



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 31/35 (2018.05)

(21)(22) Заявка: 2015132211, 10.02.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
10.02.2014Дата регистрации:
25.07.2018

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
08.02.2013 AU 2013900411

(43) Дата публикации заявки: 16.03.2017 Бюл. № 8

(45) Опубликовано: 25.07.2018 Бюл. № 21

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 08.09.2015(86) Заявка РСТ:
AU 2014/000102 (10.02.2014)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2014/121343 (14.08.2014)Адрес для переписки:
190000, Санкт-Петербург, Box-1125,
"ПАТЕНТИКА"

(72) Автор(ы):

ПЕЙДЖ Стефан (AU),
ГАРГ Санджай (AU)

(73) Патентообладатель(и):

ЛУОДА ФАРМА ПТИ ЛИМИТЕД (AU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2369356 C2, 10.10.2009. RU
2325189 C2, 27.05.2008. RU 2311201 C2,
27.11.2007. HEUER C. et al. Effect of monensin
on blood ketone bodies, incidence and
recurrence of disease and fertility in dairy cows
// J Dairy Sci. 2001 May;84(5):1085-97. PMID:
11384035 DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(01)74569-
9.

RU 2662300 C2

RU 2662300 C2

(54) СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ МИКРОБНЫХ ИНФЕКЦИЙ, В ТОМ ЧИСЛЕ МАСТИТА

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к ветеринарии и может быть использована для лечения или предотвращения мастита. Способ по изобретению включает стадию интрамаммарного введения композиции, содержащей терапевтически эффективное количество полизэфирного ионофора, выбранного из наразина, салиномицина, лазалоцида, монензина, семдурамицина, мадурамицина и лаидломицина.

Применение по изобретению касается изготовления композиции, предназначенной для интрамаммарного введения. Использование изобретений позволяет эффективно лечить мастит при высокой концентрации и снижении токсичности полизэфирного ионофора за счет интрамаммарного введения. 2 н. и 16 з.п. ф-лы, 38 ил., 14 табл., 9 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

A61K 31/35 (2018.05)

(21)(22) Application: 2015132211, 10.02.2014

(24) Effective date for property rights:
10.02.2014Registration date:
25.07.2018

Priority:

(30) Convention priority:
08.02.2013 AU 2013900411

(43) Application published: 16.03.2017 Bull. № 8

(45) Date of publication: 25.07.2018 Bull. № 21

(85) Commencement of national phase: 08.09.2015

(86) PCT application:
AU 2014/000102 (10.02.2014)(87) PCT publication:
WO 2014/121343 (14.08.2014)Mail address:
190000, Sankt-Peterburg, Box-1125, "PATENTIKA"

(72) Inventor(s):

PEJDZH Stefen (AU),
GARG Sandzhaj (AU)

(73) Proprietor(s):

LUODA FARMA PTI LIMITED (AU)

R U
2 6 6 2 3 0 0 C 2R U
2 6 6 2 3 0 0 C 2

(54) METHODS OF TREATING MICROBIAL INFECTIONS, INCLUDING MASTITIS

(57) Abstract:

FIELD: veterinary science.

SUBSTANCE: group of inventions relates to veterinary medicine and can be used to treat or prevent mastitis. Method of the invention comprises a step for intramammary administration of a composition comprising a therapeutically effective amount of a polyether ionophore selected from narasin, salinomycin, lasalocid, monensin, semduramicin, maduramycin and

laidlomycin. Use of the invention relates to the manufacture of a composition intended for intramammary administration.

EFFECT: use of inventions makes it possible to effectively treat mastitis at a high concentration and reduce the toxicity of the polyester ionophore due to intramammary administration.

18 cl, 38 dwg, 14 tbl, 9 ex

Область техники

Настоящее изобретение относится к способам лечения и предотвращения мастита у субъекта, к интрамаммарным противомикробным ветеринарным композициям, применяемым в таких способах, и интрамаммарным ветеринарным композициям, применяемым в таких способах.

Уровень техники

Частой причиной инфекционных заболеваний как у человека, так и в ветеринарной практике является инфицирование бактериями рода *Staphylococcus*. Стафилококки являются комменсалами здоровых млекопитающих и птиц и могут присутствовать на поверхности кожи и связанных с ней желез, в ноздрях, и транзиентно в желудочно-кишечном тракте, а также на поверхности слизистых оболочек верхних дыхательных путей и нижних мочеполовых путей. Хотя многие виды стафилококков не вызывают инфекционных заболеваний, некоторые виды являются оппортунистическими патогенами. В медицинской и ветеринарной практике основное значение имеют два патогенных вида стафилококков *Staphylococcus aureus* (золотистый стафилококк) и *Staphylococcus pseudintermedius*. *Staphylococcus aureus* ассоциирован с маститом, кожными и послеоперационными раневыми инфекциями, тогда как *Staphylococcus pseudintermedius* обычно ассоциирован с гнойными кожными и послеоперационными раневыми инфекциями у собак и кошек. *Staphylococcus pseudintermedius* охарактеризован как основной патогенный вид ветеринарного значения группы *Staphylococcus pseudintermedius* (*Staphylococcus pseudintermedius* group, SIG), включающей штаммы *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus pseudintermedius* и *Staphylococcus delphini*.

Лечение бактериальных инфекций антибиотиками

Лечение бактериальных инфекций, вызванных стафилококком, может быть

затруднено, в частности, в случае заражения субъекта штаммами, устойчивыми к антибиотикам. Бактериальную инфекцию, вызванную стафилококком, как правило, лечат введением β -лактамных противомикробных препаратов, относящихся к классу противомикробных препаратов, мишенью которых являются пенициллин-связывающие белки (ПСБ), участвующие в биосинтезе клеточной стенки бактерий. Такие противомикробные препараты обладают бактерицидной активностью и действуют путем ингибирования биосинтеза клеточной стенки бактерий, что приводит к увеличению внутреннего осмотического давления, в результате чего происходит лизис бактерий. Однако применение, чрезмерное применение и неправильное применение противомикробных препаратов в лечении бактериальных инфекций привело к появлению бактерий, устойчивых к противомикробным препаратам, в особенности это характерно для бактерий рода *Staphylococcus*. Механизмы устойчивости у некоторых видов стафилококков включают секрецию ферментов β -лактамаз, способных гидролизовать β -лактамное кольцо β -лактамных препаратов. Для преодоления этой формы устойчивости, как правило, совместно с β -лактамными противомикробными агентами вводят ингибиторы β -лактамазы, например, клавулановую кислоту, или применяют синтетические аналоги пенициллина, таких как метициллин и клоксациллин, которые не являются субстратами β -лактамазы.

В последнее время даже комбинированное лечение с применением β -лактамных противомикробных препаратов и ингибиторов β -лактамаз стало неэффективным против устойчивых к антибиотикам штаммов *Staphylococcus*. Появление метициллин-устойчивых изолятов золотистого стафилококка (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) в существенной степени препятствовало применению метициллина и других β -лактамных противомикробных препаратов, которые не инактивируются β -лактамазой. Устойчивые

к метициллину изоляты, как было показано, содержат ген устойчивости *tesA* или *tesC*, который кодирует мутантную форму пенициллин-связывающих белков, или ПСБ, и обуславливает устойчивость к пенициллину, а также его аналогам, а также другим β -лактамным противомикробным агентам, в том числе большинству цефалоспоринов и карбапенемов. Проблема MRSA часто встречается в больницах, где бактериальные изоляты MRSA передаются пациентам, например, «больничные» MRSA (hospital-acquired MRSA, HA-MRSA), которые часто сохраняются в больницах за счет загрязнения оборудования и заражения персонала. К сожалению, пациенты с ослабленным иммунитетом, имеющие раны или другие травмы, предрасположены к беспрепятственному заражению MRSA, а также инфицированию другими видами стафилококков. В связи с этим многие больничные учреждения были вынуждены реализовывать меры против MRSA для снижения заболеваемостью HA-MRSA инфекциями. Более поздней проблемой стало появление штаммов MRSA за пределами больниц, называемых «бытовыми» изолятами MRSA (community-acquired, CA-MRSA). Эти штаммы зачастую даже более опасны, чем штаммы HA-MRSA, и они могут вызвать некротический фасциит. Совсем недавно были описаны штаммы, ассоциированные с домашним скотом (livestock-associated MRSA, LA-MRSA) (например, имеющие тип последовательности [ST] 398 в Европе и к ST9 в Азии), вызывающие острые инфекции у свиней, домашней птицы, крупного рогатого скота (в том числе молочного скота) и других видов сельскохозяйственных животных.

В дополнение к MRSA, устойчивость к метициллину также наблюдается у других видов стафилококков. Например, известно, что многие штаммы непатогенных коагулазонегативных видов стафилококка (MR-CNS) и *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) являются метициллин-устойчивыми. К другим устойчивым видам с различными механизмами устойчивости относятся грамотрицательные MDR *Pseudomonas aeruginosa* и MDR *Escherichia coli* и виды *Enterobacter*, а также грамположительные устойчивые к ванкомицину *Enterococci* (VRE) и устойчивые к пенициллину и макролиду виды *Streptococcus*.

Мастит у коров

Примером заболевания животных, ограничивающего производство, которое требует лечения и предотвращения с применением антибиотиков является мастит у коров. Мастит является наиболее частой причиной применения антибиотиков у сельскохозяйственных животных и обуславливает значительные расходы молочной промышленности для устранения инфекции и предотвращения новых случаев интрамаммарной инфекции. Мастит поражает одну или более из четырех четвертей молочной железы коровы или вымени и может отрицательно повлиять на здоровье пострадавших коров. Возбудители попадают в молочную железу через канал соска, когда сфинктер соска расслабляется после доения. В Австралии и в других местах, к наиболее распространенным возбудителям мастита относятся *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus*, коагулазонегативные стафилококки, *Streptococcus dysgalactiae* и *Streptococcus agalactiae*. Мастит, вызванный MRSA, является причиной потери продуктивности молочного скота, которая потенциально может распространиться по всему миру за счет того, что некоторые штаммы, выявленные у молочного скота (например, ST398), способны заражать и вызывать заболевания у человека. Незначительное число продуктов, доступных в настоящее время для лечения мастита у молочного скота, является эффективным против MRSA, и в течение более 20 лет не было разработано и зарегистрировано новых противобактериальных агентов, что обуславливает острую необходимость в новых лекарствах и системах интрамаммарной

доставки для улучшения микробиологических и клинических исходов заболеваний. Причиной большинства случаев неэффективного лечения мастита в прошлом является неудовлетворенная потребность в проверенных системах интрамаммарной доставки, системах, которые являются безопасными для животного и надежно и воспроизводимо 5 эффективными против распространенных возбудителей мастита.

Введение препаратов для лечения мастита обычно осуществляют в двух разных стадиях лактационного цикла коровы: стадия сухостойной коровы (dry cow, DC) и дойной или лактирующей коровы (lactating cow, LC). Терапию дойных коров применяют, когда коровы дают молоко, а терапию сухостойных коров применяют после окончания 10 периода лактации. Терапию сухостойных коров применяют для лечения инфекций, накопленных на стадии лактации, чтобы предотвратить их перенос на следующий период лактации, и уменьшить число новых инфекционных заболеваний в течение сухостойного периода. Лечение мастита часто осуществляют через канал соска вымени путем интрамаммарной инъекции или инфузии.

15 Терапия сухостойных коров

Лечение сухостойных коров может осуществляться с помощью противомикробных инфузий или введения герметика для сосков. Для предотвращения новых инфекций во время сухостойного периода природный механизм защиты коров включает 20 формирование пробки из природного кератина, закрывающей сосок. Кератиновая пробка создает эффективный барьер, препятствующий проникновению бактерий из канала соска во время сухостойного периода. У большинства коров образование кератиновой пробки происходит постепенно в течение первых двух недель после последнего доения и начала сухостойного периода. У некоторых коров кератиновая пробка не образуется, что делает их предрасположенными к заражению инфекциями 25 во время сухостойного периода. На способность запечатывания канала соска серьезное влияние может также оказывать травматическое повреждение конца соска.

Один из подходов при лечении мастита у коров представляет собой интрамаммарную инфузию противомикробного препарата в канал соска и цистерну соска. Этот 30 стандартный способ описан в учебнике Роджера Блоуэя и Питера Эдмондсона (Roger Blowey and Peter Edmondson) (2010) *Mastitis control in dairy herds* (второе издание), в частности, в разделе "Treatment and Dry Cow Therapy", CAB International, Wallingford, United Kingdom, 2010, на страницах 196-197. Противомикробные препараты вводят с помощью шприца, который частично вставлен в канал соска, а антибиотик вводят, массируя сосок, внутрь и через цистерну железы.

35 Задержка или полная невозможность естественного образования кератиновой пробки во время сухостойного периода создает для коровы риск возникновения новых инфекций, вызывающих мастит. Одним из способов дополнительной природной защиты соска, а также обеспечения эффективного запечатывания канала в течение сухостойный период, является применение внутреннего герметика для сосков. Применение внутреннего 40 герметика для сосков была описана в середине 1970-х годов, Meaney, W.J. "Dry period teat seal." *Vet Rec.* 99(2) (1976) 30.

Заявителю известны два типа герметика для сосков для снижения риска инфекций сухостойного периода: наружный пленочный герметик, который обеспечивает гибкую защитную пленку на конце соска на срок до 7 дней, и внутренний герметик,

45 запечатывающий канал соска. Наружный герметик уже не находит широкого применения, хотя его можно применять в конце сухостойного периода при отсутствии введения внутреннего герметика. Внутренний герметик является самым эффективным и наиболее часто используемым. Чаще всего основой внутреннего герметика для сосков

является соль висмута, которую вводят в канал соска в период сухостоя. Такой герметик не имеет антибактериальных свойств и, следовательно, большое значение имеет соблюдение строгой гигиены во время введения. Однако включение противомикробных веществ в состав внутреннего герметика для сосков может способствовать лечению существующих инфекций и повысить вероятность предотвращения новых инфекций.

5 Для эффективного лечения сухостойных коров необходимы интрамаммарные препараты, которые обеспечивают устойчивую и эффективную интрамаммарную концентрацию антибактериальных агентов во время всего сухостойного периода. Например, сохранение нерастворимых солей пенициллина (в частности, клоксациллина

10 бензатина) в составе препарата в виде геля из моностеарата алюминия и разбавленных в минеральном масле (например, см. "Smith, A., F.K. Neave, et al. (1967) Journal of Dairy Research 34(01): 47-57").

Терапия дойных коров

В составе препаратов для лактирующих коров должны быть сбалансированы два

15 противоположных друг другу фактора. Препарат должен обеспечивать эффективные концентрации антибактериального вещества в пределах молочной железы, где присутствуют инфицирующие агенты (т.е. в месте инфекции) настолько, насколько это возможно, даже в условиях продолжения доения дважды в день или более часто, при сведении к минимуму периода, в течение которого молоко отбраковывается в связи с

20 сохранением неприемлемых концентраций остатков вещества в молоке после введения последней инфузии. В целом, препараты для применения у лактирующих коров обеспечивают высокие концентрации в течение нескольких часов или дней, и входят в состав препаратов на водной или масляной основе (минеральное или растительное масло) с быстрым высвобождением.

25 Появление устойчивости к антибиотикам усиливает потребность в альтернативных соединениях, способных ингибировать штаммы бактерий со множественной устойчивостью, такие как MRSA и MRSP.

Полиэфирные ионофоры

Карбоксильные полиэфиры, также известные как полиэфирные антибиотики или

30 полиэфирные ионофоры, образуют электрически нейтральные комплексы с одновалентными или двухвалентными катионами, катализируя электрически неактивный обмен катионов или протонов в различных биологических мембранах. Было показано, что эти соединения в высокой степени перспективны для борьбы с устойчивыми к лекарственным средствам инфекциями, вызванными бактериями и простейшими, однако

35 их применение строго ограничено их высокой токсичностью. Механизм действия этих молекул связан с тем, что они делают клеточные или внутриклеточные мембранны проницаемыми для катионов, которые в норме асимметрично распределены по биологическим мембранам, тем самым, образуя резкие концентрационные градиенты. Примеры простых ионофоров включают лазалоцид, монензин, наразин, салиномицин,

40 семдурамицин, мадурамицин и лаидломицин.

Однако острая токсичность этих соединений, связанная с их лизирующей активностью в отношении эритроцитов и сердечной токсичностью, эффективно предотвратила их применение *in vivo*. Основным препятствием для применения полиэфирных ионофоров в качестве лекарственных средств для контроля заболеваний человека является их

45 токсичность. Например, как сообщают Naqjokat и Steinhart (2012, J Biomed Biotechnol 950658), значительная токсичность салиномицина была обнаружена в отношении человека. Так, в результате случайного вдыхания и проглатывания примерно 1 мг/кг салиномицина у 35-летнего мужчины наблюдался тяжелый острый и хронический

токсический эффект, сильная тошнота, а также светобоязнь, слабость ног, тахикардия и повышение артериального давления и хроническое повышение уровня креатинкиназы (день 2 - день 35), миоглобинурия, слабость конечностей, боли в мышцах и слабый рабдомиолиза. Европейским ведомством по безопасности пищевых продуктов в

5 последнее время были опубликованы данные по оценке риска и установлена допустимая суточная доза (ADI) салиномицина для человека - 5 мкг/кг, поскольку ежедневное потребление более 500 мкг/кг салиномицина у собак приводит к нейротоксическим эффектам, таким как потеря миелина и дегенерация аксонов (Naujokat and Steinhart, 2012, см. выше). В другом примере, Liu (1982, Polyether Antibiotics. Naturally Occurring Acid

10 Ionophores. Volume 1. Biology. J.W. Westley. New York, Marcel Dekker Inc: 43-102) сообщает, что высокая пероральная и парентеральная токсичность полиэфирных ионофоров является вероятной причиной отсутствия данных о противомикробной активности полиэфирных ионофоров *in vivo*.

Единственным к настоящему времени применением полиэфирных ионофоров, о 15 котором известно заявителю, является их применение в качестве пероральных агентов в ветеринарии для борьбы с кокцидиозом и для стимулирования роста.

Кроме того, не для всех полиэфирных ионофоров была показана значимая активность 20 против грамположительных бактерий, таких как *Staphylococcus aureus*, и большинство из них не обладает активностью широкого спектра действия в отношении грамотрицательных бактерий. В связи со значительной токсичностью в отношении млекопитающих, как сообщают Naujokat и Steinhart (2012, см. выше), салиномицин использовался только как кокцидиостат и стимулятор роста поголовья скота, но не рассматривался в качестве подходящего кандидата для разработки лекарств для человека.

25 Сохраняется потребность в альтернативных противомикробных препаратах в лечении инфекций, вызываемых бактериями со множественной устойчивостью, такими как MRSA и MRSP. Однако, по сообщениям Американского общества инфекционистов и Европейского центра по контролю и профилактике заболеваний, в разработке находится лишь небольшое количество новых лекарственных препаратов с перспективными 30 результатами, превышающими существующие способы лечения, и еще меньше из них предназначено для направленного лечения стафилококков (Gilbert и др., 2010, Clinical Infectious Diseases, 50(8): 1081-1083).

Задачей настоящего изобретения является устранение некоторых или всех недостатков 35 предшествующего уровня техники.

Обсуждение предшествующего уровня техники, изложенное выше, предназначено для облегчения понимания всего настоящего изобретения. Обсуждение не подразумевает признание или принятие того, что любой из упомянутых источников является или 40 являлся частью общедоступных сведений на дату приоритета заявки.

Краткое описание изобретения

45 В соответствии с одним аспектом настоящего изобретения, предложен способ лечения мастита у субъекта, включающий стадию введения терапевтически эффективного количества полиэфирного ионофора или его терапевтически приемлемую соль, в молочную железу субъекта.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения, предложен способ 50 предотвращения мастита у субъекта, включающий стадию введения терапевтически эффективного количества полиэфирного ионофора или его терапевтически приемлемую соль, в молочную железу субъекта.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложено применение

полиэфирного ионофора, или его терапевтически приемлемой соли, в производстве лекарственного средства для лечения или предотвращения мастита у субъекта.

Введение может представлять собой интрамаммарное введение, например, путем интрамаммарной инъекции или инфузии через канал соска.

- 5 Дополнительные признаки изобретения предусматривают полиэфирный ионофор или его терапевтически приемлемую соль, выбранный из группы, включающей момензин (также известный как A-3823A), наразин A (также известный как A-28086A), наразин B (также известный как A-28086B), наразин D (также известный как A-28086D), лазалоцид, салиномицин, и мадурамицин, альбориксин (также известный как S-14750A, 10 CP-38986), лаидломицин (также известный как AB-78), леноремицин (также известный как A-130A, Ro21-6150), A-130B, 130C-A, дианемицин (также известный как A-150 (M5-16183), A-204A, A-204B, лономицин (также известный как A-218), деоксилаидломицин (также известный как A-712), кальцимицин (также известный как A-23187), септамицин (также известный как BL-580 α и A-28695A), A28695 B, K-41A (также известный как A-15 15 32887), септамицин (также известный как BL-580 α ^b), BL-580 β , BL-580 δ , BL-580Z, карриомицин, кальцимицин^b (также известный как A-23187), катиономицин, хлорноборитомицин A (также известный как X-14766A), этеромицин (также известный как CP-38295, C 20-12, T-40517), дезокси-салиномицин (также известный как SY-1), 20 дезокси-эпи-салиномицина (SY-2), дезокси-наразин, дезокси эпи-наразин, дианемикон^b (также известный как M5-16183,-150), эмерицид (также известный как лономицин A и DE 3938), дуамицин (также известный как нигерицин, хеликсин С и азаломицин M), гридориксин, иономицин, K-41B, лазалоцид A (X-537A), лазалоцид B, лазалоцид C, 25 лазалоцид D, лазалоцид E, изо-лазалоцид, леузерамицин, ломомицин B, ломомицин C, лизоцеллин, M-139603, монензин B, монензин C, монензин D, муталомицин, ноборитомицин A, ноборитомицин B, RP 30504, RP 37454, салиномицин, салиномицин All, SY-4, SY-5, SY-8, тетрономицин, TM-531B, TM-531C, X-206, X-14547A, X-14667A, X-14667B, X-14868A, X-14868B, X-14868C, X-14868D, 5057, 6016.

Предпочтительно, полиэфирный ионофор выбран из группы, включающей

- 30 салиномицин; лазалоцид; наразин; мадурамицин; монензин, лаидломицин и семдурамицин.

Субъект может представлять собой корову, овцу, козу, другой вид жвачных животных из группы верблюдов или лошадиных (в том числе лошадь, ослищу и зебру). Субъект может представлять собой человека.

- 35 Полиэфир ионофор вводят в молочную железу (две или четыре из которых образуют вымя у жвачных животных, или в грудь человека) субъекта в дозе, выбранной из группы, включающей от 5 мг до 2000 мг на железу, предпочтительно от 20 мг до 900 мг на железу, более предпочтительно от 40 до 600 мг на железу, наиболее предпочтительно от 50 мг до 500 мг на железу. Например, полиэфирный ионофор вводят в молочную 40 железу субъекта в дозе, выбранной из группы, включающей 50 мг на железу, 60 мг на железу, 70 мг на железу, 80 мг на железу, 90 мг на железу, 100 мг на железу, 110 мг на железу, 120 мг на железу, 130 мг на железу, 140 мг на железу, 150 мг на железу, 160 мг на железу, 170 мг на железу, 180 мг на железу, 190 мг на железу, 200 мг на железу, 210 мг на железу, 220 мг на железу, 230 мг на железу, 240 мг на железу, 250 мг на железу, 45 260 мг на железу, 270 мг на железу, 280 мг на железу, 290 мг на железу, 300 мг на железу, 310 мг на железу, 320 мг на железу, 330 мг на железу, 340 мг на железу, 350 мг на железу, 360 мг на железу, 370 мг на железу, 380 мг на железу, 390 мг на железу, 400 мг на железу, 410 мг на железу, 420 мг на железу, 430 мг на железу, 440 мг на железу, 450 мг на железу,

460 мг на железу, 470 мг на железу, 480 мг на железу, 490 мг на железу и 500 мг на железу.

В одном варианте реализации изобретения полиэфирный ионофор вводят субъекту в диапазоне доз, выбранном из группы, включающей: от 20 мг на канал соска до 900 мг на канал соска; и от 50 мг на канал соска до 600 мг на канал соска.

5 В одном варианте реализации изобретения полиэфирный ионофор вводят в каждую молочную железу через канал соска. Например, полиэфирный ионофор вводят через канал соска с применением устройства для интрамаммарного введения, такого как шприц. Это является предпочтительным путем в лечении мастита у жвачных животных, таких как коровы, а у также верблюдов и лошадей. В другом варианте полиэфирный 10 ионофор вводят субъекту путем местного нанесения на поверхность молочной железы, или в виде инъекций через кожу субъекта непосредственно в молочную железу или через молочные протоки. Например, при лечении мастита у человека ионофор вводят посредством местного нанесения на поверхность молочной железы или путем инфузии 15 в молочные протоки.

15 В одном варианте реализации изобретения полиэфирный ионофор вводят субъекту с применением режима дозирования, выбранного из группы, включающей: три раза в день; два раза в день; один раз в день; каждый второй день; один раз в неделю; один раз в две недели, один раз в месяц, один раз в сухостойный период, или два раза в 20 сухостойный период. Предпочтительно, полиэфирный ионофор вводят через канал соска в каждую инфицированную четверть или половину молочной железы субъекта (например, вымени), сразу же после доения (или сцеживания молока для кормления потомства). Например, если субъекта доят дважды в день, полиэфирный ионофор 25 вводят сразу же после каждого доения. В предпочтительном варианте полиэфирный ионофор вводят субъекту в период лактации два раза в день, сразу после каждого доения в течение 2 дней, 3 дней, 7 дней, 14 дней, 21 дней и одного месяца, или до исчезновения признаков мастита; или, в случае применения к рогатому скоту, коровам 30 при наступлении сухостойного периода в конце лактации, или телкам до первого отела.

В одном варианте реализации изобретения полиэфирный ионофор вводят субъекту в общей дозе на канал соска (у жвачных животных) или на грудь (у людей), выбранной 35 из группы, включающей: от 1 мг до 1000 мг; от 10 мг до 500 мг; от 10 мг до 400 мг; от 10 мг до 300 мг; от 10 мг до 200 мг; от 10 мг до 100 мг; и от 50 мг до 100 мг.

Предпочтительно, полиэфирный ионофор вводят субъекту в общем количестве на дозу 150 мг, 300 мг или 600 мг.

В одном варианте реализации изобретения полиэфирный ионофор вводят в вымя 35 или грудь субъекта. В одном примере полиэфирный ионофор вводят в каждую четверть или половину вымени субъекта. В одном примере полиэфирный ионофор вводят субъекту в количестве общей дозы на четверть вымени (или на половину вымени или груди, в зависимости от анатомических различий между видами животных), выбранной из группы, включающей: от 1 мг до 1000 мг; от 10 мг до 500 мг; от 10 мг до 400 мг; от 40 10 мг до 300 мг; от 10 мг до 200 мг; от 10 мг до 100 мг; от 50 мг до 100 мг. Более предпочтительно, доза на четверть вымени составляет 75 мг, 150 мг, 300 мг или 600 мг. В одном варианте реализации доза на четверть вымени (или половину вымени, или груди), выбрана из группы, включающей: 1 мг, 10 мг, 20 мг, 30 мг, 40 мг, 50 мг, 60 мг, 70 мг, 80 мг, 90 мг, 100 мг, 110 мг, 120 мг, 130 мг, 140 мг, 150 мг, 160 мг, 170 мг, 180 мг, 45 190 мг, 200 мг, 210 мг, 220 мг, 230 мг, 240 мг, 250 мг, 260 мг, 270 мг, 280 мг, 290 мг, 300 мг, 310 мг, 320 мг, 330 мг, 340 мг, 350 мг, 360 мг, 370 мг, 380 мг, 390 мг, 400 мг, 410 мг, 420 мг, 430 мг, 440 мг, 450 мг, 460 мг, 470 мг, 480 мг, 490 мг, 500 мг, 510 мг, 520 мг, 530 мг, 540 мг, 550 мг, 560 мг, 570 мг, 580 мг, 590 мг, 600 мг. В одном примере, общая доза

на вымя (или четыре четверти или две половины) или на обе груди, выбрана из указанных доз, умноженных на количество молочных желез.

В одном варианте реализации концентрация остаточного ионофора в молоке субъекта после введения находится в диапазоне, выбранном из группы, включающей: от 1 до

- 5 200 мг/л после 12 часов; от 0,1 до 5 мг/л после 24 часов; от 0,01 до 2 мг/л после 48 часов; от 0,0001 до 1 мг/л после 72 часов. Предпочтительно, концентрация выбрана из группы, включающей: менее 200 мг/л после 12 часов; менее 5 мг/л после 24 часов; менее 1 мг/л после 48 часов и менее 0,5 мг/л после 72 часов. В качестве альтернативы, концентрация выбрана из группы, включающей: менее 10 мг/л после 12 часов; менее 1 мг/л после 24
- 10 часов; менее 1 мг/л после 48 часов и менее 0,01 мг/л через 72 часов. В качестве альтернативы, концентрация выбрана из группы, включающей: менее 1 мг/л после 12 часов; менее 0,1 мг/л через 24 часа; менее 0,01 мг/л через 48 часов и менее 0,001 мг/л после 72 часов. В качестве альтернативы, концентрация выбрана из группы, включающей: менее 0,1 мг/л после 12 часов; менее 0,01 мг/л через 24 часов; менее 0,001
- 15 мг/л после 48 часов и менее 0,0001 мг/л после 72 часов.

Микроорганизм может быть как прокариотическим, так и эукариотическим.

Предпочтительно, микроорганизм, вызывающий мастит, представляет собой бактериальный агент, выбранный из группы, включающей, но не ограниченной перечисленными, виды *Staphylococcus* spp, *Streptococcus* spp, *Bacillus* spp, *Enterococcus* spp,

- 20 *Listeria* spp, *Mycoplasma* spp, и анаэробные бактерии. Бактериальный агент может быть выбран из группы, включающей, но не ограниченной перечисленными, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus felis*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus caprae*, *Staphylococcus cohnii* subsp. *cohnii*, *Staphylococcus cohnii* subsp. *urealyticus*, *Staphylococcus capitis* subsp. *capitis*, *Staphylococcus capitis* subsp. *urealyticus*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus delphini*, *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans*, *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus*, *Streptococcus equinus*, *Bacillus melaninogenicus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus anthracis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus durans*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Actinomyces bovis*, *Propionibacterium acnes*, *Propionibacterium granulosum*, *Eubacterium*, *Peptococcus indolicus*, *Peptostreptococcus anaerobius* и *Mycoplasma bovis*.

Более предпочтительно, бактериальный агент выбран из группы, включающей *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* и *Propionibacterium acnes*.

Наиболее предпочтительно, бактериальный агент представляет собой чувствительный

- 40 к антибиотикам штамм или устойчивый к антибиотикам штамм. Примеры штаммов, устойчивых к антибиотикам, включают MRSA и устойчивые к тетрациклину *Streptococcus* spp. В предпочтительном варианте реализации бактериальная агент представляет собой MRSA.

В одном варианте реализации бактериальный агент выбран из группы, включающей,

- 45 но не ограниченной перечисленными, коагулазонегативные стафилококки (КНС). Примеры коагулазонегативных стафилококков (КНС), включают *Staphylococcus epidermidis* (изолирован из мастита коров), *Staphylococcus simulans* (изолирован из мастита коров или кошачьего дерматита), *Staphylococcus felis* (изолирован из кошачьего

дерматита), *Staphylococcus xylosus* (изолирован из мастита коров или коровьего дерматита), *Staphylococcus chromogenes* (изолирован из мастита коров или козьего дерматита), *Staphylococcus warneri* (изолирован из инфицированных коз), *Staphylococcus haemolyticus* (изолирован из инфицированных коз), *Staphylococcus sciuri* (изолирован из 5 свиного экссудативного эпидерматита), *Staphylococcus saprophyticus* (изолирован из инфицированных коз), *Staphylococcus hominis* (изолирован из инфицированных свиней), *Staphylococcus caragae* (изолирован из инфицированных коз), *Staphylococcus Staphylococcus cohnii* subsp. *cohnii* (изолирован из инфицированных коз), *Staphylococcus cohnii* subsp. *urealyticus* (изолирован из инфицированных коз), *Staphylococcus capitis* subsp. *capitis* 10 (изолирован из мастита коров), *Staphylococcus capitis* subsp. *urealyticus* (изолирован из мастита коров) и *Staphylococcus hyicus* (изолирован из свиного экссудативного эпидерматита и инфицированных коров).

В другом варианте реализации бактериальный агент выбран из коагулазо-позитивных стафилококков. Например, бактериальный агент может быть выбран из группы, 15 включающей, но не ограниченной перечисленными, *Staphylococcus aureus* (выделенный из инфицированных людей, лошадей, собак и кошек, коровьего и овчье мастила, и дерматитов многих видов и послеоперационных раневых инфекций), *Staphylococcus pseudintermedius* (пиодермия собак, инфекции собак и кошек), *Staphylococcus delphini* (гнойные поражения кожи дельфина), *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* (наружный 20 отит собак, инфекции собак и кошек) и *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* (лимфаденит овец). В наиболее предпочтительном варианте бактериальный агент представляет собой *Staphylococcus aureus*, который может быть получен из различных линий, адаптирован ко многим хозяевам, в том числе ассоциированный с домашним скотом MRSA, 25 относящийся к типу последовательности ST9 (ST) или клональному комплексу 398 (clonal complex, CC);, ассоциированный с различными сообществами людей CA-MRSA, и ассоциированный с больницами HA-MRSA.

В другом варианте реализации бактериальный агент относится к роду *Streptococcus*. Например, бактериальный агент может быть выбран из группы, включающей, но не ограниченной перечисленными, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus 30 dysgalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* и *Streptococcus equinus*. Бактерии могут быть изолированы из мастита коров.

В другом варианте реализации бактериальный агент относится к роду *Bacillus*. Например, бактериальный агент может быть выбран из группы, включающей, но не ограниченной перечисленными, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* и *Streptococcus equinus*. Бактерии могут быть изолированы из мастита коров.

В другом варианте реализации бактериальный агент относится к роду *Enterococcus*. 40 Например, бактериальный агент может быть выбран из группы, включающей, но не ограниченной перечисленными, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* и *Enterococcus durans*. Бактерии могут быть изолированы из мастита коров.

В другом варианте реализации бактериальный агент относится к роду *Listeria*. Например, бактериальный агент может представлять собой *Listeria monocytogenes*. 45 Бактерии могут быть изолированы из мастита коров.

В другом варианте реализации изобретения бактериальный агент является анаэробным. Например, бактериальный агент может быть выбран из группы, включающей, но не ограниченной перечисленными, *Clostridium perfringens*, *Actinomyces*

bovis, Propionibacterium acnes, Propionibacterium granulosum, Eubacterium, Peptococcus indolicus и Peptostreptococcus anaerobius. Бактерии могут быть изолированы из мастита коров.

В другом варианте реализации микроорганизм относится к роду *Mycoplasma*.

5 Например, микроорганизм может представлять собой *Mycoplasma bovis*. Бактериальный агент может быть изолирован из мастита коров.

В предпочтительном варианте реализации изобретения микроорганизм представляет собой *Mycoplasma bovis*. В наиболее предпочтительном варианте микроорганизм является MRSA.

10 Следует понимать, что полиэфирный ионофоры, описанные в настоящей заявке, как правило, эффективны против грамположительных бактерий и ряда анаэробных бактерий, а также грибов. Чувствительность микроорганизма к полиэфирным ионофорам описанных в настоящей заявке варьирует, в зависимости от индивидуального штамма, но в целом, грамположительные кокки и бациллы, а также некоторые анаэробы, 15 такие как *Clostridium*, *Eubacterium*, *Propionibacterium*, *Mycobacterium*, and *Streptomyces* являются восприимчивыми к полиэфирным ионофорам, описанным в настоящей заявке. Грибы и дрожжи, такие как *Sclerotinia sclerotiorum*, *Monila laxa*, *Phomopsis malii*, *Botrytis cinerea*, *Trichtheium roseum* и *Verticillium albo-atrum* также могут проявлять чувствительность к полиэфирным ионофорам, описанным в настоящей заявке.

20 В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложена фармацевтическая интрамаммарная противомикробная композиция, содержащая терапевтически эффективное количество полиэфирного ионофора, или его терапевтически приемлемую соль. Интрамаммарные противомикробные композиции ветеринарного назначения настоящего изобретения также могут применяться при 25 лечении мастита у человека.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложена интрамаммарная противомикробная композиция ветеринарного назначения, содержащая терапевтически эффективное количество полиэфирного ионофора, или его терапевтически приемлемую соль.

30 Интрамаммарная противомикробная композиция ветеринарного назначения согласно настоящему изобретению может применяться при лечении мастита у коров.

Противомикробная композиция согласно настоящему изобретению может быть 35 составлена для лечения мастита сухостойных коров или для лечения мастита у дойных коров. Состав для лечения мастита сухостойных коров может дополнительно включать вспомогательные вещества, способствующие гелеобразованию или иным образом способствующие затвердеванию состава и запечатывая канала соска. Составы для лечения мастита у дойных коров могут дополнительно содержать вспомогательные вещества, способствующие быстрому высвобождению, например, таким образом, что препарат не задерживается в молочной железе дойной коровы.

40 В одном варианте реализации интрамаммарная противомикробная композиция включает примеси, при этом количество примесей в процентах от общей массы композиции, выбрано из группы, включающей: менее 20% примесей (от общего веса композиции); менее 15% примесей; менее 10% примесей; менее 8% примесей; менее 5% примесей; менее 4% примесей; менее 3% примесей; менее 2% примесей; менее 1% примеси:

45 менее 0,5% примесей; менее 0,1% примесей. В одном варианте реализации интрамаммарная противомикробная композиция включает микробные примеси или вторичные метаболиты, при этом количество микробных примесей в процентах от общей массы композиции выбрано из группы, включающей: менее 5%; менее 4%; менее

3%; менее 2%; менее 1%; менее 0,5%; менее 0,1%; менее 0,01%; менее 0,001%. В одном варианте реализации интрамаммарная противомикробная композиция стерильна и хранится в герметичном стерильном контейнере. В одном варианте реализации интрамаммарная противомикробная композиция не содержит детектируемого количества микробного загрязнения.

5 Композиция согласно настоящему изобретению может содержать дополнительный противомикробный агент. Дополнительный противомикробный агент может представлять собой противогрибковый агент.

В одном варианте реализации противогрибковый агент выбран из группы,

- 10 включающей, но не ограниченной перечисленными, Эхинокандины (Анидулафунгин, Каспофунгина, Микафунгин), Полиены (Амфотерицин В, Кандицидин, Филипин, Фунгихромин, Хачимицин, Гамицин, Люцензомицин, Мепартрицин, Натамицин, Нистатин, Пецилоцин, Перимицин, Гризофульвин, Олигомицины, Пирролнитрин, Сикканин и Виридин. Противогрибковое средство может быть синтетическим
- 15 соединением, выбранным из группы, включающей, но не ограниченной перечисленными, Аллиламины (бутенафин, Нафтифин, Тербинафин) Имидазолы (Бифоназол, Бутоконазол, Хлормидазол, Клоконазол, Клотrimазол, Эконазол, Фентиконазол, Флутримазол, Изоконазол, Кетоконазол, Ланоконазол, Миконазол, Нетриконазол, Омоконазол, Оксиконазол нитрат, Сертаконазол, Сулконазол, Тиоконазол),
- 20 Тиокарбаматы (Лиранафтат, Толциктат, Толиндат, Толнафтат), Триазолы (Флуконазол, Изавуконазол, Итраконазол, Позаконазол, Равуконазол, Саперконазол, Терконазол, Вориконазол), Акризорцин, Аморолфин, Бромсалицилхлоранилид, Буклозамил, Кальция пропионат, Хлорфенезин, Циклопирокс, Клоксиквин, Копараффинат, Экзаламид, Флуцитозин, Галопрогин, Гексетидин, Лофлукарбан, Ниfurатель, Калия йодид,
- 25 Пропионовую кислоту, Пиритион, Салициланилид, Натрия пропионат, Сулбентин, Тенонитрозол, Триацетин, Ундециленовую кислоту и Цинка пропионат.

В другом варианте противогрибковый агент выбран из группы, включающей, но не ограниченной перечисленными, Аморолфин, Амфотерицин В, Анидулафунгин, Бифоназол, Бромхлорсалициланилид, Бутенафина гидрохлорид, Бутоконазола нитрат,

- 30 Каспофунгина ацетат, Хлормидазола гидрохлорид, Хлорфенезин, Циклопирокс, Климбазол, Клотrimазол, Клоксиквин, Кроконазола гидрохлорид, Эберконазола нитрат, Эконазол, Энилконазол, Фентиконазола нитрат, Флуконазол, Флуцитозин, Флутримазол, Фосфлуконазол, Гризофульвин, Изоконазол, Итраконазол, Кетоконазол, Ланоконазол, Лиранафтат, Луликоназол, Мепартрицин, Микафунгин натрия,
- 35 Миконазол, Нафтифина гидрохлорид, Натамицин, Нетриконазола гидрохлорид, Ниfurоксим, Нистатин, Омоконазола нитрат, Оксиконазола нитрат, Парконазола гидрохлорид, Пентамицин, Пироктон оламин, Позаконазол, Пропионовую кислоту, Пирролнитрин, Равуконазол, Сертаконазола нитрат, Сикканин, Параблорбензоат натрия, Сулконазола нитрат, Тербинафин, Терконазол, Тиоконазол, Толциктат,
- 40 Толнафтат, Триацетин, Триметрексата глюкуронат, Ундециленовую кислоту и вориконазол.

Композиция, согласно настоящему изобретению, может дополнительно содержать антибиотик, выбранный из группы, включающей, но не ограниченной перечисленными: ингибиторы 6-лактамазы (Клавулановую кислоту, Сульбактам, Сультамициллин,

- 45 Тазобактам), ингибиторы почечной дипептидазы (Циластатин) и протекторы почек (Бетамипрон).

В одном варианте реализации композиция согласно настоящему изобретению содержит дополнительно антибиотик, выбранный из группы, включающей, но не

ограниченной перечисленными, Аминогликозиды (Амикацин, Арбекацин, Бамбермицины, Бутирозин, Дибекацин, Дигидрострептомицин, Фортимицины, Гентамицин, Канамицин Изепамицин, Микрономицин, Неомицин, Нетилмицин, Паромомицин, Рибостамицин, Сизомицин, Спектиномицин, Стрептомицин, Тобрамицин),

5 Амфениколы (Азидамфеникол, Хлорамфеникол, Тиамфеникол), Ансамицины (Рифамид, Рифампин, Рифамицин SV, Рифапентин, Рифаксимин), β -лактамы, Карбацефемы (Лоракарбеф), Карбапенемы (Биапенем, Дорипенем, Эртапенем, Имипенем, Меропенем, Панипенем), Цефалоспорины (Цефаклор, Цефадроксил, Цефамандол, Цефатризин, Цефазедон, Цефазолин, Цефакапен, Цефдинир, Цефдиторен, Цефепим, Цефетамет,

10 Цефиксим, Цефменоксим, Цефодизим, Цефоницид, Цефоперазон, Цефоранид, Цефоселис, Цефотаксим, Цефотиам, Цефозопран, Цефпимизол, Цефпирамид, Цефпиrom, Цефподоксим, Цефпрозил, Цефроксанид, Цефсулодин, Цефтаролин, Цефтазидим, Цефтерам, Цефтезол, Цефтибутен, Цефтизоксим, Цефтобиопрол медокарил, Цефтриаксон, Цефуроксим, Цефузонам, Цефацетрил, Цефалексин, Цефалоглицин,

15 Цефалоридин, Цефалотин, Цефапирин, Цефрадин, Пивцефалексин), Цефамицины (Цефбуперазон, Цефметазол, Цефминокс, Цефотетан, Цефокситин), Монобактамы (Азtreонам, Карумонам), Оксацифемы (Фломоксеф, Моксалактам), Пенемы (Фаропенем, Ритипенем), Пенициллины (Амдиноциллин, Амдиноциллин пивоксил, Амоксициллин, Ампициллин, Апалциллин, Аспоксициллин, Азидоциллин, Азлоциллин,

20 Бакампициллин, Карбенициллин, Кариндациллин, Клометоциллин, Клоксациллин, Циклациллин, Диклоксациллин, Эпициллин, Фенбенициллин, Флоксациллин, Гетациллин, Ленампициллин, Метамициллин, Метициллин натрия, Мезлоциллин, Нафциллин, Оксациллин, Пенамециллин, Пенетамат гидроиодид, Пенициллин G, Пенициллин G бензатин, Пенициллин G прокайн, Пенициллин N, Пенициллин O, Пенициллин V,

25 Фенетициллин калия, Пиперациллин, Пивампициллин, Пропициллин, Квинациллин, Сулбенициллин, Сультамициллин, Талампициллин, Темоциллин, Тикарциллин), Линкозамиды (Клиндамицин, Линкомицин), Макролиды (Азитромицин, Цетромицин, Кларитромицин, Диритромицин, Эритромицин, Эритромицин ацистрат, Эритромицин эстолат, Эритромицин глюкогептонат, Эритромицин лактобионат, Эритромицин пропионат, Эритромицин стеарат, Фидаксомицин, джозамицин, Леукомицин, Мидекамицины, Миокамицин, Олеандомицин, Примицин, Ротикамицин, Розарамицин, Рокситромицин, Спирамицин, Телитромицин, Тролеандомицин), Полигептиды (Амфомицин, Бацитрацин, Бацитрацин цинка, Капреомицин, Колистин, Далбаванцин, Даптомицин, Эндурацидин, Энвиомицин, Фузафунгин, Грамицидин(ы), Грамицидин S,

35 Изеганан, Оритаванцин, Полимиксин, Квинупристин, Рамопланин, Ристоцетином, Тейкопланин, Телаванцин, Тиострептон, Туберактиномицин, Тироцидин, Тиротрицин, Ванкомицин, Биомицин), Тетрациклины (Хлортетрациклин, Кломоциклин, Демеклоциклин, Доксициклин, Гуамециклин, Лумециклин, Меклоциклин, Метациклин, Миноциклин, Окситетрациклин, Пипациклин, Ролитетрациклин, Тетрациклин,

40 Тигециклин), другие соединения (Циклосерин, Дальфопристин, Фосфомицин, Фузидиевую кислоту, Муцироцин, Пристинамицин, Ретапамулин и Виргинамицин).

В другом варианте реализации композиция по настоящему изобретению дополнительно содержит синтетический антибиотик, выбранный из группы, включающей, но не ограниченной перечисленными, 2,4-диаминопиримидины (Бродимоприм, Иклаприм, Тетроксоприм, Триметоприм), Нитрофураны (Фуралтадон, Фуразолиум хлорид, Ниfurатель, Ниfurфолин, Ниfurпиринол, Ниfurтоинол, Нитрофурантоин) Оксазолидиноны (Линезолид), Пептиды (Омиганан, Пексиганан), хинолоны и аналоги (Балофлоксацин, Безифлоксацин, Циноксацин, Ципрофлоксацин,

- Клинафлоксацин, Эноксацин, Финафлоксацин, Флероксацин, Флумекин, Гареноксацин, Гатифлоксацин, Гемифлоксацин, Грепафлоксацин, Ломефлоксацин, Милоксацин, Моксифлоксацин, Надифлоксацин, Налидиксовую кислоту, Норфлоксацин, Офлоксацин, Оксолиновую кислоту, Пазуфлоксацин, Пефлоксацин, Пипемидовую кислоту,
- 5 Пиромидиновую кислоту, Прулифлоксацин, Розоксацин, Руфлоксацин, Ситафлоксацин, Спарфлоксацин, Тосуфлоксацин, Тровафлоксацин), Сульфаниламиды (ацетил Сульфаметоксиразин, Хлорамин-В, Хлорамина-Т, Дихлорамин Т, Мафенид, Ноприлсульфамид, Фталилсульфацетамид, Фталилсульфатиазол, Салазосульфадимидин, Сукцинилсульфатиазол, Сульфабензамид, Сульфацетамид, Сульфахлорпириазин,
- 10 Сульфахризоидин, Сульфацитин, Сульфадиазин, Сульфадикрамид, Сульфадоксин, Сульфаэтидол, Сульфагуанидин, Сульфагуанол, Сульфален, Сульфалоксовая кислота, Сульфамеразин, Сульфаметер, Сульфаметазин, Сульфаметизол, Сульфаметомидин, Сульфаметоксазол, Сульфаметоксириазин, Сульфаметрол, Сульфамидохризоидин, Сульфамоксол, Сульфаниламид, N4-Сульфанилилсульфаниламид, Сульфанилмочевина,
- 15 15 N-Сульфанилил-3,4-ксиламид, Сульфаперин, Сульфафеназол, Сульфапроксилин, Сульфапиразин, Сульфапиридин, Сульфатиазол, Сульфатиомочевина, Сульфизомидин, Сульфисоксазол), Сульфоны (Ацедиасульфон натрия, Дапсон, Глюкосульфон натрия, Сукцисульфон, Сульфаниловую кислоту, п-Сульфанилилбензиламин, Сульфоксон натрия, Тиазолсульфон), Клофоктол, Метенамин, Метронидазол, Нитроксолин,
- 20 Тауролидин и Ксиборнол.

В другом варианте реализации композиция по настоящему изобретению дополнительно содержит антибиотик, выбранный из группы, включающей, но не ограниченной перечисленными, Ацедиасульфон натрия, Амикацин, Аминосалициловую кислоту, Амоксициллин, Ампициллин, Апрамицин, Арбекацин сульфат, Арсаниловую кислоту, Аспоксициллин, Астромицин сульфат, Авилицин, Авопарцин, Азидамфеникол, Азидоциллин натрия, Азитромицин, Азлоциллин, Азтреонам, Бакампициллин гидрохлорид, Бацитрацин, Балофлоксацин, Бамбермицин, Баквилоприм, Беканамицин сульфат, Бенетамин пенициллин, Бензатин бензилпенициллин, Бензатин феноксиметилпенициллин, Бензилпенициллин, Бесифлоксацин, Бетамиpron, Биапенем, Бродимоприм, Капреомицин сульфат, Карбадокс, Карбенициллин натрия, Кариндациллин натрия, Карумонам натрия, Цефаклор, Цефадроксил, Цефалексин, Цефалониум, Цефалоридин, Цефалотан натрия, Цефамандол, Цефапирин натрия, Цефатризин, Цефазолин, Цефбуперазон, Цефакапен пивоксил гидрохлорид, Цефдинир, Цефдиторен пивоксил, Цефепим гидрохлорид, Цефетамет, Цефиксим, Цефменоксим гидрохлорид, Цефметазол, Цефминокс натрия, Цефодизим натрия, Цефоницид натрия, Цефоперазон натрия, Цефоранид, Цефоселис сульфат, Цефотаксим натрия, Цефотетан, Цефотиам гидрохлорид, Цефовицин натрия, Цефокситин натрия, Цефозопран гидрохлорид, Цефпирамид, Цефпиром сульфат, Цефподоксим прокселил, Цефпрозил, Цефквином сульфат, Цефрадин, Цефсулодин натрия, Цефтаролин фозамил ацетат,

30 Цефтазидим, Цефтерам пивоксил, Цефтезол натрия, Цефтибутен, Цефтиофур, Цефтизоксим натрия, Цефтобипрол медокарил, Цефтриаксон натрия, Цефуроксим, Цетромицин, Хлорамфеникол, Хлороксин, Хлорквиналдол, Хлортетрациклин, Циклациллин, Циластатин натрия, Циноксацин, Ципрофлоксацин, Кларитромицин, Клавулановую кислоту, Пенициллин клемизол, Клиндамицин, Клиохинол, Клофазимин,

35 40 Клофоктол, Клометоциллин калия, Клоксациллин, Колистин сульфат, Ко-тетроксазин, Ко-трифамол, Ко-тримоксазол, Циклосерин, Далбаванцин, Данофлоксацин мезилат, Дапсон, Даптомицин, Деланамид, Демеклоциклин, Дибекацин сульфат, Диклоксациллин, Дифлоксацин гидрохлорид, Дигидрострептомицин сульфат, Диритромицин, Дорипенем,

Доксициклин, Эноксацин, Энрофлоксацин, Эртапенем натрия, Эритромицин, Этамбутол гидрохлорид, Этионамид, Этимицин сульфат, Фаропенем натрия, Фидаксомицин, Флероксацин, Фломоксеф натрия, Флорфеникол, Флуклоксациллин, Флумекин, Флуритромицин этилсукиннат, Формосульфатиазол, Фосфомицин, Фрамицетин сульфат, 5 Фтивазид, Фуралтадон гидрохлорид, Фуразидин, Фузафунгин, Фузидиевую кислоту, Гамиромицин, Гареноксацин мезилат, Гатифлоксацин, Гемифлоксацин мезилат, Гентамицин сульфат, Грамицидин, Грамицидин С, Галквинол, Ибафлоксацин, Иклаприм, Имипенем, Изепамицин, Изониазид, Джозамицин, Канамицин кислый сульфат, Китазамицин, Латамоксев динатрия, Левофлоксацин, Линкомицин, Линезолид, 10 Ломефлоксацин гидрохлорид, Лоракарбеф, Лимециклин, Мафенид, Магаинины, Миндалльную кислоту, Марбофлоксацин, Мециллинам, Меклоциклин, Мелеумицин, Меропенем, Метациклин, Метенамин, Метициллин натрия, Мезлоциллин, Микрономицин сульфат, Мидекамицин, Миноциклин, Миронамид, Моксифлоксацин гидрохлорид, Муцироцин, Надифлоксацин, Нафциллин натрия, Налидиксовую кислоту, 15 Неомицин, Нетилмицин сульфат, Ниfurоксазид, Ниfurпиринол, Ниfurтоинол, Ниfurзид, Низин, Нитрофурантоин, Нитрофуразон, Нитроксолин, Норфлоксацин, Норванкомицин гидрохлорид, Новобиоцин, Офлоксацин, Олеандомицин фосфат, Орбифлоксацин, Оритаванцин, Орметоприм, Оксациллин натрия, Оксолиновую кислоту, Окситетрациклин, Панипенем, Пазуфлоксацин мезилат, Пефлоксацин мезилат, 20 Пенетамат гидроиодид, Фенетициллин калия, Феноксиметилпенициллин, Фталилсульфацетамид, Фталилсульфатиазол, Пипемидовую кислоту, Пиперациллин, Пирлимицин гидрохлорид, Пиромидиновую кислоту, Пивампициллин, Пивмекиллинам, Полимиксин В сульфат, Прадофлоксацин, Пристинамицина, Прокайн бензилпенициллин, Пропициллин калия, Протионамид, Прулифлоксацин, Пиразинамид, Квинупристин/ 25 дальфопристин, Рамопланин, Ретапамулин, Рибостамицин сульфат, Рифабутин, Рифамицин, Рифамицин натрия, Рифапентин, Рифаксимин, Рокитамицин, Ролитетрациклин, Розоксацин, Рокситромицин, Руфлоксацин гидрохлорид, Сарафлоксацин гидрохлорид, Сизомицин сульфат, Ситафлоксацин, Спарфлоксацин, Спектиномицин, Спирамицин, Стрептомицин, Сукциниосульфатиазол, Сульбактам, 30 Сульбенициллин натрия, Сульфабензамид, Сульфакарбамид, Сульфацетамид, Сульфахлорпиридазин, Сульфахризоидин, Сульфаклозин, Сульфадиазин, Сульфадиазин серебра, Сульфадикрамид, Сульфадиметоксин, Сульфадимидин, Сульфадоксин, Сульфафуразол, Сульфагуанидин, Сульфамеразин, Сульфаметизол, Сульфаметоксазол, Сульфаметоксипиридазин, Сульфаметилтиазол, Сульфаметопиразин, Сульфаметрол, 35 Сульфамонометоксин, Сульфамоксол, Сульфаниламид, Сульфапиридин, Сульфаквиноксалин, Сульфатиазол, Сульфатиазол серебра, Сульфатроксазол, Сульфизомидин, Сультамициллин, Тауролидин тазобактам натрия, Тейкопланин, Телаванцин, Телитромицин, Темоциллин, Теризидон, Тетрациклин, Тетроксоприм, Теноевую кислоту, Тиамфеникол, Тиоацетазон, Тиострептон, Тиамулин, Тикарциллин 40 мононатриевый, Тигециклин, Тилдипирозин, Тилмикозин, Тобрамицин, Тосуфлоксацин, Триметоприм, Тролеандомицин, Тулатромицин, Тилозин, Тилвалозин тартрат, Тиротрицин, Валнemuлин, Ванкомицин, Виргиниамицин и Ксиборнол.

Предпочтительно, композиция согласно настоящему изобретению содержит дополнительно антибиотик, выбранный из группы, включающей, но не ограниченной 45 перечисленными, пенициллин G, пенетамат, клоксациллин, нафциллин, ампициллин, амоксициллин, клавулановую кислоту, гентамицин, стрептомицин, неомицин, фрамицетин, тетрациклины, тилмикозин и пирлимицин.

Композиция, согласно изобретению, может дополнительно содержать

вспомогательное вещество, выбранное из группы, включающей, но не ограниченной перечисленными, связующие вещества и добавки для прессования, покрытия и пленки, красители, растворители и носители, разрыхлители, эмульгаторы и солюбилизаторы, ароматизаторы и подсластители, репелленты, вещества, способствующие скольжению, 5 и смазывающие вещества, пластификаторы, консерванты, пропелленты, растворители, стабилизаторы, суспендирующие агенты и усилители вязкости. В одном из вариантов реализации изобретения композиция дополнительно содержит лимонную кислоту. Следует понимать, что такие вспомогательные вещества могут привести к любому изменению рН композиции.

10 Композиция быть представлена в форме герметика для соска, содержащего полиэфирный ионофор, как описано в настоящей заявке, вместе с гелеобразующим веществом, например, таким, которое обычно применяют в данной области. Например, висмута субнитрат 65% (вес./вес.) на парафиновой гелевой масляной основе, или висмута субнитрат, жидкий парафин, стеарат алюминия и гелевой основе.

15 В соответствии с еще одним аспектом изобретения предлагается терапевтическое устройство для применения в лечении мастита у субъекта, при этом такое устройство содержит инжектор для интрамаммарного введения и композицию согласно настоящему изобретению, содержащую терапевтически эффективное количество полиэфирного ионофора или его терапевтически приемлемую соль.

20 В соответствии с еще одним аспектом настоящего изобретения предложено устройство ветеринарного назначения для применения в лечении мастита у субъекта, при этом такое устройство содержит инжектор для интрамаммарного введения и композицию, согласно настоящему изобретению, содержащую терапевтически эффективное количество полиэфирного ионофора или его терапевтически приемлемую соль.

25 Предпочтительно, устройство адаптировано для немедленного, замедленного или контролируемого высвобождения ионофора.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к применению полиэфирного ионофора или его терапевтически приемлемой соли, в изготовлении лекарственного средства для лечения или предотвращения мастита у субъекта. Предпочтительно, 30 применение включает введение терапевтически эффективного количества полиэфирного ионофора или его терапевтически приемлемую соль, в молочную железу субъекта. Предпочтительно, полиэфирный ионофор вводят субъекту в дозе в диапазоне от 20 мг на канал соска до 900 мг на канал соска или 50 мг на канал соска до 600 мг на канал соска.

35 В другом аспекте изобретение представляет собой способ, композицию, устройство или применение, по существу как описано в настоящей заявке со ссылкой на прилагаемые примеры и чертежи.

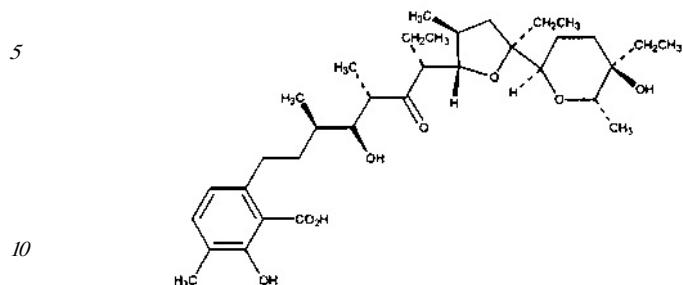
В другом аспекте настоящее изобретение представляет собой композицию, устройство, а также применение, по существу как описано в настоящей заявке со ссылкой на 40 прилагаемые примеры и чертежи.

Термины, используемые в данном документе, имеют свои обычные значения в данной области, если не указано иначе. Как изложено в настоящем документе используются следующие термины, относящиеся к полиэфирным ионофорам:

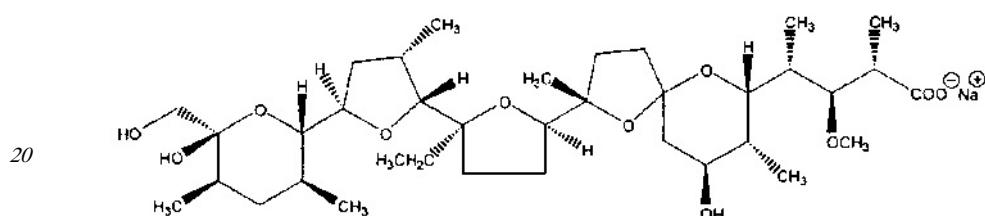
45 В отношении примеров и чертежей, LP 1088 относится к салиномицину; LP 1369 относится к лазалоиду; LP 4525 относится к наразину; LP 6315 относится к мадурамицину; LP 9666 относится к монензину.

При использовании в настоящей заявке термин лазалоид (также известный как Аватек, Боватек, антибиотик X-537A, ионофор X-4537A и Ro 2-2985, регистрационный

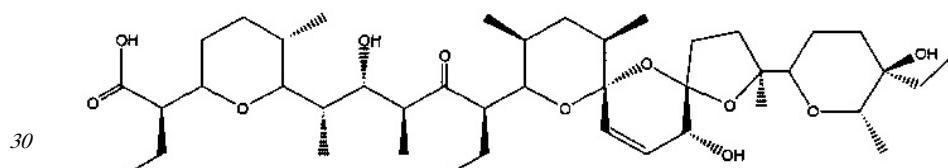
номер CAS 25999-31-9 (кислота), 25999-20-6 (натриевая соль)) относится к соединению, имеющему следующую химическую структуру:



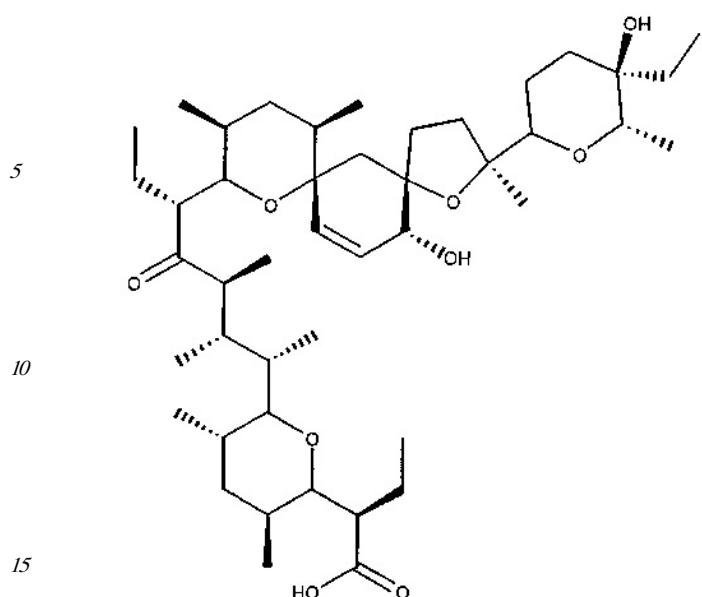
При использовании в настоящей заявке термин монензин, (также известный как Кобан, Руменсин, Монензиновая кислота и 3823A, регистрационный номер CAS 17090-79-8 (кислота), 22373-78-0 (натриевая соль)) относится к соединению, имеющему 15 следующую химическую структуру:



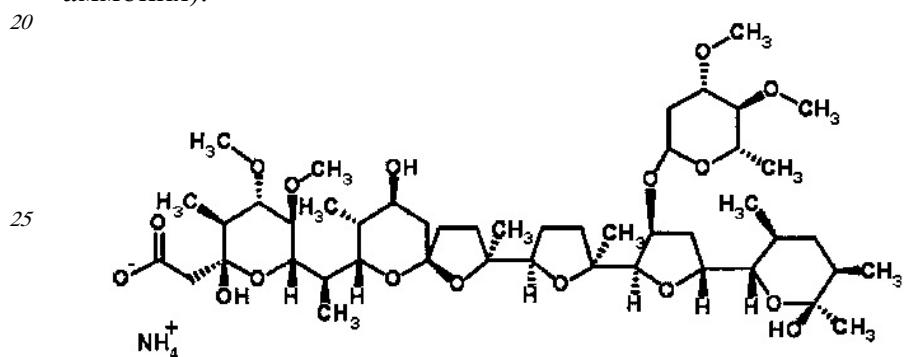
При использовании в настоящей заявке термин салиномицин (также известный как Коксистак, Позистак, Салоцин, Овикокс, AHR-3096, K-364 и K-748364A, CAS 25 регистрационный номер 53003-10-4 (кислоты), 55721-31-8 (натриевая соль)) относится к соединению, имеющему следующую химическую структуру:



При использовании в настоящей заявке термин наразин (также известный как Монтебан, 4-метилсалиномицин, соединение 79891, A-28086 фактора A, C-7819B, регистрационный номер CAS 55134-13-9 (кислота)) относится к соединению, имеющему 35 следующую химическую структуру:



При использовании в настоящей заявке термин мадурамицин относится к соединению, имеющему следующую химическую структуру (представлен ниже как мадурамицин аммония):



Преимуществом настоящего изобретения является то, что композиции, описанные в настоящей заявке, применяются в способе лечения и предотвращения мастита. Интрамаммарное введение может быть осуществлено с помощью инжекторов для интрамаммарного введения или герметиков для сосков в соответствии со стандартными процедурами, известными в данной области техники. Интрамаммарное применение композиций согласно изобретению, как ожидается, приведет к лечению и предотвращению мастита у субъекта за счет действия полизэфирного ионофора при минимальной системной абсорбции через барьер молочная железа/кровь у субъекта. Таким образом, для лечения мастита могут применяться терапевтически эффективные количества полизэфирного ионофора без воздействия на субъект по существу токсических доз вещества.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Дополнительные признаки настоящего изобретения более полно описаны в последующем описании нескольких не ограничивающих вариантов его реализации. Данное описание представлено исключительно для иллюстрации настоящего изобретения. Описанные варианты реализации изобретения никоим образом не ограничивают краткого описания, раскрытия или описания изобретения, как изложено выше. Описание приведено со ссылкой на прилагаемые фигуры, где:

Фигура 1 представляет собой таблицу, в которой приведена коллекция изолятов с указанием вида позвоночного, из которого были получены данные изоляты, с

последующей биохимической характеристикой видов *Staphylococcus*, включая профиль устойчивости в соответствии с Примером 1. СI означает клиндамицин, Enr - энрофлоксацин, Е - эритромицин, G - гентамицин, О - оксациллин, Р - пенициллин G, Тe - тетрациклин, Тm - триметоприм-сульфаметоксазол;

5 Фигура 2 представляет собой схематическое изображение 96-луночного планшета для теста, выявляющего минимальную ингибирующую концентрации в соответствии с Примером 1;

Фигура 3 представляет собой схематическое изображение теста, выявляющего минимальную бактерицидную концентрацию, при этом затемненные области

10 представляют собой расположение лунок объемом 10 мкл в двух повторностях, а стрелка указывает на увеличивающиеся концентрации в направлении по часовой стрелке вокруг чашки в соответствии с Примером 1;

на Фигуре 4 показан график минимальной ингибирующей концентрации (МИК) для индивидуальных изолятов, разделенных на метициллин-чувствительные и метициллин-устойчивые штаммы; значения выше 128 мкг/мл соответствуют штаммам, для которых не было получено значений МИК в диапазоне тестируемых концентраций (0,25-128 мкг/мл) в соответствии с Примером 1;

на Фигуре 5 приведена таблица, иллюстрирующая МИК₅₀, МИК₉₀ и диапазон МИК для метициллин-чувствительных штаммов для ампициллина и пяти тестируемых соединений в соответствии с Примером 1;

на Фигуре 6 приведена таблица, иллюстрирующая МИК₅₀, МИК₉₀ и диапазон МИК для метициллин-устойчивых штаммов для ампициллина и пяти тестируемых соединений в соответствии с Примером 1;

25 на Фигуре 7 приведен график минимальных бактерицидных концентраций (МБК) для отдельных штаммов, разделенных на метициллин-чувствительные и метициллин-устойчивые штаммы; значения выше 128 мкг/мл соответствуют штаммам, для которых не было получено значений МБК в диапазоне тестируемых концентраций (0,25-128 мкг/мл) в соответствии с Примером 1;

на Фигуре 8 приведена таблица, иллюстрирующая МБК₅₀, МБК₉₀ и диапазон МБК для метициллин-чувствительных штаммов для пяти тестируемых соединений в соответствии с Примером 1;

на Фигуре 9 приведена таблица, иллюстрирующая МБК₅₀, МБК₉₀ и диапазон МБК для метициллин-устойчивых штаммов для пяти тестируемых соединений в соответствии с Примером 1;

на Фигуре 10 приведен график, иллюстрирующий измерения оптической плотности, полученные для микроразведений в анализе время-элиминация (time-kill) для ATCC 49775 в течение 48 часов с использованием различных концентраций ампициллина, LP 1369 и LP 6315, по сравнению с кривой роста, в соответствии с Примером 1;

40 на Фигуре 11 приведен график, иллюстрирующий измерения оптической плотности, полученные для микроразведений в анализе time-kill для MSS 1 в течение 48 часов с использованием различных концентраций ампициллина, LP 1369 и LP 6315, по сравнению с кривой роста, в соответствии с Примером 1;

на Фигуре 12 приведен график, иллюстрирующий измерения оптической плотности, 45 полученные для микроразведений в анализе time-kill для MSS 11 в течение 48 часов с использованием различных концентраций ампициллина, LP 1369 и LP 6315, по сравнению с кривой роста, в соответствии с Примером 1;

на Фигуре 13 приведен график, иллюстрирующий измерения оптической плотности,

полученные для микроразведений в анализе time-kill для MRSA в течение 48 часов с использованием различных концентраций ампициллина, LP 1369 и LP 6315, по сравнению с кривой роста, в соответствии с Примером 1;

на Фигуре 14 приведен график, иллюстрирующий количество жизнеспособных

5 колоний (log10) для ATCC 49775 в течение 24 ч при сравнении введения однократной, четырехкратной и восьмикратной МИК LP 1369, однократной и четырехкратной МИК ампициллина в соответствии с Примером 1;

на Фигуре 15 приведен график, иллюстрирующий количество жизнеспособных колоний (log10) для MRSA 9 в течение 24 ч при сравнении введения однократной,

10 четырехкратной и восьмикратной МИК LP 1369, однократной и четырехкратной МИК ампициллина в соответствии с Примером 1;

на Фигуре 16 приведена таблица, в которой указано изменение количества КОЕ/мл (log10) для ATCC 49775 и MRSA 9 в течение 24 часов при различных концентрациях ампициллина или LP 1369, по сравнению с контрольными показателями роста в

15 соответствии с Примером 1;

на Фигуре 17 приведен график, иллюстрирующий количество жизнеспособных колоний (log10) для ATCC 49775 в течение 24 ч при сравнении введения однократной, четырехкратной и восьмикратной МИК LP 6315, однократной и четырехкратной МИК ампициллина в соответствии с Примером 1;

20 на Фигуре 18 приведен график, иллюстрирующий количество жизнеспособных колоний (log10) для MRSA 9 в течение 24 ч при сравнении введения однократной, четырехкратной и восьмикратной МИК LP 6315, однократной и четырехкратной МИК ампициллина в соответствии с Примером 1;

на Фигуре 19 приведена таблица, в которой указано изменение количества КОЕ/мл

25 (log10) для ATCC 49775 и MRSA 9 в течение 24 часов при различных концентрациях ампициллина или LP 6315, по сравнению с контрольными показателями роста в соответствии с Примером 1;

на Фигуре 20 показан график, иллюстрирующий показания оптической плотности, полученные в анализе токсичности эритроцитов для каждого испытуемого соединения

30 при различных концентрациях, а также положительных и отрицательных контролей, и показания только для крови в соответствии с Примером 1; и

Фигура 21 представляет собой таблицу, в которой приведена коллекция изолятов и указаны породы собак, из которых они были получены, с последующей биохимической характеристикой изолятов *Staphylococcus pseudintermedius*, включая профиль

35 устойчивости в соответствии с Примером 2;

Фигура 22 представляет собой таблицу, в которой приведен профиль устойчивости изолятов *Staphylococcus pseudintermedius*, собранных согласно Примеру 2;

Фигура 23 представляет собой таблицу, в которой приведен профиль МИК для ампициллина и соединений LP в отношении изолятов *Staphylococcus pseudintermedius*,

40 собранных согласно Примеру 2;

на Фигуре 24 представлено схематическое изображение, иллюстрирующее компоновку 96-луночного микротитрационного планшета для тестирования минимальной ингибирующей концентрации в соответствии с Примером 3;

Фигура 25 представляет собой таблицу, показывающую диапазон МИК₅₀, МИК₉₀,

45 МИК и диапазон МБК₅₀, МБК₉₀ и МБК для каждого испытуемого соединения согласно Примеру 3;

Фигура 26 представляет собой таблицу, показывающую диапазон МИК₅₀, МИК₉₀,

МИК и диапазон МБК₅₀, МБК₉₀ и МБК для каждого тестируемого соединения в отношении 14 изолятов *Staphylococcus aureus* согласно Примеру 3;

Фигура 27 представляет собой таблицу, показывающую диапазон МИК₅₀, МИК₉₀,
⁵ МИК и диапазон МБК₅₀, МБК₉₀ и МБК для каждого тестируемого соединения в
отношении шести коагулазонегативных изолятов *Staphylococcus aureus* согласно Примеру
3;

Фигура 28 представляет собой таблицу, показывающую диапазон МИК₅₀, МИК₉₀,
МИК и диапазон МБК₅₀, МБК₉₀ и МБК для каждого тестируемого соединения в
¹⁰ отношении 12 изолятов *Staphylococcus agalactiae* согласно Примеру 3;

Фигура 29 представляет собой таблицу, показывающую диапазон МИК₅₀, МИК₉₀,
МИК и диапазон МБК₅₀, МБК₉₀ и МБК для каждого тестируемого соединения в
отношении шести изолятов *Staphylococcus uberis* согласно Примеру 3;

Фигура 30 представляет собой таблицу, показывающую профили изолятов,
¹⁵ полученных из мастита коров, в соответствии с Примером 3;

Фигура 31 представляет собой таблицу, показывающую МИК индивидуальных
изолятов из мастита коров, в соответствии с Примером 3;

Фигура 32 представляет собой таблицу, показывающую МБК индивидуальных
²⁰ изолятов из мастита коров, в соответствии с Примером 3;

Фигура 33 представляет собой график, показывающий взвешенные ВДП (верхние
доверительные пределы) концентрации LP1369 в молоке на 3 доения для коров,
однократно подвергнутых лечению с использованием «микроразмера»;

Фигура 34 представляет собой график, показывающий взвешенные ВДП концентрации
²⁵ LP1369 в молоке на 3 доения для коров, однократно подвергнутых лечению с
использованием «наноразмера»;

Фигура 35 представляет собой график, показывающий взвешенные ВДП концентрации
LP1369 в молоке на 3 доения для коров, однократно подвергнутых лечению с
использованием РВР;

Фигура 36 представляет собой таблицу, в которой приведены результаты
³⁰ микробиологического анализа проб молока, взятых до инфекции, после инфекции и
после лечения, как описано в Примерах 7 и 8;

Фигура 37 представляет собой график, показывающий взвешенные верхние
доверительные пределы концентрации LP1369 в молоке на 4 доения для четвертей
³⁵ вымени, подвергнутых лечению 6 раз (последовательные доения) с использованием
IVP1;

Фигура 38 представляет собой график, показывающий взвешенные верхние
доверительные пределы концентрации LP1369 в молоке на 4 доения для четвертей
вымени, подвергнутых лечению 6 раз (последовательные доения) с использованием
⁴⁰ IVP2.

ОПИСАНИЕ ВАРИАНТОВ РЕАЛИЗАЦИИ

Общая часть

Перед описанием настоящего изобретения в деталях, следует понимать, что
изобретение не ограничивается конкретными способами, приведенными в качестве
⁴⁵ примеров, или композициями, описанных в данном документе. Также следует понимать,
что используемая здесь терминология предназначена только описания конкретных
вариантов реализации изобретения, и не является ограничивающей.

Все публикации, упоминаемые в настоящей заявке, в том числе патенты и заявки на
патент, включены посредством ссылок в полном объеме. Однако заявки, упомянутые

в настоящем документе, приведены просто в целях описания и раскрытия способов, протоколов и реагентов, указанных в публикации, которые, могут быть использованы в связи с настоящим изобретением. Цитирование какой-либо публикации в данном документе не следует толковать как признание того, что изобретение не имеет права 5 датироваться более ранним числом на основании предшествующего изобретения.

Кроме того, при осуществлении настоящего изобретения специалистами в данной области техники используются, если не указано иное, стандартные микробиологические методы. Такие стандартные методы известны специалистам в данной области.

В настоящем описании и в прилагаемой формуле изобретения, формы слов, 10 приведенные в единственном числе, включают также множественное число, если из контекста явно не следует иное.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые здесь, имеют те же значения, которые обычно понятны среднему специалисту в области, к которой относится данное изобретение. Хотя для осуществления настоящего 15 изобретения могут использоваться любые материалы и методы, аналогичные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящей заявке, предпочтительные материалы и методы описаны в данном документе.

Изобретение, описанное в настоящей заявке, может включать один или несколько диапазонов значений (например, размер, концентрация, доза и т.д.). Следует понимать, 20 что диапазон значений включает все значения в пределах диапазона, в том числе значения, определяющие диапазон, и значения, примыкающие к диапазону, которые обеспечивают такой же или по существу такой же результат, как и значения, непосредственно примыкающие к тому значению, которое определяет границу диапазона.

25 Выражение «терапевтически эффективное количество» при использовании в настоящей заявке относится к количеству, достаточному для ингибирования роста бактерий, связанного с бактериальным носительством или маститом. То есть, упоминание введения терапевтически эффективного количества полиэфирных ионофоров согласно способам или композиций по настоящему изобретению относится к терапевтическому эффекту, в котором существенная бактерицидная или 30 бактериостатическая активность вызывает существенное ингибирование мастита. Термин «терапевтически эффективное количество» при использовании в настоящей заявке относится к нетоксичному, но достаточному для обеспечения желаемого биологического, терапевтического и/или профилактического результата количеству 35 композиции. Желаемые результаты включают устранение бактериального носительства или уменьшение и/или облегчение признаков, симптомов или причин заболевания или любое другое желаемое изменение биологической системы. Эффективное количество в каждом отдельном случае может быть определено одним из специалистов в данной области техники с использованием стандартных экспериментов. По отношению к 40 фармацевтической или ветеринарной композиции, эффективные количества могут представлять собой дозы, рекомендуемые для изменения болезненного состояния или признаков, или их симптомов. Эффективные количества различаются в зависимости от применяемой ветеринарной композиции и применяемого способа введения. Эффективные количества обычно оптимизированы с учетом различных факторов 45 конкретного пациента, таких как возраст, вес, пол и т.д., и области, подверженной заболеванию, или микроорганизмов, вызвавших заболевание.

Как указано в настоящем описании термины «микроорганизм/микроб» и «микробный» относятся к микроскопическому организму, включающему либо

одиночные клетки, либо кластеры клеток, и охватывают, но не ограничены перечисленными, прокариотические формы, такие как бактерии и архебактерии; и эукариотические формы, такие как простейшие, грибы, водоросли. Предпочтительно термин «микроорганизм/микроб» и «микробный» относится к прокариотам и

5 эукариотам. Прокариоты могут охватывать бактерий, таких как *Staphylococcus* spp, *Streptococcus* spp, *Bacillus* spp, *Enterococcus* spp, *Listeria* spp, *Mycoplasma* spp и анаэробные бактерии. Термины могут относиться к чувствительному к антибиотикам или устойчивому к антибиотикам штамму. В предпочтительном варианте реализации термины относятся к MRSA. В другом предпочтительном варианте реализации термины

10 относятся к MRSP.

В одном варианте реализации термины «микроорганизм/микроб» и «микробный» относятся к одному или более коагулазонегативных стафилококков (КНС):

15 *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus felis*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus caprae*, *Staphylococcus cohnii* subsp. *Cohnii*, *Staphylococcus cohnii* subsp. *urealyticus*, *Staphylococcus capitis* subsp. *capitis*, *Staphylococcus capitis* subsp. *urealyticus* и *Staphylococcus hyicus*.

20 В другом варианте реализации термины «микроорганизм/микроб» и «микробный» относятся к одному или более из коагулазопозитивных стафилококков: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus delphini*, *Staphylococcus schleiferi* subsp. *Coagulans* и *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius*.

25 В другом варианте реализации бактериальный агент относится к роду *Streptococcus*. Например, бактериальный агент может быть выбран из группы, включающей, но не ограниченной перечисленными, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus* и *Streptococcus equinus*. Бактерии могут быть выделены из коровьего молока.

30 В другом варианте реализации термины «микроорганизм/микроб» и «микробный» относятся к одному или более из бактериальных агентов рода *Bacillus*: *Bacillus melaninogenicus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* и *Bacillus anthracis*.

35 В другом варианте реализации термины «микроорганизм/микроб» и «микробный» относятся к одному или более из бактериальных агентов рода *Enterococcus*: *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* и *Enterococcus durans*.

В другом варианте реализации термины «микроорганизм/микроб» и «микробный» относятся к одному или более из бактериальных агентов рода *Listeria*: такому, как *Listeria monocytogenes*.

40 В другом варианте реализации термины «микроорганизм/микроб» и «микробный» относятся к одной или более из анаэробных бактерий: *Clostridium perfringens*, *Actinomyces bovis*, *Propionibacterium acnes*, *Propionibacterium granulosum*, *Eubacterium*, *Peptococcus indolicus* и *Peptostreptococcus anaerobius*.

45 В другом варианте реализации термины «микроорганизм/микроб» и «микробный» относятся к одному или более из видов рода *Mycoplasma*, такому как: *Mycoplasma bovis*.

В другом варианте реализации термины «микроорганизм/микроб» и «микробный» относятся к одному или более из грибов рода *Malassezia*.

В другом варианте реализации термин «лечение» относится к полному или частичному снятию симптомов и признаков заболевания. Например, при лечении мастита, лечение

5 полностью или частично снимает симптомы мастита. Предпочтительно при лечении мастита (например, при лечении коров) лечение снижает число соматических клеток ниже 280000 клеток/мл (линейный счет ≥ 5). Предпочтительно лечение снижает число соматических клеток ниже 280000 клеток/мл (линейный счет ≥ 5) на процент, выбранный из группы, включающей: на 10%; на 20%; на 50%; 80%; на 90% и на 95%.

Ветеринарные и фармацевтические приемлемые соли включают соли, которые сохраняют биологическую эффективность и свойства соединений согласно настоящему изобретению и которые не являются биологически или иным образом нежелательными. Во многих случаях соединения, описанные в настоящей заявке здесь, способны

10 образовывать кислотные и/или основные соли в силу наличия амино и/или карбоксильных групп, или групп подобных им. Ветеринарные и фармацевтические приемлемые аддитивные соли могут быть получены из неорганических и органических оснований. Соли, полученные из неорганических оснований, включают, в качестве примера, соли натрия, калия, лития, аммония, кальция и магния. Соли, полученные из 15 органических оснований, включают, но не ограничиваются перечисленными, соли первичных, вторичных и третичных аминов, таких как, только в качестве примера, алкиламины, dialкиламины, триалкиламины, замещенные алкиламины, ди- (замещенный алкил) амины, три (замещенный алкил) амины, алкениламины, диалкениламины, триалкениламины, замещенные алкениламины, ди- (замещенный алкенил) амины, три- 20 (замещенный алкенил) амины, циклоалкиламины, ди- (циклоалкил) амины, три- (циклоалкил) амины, замещенные циклоалкиламины, дизамещенные циклоалкиламины, тризамещенные циклоалкиламины, циклоалкениламины, ди(циклоалкенил)амины, три (циклоалкенил)амины, замещенные циклоалкениламины, дизамещенные циклоалкениламины, тризамещенные циклоалкениламины, ариламины, диариламины, 25 триариламины, гетероариламины, дигетероариламины, тригетероариламины, гетероциклические амины, дигетероциклические амины, тригетероциклические амины, смешанные ди- и триамины, где по меньшей мере два из заместителей у амина различаются между собой и выбраны из группы, включающей алкил, замещенный алкил, алкенил, замещенный алкенил, циклоалкил, замещенный циклоалкил, 30 циклоалкенил, замещенный циклоалкенил, арил, гетероарил, гетероциклик и т.п. Также охвачены амины, где два или три заместителя вместе с атомом азота из аминогруппы образуют гетероциклическую или гетероарильную группу.

Ветеринарные и фармацевтические приемлемые кислотно-аддитивные соли могут быть получены из неорганических и органических кислот. Неорганические кислоты, 35 которые могут быть использованы для этой цели, включают, в качестве примера, соляную кислоту, бромистоводородную кислоту, серную кислоту, азотную кислоту, фосфорную кислоту и т.п. Органические кислоты, которые могут быть использованы для этой цели, включают, в качестве примера, уксусную кислоту, пропионовую кислоту, гликолевую кислоту, пировиноградную кислоту, щавелевую кислоту, яблочную кислоту, 40 малоновую кислоту, янтарную кислоту, малеиновую кислоту, фумаровую кислоту, винную кислоту, лимонную кислоту, бензойную кислоту, коричную кислоту, миндальную кислоту, метансульфоновую кислоту, этансульфоновую кислоту, п-толуолсульфоновую кислоту, салициловую кислоту и т.п.

Ветеринарные и фармацевтические приемлемые соли соединений, применяемых в 45 настоящем изобретении, могут быть синтезированы из исходного соединения, которое содержит основную или кислотную группу, обычным химическими способами. Как правило, такие соли могут быть получены взаимодействием свободных кислотных или основных форм указанных соединений со стехиометрическим количеством

соответствующего основания или кислоты в воде или в органическом растворителе или в смеси двух. Как правило, предпочтительны неводные среды, такие как эфир, этилацетат, этанол, изопропанол или ацетонитрил. Списки подходящих солей можно найти в справочнике Ремингтона Remington's Pharmaceutical Sciences. 17th ed., Mack

- 5 Publishing Company, Easton, Pa. (1985), p. 1418, включено в настоящее описание посредством ссылки. Примерами таких ветеринарных приемлемых солей являются иодид, ацетат, фенилацетат, трифторацетат, акрилат, аскорбат, бензоат, хлорбензоат, динитробензоат, гидроксибензоат, метоксибензоат, метилбензоат, о-ацетоксибензоат, нафталин-2-бензоат, бромид, изобутират, фенилбутират, γ -гидроксибутират, β -гидроксибутират, бутин-1,4-диоат, гексин-1,4-диоат, гексин-6-диоат, капроат, каприлат, хлорид, циннамат, цитрат, деканоат, формиат, фумарат, гликолат, гептаноат, гиппурат, лактат, малат, малеат, гидроксималеат, малонат, манделат, мезилат, никотинат, изоникотинат, нитрат, оксалат, фталат, терефталат, фосфат, моногидрофосфат, дигидрофосфат, метафосфат, пирофосфат, пропионат, пропионат, фенилпропионат, 15 салицилат, соль себациновой кислоты, сукцинат, суберат, сульфат, бисульфат, пиросульфат, сульфит, бисульфит, сульфонат, бензолсульфонат, п-бромфенилсульфонат, хлорбензолсульфонат, пропансульфонат, этансульфонат, 2-гидроксиэтансульфонат, метансульфонат, нафталин-1-сульфонат, нафталин-2-сульфонат, р-толуолсульфонат, ксилолсульфонат, тартрат и т.п.

20 Следует понимать, что тип микробных инфекций, для лечения которых предназначены способы согласно настоящему изобретению, включают инфекции молочной железы.

Инtramаммарные инфекции могут привести к субклиническому или клиническому маститу. Субклинический мастит включает инфекции без видимых признаков местного воспаления или участия системного ответа, и он может привести к времененным 25 нарушениям лактации или воспалению вымени, которые, как правило, протекают бессимптомно. При персистенции инфекции мастит может быть определен как хронический. Диагностика может быть осуществлена путем оценки содержания соматических кровяных клеток (таких как, например, нейтрофилы) в молоке с помощью стандартных тестов, известных в данной области, таких как California Mastitis Test или 30 автоматизированными методами, предусмотренными организациями по улучшению молочного стада. В целом по числу соматических клеток в молоке определяют наличие инфекции. В качестве примера, коровы с числом соматических клеток ≥ 280000 клеток/мл (линейный балл ≥ 5) имеют $>80\%$ вероятность наличия инфекции. Возбудитель инфекции может быть идентифицирована путем оценки бактериальной культуры в 35 молоке в соответствии со стандартными процедурами, известными в данной области техники.

Клинический мастит включает воспалительный ответ на инфекцию, следствием которого является образование визуально аномального молока. Признаки воспаления могут включать в себя изменения вымени (отек, жжение, боль, покраснение). Легкие 40 клинические случаи включают только местные признаки. Тяжелые клинические случаи включают системный ответ (лихорадка, анорексия, шок) и быстрое возникновение.

Композиции, описанные в настоящей заявке, могут быть приготовлены для инtramаммарного введения за счет заключения таких лекарственных форм в эмульсии «масло-в-воде» или эмульсии «вода-в-масле». В таком препарате лекарственная форма 45 с быстрым высвобождением находится в непрерывной фазе, а лекарственная форма с замедленным высвобождением находится в виде дисперсной фазы. Также лекарственный препарат может быть приготовлен для доставки трех лекарственных форм, как описано выше. Например, может быть предусмотрена эмульсия «масло-в-воде-в-масле», при

этом масло представляет собой непрерывную фазу, которая содержит компонент для немедленного высвобождения, диспергированная в масле вода содержит первую лекарственную форму с замедленным высвобождением, а диспергированное в воде масло содержит третью лекарственную форму с замедленным высвобождением.

- 5 Описанные в настоящей заявке композиции могут быть в форме жидкого препарата. Жидкий препарат может содержать раствор, который включает терапевтический агент, растворенный в растворителе. Как правило, можно применять любой растворитель, который имеет желаемый эффект, в котором растворяется терапевтический агент и который может быть введен субъекту. Как правило, можно применять любую
- 10 концентрацию терапевтического агента, которая оказывает желаемое действие. В некоторых вариантах препарат представляет собой раствор, который является ненасыщенным, насыщенным или перенасыщенным. Растворитель может быть чистым растворителем или может быть смесью жидких компонентов растворителя. В некоторых вариантах раствор представлен в форме гелеобразующего *in situ* препарата.
- 15 Растворители и типы растворов, которые можно применять, хорошо известны специалистам в области технологии доставки лекарств.

Также в настоящей заявке предусмотрена интрамаммарная доставка соединений в соответствии с препаратами, известными в данной области техники. Например, такая доставка может быть осуществлена с помощью интрамаммарной инфузии, включающей

20 полиэфирный ионофор согласно настоящему изобретению, растительное масло, растворимую в спирте фракцию природного фосфолипида лецицина, способствующего образовании дисперсии масла в молоке, при этом такой фосфолипид выбран из группы, включающей фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин и их смеси, и присутствует в количестве по меньшей мере 0,25% в указанном масле. Такие композиции могут

25 обеспечить быстрое диспергирование в молоке с коротким периодом отбраковки молока (*milkout*). В качестве альтернативы, полиэфирный ионофор может быть диспергирован в масле, состоящем из смеси триглицеридов пальмитиновой и стеариновой кислоты вместе с полиоксиэтилированным цетиловым спиртом и стеариловым спиртом, и удерживаться в масляной среде минерального, растительного, синтетического или

30 смешанного происхождения. Такие композиции могут ускорить высвобождение антибактериального агента в вымя, повышая его биологический потенциал и снижая период отбраковки молока. Интрамаммарный препарат может быть представлен в форме пасты, содержащей полиэфирный ионофор, коллоидный диоксид кремния, модификатор вязкости и гидрофильный носитель.

35 В одном варианте реализации композиция по настоящему изобретению приготовлена для интрамаммарной доставки за счет того, что полиэфирный ионофор входит в состав препарата для интрамаммарной доставки в качестве твердой дисперсии. В одном дополнительном варианте реализации полиэфирный ионофор диспергирован в водорастворимом полимере с формированием твердой дисперсии. Твердую дисперсию

40 затем входит в состав препарата для интрамаммарной доставки путем добавления смягчающего триэфира. Вязкость можно регулировать путем добавления композиции на основе диоксида кремния для увеличения вязкости. В одном примере, полиэфирный ионофор диспергирован в поливинилпирролидоне К 30 с образованием твердой дисперсии. Твердую дисперсию затем помещают в состав препарата для

45 интрамаммарной доставки с добавлением Crodamol GTCC (который представляет собой полностью насыщенный смягчающий триэфир), а вязкость регулируют путем добавления Aerosil R972 (Aerosil R972 представляет собой пирогенный диоксид кремния с последующей обработкой диметилдихлорсиланом). Препарат для интрамаммарной

доставки затем помещают в шприц для введения в вымя субъекта.

В другом аспекте изобретение представляет собой ветеринарную противомикробную композицию для интрамаммарной доставки, содержащую терапевтически эффективное количество полиэфирного ионофора входящего в состав препарата для

- 5 интрамаммарного введения в виде твердой дисперсии. Предпочтительно, композиция включает полиэфирный ионофор, диспергированный в водорастворимом полимере с образованием твердой дисперсии. Из твердой дисперсии получают препарат для интрамаммарного введения путем добавления смягчающего вещества. Вязкость можно регулировать с помощью добавления агента, увеличивающего или уменьшающего
- 10 вязкость. Более предпочтительно, композиция содержит полиэфирный ионофор, водорастворимый полимер и смягчающее вещество. Более предпочтительно, композиция содержит полиэфирный ионофор, водорастворимый полимер, смягчающее вещество и агент, обеспечивающий вязкость. Еще более предпочтительно, композиция содержит полиэфирный ионофор, поливинилпирролидон К 30, Crodamol GTCC и Aerosil R972.

15 В предпочтительном варианте реализации композиция представляет собой композицию, выбранную из группы, включающей:

- (1) 600 мг твердой дисперсии LP1369-PVPK30 (150 мг LP1369 + 450 мг PVPK30) + 7% R972 + Crodamol GTCC; и
- (2) 1200 мг твердой дисперсии LP1369-PVPK30 (300 мг LP1369 + 900 мг PVPK30) +
- 20 7% R972 + Crodamol GTCC.

В одном аспекте настоящее изобретение представляет собой стандартную лекарственную форму, выбранную из группы, включающей: группа 75 мг Каждый шприц содержит 300 мг твердой дисперсии LP1369-PVPK30 (75 мг LP1369 + 225 мг PVPK30) + 7% R972 + Crodamol GTCC; окончательный объем 5 мл. группа 150 мг

25 Каждый шприц содержит 600 мг твердой дисперсии LP1369-PVPK30 (150 мг LP1369 + 450 мг PVPK30) + 7% R972 + Crodamol GTCC; окончательный объем 5 мл. группа 300 мг

Каждый шприц содержит 1200 мг твердой дисперсии LP1369-PVPK30 (300 мг LP1369 + 900 мг PVPK30) + 7% R972 + Crodamol GTCC; окончательный объем 5 мл. группа 600

30 мг (300 мг × 2)

Каждый шприц содержит 1200 мг твердой дисперсии LP1369-PVPK30 (300 мг LP1369 + 900 мг PVPK30) + 7% R972 + Crodamol GTCC; окончательный объем 5 мл.

Системы для интрамаммарной доставки для лечения мастита в соответствии с настоящим изобретением включают доставку интрамаммарным путем, прежде всего, для доставки композиций согласно изобретению через канал соска в вымя рядом с местом инфекции. Композиция согласно настоящему изобретению может содержать «наномодифицированные» активные ингредиенты и может быть представлена в виде ветеринарно приемлемого гидрофильного гидрогеля на полимерной основе в качестве системы для интрамаммарной доставки, способного к гелеобразованию *in situ*. Как альтернатива, композиция согласно настоящему изобретению может быть в виде мукоадгезивного препарата, способные к адгезии к эпителию.

40 Препараты, включающие композиции согласно настоящему изобретению, как альтернатива, могут быть составлены с применением методов доставки лекарств на основе нанотехнологий, таких, которые известны в данной области. Преимуществом систем доставки лекарств на основе нанотехнологий является улучшенная биодоступность, комплаентность пациента и снижение побочных эффектов.

45 Приготовление препаратов, включающих композиции настоящего изобретения включает приготовление наночастиц в виде наносуспензий или наноэмulsionий,

основанных на растворимости соединения. Наносуспензий представляют собой дисперсии наноразмерных частиц лекарственного средства, подготовленных на основе технологии «снизу вверх» или «сверху вниз» и стабилизованных с помощью подходящих вспомогательных веществ. Этот подход может применяться для

5 полиэфирных ионофоров, описанных в настоящей заявке, где полиэфирный ионофор имеет низкую водную и липидную растворимость в целях повышения растворимости при насыщении и улучшения характеристики растворения. Растворимость при насыщении, как следует понимать, является константой, специфичной для конкретного соединения и зависящей от температуры, свойств среды для растворения и размера

10 частиц (<1-2 мкм).

Композиция согласно настоящему изобретению может быть представлена в виде наносуспензий. Для наносуспензий увеличение площади поверхности может привести к увеличению растворимости при насыщении. Наносуспензий представляют собой коллоидные системы доставки лекарственных средств, состоящие из частиц менее 1

15 мкм. Композиции согласно настоящему изобретению могут быть в форме наносуспензий, включая нанокристаллические сусpenзии, твердые липидные наночастицы (solid lipid nanoparticles, SLNs), полимерные наночастицы, нанокапсулы, полимерные мицеллы, и дендримеры. Наносуспензий могут быть получены с использованием подхода «сверху вниз» таким образом, что более крупные частицы могут быть измельчены до

20 нанометровых размеров с помощью различных методов, известных в данной области, в том числе мокрого помола и гомогенизации при высоком давлении. В качестве альтернативы, наносуспензий могут быть получены с использованием технологии «снизу вверх» таким образом, что контролируемое осаждение частиц может осуществляться из раствора.

25 Композиция согласно настоящему изобретению может быть представлена в виде наноэмulsionии. Наноэмulsionии обычно представляют собой прозрачные двухфазные системы «масло-в-воде» или «вода-в-масле» с размером капель в интервале 100-500 нм, и при этом целевое соединение присутствует в гидрофобной фазе. Приготовление

30 наноэмulsionий может улучшить растворимость полиэфирных ионофоров, описанных в настоящей заявке, что обеспечивает лучшую биодоступность. Наноразмерные сусpenзии могут включать агенты для электростатической или стерической стабилизации, такие как полимеры и поверхностно-активные вещества. Композиции в форме SLN

35 могут содержать биоразлагаемые липиды, такие как триглицериды, стероиды, воски и эмульгаторы, такие как соевый лецитин, яичный лецитин, и полоксамеры. Приготовление препаратов SLN может включать растворение/диспергирование лекарственного средства в расплавленном липиде с последующей горячей или холодной гомогенизацией. Если используется горячая гомогенизация, расплавленная липидная фаза может быть

40 диспергирована в водной фазе и таким образом получена эмульсия. Она может быть отверждена путем охлаждения до достижения SLNs. При использовании холодной гомогенизации липидная фаза может быть отверждена в жидком азоте и измельчена до микронных размеров. Полученный порошок может быть подвергнут гомогенизации при высоком давлении в водном растворе поверхностно-активного вещества.

45 Композиции по изобретению могут быть в форме наноэмulsionии. Полиэфирные соединения, как описано в настоящей заявке, могут быть растворены в маслах/ жидким липиде и стабилизированы с образованием препарата в виде эмульсии. Наноэмulsionии могут быть получены с помощью высоко- и низкоэнергетических методов измельчения капель. Высокоэнергетические методы могут включать гомогенизацию при высоком давлении, ультразвуковую обработку и микрофлюидизацию. При использовании

низкоэнергетических методов спонтанную наноэмulsionю создает диффузия растворителя и инверсия фазы. Липиды, используемые в наноэмulsionях, могут быть выбраны из группы, включающей триглицериды, соевое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло. Также могут быть добавлены другие компоненты, такие как эмульгаторы,

5 антиоксиданты, модификаторы pH и консерванты.

Для лечения мастита, в основном используется интрамаммарный путь введения для доставки лекарственного средства через канал соска в вымя и близко к месту инфекции. Композиция может быть составлена таким образом, что она включает

10 наномодифицированные активные ингредиенты. Соответственно, композиция может быть представлена в форме интрамаммарной системы доставки в виде гидрогеля на гидрофильной полимерной основе, способного к гелеобразованию *in situ*. В качестве альтернативы, композиция может быть представлена в форме мукоадгезивного препарата, способного к адгезии к эпителию. Другие пути введения включают местное применение (например, накожное) и энтеральное (например, пероральное).

15 Композиция может быть представлена в форме препарата с контролируемым высвобождением, и может включать разлагаемый или неразлагаемый полимер, гидрогель, органогель или другую физическую структуру, которая модифицирует высвобождение полиэфирного ионофора. Следует понимать, что такие композиции могут включать дополнительные неактивные ингредиенты, которые добавляют для 20 обеспечения желаемого цвета, стабильности, буферной емкости, дисперсии или других известных желательных характеристик. Такие препараты могут дополнительно включать липосомы, такие как эмульсии, пены, мицеллы, нерастворимые монослои, жидкие кристаллы, фосфолипидные дисперсии, пластинчатые слои и т.п. Липосомы для применения в настоящем изобретении могут быть изготовлены из стандартных 25 образующих везикулы липидов, как правило, включающих нейтральные и отрицательно заряженные фосфолипиды и стерол, такой как холестерин.

В данном описании, если из контекста не следует иного, слово «содержать» или его формы, такие как «содержит» или «содержащий», подразумевает включение указанного элемента или группы элементов, но не исключение любого другого элемента или группы 30 элемента.

ПРИМЕР 1 - Антибактериальная активность против штаммов *Staphylococcus* Специальные сведения

Как видно из предыдущего описания изобретения, изобретение относится к способам лечения мастита у субъектов, таких как коровы, овцы, козы, других виды жвачных, 35 верблюдов и лошадей, а также человек. Также очевидно из предыдущего описания изобретения, что изобретение также относится к композициям, применяемым в таких способах лечения мастита.

Следует понимать, что системное воздействие на субъекта, подлежащего лечению в соответствии со способами лечения по настоящему изобретению или с помощью 40 композиций, описанных в настоящей заявке, должно быть сведено к минимуму, чтобы уменьшить токсические эффекты действия терапевтически эффективных количеств полиэфирных ионофоров. Следует иметь в виду, что барьер молочная железа/кровь функционирует как физический барьер для поглощения терапевтически эффективных количеств полиэфирных ионофоров, в связи с чем соединения остаются 45 локализованными в ткани и жидкости молочной железы для локализованной противомикробной активности и снижения токсических эффектов.

Материалы и методы

Сбор и идентификация бактериальных изолятов

Из коллекции изолятов были собраны сорок два изолята *Staphylococcus* различных видов и типов штаммов. Для идентификации видов *Staphylococcus* были использованы биохимические тесты, в том числе анализ коагулазы, латекс-агглютинация, тест на белок A, тест Vogues-Proskauer и оценка устойчивости к полимиксину B. Также был 5 проведен скрининг всех штаммов на устойчивость к различным противомикробным препаратам, обычно используемых для лечения инфекций. Он был осуществлен с помощью дискодиффузионного метода и стандартов устойчивости, изложенных в CLSI. Были использованы следующие противомикробные препараты: амоксициллин-клавулановая кислота (30 мкг), цефалотин (30 мкг), клиндамицин (2 мкг), энрофлоксацин 10 (5 мкг), эритромицин (15 мкг), гентамицин (10 мкг), имипенем (10 мкг), оксациллин (1 мкг), пенициллин G (10 единиц), тетрациклин (30 мкг), 1:19 триметоприм-сульфаметоксазол (25 мкг) и ванкомицин (30 мкг). Все штаммы, устойчивые к оксациллину, также оказались устойчивыми к амоксициллин-клавулановой кислоте, цефалотину и имипенему, и они были определены как метициллин-устойчивые штаммы.

15 Профили всех изолятов приведены на Фигуре 1.

Подготовка противомикробных препаратов

Для каждого из пяти тестируемых соединений готовили исходный раствор 256 мг/мл путем растворения 2,56 г вещества в 10 мл диметилсульфоксида (ДМСО).

Полученный раствор затем делили на аликовты объемом 500 мкл и хранили при -80°C 20 до использования. Стоковый раствор 256 мг/мл ампициллина также получали растворением 0,303 г ампициллина (Sigma-A-0166) в 10 мл ДМСО. Этот раствор разделяли на аликовты и хранили таким же образом, как и пять тестируемых соединений. По мере необходимости готовили рабочий раствор соединений с концентрацией 256 мкг/мл путем разбавления 100 мкл стокового раствора (25,6 мг/мл) в 9,9 мл среды Мюллера-Хинтона со стандартизованным содержанием катионов (САМНВ).

Оценка минимальной ингибирующей концентрации

Оценку минимальной ингибирующей концентрации проводили в соответствии со стандартами CLSI (CLSI 2012). 90 мкл раствора одного из тестируемого соединений или ампициллина добавляли в крайнюю колонку 96-луночного планшета, в каждой лунке 30 которого содержалось 90 мкл САМНВ. Затем проводили последовательное разбавление растворов вдоль ряда, оставляя 2 колонки для положительных и отрицательных контролей (Фигура 2). Бактериальную суспензию готовили добавлением свежих колоний, полученных из ночной культуры на овечьем кровяном агар (SBA) к 9,1 г/л солевого раствора. Эту суспензию доводили до концентрации от 4×10^8 до 5×10^8 КОЕ/мл.

35 Концентрацию суспензии определяли путем измерения оптической плотности (OD) с использованием спектрофотометра при длине волны 600 нм, при этом необходимая концентрация суспензии имела оптическую плотность от 1,00 до 1,20. 1 мл этой суспензии добавляли к 9 мл физиологического раствора, после чего ее добавляли во все лунки, за исключением лунок с отрицательным контролем, в объеме 10 мкл с получением 40 конечной концентрации от 4×10^5 до 5×10^5 КОЕ/мл в каждой лунке. Тестируемые образцы инкубировали в течение 24 часов при 37°C и затем оценивали визуально, а также с помощью планшет-ридера, оценивающего OD при длине волны 600 нм. Тестирование проводили в двух повторностях, и повторяли, если наблюдалось расхождение в 45 показаниях.

Минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) определяли как наименьшую концентрацию антибиотика, предотвращающую рост бактерий визуально и на основе показаний OD. Прямые статистические сравнения между испытуемыми соединениями и ампициллином не проводили в связи с ограничениями по конфиденциальности

информации, в том числе с ограничения по раскрытию информации, относящейся к структуре соединения и его молекулярному весу. Вместо этого проводили сравнение значений МИК и определяли наименьшую концентрацию каждого соединения, которая была эффективной против 50% и 90% изолятов, то есть МИК₅₀ и МИК₉₀,

⁵ соответственно. Эти значения, а также ряд значений МИК затем использовали для прямого сравнения испытуемых соединений, а также для общего сравнения с ампициллином.

Определение минимальной бактерицидной концентрации

После определения МИК с использованием 96-луночного планшета МИК для ¹⁰ определения минимальной бактерицидной концентрации (МБК) для каждого из тестируемых соединений использовали вариант капельно-чашечного метода. МБК оценивали с использованием образцов, взятых с планшета МИК после инкубации. Для каждого соединения каплю 10 мкл каждой концентрации, равной или выше МИК, ¹⁵ наносили при помощи пипетки на овечий кровяной агар в направлении по часовой стрелке (Фигура 3). Каплю с каждой из анализируемых концентраций наносили на чашку с помощью пипетки в двух повторностях, при этом вторую повторность раскапывали на внутреннем кольце капель. Чашки инкубировали при 37°C в течение ночи и рост оценивали на следующий день. МБК определяли как концентрацию, при которой было уничтожено 99,9% колоний на основании визуальной оценки по ²⁰ отсутствию роста на агаре в месте, где была размещена капля. На основании этих данных для некоторых соединений можно предположить наличие бактерицидного действия. Рассчитывали значения МБК для 50% и 90% изолятов (МБК₅₀ и МБК₉₀) и оценивали вместе с диапазоном МБК соединения для отбора соединений для ²⁵ дальнейшего исследования.

Анализ динамики время-элиминация (time-kill Kinetics)

После оценки МИК и МБК были выбраны два соединения для анализа «время-элиминация» (time-kill assay) с использованием микроразведений, LP 1369 и LP 6315, и было проведено их сравнение с ампициллином. Анализ «время-элиминация» проводили в соответствии с рекомендациями M26-а от CLSI, с модификациями. Готовили серию ³⁰ разведений тестируемого соединения и ампициллина в САМНВ в доль ряда 96-луночного планшета, и добавляли бактериальную суспензию таким же образом, как для оценки МИК. После этого 96-луночные планшеты инкубировали при 37°C в течение 48 часов, при этом через определенные промежутки времени проводили оценку OD для лунок с ³⁵ положительным контролем, а также для лунок с однократной, четырехкратной и восьмикратной МИК концентрацией соединения, характерной для тестируемого штамма, с использованием спектрофотометра при длине волны 600 нм. Оценку проводили на следующих временных интервалах: 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24 и 48 часов после добавления бактериальной суспензии в лунки. Каждое тестируемое соединение тестировали в трех ⁴⁰ повторностях, а для ампициллина проводили анализ в двух повторностях, и такой тест повторяли дважды независимо. Бактериальные штаммы, используемые для анализа микроразведений, были выбраны на основе бактерицидной активности, выявленной в ходе оценки МБК. Был выбран один штамм из каждой категорий коллекции изолятов *Staphylococcus* (метициллин-чувствительный, резистентный к метициллину и ⁴⁵ коагулазоотрицательный), а также референсный штамм ATCC для сравнения. Были выбраны следующие штаммы: MSS 1, MSS 11, MRSA 9 и референсный штамм ATCC 49775.

Из-за ограничений, связанных с пределом измерений OD, анализ «время-элиминация» также в макроразведениях. В 15 мл пробирках готовили по 9 мл раствора тестируемого

соединения в САМНВ в концентрации, соответствующей однократной, четырехкратной и восьмикратной концентрации МИК, а также 9 мл ампициллина в САМНВ с однократной и четырехкратной МИК. В каждую из пробирок добавляли 1 мл от 4 до ⁵ 5×10^6 бактериальной суспензии (приготовленной также, как для оценки МИК), а также оставляли одну контрольную пробирку для оценки роста, содержащую только 9 мл САМНВ. Пробирки инкубировали при 37°C в орбитальном шейкере со скоростью 100 об/мин в течение 24 часов. Через 0, 1, 4, 8, 12 и 24 ч после добавления бактерий из каждой пробирки брали по 100 мкл образцов, и готовили серийное разведение в солевом растворе 9,1 г/л. После этого полученные разведения высевали в двух повторностях ¹⁰ на агар для подсчета колоний (plate count agar) и инкубировали в течение 24 часов при 37°C. После инкубации оценивали жизнеспособные колонии микроорганизмов на основании числа колоний, видимых на агаре, и использовали это значение для расчета количества КОЕ/мл в каждый момент времени. Для анализа «время-элиминация» в ¹⁵ макроразведениях использовали только референсный штамм ATCC 49775 и MRSA 9 с целью дальнейшей оценки бактерицидной активности против метициллин-резистентные штаммы. Анализ «время-элиминация» с макроразведениями повторяли независимо, и бактерицидную активность определяли как $\geq 3 \log$ уменьшение числа КОЕ/мл.

Тестирование токсичности в отношении эукариотических клеток

Для оценки токсичности всех пяти соединений в отношении эукариотических клеток ²⁰ использовали гемолиз эритроцитов. Образцы крови промывали с помощью солевого раствора 9,1 г/л и центрифугировали при 2500 об/мин в течение 10 минут. Этот процесс повторяли до удаления из раствора клеточных остатков и частично лизированных клеток. 2 мл оставшихся клеток крови суспендировали в 98 мл солевого раствора 9,1 г/л с получением 2%-го раствора клеток крови, который наносили в объеме 90 мкл в лунки 96-луночного планшета. Растворы соединений, а также к хлорамфениколу, ²⁵ готовили из стокового раствора с концентрацией 256 мкг/мл (как описано выше). Хлорамфеникол использовали в качестве отрицательного контроля для лизиса эритроцитов, а готовый к употреблению раствор амфотерицина B использовали в качестве положительного контроля. Затем в разных рядах лунок добавляли по 90 мкл ³⁰ раствора соединений и контролей. Указанные соединения серийно разводили вдоль ряда для оценки различных концентраций противомикробных препаратов. Лунки, содержащие только 2%-ный раствор крови, также использовали для оценки различий между показаниями различных столбцов 96-луночного планшета. Анализируемые образцы инкубировали при 37°C в течение одного часа, а затем оценивали лизиса ³⁵ визуально и с помощью планшет-ридера для измерения оптической плотности при длине волны 600 нм. Каждый образец анализировали в двух повторностях, и затем повторяли в четырех повторности для большей точности оценки.

Результаты

Результаты оценки МИК подтвердили антибактериальную активность для всех ⁴⁰ исследуемых соединений в отношении как метициллин-чувствительных, так и метициллин-устойчивых стафилококков. Все тестируемые соединения демонстрировали постоянно низкие значения МИК (меньше или равно 16 мкг/мл) в отношении всех штаммов, за исключением соединения LP 9666, как показано на Фигуре 4. Наблюдались ⁴⁵ вариации МИК для соединения LP 9666, о чем свидетельствует высокое значение МИК₉₀ и широкий диапазон МИК. В то время как диапазон значений МИК был таким же, как для ампициллина, различий между метициллин-устойчивыми и метициллин-чувствительными штаммами, как это наблюдалось для значений МИК для ампициллина,

выявлено не было. МИК₅₀, МИК₉₀ и диапазоны МИК для метициллин-чувствительных штаммов *Staphylococcus* показаны на Фигуре 5. Значения МИК₅₀ для большинства тестируемых соединений, за исключением LP 9666, были сопоставимы с ампициллином, тогда как значения МИК₉₀ были значительно ниже. Схожий результат также был отмечен для диапазонов МИК для тестируемых соединений в отношении всей коллекции штаммов, и были выявлены меньшие диапазоны, по сравнению с ампициллином, для всех тестируемых соединений, кроме LP 9666. Аналогичная тенденция наблюдалась и в отношении метициллин-устойчивых изолятов, как показано на Фигуре 6. Соединения LP 1088, 1369, 4525 и 6315 характеризовались значениями МИК₅₀ и МИК₉₀ значительно более низкими, чем ампициллин, а также узкими диапазонами МИК. Однако хотя LP 9666 показал более высокие значения МИК₅₀ и МИК₉₀, чем четыре остальные тестируемые соединения, они были значительно ниже, чем для ампициллина в отношении метициллин-устойчивых штаммов.

Все пять тестируемых соединений демонстрировали бактерицидную активность в высоких концентрациях, но соединения LP 1088, 1369, 4525 и 6315 также показали некоторую бактерицидную активность в низких концентрациях. Соединения LP 1088 и 1369 демонстрировали бактерицидную активность более согласованно в отношении метициллин-чувствительных штаммов, а соединения LP 4525 и 6315 демонстрировали бактерицидную активность более согласовано в отношении метициллин-чувствительных штаммов, как показано на Фигуре 7.

Сравнение МБК₅₀, МБК₉₀ и диапазонов МБК для пяти тестируемых соединений для метициллин-чувствительные и метициллин-устойчивых штаммов показаны на Фигурах 8 и 9, соответственно. Значения МБК₅₀ и МБК₉₀ показали, хотя была обнаружена некоторая зависимая от штамма бактерицидная активность для тестируемых соединений при низких концентрациях, большинство соединений оказывали бактериостатическое действие в отношении большинства штаммов. Наибольшее бактерицидная активность наблюдалась для соединений LP 1369 в отношении метициллин-чувствительных изолятов и для LP 6315 в отношении метициллин-устойчивых изолятов, так как эти соединения показали самые низкие значения МБК₅₀, несмотря на схожий диапазон МБК.

В анализе «время-элиминация» для микроразведений оба соединения, LP 1369 и LP 6315, предотвращали рост референсного штамма ATCC течение 48-часового периода, по сравнению с контрольным ростом (Фигура 10). Некоторый рост наблюдался после 48 часов для LP 6315 при МИК, но он по-прежнему был значимо меньше, чем для контроля. Аналогичные тенденции наблюдались при анализе элиминации, выполненных для метициллин-чувствительных штаммов MSS 1 и MSS 11 (Фигуры 11 и 12, соответственно). Для референсного штамма ATCC все соединения предотвращали рост бактерий до уровня контрольного роста и, в большинстве концентраций, предотвращали рост выше начальной концентрации. Однако для штамма ATCC рост наблюдался при МИК для LP 6315, но наблюдался на 24 часа раньше, и продолжал расти к заключительным 24 часам. Аналогичная тенденция наблюдалась и для МИК для ампициллина в отношении MSS 11, но увеличение числа бактерий в последние 24 часов было намного круче, чем для LP 6315 при 1×МИК в анализе «время-элиминация». Для анализа «время-элиминация» для MRSA 9 (Фигура 13), увеличение количества бактерий после 12 часов было заметно для ампициллина, и в результате роста после 48 часов было сопоставимо с ростом в контроле. Однако в то время как увеличение для 1×МИК LP 6315 было заметно после 24 часов, а после 48 часов рост больше не наблюдался.

Дальнейший анализ «время-элиминация» для макроразведений показал относительно постоянное снижение числа жизнеспособных бактерий, по сравнению с первоначальным 24-часовым периодом, для обоих тестируемых соединений, независимо от штамма. На

Фигурах 14 и 15 показано, что эффект соединения LP 1369 на количество бактерий,

5 является значимым, по сравнению с ростом в контроле на всех испытанных

концентрациях, но, это соединение показало более высокую эффективность при четырехкратной МИК, чем при востмикратной МИК для обоих штаммов, MRSA 9 и референсного штамма ATCC 49775. Оценивали общее уменьшение количества бактерий,

как показано на Фигуре 16. Как и следовало ожидать, ампициллин оказывал

10 бактерицидное действие в отношении обоих штаммов, поскольку уменьшение количества жизнеспособных бактерий было $>3\text{-log}_{10}$, а соединение LP 1369 показало

бактериостатическое действие для всех концентраций, поскольку уменьшение количества жизнеспособных бактерий было $<3\text{-log}_{10}$.

Аналогичная тенденция, как и для LP 1369, наблюдалась для LP 6315. Для

15 референсного штамма ATCC (Фигура 17), наблюдалось постоянное снижение количества бактерий в течение 24-часового периода для всех трех концентраций исследуемого соединения. Для MRSA 9, как показано на Фигуре 18, все концентрации приводили к снижению количества бактерий в течение первых 12 часов, но для МИК рост наблюдался между 12 и 24 часов. При количественной оценке такого снижения (Фигура 19), для

20 ампициллина, как и ожидалось, было показано бактерицидное действие, тогда как большинство концентраций LP 6315 оказывали бактериостатическое действие. Однако при четырехкратной МИК LP 6315 демонстрировало бактерицидное действие в отношении MRSA, поскольку уменьшение числа колоний было $>3\text{-log}_{10}$.

Показания оптической плотности в анализе токсичности в отношении

25 эукариотических клеток приведены на Фигуре 20. Уменьшение оптической плотности интерпретировали как показатель лизиса эритроцитов. Хотя наблюдали снижение оптической плотности для всех тестируемых соединений в концентрации 32 мкг/мл и выше, для всех соединений, кроме LP 1369, это снижение не было статистически

30 значимым, поскольку снижение было сравнимо с действием хлорамфеникола, и поскольку при этих концентрациях не наблюдали лизиса эритроцитов. Хотя уровень лизиса был не таким высоким, как для амфотерицина B, в случае соединения LP 1369 наблюдался некоторые лизис клеток в диапазоне концентраций 32-128 мкг/мл, но визуально он был наиболее заметен при 64 мкг/мл.

35 ПРИМЕР 2 - Антибактериальная активность против изолятов из кожных повреждений

Изоляты *Staphylococcus pseudintermedius* были собраны из кожных повреждений различных пород собак. Наличие гена тес и профиль устойчивости определяли в соответствии с Материалами и методами, описанными в Примере 1.

40 На Фигуре 21 показаны результаты ОТ-ПЦР по определению присутствия гена тесA и профиль устойчивости к различным антибиотикам. На Фигуре 22 представлен профиль устойчивости всех полученных изолятов, а на Фигуре 23 показана активность (индивидуальные результаты и МИК₅₀, МИК₉₀, мода МИК и диапазон МИК) для ампициллина, LP 1369, LP 4525 и LP 6315 в отношении 23 изолятов.

45 ПРИМЕР 3 - Антибактериальная активность против изолятов из коровьего мастита
Краткое описание

Пять противомикробных агентов, LP 1088, LP 1369, LP 4525, LP 6315 и 9666 LP, были протестированы против 51 изолятов, полученных из мастита австралийских коров, в

первую очередь патогенные виды *S. aureus*, *S. agalactiae* и *S. uberis*. Соединение LP 4525 характеризовалось самыми низкими МИК₅₀ и МИК₉₀ (0,25 мкг/мл и 1 мкг/мл, соответственно). Для LP 1088, LP 1369, LP 6315 и LP 9666 были определены МИК₉₀, равные 2 мкг/мл, 4 мкг/мл, 4 мкг/мл и 128 мкг/мл, соответственно. Все протестированные 5 противомикробные соединения показали значения МБК, что указывает на то, что эти соединения оказывают бактериостатическое действие против патогенов мастита. Соединение LP 4525 оказалось наиболее перспективным кандидатом как интрамаммарный противомикробный агент для лечения мастита у коров, вызванного 10 инфекцией грамположительными бактериями.

10 Материалы и методы

Сбор и идентификация бактериальных изолятов

Из образцов молока, собранных на молочных фермах в сельских районах Южной Австралии Амбулатоной клиникой Университета была собрана коллекция из пятьдесят 15 одного изолята из мастита коров, охватывающая различные виды бактерий. Определение видов *Staphylococcus*, *Streptococcus* и *Corynebacterium* из грамотрицательных видов проводили на основании морфологии клеток после окрашивания по Граму и анализа 20 каталазы. Для определения изолятов на видовом уровне использовали биохимический анализ, включая анализ коагулазы, определение группы по Лэнсфилд, гидролиз эскулина и тест САМР. В случае, если биохимические тесты не давали окончательных результатов в определении видов, для подтверждения идентичности изолятов проводили амплификацию и секвенирование гена 16S рибосомной РНК.

Подготовка противомикробных препаратов

Для каждого из пяти тестируемых соединений готовили стоковый раствор с 25 концентрацией 256 мг/мл путем растворения 2,56 г соединения в 10 мл диметилсульфоксида (ДМСО). Полученный раствор затем разделяли на аликовты объемом 500 мкл и хранили при -80°C. Также готовили 256 мг/мл стоковый раствор ампициллина путем растворения 0,303 г ампициллина (Sigma A-0166) в 10 мл ДМСО. Этот раствор разделяли на аликовты и хранили таким же образом, как и пять 30 тестируемых соединений. При необходимости готовили рабочий раствор с концентрацией 256 мкг/мл путем разбавления 100 мкл стокового раствора (25,6 мг/мл) в 9,9 мл среды Мюллера-Хинтона со стандартизованным содержанием катионов (САМНВ).

Оценка минимальной ингибирующей концентрации

Оценку минимальной ингибирующей концентрации проводили в соответствии со 35 стандартами CLSI (CLSI 2012). Тестируемые соединения наносили в лунки 96-луночного микротитровального планшета, содержащие 90 мкл САМНВ в объеме 90 мкл и делали серийные разведения с получением градиента концентрации в диапазоне от 128 мкг/мл до 0,25 мкг/мл (см. Фигуру 24). Для видов *Streptococcus* среду САМНВ заменяли на 40 среду САМНВ с добавлением 4% лизированной овечьей крови (4% LSB: САМНВ). 4% LSB: САМНВ готовили путем смешивания 5 мл овечьей крови в 5 мл воды MilliQ и повторного замораживания при -20°C и оттаивания с последующим центрифугированием в течение 20 мин при 7000 об/мин. 7 мл супернатанта удаляли и добавляли к 93 мл САМВ.

Бактериальные суспензии получают путем эмульгирования свежих колоний из ночной 45 культуры, выращенной на овечьем кровяном агаре (SBA) в 4 мл 9,1 г/л физиологического раствора до оптической плотности от 1,00 до 1,20 при 600 нм (OD_{600nm}).

Стандартизованные бактериальные суспензии разводили 1:10 в физиологическом растворе и раскладывали во все лунки, за исключением лунок с негативным контролем,

по 10 мкл с получением конечной концентрации между 4×10^5 и 5×10^5 КОЕ/мл в каждой лунке. 96-луночные планшеты инкубировали в течение 24 часов при 37°C в 5% CO₂ и затем оценивали визуально и на основании значений оптической плотности, полученных с помощью планшет-ридера при длине волны 600 нм. Данный анализ проводили в двух повторностях и повторяли, если между повторами наблюдались расхождения в значениях МИК.

Минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) определяли как наименьшую концентрацию антибиотика, предотвращающую рост бактерий визуально и на основе показаний OD. Значения МИК сравнивали и определяли наименьшую концентрацию каждого соединения, которая была эффективна против 50% и 90% изолятов, то есть МИК₅₀ и МИК₉₀, соответственно. Эти значения, а также ряд значений МИК затем использовали для прямого сравнения испытуемых соединений, а также для общего сравнения с ампициллином.

Определение минимальной бактерицидной концентрации

После определения МИК для определения минимальной бактерицидной концентрации (МБК) для каждого из тестируемых соединений использовали вариант капельно-чашечного метода. МБК оценивали, нанося аликовоты капель 10 мкл каждой концентрации из микротитровального планшета на SBA, и инкубировали при 37°C в течение 16 часов. МБК определяли как концентрацию, при которой было уничтожено 99,9% колоний на основании визуальной оценки по отсутствию роста на агаре в месте, где была размещена капля. Рассчитывали значения МБК для 50% и 90% изолятов (МБК₅₀ и МБК₉₀) и оценивали вместе с диапазоном МБК соединения для отбора соединений для дальнейшего исследования.

Результаты

Антибактериальная активность против изолятов, полученных из мастита коров, наблюдалась для всех пяти тестовых соединений, LP 1088, LP 1369, LP 4525, LP 6315 и LP 9666. Соединение LP4525 показало низкое значение МИК₉₀ (1 мкг/мл). Значения LP 1088, LP 1369 и LP6315 были на 1-2 разведения выше, тогда как значение для LP9666 было выше на несколько разведений (Фигура 25). В отличие от низких значений МИК₉₀, полученных для 4 из 5 соединений, высокие значения МБК₉₀, полученные для всех соединений, свидетельствуют о том, что все соединения оказывают по большей части бактериостатическое действие, хотя для некоторых штаммов наблюдалась бактерицидная активность при достаточно низких концентрациях выше МПК (2-8 мкг/мл). Значения МИК и МБК в отношении отдельных изолятов для всех пяти соединений приведены на Фигуре 31 и Фигуре 32.

При анализе данных МИК и МБК в зависимости от вида изолятов стало очевидно, что значения МИК₅₀ и МИК₉₀ являются более низкими для видов *Streptococcus*, по сравнению с видами *Staphylococcus* (Фигуры с 26 по 30). Однако диапазоны МИК указывают на то, что различия между двумя группами патогенов не являются значимыми. Значения МБК также сильно варьируют в пределах вида, при этом некоторые штаммы стафилококков и стрептококков эффективно элиминируются при концентрациях незначительно выше МИК (например, для LP 4525 и LP 6315), но значимых различий между видами выявлено не было.

Предварительные результаты этого исследования свидетельствуют о том, что все пять соединения проявляют бактериостатическую активность, при этом некоторые соединения проявляют зависимую от штамма бактерицидную активность в высоких

концентрациях. Хотя все соединения демонстрировали некоторую мутность при разведении в среде Мюллера-Хинтона со стандартизованным содержанием катионов, соединения LP 1088, LP 1369, LP 4525 и LP 6315 все характеризовались низкими значениями МИК. Соединение LP 9666, однако, характеризовалось значительно более высокими значениями МИК₉₀ для каждой из групп патогенов, вызывающих мастит, и возможно, это было обусловлено образованием значительного количества осадка при разведении в среде Мюллера-Хинтона со стандартизованным содержанием катионов. Соединение LP 4525 характеризовалось самыми согласованными значениями МИК для всех изолятов, и об этом свидетельствует небольшой диапазон МИК. LP 4525 также характеризовалось меньшими значениями, по сравнению с МИК₉₀ для всех других соединений. Мы также обнаружили, что один изолят грамотрицательных бактерий (изолят 2825) в коллекции был чувствителен к действию всех пяти соединений.

ПРИМЕР 4 - Получение интрамаммарных препаратов для Примера 5

Получали четыре препарата для соединения LP 1369 для исследований на животных в Примере 5.

Состав препаратов

Группа 1: Только носитель. Каждый шприц содержит 7% Aerosil R972 + Crodamol GTCC; окончательный объем 5 мл

Группа 2: «Микроразмерный». Каждый шприц содержит 900 мг микроразмерного LP 1369 + 7% Aerosil R972 + Crodamol GTCC; окончательный объем 5 мл

Группа 3: «Наноразмерный». Каждый шприц содержит 900 мг наноразмерного LP 1369 + 7% Aerosil R972 + Crodamol GTCC; окончательный объем 5 мл

Группа 4: «ПВП» (представляет собой твердую дисперсию). Это смесь ПВП (поливинилпирролидон К 30 (PVPK30, Sigma, 81420)) и LP 1369. Каждый шприц содержит 450 мг LP 1369 + 1350 мг ПВП + 7% Aerosil R972 + Crodamol GTCC; окончательный объем 5 мл. Были приготовлены два шприца (450 мг/шприц × 2) для каждой четверти.

Подготовка интрамаммарных препаратов

Группа 1: Только носитель. Десять с половиной граммов Aerosil R972 растворяли в 150 мл Crodamol GTCC (представляющий собой полностью насыщенный смягчающее триэфир, Chemsupply, CP209).

Группа 2: Микроразмерное соединение LP1369 получали, пропуская LP 1369 (>98% чистоты по ВЭЖХ, Crodamol GTCC) через 75 мкм сито. Двадцать семь (27) грамм LP 1369 суспендировали в Crodamol GTCC и добавляли 10,5 грамм R972. Суспензию доводили до конечного объема 150 мл добавлением Crodamol GTCC. Конечная концентрация LP 1369 составляла 900 мг/5 мл.

Группа 3: Наноразмерное соединение получали с помощью мокрого помола LP 1369 в Crodamol GTCC (80 мг/мл; 450 мг/5 мл) с <5 мм измельчающими шариками в течение 30 мин при 1000 об/мин с последующей гомогенизацией в течение 30 мин. Для поддержания вязкости добавляли семь процентов Aerosil R972. Готовили два шприца (450 мг/шприц × 2) для каждой четверти.

Группа 4: ПВП. Пятьдесят четыре грамма твердой дисперсии ПВП-LP 1369 (13,5 грамм LP 1369 и 40,5 г ПВП) суспендировали в Crodamol GTCC и добавляли 10,5 г Aerosil R972. Суспензию доводили до конечного объема 150 мл с помощью Crodamol GTCC. Конечная концентрация LP 1369 составляла 450 мг/5 мл. Готовили два шприца (450 мг/шприц × 2) для каждой четверти.

ПРИМЕР 5 - Пилотное исследование по определению профиля остаточного выведения для соединения LP1369 в разработке интрамаммарного антибиотика для применения у дойного молочного скота

Информация о сохранении остатков лекарственного средства в молоке после интрамаммарного введения необходима для определения периода, на который стоит удерживать молоко, или продолжительности времени после последнего введения, в течение которого необходимо отбраковывать молоко до достижения безопасной концентрации. Было проведено исследование на коровах, получавших три препарата LP1369, в ходе которого отслеживали концентрацию в молоке в течение 12 доений (6 дней) после введения. Данные о концентрации LP1369 в молоке 4 коров из группы «микроразмерный», 2 коров из группы «наноразмерный» и 3 коров из группы «ПВП», получивших однократное введение на 1-ое, 2-ое, и 12-ое доение после введения, были предоставлены аналитической лабораторией Школы фармации, Университет Южной Австралии, Аделаида, ЮА, Австралия.

Анализ данных

Не дектируемые концентрации LP1369 в пробах молока были приняты за 0,0001 мг/л. Данные по концентрациям в молоке оценивали с помощью графиков распределения вероятностей, и для всех временных точках данные соответствовали логарифмически нормальному распределению. Таким образом, значения концентрации LP1369 в цельном молоке преобразовывали логарифмически до расчета средних и стандартных отклонений (взвешенных по объему произведенного молока каждым животным) для каждого момента времени с использованием Microsoft Excel 2010.

Результаты

Коровы, получавшие микронизированные препараты

Таблица 1

Информация о доении	Общий объем молока (л)	Взвешенная средняя концентрация LP1369 (мг/л)	Взвешенное стандартное отклонение (мг/л)	Взвешенный ВДП (верхний доверительный предел) (log шкала)*
Доение 1 (12 ч)	6,8	11,8533	11,949	1,0738
Доение 2 (24 ч)	14,3	2,6745	1,416	0,4276
Доение 12 (144 ч)	23,0	0,0001	0,000	-4,0000

* взвешены по выходу молока

Значения ВДП по log10 шкале снижались линейно с течением времени ($R^2=0,9980$).

Подобранная линия указывает на то, что ВДП будет ниже -1 (0,010 мг/л по логарифмической шкале) через 65,3 часов после последней обработки при разовой обработке. См. Фигуру 33.

Коровы, получавшие наноразмерные препараты

Таблица 2

Информация о доении	Общий объем молока (л)	Взвешенная средняя концентрация LP1369 (мг/л)	Взвешенное SD (мг/л)	Взвешенный ВДП (log шкала)*
Доение 1 (12 ч)	7,0	5,2121	3,994	0,7170
Доение 2 (24 ч)	9,4	0,4468	0,321	-0,3499
Доение 12 (144 ч)	25,0	0,0001	0,000	-4,0000

* взвешены по выходу молока

Значения ВДП по log10 шкале снижались линейно с течением времени ($R^2=0,9856$).

Подобранная линия указывает на то, что ВДП будет ниже -1 (0,010 мг/л по логарифмической шкале) через 61,1 час после последней обработки при разовой обработке. См. Фигуру 34.

Коровы, получавшие ПВП

Таблица 3

Информация о доении	Общий объем молока (л)	Взвешенная средняя концентрация LP1369 (мг/л)	Взвешенное SD (мг/л)	Взвешенный ВДП (log шкала)*
Доение 1 (12 ч)	36,1	1,5471	1,059	0,1895
Доение 2 (24 ч)	44,6	0,3748	0,196	-0,4261
Доение 12 (144 ч)	56,7	0,0001	0,000	-4,2283

* взвешены по выходу молока

Значения ВДП по \log_{10} шкале снижались линейно с течением времени ($R^2=0.9976$). Подобранная линия указывает на то, что ВДП будет ниже -1 (0,010 мг/л по логарифмической шкале) через 5,3 часов после последней обработки при разовой обработке. См. Фигуру 35.

Заключение

Значительные затраты владельцев молочных ферм связаны с необходимостью отбраковывать молоко, полученное от коров, получавших лечение, до тех пор, пока концентрация лекарственного средства в молоке не достигнет значения, которое считается приемлемыми регулирующими органами. Результаты этого исследования по выведению LP1369 определили, что как ожидается, необходим период удержания от использования молока, равный 65,3, 61,1 и 5,3 часов, что эквивалентно 6, 6 и 1 доение для микронизированных, наноразмерных и ПВП препаратов соответственно. Препарат в виде твердой дисперсии (ПВП) требует отбраковки молока на 5 доений меньше.

ПРИМЕР 6 - Приготовление интрамаммарных препаратов для Примера 7

Для исследований на животных в Примере 7. были приготовлены три экспериментальных ветеринарных продукта (Investigational Veterinary Products, IVP), в состав которых входит соединение LP1369, для интрамаммарного применения.

Таблица 4

'IVP1'	Экспериментальный ветеринарный продукт 1: LP1369 150 мг на шприц в твердой дисперсии
'IVP2'	Экспериментальный ветеринарный продукт 2: LP1369 300 мг на шприц в твердой дисперсии
'IVP3'	Экспериментальный ветеринарный продукт 3: LP1369 600 мг на шприц в твердой дисперсии

Методы

Приготовление интрамаммарного препарата, содержащего соединение LP1369, представляет собой двухэтапный процесс. Первый этап представляет собой подготовку твердой дисперсии соединения, которую включают в носитель для интрамаммарного введения.

Приготовление твердой дисперсии

В круглодонную колбу добавляли восемь грамм LP1369 (>98% чистота по ВЭЖХ, Bioaustralis fine chemicals, BIA-L1302) и 24 г поливинилпирролидона К 30 (PVPK30, Sigma, 81420). Добавляли метанол (200 мл) вместе с перемешиванием и обработкой ультразвуком до полного растворения LP1369 и PVPK30. Метанол удаляли с помощью роторного испарителя при 45°C в вакууме (~4-5 ч). Твердую дисперсию, образовавшуюся вокруг стенки колбы, собирали, растирали шпателем и измельчали в блендере.

Приготовление препаратов для интрамаммарного введения

В олбу добавляли тридцать грамм PVPK30-LP 1369 (эквивалентно 7,5 г LP 1369) или 60 грамм PVPK30-LP 1369 (эквивалент 15 грамм LP 1369). Для образования суспензии добавляли Crodamol GTCC (представляющий собой полностью насыщенный смягчающий триэфир, Chemsupply, CP209) (около 250 мл, ~220 мл). Затем в суспензию добавляли 5 семнадцать целых пять грамм Aerosil R972 (7% по массе) (Aerosil R972 представляет собой пирогенный диоксид кремния с последующей обработкой диметилдихлорсиланом, поставляемый Evonik Australia Pty Ltd, каталожный номер R972) для регулирования вязкости. Объем суспензии доводили до 250 мл, в результате чего получали следующие концентрации соединения LP 1369: 150 мг/5 мл или 300 мг/5 мл.

10 Для группы, получающей 600 мг/шприц, в колбу добавляли 120 грамм твердой дисперсии PVPK30-LP 1369 (эквивалент 30 грамм LP 1369). Для получения суспензии добавляли Crodamol GTCC (около 250 мл, ~220 мл). Затем в суспензию добавляли 15 семнадцать целых пять грамм Aerosil R972 (7% по весу) для регулирования вязкости. Суспензию доводили до 250 мл с получением концентрации LP 1369, равной 600 мг/5

15 мл. Для улучшения текучести, твердую дисперсию разбавляли в два раза до 500 мл с добавлением дополнительного 17,5 г Aerosil R972 для поддержания вязкости (конечный R972 7%). Для каждой четверти готовили два шприца (300 мг/шприц × 2). Каждый шприц (Elm-Plastic, **Düsseldorf**, Germany: 8ml Udder Injector Art. No. 808000) заполняли 20 с помощью 5 мл суспензии и маркировали.

Состав препаратов

группа 150 мг - IVP1

Каждый шприц содержит 600 мг твердой дисперсии LP1369-PVPK30 (150 мг LP1369+ 450 мг PVPK30) + 7% R972 + Crodamol GTCC; окончательный объем 5 мл группа 300 мг - IVP2

25 Каждый шприц содержит 1200 мг твердой дисперсии LP1369-PVPK30 (300 мг LP1369 + 900 мг PVPK30) + 7% R972 + Crodamol GTCC; окончательный объем 5 мл группа 600 мг (300 мг × 2) - IVP3

Каждый шприц содержит 1200 мг твердой дисперсии LP1369-PVPK30 (300 мг LP1369 + 900 мг PVPK30) + 7% R972 + Crodamol GTCC; окончательный объем 5 мл

30 ПРИМЕР 7. Эффективность экспериментальных ветеринарных продуктов, содержащих LP1369, в лечении клинического мастита, индуцированного *Streptococcus uberis* у дойных коров

Целью данного исследования была оценка предварительную эффективность двух экспериментальных ветеринарных продуктов (IVP), содержащих LP1369, в лечении 35 клинического мастита, индуцированных *Streptococcus uberis* у дойных коров.

Конкретными задачами данного исследования явились:

40 (1) Проверка предварительной эффективности каждого IVP в качестве лекарства для лечения индуцированного клинического мастита у дойного скота после экспериментального инфицирования через интрамаммарный путь с помощью известного штамма *S. uberis*.

(2) Сравнение предварительной эффективности двух IVP в лечении индуцированного клинического мастита у дойного скота после экспериментального инфицирования через интрамаммарный путь с помощью известного штамма *S. uberis*.

45 (3) Сравнение предварительной эффективности двух IVP с коммерческим продуктом в лечении индуцированного клинического мастита у дойного скота после экспериментального инфицирования через интрамаммарный путь с помощью известного штамма *S. uberis*.

Конечная цель данного исследования состояла в получении данных об эффективности

IVP.

Клинический мастит во всем мире является причиной значительных потерь в молочной промышленности. Заболеваемость молочных стад клиническим маститом в Австралии и Новой Зеландии, по оценкам, составляет примерно 15% (McDougall, 1999, McDougall et al., 2007a, Petrovski et al., 2009). *Streptococcus uberis*, как было показано, является основным микроорганизмом, вызывающим мастит в Австралии (Shum et al., 2009); Petrovski 2013, не опубликовано) и Новой Зеландии (Laven, 2008, McDougall, 1998, McDougall et al., 2007a, McDougall et al., 2007b). Для проверки эффективности лечения мастита антибиотиками *in vivo* предпочтительно проводить лечение инфицированных коров. Однако исследование природных инфекций может занять значительное время. В связи с этим, использование индуцированного мастита у дойных коров позволяет завершить исследования эффективности в течение более короткого времени и с меньшим числом животных, при сравнении с исследованиями природного мастита. Данная модель была разработана этой группой ранее, и один штамм *S. uberis* был выбран в качестве предпочтительного провоцирующего штамма для дальнейших исследований.

Таблица 5

Место испытаний	
20	Испытательная площадка для испытаний на животных:
	Молочный научно-исследовательский центр Школа животных и ветеринарных наук Roseworthy C.A., 2371 Австралия
	Испытательная площадка для микробиологических исследований:
	Микробиологическая лаборатория Школа животных и ветеринарных наук Roseworthy C.A., 2371 Австралия

Схема эксперимента**Тип и схема исследования**

Данное исследование представляло собой рандомизированное исследование для проверки эффективности IVP против клинического индуцированного мастита у дойных коров. У всех коров с помощью микробной супензии инокулировали две контраполатеральные четверти (т.е. переднюю левую и заднюю правую или переднюю правую и заднюю левую). Четверти инокулировали с использованием интрамаммарного способа введения. Каждый инокулят имел объем примерно 4 мл и содержал приблизительно 106 колонии образующих единиц (КОЕ) на шприц известного и хорошо охарактеризованного штамма *S. uberis*.

Коров доили с помощью портативных доильных аппаратов два раза в день.

Клинические исследования коров и каждой четверти проводили каждые 12 часов начиная с первого доения после инфицирования (час 12) до часа 180. До доения перед инфицированием, от каждой из 4/4 собирали приблизительно 2 мл молока на одну корову, используя асептический метод сбора, для тестирования проб молока. Появление секреции молока из каждой четверти отслеживали с помощью пластикового контейнера темного цвета или старой записи для изменений консистенции, и по внешнему виду. При наличии крупинок или сгустков продолжали дальнейшее исследование. После обнаружения признаков мастита собирали образцы молока из четвертей с подозрением на наличие инфекции с помощью асептического метода сбора для отбора проб молока. Выход молока учитывали при каждом доении для каждой из инфицированной четверти, и собирали композитное молоко с обеих неинфицированных четвертей (например, ПП и ЗЛ или ПЛ и ЗП вместе). В заданные моменты времени собирали образцы молока с

помощью системы доения в ведра для композитных неинфицированных четвертей и системы четвертного доения для каждой инфицированной четверти каждое утро для оценки числа соматических клеток, и процентного содержания белков, жиров и лактозы. Кроме того, также в заданные моменты времени, отбирали образцы молока для ВЭЖХ и микробиологического анализа на содержание остатков противомикробных веществ в молоке, например, с помощью COPAN или Delvotest.

До и после завершения каждого доения, у коров оценивали клинические признаки, связанные с острым маститом: депрессию, хромоту и лежачее положение. Процесс оценки включал визуальное наблюдение и клиническое обследование животных, с пристальной оценкой вымени. Отдельные четверти вымени проверяли и пальпировали на клинические признаки, связанные с маститом, т.е. жжение, отек, покраснение, чувствительность, и результаты всех наблюдений были задокументированы.

Коровы/отдельные четверти, проявившие признаки клинического мастита сразу подвергались лечению. По мере того, как у коров/четвертей все более проявлялись признаки мастита, их подвергали лечению с помощью IVP1, IVP2 или с помощью референсного продукта (Norocloxx LC, Norbrook). Распределение отдельных коров по группам в исследовании осуществляли на основании циклического повторения этой схемы. Если вторая четверть у одной коровы демонстрировала признаки мастита в одном и том же или последующем доении (доениях), что лечение проводили с помощью того же IVP/референсного продукта, который вводили в первую четверть для лечения клинического мастита у данной конкретной коровы. Таким образом, количество коров/четвертей на группу менялось.

25

30

35

40

45

Таблица 6

Расписание мероприятий

5	День исследования	Количество часов относительно инокуляции	Событие
	0	-1.0	Асептическое взятие проб молока у всех коров
	0	-0.5	Доение всех коров, наблюдение получающих лечение
	0	0	коров, взятие образцов у всех коров
	0	0 to 2	ИНФИЦИРОВАНИЕ ВСЕХ КОРОВ
			Наблюдение всех коров
10	1	12	Клиническое наблюдение, доение всех коров, сбор образцов и лечение по необходимости
	2	24	Клиническое наблюдение, доение всех коров, сбор образцов и лечение по необходимости
	2	36	Клиническое наблюдение, доение всех коров, сбор образцов и лечение по необходимости
	3	48	Клиническое наблюдение, доение всех коров, сбор образцов и лечение по необходимости
15	3	60	Клиническое наблюдение, доение всех коров, сбор образцов и лечение по необходимости
	4	72	Клиническое наблюдение, доение всех коров, сбор образцов и лечение по необходимости
	4	84	Клиническое наблюдение, доение всех коров, сбор образцов и лечение по необходимости
	5	96	Клиническое наблюдение, доение всех коров, сбор образцов и лечение по необходимости
20	5	108	Клиническое наблюдение, доение всех коров, сбор образцов и лечение по необходимости
	6	120	Клиническое наблюдение, доение всех коров, сбор образцов и лечение по необходимости
	6	132	Клиническое наблюдение, доение всех коров, сбор образцов и лечение по необходимости
	7	144	Клиническое наблюдение, доение всех коров, сбор образцов и лечение по необходимости
25	7	156	Клиническое наблюдение, доение всех коров, сбор образцов и лечение по необходимости
	8	168	Клиническое наблюдение, доение всех коров, сбор образцов и лечение по необходимости
	8	180	Клиническое наблюдение, доение всех коров, сбор образцов и лечение по необходимости

Материалы и методы

Животные

Подробная характеристика животных

Виды: коровы

Возраст: 2-10 лет.

Порода: Общий молочный скот (голштино-фризская)

35 Тип: Дойные молочные коровы

Вес тела: Не установлено

Количество и пол: 14 самок

Идентификация: Коровы были идентифицированы с помощью постоянных бирок на одно с уникальными номерами на ферме происхождения. Кроме того, каждой корове 40 маркировали пульверизатором заднюю ногу чуть ниже лобковой кости с помощью уникального идентификационного номера в исследовании (например, 1, 2, 3 ... 14) с помощью красок разных цветов. Тот же уникальный идентификационный номер в исследовании было указан на пластиковой ленте с цветовой идентификацией на ноге, которую прикрепляли каждой корове в области плюсны. Источник: Животные получены 45 из коммерческого молочного стада.

Критерии включения

- Здоровые коровы (по клиническим наблюдением за 3-4 дня до приобретения)
- Четыре функциональные четверти (перед приобретением)

- Известная история числа соматических клеток (SCC не выше 250000 клеток/мл в течение последних 12 месяцев)

- Коровам не вводили противомикробные препараты в течение 14 дней до начала исследования

5 Удаление из тестирования после включения (изъятие)

Не ожидалось, что будет необходимость в исключении коров из исследования вследствие его короткой продолжительности. Тем не менее, коровы, которые были признаны непригодными для продолжения участия в исследовании, были удалены после одобрения решения руководителем исследования. Причины любых удалений *10* были полностью задокументированы и обоснованы в исходных данных и SR. Любая корова, которая была удалена из исследования, получала соответствующий ветеринарный уход. Одна корова была удалена из исследования из-за случайной травмы задней ноги.

Условия содержания и обращение с животными

15 В ходе всего исследования коров содержали на испытательном участке для фазы исследований на животных. Коровы были адаптированы к условиям испытательного участка в течение минимум 7 дней до начала исследования. С коровами обращались в соответствии с условиями кормления/размещения скота Австралии, которые согласуются с рекомендациями хорошей хозяйственной практики. Коровы получали общий *20* смешанный рацион и концентрат на основе зерна, используемые на ферме происхождения. Для питья была доступна водопроводная вода без ограничений, подаваемая в чистое самополняемое корыто. Распределение по группам и рандомизация

Все коровы, отвечающие критериям включения, были включены в исследование.

25 Инфицируемые четверти чередовали у разных коров, как представлено в Таблице 7, на основании порядка размещения коров в доильном зале. Окончательное распределение по группам в исследовании отражено в отчете SR.

30

35

40

45

Таблица 7. Режим лечения для каждой коровы

Порядок коров в доильном зале		Передняя левая	Передняя правая	Задняя левая	Задняя правая
5	1	Инфицирована	Не инфицирована	Не инфицирована	Инфицирована
	2	Не инфицирована	Инфицирована	Инфицирована	Не инфицирована
	3	Инфицирована	Не инфицирована	Не инфицирована	Инфицирована
10	4	Не инфицирована	Инфицирована	Инфицирована	Не инфицирована
	5	Инфицирована	Не инфицирована	Не инфицирована	Инфицирована
	6	Не инфицирована	Инфицирована	Инфицирована	Не инфицирована
15	7	Инфицирована	Не инфицирована	Не инфицирована	Инфицирована
	8	Не инфицирована	Инфицирована	Инфицирована	Не инфицирована
	9	Инфицирована	Не инфицирована	Не инфицирована	Инфицирована
20	10	Не инфицирована	Инфицирована	Инфицирована	Не инфицирована
	11	Инфицирована	Не инфицирована	Не инфицирована	Инфицирована
	12	Не инфицирована	Инфицирована	Инфицирована	Не инфицирована
25	13	Инфицирована	Не инфицирована	Не инфицирована	Инфицирована
	14	Не инфицирована	Инфицирована	Инфицирована	Не инфицирована

Инфицирование

Штамм для инокуляции (инфицирования)

Штамм *S. uberis*, используемый для инокуляции, был получен из библиотеки штаммов Микробиологической лаборатории SAVS, Университет Аделаиды. Был выбран штамм, который хорошо охарактеризован и который, как известно по предварительному изучению, успешно индуцировал клинический мастит в период 36-120 часов после инфицирования. Штамм был идентифицирован фенотипически как *S. uberis* посредством биохимических тестов в соответствии со стандартными микробиологическими методами.

Суспензия для инокуляции

Приготовление суспензии выбранного штамма *S. uberis* для инокуляции проводили в Микробиологической лаборатории SAVS, Университета Аделаиды. Процесс подготовки суспензии для инокуляции соответствовал стандартным лабораторным процедурам.

Экспериментальная инфекция

Всем коровам в две контраполарные четверти (см. Таблицу 7) вводили суспензию для инокуляции сразу же после окончания доения, но не более чем через 0,5 часа после доения. Перед инокуляцией концы сосков всех четырех четвертей тщательно очищали с использованием сухих бумажных полотенец и пропитанных спиртом ватных тампонов или салфеток для сосков. Инокуляцию вводили интрамаммарным способом. Все содержимое одного шприца вводили в каждую из заранее выбранных четвертей. После введения суспензии четверть тщательно массировали для лучшего распространения суспензии в вымени.

Режим терапии

Все процедуры проводились аккредитованным ветеринаром или надлежащим образом обученным персоналом. Руководитель эксперимента вел подробные записи об обучении персонала, о тестировании используемых продуктов и дозах, вводимых в ходе эксперимента.

- 5 Коровы получали терапию интрамаммарным путем согласно схеме терапии. Процедуры были записаны в виде «Протокола терапии».

Введение IVP и частота введения

Каждая корова получала терапию с использованием одного шприца для интрамаммарного введения на четверть, содержащего рекомендованную дозу в каждом 10 случае, шесть последовательных раз. Для коров/четвертей, получавших IVP1 и IVP2, терапевтический препарат вводили в каждую инфицированную четверть сразу же после каждого доения 6 раз подряд, например, каждые 12 часов. Интрамаммарное введение осуществляли в соответствии с документированными стандартными процедурами.

Введение референсного продукта и частота введения

15 Каждой корове вводили рекомендованную дозу из одного шприца для интрамаммарного введения на четверть в каждом случае, три раза. Для коров/четвертей, получавших референсный продукт, терапевтический препарат вводили в каждую инфицированную четверть сразу же после каждого доения 3 раза, с интервалом 24 часа. Интрамаммарное введение осуществляли в соответствии с документированными 20 стандартными процедурами.

Сопутствующее лечение

Использование любого другого лечения, связанного с тестируемым продуктом, была запрещена во время исследования. Все другие методы лечения могли быть использованы только для того, чтобы избежать ненужных страданий животных, и они должны были 25 быть обоснованы. В любом случае, Руководитель исследования должен был быть проинформирован и должен был утвердить какое-либо сопутствующее лечение.

Наблюдения/Измерения/Сбор образцов

Оценка животных

Каждая корова была осмотрена ветеринаром перед лечением. Осмотр включал 30 общие наблюдения (в частности, телосложение, осанка и поведение), измерение ректальной температуры и пальпацию каждой четверти вымени.

В ходе этого исследования не оценивали массу тела.

Коров осматривали по меньшей мере два раза в день на наличие каких-либо признаков заболевания. Исследовательской персонала на протяжении всего 35 исследования. Наблюдения записывали в форме ежедневного учета (Daily Log form). О возникновении любых (AE) нежелательных явлений незамедлительно сообщалось Руководителю исследования и, в случае необходимости, ветеринару. Все события были задокументированы.

Каждую корову обследовали на наличие признаков клинического мастита во время 40 каждого доения, начиная с дня исследования 0 час 0 до дня исследования 8 час 180.

Коровам, которые демонстрировали более серьезные признаки дискомфорта (выше, чем 3 балла, как описано в документально оформленных стандартных методиках работы) вводили противовоспалительное обезболивающее средство (кетопрофен) в дозе, рекомендованной производителем.

45 Результаты всех наблюдений, наличие или отсутствие каких-либо патологий, были задокументированы в формуляре наблюдений.

Клиническое обследование перед доением и асептическое почетвертное взятие коллекции образцов молока у коров

Доение коров и клинические исследования проводили через каждые 12 часов, начиная непосредственно перед инокуляцией (день исследования 0 час 0) до дня исследования 8 час 180. При каждом доении перед почетвертным доением для инфицированных четвертей и доением в ведро для не инфицированных четвертей обследовали молочные выделения с использованием пластикового контейнера темного цвета на наличие изменений, соответствующих маститу, включая изменения в консистенции, внешнем виде и/или в присутствии крупинок или сгустков. При появлении признаков, указывающих на появление мастита, собирали дополнительные образцы молока с использованием асептической метода, в соответствии с документально оформленными стандартными методиками работы.

Все асептические образцы молока были собраны в двух экземплярах.

Наблюдение за внешним видом молока

Когда начальные наблюдения и асептическое взятие образцов были завершены, оценивали внешний вид молока с использованием пластикового контейнера темного цвета или старой записи, на наличие изменений в консистенции, внешнем виде и наличие крупинок или сгустков. Внешний вид молока оценивали на основе критерии, описанных в документально оформленных стандартных методик работы.

Доение

После осмотра внешнего вида молока коров доили с помощью портативных

доильных аппаратов. Инфицированные четверти доили каждые 12 часов, начиная непосредственно перед инокуляцией (день исследования 0 час 0) до дня исследования 8 час 180 с помощью аппаратов для почетвертного доения. Не инфицированные четверти каждой коровы доили каждые 12 часов, начиная непосредственно перед инокуляцией (день 0 час 0) до дня исследования 8 час 180 с помощью доения в ведро.

Выход молока

Выход молока для инфицированных и не инфицированных четвертей учитывали при каждом доении, отдельный для каждой инфицированной четверти и композитный для не инфицированных четвертей (например, ПП и ЗЛ или ПЛ и ЗП учитывали вместе для не инфицированных четвертей).

Взятие образцов молока для инфицированных и не инфицированных четвертей

Образцы были собраны из пула молока из двух не инфицированных четвертей, собранного при доении в ведро, или молока из отдельных четвертей в случае инфицированных четвертей, собранных при почетвертном доении. Эти образцы были репрезентативными для каждой коровы/четверти/комбинации четвертей в соответствии с документально оформленными стандартными методиками работы, и были использованы как образцы свежего молока для анализа. Эти образцы были использованы для подсчета соматических клеток, а также анализа процентного содержания белков, жиров и лактозы.

Обследование вымени/коров после доения

После завершения доения у коров оценивали клинические признаки, связанные с острым маститом: депрессию, хромоту и лежачее положение. Процесс оценки включал визуальное наблюдение и клиническое обследование животных, с пристальной оценкой вымени. При подозрении возникновения у животного заболевания развернутое клиническое обследование проводилось квалифицированным ветеринаром с целью диагностики клинического состояния. Обследование могло включать взятие образцов крови для проведения соответствующих тестов (например, гематологического, биохимического), это было необходимо.

Вымя и индивидуальные четверти были обследованы и пальпированы на наличие

клинических признаков, связанных с маститом, т.е. жжения, отека, покраснения, чувствительности. Описание системы балльной оценки вымени при пальпации соответствовало документально оформленными стандартными методиками работы. Терапия четвертей/коров с диагнозом мастита

- 5 При выявлении признаков мастита (изменения в молоке, жар, опухание и болезненные вымени или балл при пальпации S3 в соответствии с документально оформленными стандартными методиками), образцы молока собирали из четвертей с подозрением на развитие инфекции путем асептического взятия образцов молока в соответствии с документально оформленными стандартными методиками. Четверти с диагнозом 10 мастита обрабатывали IVP или референсным продуктом. Первую корову/четверть с признаками мастита обрабатывали IVP1, следующую - IVP2 и затем референсным продуктом. Этот цикл повторяли для всех последующих инфицированных коров. Если вторая четверть у одной коровы демонстрировала признаки мастита при том же или последующем доении (доениях), то корове продукт во вторую четверть, вводили такой же IVP/референсный, как и в первую. Таким образом, количество коров/четвертей в каждой экспериментальной группе могло изменяться.
- 15

- В случаях, если у какой-либо коровы развивалась инфекция более чем в двух четвертях, ей вводили инъекционный продукт (т.е. Mamazyn) в соответствии с рекомендацией на препарате (например, 5 г один раз в день, троекратно). Для коров 20 проявляющих признаки острого распространенного мастита, немедленно применяли системную антибиотикотерапию и, при необходимости, поддерживающую терапию (например, с помощью нестероидного противовоспалительного - кетопрофена). Решение о назначении терапии принималось квалифицированным ветеринаром в консультации с Руководителем исследования. Четверти продолжали наблюдать при каждом доении 25 и обрабатывали при необходимости.

Оценка эффективности

Определение эффективности

Продукт считался эффективным, если 50% четвертей, в которые его вводили, достигали клинического выздоровления в течение 5 дней от начала лечения.

- 30 Измерение эффективности
Клиническое выздоровление
Клиническое выздоровление определяли на основании клинического исследования коров, пальпации вымени и оценки внешнего вида молока. Клиническое излечение было определено как:
- 35 1) балл при пальпации ≤ 3 в соответствии с документально оформленными стандартными методиками, и/или
2) балл в оценке молока ≤ 3 в соответствии с документально оформленными стандартными методиками, и/или
3) установление нормальной температуры вымени, исчезновение опухоли, боли при 40 прикосновении и покраснения, и/или
4) балльная оценка общего состояния здоровья коровы $\wedge 3$ в соответствии с документально оформленными стандартными методиками.

Выздоровление на основании микробиологического анализа (микробиологическое излечение)

- 45 Клиническое выздоровление также определяли посредством анализа микробиологической культуры асептических проб молока, взятых до начала лечения и минимум 7 дней после последней обработки на уровне четверти. Выздоровление на основании микробиологического анализа определяли как:

1) выделение одного или двух типов колоний до лечения с последующим отсутствием роста после обработки,

2) выделение одного или двух типов колоний перед лечением с последующим выделением различных типов колоний после лечения.

5 Эффективность IVP/референсного продукта определяли как:

1) процент четвертей с клиническим маститом, которые достигали клинического выздоровления от общего количества четвертей, обработанных с помощью конкретного IVP/референсного продукта,

2) процент четвертей с клиническим маститом, которые достигали выздоровления

10 на основании микробиологического анализа от общего количества четвертей, обработанных с помощью конкретного IVP/референсного продукта.

Ссылки на используемые методы

1. Laven, R. 2008. Clinical forum: choosing mastitis treatment in the lactating cow: selling or science? UK Vet: Livestock 13(4):29-36.

15 2. McDougall, S. 1998. Efficacy of two antibiotic treatments in curing clinical and subclinical mastitis in lactating dairy cows. N.Z. Vet. J. 46(6):226-232.

3. McDougall, S. 1999. Prevalence of clinical mastitis in 38 Waikato dairy herds in early lactation. N.Z. Vet. J. 47(4): 143-149.

20 4. McDougall, S., K.E. Agnew, R. Cursons, X.X. Hou, and C.R. Compton. 2007a. Parenteral treatment of clinical mastitis with tylosin base or penethamate hydriodide in dairy cattle. J. Dairy Sci. 90(2):779-789.

5. McDougall, S., D.G. Arthur, M.A. Bryan, J.J. Vermunt, and A.M. Weir. 2007b. Clinical and bacteriological response to treatment of clinical mastitis with one of three intramammary antibiotics. N.Z. Vet. J. 55(4): 161-170.

25 6. Petrovski, K., C. Heuer, T. Parkinson, and N. Williamson. 2009. The incidence and aetiology of clinical bovine mastitis on 14 farms in Northland, New Zealand. N.Z. Vet. J. 57(2): 109-115.

7. Shum, L.W.C, C.S. McConnel, A.A. Gunn, and J.K. House. 2009. Environmental mastitis in intensive high-producing dairy herds in New South Wales. Aust. Vet. J. 87(12):469-475.

Результаты

30 **Таблица 8: Сокращения**

IVP1	Экспериментальный ветеринарный продукт 1: LP1369 150 мг на шприц в виде твердой дисперсии
IVP2	Экспериментальный ветеринарный продукт 2: LP1369 300 мг на шприц в виде твердой дисперсии
REF	Референсный продукт: Norgicloxx содержащий 200 мг клокациллина бензатин на шприц
UUC	Не обработанный не индуцированный контроль: не обработанный и не индуцированные контрольные четверти у каждой коровы, получавшей терапию

Внешний вид молока перед доением

40 **Таблица 9. Средние балльные показатели внешнего вида молока, определенные с помощью стрип-теста молока перед доением и различия по экспериментальным группам**

Экспериментальная группа	Средний балльный показатель внешнего вида	SOC	Различия с
IVP1	0,76	0,09	UUC
IVP2	0,76	0,10	UUC
REF	0,79	0,07	IVP1, IVP2, UUC
UUC	-0,13	0,06	IVP1, IVP2, REF

45 Балльная оценка при пальпации после доения

Таблица 10. Средние балльные показатели при пальпации сразу же после доения и различия по экспериментальным группам

Экспериментальная группа	Средний балльный показатель при пальпации	СОС	Различия с
IVP1	1,67	0,11	REF, UUC
IVP2	1,62	0,11	REF, UUC
REF	1	0,08	IVP1, IVP2, UUC
UUC	0,51	0,07	IVP1, IVP2, REF

Выход молока

Таблица 11. Средний выход молока и различия по экспериментальным группам

Экспериментальная группа	Средний выход молока (л/четверть/доение)	СОС	Различия с
IVP1	1,69	0,12	IVP2, UUC
IVP2	1,38	0,12	IVP1, UUC
REF	1,46	0,09	UUC
UUC	2,28	0,09	IVP1, IVP2, REF

Таблица 12. Краткая сводка по клиническому выздоровлению и случаям его отсутствия

Клиническое выздоровление

Клиническое выздоровление определяли на основании клинического исследования каждой коровы, пальпации вымени и оценки внешнего вида молока.

Клиническое излечение было определено как:

- 1) балл при пальпации ≤ 3 , и/или
- 2) балльная оценка молока ≤ 3 , и/или
- 3) установление нормальной температуры вымени, исчезновение опухоли, боли при прикосновении и покраснения, и/или
- 4) балльная оценка общего состояния здоровья коровы ≤ 3 .

ТЕРАПИЯ	КОРОВА	ЧЕТВЕРТЬ	БАЛЛ ПРИ ПАЛЬПАЦИИ	БАЛЛЬНАЯ ОЦЕНКА МОЛОКА	ВЫМЯ	БАЛЛЬНАЯ ОЦЕНКА ОБЩЕГО СОСТОЯНИЯ ЗДОРОВЬЯ	СТАТУС
IVP1	1	F	≤ 3	≤ 3	Норма	≤ 3	Выздоровление
IVP1	1	H	≤ 3	≤ 3	Норма	≤ 3	Выздоровление
IVP1	2	F	≤ 3	≤ 3	Норма	≤ 3	Выздоровление
IVP1	2	H	≤ 3	≤ 3	Норма	≤ 3	Выздоровление
IVP1	3	F	≤ 3	≤ 3	Норма	≤ 3	Выздоровление

	IVP1	3	H	≤3	≤3	Норма	≤3	Выздоровление
5	IVP2	4	F	≤3	≤3	Норма	≤3	Выздоровление
	IVP2	4	H	≤3	≤3	Норма	≤3	Выздоровление
	IVP2	5	F	≤3	≤3	Норма	≤3	Выздоровление
10	IVP2	5	H	≤3	≤3	Норма	≤3	Выздоровление
	IVP2	6	F	>3	>3	Патология	>3	Отсутствие выздоровления
	IVP2	6	H	>3	>3	Патология	>3	Отсутствие выздоровления
15	Референсный продукт	7	F	≤3	≤3	Норма	≤3	Выздоровление
	Референсный продукт	7	H	≤3	≤3	Норма	≤3	Выздоровление
	Референсный продукт	8	F	≤3	≤3	Норма	≤3	Выздоровление
20	Референсный продукт	8	H	≤3	≤3	Норма	≤3	Выздоровление
	Референсный продукт	9	F	>3	>3	Патология	>3	Отсутствие выздоровления
25	Референсный продукт	9	H	>3	>3	Патология	>3	Отсутствие выздоровления

Инокуляция *Streptococcus uberis* в настоящем исследовании индуцировала развитие достаточно сильной бактериальной инфекции, которую едва мог преодолеть коммерчески доступный референсный продукт (Noroclox), с помощью которого только 2 из 3 коров были излечены. Noroclox, как правило, оказывается достаточно эффективными на практике при лечении инфекций, что свидетельствует о том, что инфекция, индуцированная в настоящем исследовании, была в крайней степени сильной. Несмотря на значительно сильную бактериальную инфекцию, продукты IVP1 (150 мг LP 1369) и IVP2 (300 мг LP1369) имели схожий эффект или превысили эффект референсного продукта, что указывает на высокий уровень активности, проявленный обоими препаратами против значимого и широко распространенного возбудителя мастита крупного рогатого скота. См. Таблицу 12.

ПРИМЕР 8 - Определение эффективности микробиологического выздоровления в результате терапии, представленной в Примере 7

Тогда как тщательная оценка состояния здоровья коровы, внешнего вида вымени (в особенности на наличие признаков воспаления: температуры, отека, боли, покраснения) и внешнего вида молока может указывать на то, было ли достигнуто клиническое излечение мастита, альтернативный тест указывает на то, приводит ли терапия к микробиологическому выздоровлению. При соответствующих условиях бактерии могут проникать в вымя вызвать мастит. Если возбудитель мастита не удаляется из инфицированного вымени в результате терапии, то сохраняется вероятность развития повторной инфекции не только у инфицированной коровы, но и у других коров в стаде, тесно с ней контактирующих. Кроме того, присутствие бактерий в молоке

не является желательным с точки зрения качества молока и безопасности пищевых продуктов, даже несмотря на то что бактерии могут быть убиты в ходе пастеризации. Таким образом, необходима оценка способности интрамаммарной терапии обуславливать микробиологическое излечение.

- 5 Микробиологическое излечение мастита определяют путем анализа микробиологической культуры асептических проб молока, взятых до начала лечения и минимум 7 дней после последней обработки на уровне четверти. Микробиологическое излечение определяли как: либо (i) выделение одного или двух типов колоний до лечения с последующим отсутствием роста после лечения, или (ii) выделение одного или двух 10 типов колоний перед лечением с последующим выделением различных типов колоний после лечения. Эффективность IVP/референсного продукта определяли как процент от всех четвертей с клиническим маститом, в которые вводили конкретный IVP/референсный продукт, для которых было достигнуто микробиологическое излечение.

Материалы и методы

- 15 Результаты микробиологического анализа были получены для образцов молока, собранных до инфекции, после инфекции и после терапии. Ячейки, в которых указано нулевое значение, соответствуют культуре с отсутствием роста. Приведена информация о том, где был собран образец, об идентификации организма и количестве 20 присутствующих организмов (КОЕ/мл), или образец был определен как контаминированный (Фигура 36). Остальные ячейки на рисунке указывают причину, в случае если образец не был собран для оценки.

Результаты

- Результаты представлены на Фигуре 36. Референсный продукт (Noroclox) обуславливал микробиологическое излечение в 5 из 8 (62,5%) инфицированных четвертях. 25 IVP2 (300 мг LP 1369) обуславливал микробиологическое излечение в 4 из 6 (66,7%) инфицированных четвертях. IVP1 (150 мг LP 1369) обуславливал полное или частичное микробиологическое излечение в 4 из 6 (66,7%) инфицированных четвертях. Для данной 30 модели *Streptococcus uberis*-индуцированного мастита, приведенные результаты, вместе с результатами, представленные в Примере 7, свидетельствуют о том, что IVP 1 и IVP2 обеспечивают высокий уровень клинического и микробиологического излечения. Эти результаты указывают на эффективное лечение мастита.

ПРИМЕР 9 - Определение профиля остаточного выведения LP 1369 в терапии клинического мастита, индуцированного *Streptococcus uberis*, у дойных коров (Пример 7)

- 35 Данные о концентрациях LP1369 в молоке из 6 четвертей для IVP1 и IVP2, обработанных 6 раз (6 последовательных доений), после терапии были предоставлены аналитической лабораторией Школы фармации, Университет Южной Австралии, Аделаида, ЮА, Австралия. Предел количественного определения для метода (ПКО) по определению содержания LP 1369 в молоке составил 0,088 мг/л. Максимальный 40 остаточный уровень (MRL) для LP 1369 составляет 0,010 мг/кг согласно APVMA, декабрь 2013 года, Agricultural and Veterinary Chemicals Code Instrument No. 4 (MRL Standard) 2012.

Анализ данных

В пробах молока, где содержание LP 1369 были ниже ПКО, концентрацию LP1369 принимали за 0,0001 мг/л.

- 45 Данные по концентрациям в молоке оценивали с помощью графиков распределения вероятностей, и для всех временных точках данные соответствовали логарифмически нормальному распределению. Таким образом, значения концентрации LP 1369 в цельном молоке преобразовывали логарифмически до расчета средних и стандартных отклонений

(взвешенных по объему произведенного молока каждым животным) для каждого момента времени с использованием Microsoft Excel 2010.

Определение выведения любого вещества из молока зависит от размера исследуемой популяции. Поскольку число коров в выборке в данном исследовании было небольшим, для анализа применяли фактор g (фактор, который обеспечивает 99% доверительный интервал вероятности того, что результаты являются репрезентативными для популяции). Возможность рассредоточенных данных сводили к минимуму за счет установления коэффициента g для популяции из 20 животных.

Были сделаны следующие допущения. Значение концентрации активного вещества в молоке на доение 1 (время 12 ч) было репрезентативным для средних концентраций, достигнутых при доении после первой, второй и последней обработки. Кроме того, значение объема молока на доение 1 (время 12 ч) было репрезентативным для среднего объема молока, собранного при доении после первой, второй и последней обработки.

Результаты

Таблица 13. Четверти, обработанные IVP 1 (150 мг активного вещества на шприц)

Информация о доении	Общий объем молока (л)	Взвешенная средняя концентрация LP1369 (мг/л)	Взвешенное стандартное отклонение (мг/л)	Взвешенный ВДП (log шкала)*
Доение 1 (12 ч)	6,28	26,1619	11,3811	2,2594
Доение 2 (24 ч)	9,75	1,7359	3,0289	1,3336
Доение 4 (48 ч)	7,00	0,8422	4,3938	1,1010
Доение 6 (72 ч)	9,50	0,1153	0,2720	0,2103

* взвешены по выходу молока

Как показано на Фигуре 37, значения ВДП по log 10 шкале снижались линейно с течением времени ($R^2=0,9113$). Подобранная линия указывает на то, что ВДП будет ниже -1 (0,010 мг/л по логарифмической шкале) через 112,7 часов после последней обработки при обработке в ходе 6 последовательных доений. Чрезвычайно высокие значения ВДП и длительное остаточное выведение, скорее всего, обусловлено ошибочным результатом для 1 из 6 четвертей (корова/четверть ID 9 ПП), которая оказалась высоко положительной на 4 доение после последней обработки.

Таблица 14. Четверти (2 на корову), обработанные IVP 2 (300 мг активного вещества на шприц)

Информация о доении	Общий объем молока (л)	Взвешенная средняя концентрация LP1369 (мг/л)	Взвешенное стандартное отклонение (мг/л)	Взвешенный ВДП (log шкала)*
Доение 1 (12 ч)	4,94	117,1022	102,3072	2,8663
Доение 2 (24 ч)	5,40	1,5246	4,7322	1,1895
Доение 4 (48 ч)	5,65	0,1376	0,2538	0,0980
Доение 6 (72 ч)	5,75	0,0001	0,0000	-3,3010

* взвешены по выходу молока

Как показано на Фигуре 38, значения ВДП по log 10 шкале снижались линейно с течением времени ($R^2=0.9558$). Подобранная линия указывает на то, что ВДП будет ниже -1 (0,010 мг/л по логарифмической шкале) через 51,7 часов после последней обработки при обработке в ходе 6 последовательных доений.

Заключение

Результаты данного исследования по выведению LP1369 впервые наглядно показали, что LP1369 быстро выводится из обработанных четвертей, пораженных маститом. Оптимизация рецептуры интрамаммарного препарата должна учитывать необходимость в максимальной эффективности и минимальном времени пребывания соединения LP1369 в молоке.

(57) Формула изобретения

1. Способ лечения или предотвращения мастита, вызванного бактериальной

10 инфекцией, у субъекта, включающий стадию введения композиции, содержащей терапевтически эффективное количество полиэфирного ионофора, выбранного из группы, включающей наразин; салиномицин; лазалоцид; монензин; семдурамицин; мадурамицин и лаидломицин, или его терапевтически приемлемой соли в молочную 15 железу субъекта, причем указанное введение представляет собой интрамаммарное введение.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный субъект выбран из группы, включающей бычьих, овчевых, козьих, верблюдовых, лошадиных и человека.

3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный полиэфирный ионофор вводят 20 указанному субъекту в дозе в диапазоне от 20 мг на канал соска до 900 мг на канал соска.

4. Способ по п. 3, отличающийся тем, что указанный полиэфирный ионофор вводят указанному субъекту в дозе в диапазоне от 50 мг на канал соска до 600 мг на канал соска.

5. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный мастит, вызванный

25 бактериальной инфекцией, вызван видом бактерии, выбранным из группы, включающей: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus felis*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus caprae*, *Staphylococcus cohnii* subsp. *cohnii*, *Staphylococcus cohnii* subsp. *urealyticus*, *Staphylococcus capitis* subsp. *capitis*, *Staphylococcus capitis* subsp. *urealyticus*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus delphini*, *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans*, *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, *Streptococcus equinus*, *Bacillus melaninogenicus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus anthracis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus durans*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Actinomyces bovis*, *Propionibacterium acnes*, *Propionibacterium granulosum*, *Eubacterium*, *Peptococcus indolicus* и *Peptostreptococcus anaerobius*.

40 6. Способ по п. 5, отличающийся тем, что указанный вид бактерии выбран из группы, включающей: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* и *Propionibacterium acnes*.

7. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанная бактерия является устойчивой к антибиотику.

45 8. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанная композиция дополнительно содержит дополнительный противомикробный агент, выбранный из группы, включающей антибиотики и противогрибковые агенты.

9. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанная композиция дополнительно содержит хелатирующий агент.

10. Применение полиэфирного ионофора, выбранного из группы, включающей наразин; салиномицин; лазалоцид; монензин; семдурамицин; мадурамицин и лаидломицин, или его терапевтически приемлемой соли в изготовлении композиции для лечения или предотвращения мастита, вызванного бактериальной инфекцией, у субъекта, причем указанная композиция предназначена для интрамаммального введения.

11. Применение по п. 10, отличающееся тем, что указанный полиэфирный ионофор вводят указанному субъекту в дозе в диапазоне от 20 мг на канал соска до 900 мг на канал соска.

12. Применение по п. 11, отличающееся тем, что указанный полиэфирный ионофор вводят указанному субъекту в дозе в диапазоне от 50 мг на канал соска до 600 мг на канал соска.

13. Применение по п. 10, отличающееся тем, что указанный мастит, вызванный бактериальной инфекцией, вызван видом бактерии, выбранным из группы, включающей: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus felis*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus caprae*, *Staphylococcus cohnii* subsp. *cohnii*, *Staphylococcus cohnii* subsp. *urealyticus*, *Staphylococcus capitis* subsp. *capitis*, *Staphylococcus capitis* subsp. *urealyticus*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus delphini*, *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans*, *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, *Streptococcus equinus*, *Bacillus melaninogenicus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus anthracis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus durans*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Actinomyces bovis*, *Propionibacterium acnes*, *Propionibacterium granulosum*, *Eubacterium*, *Peptococcus indolicus* и *Peptostreptococcus anaerobius*.

14. Применение по п. 13, отличающееся тем, что указанная бактерия выбрана из группы, включающей *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* и *Propionibacterium acnes*.

15. Применение по п. 10, отличающееся тем, что указанная бактерия является устойчивой к антибиотику.

16. Применение по п. 10, отличающееся тем, что указанный субъект выбран из группы, включающей бычьих, овечьих, козьих, верблюдовых, лошадиных и человека.

17. Применение по п. 10, отличающееся тем, что указанная композиция дополнительно содержит дополнительный противомикробный агент, выбранный из группы, включающей антибиотики и противогрибковые агенты.

18. Применение по п. 10, отличающееся тем, что указанная композиция дополнительно содержит хелатирующий агент.

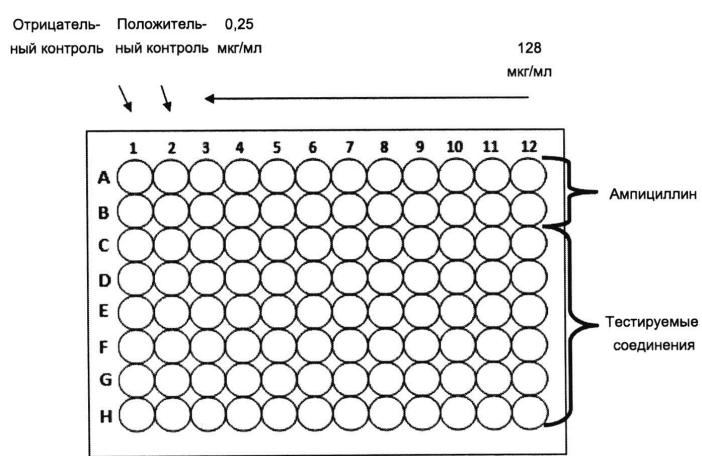
IDштамма #	Источник	Вид	Профиль устойчивости
ATCC 49775	Человек	<i>S. aureus</i>	
MSS 1	Корова	<i>S. aureus</i>	
MSS 2	Кошка	<i>S. intermedius</i>	P
MSS 3	Кошка	<i>S. aureus</i>	P
MSS 4	Неизв.	<i>S. pseudointermedius</i>	
MSS 5	Собака	<i>S. intermedius</i>	P
MSS 6	Человек	<i>S. pseudointermedius</i>	
MSS 7	Собака	<i>S. pseudointermedius</i>	P
MSS 8	Собака	<i>Coagulase negative</i>	P, Te
MSS 9	Собака	<i>S. intermedius</i>	
MSS 10	Собака	<i>S. intermedius</i>	
MSS 11	Неизв.	<i>Coagulase negative</i>	P, Te
MSS 12	Собака	<i>S. pseudointermedius</i>	P
MSS 13	Птица	<i>Coagulase negative</i>	P, Te
MSS 14	Собака	<i>S. intermedius</i>	P
MSS 15	Собака	<i>S. intermedius</i>	P, Te
MSS 16	Свинья	<i>Coagulase negative</i>	P
MSS 17	Свинья	<i>S. aureus</i>	Cl, E
MSS 18	Собака	<i>S. intermedius</i>	P
MSS 19	Собака	<i>Coagulase negative</i>	E
MSS 20	Собака	<i>S. pseudointermedius</i>	Cl, P, Te
MRSA 1	Человек	<i>S. aureus</i>	Enr, E, Gn, O, P
MRSA 2	Человек	<i>S. aureus</i>	Gn, O, P, Tm
MRSA 3	Человек	<i>S. aureus</i>	E, Enr, O, P
MRSA 4	Человек	<i>S. aureus</i>	E, Enr, O, P
MRSA 5	Человек	<i>S. aureus</i>	E, Enr, Gn, O, P, Te
MRSA 6	Человек	<i>S. aureus</i>	E, Enr, O, P, Tm
MRSA 7	Человек	<i>S. aureus</i>	E, Enr, Gn, O, P, Tm
MRSA 8	Человек	<i>S. aureus</i>	E, Gn, O, P, Te, Tm
MRSA 9	Человек	<i>S. aureus</i>	E, O, P
MRSA 10	Человек	<i>S. aureus</i>	E, Enr, O, P
MRSA 11	Человек	<i>S. aureus</i>	O, P
MRSA 12	Человек	<i>S. aureus</i>	E, O, P, Te
MRSA 13	Человек	<i>S. aureus</i>	E, O, P
MRSA 14	Человек	<i>S. aureus</i>	E, O, P
MRSA 15	Человек	<i>S. aureus</i>	E, O, P
MRSA 16	Человек	<i>S. aureus</i>	O, P, Te

Фигура 1

2/ 28

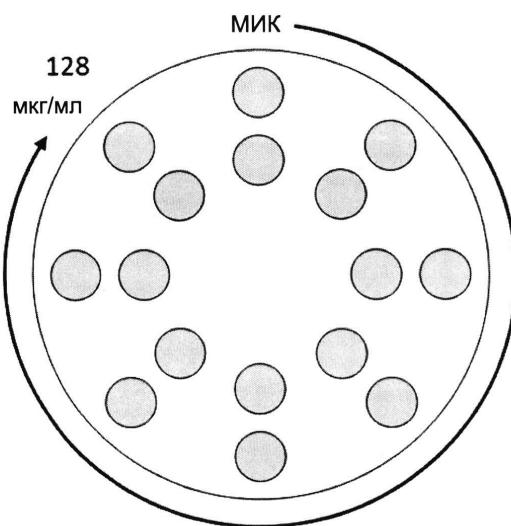
MRSA 17	Человек	<i>S. aureus</i>	E, Enr, Gn, O, P, Tm
MRSA 18	Человек	<i>S. aureus</i>	O, P, Tm
MRSA 19	Человек	<i>S. aureus</i>	E, O, P, Te, Tm
MRSA 20	Человек	<i>S. aureus</i>	Enr, O, P
MR-CNS 1	Собака	<i>Coagulase negative</i>	Enr, Gn, O, P, Tm

Фигура 1 (продолж.)

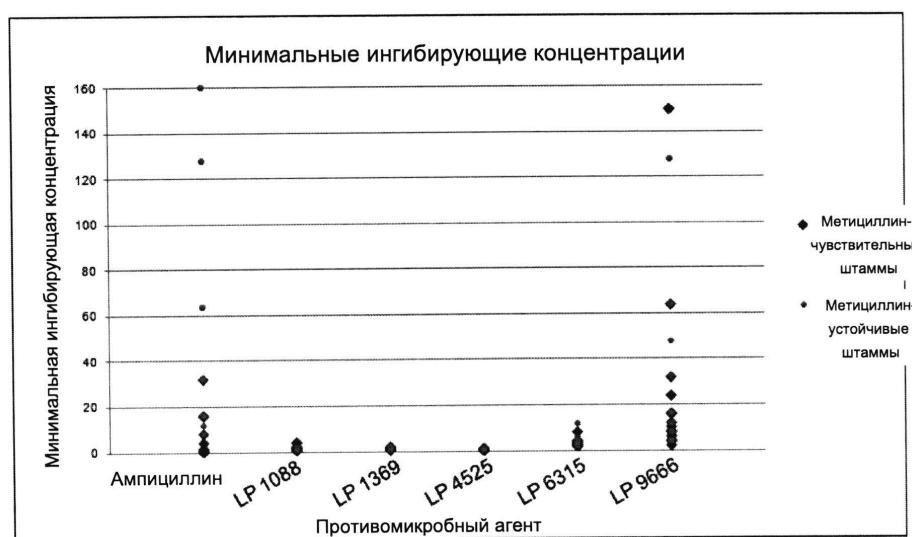


Фигура 2

3 / 28



Фигура 3



Фигура 4

4 / 28

Соединение	Ампциллин	LP 1088	LP 1369	LP 4525	LP 6315	LP 9666
МИК 50	0.5	1	1	0.5	2	8
МИК 90	16	2	2	1	4	64
МИК	0.25 – 32	0.5 – 4	0.5 – 2	0.25 – 1	2 – 8	2 – >128
Диапазон						

Фигура 5

Соединение	Ампциллин	LP 1088	LP 1369	LP 4525	LP 6315	LP 9666
МИК 50	128	1	1	0.5	4	32
МИК 90	>128	2	1	0.5	4	64
МИК	8 – >128	1 – 2	0.5 – 2	0.25 – 1	2 – 16	4 – 128
Диапазон						

Фигура 6

5 / 28



Фигура 7

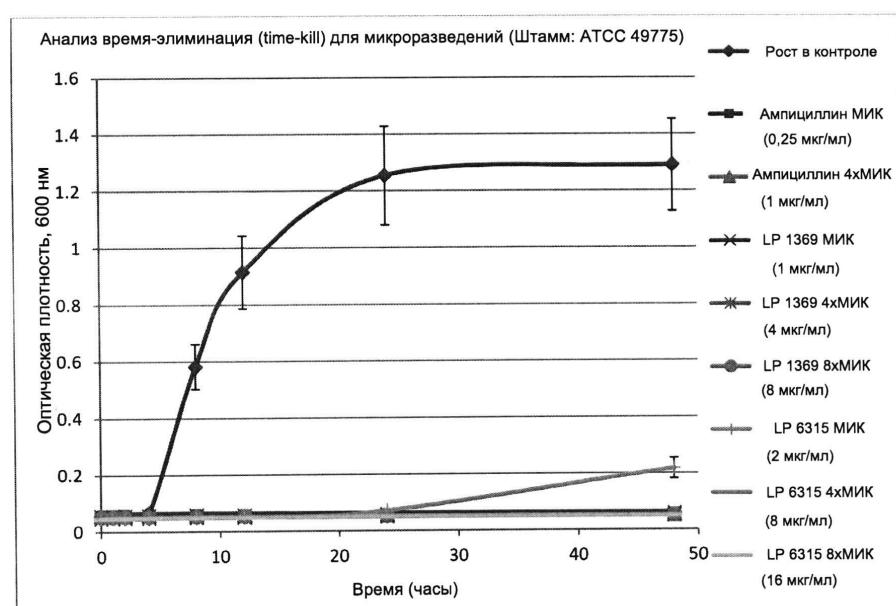
Соединение	LP 1088	LP 1369	LP 4525	LP 6315	LP 9666
МБК 50	>128	64	>128	>128	>128
МБК 90	>128	>128	>128	>128	>128
диапазон МБК	4 – >128	4 – >128	64 – >128	64 – >128	128 – >128

Фигура 8

6 / 28

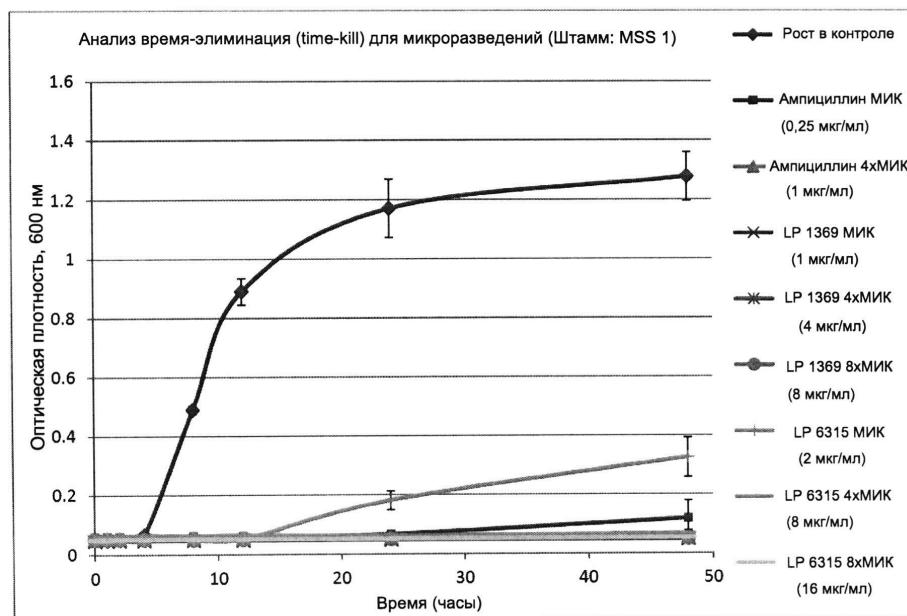
Соединение	LP 1088	LP 1369	LP 4525	LP 6315	LP 9666
МБК '50	>128	>128	>128	128	>128
МБК '90	>128	>128	>128	>128	>128
диапазон МБК	128 – >128	64 – >128	4 – >128	4 – >128	128 – >128

Фигура 9

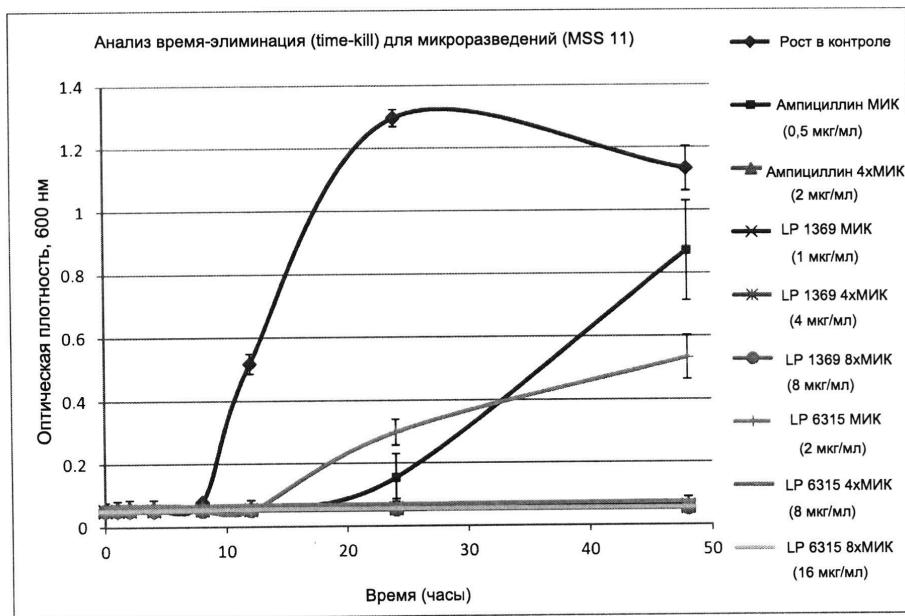


Фигура 10

7 / 28

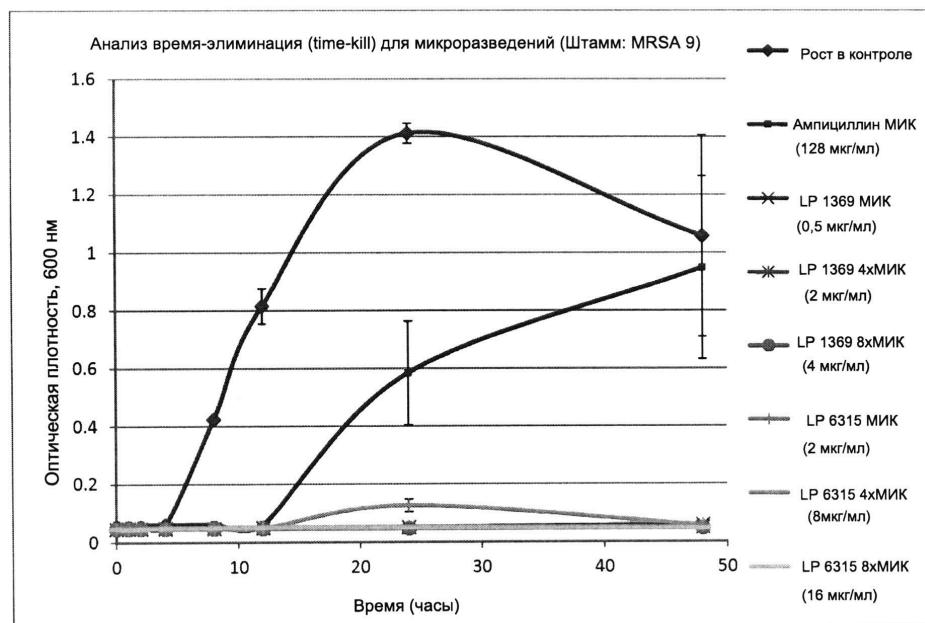


Фигура 11

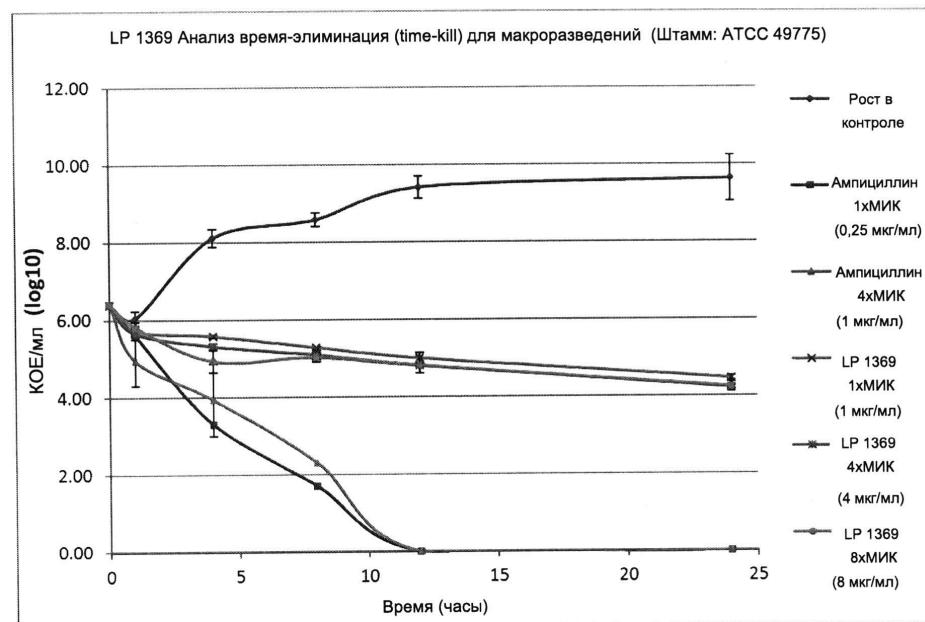


Фигура 12

8 / 28

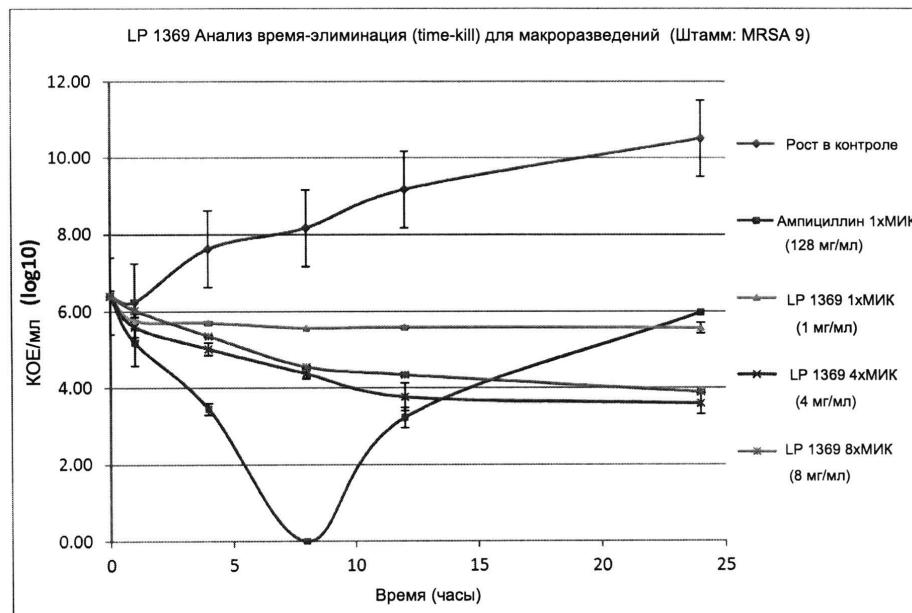


Фигура 13



Фигура 14

9 / 28

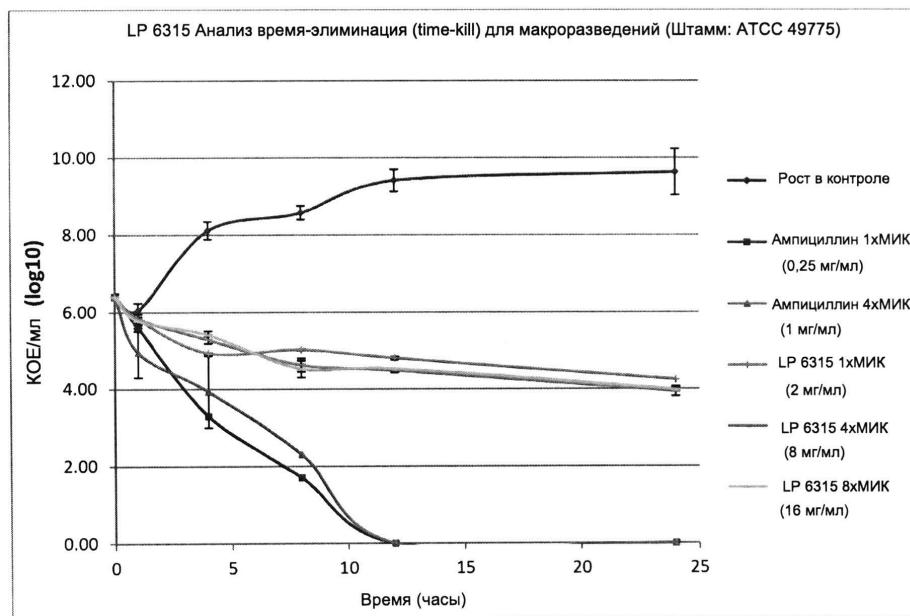


Фигура 15

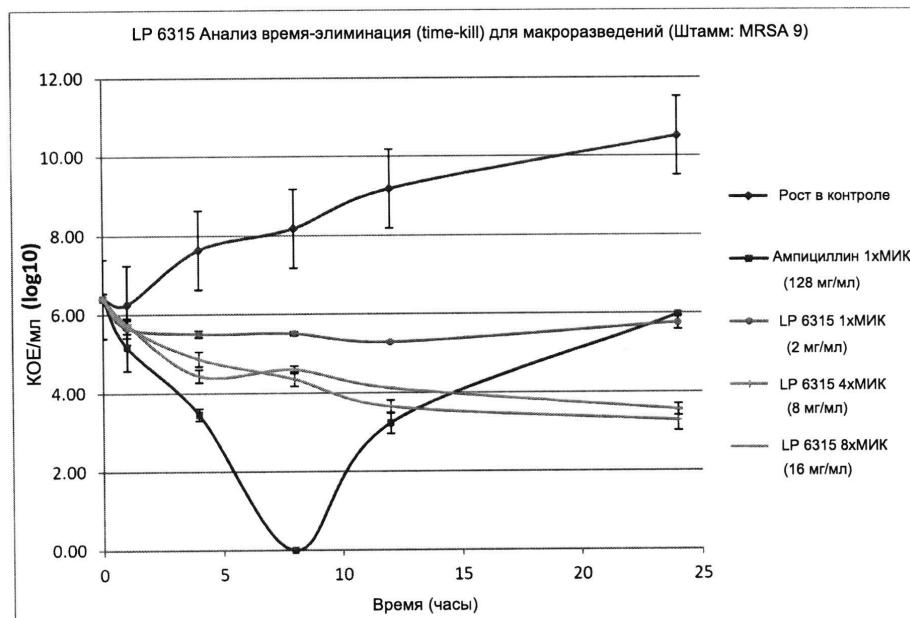
	Рост в контроле	Ампициллин 1xМИК	Ампициллин 4xМИК	LP 1369 1xМИК	LP 1369 4xМИК	LP 1369 8xМИК
ATCC 49775	3.23	-6.4	-6.4	-1.94	-2.18	-2.16
MRSA 9	4.11	-6.41	N/A	-0.84	-2.82	-2.52

Фигура 16

10 / 28



Фигура 17

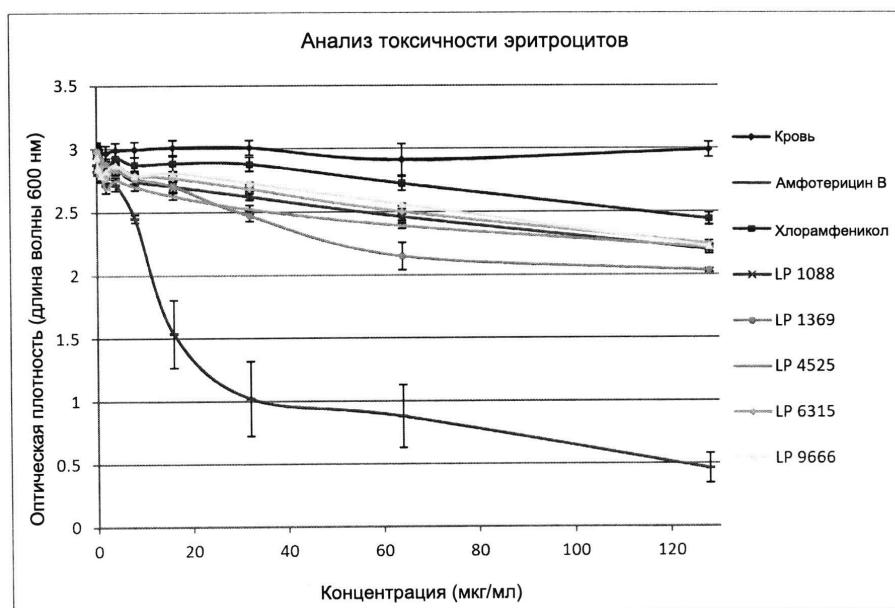


Фигура 18

11 / 28

	Рост в контроле	Ампициллин 1xМИК	Ампициллин 4xМИК	LP 6315 1xМИК	LP 6315 4xМИК	LP 6315 8xМИК
ATCC 49775	3.23	-6.4	-6.4	-1.49	-2.47	-2.42
MRSA 9	4.11	-6.41	N/A	-0.64	-3.13	-2.86

Фигура 19



Фигура 20

12 / 28

Адепанд #	GLY	Место изоляции	Вид	Порода	MRSP / MSSP	гн. мес	месA по от-ПЦР Adl	Цефокситин ZD (мм)	Цефокситин ZD, Adl (мм)	Оксациллин ZD, Adl (мм)	Оксациллин Etest МИК
S1P1	191	Подмышки	<i>S. pseudointermedius</i>	MRSP	Поз.	Поз.	0	0	0	0	>256
S2P2	193	Ткань	<i>S. pseudointermedius</i>	Шарпей X	MRSP	Поз.	Поз.	21	21	0	>256
S3P3	194	Мазок кожи	<i>S. pseudointermedius</i>	Маскифф X	MRSP	Поз.	Поз.	21	24	0	>256
S4P4	214	Мазок кожи	<i>S. pseudointermedius</i>	Кав.-лонг.-чарлз-спаннель	MRSP	Поз.	Поз.	29	20	0	2
S5P5	215	Мазок кожи	<i>S. pseudointermedius</i>	Шарпей	MRSP	Поз.	Поз.	26	30	0	4
S6P6	218	Мазок лапки	<i>S. pseudointermedius</i>	Такса	MRSP	Поз.	Поз.	22	26	0	>256
S7P7	219	Мазок кожи	<i>S. pseudointermedius</i>	Британ. бульдог	MRSP	Поз.	Поз.	21	19	0	>256
S8P8	220	Мазок кожи	<i>S. pseudointermedius</i>	Британ. бульдог	MRSP	Поз.	Поз.	21	22	0	>256
S9P9	96	Мазок кожи	<i>S. pseudointermedius</i>	Акита	MRSP	Поз.	Поз.	23	26	0	4
S10P10	190	Мазок кожи	<i>S. pseudointermedius</i>	Акита	MRSP	Поз.	Поз.	21	25	0	>256
S11P11	187	Ткань	<i>S. pseudointermedius</i>	Бульдерьер	MSSP	Поз.	Поз.	22	21	0	>256
S12P12	188	Мазок кожи	<i>S. pseudointermedius</i>	Датский дог	MRSP	Поз.	Поз.	24	24	13	15
S13P13	189	Мазок хвост. части	<i>S. pseudointermedius</i>	Датский дог	MSSP	НЕГ.	НЕГ.	36	40	26	36
S14P14	185	Ткань	<i>S. pseudointermedius</i>	Лабрад. ретривер	MSSP	НЕГ.	НЕГ.	34	32	22	29
S15P15	191	Ткань	<i>S. pseudointermedius</i>	Мальт. болонка X	MSSP	НЕГ.	НЕГ.	33	34	22	25
S16P16	194	Мазок кожи	<i>S. pseudointermedius</i>	Мальт. болонка	MSSP	НЕГ.	НЕГ.	38	42	26	34
S17P17	195	Мазок кожи	<i>S. pseudointermedius</i>	Шарпей X	MSSP	НЕГ.	НЕГ.	36	38	22	26
S18P18	196	Ткань	<i>S. pseudointermedius</i>	Джек-рассел-терьер	MSSP	НЕГ.	НЕГ.	25	40	22	30
S19P19	197	Мазок кожи	<i>S. pseudointermedius</i>	Лабрад. ретривер	MSSP	НЕГ.	НЕГ.	36	38	25	32
S20P20	198	Мазок кожи	<i>S. pseudointermedius</i>	Фокстерьер	MSSP	НЕГ.	НЕГ.	38	36	23	30
S21P21	199	Мазок хвост. части	<i>S. pseudointermedius</i>	Лабрад. ретривер	MSSP	НЕГ.	НЕГ.	36	40	27	37
S22P22	200	Мазок кожи	<i>S. pseudointermedius</i>	Мальт. болонка	MSSP	НЕГ.	НЕГ.	34	35	21	26
S23P23	203					Поз.	Поз.	29	26	13	14

Фигура 21

13 / 28

	macA по OT-ЦР	Пенициллин	Ампициллин	Эритромицин	Гентамицин	Клиндамицин	Ципрофлоксацин
S1P1	Поз.	R	R	R	R	S	R
S2P2	Поз.	R	R	R	R	I	R
S3P3	Поз.	R	R	R	R	R	R
S4P4	Поз.	R	R	R	R	R	R
S5P5	Поз.	R	R	R	R	R	R
S6P6	Поз.	R	R	R	R	R	R
S7P7	Поз.	R	R	R	R	R	R
S8P8	Поз.	R	R	R	R	R	R
S9P9	Поз.	R	R	S	R	R	R
S10P10	Поз.	R	R	R	R	R	R
S11P11	Поз.	R	R	R	S	I	S
S12P12	Поз.	R	S	S	R	S	R
S13P13	НЕГ.	R	R	S	S	S	S
S14P14	НЕГ.	R	R	S	S	S	S
S15P15	НЕГ.	R	R	S	S	S	S
S16P16	НЕГ.	R	R	S	S	S	S
S17P17	НЕГ.	R	R	S	S	S	S
S18P18	НЕГ.	R	R	S	S	S	S
S19P19	НЕГ.	R	R	S	S	S	S
S20P20	НЕГ.	R	R	S	S	S	S
S21P21	НЕГ.	S	S	S	S	S	S
S22P22	НЕГ.	R	R	S	S	S	S
S23P23	Поз.	R	R	R	S	I	S

Фигура 22

	тест по ОГ-ПИР	Цефалотин	Хлорамфеникол	Тетрациклин	Окситетрациклин	Ванкомицин	Цефотетан	Моксифлоксацин	Рифампицин
S1P1	Поз.	R	S	R	R	R	S	S	S
S2P2	Поз.	S	R	S	S	R	S	I	S
S3P3	Поз.	S	R	I	R	S	R	S	S
S4P4	Поз.	I	R	R	R	S	S	S	S
S5P5	Поз.	S	R	R	R	S	S	S	S
S6P6	Поз.	S	R	I	R	S	S	S	S
S7P7	Поз.	R	R	R	R	R	S	S	S
S8P8	Поз.	I	R	R	R	S	S	S	S
S9P9	Поз.	S	R	R	I	S	S	S	S
S10P10	Поз.	S	R	I	R	S	S	S	S
S11P11	Поз.	S	S	S	S	S	S	S	S
S12P12	Поз.	S	S	R	R	S	S	S	S
S13P13	НЕИ.	S	S	S	S	S	S	S	S
S14P14	НЕИ.	S	S	S	S	S	S	S	S
S15P15	НЕИ.	S	S	I	I	S	S	S	S
S16P16	НЕИ.	S	S	S	S	S	S	S	S
S17P17	НЕИ.	S	S	S	S	S	S	S	S
S18P18	НЕИ.	S	S	S	S	S	S	S	S
S19P19	НЕИ.	S	S	S	S	S	S	S	S
S20P20	НЕИ.	S	S	R	I	S	S	S	S
S21P21	НЕИ.	S	S	S	S	S	S	S	S
S22P22	НЕИ.	S	S	S	S	S	S	S	S
S23P23	Поз.	S	S	S	S	S	S	S	S

Фигура 22 (продолж.)

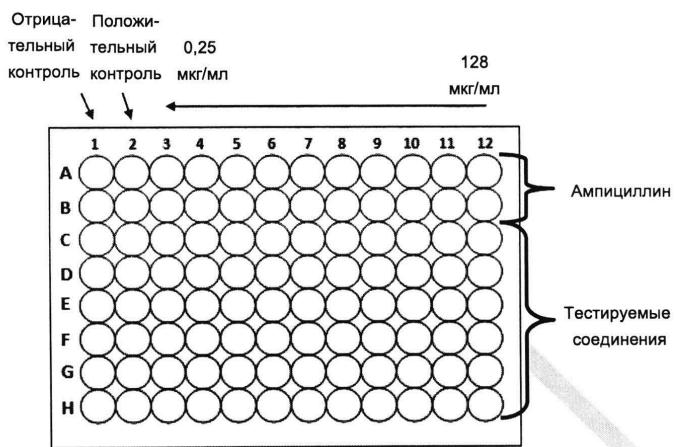
15 / 28

	Колонка 1	Ампилилин	LP 1369	LP 4525	LP6315
1	S1P1	128	1	0.5	2
2	S2P2	128	0.5	0.25	1
3	S3P3	128	0.5	0.5	2
4	S4P4	128	0.5	0.25	1
5	S5P5	16	0.5	0.1	1
6	S6P6	64	0.5	0.25	1
7	S7P7	128	0.5	0.25	1
8	S8P8	128	0.5	0.25	1
9	S9P9	32	0.5	0.25	1
10	S10P10	64	1	0.25	1
11	S11P11	128	0.5	0.25	1
12	S12P12	32	0.5	0.25	1
13	S13P13	0.25	0.5	0.1	1
14	S14P14	1	1	0.25	2
15	S15P15	4	0.5	0.25	1
16	S16P16	0.25	0.5	0.25	1
17	S17P17	1	0.25	0.1	1
18	S18P18	4	0.25	0.25	1
19	S19P19	0.5	0.5	0.25	1
20	S20P20	4	0.5	0.25	1
21	S21P21	0.1	0.5	0.25	2
22	S22P22	8	0.5	0.25	2
23	S23P23	32	0.5	0.25	1

Колонка 1	Ампилилин	LP 1369	LP 4525	LP6315
МИК 50 мкг/мл	32	0.5	0.25	1
МИК 90 мкг/мл	128	1	0.25	2
мода МИК мкг/мл	128	0.5	0.25	1
диапазон МИК мкг/мл	0.1-128	0.25-1	0.1- 0.25	1 - 2

Фигура 23

16 / 28



Фигура 24

Соединение	МИК			МБК		
	МИК 50	МИК 90	диапазон МИК	МБК 50	МБК 90	диапазон МБК
LP1088	1	2	0.25-4	128	x	4-x
LP1369	2	4	0.5-8	64	x	2-x
LP4525	0.25	1	0.25-2	128	x	2-x
LP6315	0.5	4	0.25-8	128	x	4-x
LP9666	32	128	1-x	x	x	64-x
Ампициллин	0.25	0.25	0.25-0.5	не прим.	не прим.	не прим.

Примечание: ' x' обозначает сплошной рост

Фигура 25

Соединение	МИК			МБК		
	МИК 50	МИК 90	диапазон МИК	МБК 50	МБК 90	диапазон МБК
LP1088	1	2	1-4	x	x	4-x
LP1369	1	4	0.5-8	x	x	2-x
LP4525	0.5	1	0.25-1	64	x	2-x
LP6315	4	4	1-4	128	x	4-x
LP9666	32	128	8-128	x	x	64-x
Ампициллин	0.25	0.5	0.25-0.5	не прим.	не прим.	не прим.

Примечание: ' x' обозначает сплошной рост

Фигура 26

17 / 28

Соединение	МИК			МБК
	МИК 50	МИК 90	диапазон МИК	
LP1088	2	4	0.5-4	4-x
LP1369	2	8	0.5-8	32-x
LP4525	0.5	1	0.25-1	8-x
LP6315	2	8	0.25-8	32-x
LP9666	64	128	4-128	x
Ампциллин	0.25	0.25	-	не прим.

Примечание: ' x' обозначает сплошной рост

Фигура 27

Соединение	МИК			МБК		
	МИК 50	МИК 90	диапазон МИК	МБК 50	МБК 90	диапазон МБК
LP1088	0.5	1	0.25-2	x	x	64-x
LP1369	2	4	2-4	x	x	64-x
LP4525	0.25	0.25	0.25-2	64	128	16-x
LP6315	0.25	0.5	0.25-0.5	128	128	8-x
LP9666	32	64	4-128	x	x	x
Ампциллин	0.25	0.25	-	не прим.	не прим.	не прим.

Примечание: ' x' обозначает сплошной рост

Фигура 28

Соединение	МИК			диапазон
	МИК 50	МИК 90	диапазон МИК	
LP1088	1	1	0.25-1	8-x
LP1369	2	4	0.5-4	32-128
LP4525	0.25	0.25	-	4-x
LP6315	0.25	0.25	-	4-128
LP9666	4	32	1-32	x
Ампциллин	0.5	0.5	0.25-0.5	не прим.

Примечание: ' x' обозначает сплошной рост

Фигура 29

Ферма	Корова	четверть	Окрашивание по Граму	Тест на каталазу	коагулаза	эскулин	CAMP	Уровень гемолиза	Группа по Лэнсфи лд
MAM	865	LR	Положительный	Положительный	Положительный	-	-	у-гемолитический	-
MAM	940	RR	Положительный	Отрицательный	-	Отрицательный	Отрицательный	у-гемолитический	вне груп
MAM	954	RR2	Положительный	Положительный	Отрицательный	-	-	у-гемолитический	-
MAM	954	RR1	Положительный	Положительный	Положительный	-	-	β-гемолитический	-
BEV	978	RR1	Положительный	Положительный	Отрицательный	-	-	α-гемолитический	-
MAM	1041	RF1	Положительный	Положительный	Положительный	-	-	β-гемолитический	-
MAM	1041	RF2	Положительный	Положительный	Положительный	-	-	β-гемолитический	-
MAM	1051	RF1	Положительный	Положительный	Положительный	-	-	у-гемолитический	-
MAM	1060	LR	Положительный	Положительный	Отрицательный	-	-	у-гемолитический	-
MAM	1092	LR	Положительный	Положительный	Положительный	-	-	β-гемолитический	-
MAM	1096	RF	Положительный	Положительный	Положительный	-	-	β-гемолитический	-
MAM	1155	LR	Положительный	Положительный	Положительный	-	-	у-гемолитический	-
MAM	1155	LF	Положительный	Положительный	Положительный	-	-	у-гемолитический	-
MAM	1194	LF	Положительный	Положительный	Отрицательный	-	-	у-гемолитический	-
MAM	1196	LF	Положительный	Положительный	Положительный	-	-	-	-
MAM	1222	RF	Положительный	Положительный	Отрицательный	Отрицательный	-	у-гемолитический	-
MAM	1232	LF	Положительный	Положительный	Положительный	-	-	β-гемолитический	-
MAM	1232	LR	Положительный	Положительный	Положительный	-	-	β-гемолитический	-
MAM	1251	RF	Положительный	Положительный	Положительный	-	-	β-гемолитический	-
MAM	1271	RF1	Отрицательный	Отрицательный	-	-	Отрицательный	α-гемолитический	-
MAM	1271	RF	Положительный	Положительный	Отрицательный	-	-	у-гемолитический	-
MAM	1271	RF2	Положительный	Положительный	Отрицательный	-	-	у-гемолитический	-
MAM	1283	LF2	Положительный	Отрицательный	-	Положительный	Отрицательный	α-гемолитический	вне груп
MAM	1283	LF1	Положительный	Положительный		-	-	у-гемолитический	-
BEV	1304	RR	Положительный	Положительный		-	-	α-гемолитический	-
BEV	1337	FR2	Положительный	Отрицательный	-	Отрицательный	Отрицательный	β-гемолитический	B
BEV	1337	FL	Положительный	Отрицательный	-	Отрицательный	Отрицательный	β-гемолитический	B

Фигура 30

BEV	1337	FR1	Положительный	Отрицательный	-	Положительный	Отрицательный	α-гемолитический	вне груши
BEV	1346	FR	Положительный	Отрицательный	-	Отрицательный	Отрицательный	β-гемолитический	В
BEV	1346	RR1	Положительный	Отрицательный	-	Отрицательный	Отрицательный	β-гемолитический	В
BEV	1346	RR	Положительный	Отрицательный	-	Отрицательный	Отрицательный		В
BEV	1346	FL	Положительный	Отрицательный	-	Отрицательный	Отрицательный	β - гемолитический	В
BEV	1346	RL	Положительный	Отрицательный	-	Отрицательный	Отрицательный	β- гемолитический	В
BEV	1537	FL	Положительный	Положительный	Положительный	-	-	у - гемолитический	-
BEV	1591	RF1	Положительный	Отрицательный	-	-	-	α-гемолитический	вне груши
BEV	1765	RR	Положительный	Положительный	Отрицательный	-	-	α-гемолитический	-
BEV	1765	RR1	Положительный	Отрицательный	-	Отрицательный	Отрицательный	β- гемолитический	В
BEV	2448	RL	Положительный	Положительный	-	-	-		-
BEV	2530	FLW	Положительный	Положительный	Отрицательный	-	-	у- гемолитический	-
BEV	2825	FR	Отрицательный	Положительный	-	-	-		-
BEV	2825	RR	Положительный	Положительный	Отрицательный	-	-	у- гемолитический	-
BEV	3071	RL2	Положительный	Отрицательный	-	Отрицательный	Отрицательный	β- гемолитический	В
BEV	3078	RRL2	Положительный	Отрицательный	-	Отрицательный	Отрицательный	β- гемолитический	В
BEV	3179	RL	Положительный	Отрицательный	-	Отрицательный	Отрицательный	β- гемолитический	В
BEV	3956	RL	Положительный	Отрицательный	-	-	Отрицательный	β- гемолитический	В
BEV	4027	RR	Положительный	Положительный	Отрицательный	-	-	У- гемолитический	-
BEV	6019	FR1	Положительный	Отрицательный	-	Отрицательный	Отрицательный	α- гемолитический	вне груши
BEV	6121	FL	Положительный	Положительный	Отрицательный	-	-	у- гемолитический	-
BEV	6154	RL	Положительный	Отрицательный	-	Отрицательный	Отрицательный	α- гемолитический	вне груши
BEV	6175	FL	Положительный	Отрицательный	-	Положительный	Отрицательный	α- гемолитический	вне груши
контр оль	6533	Контрол ьный штамм	Положительный	Отрицательный	Положительный	-	-		-

Фигура 30 (продолж.)

Ферма	Корова	четверть	Морфология клеток	Дополнительные морфологические характеристики	Размер одиночных клеток	Диагноз
MAM	865	LR	КОККИ	полностью круглые	средние	<i>S. aureus</i>
MAM	940	RR	КОККИ	ланцетовидные	мелкие	<i>S. uberis</i>
MAM	954	RR2	КОККИ	Круглые, кластеризованы	средние	Коагулазонегативный стафилококк
MAM	954	RR1	КОККИ	Круглые, кластеризованы	средние	<i>S. aureus</i>
BEV	978	RR1	палочка	цепи	крупные	<i>Bacillus</i> spp.
MAM	1041	RF1	КОККИ	кластеризованы	средние	<i>S. aureus</i>
MAM	1041	RF2	КОККИ	круглые	средние	<i>S. aureus</i>
MAM	1051	RF1	КОККИ	круглые	средние	<i>S. aureus</i>
MAM	1060	LR	КОККИ	Круглые, кластеризованы	средние	Коагулазонегативный стафилококк
MAM	1092	LR	КОККИ		мелкие	<i>S. aureus</i>
MAM	1096	RF	КОККИ	Мелкие заметные филаменты, выступающие из каждого кластера	средние	<i>S. aureus</i>
MAM	1155	LR	КОККИ	полностью круглые	средние	<i>S. aureus</i>
MAM	1155	LF	КОККИ	В форме винограда	средние	<i>S. aureus</i>
MAM	1194	LF	КОККИ	Мелкие, круглые	средние	Коагулазонегативный стафилококк
MAM	1196	LF	КОККИ	В форме винограда	мелкие	<i>S. aureus</i>
MAM	1222	RF	КОККИ		мелкие	Коагулазонегативный стафилококк
MAM	1232	LF	КОККИ		мелкие	<i>S. aureus</i>
MAM	1232	LR	КОККИ	Круглые, кластеризованы	средние	<i>S. aureus</i>
MAM	1251	RF	КОККИ	ланцетовидные	средние	<i>S. aureus</i>
MAM	1271	RF1	КОККИ	Круглые, В форме винограда	мелкие	Недентифицирован Грамотрицательные
MAM	1271	RF	КОККИ	Мелкие, круглые	мелкие	Коагулазонегативный стафилококк
MAM	1271	RF2	КОККИ	Высоко кластеризованные кокки	мелкие	Коагулазонегативный стафилококк
MAM	1283	LF2	КОККИ	Очень мелкие	мелкие	<i>S. uberis</i>
MAM	1283	LF1	КОККИ	В форме винограда, кластеризованы	средние	<i>S. aureus</i>
BEV	1304	RR	палочка	Очень мелкие, Овальной/палочковидной формы, Собраны в виде палисада	мелкие	<i>S. aureus</i>

Фигура 30 (продолж.)

BEV	1337	FR2	КОККИ	полностью круглые	средние	<i>S. agalactiae</i>
BEV	1337	FL	КОККИ		мелкие	<i>S. agalactiae</i>
BEV	1337	FR1	КОККИ	круглые	средние	<i>S. uberis</i>
BEV	1346	FR	КОККИ	ланцетовидные	мелкие	<i>S. agalactiae</i>
BEV	1346	RR1	КОККИ	ланцетовидные	средние	<i>S. agalactiae</i>
BEV	1346	RR	КОККИ	ланцетовидные	мелкие	<i>S. agalactiae</i>
BEV	1346	FL	КОККИ	ланцетовидные	мелкие	<i>S. agalactiae</i>
BEV	1346	RL	КОККИ	круглые	мелкие	<i>S. agalactiae</i>
BEV	1537	FL	Плоские диплококки	Ланцетовидные, Очень кластеризованные	средние	<i>S. aureus</i>
BEV	1591	RF1	КОККИ	Ланцетовидные	мелкие	<i>S. uberis</i>
BEV	1765	RR	КОККИ	Мелкие, круглые	мелкие	Коагулазонегативный стафилококк
BEV	1765	RR1	КОККИ			Коагулазонегативный стафилококк
BEV	2448	RL	КОККИ	Короткие, толстой палочковидной формы	мелкие	<i>S. agalactiae</i>
BEV	2530	FLW	КОККИ			Коагулазонегативный стафилококк
BEV	2825	FR	КОККИ	ланцетовидные	мелкие	Неидентифицирован Грамотрицательные
BEV	2825	RR	КОККИ	ланцетовидные	мелкие	Неидентифицирован Грамотрицательные
BEV	3071	RL2	КОККИ			<i>S. agalactiae</i>
BEV	3078	RRL2	КОККИ	ланцетовидные	средние	<i>S. agalactiae</i>
BEV	3179	RL	КОККИ		мелкие	<i>S. agalactiae</i>
BEV	3956	RL	КОККИ	ланцетовидные	мелкие	<i>S. agalactiae</i>
BEV	4027	RR	Гифы и почки	Кокки неправильной формы		Неидентифицированные дрожжи
BEV	6019	FR1	КОККИ	ланцетовидные	средние	<i>S. uberis</i>
BEV	6121	FL	КОККИ			Коагулазонегативный стафилококк
BEV	6154	RL	КОККИ	ланцетовидные	мелкие	<i>S. uberis</i>
BEV	6175	FL	КОККИ	Очень мелкие, круглые	мелкие	<i>S. uberis</i>
CTRL	6533	Контрольный штамм	п КОККИ	Круглые, В форме винограда	крупные	<i>S. aureus</i>

Фигура 30 (продолж.)

МИК	Четверть	Соединение					
		Amp	LP1088	LP1369	LP4525	LP6315	LP9666
Корова							
865	LR						
940	RR						
954	RR1	0.25	2	1	0.5	2	64
954	RR2	0.25	2	1	0.5	4	x
978	RR1						
1041	RF1	0.5	2	1	0.5	4	128
1041	RF2	0.25	1	0.5	0.25	2	32
1051	RF1	0.25	2	1	0.5	4	16
1060	LR						
1092	LR	0.25	1	0.5	0.5	4	16
1096	RF	0.25	1	0.5	0.25	4	16
1155	LF	0.25	1	0.5	0.25	4	64
1155	LR	0.25	4	4	1	1	32
1194	LF	0.25	4	8	1	2	x
1196	LF	0.25	1	1	0.25	4	64
1222	RF	0.25	0.5	2	0.25	0.25	16
1232	LF	0.5	1	1	0.5	2	128
1232	LR	0.25	1	0.5	0.25	2	8
1251	RF	0.25	1	1	0.5	2	64
1271	RF1		0.5	1	0.25	0.25	8
1271	RF						
1271	RF2						
1283	LF2	0.5	1	1	0.25	0.25	1
1283	LF1		0.25	0.5	0.25	0.25	2
1337	FR1		0.25	0.5	0.25	0.25	16
1337	FR2	0.25	2	2	0.25	0.25	4
1337	FL		1	4	0.25	0.5	32
1346	FR		0.5	4	0.25	0.25	128
1346	RR1		0.5	2	0.25	0.25	16
1346	RR		0.25	2	2	0.25	4
1346	FL		1	2	0.25	0.25	16
1346	RL		0.5	2	0.25	0.25	32
1537	FL	0.5	2	4	0.5	0.25	16
1591	RF1						
1765	RR	0.25	2	4	0.25	0.25	4
1765	RR1		1	4	0.25	0.5	64
2530	FLW	4	x	x	x	x	x
3071	RL2		0.5	2	0.25	0.25	16
3078	RRL2		0.5	2	0.25	0.5	32
3179	RL		1	2	0.25	0.25	32
3956	RL		0.5	2	0.25	0.25	8
4027	RR	x	x	x	x	x	x
6019	FR1		0.25	1	0.25	0.25	2
6121	FL	0.25	2	0.5	0.25	1	128
6154	RL		0.5	2	0.25	0.25	32
6175	FL	0.5	1	2	0.25	0.25	2
1304	RR						
1591	RR						
6533	Контрольный штамм S. aureus	0.25	1	1	0.25	2	8

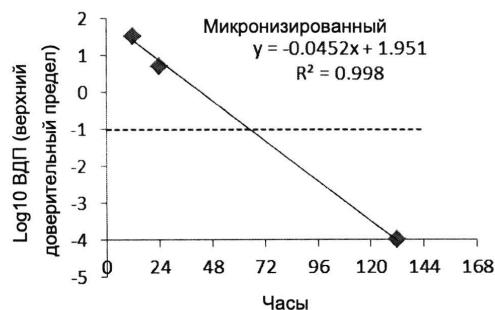
Примечание: ' x' обозначает сплошной рост

Фигура 31

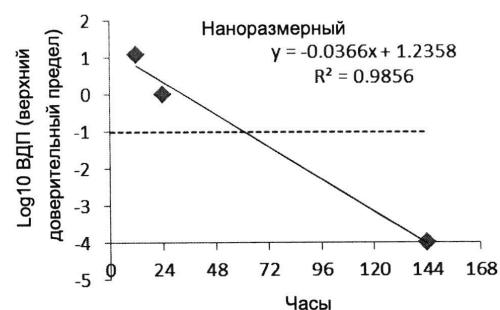
МБК	Четверть	Соединение				
		LP1088	LP1369	LP4525	LP6315	LP9666
Корова						
865	LR					
940	RR					
954	RR1	128	x	x	128	x
954	RR2	x	x	128	x	x
978	RR1	64	16	32	128	128
1041	RF1	128	x	64	128	x
1041	RF2	8	x	8	64	64
1051	RF1	x	x	x	x	x
1060	LR	4	x	128	32	x
1092	LR	x	x	128	x	x
1096	RF	x	x	128	128	x
1155	LF	128	128	128	128	x
1155	LR	x	64	128	64	x
1194	LF	x	x	64	x	x
1196	LF	x	x	32	x	x
1222	RF	128	32	32	32	x
1232	LF	64	128	16	32	x
1232	LR	128	x	64	64	x
1251	RF	4	2	2	4	x
1271	RF1	64	64	32	8	x
1271	RF	128	x	32	128	x
1271	RF2					
1283	LF2	32	64	8	16	x
1283	LF1	128	64	64	64	x
1337	FR1	x	128	x	64	x
1337	FR2	64	64	16	16	x
1337	FL	x	128	128	128	x
1346	FR	x	128	64	128	x
1346	RR1	128	128	64	128	x
1346	RR	64	64	16	32	x
1346	FL	x	128	128	128	x
1346	RL	x	128	64	128	x
1537	FL	64	32	32	16	x
1591	RF1					
1765	RR	16	64	8	32	x
1765	RR1	64	64	32	8	x
2530	FLW	128	x	x	x	x
3071	RL2	x	128	128	64	x
3078	RRL2	x	128	64	128	x
3179	RL	x	128	128	x	x
3956	RL	x	128	64	64	x
4027	RR		x	x	x	x
6019	FR1	128	64	32	32	x
6121	FL	128	32	64	128	x
6154	RL	x	128	64	128	x
6175	FL	16	32	4	4	x
1304	RR					
1591	RR					
6533	Контрольный штамм <i>S. aureus</i>					

Фигура 32

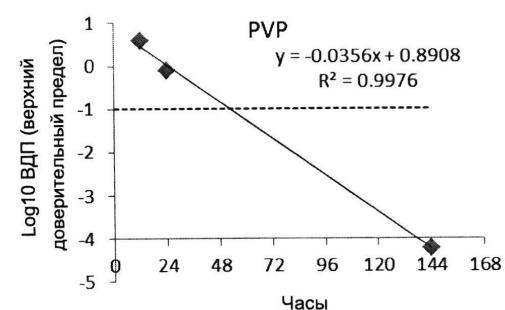
24 / 28



Фигура 33



Фигура 34



Фигура 35

Корова	Четверть	Группа	Результаты культурального анализа до инфекции (КОЕ/мл)	Результаты культурального анализа до инфекции (КОЕ/мл)	Результаты культурального анализа после терапии (КОЕ/мл)	Интерпретация
101	Передняя правая	IVP1	0		0	Контроль
101	Передняя левая	IVP1	0	<i>S. uberis</i> ($>1 \times 10^5$)	<i>S. uberis</i> (6×10^4)	Излечение (частичное)
101	Задняя правая	IVP1	0	<i>S. uberis</i> ($>1 \times 10^5$)	<i>S. uberis</i> (4.6×10^3)	Излечение (частичное)
101	Задняя левая	IVP1	0		0	Контроль
109	Передняя правая	IVP1	0	<i>S. uberis</i> (4×10^4)	контаминирован	Излечение
109	Передняя левая	IVP1	0		<i>Coryne</i> spp. (3×10^3)	Контроль
109	Задняя правая	IVP1	0		контаминирован	Контроль
109	Задняя левая	IVP1	0		<i>S. uberis</i> ($>1 \times 10^5$)	Отсутствие излечения
114	Передняя правая	IVP1	0		0	Контроль
114	Передняя левая	IVP1	0	<i>S. uberis</i> ($>1 \times 10^5$)	<i>S. uberis</i> ($>1 \times 10^5$)	Отсутствие излечения
114	Задняя правая	IVP1	0	<i>S. uberis</i> ($>1 \times 10^5$)	<i>S. uberis</i> (4×10^4)	Излечение (частичное)
114	Задняя левая	IVP1	0		0	Контроль
107	Передняя правая	IVP2	0		0	Контроль
107	Передняя левая	IVP2	<i>S. uberis</i> (30×10^4)	<i>S. uberis</i> (1×10^2)	0	Излечение
107	Задняя правая	IVP2	0	<i>S. uberis</i> ($>1 \times 10^5$)	0	Излечение
107	Задняя левая	IVP2	0		0	Контроль

Фигура 36

26 / 28

108	Передняя правая	IVP2	0		контаминирован	Контроль
108	Передняя левая	IVP2	0	<i>S. uberis</i> (2.6x10 ³)	контаминирован	Излечение
108	Задняя правая	IVP2	0	<i>S. uberis</i> (3.4x10 ³)	CNS (4.8x10 ³)	Излечение
108	Задняя левая	IVP2	0		контаминирован	Контроль
113	Передняя правая	IVP2	0	<i>S. uberis</i> (>1x10 ⁵)	Отсутствие клинического заключ.	Отсутствие клинического заключ.
113	Передняя левая	IVP2	0		Отсутствие клинического заключ.	Отсутствие клинического заключ.
113	Задняя правая	IVP2	0		Отсутствие клинического заключ.	Отсутствие клинического заключ.
113	Задняя левая	IVP2	0	<i>S. uberis</i> (>1x10 ⁵)	Отсутствие клинического заключ.	Отсутствие клинического заключ.
102	Передняя правая	Ref	0		<i>Coryne</i> spp. (2x10 ³)	Контроль
102	Передняя левая	Ref	0	<i>S. uberis</i> (>1x10 ⁵)	0	Излечение
102	Задняя правая	Ref	0	<i>S. uberis</i> (>1x10 ⁵)	0	Излечение
102	Задняя левая	Ref	0		0	Контроль
103	Передняя правая	Ref	0	<i>S. uberis</i> (>1x10 ⁵)	0	Излечение
103	Передняя левая	Ref	0		<i>S. uberis</i> (1x10 ²)	Новая инфекция
103	Задняя правая	Ref	0	<i>S. uberis</i> (>1x10 ⁵)	0	Излечение
103	Задняя левая	Ref	0	<i>S. uberis</i> (>1x10 ⁵)	<i>Bacillus</i> spp. (1x10 ²)	Излечение + контаминация

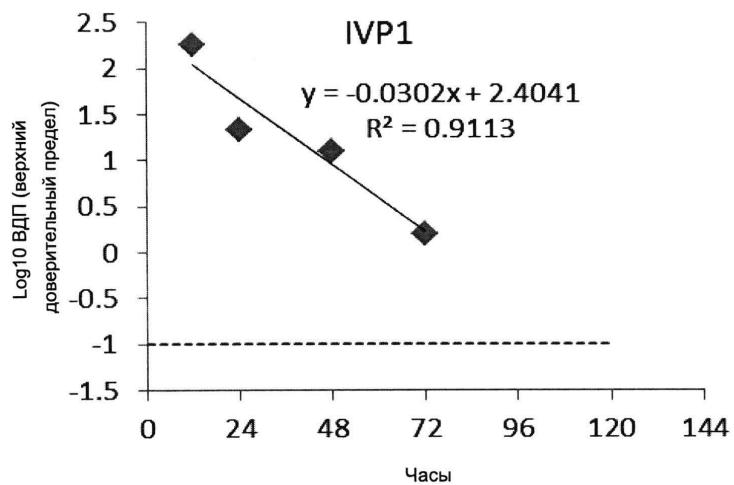
Фигура 36 (продолж.)

27 / 28

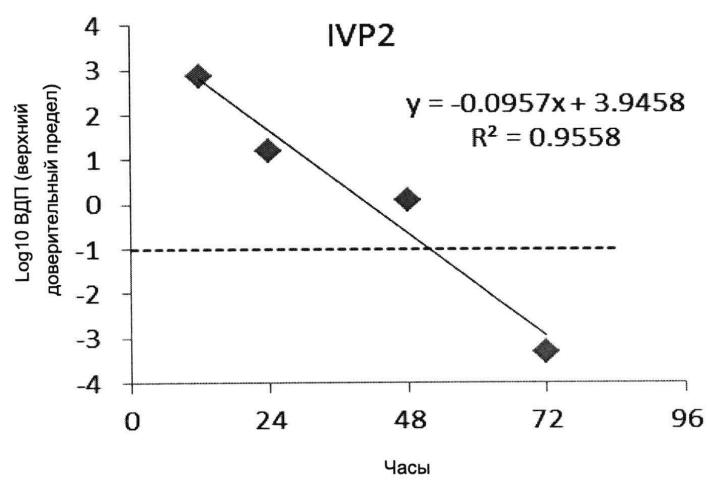
104	Передняя правая	Ref	0	<i>S. uberis</i> (2.4×10^3)	0	Излечение
104	Передняя левая	Ref	0		<i>Coryne</i> spp (2.4×10^2)	Контроль +незначительная инфекция
104	Задняя правая	Ref	0		0	Контроль
104	Задняя левая	Ref	0	контаминирован	0	Инфекция Отсутствие излечения
111	Передняя правая	Ref	0		Отсутствие клинического заключ.	Отсутствие клинического заключ.
111	Передняя левая	Ref	0	<i>S. uberis</i> ($>1 \times 10^5$)	Отсутствие клинического заключ.	Отсутствие клинического заключ.
111	Задняя правая	Ref	$CNS (1 \times 10^4)$	<i>S. uberis</i> ($>1 \times 10^5$)	Отсутствие клинического заключ.	Отсутствие клинического заключ.
111	Задняя левая	Ref	0		Отсутствие клинического заключ.	Отсутствие клинического заключ.

Фигура 36 (продолж.)

28 / 28



Фигура 37



Фигура 38