. Po šio kurso išmatų parazitai nebuvo rasti, akivaizdžiai įrodant efektingumą prieš 10 susirgimą. Tačiau praėjus vienai savaitei po kurso nutraukimo, pacientas pradėjo vėl būti pozityvus žarnyno Cryptosporidia. Tai rodo, kad naudojant optimalią bacitracino dozę yra galimas pilnas Cryptosporidia išnaikinimas, nežiūrint šitos 15 nepagydomos ligos.

Šis išradimas gali būti išreikštas kitoms specifinėms formoms, nenutolstant nuo jo esmės ar pagrindinių požymių. Tokiu būdu, rekomendacija gali būti atlikta, 20 papildant reikalavimus labiau, negu prieš tai einanti specifikacija, kas rodo išradimo apimtį.



## IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Priemonė pirmuonių sukeltai infekcijai paveikti,  
b e s i s k i r i a n t i tuo, kad turi bacitracino  
5 divalenčio metalo druskos efektyvų kiekį.
2. Priemonė pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i  
tuo, kad bacitracino druska apima druską bent vieno  
bacitracino, atrinkto iš grupės, susidedančios iš  
10 bacitracino A, bacitracino B<sub>1</sub>, bacitracino B<sub>2</sub>,  
bacitracino B<sub>3</sub>, bacitracino C<sub>1</sub>, bacitracino C<sub>2</sub>,  
bacitracino C<sub>3</sub>, ir bet kokias jų kombinacijas.
3. Priemonė pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i  
15 tuo, kad bacitracino druska yra atrinkta iš bacitracino  
druskų grupės, susidedančios iš Co<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>,  
Ni<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> druskų, ir bet kokios jų kombinacijos.
4. Priemonė pagal 3 punktą, b e s i s k i r i a n t i  
20 tuo, kad bacitracino druska yra cinko bacitracinas.
5. Priemonė pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i  
tuo, kad skirta *Trichomonas vaginalis* infekcijai  
paveikti.  
25
6. Priemonė pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i  
tuo, kad skirta *Tritrichomonas foetus* infekcijai  
paveikti.
- 30 7. Priemonė pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i  
tuo, kad skirta *Tritrichomonas gallinae* infekcijai  
paveikti.
- 35 8. Priemonė pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i  
tuo, kad skirta *Cryptosporidium* sp. infekcijai  
paveikti.

9. Priemonė pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i  
tuo, kad skirta *Giardia lamblia* infekcijai paveikti.
- 5 10. Priemonė pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i  
tuo, kad skirta *Entamoeba histolytica* infekcijai  
paveikti.
- 10 11. Priemonė pagal 10 punktą, b e s i s k i r i a n t i  
tuo, kad turi cinko bacitracino ir skiriama žmonėms  
oraliniu būdu.
- 15 12. Priemonė pagal 11 punktą, b e s i s k i r i a n t i  
tuo, kad cinko bacitracino dienos dozė yra nuo 0,5 iki  
5 gramų.
- 20 13. Priemonė pagal 12 punktą, b e s i s k i r i a n t i  
tuo, kad cinko bacitracino dienos dozė yra nuo 1 iki 3  
gramų.
- 25 14. Priemonė pagal 12 punktą, b e s i s k i r i a n t i  
tuo, kad dienos dozė yra skiriama nuo trijų iki dešimt  
dienų.
- 30 15. Priemonė pagal 13 punktą, b e s i s k i r i a n t i  
tuo, kad dienos dozė yra skiriama nuo trijų iki dešimt  
dienų.
- 35 16. Priemonė pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i  
tuo, kad skiriama kompozicija iš bacitracino  
dvivalenčio metalo druskos ir farmacijos priimtino  
nešėjo.
17. Priemonė pagal 16 punktą, b e s i s k i r i a n t i  
tuo, kad kompoziciją sudaro cinko bacitracinas,  
mikrokristalinė celiuliozė, polivinilpirolidonas ir  
magnio stearatas.

18. Priemonė pagal 17 punktą, b e s i s k i r i a n t i  
tuo, kad kompoziciją sudaro:

- (a) mikrokristalinė celiuliozė nuo 150 iki 250 mg,
- 5 (b) polivinilpirolidonas nuo 10 iki 40 mg,
- (c) magnio stearatas nuo 5 iki 10 mg, ir
- (d) likutį sudarantis cinko bacitracinas.

19. Bacitracino divalenčio metalo druskos panaudojimas  
10 medikamentų, skirtų pirmuonių sukeltai infekcijai  
paveikti, gamybai.

20. Panaudojimas pagal 19 punktą, b e s i s k i -  
r i a n t i s tuo, kad bacitracino druska apima druską  
15 bent vieno bacitracino, atrinkto iš grupės, susidedan-  
čios iš bacitracino A, bacitracino B<sub>1</sub>, bacitracino B<sub>2</sub>,  
bacitracino B<sub>3</sub>, bacitracino C<sub>1</sub>, bacitracino C<sub>2</sub>, bacitra-  
cino C<sub>3</sub>, ir bet kokią jų kombinaciją.

20 21. Panaudojimas pagal 19 punktą, b e s i s k i -  
r i a n t i s tuo, kad bacitracino druska yra atrinkta  
iš bacitracino druskų grupės, susidedančios iš Co<sup>2+</sup>,  
Cd<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> druskų, ir bet kokios jų  
kombinacijos.

25 22. Panaudojimas pagal 21 punktą, b e s i s k i -  
r i a n t i s tuo, kad bacitracino druska yra cinko  
bacitracinas.

30 23. Panaudojimas pagal 19 punktą, b e s i s k i -  
r i a n t i s tuo, kad yra efektyvus *Trichomonas*  
*vaginalis* infekcijai paveikti.

35 24. Panaudojimas pagal 19 punktą, b e s i s k i -  
r i a n t i s tuo, kad yra efektyvus *Tritrichomonas*  
*foetus* infekcijai paveikti.

25. Panaudojimas pagal 19 punktą, b e s i s k i -  
r i a n t i s tuo, kad yra efektyvus *Tritrichomonas*  
*gallinae* infekcijai paveikti.
- 5 26. Panaudojimas pagal 19 punktą, b e s i s k i -  
r i a n t i s tuo, kad yra efektyvus *Cryptosporidium*  
*sp.* infekcijai paveikti.
- 10 27. Panaudojimas pagal 19 punktą, b e s i s k i -  
r i a n t i s tuo, kad yra efektyvus *Giardia lamblia*  
infekcijai paveikti.
- 15 28. Panaudojimas pagal 19 punktą, b e s i s k i -  
r i a n t i s tuo, kad yra efektyvus *Entamoeba*  
*histolytica* infekcijai paveikti.
- 20 29. Panaudojimas pagal 19 punktą medikamento,  
susidedančio iš bacitracino divalenčio metalo druskos  
ir farmacijoje priimtino nešėjo, paruošimui.
- 25 30. Panaudojimas cinko bacitracino pagal 29 punktą,  
b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad medikamentą  
sudaro cinko bacitracinas, mikrokristalinė celiuliozė,  
polivinilpirolidonas ir magnio stearatas.
31. Panaudojimas pagal 30 punktą, b e s i s k i -  
r i a n t i s tuo, kad medikamentą sudaro:
  - (a) mikrokristalinė celiuliozė nuo 150 iki 250 mg,
  - 30 (b) polivinilpirolidonas nuo 10 iki 40 mg,
  - (c) magnio stearatas nuo 5 iki 10 mg, ir
  - (d) likutį sudarantis cinko bacitracinas.
- 35 32. Kompozicija pirmuonių sukeltai infekcijai paveikti,  
b e s i s k i r i a n t i tuo, kad susideda iš  
divalenčio metalo druskos bent vieno bacitracino,  
atrinkto iš grupės, susidedančios iš bacitracino A,

5      bacitracino B<sub>1</sub>, bacitracino B<sub>2</sub>, bacitracino B<sub>3</sub>,  
       bacitracino C<sub>1</sub>, bacitracino C<sub>2</sub>, bacitracino C<sub>3</sub>, ar bet  
       kokios jų kombinacijos, kai druska yra atrinkta iš  
       grupės, susidedančios iš Co<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>  
 10      bacitracino druskų, arba bet kokios jų kombinacijos,  
       mikrokristalinės celiuliozės, polivinilpirolidono ir  
       magnio stearato.

10      33. Kompozicija pagal 32 punktą, b e s i s k i -  
       r i a n t i tuo, kad ją sudaro:

- (a) mikrokristalinė celiuliozė nuo 150 iki 250 mg,
- (b) polivinilpirolidonas nuo 10 iki 40 mg,
- (c) magnio stearatas nuo 5 iki 10 mg, ir
- 15      (d) likutį sudaranti bacitracino dvivalenčio  
       metalo druska.

20      34. Kompozicija pagal 32 punktą, b e s i s k i -  
       r i a n t i tuo, kad ją sudaro zinko bacitracinas,  
       mikrokristalinė celiuliozė, polivinilpirolidonas ir  
       magnio stearatas.

25      35. Kompozicija pagal 32 punktą, b e s i s k i -  
       r i a n t i tuo, kad ją sudaro:

- (a) mikrokristalinė celiuliozė nuo 150 iki 250 mg,
- (b) polivinilpirolidonas nuo 10 iki 40 mg,
- (c) magnio steratas nuo 5 iki 10 mg, ir
- (d) likutį sudarantis cinko bacitracinas.