

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2006-366**
(22) Přihlášeno: **06.05.1998**
(30) Právo přednosti: **07.05.1997 US 1997/852447**
03.07.1997 US 1997/887810
03.07.1997 US 1997/887809
(40) Zveřejněno: **12.07.2000**
(Věstník č. 7/2000)
(47) Uděleno: **29.06.2007**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **08.08.2007**
(Věstník č. 32/2007)
(86) PCT číslo: **PCT/US1998/009229**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 1998/050035**

(11) Číslo dokumentu:

298 270

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:
A61K 31/426 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61P 33/00 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

US 5387598; US 5578621.

Feregrino-Goyos a spol.: "Clinical study of nitazoxamide in the therapy of cryptosporidium parvum in patient with Aids"; AIDS, sv. 10, č. 2, 1996, abstrakt.

(73) Majitel patentu:

ROMARK LABORATORIES, L. C., Tampa, FL, US

(72) Původce:

Rossignol Jean-François, Clearwater, FL, US

(74) Zástupce:

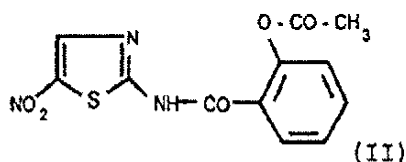
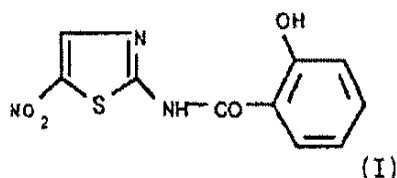
ROTT, RŮŽIČKA & GUTTMANN Patentová,
známková a advokátní kancelář, Ing. Ivana Jirotková,
Nad Štolou 12, Praha 7, 17000

(54) Název vynálezu:

**Farmaceutické kompozice tizoxanidu a/nebo
nitazoxanidu**

(57) Anotace:

Farmaceutický přípravek, obsahující jako účinnou složku alespoň jednu sloučeninu vybranou ze skupiny zahrnující sloučeninu vzorce I a sloučeninu vzorce II a dále obsahující alespoň jednu farmaceuticky přijatelnou kyselinu v množství zlepšujícím stabilitu. Účinná složka je přednostně ve formě částic o velikosti částic menší než 200 μm a o střední velikosti částic větší než 10 μm . Farmaceutické přípravky jsou vhodné zejména pro léčení oportunních infekcí u osob s kompromitovaným nebo potlačeným imunitním systémem a při léčbě infekcí způsobených motolicemi.

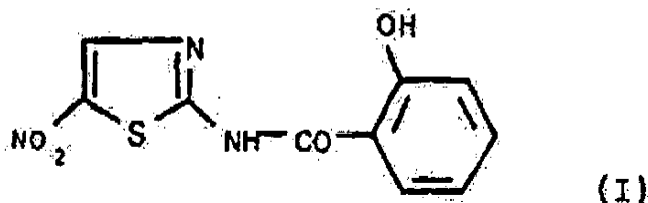


CZ 298270 B6

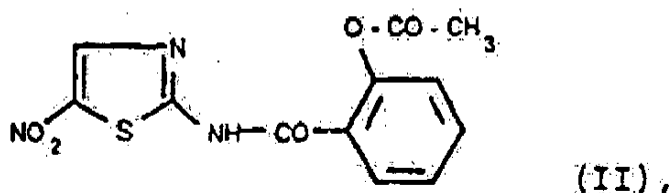
Farmaceutické kompozice tizoxanidu a/nebo nitazoxaniduOblast techniky

5

Tento vynález se týká farmaceutické kompozice obsahující jako aktivní složku nejméně jednu sloučeninu vybranou ze skupiny, kterou tvoří sloučenina vzorce I



a sloučenina vzorce II



10

kteřá dále obsahuje alespoň jednu farmaceuticky přijatelnou kyselinu.

Aktivní složka je výhodně v podobě částic velikosti pod 200 μm a střední velikost částice je větší než 10 μm .

15

Vynález se též týká farmaceutických kompozic stabilizovaných nejméně jednou farmaceuticky přijatelnou kyselinou.

20

Farmaceutické kompozice jsou zvláště použitelné při léčbě oportunních infekcí osob s kompromitovaným nebo suprimovaným imunitním systémem a při léčbě infekcí motolicí.

Dosavadní stav techniky

25

Existuje naléhavá potřeba vývoje způsobů léčby četných parazitárních a bakteriálních infekcí osob s kompromitovaným imunitním systémem (AIDS, pacienti s rakovinou, starší osoby, stárnoucí, příjemci imunosupresivních léčiv po transplantaci orgánů). Jinou oblastí použití jsou infekce motolicí, zvláště v tropickém podnebí. Proto zde je potřeba farmaceutické kompozice, kterou by snášely i imunitně kompromitované osoby a jež by byla stálá při skladování i v tropickém prostředí.

30

Specifický prvek *Toxoplasma gondii* je mezi převládajícími příčinami latentních infekcí centrálního nervového systému ve světovém měřítku. Tímto parazitem je infikováno mnoho zdravých lidí, ale obvykle jejich imunitní systém udrží organismus pod kontrolou. *Toxoplasma gondii* je neobvyklejším oportunním patogenem mozku pacientů trpících AIDS. V dnešní době se toxoplasmóza stává stále větším problémem nejen kvůli AIDS, ale i vlivem rostoucího používání imunosupresivních léčiv (podávaných například pacientům po transplantaci orgánů). Toxoplasmóza se obvykle léčí kombinací pyrimethaminu a sulfadiazinu. Jsou to účinné léky, ale nezbíjejí cysty parazita, takže léčba musí pokračovat při udržovacích dávkách. Toxicita si často vynutí vysazení léku, zvláště u lidí imunosuprimovaných, a následuje recidiva. Statistika proto

40

není příznivá při uváděné úmrtnosti asi 70 % u imunodeficientních pacientů a průměrném přežívání čtyři měsíce.

5 Kryptosporidióza je způsobena mikroskopickým parazitním prvokem *Cryptosporidium parvum*. U osob s normální imunitou může být průjem způsobený tímto prvokem prudký a dlouhý, ale je spontánně mizející. U pacientů trpících AIDS kryptosporidiální průjem často ohrožuje jejich život. Odhaduje se, že z pacientů AIDS asi 15 až 20 % trpí tímto onemocněním. Až dosud neexistuje žádná trvale účinná nebo osvědčená terapie kryptosporidiózy.

10 U pacientů trpících AIDS byl nejčastěji identifikován jako patogen *Enterocytozoon bieneusi*, parazitní mikrosporidie nalezená u téměř jedné čtvrtiny pacientů. Nyní se zdá, že tento drobný parazit může být označen jako příčina značného podílu mnoha nevysvětlených případů poruch trávení, průjmu a tělesného chátrání nositelů HIV. Žádná účinná léčba dosud neexistuje.

15 HIV-pozitivní osoby infikuje několik dalších druhů mikrosporidií včetně *Encephalitozoon hellem* a *cuniculi* a nový druh označený jako *Septata intestinalis*. Nedávná zpráva zjišťuje, že infekce diseminovanými mikrosporidii v současnosti nabývá na významu.

20 Od kryptosporidiózy je klinicky neodlišitelná infekce parazitem *Isospora belli*. Je znám spíše v tropickém pásmu a v USA byl nalezen u méně než 1 % pacientů, i když jeho skutečný výskyt je pravděpodobně vyšší.

25 *Pneumocystis carinii* se všeobecně zařazuje jako parazitní prvok; některé práce však uvádějí, že by mohl patřit mezi fungi (houby), s nimiž sdílí určité genetické sekvence. *Pneumocystis carinii* obvykle infikuje plíce (Pneumocystis Carinii Pneumonia (PCP) – zápal plic způsobený P.c.). Uvádí se, že léčba je úspěšná u asi 40 až 60 % pacientů, přičemž však jsou problémy s toxicitou léku zvláště u imunitně kompromitovaných pacientů. Mezi mnoha vážnými případy infekce dětí virem lidské imunodeficiency (HIV) zaujímá PCP výjimečné postavení vlivem svého vysokého výskytu, ojedinělého rozložení podle věku a časté úmrtnosti. PCP je nejběžnější vážná oportunní infekce dětí infikovaných HIV; výskyt PCP mezi malými dětmi infikovanými HIV bez profylaktického ošetření je odhadován na nejméně 12 % v prvním roce života. Mnoho dětí umírá krátce po rozvinutí nemoci PCP.

35 *Mycobacterium Avium Complex* (MAC) patří k infekcím, jež působí čeled' velmi podobných mykobakteriálních organizmů *Mycobacterium avium* a *Mycobacterium intracellulare*. Pokud se vyskytuje u lidí imunitně nekompromitovaných, je obvykle ve formě infekce dýchacího ústrojí. U pacientů trpících AIDS je MAC obvykle diseminován (diseminovaný MAC nebo DMAC) a téměř každý orgán může být zasažen. V nedávném výzkumu bylo zjištěno, že bakterie MAC byly nalezeny u 43 % pacientů, kteří přežili 2 roky po diagnostikování AIDS. Pro diseminovaný MAC nebyla nalezena žádná standardní terapie. Obvykle se předepisují kombinace léků, a jsou-li úspěšné, vyžaduje se jejich doživotní podávání. Naléhavě je třeba účinnějšího způsobu léčby.

45 Osoby nakažené HIV jsou zvláště náchylné k infekcím *Mycobacterium tuberculosis* a průběh nemoci se urychluje. Zatímco u osob neinfikovaných HIV je extrapulmonární tuberkulóza neobvyklá, u HIV-pozitivních osob se často vyskytuje. CDC zveřejnila směrnice pro léčbu TBC, jež zohledňují rostoucí výskyt tuberkulózy odolné vůči širokému spektru léčiv (MDR-TB). Úmrtnost mezi pacienty AIDS s MDR-TB je velmi vysoká (asi 80 %) a postup nemoci je extrémně prudký.

50 Proto existuje naléhavá potřeba vývoje nových způsobů léčby těchto infekcí, jež jsou u lidí i zvířat tak časté a trvale je ohrožují.

55 Také existuje potřeba mít k dispozici širokospektré léky pro zjednodušení léčby infekcí způsobených motolicí (trematoda). V současné době je nutno diagnostikovat specifickou patogenní motolici a předepsat lékovou terapii specifickou pro danou motolici. Mnoho méně vyvinutých zemí

není vybaveno prostředky pro diagnostikování specifické motolice. Nalezení léku se širokou působností by odstranilo potřebu této diagnózy.

5 *Schistosoma mansoni*, krevní motolic, je původcem schistosomiázy, druhé nejvýznamnější tropické parazitární choroby lidí po malárii, a nejdůležitější infekcí motolicí u lidí. *Schistosoma haematobium* je jiný významný druh infikující člověka. Ve světovém měřítku trpí schistosomiázou více než 200 miliónů lidí včetně několika set tisíc osob v USA.

10 *Fasciola hepatica*, běžná jaterná motolice, je především chorobou ovcí, ale člověk bývá náhodným hostitelem. Tento parazit dokáže přežít i při silné imunitní odezvě hostitele. Pro léčbu se nabízí bithionol, který však není ve Spojených státech schválen.

Proto trvá potřeba farmaceutické kompozice s dlouhou skladovatelností i v tropických podmínkách a se širokou působností proti motolicím.

15 Podstata vynálezu

20 Nyní bylo pozorováno při výzkumech na zvířatech a při klinických výzkumech na lidech, že účinnost léčby za použití sloučenin vzorce I a II závisí na velikosti částice aktivní složky léku a na stabilitě sloučeniny.

25 Popsané farmaceutické kompozice jsou vhodné pro léčbu nákaz lidí a zvířat motolicí způsobených patogeny *Schistosoma*, jako například *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma mekongi*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma intercalatum*; patogeny *Fasciola*, jako například *Fasciola hepatica* a *Fasciola gigantica*, *Fasciolopsis biski*; a *Dicrocoelium dendriticum*, *Heterophyes heterophyes* a *Metagonimus yokogawa*.

30 Farmaceutické kompozice jsou též účinné při léčbě imunokompromitovaných pacientů trpících oportunními infekcemi patogeny *Cryptosporidium parvum*, *Isospora belli*, *Enterocytozoon biveusi*, *Encephalitozoon intestinalis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium intracellulare*, *Pneumocystis carinii* a *Toxoplasma gondii*.

35 Farmaceutická kompozice může být ve formě vhodné pro orální aplikaci, jako pevná dávkovací forma, kapalná suspenze nebo jako pasta.

Přehled obrázků na výkresech

40 Pro lepší porozumění podstaty a předmětu tohoto vynálezu by bylo užitečné odkázat na následující podrobný popis, který je třeba vnímat s připojenými obrázky, ve kterých:

Obrázek 1: ukazuje procenta inhibice a přežívání buněk hostitele při aplikaci nitazoxanidu proti *E. intestinalis*.

45 Obrázek 2: ukazuje procenta inhibice a přežívání buněk hostitele při aplikaci nitazoxanidu proti *V. corneae*.

50 Obrázek 3: ukazuje procenta inhibice a přežívání buněk hostitele při aplikaci albendazolu proti *E. intestinalis*.

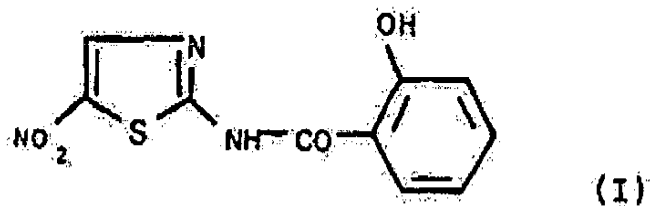
Obrázek 4: ukazuje procenta inhibice a přežívání buněk hostitele při aplikaci albendazolu proti *V. corneae*.

Obrázek 5 a 6: ukazuje hodnoty optické hustoty získané pro každou kultivační jamku vynášené proti koncentracím léku v kultuře.

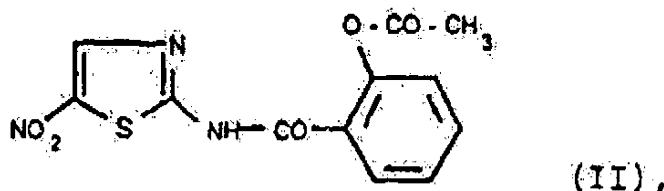
5 Obrázek 7: je graf založený na zjišťování účinnosti nitazoxanidu proti mykobakterii pomnožené v kapalném živném bujónu.

Obrázek 8: ukazuje procento aktivních částic s objemem menším než příslušná hodnota velikosti Φ částic v μm .

10 Předmětem vynálezu jsou farmaceutické přípravky, obsahující jako aktivní složku nejméně jednu sloučeninu vybranou ze skupiny, kterou tvoří sloučenina vzorce I

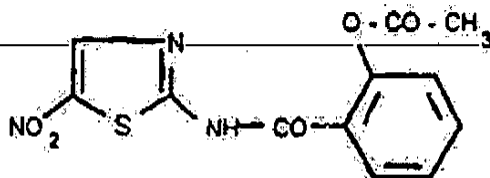


a sloučenina vzorce II



15 a dále obsahující farmaceuticky přijatelnou kyselinu v množství zvyšujícím stabilitu.

Předmětem vynálezu je dále farmaceutický přípravek, obsahující jako účinnou složku sloučeninu vzorce II



20 a farmaceuticky přijatelnou kyselinu v množství postačujícím k nastavení pH farmaceutického přípravku mezi 2 a 6, uvede-li se farmaceutický přípravek do styku s vodou, přičemž uvedená účinná složka je ve formě pevných částic a přičemž poměr hmotnosti farmaceuticky přijatelné kyseliny k hmotnosti uvedených pevných částic je mezi 0,01 a 0,5.

25 Příklady takových kyselin jsou: kyselina citronová, kyselina glutamová, kyselina jantarová, kyselina ethansulfonová, kyselina octová, kyselina vinná, kyselina askorbová, kyselina methansulfonová, kyselina fumarová, kyselina adipová, kyselina jablečná a jejich směsi. Velmi vhodná je kyselina citronová. Přítomnost této kyseliny zvyšuje stabilitu účinné složky nebo složek.

30 Poměr hmotnosti farmaceuticky přijatelné kyseliny k hmotnosti uvedeným účinným pevným částicím je výhodně mezi 0,03 a 0,2. Výhodně je množství kyseliny dostatečné pro nastavení pH suspenze mezi 2 až 6, výhodně mezi 3 a 5, zejména mezi 3,5 až 4,5.

35 Metody přípravy pevných a kapalných dávkových forem farmaceutického přípravku a jejich výhodné příklady jsou popsány v WO 95/28393, přičemž na tento dokument se zde odkazuje.

Přípravky výhodně obsahují smáčedlo a popřípadě derivát škrobu, jak je například popsáno v US 5 578 621, na jehož obsah se zde odkazuje. Smáčedlo, popsané v US 5 578 621, slouží jako dispergační prostředek.

- 5 Takovéto farmaceutické přípravky, ať jako pevné či kapalně dávkové formy nebo jako pasty nebo masti, mohou popřípadě obsahovat další účinné složky jako antibiotika, protivirové prostředky nebo inhibitory protonové pumpy. Ačkoli to není výhodné, je možné, aby tyto farmaceutické přípravky obsahovaly také účinné pevné částice sloučeniny vzorce I a/nebo sloučeniny vzorce II, které jsou větší než 200 μm .

10

Přípravky mohou obsahovat excipienty, jako takové známé, například za účelem přípravy forem vhodných pro orální aplikaci.

- 15 Výhodně, za účelem dosažení vynikající účinnosti proti širokému spektru parazitů, bakterií, hub a virů, je distribuční faktor uvedených účinných pevných částic mezi 0,8 a 2, výhodně mezi 1,1 a 1,9, zejména větší než 1,5, přičemž se tento distribuční faktor počítá podle rovnice

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

20 kde

$F_{90\%}$ je distribuční faktor při 90 %,

25 $\Phi_{90\%}$ je maximální velikost částic frakce částic odpovídající 90 % aktivních pevných částic a

25

$\Phi_{10\%}$ je maximální velikost částic frakce částic odpovídající 10 % aktivních pevných částic.

Podle konkrétního provedení vynálezu se částice sloučeniny vzorce I a/nebo vzorce II připraví výše uvedenou metodou a rozemelou tak, že méně než 10 % uvedených aktivních částic má velikost větší než 10 μm , méně než 50 % částic má velikost větší než 50 μm a méně než 10 % těchto účinných částic má velikost menší než 5 μm , přičemž střední velikost částic je mezi 20 a 50 μm . Tyto aktivní částice se pak granulují s použitím směsi obsahující aktivní pevné částice a alespoň jedno granulační činidlo. Příklady granulačních činidel jsou polyvinylpyrrolidon, voda, alkohol, sacharóza, hydroxyl-celulóza a jejich směsi. Výhodně se během granulačního procesu přidává alespoň jedna farmaceuticky přijatelná kyselina.

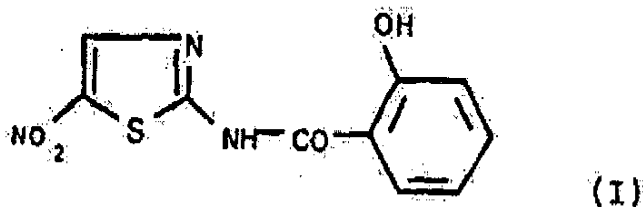
35

Vynález se týká také pevných dávkových forem obsahujících přípravky podle vynálezu, jako jsou tablety, dispergovatelné tablety, povlékané tablety, matrice atd. Dávková forma podle vynálezu obsahuje například

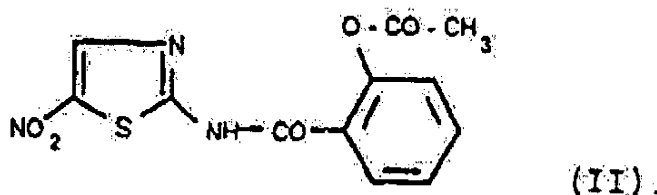
- 40 – pevné aktivní částice s velikostí částic menší než 200 μm , přičemž méně než 10 % těchto částic má velikost větší než 100 μm , méně než 50 % těchto částic má velikost větší než 50 μm a méně než 10 % těchto částic má velikost menší než 5 μm , přičemž střední velikost částic je mezi 20 a 50 μm ;
- alespoň jedno granulační činidlo;
- 45 – alespoň jedno smáčedlo;
- alespoň jeden derivát škrobu a
- alespoň jednu farmaceuticky přijatelnou kyselinu, která se přednostně přidává během granulačního procesu.
- 50 Kapalně dávkové formy, jako jsou vodné suspenze podle vynálezu, obsahují například
- jako účinnou složku pevné částice obsahující sloučeninu vzorce I a/nebo sloučeninu vzorce II s velikostí částic menší než 200 μm , přičemž méně než 10 % těchto částic má velikost

- větší než 100 μm , méně než 50 % těchto částic má velikost větší než 50 μm a méně než 10 % těchto částic má velikost menší než 5 μm ;
- alespoň jedno granulační činidlo;
 - alespoň jedno smáčedlo;
- 5 - alespoň jednu farmaceuticky přijatelnou kyselinu, přičemž pH suspenze je mezi 2 a 6, přednostně mezi 3 a 5, zejména mezi 3,5 a 4,5;
- alespoň jedno zahušťovadlo, například xanthanovou gumu, aguarovou gumu, krystalickou celulózu, carrubskou gumu, karboxymethylcelulózu nebo jejich směs.
- 10 Pastové nebo masťové formy podle vynálezu, vhodné pro orální aplikaci, obsahují například
- jako účinnou složku pevné částice obsahující sloučeninu vzorce I a/nebo sloučeninu vzorce II s velikostí částic menší než 200 μm , přičemž méně než 10 % těchto částic má velikost větší než 100 μm , méně než 50 % těchto částic má velikost větší než 50 μm a méně než 10 % těchto částic má velikost menší než 5 μm ;
- 15 - alespoň jedno smáčedlo;
- alespoň jednu farmaceuticky přijatelnou kyselinu, přičemž pH suspenze je mezi 2 a 6, přednostně mezi 3 a 5, zejména mezi 3,5 a 4,5;
 - alespoň jedno zahušťovadlo, například xanthanovou gumu, aguarovou gumu, krystalickou celulózu, carrubskou gumu, karboxymethylcelulózu nebo jejich směs.
- 20 Pastové nebo masťové formy pro lokální nebo intravaginální aplikaci obsahující například
- jako účinnou složku pevné částice obsahující sloučeninu vzorce I a/nebo sloučeninu vzorce II s velikostí částic menší než 200 μm , přičemž méně než 10 % těchto částic má velikost větší než 100 μm , méně než 50 % těchto částic má velikost větší než 50 μm a méně než 10 % těchto částic má velikost menší než 5 μm ;
- 25 - alespoň jedno smáčedlo;
- alespoň jednu farmaceuticky přijatelnou kyselinu, přičemž pH suspenze je mezi 2 a 6, přednostně mezi 3 a 5, zejména mezi 3,5 a 4,5;
 - cetylalkohol a/nebo deriváty glyceridu a/nebo propylenglykol;
- 30 - alespoň jedno zahušťovadlo, například xanthanovou gumu, aguarovou gumu, krystalickou celulózu, carrubskou gumu, karboxymethylcelulózu nebo jejich směs.

Způsob léčby infekcí zahrnuje podávání farmaceutického přípravku zahrnujícího jako účinnou složku alespoň jednu sloučeninu vybranou ze skupiny zahrnující desacetylnitazoxid vzorce I



a nitazoxid vzorce II



Nitazoxanid (NTZ), sloučenina vzorce II, je generický název 2-(acetyloxy)-N-(5-nitro-2-thiazolyl)benzamid, sloučeniny, kterou poprvé syntetizovali Rossignol a Cavier v r. 1975. 2 mg nitazoxanidu lze rozpustit v 1 ml DMSO. Nitazoxanid se snadno vstřebává při orálním podání.

- 5 Až dosud nebyl podán důkaz, že sloučeniny vzorce I a/nebo II by mohly být v širokém rozsahu účinné proti infekcím způsobeným motolicemi, nebo že by byly dostatečně netoxické, aby je snášely i imunokompromitované osoby.

- 10 Příprava a určitá použití pro nitazoxanid se popisují v patentu US 3 950 351 a v pracích publikovaných přihlašovatelem. Desacetyl-nitazoxanid, sloučenina vzorce I, se někdy uvádí jako tizoxanid nebo d-NTZ a je metabolitem nitazoxanidu.

V přihlášce WO 95/28393 popsal přihlašovatel způsob přípravy čisté sloučeniny vzorce II i použití kompozice obsahující směs sloučenin vzorce I a II.

- 15 Nyní bylo pozorováno, že pevná částice sloučeniny vzorce I, sloučeniny vzorce II nebo jejich směsí s velikostí částic mezi 170 a 520 μm (střední velikost částice = 352 μm) mají velice omezenou účinnost při orálním podávání lidem nebo zvířatům. Účinnost takových částic je menší než účinnost existujících farmaceutických produktů, a proto je pro komerční účely nepřijatelná.

- 20 Na psech též bylo pozorováno, že orální podávání jednotlivé dávky 50 mg pevných částic sloučeniny vzorce I a sloučeniny vzorce II s velikostí částic pod 50 μm na kg hmotnosti psa způsobilo zvířatům závažné nepříznivé následky.

- 25 Nyní bylo zjištěno, že má-li být zajištěna účinná a bezpečná léčba infekcí způsobených lidem i zvířatům parazity, bakteriemi, houbami a viry, musí farmaceutická kompozice, ať už v pevné dávkovací formě nebo kapalné suspenzi obsahovat účinnou dávku aktivní složky ve formě pevných částic obsahujících sloučeninu vzorce I a/nebo sloučeninu vzorce II s velikostí částice menší než 200 μm , přičemž střední velikost částice aktivních pevných částic je větší než 10 μm .

- 30 Přítomnost vysokého obsahu částic aktivní složky s velikostí větší než 200 μm vzhledem k obsahu částic velikosti mezi 5 a 200 μm významně snižuje chemoterapeutickou aktivitu sloučenin. Je výhodné, když farmaceutické kompozice podle vynálezu neobsahují více než 5 % hmotnostních aktivních pevných částic velikosti větší než 200 μm . Nejvýhodnější je, když farmaceutické kompozice podle vynálezu neobsahují prakticky žádné aktivní pevné částice s velikostí větší než 200 μm .

- 35 Přítomnost vysokého obsahu částic aktivní složky s rozměrem pod 5 μm vzhledem k obsahu částic rozměrů mezi 5 a 200 μm může vyvolat u zvířat nebo u lidí záporné účinky. Kromě toho bylo zjištěno, že částice s rozměry pod 5 μm jsou rychleji vstřebávány ze zažívacího traktu do krevního oběhu, a proto nejsou dostatečně účinné proti parazitům, bakteriím, houbám a virům v zažívacím traktu zvířat a lidí.

- 40 Ani zkušební vědci nemohli předvídat, že velikost částice sloučeniny vzorce I a sloučeniny vzorce II by mohla mít tak významný dopad na jejich antimikrobiální aktivitu při léčbě zvířat a lidí. Například při výzkumech prováděných přihlašovatelem nevykázaly antiparazitické sloučeniny jako albendazol, mebendazol, niklosamid, praziquantel a metronidazol tak výrazný rozdíl antiparazitické aktivity při léčbě zvířat a lidí v závislosti na jejich velikosti částic. Kromě toho by ani zkušený vědec nemohl předvídat, že rozměry částic sloučeniny vzorce I a sloučeniny vzorce II by měly tak nepříznivý dopad na schopnost zvířat a lidí snášet podávání uvedeného aktivního prostředku.

Sloučeniny vzorce I a II mohou být podávány buď v pevné dávkovací formě, nebo jako vodné suspenze, ale dává se přednost, aby farmaceutické kompozice obsahovaly účinnou dávku aktivní

5 složky ve formě pevné částice vzorce I a/nebo II s rozměrem částic pod 200 μm , přičemž je střední velikost uvedené aktivní pevné částice větší než 10 μm , stanoveno přístrojem Coulter® Counter LS 100. Toto zařízení používá laserové paprsky vlnové délky 750 nm pro třídění částic v rozmezí 0,4 μm do 900 μm (průměr) podle lomu světla. Vzorky jsou měřeny ve vodě s malým
přídavkem přípravku Triton X-100 pro zvýšení smáčivosti a deflokulaci prášku.

Je výhodné, když střední velikost částice uvedených aktivních pevných částic je mezi 10 a 100 μm , výhodně mezi 20 a 50 μm . Příklady výhodných kompozic jsou:

- 10
- kompozice s méně než 10 % hmotnostními uvedených aktivních pevných částic s velikostí částic nad 100 μm ;
 - kompozice s nejméně 50 % hmotnostními uvedených aktivních pevných částic s velikostí částic pod 50 μm ;

15 Je výhodné, když střední velikost částice uvedených aktivních pevných částic je mezi 10 a 100 μm , výhodněji mezi 20 a 50 μm . Ve výhodném provedení kompozice má méně než 10 % uvedených aktivních pevných částic velikost částice menší než 5 μm .

20 Aktivní složka nebo složky použité v pevné dávkovací formě nebo suspenzi je výhodně směs pevných částic sloučenin vzorce I a vzorce II s velikostí částic menší než 200 μm , přičemž je hmotnostní obsah sloučeniny vzorce I vzhledem k hmotnosti sloučenin vzorce I a II v uvedené směsi mezi 0,5 % a 20 %, výhodněji mezi 0,5 % a 10 %.

25 Suchá čistá sloučenina vzorce I a suchá čistá sloučenina vzorce II byly podrobeny mletí a třídění síťovou technikou.

Po mletí měly částice sloučeniny vzorce I, vzorce II a jejich směsi distribuci velikosti částic podle obrázku 8. Obrázek 8 ukazuje procentuální podíl částic s menším rozměrem než příslušná hodnota velikosti Φ částic v μm .

30 Z tohoto obrázku vyplývá že:

- méně než 10 % hmotnostních částic mělo velikost částice menší než přibližně 5 μm ;
- méně než 10 % hmotnostních částic mělo velikost částice větší než přibližně 70 μm ;
- střední velikost částice je přibližně 40 μm ;
- distribuční faktor částic je asi 1,73, přičemž se uvedený distribuční vypočítal podle rovnice:

35

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

ve které

- 40
- $F_{90\%}$ je rozdělovací součinitel při 90 %,
 - $\Phi_{90\%}$ je maximální velikost částice ve frakci částic odpovídajících 90 % uvedených aktivních pevných částic a
 - $\Phi_{10\%}$ je maximální velikost částice ve frakci částic odpovídajících 10 % uvedených aktivních pevných částic.

45 Následující tabulky ilustrují konkrétní příklady takových kompozic.

Tabulka 1

Příklad kompozice dispergovatelných tablet pro orální podávání obsahujících jako aktivní složky sloučeninu vzorce II a sloučeninu vzorce I	
Nitazoxanid (99 %) + desacetyl-nitazoxanid (1 %)	200 mg
Mikrokryсталická celulóza Avicel pH 102 od firmy FMC-USA	116 mg
Krospovidón	25 mg
Stearát hořečnatý	3 mg
Koloidní oxid křemičitý	5 mg
Kyselina citronová	10 mg
Jahodová příchut' č. 877720 od firmy Robertet	10 mg
Sacharinát sodný	2 mg

5

Tabulka 2

Příklad kompozice povlečených tablet pro orální podávání obsahujících jako aktivní složky sloučeninu vzorce II a sloučeninu vzorce I	
Nitazoxanid	500 mg
Kukuřičný škrob	60 mg
Předželatinovaný kukuřičný škrob	70 mg
Hydroxypropylmethylcelulóza	5 mg
Sacharóza	20 mg
Sodná sůl glykolátu škrobu	30 mg
Kyselina citronová	25 mg
Mastek	8 mg
Stearát hořečnatý	7 mg

Povlaky: na tablety nebo granule obsahující 500 mg aktivní složky se nastříkuje horký cukrový roztok nebo povlakový film.

10

Tabulka 3

Příklad vodné suspenze pro orální podávání obsahující jako aktivní složky sloučeninu vzorce II a sloučeninu vzorce I. Suspenze měla pH asi 4,1.	
Nitazoxanid (98 %) + desacetyl-nitazoxanid (2 %)	2 g
Destilovaná voda	100 ml
Benzoát sodný	0,2 g
Sacharóza	30,5 g
Xanthanová guma	0,2 g
Mikrokrytalická celulóza a sodná sůl karboxymethylcelulózy Avicel RC-591 od firmy FMC - USA	0,8 g
Kyselina citronová	0,2 g
Dihydrát citrátu sodného	50 mg
Jahodová příchut' č. 877720 od firmy Robertet	125 mg
Červené barvivo č. 33 D a C	1 mg

5 Tabulka 4

Příklad pasty pro orální podávání obsahující jako aktivní složky sloučeninu vzorce II a sloučeninu vzorce I	
Nitazoxanid (98 %) + desacetyl-nitazoxanid (2 %)	500 mg
Minerální olej	10 g
Hnědý cukr	1 g
Mikrokrytalická celulóza a sodná sůl karboxymethylcelulózy Avicel RC-591 od firmy FMC - USA	0,8 g
Kyselina citronová	0,2 g

Tabulka 5

Příklad formulace pasty nebo másti pro intravaginální nebo lokální aplikaci, kde pasta obsahuje jako aktivní složky sloučeninu vzorce II a sloučeninu vzorce I	
Nitazoxanid (98 %) + desacetyl-nitazoxanid (2 %)	8 g
Cremaphor A6	2 g
Cremaphor A25	1,5 g
Minerální olej	7 g
Luvitol EHO	7 g
Monoester glycerolu	4 g
Cetylalkohol	3 g
Simeticon	0,5 g
Germaben II	1 g
Propylenglykol	3,5 g
Destilovaná voda	62,5 g

Farmaceutické kompozice podle vynálezu jsou kompozice s širokým spektrem účinků na parazity, bakterie, houby a viry, zvláště když jsou podávány orálně.

5

Účinnost a bezpečnost výše popsaných farmaceutických kompozic při podávání zvířatům i lidem byly vynikající. Při klinických výzkumech na lidech bylo konkrétně zjištěno, že účinnost výše uvedených farmaceutických kompozic je při léčbě parazitárních onemocnění výrazně vyšší než u těchto formulací při použití aktivní sloučeniny s velikostí částice mezi 170 a 520 μm (střední velikost částice = 352 μm), i když se větší částice podávaly pacientům v dávkách až třikrát vyšších a po delší dobu. Příklady rychlostí uzdravení jsou uvedeny níže v tabulce 6.

10

Tabulka 6

Porovnání výsledků klinických výzkumů na lidech za použití sloučenin vzorce I a vzorce II s velikostmi částic v rozmezí 170 µm až 520 µm (střed = 352 µm) s výsledky získanými při použití sloučenin vzorce I a vzorce II s velikostmi částic v rozmezí od 5 µm do 200 µm (střed = 34 µm)		
Sloučenina vzorce I (98 %) + sloučenina vzorce II (2 %)		
	Velikost částic 170 až 520 µm	Velikost částic 5 až 200 µm
	Dávka: 15 až 50 mg/kg/den po dobu 3 až 7 dní	Dávka: 15 mg/kg/den po dobu 3 dní
	Počet vyléčených/celkem = % vyléčení	Počet vyléčených/celkem = % vyléčení
Parazit		
Blastocystis hominis	12/27 = 44 %	10/10 = 100 %
Entamoeba histolytica	28/47 = 62 %	106/133 = 80 %
Giardia lamblia	11/37 = 30 %	50/73 = 68 %
Ascaris lumbricoides	3/39 = 4 %	144/179 = 80 %
Trichuris trichiura	7/48 = 15 %	58/79 = 73 %

V případě všech parazitů uvedených v tabulce 6 byl podíl uzdravených výrazně lepší pro pacienty léčené aktivními částicemi velikosti mezi 5 a 200 µm než při léčbě aktivními částicemi v rozmezí velikostí 170 až 520 µm, přičemž ve všech případech byla statistická významnost $p < 0,02$ (při použití standardního testu X^2). Tak tomu bylo i když dávky aktivního činidla s větší velikostí částic byly běžně vyšší a doba léčby byla často delší než doba podávání farmaceutických kompozic aktivního činidla s velikostí částic pod 200 µm. U žádné skupiny pacientů se nevyskytly nežádoucí účinky.

Výsledky podobné výše uvedeným údajům z výzkumů na lidech byly zjištěny i při testech na zvířatech.

Kromě toho nežádoucí účinky pozorované na psech po orální aplikaci jednorázové dávky 50 mg sloučeniny vzorce I a sloučeniny vzorce II na kg hmotnosti psa nebyly pozorovány při důkladných výzkumech na zvířatech při použití sloučeniny vzorce I a sloučeniny vzorce II s velikostí částice mezi 5 a 200 µm (střed > 10 µm), i když byla podávána tatáž dávka nebo vyšší dávka těchto sloučenin denně po dobu 90 dní nebo déle.

Kromě toho byly uvedené kompozice stálé (i v podmínkách 40 °C a 65 % relativní vlhkosti po dobu šesti měsíců, nebo v případě kapalných suspenzí, když byly suspendovány ve vodě za uvedených podmínek, po dobu 3 měsíců), čímž je zajištěno, že aktivní složky nedegradují a že kompozice udržují svou účinnost po takovou dobu po přípravě, jež je vhodná pro léčebné a komerční účely.

V dalším bude ukázána účinnost farmaceutických kompozic.

Příklady provedení vynálezu

5 Příklad I

Cryptosporidium parvum

10 V přípravném klinickém experimentu se 30 osob trpících AIDS s chronickým kryptosporidiálním průjmem léčilo orálním podáváním nitazoxanidu při denních dávkách 500 až 2000 mg. Pokud průjem neustal, podávání nitazoxanidu pokračovalo další 4 týdny s maximální denní dávkou 2000 mg.

15 Dvacet osm osob dokončilo dva nebo více týdnů léčby a do osmého týdne po léčení bylo 16 z nich schopno vyhodnocení z hlediska terapeutické odezvy. V této poslední skupině 12 osob vykázalo 50% nebo větší omezení denní frekvence vyměšování a deset jednotlivců vykázalo výrazné snížení nebo úplné vymýcení parazitů ve stolici, přičemž u čtyř osob byl tento organizmus neprokazatelný. Šest pacientů splnilo kritéria klinické a parazitologické odezvy.

20 Pacienti, jimž byly podávány vyšší denní dávky léku po delší dobu, měli větší šanci na pozitivní odezvu.

25 Pokus s nitazoxanidem při kryptosporidiálním průjmu v důsledku AIDS za použití značení fluorescenční látkou prokázal pokles frekvence vyměšování u osob, jimž bylo denně podáváno 500, 1000, 1500 nebo 2000 mg léku. Účastníci pokusu vykazovali počty CD4+ 42 buněk/mm³ (v rozsahu 0–303 buněk/mm³), průměrný počet denních stolic 6,7 během 15 měsíců, oocysty *Cryptosporidium parvum* ve stolici a žádné další zjevné střevní patogeny. Téměř u všech účastníků selhala terapie s azithromycinem nebo paromycinem.

30 Po 23 týdnech mělo 9 osob ze 13 kompletní klinickou odezvu (převážně tvarovanou stolicí jednou až třikrát denně) a 4 ze 13 vykázaly částečnou klinickou odezvu (nejméně 50% pokles denní frekvence stolice nebo změnu konzistence stolice na nejméně 75 % tvarované stolice). Do ukončení pokusu došlo u 8 z 11 osob k úplnému vyhlazení parazita a další 3 vykázaly podstatné snížení koncentrace oocystů. Byl zjištěn trend k lepší odezvě při dávkách 1000 mg denně a vyšších a při delší léčbě. Tři účastníci pokusu dostali kopřivkovou vyrážku na pokožce; zdravotní režim dodržovalo více než 90 % účastníků více než čtyři týdny.

Příklad II

40

Cryptosporidium parvum

Pokus in vitro, údaje o dávkování:

45 Nitazoxanid se rozpustil ve sterilním dimethylsulfoxidu (DMSO) a zkoušel se na jednobuněčných vrstvách infikovaných intaktními oocystami *Cryptosporidium parvum* při koncentracích 100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml a 0,1 µg/ml. Paralelně se provedl druhý test při koncentracích nitazoxanidu 20 µg/ml, 2 µg/ml, 0,2 µg/ml a 0,02 µg/ml. Těchto koncentrací se docílilo technikou postupného ředění za použití kompletní živné půdy DMEM až do dosažení finální koncentrace DMSO 0,5%. U kontrolního média (půdy) se dosáhlo téhož zředění.

50

Při pokusu se užilo buněčné kultury MDBKF5D2 vypěstované v sedmimilimetrových komůrkách; jako *Cyklosporidium parvum* oocysty GCH1 v počtu 5×10^4 na jamku; šlo o porovnání paromomycinu (pozitivní kontrola) proti nitazoxanidu (experimentální lék). Obsaženo bylo i

imunní králičí antisérum obsahující sporozoity *Cryptosporidium parvum* (0,1 %) a s fluoresceinem konjugované kozí sérum proti králičí protilátce (1 %).

Test toxicity:

5

200 µl půdy obsahující nitazoxanid při koncentracích 100, 10, 1 a 0,1 µg/ml a příslušné kontrolní půdy se umístily do dvou jamek plotny s 96 jamkami obsahujících konfluentní jednobuněčné vrstvy buněk MDBKF5D2 a do dvou jamek bez této vrstvy. Lék se na jednobuněčných vrstvách inkuboval při 37 °C a 8% CO₂; po 24 hodinách (první pokus) a 48 hodinách (druhý pokus) se do každé jamky přidal MTS (Owenův roztok) a PMS v množství 333 µg/ml resp. 25 µM. Plotna se vrátila do inkubátoru a potom se vyvíjela dvě hodiny. Potom se odebralo svrchu kultury 100 µl supernatantu a převedlo na novou plotnu s mikrotitrem pro zjištění optické hustoty přístrojem ELISA při 490 nm. Výsledky se zaznamenaly a analyzovaly. Toxicita v procentech se vypočítala odečtením střední optické hustoty (OD) supernatantu z kultury s lékem od OD supernatantu kontrolní půdy bez léku, vydělením střední optickou hustotou supernatantu z kontrolní půdy a násobením 100.

10

15

$$\frac{\text{OD půdy} - \text{OD léku}}{\text{OD půdy}} \times 100$$

20

Test intaktních oocyst *Cryptosporidium parvum*

25

Na konfluentních jednobuněčných vrstvách MDBKF5D2 se při 37 °C a v prostředí 8% CO₂ inkubovaly v nitazoxanidu (100, 20, 10, 2, 1, 0,2, 0,1 a 0,02 µg/ml) oocysty *Cryptosporidium parvum* v množství 5 x 10⁴ na jamku. Stupeň infekce v každé jamce se stanovil imunofluorescenční analýzou po 24 a 48 hodinách. Inhibice v procentech se stanovila odečtením průměrného počtu parazitů na 10 polí v medikovaných jamkách od průměrného počtu parazitů na 10 polí v jamkách s kontrolní půdou bez léku, dělením tohoto rozdílu průměrným počtem parazitů v kontrolních půdách a násobením stem.

30

$$\frac{\text{počet v kontr. půdách} - \text{počet v půdách s lékem}}{\text{počet v kontrolních půdách}} \times 100$$

Výsledky:

35

Pokus 1: 24 hodin

Sloučenina	Koncentrace	Střední (+SD)*	Toxicita %	Inhibice %
Infikovaná půda	0	983,5 (±128,2)	0	0
Paromomycin	2 mg/ml	482 (±47,1)	23,8	51
NTZ	100 µg/ml	ztráta	88,1	NA **
	10 µg/ml	55,5 (±13,5)	65,1	94,4
	1 µg/ml	224,5 (±28,5)	8,3	77,2
	0,1 µg/ml	474,5 (±29,5)	19,3	51,8

* Počet parazitů/10 polí

** Není k dispozici vlivem toxicity

40

Pokus 2: 48 hodin

Sloučenina	Koncentrace	Střední (+SD)*	Toxicita %	Inhibice %
Infikovaná půda	0	2231,25 (+90,03)	0	0
Paromomycin	2 mg/ml	580(+33,42)	40,8	74,01
NTZ	20 µg/ml	68,75(+13,77)	92,87	96,92
	2 µg/ml	113,75(+21,36)	24,93	94,90
	0,2 µg/ml	1020(+158,48)	16,56	54,29
	0,02 µg/ml	1041(+191,46)	21,23	53,33

* Počet parazitů/10 polí

5 Účinek nitazoxanidu na intaktní oocysty *Cryptosporidium parvum*

V pokusu 1 měl nitazoxanid při koncentracích 10, 1 a 0,1 µg/ml za následek hodnoty inhibice parazitů 94,4, 77,2 a 51,8 % a toxicitu vůči buňkám v procentech 65,1, 8,3 a 19,3 %. Třebaže při zředění 10 µg/ml došlo k téměř úplné inhibici infekce parazity, byly zřejmé vysoké stupně toxicity. Při zředění 1 µg/ml nitazoxanidu vyšlo příznivě srovnání s paromomycinem koncentrace 2 mg/ml z hlediska inhibice parazitů i toxicity vůči buňkám (77,2% inhibice parazitů a 8,3 % celulární toxicity v případě nitazoxanidu při zředění 1 µg/ml ve srovnání s 51% inhibicí parazitů a 23,8% toxicity vůči buňkám v případě paromomycinu při 2 mg/ml).

15 Při pokusu 2 se lék modifikoval s cílem dosáhnout lepší distribuce dávek při minimální toxicitě. V důsledku toho zůstaly kultury živé i po 48 hodinách a nejen po 24 hodinách jako v pokusu 1. Inkubace po dobu 48 hodin měla samozřejmě za následek vyšší relativní toxicitu vůči buňkám jak ukazuje srovnání s paromomycinem v obou pokusech. Koncentrace nitazoxanidu 20 µg/ml byla při inkubaci 48 hodin stále příliš toxická, i když se jednobuněčná vrstva zdála dosud
 20 intaktní. Je možné, že vysoká toxicita nutně ovlivňující funkci buněk má rovněž účinek na vývoj infekce parazitem. Při zředění 2 µg/ml nitazoxanidu byla zábrana infekce parazitem značná při relativně nízké celulární toxicitě. Další ředění rovněž měla za následek značnou inhibici a nízkou toxicitu vůči buňkám. Při koncentraci léku 2 µg/ml mírná toxicita vůči buňkám a inhibiční akti-
 25 vita 94,90 % ukazuje, že nitazoxanid je při koncentraci 2 µg/ml vhodnější než paromomycin při infekci *Cryptosporidium parvum* in vitro než paromomycin při koncentraci 2 mg/ml (tisíckrát vyšší koncentrace).

Příklad III

Cryptosporidium parvum

30

Informace: dávkování a přechovávání in vitro

Nitazoxanid a desacetylnitazoxanid (NTZ a NTZdes) byly zkoušeny na jednobuněčných vrstvách infikovaných intaktními oocystami *Cryptosporidium parvum* a excystovanými sporozoity při
 35 koncentracích 10, 1, 0,1 a 0,01 µg/ml. Každá sloučenina se rozpustila v 100% dimethylsulfoxidu (DMSO) a zředila sterilním médiem DMEM. Každá koncentrace nitazoxanidu stejně jako kontrolní média obsahovala konstantní množství DMSO 0,025 %.

Při pokusu se užilo buněčné kultury z buněk MDBKF5D2 vypěstované v sedmimilimetrových komůrkách; jako *Cyklusporidium parvum* použity oocysty GCH1 v počtu 5×10^4 na jamku; šlo

o porovnání paromomycinu (pozitivní kontrola) proti nitazoxanidu (experimentální lék). Obsaženo bylo i imunní králičí antisérum obsahující sporozoity *Cryptosporidium parvum* (0,1 %) a s fluoresceinem konjugované kozí sérum proti králičí protilátce (1 %).

5 Test toxicity:

200 µl půdy obsahující nitazoxanid při výše uvedených koncentracích a příslušné kontrolní půdy se umístily do dvou jamek plotny s 96 jamkami obsahujících konfluentní jednobuněčnou vrstvu buněk MDBKF5D2 a do dvou jamek bez této vrstvy. Lék se na vrstvách inkuboval při 37 °C 8% CO₂; po 48 hodinách se do každé jamky přidal MTS (Owenův roztok) a PMS v množství 333 µg/ml resp. 25 µM. Plotna se vrátila do inkubátoru a potom se vyvíjela dvě hodiny. Potom se odebralo svrchu kultury 100 µl každého supernatantu a převedlo na novou mikrotitrační plotnu pro zjištění optické hustoty přístrojem ELISA při 490 nm. Výsledky se zaznamenaly a analyzovaly. Toxicita v procentech se vypočítala odečtením střední optické hustoty (OD) supernatantu z léku od střední optické hustoty OD supernatantu kontrolní půdy bez léku, vydělením střední optickou hustotou supernatantu z kontrolní půdy a násobením 100.

$$\frac{\text{OD půdy} - \text{OD léku}}{\text{OD půdy}} \times 100$$

20 Klasifikace cytotoxicity byla stanovena takto: 0,5% toxicita = 0,6% až 25% toxicita = 1, 26% až 50% toxicita = 2, 51 % až 75% toxicita = 3 a 76 až 100% toxicita = 4. Platí, že cytotoxicita 0 až 1 se má považovat za přijatelnou úroveň toxicity. Toxicity hodnot 2, 3 a 4 se uvažují jako vysoce toxické pro jednobuněčnou vrstvu.

25 Testování intaktních oocyst *Cryptosporidium parvum*

Na konfluentních jednobuněčných vrstvách MDBKF5D2 se při 37 °C a v prostředí 8% CO₂ inkubovaly v nitazoxanidu při výše uvedených koncentracích oocysty *Cryptosporidium parvum* v množství 5 x 10⁴ na jamku. Stupeň infekce v každé jamce se stanovil imunofluorescenční analýzou po 48 hodinách a analyzoval počítačem. Inhibice v procentech se stanovila odečtením průměrného počtu parazitů na pole v medikovaných jamkách od průměrného počtu parazitů na pole v jamce s kontrolní půdou bez léku, dělením tohoto rozdílu průměrným počtem parazitů v kontrolních půdách a násobením stem.

$$\frac{\text{počet v kontr. půdách} - \text{počet v půdách s lékem}}{\text{počet v kontrolních půdách}} \times 100$$

Výsledky:

Pokus s oocystami *Cryptosporidium parvum* (48 hod.)

Léky	Konc.	Parazit	±SD	Tox/O D	±SD	Inhib. %	Tox. %	Klasi- fikace
Vodná média	0	681,58	±271,02	2,024	±0,18	0	0	0
Paromomycin	2000	115,75	±44,65	1,219	±0,009	83,02	39,79	2
DMSO média 0,025	0	628,50	±171,94	1,799	±1,45	0	0	0
NTZ	10	11,75	±7,33	0,413	±0,13	98,13	77,07	4
	1	39,67	±13,13	1,618	±0,326	93,69	10,09	1
	0,1	643,42	±229,73	1,878	±0,154	≤0	≤0	0
	0,01	714,33	±194,79	1,617	±0,072	≤0	10,12	1
Nové NTZdes.	10	13,75	±6,66	0,337	±0,005	97,81	81,27	4
	1	39,92	±13,49	1,710	±0,033	93,65	4,97	0
	0,1	649,86	±152,19	1,506	±0,119	≤0	16,29	1
	0,01	749,33	±139,49	1,721	±0,144	≤0	4,36	0

Konc. – $\mu\text{g/ml}$; Parazit – průměrný počet parazitů/pole (analyzováno 12 polí); Inhib. % – inhibice infekce parazitem v %; Tox % – toxicita léku vůči buňkám v %.

- 5 Z výše uvedeného je zřejmé, že inhibiční aktivita NTZdes je stejná jako u NTZ v příkladu II. Nitazoxanid a desacetylnitazoxanid byly stejně účinné in vitro vůči *Cryptosporidium parvum* při paralelních testech, získány výsledky 98% až 94% inhibice při ředěních 10 a 1 $\mu\text{g/ml}$ pro obě sloučeniny. V případě nitazoxanidu bylo zředění 1 $\mu\text{g/ml}$ nejnížší koncentrací dosahující více než 90% inhibice, zatímco 50% inhibice bylo možno dosáhnout s nižší koncentrací nitazoxanidu například 0,2, 0,1 a 0,02 $\mu\text{g/ml}$. V těchto experimentálních podmínkách paromomycin použitý
10 jako pozitivní kontrola byl 200krát méně účinný, protože dosahoval při koncentraci 2000 $\mu\text{g/ml}$ inhibiční účinnosti jen 51 až 83 %.

Příklad IV

15

E. intestinalis a *V. cornea*

- 20 Buňky 2RK–13 (jaterní buňky králíka) se uložily na kultivační plotny s 24 jamkami v množství $2,6 \times 10^5$ buněk na jamku (1,0 ml média, RPMI 1640 s 2 mM L–glutaminu a 5% teplem aktivované hovězí fetální sérum). Plotny se inkubovaly přes noc v inkubátoru s atmosférou CO_2 při teplotě 37 °C, během té doby se jamky spojily (jedno zdvojení, takže množství buněk na jamku bylo asi 5×10^5).

- 25 K hostitelským buňkám se přidaly organizmy *Septata intestinalis* (z tkáňových kultur) v množství poměru asi 3:1, tedy asi 15×10^6 organismů na jamku. Výsledkem tohoto poměru bylo, že se infikovalo asi 50 % hostitelských buněk.

- 30 Léky se rozpustily v DMSO, vodě nebo methanolu (v závislosti na rozpustnosti) na roztoky koncentrace 1,0 mg/ml. Tyto roztoky se skladovaly při –70 °C. Všechna zředění v těchto experimentech se prováděla v kompletním tkáňovém kultivačním médiu. Všechna zředění se zkoušela ve třech jamkách.

Médium (obsahující čerstvě zředěné léky) se nahrazovalo každé tři až čtyři dny.

- 35 Šestý den po přidání parazitů a léků se na buňkách zjišťuje toxicita. Kontrolní buňky s léky ale bez parazitů jsou studovány z několika hledisek: konfluence, morfologie buněk a zda jsou přítomny mrtvé nebo plovoucí buňky. Buňky inkubované pouze s parazity jsou kontrolovány z hlediska infekčnosti parazitů (přítomnost parazitoforních vakuol). Buňky inkubované s parazity a léky se hodnotí z hlediska toxicity pro hostitelské buňky a množství přítomných parazitoforních
40 vakuol (zda je velké, střední, malé).

- 45 Desátého dne se do kultivačních jamek přidá 100 μl 10% SDS (cílová koncentrace 0,5 %), aby došlo k prasknutí membrán hostitelských buněk a uvolnily se mikrosporidie. Celkové množství parazitů v každé jamce se stanoví zjišťováním alikvotního množství hemacytometrem. Výsledky se vyjadřují v procentech inhibice (v poměru k počtu infikovaných buněk bez přídavku léku).

Výsledky ukazují obrázky 1 až 4.

50

Příklad V

Toxoplasma gondii

Nitazoxanid a desacetylnitazoxanid se testovaly proti parazitům, konkrétně proti *Toxoplasma gondii* kmen RH, udržovanému opakovanými pasážemi myši. Buněčné kultury fibroplastů MRC5 od firmy Bio-Merieux, Francie, byly v kultivačních plotnách o 96 jamkách inokulovány tímto kmenem *Toxoplasma gondii*. Do každé kultivační jamky (s výjimkou 8 kontrolních jamek použitých jako negativní kontrola) se přidalo 200 čerstvě odebraných tachyzoitů. Po 4 hodinách inkubace se do těchto kultur přidaly zředěné roztoky léků.

Nitazoxanid (NTZ) a desacetylnitazoxanid (dNTZ) se zkoušely v koncentracích v rozmezí mezi 8×10^{-4} a 40 mg/l. Léky se nejdříve rozpustily v DMSO při koncentracích 2 mg/ml a pak se postupným ředěním v kultivační půdě připravily v potřebných koncentracích. Nedošlo ke vzniku sraženin.

Tato zředění léků se přidala ke kulturám (na každé zředění 8 jamek) a následovala inkubace kultivačních ploten po dobu 72 hodin. Potom byly kultury fixovány studeným methanolem. Růst *Toxoplasma gondii* se zjišťoval na přístroji ELISA za pomoci králičí protilátky proti *Toxoplasma gondii* značené peroxidázou. Pro každou jamku se zaznamenala hodnota optické hustoty.

Výsledky se prezentují grafem v němž se vynášejí údaje optické hustoty proti koncentraci léku v kultuře. Statistický rozbor spočíval v regresní analýze při intervalu spolehlivosti 95 % a stanovení křivek závislosti dávka/odezva z hodnot optické hustoty pro každý lék.

Jedna plotna byla kontaminována Giemsou pro zjištění jejího cytopatického účinku na kultury.

Byly provedeny tři oddělené experimenty. V každém experimentu se pro každou sloučeninu použilo dvou kultivačních ploten; v každé kultivační plotně se pro každou koncentraci léku použilo 8 replikačních jamek.

Výsledky:

Ve třech sadách pokusů byly získány podobné výsledky. Grafické znázornění výsledků jednoho reprezentativního pokusu pro každý lék je ukázáno v obrázcích 5a, b, c a 6a, b, c.

Nitazoxanid (obrázky 5a, b, c);

Při koncentracích v rozmezí 10^{-4} mg/l a 0,3 mg/l nebyl zaznamenán žádný inhibiční účinek. Značný efekt vykazala koncentrace $\geq 0,6$ mg/l a úplné inhibice růstu *Toxoplasma* se dosáhlo při koncentracích $\geq 2,5$ mg/l. Při koncentracích $\geq 2,5$ mg/l však byla na jednobuněčné vrstvě zaznamenána výrazná toxicita.

Mikroskopické zkoumání jednobuněčné vrstvy ukázalo, že NTZ při koncentraci 1,25 mg/l vyvolalo na parazity infikovaných buňkách cytopatický efekt ve formě zvětšení parazitoformních vakuol a snížení počtu intracelulárních parazitů. Na základě regresní analýzy lze odhadnout, že 50% inhibiční účinek má zředění 1,2 mg/l.

Desacetylnitazoxanid (obrázky 7a, b, c):

S desacetylnitazoxanidem byly dosaženy obdobné výsledky: žádný účinek při koncentracích v rozmezí 10^{-4} mg/l a 0,3 mg/l, inhibice při koncentraci $\geq 0,6$ mg/l a výrazná toxicita při koncentraci $\geq 2,5$ mg/l. Lze odhadnout, že 50% inhibiční účinek má zředění 1,2 mg/l.

Získané výsledky byly reprodukovatelné ve třech oddělených pokusech při hodnocení inhibičního účinku léku na opakovaných kultivacích pro každou koncentraci léku.

U NTZ i desacetylnitazoxanidu bylo možno pozorovat při koncentracích kolem 1,2 mg/l výraznou inhibici růstu *Toxoplasma* se změnami na parazitoformní vakuole, ale bez výrazných změn na samotném parazitu.

- 5 Tyto výsledky ukazují, že tyto látky mají dobrou aktivitu proti *Toxoplasma gondii* a že tento terapeutický účinek je možno očekávat in vivo při koncentracích kolem 1 mg/l v séru nebo tkáních.

10 Příklad VI

Mycobacteria

- 15 Bylo zjištěno, že nitazoxanid má antimikrobiální aktivitu proti mykobakteriím tuberkulózy. Následující tabulka ukazuje výsledky zjišťování MIC nitazoxanidu a tizoxanidu (NTZdes) proti *Mycobacterium intracellulare* agarovou diluční technikou. Tyto výsledky jsou založeny na několika experimentech s použitím agarové diluční techniky na agaru Middlebrook, z nichž každý trval 3 týdny. Získané údaje prokazují, že nitazoxanid má MIC proti Mycobacteria 2 µg/ml a tizoxanid má MIC 4 µg/ml při použití standardního kmene *Mycobacterium intracellulare* od
- 20 ATCC a standardní agarové diluční techniky.

MIC (minimální inhibiční koncentrace) nitazoxanidu vůči *Mycobacteria intracellulare*

MIC*	
nitazoxanid	2 µg/ml
tizoxanid	4 µg/ml

- 25 *MIC se stanovily standardní agarovou diluční technikou během 3 týdnů s použitím agaru Middlebrook 7H11. V tomto pokusu bylo použito *M. intracellulare* ATCC 13950, standardního kmene.

- 30 Obrázek 7 je graf založený na studiu účinnosti nitazoxanidu proti mykobakterii vypěstované v kapalném bujónu. Použili jsme kolorimetrickou analýzu MTS umožňující stanovit růst po 4 hodinách ve srovnání s počítáním na agaru, které to umožňuje po 3 týdnech. Jak lze vidět na údajích v obrázku 7, pokud se nitazoxanid přidal 72 hodin po zahájení kultivace, bylo možno pozorovat bezprostřední účinek na kontinuální růst ve srovnání s růstem v samotném kontrolním médiu. Při dávce 3 µg/ml nitazoxanidu se na příštích 24 hodin růst zastaví a potom další dva dny
- 35 pokračuje pomalý růst. Dávka 50 µg/ml působila během 144 hodin kultivace dokonale bakteriostaticky.

Příklad VII

40 Cryptosporidium parvum

Účinek nitazoxanidu proti *Cryptosporidium parvum* byl zkoušen na experimentálně infikovaných myších. Nitazoxanid byl dodán firmou Romark Laboratories, L.C. Tampa, Florida.

- 45 Celková dávka pro člověka (1 g/den během 7 dní = 7 g) byla modifikována pro použití u myši podle Pageta a Barnese. Lidská dávka byla násobena faktorem 0,0026 pro myši (vážíci přibližně 20 g) a získalo se celkové množství léku potřebné pro každého hostitele ráno a večer během 7 dní následujících po sobě. Každá myš přijala denně 2,6 mg (7000 mg x 0,0026/7). Dávky byly aplikovány orálně s použitím plastové injekční stříkačky se zakulaceným hrotem.

50

Dvacet (20) dvoudenních sajících myších mláďat se infikovalo orálním podáním 100 000 oocyst *Cryptosporidium parvum* získaných z infikovaných telat. Před podáním myším se oocysty zkoncentrovaly pomocí cukerného roztoku technikou popsanou Fayerem a Ellisem. Všem myším byly odebrány rektální výtěry a denně zkoumány modifikovanou kontaminační technikou Niehl-Neelsenovou popsanou Graczykem a dalšími. Oocysty se objevily v trusu 2 dny po orální infekci zvířat. Od třetího dne po infekci zvířat bylo deseti myším podáváno 1,3 mg nitazoxanidu ráno a večer 7 dní po sobě následujících, zatímco 10 zbývajících myší se použilo jako neléčená kontrola. Rektální výtěry byly odebrány denně všech sedm dní léčby a každý den sedm dní následujících po ukončení léčby. Oocysty byly suspendovány v oleji a pod mikroskopem počítány v 100 polích.

Výsledky:

Výsledky ukázané v následující tabulce jasně dokazují, že nitazoxanid podávaný v denní dávce 2,6 mg/den 7 po sobě následujících dní byl účinný proti *Cryptosporidium parvum* a redukoval počet oocyst v trusu infikovaných myší, jak vyplývá ze srovnání s kontrolními zvířaty. Zkoušený lék snížil na konci třetího dne léčby uvolňování oocyst do stolice u 6 z 10 léčených myší. Sedmého dne na konci léčby byla tato produkce oocyst zcela eliminována a všechna léčená zvířata vykázala negativní výsledky při kontrole trusu na rozdíl od neléčných kontrolních myší. Tento efekt trval po ukončení léčby nejméně 7 dní jak vyplývá z negativního výsledku kontroly třetí a sedmý den po ukončení léčby.

Počet zjištěných oocyst/pole v olejové imerzi								
Myš č.	3. den léčby		poslední den léčby		3. den po léčbě		7. den po léčbě	
	Kontrol-ní skup.	Léčená skup.	Kontrol-ní skup.	Léčená skup.	Kontrol-ní skup.	Léčená skup.	Kontrol-ní skup.	Léčená skup.
1	3,0	0,0	5,0	0,0	4,0	0,0	2,0	0,0
2	4,0	0,0	4,0	0,0	3,0	0,0	1,0	0,0
3	6,0	0,0	5,0	0,0	4,0	0,0	0,5	0,0
4	3,0	2,0	3,0	0,0	2,0	0,0	1,0	0,0
5	5,0	2,0	3,0	0,0	3,0	0,0	0,5	0,0
6	3,0	0,0	4,0	0,0	5,0	0,0	2,0	0,0
7	3,0	0,0	5,0	0,0	4,0	0,0	1,0	0,0
8	5,0	1,0	5,0	0,0	1,0	0,0	0,5	0,0
9	3,0	3,0	3,0	0,0	2,0	0,0	1,0	0,0
10		0,0	5,0	0,0	2,0	0,0	0,5	0,0
Celkem	35	8,0	4,2	0,0	30	0,0	10	0,0
Průměr	3,5	0,8	4,2	0,0	3,0	0,0	1,0	0,0
Účinnost		60 %		100 %		100 %		100 %

Příklad VIII

Mycobacterium

Nitazoxanid se srovnával s antibiotikem izoniazidem. Jako mykobakteriálního kmene bylo použito BCG (bacil Calmette a Guerin). Citlivost tohoto kmene byla tatáž jako u *M. tuberculosis*, ale tento kmen byl neškodnější a proto nevyžadoval žádná náročná opatření.

Myším bylo denně podáváno 4 mg léku na myš v 0,2 ml slunečnicového oleje. Výsledky u myší léčených nitazoxanidem byly srovnatelné se skupinou léčenou izoniazidem.

	10 ⁷			10 ⁵		
	Slezina	Játra	Plíce	Slezina	Játra	Plíce
Nitazo	1,575.000	1,575.000	57.500	68.250	70.000	50
	800.000	1,550.000	122.500	65.000	87.500	75
	875.000	1,550.000	30.000	75.000	35.000	150
	950.000	750.000	75.000	60.000	60.000	50
INH	475.000	1,050.000	11.000	20.000	21.250	50
	255.000	750.000	5.750	15.250	27.500	125
	200.000	975.000	4.000	60.000	52.500	50
				20.000	37.500	50
PBS	1,500.000	2,125.000	92.500	102.500	195.000	750
	1,525.000	1,800.000	98.000	140.000	175.000	800
	1,925.000	1,750.000	177.500	98.000	150.000	500
	1,675.000	1,800.000	117.500	105.000	150.000	750

Příklad IX

5 Fasciola hepatica

Účinnost nitazoxanidu a desacetylnitazoxanidu proti *Fasciola hepatica* byla zkoušena in vitro.

10 Dospělí jedinci *Fasciola hepatica* byli získáni ze žlučovodů jater tří telat poražených kvůli fasciolosis ve veterinární diagnostické laboratoři firmy Hardy's Meat Packers, Bunkie, LA. Motolice byly promývány jednu hodinu ve sterilním soleném roztoku a přeneseny do sterilního roztoku nebo RPMI (pH 7,4) na další 3 hodiny. Potom byly motolice uchovávány přes noc při 37 °C v prostředí s 5% CO₂ ve sterilní směsi RPMI–králíčí sérum (objemový poměr 50:50) nebo sterilním RPMI (pH 7,4).

15 Kultivace in vitro (37 °C a 5% CO₂) byla provedena modifikací způsobu Ibarra a Jenkinse (Z. Parasitenkd. 70:655–661, 1984). Při dodržování sterilních podmínek se motolice dvakrát promyly po 2 až 3 minutách v Hankově rovnovážném solném roztoku (pH 7,2) a individuálně umístily do jamek kultivačních ploten Linbro se šesti jamkami obsahujícími alikvotních 10 ml zamýšleného zředění léku v kultivačním médiu. Toto médium sestávalo ze směsi (v objemovém poměru 50:50) RPMI a králíčího séra s 2% králíčí krve a 100 ppm penicilinu a 100 ppm streptomycinu. Použilo se výhradně motolic s normální aktivitou a morfologií.

25 Zásobní roztoky NTZ nebo jeho metabolitu D–NTZ od firmy Romark se rozpustily v DMSO (2000 µg/ml) a zředily v kultivačním médiu za použití volumetrické buňky s objemem 100 ml pro přípravu specifické koncentrace léku (100, 50, 25, 10, 5, 3, 1 µg/ml). V každé replikované kultuře byly umístěny dvě motolice, jedna v nesubstituované kultivační půdě s RBC a druhá v kultivační půdě bez léku a s RBC.

30 Motolice se zkoušely z hlediska účinků léků, jak se projevovaly smrtí, poruchami hybnosti nebo morfologickými změnami ve srovnání s nemedikovanými kontrolními motolicemi pomocí zezařazeného panelu a osvětlené třikrát zvětšující čočky.

Výsledky:

35 Experiment 1:

40 V případě D–NTZ byly motolice při zředění léku 50 a 100 µg během jedné hodiny mrtvé nebo skomírající. Při koncentraci 25 µg byly po první hodině 4 ze 7 motolic skomírající, dvě byly aktivní a jedna byla malátná; do tří hodin byly všechny mrtvé kromě dvou malátných a jen jedna motolice zůstala malátná naživu i po čtyřech hodinách. Při koncentraci léku 10 µg byla po 1,

3 a 4 hodinách zaznamenána omezená aktivita a do 7 hodin byly všechny mrtvé nebo skomírající. V případě zředění na 5 µg a 3 µg byla u některých jedinců pozorována snížená aktivita, přičemž v kategorii se zředěním 3 µg byl pozorován poněkud slabší nástup; ve skupinách s koncentrací léku 3 a 5 µg byly do 50 hodin všechny motolice mrtvé kromě jedné malátné motolice v každé skupině. Ve skupině s koncentrací léku 1 µg bylo po 42 až 74 hodinách pozorováno snížení aktivity a po 91 hodině zůstaly naživu jen 3 aktivní a jedna skomírající motolice; v této skupině 1 µg zůstala po 115 hodinách jen jedna malátná motolice. V kontrolní skupině s RBC byla úmrtnost sledována po 66 hodinách (jedna motolice), 91 hodinách (jedna motolice) a 115 hodinách (čtyři motolice). V kontrolní skupině bez RBC byly po 91 hodině naživu všechny motolice a po 115 hodinách byla jedna mrtvá.

Experiment 2:

V případě NTZ byla u 8 replikovaných případů pozorována ve srovnání s D-NTZ o něco větší aktivita časnějším ovlivněním hybnosti a úmrtnosti. U skupin s koncentrací léku 100, 50 a 25 µg byly po jedné hodině mrtvé nebo skomírající všechny motolice kromě jedné ve skupině 25 µg, jež byla mrtvá po třech hodinách. Ve všech ostatních medikovaných skupinách bylo po jedné hodině patrné snížení hybnosti v závislosti na velikosti dávky. Ve skupině 10 µg po 16 hodinách přežila jen jedna motolice. Ve skupině s koncentrací léku 5 µg byly po 6 hodinách aktivní jen 3 motolice a žádná nebyla aktivní po 16 hodinách. Ve skupině 3 µg byly po 23 hodinách naživu jen 2 malátné motolice; tyto však byly po 41 hodinách mrtvé. Ve skupině 1 µg uhynula do 16 hodin jedna motolice, do 41. hodiny tři motolice a do 74 hodin pět motolic; po 91 hodinách byly aktivní 3 motolice a po 115 hodinách si uchovala aktivitu jedna motolice. V kontrolní skupině s RBC bylo po 74 hodinách aktivních 7 z 8 motolic, po 91 hodinách 3 a dvě motolice zůstaly aktivní po 115 hodinách. V kontrolní skupině bez RBC bylo po 74 hodinách aktivních 6 z 8 motolic, po 91 hodinách 4 a dvě motolice zůstaly aktivní po 115 hodinách.

Ve skupinách s vysokou dávkou (25, 50, 100 µg) byla smrt motolic rychlá a byla spojena s kontrakcí a sraštěním („curling“) ventrální části. Při medikaci v nižších koncentracích většina motolic načas zpomalila a po smrti nebo při umírání byla ochablější a zploštěná. Počínaje 91. hodinou se u některých replikovaných případů stala pro výsledky experimentů omezujícím faktorem kontaminace. V případě D-NTZ došlo po 115 hodinách k vytvoření souvislého překrytí dvou replikovaných ploten bakteriálním nebo plísnovým porostem s následným úhynem. Při pokusu s NTZ toto překrytí a úhyn motolice na celých replikovaných plotnách nastalo po 91 hodinách (dvě replikované plotny) a 115 hodinách (5 replikovaných ploten). Pozorování po 139 hodině nebylo uznáno za validní pro celkovou kontaminaci většiny ploten.

Závěry:

Z pokusů s oběma zkoušenými léky vyplývá jejich značná účinnost při usmrcování motolic. Poněkud vyšší účinnost proti *F. hepatica* byla pozorována u nitazoxanidu než u desacetynitazoxanidu, jeho hlavního metabolitu, o němž se soudí, že je účinný na hepatické úrovni.

K rychlé smrti motolic dochází při aplikaci D-NTZ in vitro v koncentracích >50 µg během hodiny, při koncentracích 25 µg během 4 hodin a při koncentracích 10 µg během 6 až 7 hodin. Deset µg může být vhodnou jednorázovou léčebnou cílenou dávkou léku pokud farmakokinetická data ukazují, že tkáňové koncentrace se udrží >6 až 8 hodin po jednorázové léčbě.

Silná schopnost usmrcovat motolice do 74 hodin (tři dny) o obou sloučeninách zjištěna při koncentracích 3 µg a 5 µg. Delší přežívání, avšak ne tak dlouhé jako u kontrolních nemedikovaných motolic, bylo pozorováno při koncentraci 1 µg; použití tohoto léku v této koncentraci na motolice v játrech po dobu 3 až 4 dnů proto může mít na parazity nedostatečný účinek.

Příklad X

Fasciola gigantica

- 5 Nitazoxanid byl testován na účinnost proti nedospělým a dospělým jedincům *Fasciola gigantica* na experimentálně infikovaných králících.

Encystované metacerkárie *Fasciola gigantica* (EMC) byly shromážděny na celofánové bláně 28 až 35 dní po infekci plžů *L. calludi* miracidiiem *Fasciola gigantica* za použití techniky již
 10 popsal Abdel-Ghany, v níž jsou plži denně vystaveni na 30 minut v čisté odchlorované vodě z vodovodu umělému světlu. Získané encystované metacerkárie (EMC) se 5 až 8 dní skladovaly při 4 °C v chladničce pod hladinou vody, dříve než se použily pro infekci experimentálních zvířat.

- 15 V tomto výzkumu bylo použito čtyřicet (40) králíků Boscat hmotnosti 1,5 až 2 kg, kteří byli zařazeni do dvou experimentálních skupin po 20 jedincích.

Zvířata ve skupině 1 se orálně infikovala 35 až 40 encystovanými metacerkáriemi zabalenými v listu hlávkového salátu vloženém na kořen jazyka zvířat. Tlamy zvířat byly ručně drženy zavřené dokud nedošlo ke spolknutí encystovaných metacerkárií. Této skupiny 1 se použilo pro testování nitazoxanidu proti nedospělým stádiím (4 až 5 týdnů starým) *Fasciola gigantica*.
 20

Zvířata ze skupiny 2 se orálně infikovala stejně jako v první skupině 10 až 15 encystovanými metacerkáriemi a použilo se jich pro zkoušku účinnosti nitazoxanidu proti motolicím v raném stádiu dospělosti (starým >10 týdnů).
 25

Deseti zvířatům ve skupině 1 bylo v době vzdálené 4 týdny od jejich infekce parazity v nedospělém stádiu jejich vývojového cyklu podáváno 7 po sobě následujících dní ráno a večer 35 mg nitazoxanidu. Zbývajících 10 zvířat skupiny 1 tvořilo neléčenou kontrolní skupinu.
 30

Deseti zvířatům ve skupině 2 bylo v době vzdálené 10 týdnů od jejich infekce parazity v dospělém stádiu jejich vývojového cyklu podáváno 7 po sobě následujících dní ráno a večer 35 mg nitazoxanidu. Zbývajících 10 zvířat skupiny 2 tvořilo neléčenou kontrolní skupinu.

- 35 Až do ukončení experimentu byla všechna zvířata krmena suchou pící.

Sedm dní po podání poslední dávky nitazoxanidu byla všechna zvířata v obou skupinách usmrcena. Povrch jater se zkoumal z hlediska přítomnosti migrujících nekrotických rýh zvláště pro vývojová stadia nedospělých parazitů. Tyto nekrotické oblasti byly studovány pomocí dvou
 40 chirurgických jehel s cílem získat migrující juvenilní motolice technikou, kterou popsal El-Bahy. Játra se rozřezala na malé kousky zvláště v okolí migrujících rýh a macerovala pod mikroskopem s cílem extrahovat motolice. Břišní dutina a viscerální povrchy se promyly teplou vodou. Tato výplachová voda se spojila, prolila sítím a zkoumala na přítomnost juvenilních motolic. Všichni nalezení parazité včetně jejich tělesných částí se spočítali u léčených i neléčených zvířat v obou
 45 skupinách 1 a 2. Živé motolice měly světle růžovou barvu, byly průsvitné a měly neporušené integumenty, snadno se teplou vodou vyplavovaly z jaterních tkání, zatímco mrtvé motolice měly barvu našedlou, byly uvolněné a vykazovaly porušené nekrotické povrchy. Účinnost nitazoxanidu se vypočítala pomocí vzorce:

$$50 \quad \% \text{ účinnosti} = \frac{a - b}{a} \times 100$$

kde: a = počet motolic získaných ze stolice kontrolních zvířat;

- 55 b: počet motolic získaných ze stolice léčených zvířat.

Výsledky:

- 5 Výsledky výzkumu uvedené v tabulce 7 ukazují výrazný pokles počtu nedospělých motolic extrahovaných z králičích jater léčené skupiny ve srovnání s kontrolní skupinou. Tento pokles v procentech byl průměrně 46,77 % (v rozmezí 40 až 60 %).

Tabulka 7

10

Účinnost nitazoxanidu proti nedospělým jedincům (4 týdny starým) *Fasciola gigantica* u pokusně infikovaných králíků.

Počet motolic získaných z králičích jater			
Králík č.	Neléčená kontrola	Léčení králíci	Účinnost %
1	7	4	42 %
2	7	4	42 %
3	6	3	50 %
4	8	4	50 %
5	5	3	40 %
6	5	2	60 %
7	5	3	40 %
8	6	3	50 %
9	8	4	50 %
10	5	3	40 %
Průměr	6,2	3,3	46,77 %

- 15 Ve vývojovém stádiu ranné dospělosti motolic, jimiž byli králíci infikováni, vykazoval nitazoxanid totální účinnost (100% redukci) a při zkoumání jater léčených králíků nebyli zjištěni žádní červi (motolice) ve srovnání se zvířaty z kontrolní skupiny neléčených králíků, jak je zřejmé z tabulky 8.

Tabulka 8

Účinnost nitazoxanidu proti jedincům v ranném stádiu dospělosti (10 týdnů starým) *Fasciola*
5 *gigantica* u pokusně infikovaných králíků.

Počet motolic získaných z králíčích jater			
Králík č.	Neléčená kontrola	Léčení králíci	Účinnost %
1	4	0,0	100 %
2	4	0,0	100 %
3	3	0,0	100 %
4	3	0,0	100 %
5	2	0,0	100 %
6	2	0,0	100 %
7	2	0,0	100 %
8	3	0,0	100 %
9	3	0,0	100 %
10	3	0,0	100 %
Průměr	2,9	0,0	100 %

Nitazoxanid podávaný 7 po sobě následujících dní v dávce 70 mg/den je mírně účinný proti
nedospělým jedincům *Fasciola gigantica* a kompletně účinný proti těmto parazitům ve vývojov-
10 ém stádiu ranné dospělosti.

Příklad XIII

Schistosoma

15 Nitazoxanid byl zkoušen proti *Schistosoma mansoni* a *Schistosoma hematobium* v experimentálně infikovaných myších.

20 Čtyřicet (40) bílých myší hmotnosti 30 až 50 g bylo rozděleno do dvou léčených skupin po 20 zvířatech. První skupina byla infikována 300 až 500 volnými a aktivními cercáriemi *Schistosoma mansoni* suspendovanými v 0,25 ml destilované vody a intraperitoneální injekcí podanými všem myším. Druhá skupina byla infikována stejným způsobem, ale cercáriemi *Schistosoma hematobium*. Obě skupiny potom byly chovány v laboratoři celkem 70 dní.

25 Sedmdesát dní po infikování zvířat bylo v každé skupině 10 zvířat léčeno nitazoxanidem dávkou 1,3 mg podávanou sedm po sobě následujících dní orálně ráno i večer. Sedm dní po ukončení léčby byla usmrcena všechna zvířata a z jater každé myši se perfuzí vlažnou vodou (37 °C) extrahovali červi. Získaní jedinci *Schistosoma* u všech léčených a kontrolních zvířat byli spočítáni. Účinnost nitazoxanidu byla vypočítána s použitím následujícího vzorce:

$$30 \quad \% \text{ účinnosti} = \frac{a - b}{a} \times 100$$

kde: a = počet jedinců *Schistosoma* získaných z výplachu kontrolních zvířat

35 b = počet jedinců *Schistosoma* získaných z výplachu léčených zvířat.

Výsledky:

5 Výsledky v tabulkách 9 a 10 jasně prokázaly, že nitazoxanid podávaný v dávkách 2,6 mg/den 7 dní po sobě následujících byl účinnější proti *Schistosoma hematobium*, kde bylo pozorováno snížení počtu červů o 82,85 % ve srovnání s kontrolními zvířaty, než proti *Schistosoma mansoni*, kde snížení proti kontrolní skupině myši dosáhlo jen 59,91 %. Tyto výsledky jsou konzistentní s výsledky ve zprávě Abaza a dalších, podle které nitazoxanid nebyl účinný při léčbě pacientů

10

Tabulka 9

Účinnost nitazoxanidu proti dospělým jedincům (13 týdnů starým) *Schistosoma mansoni* u myši.

Počet motolic odstraněných z myších jater		
Myš č.	Neléčené kontrolní myši	Léčené myši
1	21	10
2	29	9
3	32	10
4	26	11
5	24	13
6	19	10
7	20	9
8	24	12
9	22	8
10	30	7
Celkem	247	99
Průměr/myš	24,7	9,9
Účinnost		59,91

15

Tabulka 10

Účinnost nitazoxanidu proti dospělým jedincům (13 týdnů starým) *Schistosoma hematobium* u myši.

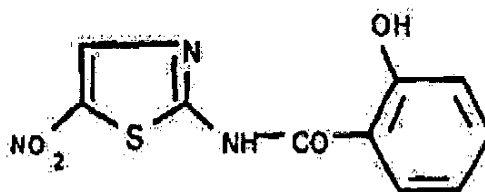
Počet motolic odstraněných z myších jater		
Myš č.	Neléčené kontrolní myši	Léčené myši
1	18	3
2	16	3
3	14	2
4	19	2
5	12	4
6	10	4
7	13	2
8	12	2
9	17	0,0
10	9	2
Celkem	140	24
Průměr/myš	14	2,4
Účinnost		82,85

5

10

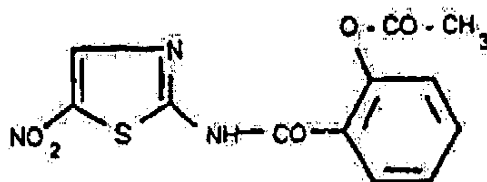
PATENTOVÉ NÁROKY

1. Farmaceutický přípravek, vyznačující se tím, že jako účinnou složku obsahuje alespoň jednu sloučeninu vybranou ze skupiny zahrnující sloučeninu vzorce I



15

a sloučeninu vzorce II



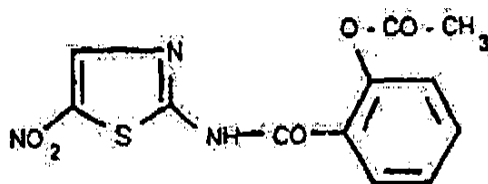
a dále obsahuje farmaceuticky přijatelnou kyselinu v množství zlepšujícím stabilitu.

2. Farmaceutický přípravek podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že farmaceuticky přijatelná kyselina je vybrána ze skupiny zahrnující kyselinu citronovou, kyselinu glutamovou, kyselinu jantarovou, kyselinu ethansulfonovou, kyselinu octovou, kyselinu vinnou, kyselinu askorbovou, kyselinu methansulfonovou, kyselinu fumarovou, kyselinu adipovou, kyselinu jablčnou a jejich směsi.

3. Přípravek podle nároku 2, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že farmaceuticky přijatelnou kyselinou je kyselina citronová.

4. Přípravek podle nároku 2, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že farmaceuticky přijatelnou kyselinou je kyselina askorbová.

5. Přípravek podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje jako účinnou složku sloučeninu vzorce II



a farmaceuticky přijatelnou kyselinu v množství dostačujícím k úpravě pH farmaceutického přípravku při styku s vodou na 2 až 6, přičemž uvedená účinná složka je ve formě pevných částic a přičemž poměr hmotnosti farmaceuticky přijatelné kyseliny k hmotnosti uvedených pevných částic je mezi 0,01 a 0,5.

6. Přípravek podle nároku 5, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že poměr hmotnosti farmaceuticky přijatelné kyseliny k hmotnosti uvedených aktivních pevných částic je mezi 0,03 a 0,2.

7. Přípravek podle nároku 2, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že přípravek je v pevné dávkové formě, přičemž aktivní částice jsou granulovány v přítomnosti alespoň granulačního činidla za vzniku granulovaných aktivních pevných částic.

8. Přípravek podle nároku 5, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že aktivní částice před granulací mají velikost částic menší než 200 μm a střední velikost částic větší než 10 μm .

9. Přípravek podle nároku 8, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že střední velikost aktivních částic je mezi 10 a 100 μm .

10. Přípravek podle nároku 7, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že granulační činidlo je vybráno ze skupiny zahrnující polyvinylpyrrolidon, vodu, alkohol, sacharózu, hydroxylcelulózu a jejich směsi.

11. Přípravek podle nároku 7, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že v granulovaných aktivních pevných částicích je hmotnostní poměr farmaceuticky přijatelné kyseliny a účinné složky mezi 0,01 a 0,5.

12. Přípravek podle nároku 2, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že je ve formě suspenze pevných částic alespoň jedné sloučeniny vzorce I a vzorce II v kapalině.

13. Přípravek podle nároku 12, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že pevné částice před vytvořením suspenze jsou granulovány v přítomnosti alespoň jednoho granulačního činidla za vzniku granulovaných aktivních pevných částic.

14. Přípravek podle nároku 12, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že kapalinou je voda.

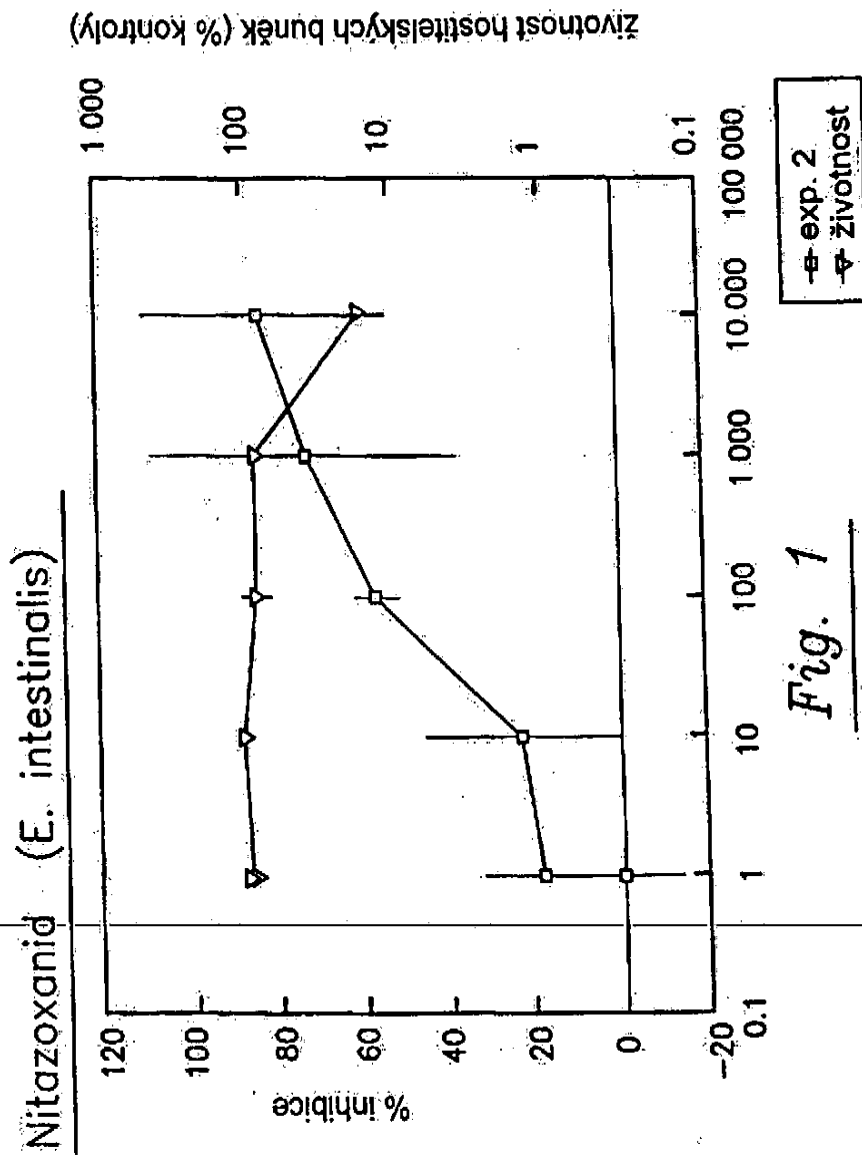
15. Přípravek podle nároku 12, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že pH suspenze je mezi 2 a 6.

16. Přípravek podle nároku 12, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že pH suspenze je mezi 3 a 5.

17. Přípravek podle nároku 2, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že je ve formě pasty zahrnující aktivní částice alespoň jedné sloučeniny vzorce I a vzorce II, smáčedlo a zahušťovadlo.

18. Přípravek podle nároku 17, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že aktivní částice mají velikost částic menší než 200 μm , méně než 10 % hmotnostních těchto částic má velikost větší než 100 μm , méně než 50 % těchto částic má velikost větší než 50 μm a méně než 10 % hmotnostních těchto částic má velikost menší než 5 μm .

9 výkresů



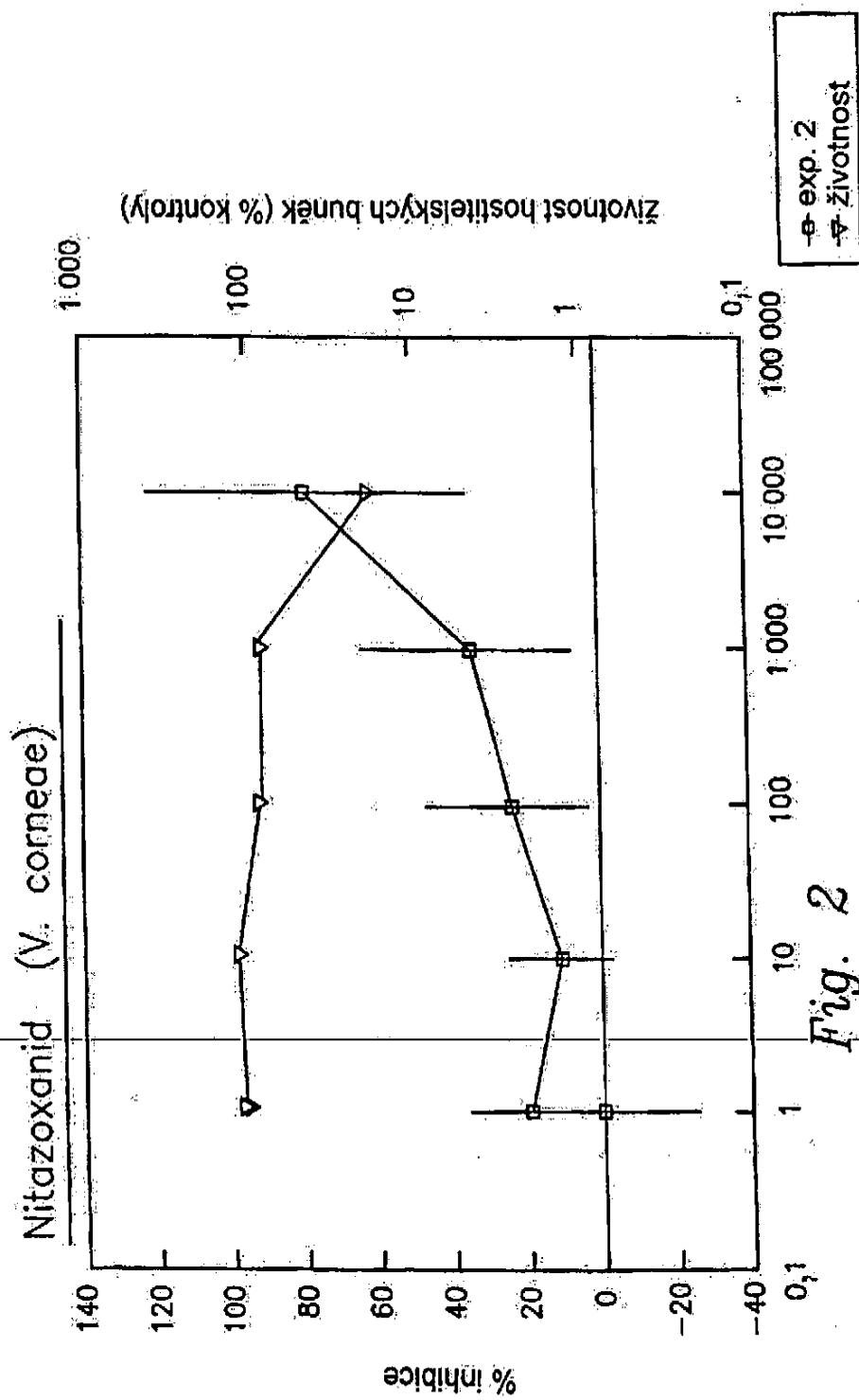
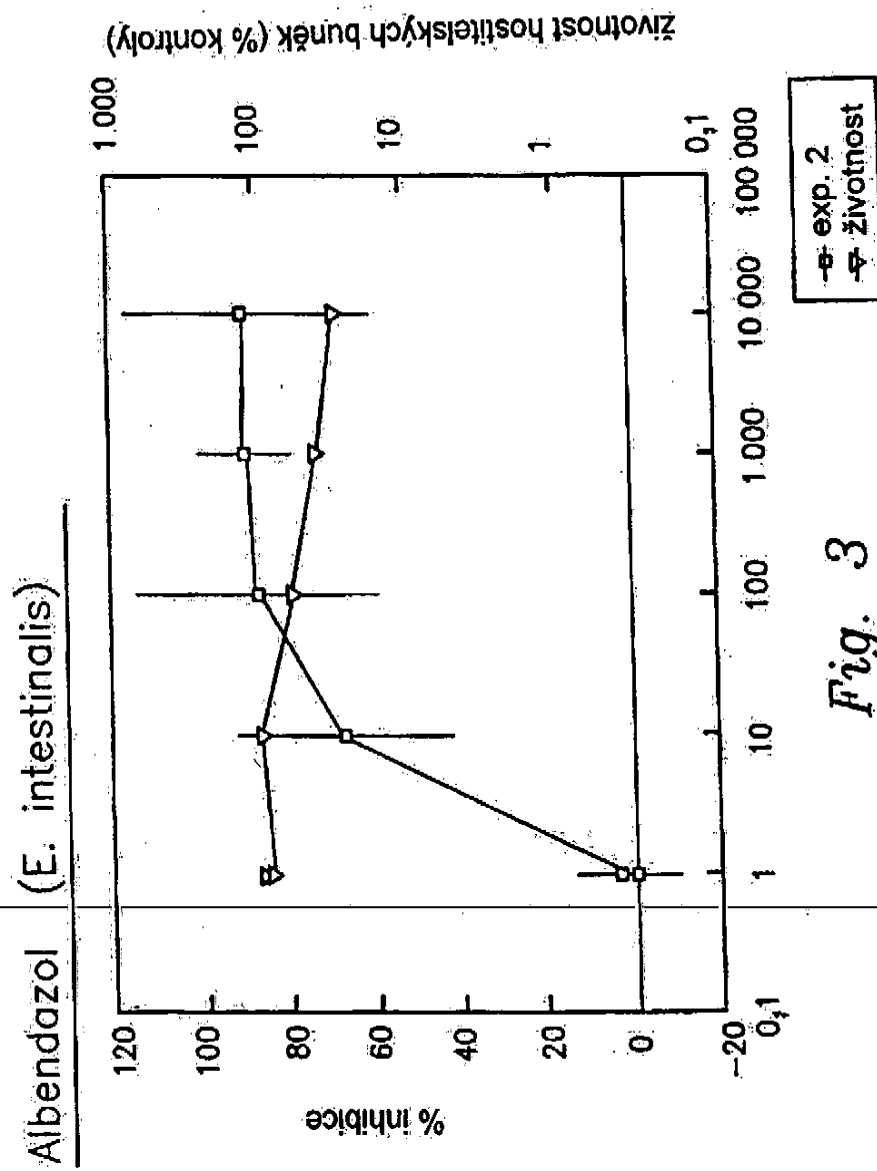
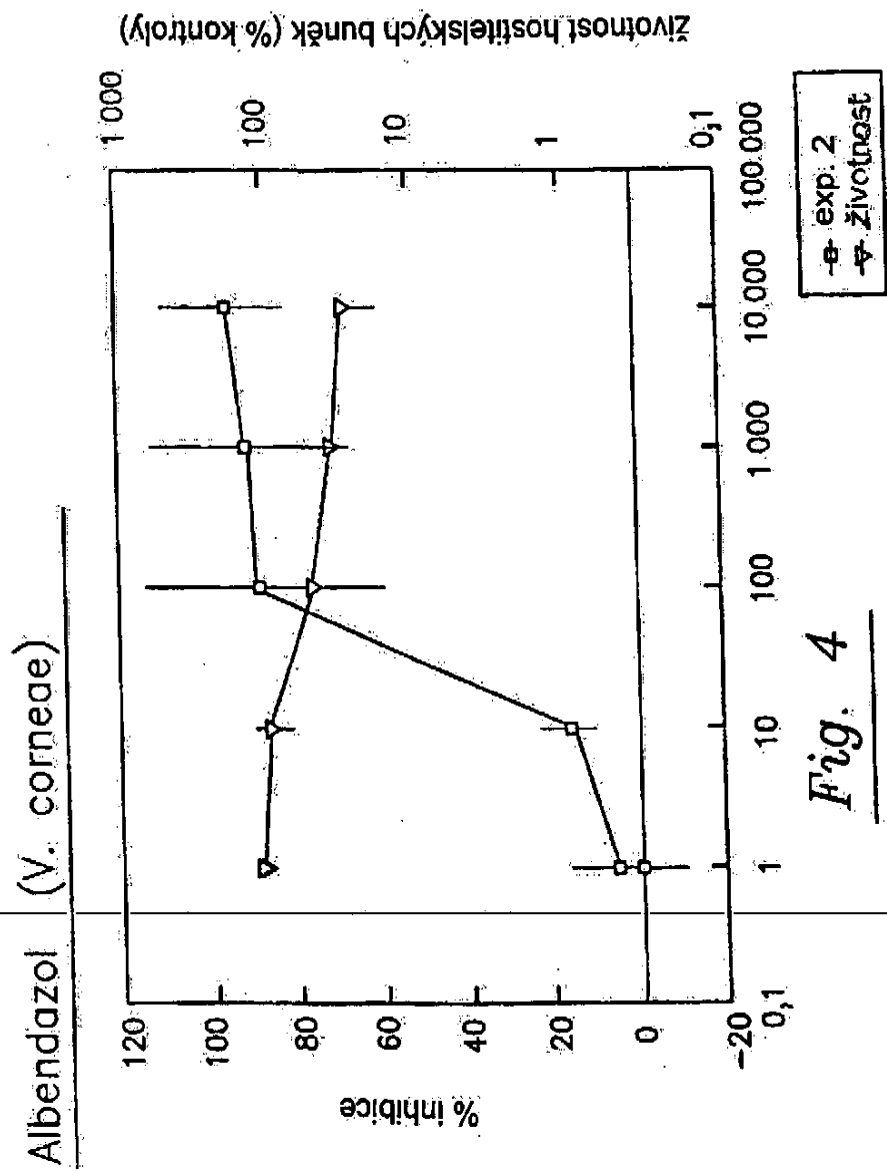


Fig. 2





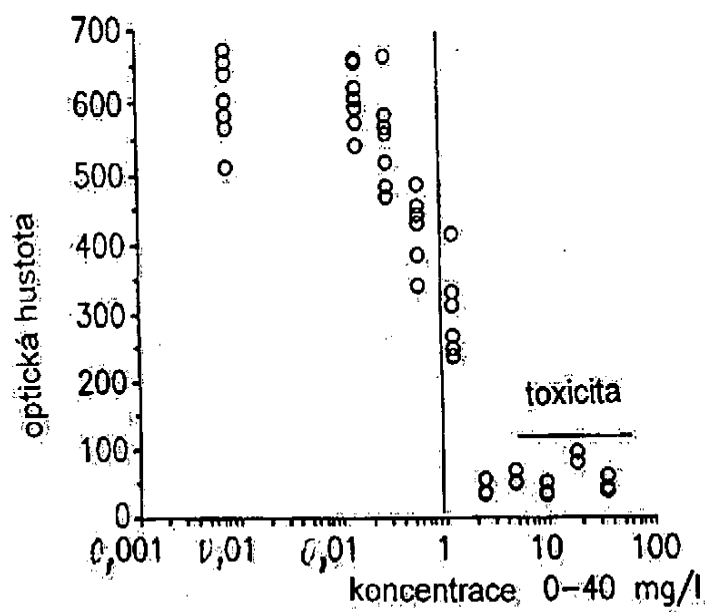


Fig. 5A

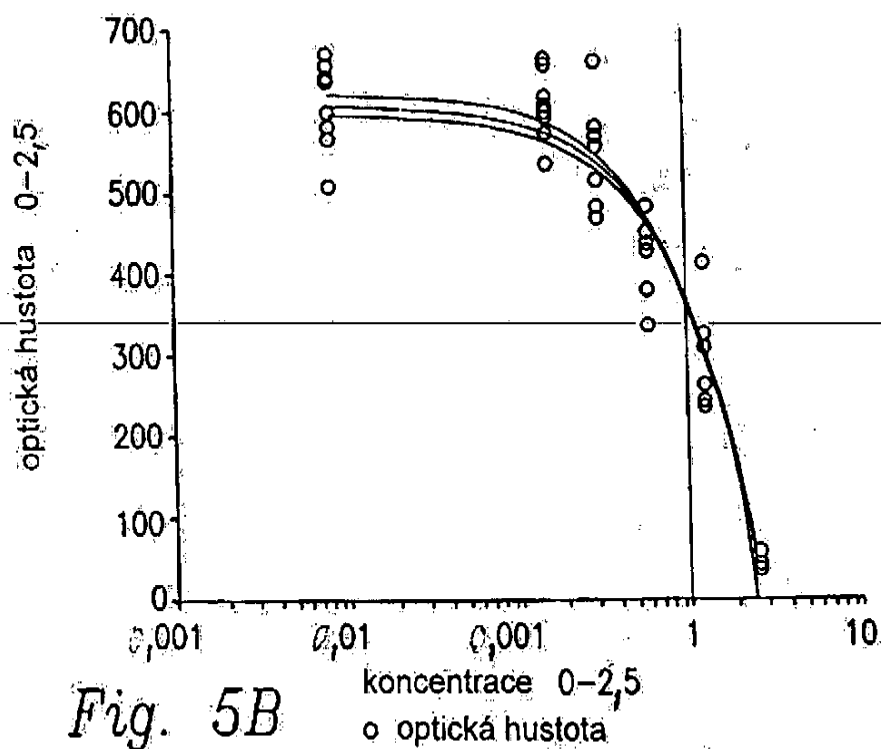


Fig. 5B

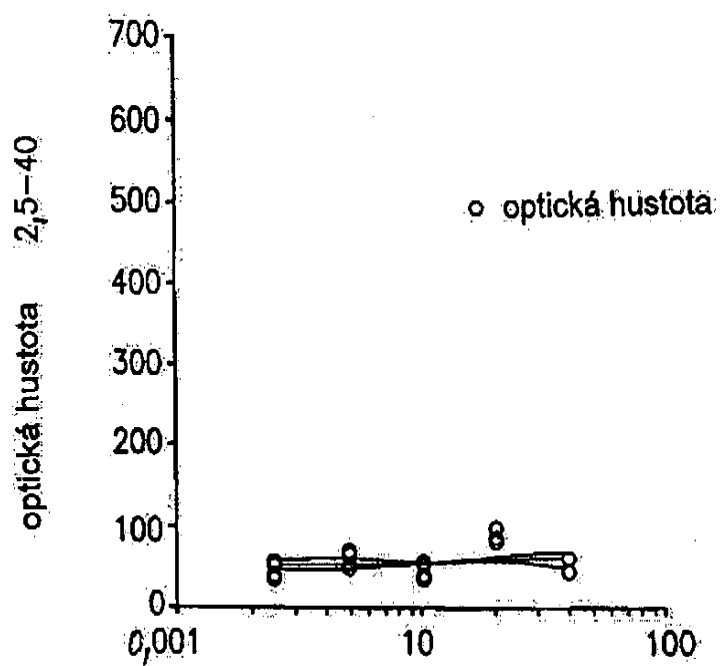


Fig. 5C

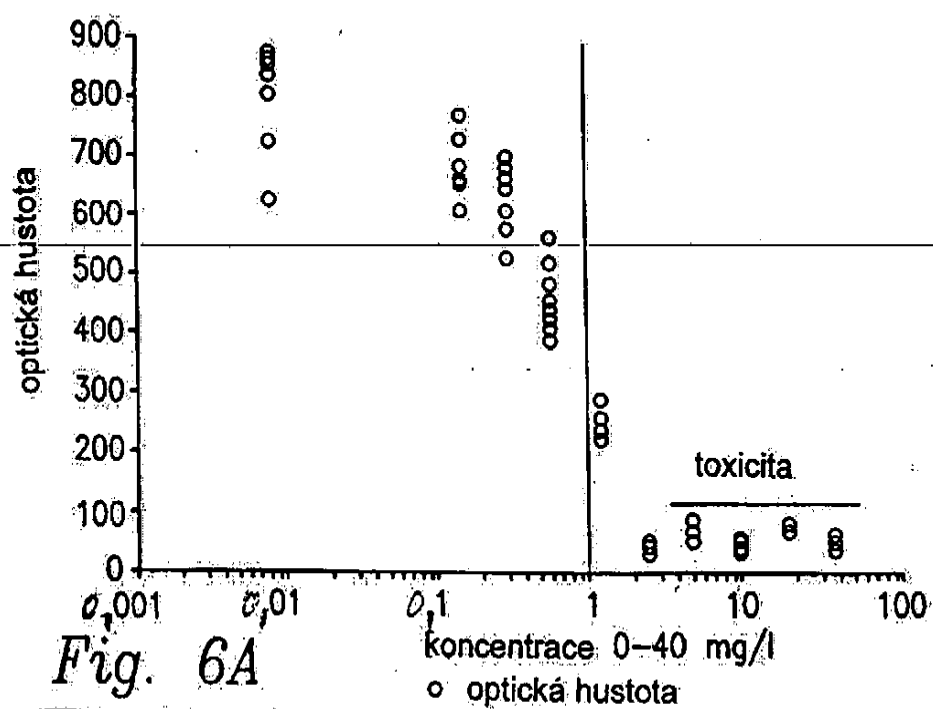
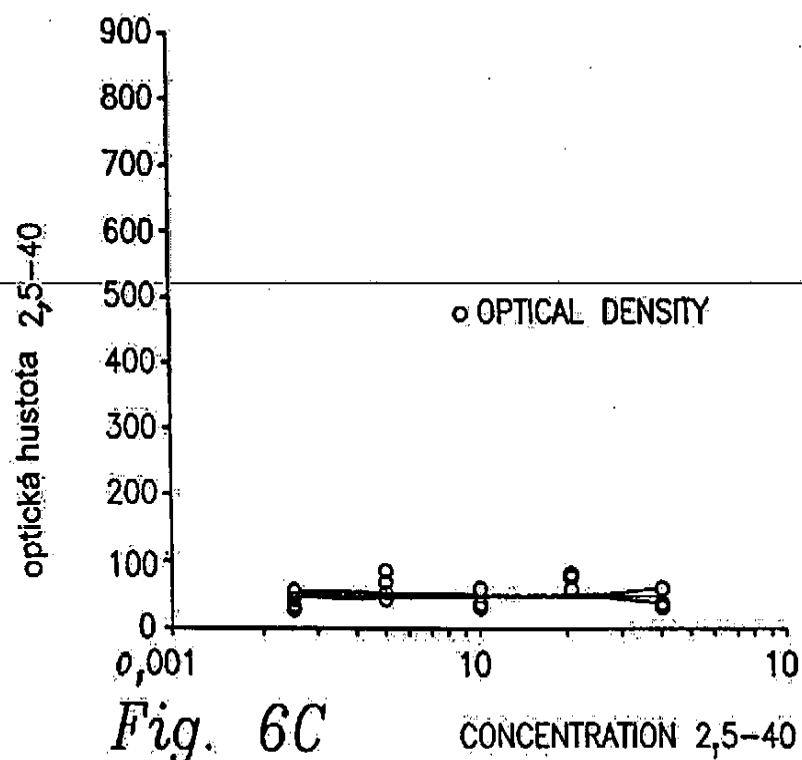
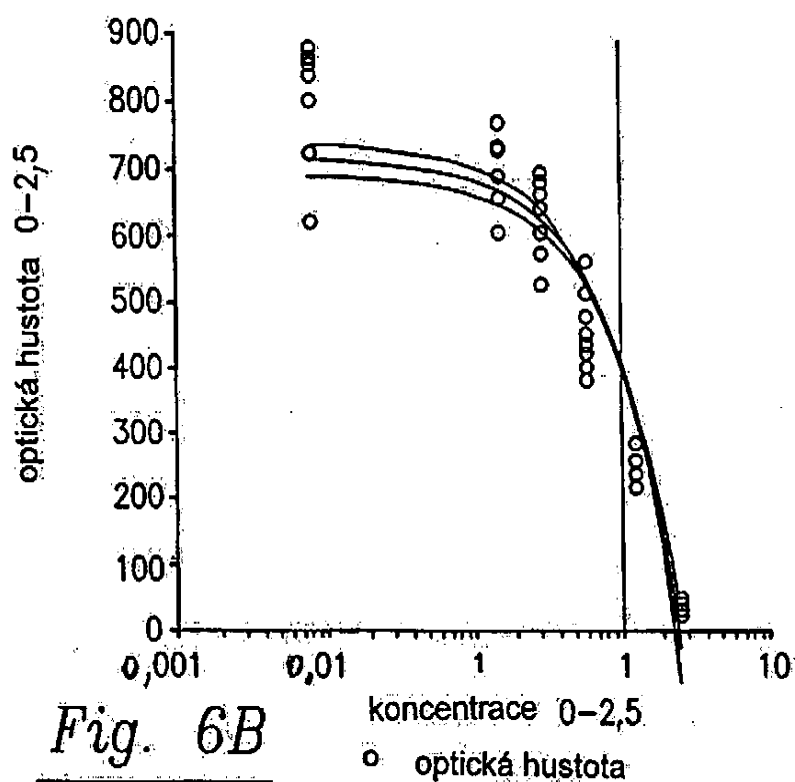
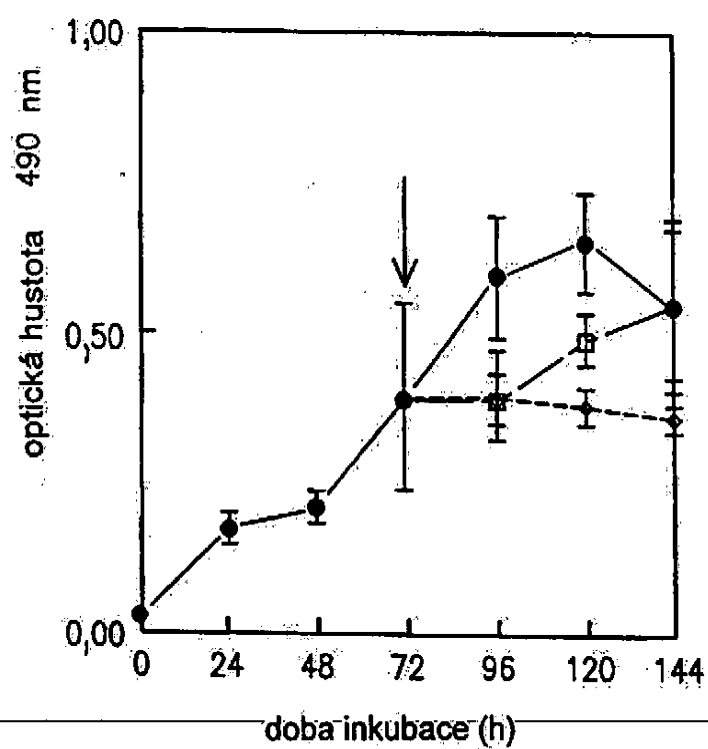


Fig. 6A



Účinek nitazoxanidu na růst mykobakterií
test MTS - 4 h



- kontrola
- 3 µg/ml
- ◇— 50 µg/ml

Fig. 7

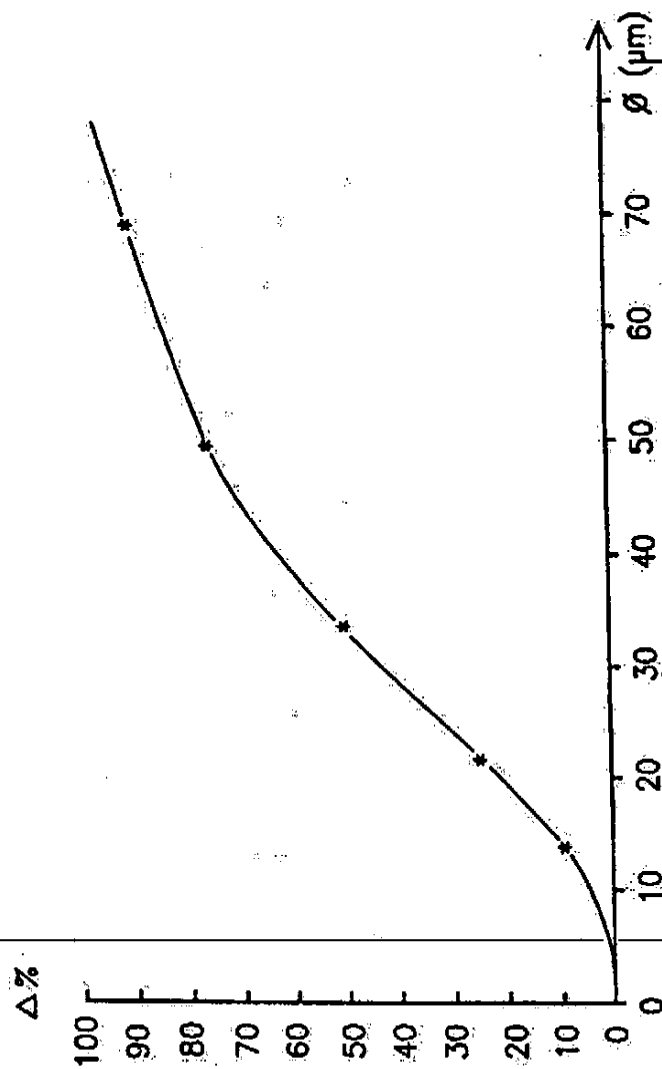


Fig. 8

Konec dokumentu