

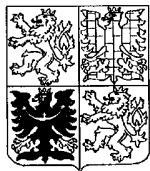
PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 3302

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **11.03.1999**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **12.03.1998**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/041232**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14.03.2001**
(Věstník č. 3/2001)

(86) PCT číslo: **PCT/US99/05315**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/45974**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 L 15/44

A 61 P 17/00

(71) Přihlašovatel:

**THE PROCTER & GAMBLE COMPANY, Cincinnati,
OH, US;**

(72) Původce:

**Rourke Francis James, Sharonville, OH, US;
Osborne Scott Edward, Middletown, OH, US;
Roe Donald Carroll, West Chester, OH, US;
Underiner Todd Laurence, Cincinnati, OH, US;
McIver John McMillan, Cincinnati, OH, US;
Bates Timothy, Cincinnati, OH, US;**

(74) Zástupce:

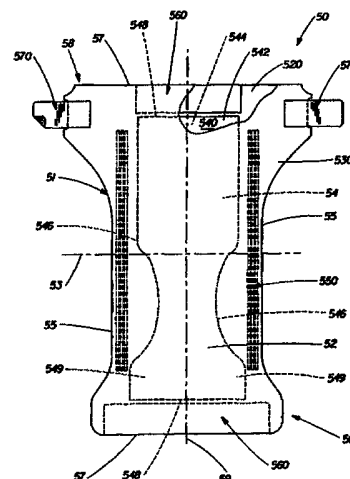
**PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1, Praha 4,
14000;**

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Absorpční prostředek s obsahem inhibitoru
proteázy a způsob jeho použití**

(57) Anotace:

Řešení popisuje absorpční prostředek, jehož alespoň jedna část obsahuje inhibitor proteázy, který snižuje aktivitu proteáz ze stolice, které by jinak mohly způsobit nebo přispět ke vzniku zánětu kůže uživatele prostředku s následnou plenkovou vyrážkou nebo dermatitidou. Prostředek dále zahrnuje distribuční systém, který obsahuje a přenáší inhibitor proteázy alespoň na část kůže uživatele. Lépe je však pokud distribuční systém obsahuje dermatologickou složku, jejíž část, včetně inhibitoru proteázy, je automaticky přenášena z prostředku na kůži uživatele, během běžného použití prostředku, čímž se vytváří ochrana proti proteázám stolice na rozhraní kůže-stolice. Opakovaná aplikace podobně upravených prostředků na kůži uživatele poskytuje dostupný zdroj, z kterého může inhibitor proteázy plynule přecházet na kůži a poskytovat pro aktivní ochranu proti proteázám stolice, při léčbě a/nebo prevenci plenkové dermatitidy způsobené proteolytickými enzymy.



Absorpční prostředek s obsahem inhibitoru proteázy a způsob jeho použití

Oblast techniky

Vynález pojednává o absorpčních prostředcích jako jsou např. plenky, cvičební spodky, vložky pro inkontinenci, dámské hygienické prostředky apod. Tyto absorpční prostředky obsahují inhibitory proteáz stolice a jsou užitečné při prevenci a léčbě plenkové vyrážky.

Dosavadní stav techniky

Plenková vyrážka je běžná forma podráždění a zánětu těch částí dětského těla, která jsou běžně kryta plenkou. Tento stav se také nazývá plenková dermatitida. Přestože je tento stav určité nejčastější u dětí, nevyskytuje se pouze u nich. U každého jedince, který trpí inkontinencí v rozsahu, který vyžaduje použití absorpčních prostředků, se může vyvinout toto onemocnění. Mezi náchylné jedince patří novorozenci, staří lidé, těžce nemocní nebo neambulantní jedinci.

K dispozici je mnoho typů absorpčních prostředků na jedno použití, jako jsou např. plenky, cvičební spodky, prostředky pro inkontinenci, zdravotnické pleny apod., které mají vysokou absorpční kapacitu pro moč a jiné tělní výměšky. Výrobky pro jedno použití, tohoto typu, obvykle obsahují nějaký typ vrchního materiálu propustného pro kapaliny, absorpční jádro a pro kapalinu nepropustný spodní materiál. Ačkoliv tyto typy absorpčních struktur

mohou být vysoce účinné při absorpci tekutin, je známé, že dlouhodobé nošení takových absorpčních prostředků může poškodit kůži hyperhydratací nebo expozicí kůže dráždivým látkám, které se běžně nachází v tělních výměscích. Část 21, kapitoly 333 503 C.F.R. definuje plenkovou vyrážku jako „zánětlivé kožní onemocnění v plenkové oblasti (hráz, hýždě, podbřišek a vnitřní strana stehen) způsobené jedním nebo více z následujících faktorů: vlhkost, okluze, odírání, trvalý kontakt s močí nebo stolicí nebo oběmi, nebo mechanické nebo chemické podráždění.“ Lékaři zpravidla pokládají plenkovou vyrážku nebo dermatitidu za stav, který je ve svém nejlehčím stadiu kontaktní iritační dermatitidou vzniklou na základě rozsáhlého kontaktu kůže s močí nebo stolicí nebo oběmi. Mezi nejčastěji zmiňovanými faktory, v souvislosti s plenkovou vyrážkou, jsou čpavek, enzymy ve stolici, bakterie, bakteriální produkty, pH moči a *Candida albicans*.

Existují důkazy, že proteolytické a lipolytické enzymy ze stolice, které pocházejí ze střeva a/nebo ze slinivky, mají klíčovou úlohu při podráždění kůže a vzniku zánětu u plenkové dermatitidy, viz. patent USA 4 556 560, patent USA 4 657 537, patent USA 4 685 909, patent USA 4 842 593, Andersen et al. (Contact Dermatitis 30:152-158, 1994), Mac Farlane et al. (J. 4 842 593), Andersen et al. (Contact Dermatitis 30:152-158, 1994), MacFarlane et al. (J. Appl. Bacteriol. 64:37-46, 1988) a Buckingham a Berg, (Pediatric Dermatology 3:107-112, 1986). Studie s různými inhibitory upravenými tak, aby inhibovaly enzymatickou aktivitu různých tříd proteáz, ukázaly, že serinové proteázy, cysteinové proteázy a metaloproteázy, jsou nejčastěji zodpovědné za celkovou proteolytickou aktivitu stolice. Je známo, že serinové proteázy,

především trypsin a chymotrypsin, jsou téměř vždy přítomny ve velkém množství ve stolici zdravých malých dětí, a menší, ale detekovatelné množství, je přítomno ve stolici zdravých dospělých.

Dráždivé účinky fekální enzymatické aktivity na kůži jsou obvykle zesíleny, pokud je přítomna moč a/nebo pokud je kůže kryta. Vytvoření hydroxidu amonného působením bakteriálního enzymu ureázy na moč má za následek zvýšení pH, např. k hodnotám 7,0 a vyšším, při kterém se aktivita proteáz a jiných enzymů, jako např. lipáz přítomných ve stolici, zvyšuje. Např. optimální rozmezí pH pro ureázu je 6,4 - 6,9, pro trypsin 7,8 - 8,2 a pro lipázy 7,5 - 9,5. Pokud pH přesáhne 7,0 začíná se z moči uvolňovat volný čpavek, který je další dráždivou toxickou sloučeninou působící na kůži. Sama moč může také přispívat k vytvoření plenkové vyrážky tím, že zvlhčuje prostředí. Voda, a to především voda ve formě moči, je obzvláště účinná při snižování kožní bariéry, čímž zvyšuje náchylnost kůže k podráždění enzymy stolice. Poněvadž moč a stolice jsou najednou běžně přítomny v absorpčním prostředí a expozice kůže po dobu několika hodin není neobvyklá, jsou přítomny vhodné podmínky a dostatek času pro vznik těchto interakcí a následné poškození kůže. Dalším faktorem, který přispívá k posílení enzymatické aktivity stolice je jeho alkalické pH. Například je dobře známo, že ačkoliv stolice přirozeně kojených dětí je obvykle kyselá, stolice uměle kojených dětí je zpravidla alkalická s pH v rozmezí od mírně alkalického (pH 7,2 - 7,5) až k silně alkalickému (pH 8,7 a vyšší). Takže především děti uměle kojené mají náchylnost k tomu, aby se u nich rozvinula plenková dermatitida způsobená zvýšenou aktivitou enzymů ve stolici díky vyššímu pH.

Z pohledu těchto stanovených příčin plenkové dermatitidy, byla provedena řada pokusů, jejichž cílem bylo snížit nebo zabránit výskytu plenkové dermatitidy. Řada těchto nejlepších přístupů se snaží ovlivnit více příčin nebo důležitých kofaktorů. Nejčastěji to je, snížení hydratace kůže častou výměnou plenek, použití prášků absorbujících vlhkost, použití superabsorpčních látek a zlepšení proudění vzduchu v plenkách. Časté je také použití umělých překážek. Běžné je místní nanesení krému, masti, roztoku nebo pasty, jenž vytvoří určitý stupeň fyzikální bariéry, která chrání kůži před dráždivými látkami ze stolice nebo moče. Avšak takový bariérový přístup, přestože snižuje přístup dráždivých látek na kůži, může být esteticky nežádoucí.

Z pohledu vlivu alkalického pH na zvýšenou aktivitu enzymů ve stolici bylo provedeno několik pokusů k udržení pH kůže pomocí látek ovlivňujících pH, jako jsou např. pufovací látky nebo kyselé činidla neutralizující čpavek, v absorpčním prostředku nebo jako přísady v lokálně aplikovaných dermatologických prostředcích. Předpokládá se, že účinné udržování pH kůže v jeho přirozeném nízkém pH (tj. od 3,0 do 5,5) může působit proti dráždivému účinku čpavku a snižovat aktivitu enzymů stolice. Snížení enzymatické aktivity kůže tímto způsobem, je však dosti obtížné za situace, kdy je alkalická stolice přímo na kůži po vyprázdnění střeva.

Určité antienzymové složky, byly přidávány do lokálně aplikovaných přípravků, pro léčbu a prevenci plenkové vyrážky, způsobené dlouhým kontaktem lidské kůže s tělními výměšky.

Například patent USA 4 556 560 popisuje přípravky obsahující ve vodě rozpustné inhibitory lipázy, nejlépe soli kovů, jako např. chlorid zinečnatý, v bariérovém přenašeči, jakým je např. polyethylen glykol. Patent USA 5 091 193 popisuje přípravky pro aplikaci na kůži při výměně plenky, které obsahují chelatující činidlo, jako např. kyselinu listovou, ethylendiamintetraoctovou kyselinu (EDTA) apod., které omezují dostupnost kovů, které ureáza a proteázy vyžadují jako kofaktory pro aktivitu. Přípravek může dále obsahovat inhibitor lipázy, jako např. ester mastného alkoholu nebo přidáný antienzym, nasycený nebo nenasycený, lineární nebo rozvětvený, zinkovou sůl mastné kyseliny o 2 až 22 atomech uhlíku nebo aminoacylkyselinu, jako např. propionylcystein, propionylhydroxyprolin nebo caproylcystein. Byly také popsány čistící utěrky, pro odstraňování tělních výměšků z kůže, které obsahují inhibitory proteázy.

Ačkoliv se na vzniku plenkové dermatitidy podílí řada faktorů, zdá se pravděpodobné, že fyziologickou odpovědí kůže na dráždivé látky, jako jsou enzymy stolice, čpavek apod., jsou některé společné mechanismy. Například je známo, že tvorba cytokinů kožními buňkami, je běžnou odpovědí na přítomnost dráždivých látek a porušení vnější vrstvy kůže (stratum corneum). Hlavním buněčným typem, který se účastní tvorby cytokinů, je keratinocyt, který se nalézá přímo pod stratum corneum a má největší pravděpodobnost se setkat s dráždivou látkou jako první. Bylo dokázáno, že keratinocyt vytváří širokou škálu různých cytokinů, včetně prozánětlivého cytokinu interleukinu 1-alfa ($IL-1\alpha$), jako odpověď na dráždivé látky. Tento cytokin a další cytokiny indukuje

kaskádu událostí, které mohou nakonec vést ke vzniku zarudnutí, pupínků, odlupování a vředů, které jsou společně popisovány jako plenková dermatitida.

Byly popsány přípravky pro léčbu nebo prevenci plenkové vyrážky, které obsahují určité inhibitory ureáz, lipáz a/nebo proteáz, avšak dříve nebylo známo, že proteázy stolice mají důležitou roli v indukci prvotní cytokinové odpovědi keratinocytů, která vede ke kaskádě zánětlivých odpovědí a inhibici proteáz, a proto je nyní možné specifičtěji předcházet a léčit plenkovou dermatitidu. Dříve nebyl popsán žádný léčebný postup, který by snižoval nebo bránil výskytu plenkové dermatitidy, u kterého by byly inhibitory proteáz přímo vpraveny do absorpčního prostředku, např. plenek apod. nebo kde by se účinná množství inhibitorů automaticky přenášela na kůži uživatele upraveného prostředku, a to bez pomoci rukou. Dále nebylo popsáno, že by užívání, a to především opakované, upraveného absorpčního prostředku, mohlo automaticky přenášet dostatečná množství inhibitorů proteáz na zvolené oblasti kůže uživatele, čímž by zajišťovalo proaktivní ochranu proti průniku proteáz a jejich aktivitě.

Podstata vynálezu

Vynález popisuje absorpční prostředek, jehož aspoň část obsahuje inhibitor proteáz, jenž snižuje aktivitu proteáz stolice, které by jinak spustily nebo přispěly k zánětu kůže uživatele prostředku s následným rozvojem plenkové dermatitidy. Zde použitým výrazem "inhibitor proteázy" se míní jakákoliv látka, která inhibuje aktivitu proteáz v jednom nebo více ze sedmi testů

popsaných níže při (i) IC_{50} 30 μM nebo méně, obvykle od 0,00001 μM do 30 μM , lépe od 0,0001 μM do 20 μM , ještě lépe od 0,001 μM do 10 μM a nejlépe od 0,01 μM do 5 μM , při měření způsobem čištěné proteázy, který je popsán níže, při (ii) IC_{50} 90 μM nebo méně, obvykle od 0,00001 μM do 90 μM , lépe od 0,0001 μM do 30 μM , ještě lépe od 0,001 μM do 10 μM a nejlépe od 0,01 μM do 5 μM , při měření způsobem specifické fekální proteázy, který je popsán níže nebo při (iii) IC_{50} nižší než 500 μM , lépe však nižší než 300 μM a nejlépe nižší než 100 μM , při měření způsobem obecné fekální proteázy, který je popsán níže.

Inhibitor proteázy obsažený v prostředku inaktivuje jeden nebo více hlavních typů proteáz ve stolici, tj. serinové proteázy, metaloproteázy, cysteinové proteázy a aspartylproteázy. Ačkoliv může být v absorpčním prostředku, použít jakýkoliv inhibitor proteázy nebo jejich směs, které mají požadovanou IC_{50} uvedenou výše, bylo zjištěno, že inhibice serinové proteázy ve stolici pomocí inhibitoru serinové proteázy, jako např. inhibitoru trypsinu ze sóji a hexamidinu, značně snižuje prvotní cytokinovou odpověď kožních buněk na stolici. Vhodnými inhibitory proteáz, pro použití v absorpčních prostředcích tohoto vynálezu, jsou inhibitor trypsinu ze sóji a hexamidin, stejně tak jako aprotinin, p-aminobenzamidin, leupeptin, pepstatin A, chymostatin apod.

Prostředek by měl obsahovat inhibitoru proteázy od 0,0001 % do 30 %, lépe však od 0,0001 % do 10 % hmotnosti. Inhibitor může být přítomen v čisté formě, jako např. prášek, vločky, zrnka apod., nebo může být v nosném vehikulu, jako roztok, suspenze, disperze, emulze apod. Navíc může být inhibitor obsažen ve volné formě v

mikrokapsulích, absorpční látce, komůrce, lepidlu, dermatologické složce, pevné opoře, struktuře nanofáze apod. Inhibitor v absorpčním prostředku snižuje aktivitu proteáz, měřeno testovacím způsobem absorpčního prostředku (popsán níže), nejméně o 10 %, lépe však nejméně o 20 %, ještě lépe nejméně o 50 % a nejlépe nejméně o 80 %. Inhibitor v absorpčním prostředku snižuje aktivitu proteáz o 10 % až 99 %, lépe však o 20 % až 99 %, ještě lépe o 50 % až 99 % a nejlépe o 80 % až 99 %.

Absorpční prostředek, dále zahrnuje distribuční systém, uvolňující inhibitor proteázy, aspoň na část kůže uživatele prostředku. Distribuční systém může mít, mimo jiné, některé z těchto uspořádání, např. konfigurace v které je inhibitor proteázy v práškové, částicové nebo šupinkové formě, nebo v roztoku, suspenzi, emulzi nebo podobně. Distribuční systém může obsahovat strukturu, jako jsou mikrokapsule, absorpční látka, struktura nanofáze, komůrka, lepidlo, pevná opora nebo podobné, nebo složku, jako je dermatologická složka. Distribuční systém přenáší, během nošení prostředku, inhibitor proteázy do blízkosti kůže, a nejlépe, aspoň na část kůže uživatele prostředku tak, že inhibitor může zastavit proteázy ve stolicí na rozhraní kůže/stolice dříve, než mohou proniknout do stratum corneum kůže, čímž sníží nebo zabrání aktivaci zánětlivé odpovědi.

V navrhovaném provedení vynálezu, zahrnuje distribuční systém dermatologickou složku, která obsahuje inhibitor proteázy od 0,01 % do 50 %, lépe však od 0,05 % do 25 % a nejlépe od 0,1 % do 10 % hmotnosti. Aspoň část povrchu absorpčního prostředku, který se dotýká uživatele, by měla obsahovat dermatologickou složku s inhibitorem enzymu, aby mohla být část dermatologické složky s

inhibitorem automaticky přenášena, během běžného nošení, z prostředku na kůži uživatele, kde potom vytváří ochranu proti proteázám stolice. Opakovaná aplikace podobně upravených prostředků na kůži uživatele, vytváří dostupný zdroj, z kterého může inhibitor proteázy plynule přecházet na kůži, kde se hromadí a vytváří proaktivní ochranu proti proteázám stolice, která snižuje nebo brání vzniku plenkové dermatitidy způsobené proteolytickými enzymy.

Výhodou absorpčního prostředku s obsahem inhibitoru proteázy je, že inhibice proteáz stolice a tedy snížení dráždění kůže způsobené kontaktem se stolicí, je přímým důsledkem interakce inhibitor – enzym, místo nepřímého vlivu, jakým je změna pH, inaktivace kofaktoru nutného pro aktivitu enzymu nebo jiných dermatologických látek. Tento způsob léčby a/nebo prevence plenkové dermatitidy, je založen na rozvážném výběru inhibitorů, které inaktivují hlavní typy proteáz přítomných ve stolici. Navíc k interakci inhibitor – enzym dochází při vysokých hodnotách pH, které jsou běžné v znečištěných plenkách a dalších absorpčních prostředcích.

Přehled obrázků na výkresech

Obrázek 1 je schematickým zobrazením absorpčního prostředku, ve formě plenky, podle uvedeného vynálezu.

Obrázek 2 je pohled z boku, znázorňující umístění kožního analogu, použitého při přenosovém testu dermatologické složky a/nebo přenosovém testu inhibitoru proteáz.

Obrázek 3 je plošný pohled, znázorňující umístění kožního analogu, použitého při přenosovém testu dermatologické složky a/nebo přenosovém testu inhibitoru proteáz.

Příklady provedení vynálezu

I. Definice

Výraz „zahrnující“, tak jak je zde použit, znamená, že různé komponenty, složky nebo kroky, mohou být společně použity při aplikaci uvedeného vynálezu. V souladu s tím, obsahuje výraz „zahrnující“, také významově užší výrazy „složený především z“ a „složený z“.

Výraz „IC₅₀“ znamená inhibiční koncentraci (např. mikromolární koncentraci, μM) látky (inhibitoru), která sníží úroveň štěpení substrátu enzymem o 50 %, při měření enzymové aktivity standardními testy *in vitro*, viz. níže. IC₅₀ se vypočítá podle rovnice $\text{IC}_{50} = (I)/((v/v_i)-1)$, kde (I) je testovaná inhibiční koncentrace, v je úroveň štěpení substrátu za nepřítomnosti inhibitoru a v_i je úroveň štěpení substrátu za přítomnosti inhibitoru. Tak jak bude dále popsáno, IC₅₀ inhibitoru proteázy, může být měřena pomocí způsobu s čištěným enzymem, způsobem se specifickou proteázou stolice nebo způsobem obecné proteázy stolice.

Další výrazy jsou zde definovány při jejich prvním použití.

Všechna procenta, koeficienty a poměry, které jsou zde použity, jsou váhová, pokud není stanoveno jinak.

II. Vynález

Vynález předkládá absorpční prostředek, který obsahuje inhibitor proteázy, jenž inhibuje jednu nebo více proteáz přítomných ve stolici a splňuje podmínku pro IC_{50} proti trypsinu, chymotrypsinu a/nebo leucinové aminopeptidáze v testu čištěné proteázy, testu specifické proteázy stolice nebo testu obecné proteázy stolice, které jsou popsány níže. Vynález navrhuje absorpční prostředek, který obsahuje inhibitor proteázy, jenž má IC_{50} 30 μM nebo méně, obvykle 0,00001 μM až 30 μM , lépe 0,0001 μM až 20 μM , ještě lépe 0,001 μM až 10 μM a nejlépe 0,01 μM až 5 μM , měřeno způsobem čištěné proteázy. Vynález odděleně navrhuje absorpční prostředek, který obsahuje inhibitor proteázy, jenž má IC_{50} 90 μM nebo méně, obvykle 0,00001 μM až 90 μM , lépe 0,0001 μM až 30 μM , ještě lépe 0,001 μM až 10 μM a nejlépe 0,01 μM až 5 μM , měřeno způsobem specifické proteázy stolice. Vynález dále navrhuje absorpční prostředek, který obsahuje inhibitor proteázy nebo směs inhibitorů proteáz, jenž má IC_{50} nižší než 500 μM , lépe nižší než 300 μM a nejlépe nižší než 100 μM , měřeno způsobem obecné proteázy stolice. V kontextu tohoto vynálezu, se pod výrazem "upravený prostředek", rozumí absorpční prostředek obsahující inhibitor proteázy. V jednom z provedení tohoto vynálezu, je inhibitor proteázy okamžitě dostupný, popř. je schopen přenosu, v části absorpčního prostředku, která může přijít do styku se stolicí, především vodnatou stolicí tak, aby mohl přímo inhibovat aktivitu proteáz. Jak bude zmíněno níže, může být inhibitor v aktivní formě nebo může být inaktivní, ale aktivovatelný, např. vnějším zdrojem, jakým je vlhkost moče nebo stolice.

V dalším provedení vynálezu, zahrnuje absorpční prostředek distribuční systém obsahující inhibitor proteázy, jenž automaticky přenáší účinné množství inhibitoru, aspoň na část kůže uživatele, během nošení prostředku. Při použití nebo opakovaném užívání podobných prostředků, které mají distribuční systém s inhibitorem proteázy, se automaticky přenáší dostatečné množství inhibitoru proteázy do zvolených oblastí kůže uživatele, před kontaktem se stolicí, čímž se vytváří proaktivní ochrana proti průniku proteáz stolice a jejich aktivitě.

Existuje přesvědčení, že proteázy stolice štěpí proteiny přítomné ve stratum corneum (vnější bariérová vrstva) kůže, což má za následek tvorbu cytokinů keratinocyty a aktivaci kaskády zánětlivých odpovědí, která vytváří příznaky plenkové vyrážky. Jak je zde předvedeno, mají látky inhibující proteázy, které jsou použity v absorpčních prostředcích navrhovaného vynálezu, překvapivou schopnost inhibovat indukci tvorby cytokinů keratinocyty za přítomnosti stolice, což je způsobeno přímou interakcí inhibitor – enzym. Domníváme se, že přítomnost inhibitoru proteázy, který splňuje podmínku pro IC_{50} popsanou výše, jenž je v kontaktu se stolicí uvnitř prostředku nebo na rozhraní kůže/stolice, snižuje nebo zabraňuje vzniku prvotní ataky proteázy stolice na stratum corneum. A proto je absorpční prostředek obsahující inhibitor proteázy nebo distribuční systém, který přenáší inhibitor proteázy v účinném množství přímo na kůži, užitečný při léčbě a/nebo prevenci plenkové dermatitidy.

Je dobře známo, že jednou z nejdůležitějších funkcí kůže, je působit jako bariéra proti úniku fyziologických tekutin, elektrolytů a dalších složek, stejně tak, jako působit jako bariéra proti průniku

mikrobů, toxinů a dalších zánětlivých nebo škodlivých látek. Ve světle nálezů, že proteázy stolice významně přispívají ke vzniku plenkové dermatitidy, je pravděpodobné, že kromě dráždění kůže natrávením stratum corneum, dochází v důsledku poškození bariéry, k průniku dalších složek moče a stolice, čpavku, mastných kyselin apod., které by samy dráždivě nepůsobily, a tím ke vzniku dalšího podráždění. *Candida albicans*, která vytváří aspartyl proteázu, se například často nachází jako hlavní složka stolice u osob léčených antibiotiky. Této kvasince se dobře daří ve vlhkém prostředí špinavých plenek a, pokud je kůže porušena, může aspartyl proteáza přispět k dalšímu poškození kůže nebo se dokonce může rozvinout vážná kandidová infekce. A proto pomáhá příměs inhibitorů proteáz v absorpčních prostředcích, udržovat integritu bariéry stratum corneum a účinně bránit výskytu druhotného podráždění a/nebo infekce, která přispívá k plenkové dermatitidě.

III. Inhibitory proteáz

Proteáza je běžný výraz, který reprezentuje skupinu proteolytických enzymů, které jsou schopné dělit proteiny a peptidy na fragmenty štěpením nebo hydrolýzou peptidových vazeb. Proteázy mohou být dále rozděleny na proteinázy (endopeptidázy) a peptidázy (exopeptidázy). Peptidázy působí na peptidovou vazbu v blízkosti volné amino- nebo karboxyskupiny na konci proteinu a tím štěpí protein. Hlavními typy peptidáz jsou karboxypeptidázy, dipeptidázy a aminopeptidázy. Proteinázy působí na specifické vnitřní peptidové vazby proteinů a mohou být rozděleny do čtyř skupin, tj. serinové proteázy, metaloproteázy, cysteinové proteázy a aspartyl proteázy. Mezi hlavní proteinázy patří trypsin a chymotrypsin. Protože jsou proteázy široce zastoupeny v rostlinách,

půdě, baktériích, mléku, mléčných výrobcích a téměř všech zvířecích tkáních, stejně tak, jako trávicích šťávách gastrointestinálního traktu, jsou téměř vždy přítomny v oblasti plenky, která byla znečištěna tělními výměšky. Každý z inhibitorů proteáz, který je přítomen v absorpčních prostředcích vynálezu, je chemickou látkou, která splňuje nejméně jedno ze sedmi kritérií pro IC_{50} popsaných výše a vratně nebo nevratně inhibuje hydrolytický účinek jedné nebo více proteáz, zastoupených v předcházejících podtřídách proteáz, jenž se běžně nachází v lidské stolici, stejně tak, jako proteáz, jejichž substrátová specifita nebyla ještě určena.

Mezi inhibitory proteáz, které mohou být použity v provedeních tohoto vynálezu, patří všechny přirozeně se vyskytující inhibitory rostlinného, mikrobiálního a/nebo zvířecího původu (včetně lidského) a synteticky připravené chemické inhibitory, které splňují kritéria pro IC_{50} popsaná výše. Příklady inhibitorů proteáz, která splňují kritéria pro IC_{50} a inhibují typ proteázy uvedený v závorce jsou, mimo jiné, inhibitor trypsinu ze sóji a další inhibitory trypsinu rostlinného původu, jako např. inhibitor proteázy z limské fazole (*Phaseolus limensis*), inhibitor proteázy z kukuřice apod, Bowman-Birkův inhibitor (inhibitor serinové a trypsinu podobné proteázy), inhibitor slinivkového trypsinu, jako např. inhibitor hovězího slinivkového zásaditého trypsinu a další inhibitory slinivkových trypsinů získané ze zvířat, inhibitor trypsinu vaječného bílku (inhibitor serinové a trypsinu podobné proteázy), ovomukoidy obsahující ovoinhibitory, jako např. z vaječného bílku kuřete nebo krocana (inhibitory trypsinu a chymotrypsinu), chymostatin (inhibitor serinové a chymotrypsinu podobné proteázy), aprotinin (inhibitor serinové proteázy); leupeptin a jeho analoga, jako např. propionyl-leupeptin, N- α -t-BOC-deacetyl-leupeptin (inhibitor

serinové a cysteinové proteázy), bestatin a jeho analoga, jako např. epibestatin a nitrobestatin (inhibitory aminopeptidázy a metaloproteázy), amastatin a jeho analoga, jako např. epiamastatin (inhibitor aminopeptidázy), antipain (trypsinový inhibitor), antitrombin III (inhibitor serinové proteázy), hirudin (inhibitor trombinu podobné serinové proteázy), cystatin (inhibitor cysteinové proteázy vaječného bílku), E-64 (trans-epoxysukcinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)-butan) a jeho analoga (inhibitor cysteinové proteázy), α_2 -makroglobulin (univerzální inhibitor endoproteáz), α_1 -antitrypsin (trypsinový inhibitor), pepstatin a jeho analoga, jako např. acetylpepstatin, pepstatin A, Nle-Sta-Ala-Sta (inhibitor aspartylproteázy), apstatin (inhibitor aminopeptidázy P), (2R)-2-merkaptomethyl-4-methylpentanoyl-b-(2-naftyl)-Ala-Ala amid (inhibitor matrix metaloproteázy), (2R)-2-merkaptomethyl-4-methyl-pentanoyl-Phe-Ala amid (inhibitor matrix metaloproteázy), N-acetyl-Leu-Leu-methioninal (inhibitor calpainu), N-acetyl-Leu-Leu-norleucinal (inhibitor calpainu), p-aminobenzoyl-Gly-Pro-D-Leu-D-Ala hydroxamová kyselina (inhibitor matrix metaloproteázy); 2(R)-(N-(4-methoxyfenylsulfonyl)-N-(3-pyridylmethyl)amino)-3-methyl-butano-hydroxamová kyselina (inhibitor metaloproteázy), 4-(2-aminoethyl)-benzensulfonylfluorid hydrochlorid (širokospektrý inhibitor/inhibitor obecné proteázy) a směsi výše uvedených.

Pro použití v absorpčních prostředcích tohoto vynálezu, dáváme přednost inhibitorům proteázy, která mají inhibiční účinek, který není omezen pouze na jednu třídu proteáz. Mezi takové sloučeniny patří, mimo jiné, hexamidin a jeho soli, pentamidin a jeho soli, benzamidin a jeho soli a deriváty, p-aminobenzamidin a jeho soli a deriváty a guanidinbenzoová kyselina a její soli a deriváty, jako ty popsané v patentu USA 5 376 655 podaném Imaki

et al. 27. 12. 1994, jenž je zde zahrnut odkazem. Dalšími navrhovanými inhibitory proteáz, jsou polymerové deriváty guanidinbenzoové kyseliny, popsané v právě projednávané přihlášce vynálezu USA 09/041 196 (T. L. Underiner et al.), která byla podána současně s touto přihláškou.

Inhibitory proteáz mohou být, v absorpčním prostředí, použity samostatně nebo ve směsích, jako "koktejly" inhibitorů. Dále mohou být různé inhibitory proteáz použity, v různých částech absorpčního prostředí.

Kvůli široké škále enzymů přítomných ve stolici, se dá předpokládat, že látky, jako ty popsané výše, které inhibují proteázy stolice, budou také inhibovat enzymy, které štěpí jiné substráty než proteiny a peptidy. A proto do rozsahu provedení tohoto vynálezu, patří také inhibitory proteáz, které inhibují lipázy a jiné esterázy, amylázy a/nebo ureázy, pokud tyto inhibitory splňují kritéria pro IC₅₀ popsaná výše.

Inhibitory proteáz, kterým se v tomto vynálezu dává přednost, jsou inhibitor trypsinu ze sóji, Bowman-Birkův inhibitor, aprotinin, hexamidin (např. hexamidin diisethionát), p-aminobenzamidin, leupeptin, pepstatin A, chymostatin a polymerové deriváty kyseliny guanidinbenzoové (popsané v přihlášce USA 09/041 196). Nejvhodnějšími inhibitory proteáz jsou inhibitor trypsinu ze sóji, hexamidin, p-aminobenzamidin a polymerové deriváty kyseliny guanidinbenzoové.

IV. Absorpční prostředky

Výraz „absorpční prostředek“, je zde použit pro výrobek, který absorbuje a zadržuje tělní výměšky. Výraz „pro jedno použití“, je zde použit při popisu absorpčního prostředku, u kterého se nezvažuje jeho přepírání nebo jiné uvádění do původního stavu nebo jeho opakované použití. Příklady absorpčních prostředků pro jedno použití, jsou dámské hygienické potřeby, jako např. zdravotnické utěrky, menstruační vložky a tampony, plenky, podložky a polštářky pro inkontinenci, cvičební kalhotky apod.

Inhibitory proteáz mohou být obsaženy, v jakékoliv části nebo částech, některého z absorpčních prostředků, zde popsaných. Distribuční systémy inhibitorů proteáz jsou součástí absorpčních prostředků a budou popsány odděleně.

Typický absorpční prostředek, na jedno použití, se skládá z vrchní pro kapalinu propustné vrstvy, ze spodní nepropustné vrstvy a absorpčního jádra umístěného mezi vrchní a spodní vrstvou. Absorpční prostředky pro jedno použití a jejich součásti, včetně vrchní vrstvy, spodní vrstvy, absorpčního jádra a kterékoli jednotlivé vrstvy těchto částí, mají povrch, který přiléhá na tělo a povrch, který přiléhá na oděv. Zde použitý výraz „povrch přiléhající k tělu“ znamená, že tento povrch prostředku nebo jeho část má být nošena směrem k tělu uživatele, zatímco „povrch přiléhající k oděvu“ je na protilehlé straně a měl by být nošen směrem k oděvu.

Následující část popisuje obecně materiály pro absorpční jádro, vrchní vrstvu a spodní vrstvu, které jsou vhodné pro absorpční prostředky na jedno použití. Tento obecný popis se vztahuje na části specifického absorpčního prostředku, zobrazeného na obrázku 1 a

popsaného níže, vedle dalších absorpčních prostředků, které jsou zde popsány obecně.

Absorpční jádro je obvykle schopné absorbovat nebo udržovat tekutiny (např. krev, moč a/nebo jiné tělní výměšky). Absorpční jádro je zpravidla stlačitelné, tvarovatelné a nedráždí kůži uživatele. Absorpční jádro může být vyráběno v řadě velikostí a tvarů (např. obdélníkový, oválný, tvar přesýpacích hodin, tvar „T“, tvar psí kosti, asymetrický atd.). Navíc může absorpční jádro, mimo absorpční složky, obsahovat také některý z široké řady materiálů absorbujících tekutiny, jako např. buničinu. Příklady dalších vhodných absorpčních materiálů používaných pro absorpční jádro jsou celulózová vata, směsné polymery jako koform, chemicky zpevněná, upravená nebo křížem provázaná celulózová vlákna, syntetická vlákna, jako např. zvlněná vlákna polyesteru, rašelina, vrstvený papír, absorpční pěny, absorpční houbovité materiály, superabsorpční polymery včetně kompozitů, absorpční gelové materiály nebo nějaký podobný materiál, kombinace materiálů nebo jejich směsi.

Uspořádání a konstrukce absorpčního jádra mohou být různé (např. absorpční jádro může mít různé obkročné zóny a/nebo profil, který je silnější ve středu, hydrofilní gradienty, gradienty absorpčních složek, superabsorpční gradienty nebo oblasti s nižší průměrnou hustotou nebo nižší průměrnou hmotností základny, např. příjmové oblasti nebo může být složeno z jedné nebo více vrstev nebo struktur). Celková absorpční kapacita absorpčního jádra by však měla odpovídat navrhovanému zatížení a předpokládanému použití absorpčního prostředku. Dále musí být velikost a absorpční kapacita absorpčního jádra přiměřená pro různá použití, jako jsou

plenky, inkontinenční polštářky, menstruační vložky, zdravotnické pleny a musí být přizpůsobena řadě uživatelů od dětí až k dospělým. Absorpční jádro může také obsahovat další absorpční složky, které jsou často používány v absorpčních prostředcích, např. zásypovou vrstvu, sací vrstvu pro udržení moči nebo další vrchní vrstvu pro zvýšení komfortu uživatele.

Vrchní vrstva je obvykle poddajná, měkká a nedráždí kůži uživatele. Dále je vrchní vrstva propustná pro kapaliny, umožňuje kapalinám (např. krev a/nebo moč) jí snadno prostupovat. Vhodná vrchní vrstva může být vyrobena z řady materiálů, např. vlněných a nevlněných materiálů (např. netkaná síť vláken), včetně nevlněných materiálů s otvory; polymerů, jako např. porézního termoplastického filmu, porézního plastického filmu a hydroformních termoplastických filmů; porézní pěny; síťované pěny; síťovaných termoplastických filmů a termoplastických skrimů. Vhodnými vlněnými a nevlněnými materiály jsou přírodní vlákna (např. vlákna ze dřeva nebo bavlny), syntetická vlákna (např. polymerová vlákna, jako např. polyesterová, polypropylenová nebo polyethylenová vlákna) nebo materiály vytvořené kombinací přírodních a syntetických vláken. Pokud je vrchní vrstva z nevlněného materiálu, tak může být materiál zpracován řadou známých technik. Síť může být vyrobena například spřádáním, mykáním, vyfoukáním za tepla, vlhkým spletením, tvarováním za vlhka, kombinací výše zmíněného nebo podobně. Vrchní vrstva by měla obsahovat dermatologickou složku s inhibitorem enzymů, bez ohledu na to, zda je vyrobena z vlněného nebo nevlněného materiálu, viz. níže.

Spodní vrstva je pro kapaliny nepropustná (např. krev a/nebo moč) a zpravidla obsahuje tenkou plastovou vrstvu, ačkoliv mohou

být použity i jiné nepropustné flexibilní materiály. Výraz „flexibilní“ je použit pro materiály, které jsou poddajné a snadno mění tvar podle tvaru a křivek lidského těla. Spodní vrstva brání výměškům absorbovaným a zadržovaným v absorpčním jádru v namočení věcí, které jsou v kontaktu s absorpčním prostředkem, jako např. prostěradlo, spodky, pyžamo a spodní oblečení. Spodní vrstva může tedy obsahovat vlněný či nevlněný materiál, polymerový povlak, jako např. termoplastickou vrstvu polyethylenu nebo polypropylenu nebo kompozitní materiály, jako např. potažený nevlněný materiál. Vhodnou spodní vrstvou je polyethylenový film o tloušťce od 0,012 mm do asi 0,051 mm. Vhodné polyethylenové filmy jsou vyráběny firmou Clopay Corporation of Cincinnati, Ohio, pod označením P18-1401 a Tredegar Film Products of Terre Haute, Indiana, pod označením XP-39385. Spodní vrstva je zpravidla vypouklá a/nebo matně opracována, aby měla vzhled textilu. Dále by měla být spodní vrstva prostupná pro výpary z absorpčního jádra (tz. že spodní vrstva je prodyšná), přestože je nepropustná. Velikost spodní vrstvy je určena velikostí absorpčního jádra a jeho zvoleným tvarem.

Spodní vrstva a vrchní vrstva jsou umístěny, v daném pořadí, vedle povrchu absorpčního jádra přiloženého k oděvu a k tělu. Absorpční jádro je zpravidla spojeno s vrchní vrstvou, spodní vrstvou nebo s oběmi vrstvami některým z upínacích prvků (nezobrazeny na obrázku 1), které jsou běžně používány v oboru. Avšak provedení absorpčního prostředku mohou být patrná, pokud částí nebo celé absorpční jádro není připevněno buď k vrchní nebo spodní vrstvě nebo k oběma vrstvám.

Spodní vrstva a/nebo vrchní vrstva mohou být připevněny k absorpčnímu jádru nebo navzájem souvislou vrstvou lepidla, vzorkovou vrstvou lepidla nebo řadou jednotlivých linek, spirál nebo bodů lepidla. Vhodná lepidla jsou vyráběna H.B. Fuller Company v St. Paul v Minnesotě pod označením HL-1258 nebo H-2031. Spojovací prostředky nejlépe vytvoří síť vláken lepidla popsaná v patentu USA 4 573 986 podaném Minetolou et al. 4. 3. 1986, jenž je zde zahrnut odkazem. Příkladem způsobu spojení je síť vláken tvořená několika adhezivními čarami stočenými do spirály, který je popsán v patentu USA 3 911 173 podaným Sprague, Jr. 7. 10. 1975, patentu USA 4 785 996 podaným Zwieker et al. 22. 11. 1978 a patentu USA 4 482 666 podaným Werenicz 27. 6. 1989. Každý z těchto patentů je zde zahrnut odkazem. Jako spojovací prostředky mohou být použity také tepelné spoje, tlakové spoje, ultrazvukové spoje, dynamické mechanické spoje nebo jiné vhodné spojovací prostředky nebo jejich kombinace známé v oboru.

Navrhovaným absorpčním prostředkem na jedno použití je plenka, jenž obsahuje aspoň v jedné části inhibitor proteázy a/nebo distribuční systém s inhibitorem proteázy a její povrch dotýkající se uživatele, je ošetřen dermatologickou složkou s obsahem inhibitoru enzymu. Zde použitý výraz "plenka", znamená absorpční prostředek, který je zpravidla používán dětmi a inkontinentními osobami a který se nosí kolem dolní části trupu. Jinými slovy, výraz "plenka", zahrnuje dětské plenky, tréninkové kalhotky, inkontinenční prostředky pro dospělé apod.

Na obrázku 1 je nákres plenky 50, která je zobrazena v roztaženém stavu (tj. není stažena elastickými částmi) a bez některých částí tak, aby byla dobře vidět její konstrukce a je otočena svým

vnějším povrchem směrem k pozorovateli. Plenka 50 z obrázku 1 je obvykle složena z propustné vrchní vrstvy 520, nepropustné spodní vrstvy 530 spojené s vrchní vrstvou 520, absorpčního jádra 540, které má povrch přivrácený k oděvu 542, povrch přivrácený k tělu 544, boční okraj 546, pásové okraje 548 a ouška 549. Plenka 50 obvykle dále obsahuje elastické stehenní manžety 550 a různě tvarovanou elastickou pásovou část 560 a zpravidla různě tvarované upínací prostředky 570.

Plenka 50 znázorněná na obrázku 1 má vnější povrch 52, vnitřní povrch 54, který odpovídá povrchu přivrácenému k tělu, jenž je protilehlý vnějšímu povrchu 52, první pásovou oblast 56, druhou pásovou oblast 58 a obvod 51, který je určen vnějšími okraji plenky 50, kde jsou podélné okraje označeny 55 a koncové okraje 57. (V oboru se obvykle používá dělení plenky na dvě pásové oblasti a oblast rozkroku, která je umístěna mezi nimi, ale v této aplikaci je pro zjednodušení použito pouze dělení plenky 50 na pásové oblasti obsahující původní oblast rozkroku). Povrch přivrácený k tělu 54 plenky 50 je tou částí plenky 50, která přiléhá k tělu uživatele během nošení. Povrch přivrácený k tělu 54 je zpravidla tvořen aspoň částí vrchní vrstvy 520 a dalšími částmi, které mohou být připojeny k vrchní vrstvě 520, jako např. stehenní manžety 550, stejně tak jako oblastmi, které nepatří k vrchní vrstvě, ale které se dotýkají uživatele, jako např. pásová část 560, boční části apod. Vnější povrch 52 zahrnuje část plenky 50, která je odvrácená od těla uživatele (tj. vnější povrch 52 je zpravidla tvořen aspoň částí spodní vrstvy 530 a dalšími částmi, které k ní mohou být připojeny). První pásová oblast 56 a druhá pásová oblast 58 se rozprostírají mezi koncovými okraji 57 obvodu 51 a příčnou středovou čarou 53

plenky 50. Na obrázku 1 je také znázorněna podélná středová čára 59.

Obrázek 1 představuje navrhované provedení plenky 50 v kterém mají vrchní vrstva 520 a spodní vrstva 530 délku a šířku větší než jsou rozměry absorpčního jádra 540. Elastické stehenní manžety 550 a spodní vrstva 530 přesahují okraje absorpčního jádra 540, čímž vytváří obvod 51 plenky 50.

Plenky uvedeného vynálezu mohou být vyrobeny v řadě známých provedení, v kterých jsou absorpční jádra přizpůsobena navrhovanému vynálezu. Příklady provedení jsou obecně popsány v patentu USA 3 860 003 (Buell) podaném 14. 1. 1975, patentu USA 5 151 092 (Buell et al.) 29. 9. 1992 a patentu USA 5 221 274 (Buell et al.) 22. 1. 1993. Všechny tyto patenty jsou zde zahrnuty odkazem. Další provedení plenky, kterému může být navrhovaný vynález snadno přizpůsoben, je popsáno v patentu USA 5 554 145 podaném Roe et al., jehož popis je zde zahrnut odkazem.

Vrchní vrstva 520, která je obzvláště vhodná pro použití v plence 50, je mykaná a tepelně spojená způsobem běžným v oboru. Přijatelná vrchní vrstva, je složena z dlouhých polypropylenových vláken, které mají denier asi 2,2. Zde použitý výraz "dlouhá vlákna", představuje ta vlákna, která mají délku aspoň 15,9 mm. Hmotnost vrchní vrstvy by měla být od asi 14 do asi 25 gramů na metr čtvereční. Vhodná vrchní vrstva je vyráběna firmou Veratec, Inc., Division of International Paper Company, Mass. pod označením P-8.

Vrchní vrstva 520 plenky 50 se obvykle vyrábí z hydrofilní látky, která usnadní rychlý průchod tekutiny (např. moče) skrz vrchní vrstvu. Pokud je vrchní vrstva vyrobena z hydrofobní látky, musí být aspoň části vrchní vrstvy upraveny tak, aby byly hydrofilní a umožnily tekutinám rychlý průchod skrz vrchní vrstvu. To sníží pravděpodobnost, že tělní výměšky odtečou z vrchní vrstvy, místo toho, aby byly nasáty z vrchní vrstvy absorpčním jádrem. Vrchní vrstva se může stát hydrofilní po impregnaci surfaktantem. Mezi vhodné způsoby impregnace surfaktantem patří nastříkání surfaktantu na vrchní látku a ponoření látky do surfaktantu. Podrobnější popis takové úpravy a hydrofility je uveden v patentu USA 4 988 344 a 4 988 345, které byly oba podány Reising et al. 29. 1. 1991, jenž jsou zde zahrnuty odkazem.

Vrchní vrstva může být také ve formě filmu s otvory, které se dává přednost v dámských hygienických absorpčních prostředcích. Filmy s otvory jsou vhodné, protože jsou propustné pro tělní tekutiny, ale nesají a mají menší tendenci k zpětnému toku tekutiny s následným namočením kůže. To znamená, že povrch filmu, který se dotýká těla zůstává suchý, čímž snižuje znečištění těla a vytváří lepší pocit uživatele. Vhodné filmy jsou popsány v patentu USA 3 929 135 (Thompson) podaném 30. 12. 1975, patentu USA 4 324 246 (Mullane et al.) podaném 13. 4. 1982, patentu USA 4 342 314 (Radel et al.) 3. 8. 1982, patentu USA 4 463 045 (Ahr et al.) podaném 31. 7. 1984 a patentu USA 5 006 394 (Baird) podaném 9. 4. 1991. Každý z těchto patentů je zde zahrnut odkazem. Doporučené filmy s mikrootvory pro vrchní vrstvy jsou popsány v patentu USA 4 609 518 (Curro et al.) podaném 2. 9. 1986 a patentu USA 4 629 643 (Curro et al.) podaném 16. 12. 1986, jenž jsou zde zahrnuty odkazem. Navrhovaná vrchní vrstva pro použití v

dámských hygienických prostředcích je film popsáný v jednom nebo ve více výše zmíněných patentech a uváděný na trh The Procter & Gamble Company of Cincinnati, Ohio pod označením "DRIWEAWE®".

Povrch filmu přiléhající k tělu může být hydrofilní, což umožní tělním tekutinám prostupovat skrz vrchní vrstvu rychleji, než kdyby hydrofilní nebyl, čímž se snižuje pravděpodobnost, že tekutina odteče z vrchní vrstvy místo toho, aby byla absorbována. V navrhovaném provedení je surfaktant začleněn do polymerní látky filmu vrchní vrstvy tak, jak je popsáno v U.S. Statutory Invention Registration No. H1670 (Aziz et al.) vydaném 1. 7. 1997, jenž je zde zahrnuta odkazem. V dalších provedeních (nezobrazeny) navrhovaného vynálezu může být absorpční prostředek vybaven doplňky zlepšujícími kontakt mezi vrchní vrstvou a kůží uživatele. V jednom provedení je absorpční prostředek vybaven elastickými částmi, jenž je popsáno v patentu USA 4 892 536 (DesMarais et al.) 9. 1. 1990, v patentu USA 4 990 147 (Freeland) 5. 2. 1991 a patentu USA 07 993 198 (Freeland et al.) 18. 12. 1992, které zdvihají vrchní vrstvu, čímž zlepšují kontakt s perianální oblastí uživatele. V jiném provedení, které je popsáno v patentu USA 5 171 236 (Drier et al.) podaném 15. 12. 1992, je plenka opatřena řadou spojů, který zdvihají vrchní vrstvu. V ještě jiném provedení, které je popsáno v U.S. Statutory Invention Registration H1687, podané na jméno Roe et al 7. 10. 1997, je absorpční prostředek opatřen hýžd'ovou ochrannou částí, která vyzdvihuje vrchní vrstvu do hýžd'ové rýhy uživatele.

V navrhovaném provedení plenky, které je zde popsáno, má spodní vrstva 530 tvar přesýpacích hodin a přesahuje absorpční jádro nejméně o 1,3 cm až 6,4 cm po celém obvodu plenky.

Absorpční jádro 540 může mít jakoukoliv velikost nebo tvar, který je slučitelný s plenkou 50. Jedno navrhované provedení plenky 50 má asymetrické absorpční jádro 540 tvaru T s oušky v první pásové oblasti, ale zpravidla pravoúhlý tvar v druhé pásové oblasti. Příklady absorpčních látek, které se dají použít pro vytvoření absorpčních jader prostředků jsou popsány např. v patentu USA 4 610 678 (Weisman et al.) podaném 9. 9. 1986, patentu USA 4 673 402 (Weisman et al.) podaném 16. 6. 1987, patentu USA 4 888 231 (Angstadt) 19. 12. 1989 a patentu USA 4 834 735 (Alemany et al.) podaný 30. 5. 1989. Absorpční jádro může dále obsahovat systém dvojího absorpčního jádra složený z absorpčního/distribučního jádra z chemicky ztužených vláken, které je umístěno nad absorpční retenční jádro, tento systém je podrobněji popsán v patentu USA 5 234 423 (Alemany et al.) podaném 10. 8. 1993 a patentu USA 5 147 345 (Young, LaVon a Taylor) podaném 15. 9. 1992. Všechny tyto patenty jsou zde zahrnuty odkazem.

V navrhovaném provedení obsahuje plenka 50 dále elastické stehenní manžety 550 pro zajištění lepšího držení tekutin a tělních výměšků, elastickou pásovou část 560 zaručující lepší přilnutí a držení a upínací prostředky 570, které vytváří boční spojení, které udržuje první pásovou oblast 56 a druhou pásovou oblast 58 tak, aby se překrývaly, čímž vzniká po obvodu plenky boční tah, který udržuje plenku na uživateli. Plenka 50 může také obsahovat, v pásové oblasti 56 a 58, elastické pásové pruhy (nezobrazeny) a/nebo

elastické boční úseky (také nezobrazeny), které zajistí větší komfort a přilnutí a také účinnější použití plenky 50.

Elastické stehenní manžety 550 mohou mít řadu různých provedení, včetně těch popsanych v patentu USA 3 860 003, patentu USA 4 909 803 (Aziz et al.) podaný 20. 3. 1990, patentu USA 4 695 278 (Lawson) podaný 22. 9. 1987 a patentu USA 4 795 454 (Dragoo) podaný 3. 1. 1989, jejichž popisy jsou zde zahrnuty odkazem. Absorpční prostředky, které mají elastické manžety ošetřené složkou, která by zde mohla být užitečná, jsou popsány v přihláškách vynálezů USA 08/766 386 a 08/840 039 postoupené 3. 12. 1996 a 24. 4. 1997, jenž jsou zde zahrnuty odkazem.

Elastický pásový prvek je složený z elastického pásového pruhu (nezobrazen), který může být vytvořen v řadě rozdílných provedení, včetně těch popsanych v patentu USA 4 515 595 (Kievit et al.) podaném 7. 5. 1985, patentu USA 5 026 364 (Robertson) podaném 25. 6. 1991 a výše zmíněném patentu USA 5 151 092 (Buell et al.) podaném 29. 9. 1992, jejichž popisy jsou zde zahrnuty odkazem.

Elastické boční úseky mohou být vytvořeny v řadě různých provedení. Příklady plenek s elastickými bočními úseky umístěnými do oušek plenky jsou uvedeny v patentu USA 4 857 067 (Wood et al.) podaném 15. 8. 1989, patentu USA 4 383 781 (Sciaraffa et al.) podaném 3. 3. 1983, patentu USA 4 938 753 (Van Gompel et al.) podaném 3. 7. 1990 a patentu USA 5 151 092 (Buell et al.) podaném 29. 9. 1992, jenž jsou zde zahrnuty odkazem.

Příklady upínacích prostředků 570 jsou popsány v patentu USA 4 846 815 (Scripps) 11. 7. 1989, patentu USA 4 894 060 (Nestegard)

podaném 16. 1. 1990, patentu USA 4 946 527 (Battrell) podaném 7. 8. 1990, patentu USA 3 848 594 (Buell) podaném 19. 11. 1974, patentu USA 4 662 875 (Hirotsu et al.) podaném 5. 5. 1987 a patentu USA 5 151 092 (Buell et al.) podaném 29. 9. 1992, jejich popisy jsou zde zahrnuty odkazem.

Plenka 50 se zpravidla aplikuje tak, že se jedna z pásových oblastí plenky, nejlépe druhá pásová oblast 58, přiloží na záda uživatele a zbytek plenky se protáhne mezi nohama uživatele tak, že se druhá pásová oblast, nejlépe pásová oblast 56, přiloží vpředu. Potom jsou použity upínací prostředky k zajištění plenky po bocích.

Je samozřejmé, že inhibitor proteázy a/nebo distribuční systém přenášející inhibitor na kůži, během nošení prostředku, mohou být použity v jakémkoliv typu absorpčního prostředku. Výše uvedený popis má tedy pouze ilustrační účel.

Navrhovaný vynález, může také využívat, tréninkové kalhotky jako absorpční prostředek obsahující inhibitor proteázy. Zde použitý výraz "tréninkové kalhotky", se vztahuje na oděv na jedno použití, který má pevné boční části a otvory pro nohy a je přizpůsobený pro děti nebo dospělé. Tréninkové kalhotky se oblékají tak, že uživatel prostrčí nohy do otvorů pro nohy a kalhotky se natáhnou k dolní části trupu uživatele. Vhodné tréninkové kalhotky jsou popsány v patentu USA 5 246 433 (Hasse et al.) podaném 21. 9. 1993, patentu USA 5 569 234 (Buell et al.) podaném 29. 10. 1996, patentu USA 4 940 464 (Van Gompel et al.) podaném 10. 7. 1990 a patentu USA 5 092 861 (Nomura et al.) podaném 3. 3. 1992, jejichž popisy jsou zde zahrnuty odkazem.

Dalšími absorpčními prostředky na jedno použití, které je možno použít v navrhovaném vynálezu, jsou inkontinenční prostředky. Výraz "inkontinenční prostředek" je použit pro podložky, spodní prádlo, vložky pro absorpční prostředky, postelové vložky a podobně, nezávisle na tom, zda jsou používány dospělými nebo jinými inkontinentními osobami. Vhodné prostředky pro inkontinenci jsou popsány v U.S. 4 253 461 (Strickland et al.) podaném 3. 3. 1981, U.S. 4 597 760 a 4 597 761 (Buell), výše zmíněný U.S. 4 704 115, U.S. 4 909 802 (Ahr et al.), U.S. 4 964 860 (Gipson et al.) podaný 23. 10. 1990 a v U.S. 5 304 161 (Noel et al.) podaném 19. 4. 1994. Popisy těchto patentů jsou zde zahrnuty odkazem.

Dalšími absorpčními prostředky na jedno použití, které je možno použít v navrhovaném vynálezu, jsou dámské hygienické prostředky, jako např. menstruační vložka. Vhodné dámské hygienické prostředky jsou popsány v patentu USA 4 556 146 (Swanson et al.) podaném 3. 12. 1985, patentu USA 4 589 876 (Van Tilberg) podaném 27. 4. 1993, patentu USA 4 687 478 (Van Tilburg) podaném 18. 8. 1997, patentu USA 4 950 264 (Osborn) podaném 21. 8. 1990, patentu USA 5 009 653 (Osborn) podaném 23. 4. 1991, patentu USA 5 267 992 (Van Tilburg) podaném 7. 12. 1993, patentu USA 5 389 094 (Lavash et al.) podaném 14. 2. 1995, v patentu USA 5 413 568 (Roach et al.) podaném 9. 5. 1995, patentu USA 5 460 623 (Emenaker et al.) podaném 24. 10. 1995, patentu USA 5 489 283 (Van Tilburg) podaném 6. 2. 1996, patentu USA 5 569 231 (Emenaker et al.) podaném 29. 10. 1996 a patentu USA 5 620 430 (Bamber) podaném 15. 4. 1997. Popisy těchto patentů jsou zde zahrnuty odkazem.

V. Testování inhibice proteáz

Standardní testy enzymové aktivity *in vitro* a inhibice enzymové aktivity, jsou dobře známy. Činidla k provádění těchto testů jsou běžně komerčně dostupná. Jedná se o jednoduchý systém, složený ze substrátu specifického pro enzym, který po hydrolýze enzymem vytváří barevný produkt. Aktivita enzymu se měří spektrofotometricky jako stupeň vývoje barevného produktu (tj. úroveň barevné změny) za určený časový úsek. Inhibice enzymové aktivity se projeví, jako měřitelné snížení úrovně barevné změny, za stejný časový úsek, za přítomnosti inhibitoru.

U testu čištěné proteázy a testů proteázy ze stolice, popsané níže, může být stanoveno, IC_{50} každého testovaného inhibitoru podle následující rovnice:

$$IC_{50} = (I)/((v/v_i)-1))$$

kde (I) je koncentrace testovaného inhibitoru, v je úroveň štěpení substrátu za nepřítomnosti inhibitoru a v_i je úroveň štěpení substrátu za přítomnosti inhibitoru.

Následující testy čištěné proteázy a proteáz stolice, jsou použity pro určení inhibiční aktivity domnělých inhibitorů proteáz proti a) čištěným proteázám přítomným ve stolici a b) proteázové aktivitě samotné stolice. Všechny látky, které splňují kritéria pro IC_{50} , v některém z následujících testů, se považují za inhibitory proteáz. V těchto testech, se měří v a v_i , jako změna absorbance (optické hustoty, OH) při dané vlnové délce/čas (např. minuty).

A. Testování čištěných proteáz

1. Čištěný Trypsin

Pro testování účinnosti inhibitorů proteáz, proti čištěnému trypsinu, se vloží do mikrokvyvety 0,05 ml předpokládaného inhibitoru a 0,125 ml 32 nM trypsinu (např. Sigma, St. Louis, MO, kat. číslo T6424) v trypsinovém pufru (50 mM TRIS, 20 mM CaCl_2 , pH 8,2). Kyveta se nechá inkubovat při 25°C asi 10 minut. K této směsi se do kyvety přidá 0,025 ml substrátu (4 mM Cbz-arginin-p-nitroanilid, např. Sigma, St. Louis, MO, kat. číslo C4893) v trypsinovém pufru, vše se promíchá, a po 10 minutách se měří absorbance při 25°C v 405 nm. Úroveň štěpení substrátu za přítomnosti inhibitoru (v_i) je sklon křivky absorbance při 405 nm vzhledem k času. Stejný postup se opakuje bez přidání domnělého inhibitoru. Úroveň štěpení substrátu, za nepřítomnosti inhibitoru (v), je sklon křivky absorbance při 405 nm vzhledem k času. Hodnoty v_i a v a koncentrace inhibitoru (I) jsou použity pro vypočítání IC_{50} podle výše uvedené rovnice.

2. Čištěný chymotrypsin

Pro testování účinnosti inhibitorů proteáz, proti čištěnému chymotrypsinu, se vloží do mikrokvyvety 0,05 ml předpokládaného inhibitoru a 0,125 ml 16 nM chymotrypsinu (např. Sigma, St. Louis, MO, kat. číslo C8946) v chymotrypsinovém pufru (50 mM TRIS, 10 mM CaCl_2 , pH 7,6). Kyveta se nechá inkubovat při 25°C asi 10 minut. K této směsi se do kyvety přidá 0,025 ml substrátu (0,6 mM N-sukc-ala-ala-pro-phe-p-nitroanilid, např. Sigma, kat. číslo S7388) v chymotrypsinovém pufru, vše se promíchá, a po 10 minutách se

měří absorbance při 25°C v 405 nm. Úroveň štěpení substrátu za přítomnosti inhibitoru (v_i) je sklon křivky absorbance při 405 nm vzhledem k času. Stejný postup se opakuje bez přidání domnělého inhibitoru. Úroveň štěpení substrátu, za nepřítomnosti inhibitoru (v), je sklon křivky absorbance při 405 nm vzhledem k času. Hodnoty v_i a v a koncentrace inhibitoru (I) jsou použity pro vypočítání IC_{50} podle výše uvedené rovnice.

3. Čištěná leucinová aminopeptidáza

Pro testování účinnosti inhibitorů proteáz, proti čištěné leucinové aminopeptidáze (LAP), se vloží do mikrokvyvety 0,05 ml předpokládaného inhibitoru a 0,125 ml 0,06 U/ml LAP (např. Sigma, St. Louis, MO, kat. číslo L5006) v LAP pufru (50 mM fosfát sodný, pH 7,2). Kyveta se nechá inkubovat při 25°C asi 10 minut. K této směsi se do kyvety přidá 0,025 ml substrátu (2,4 mM L-leucin-p-nitroanilin, např. Sigma, St. Louis, MO, kat. číslo L9125) v LAP pufru, promíchá se a po 10 minutách se měří absorbance při 25°C v 405 nm. Úroveň štěpení substrátu za přítomnosti inhibitoru (v_i) je sklon křivky absorbance při 405 nm vzhledem k času. Stejný postup se opakuje bez přidání domnělého inhibitoru. Úroveň štěpení substrátu, za nepřítomnosti inhibitoru (v), je sklon křivky absorbance při 405 nm vzhledem k času. Hodnoty v_i a v a koncentrace inhibitoru (I) jsou použity pro vypočítání IC_{50} podle výše uvedené rovnice.

B. Testování specifických proteáz ze stolice

Následuje obecný popis způsobu získání vzorku stolice, který je vhodný pro použití při testování proteáz stolice.

Pro účely vytvoření pozitivních kontrol, které zajistí, že soubor vzorků stolice vykazuje enzymatickou aktivitu požadovanou pro zhodnocení aktivity inhibitorů proteáz, se provede následující postup pro každý z testů. Shromážděná dětská stolice (nejméně pět různých vzorků), odebraná tak, aby byla bez příměsi moče a kontaminace, je smíchána s vodou v hmotnostním poměru (w/w) např. 1:50. Tato směs je potom řádně promíchána tak, aby bylo možné homogenizací nebo sonikací získat homogenní suspenzi. Suspenze stolice je použita jako zdroj proteázové aktivity tak, jak je to popsáno níže, a bude mít úroveň přeměny substrátu za nepřítomnosti inhibitoru v rozmezí od 0,005 OD₄₀₅ za minutu do 0,020 OD₄₀₅ za minutu. (Pro zajištění dokonalé linearity by neměla konečná absorbance překročit 1,5 OD₄₀₅ jednotek). Pokud je aktivita dětské stolice mimo toto rozmezí, potom není možné přesně určit hodnoty IC₅₀ u domnělých inhibitorů proteáz. Avšak rozmezí enzymové aktivity, může být upraveno, zvýšením nebo snížením dilučního faktoru u každého enzymu. Pokud to není možné, tak by měla být pro získání vzorků zvolena jiná skupina.

1. Aktivita trypsinu ve stolici

Pro testování účinnosti inhibitorů proteáz, proti trypsinu ve stolici, se vloží do kyvety inhibitor a trypsinový pufr (50 mM TRIS, 20 mM CaCl₂, pH 8,2) tak, aby konečný objem byl 0,8 ml. K této směsi se do kyvety přidá 0,1 ml substrátu (3 mM Cbz-arginin-p-nitroanilid). Kyveta se otáčením promíchá a inkubuje se při 25°C 5 minut. Do kyvety se přidá asi 0,1 ml suspenze ze stolice, vše se promíchá, a za 5 minut se měří při 25°C absorbance v 405 nm mínus absorbance při 490 nm. (Absorbance při 490 nm je opravný faktor

pro absorbanci pozadí, která je způsobena částicemi stolice, tj. "interference"). Úroveň štěpení substrátu, za přítomnosti inhibitoru (v_i), je sklon křivky rozdílu absorbance (tj. absorbance při 405 nm minus absorbance při 490 nm) vzhledem k času. Stejný postup se opakuje bez přidání domnělého inhibitoru. Úroveň štěpení substrátu, za nepřítomnosti inhibitoru (v), je sklon křivky rozdílu absorbance vzhledem k času. Hodnoty v_i a v a koncentrace inhibitoru (I) jsou použity pro vypočítání IC_{50} podle výše uvedené rovnice.

2. Aktivita chymotrypsinu ve stolici

Pro testování účinnosti inhibitorů proteáz, proti chymotrypsinu ve stolici, se vloží do kyvety inhibitor a chymotrypsinový pufr (50 mM TRIS, 10 mM $CaCl_2$, pH 7,6) tak, aby konečný objem byl 0,92 ml. K této směsi se do kyvety přidá 0,04 ml substrátu (1,25 mM N-sukc-ala-ala-pro-phe-p-nitroanilid). Kyveta se otáčením promíchá a inkubuje se při 25°C 5 minut. Do kyvety se přidá asi 0,04 ml suspenze ze stolice, vše se promíchá a za 5 minut se měří při 25°C absorbance v 405 nm minus absorbance při 490 nm. Úroveň štěpení substrátu, za přítomnosti inhibitoru (v_i), je sklon křivky rozdílu absorbance (tj. absorbance při 405 nm minus absorbance při 490 nm) vzhledem k času. Stejný postup se opakuje bez přidání domnělého inhibitoru. Úroveň štěpení substrátu, za nepřítomnosti inhibitoru (v), je sklon křivky rozdílu absorbance vzhledem k času. Hodnoty v_i a v a koncentrace inhibitoru (I) jsou použity pro vypočítání IC_{50} podle výše uvedené rovnice.

3. Aktivita LAP ve stolici

Pro testování účinnosti inhibitorů proteáz, proti LAP ve stolici, se vloží do kyvety inhibitor a LAP pufr (50 mM fosfát sodný, pH 7,2) tak, aby konečný objem byl 0,95 ml. K této směsi se do kyvety přidá 0,03 ml substrátu (6 mM L-leucin-p-nitroanilid). Kyveta se otáčením promíchá a inkubuje se při 25°C 5 minut. Do kyvety se přidá asi 0,02 ml suspenze stolice, vše se promíchá, a za 5 minut se měří při 25°C absorbance v 405 nm mínus absorbance při 490 nm. Úroveň štěpení substrátu, za přítomnosti inhibitoru (v_i), je sklon křivky rozdílu absorbance (tj. absorbance při 405 nm mínus absorbance při 490 nm) vzhledem k času. Stejný postup se opakuje bez přidání domnělého inhibitoru. Úroveň štěpení substrátu, za nepřítomnosti inhibitoru (v), je sklon křivky rozdílu absorbance vzhledem k času. Hodnoty v_i a v a koncentrace inhibitoru (I) jsou použity pro vypočítání IC_{50} podle výše uvedené rovnice.

Pomocí testů čištěných proteáz a proteáz ze stolice, které byly popsány výše, byla zjišťována inhibiční proteázová aktivita, vybraných inhibitorů proteáz, použitých v absorpčních prostředcích tohoto vynálezu a výsledky testování jsou zobrazeny v tabulce 1.

Tabulka 1

	IC ₅₀ (μM)					
	Čištěné proteázy			Specifické proteázy stolice		
	Trypsin	Chymotrypsin	LAP*	Trypsin	Chymotrypsin	LAP*
Inhibitor						
inhibitor trypsinu ze sóji	0,25	0,026	>10	<0,01	0,06	>20
aprotinin	0.168	1	>20	0.01	0.22	>20
hexamidin diisothionát	2.5	>1000	256	2.3	>1000	130
p-aminobenzamidin	13.8	>500	>500	20	>500	>500
leupeptin	0.14	>500	>500	0.11	>500	>500
pepstatin A	324	4.9	>500	>500	300	>500
chymostatin	>500	<0.12	>500	>500	0.02	>500

*LAP = leucinová aminopeptidáza

Tabulka 1 ukazuje, že každá z uvedených sloučenin inhibuje nejméně jednu proteázu testovanou způsobem čištěných proteáz a/nebo proteáz ze stolice.

C. Obecné testování proteáz ze stolice

Obecný způsob získávání vzorku stolice, vhodného pro testování proteáz ve stolici, popsany výše, může být, bez zbytečného experimentování, snadno přizpůsoben pro získávání příslušných vzorků stolice, vhodných pro obecné testování proteáz stolice.

Pro testování účinnosti inhibitorů proteáz, proti aktivitě proteáz ze stolice, se přidá 50 μ l inhibitoru a 50 μ l suspenze stolice do 1,5 ml zkumavky. Zkumavka se obracením promíchá a nechá se inkubovat při 25°C asi 45 minut. Potom se do zkumavky přidá 50 μ l proteázového pufru (200 mM pufru TRIS, který obsahuje 20 mM CaCl_2 , pH 7,8). Zkumavka se znovu promíchá a nechá se inkubovat při 25°C 45 minut. Potom se do zkumavky přidá 50 μ l proteázového substrátu (0,4 % kasein-resorufinu, např. Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, kat. č. 1 734 334). Zkumavka se znovu promíchá a nechá se inkubovat při 37 °C 60 minut, aby proběhlo štěpení substrátu. Potom se přidá 480 μ l trichloroctové kyseliny (5 % w/v), aby se zastavila reakce a došlo k vysrážení zbylého kasein-resorufinu. Zkumavka se promíchává obracením při 37°C 15 minut. Zkumavka se potom stočí relativní odstředivou silou 20 800 x g 5 min. Potom se do kyvety přidá 400 μ l supernatantu k 600 μ l testového pufru (0,5 M TRIS, pH 8,8). Kyveta se obracením promíchá a při 574 nm se měří absorbance. Stejný postup se opakuje

bez domnělého inhibitoru. A je absorbance při 574 nm za nepřítomnosti inhibitoru. A_i je absorbance při 574 nm za přítomnosti inhibitoru. Před zahájením reakce jsou A i A_i téměř nulové. A proto, může být úroveň štěpení substrátu za přítomnosti inhibitoru (v_i), vypočítána vydělením absorbance při 574 nm (A_i) a času reakce. Úroveň štěpení substrátu za nepřítomnosti inhibitoru (v), může být vypočítána, vydělením absorbance při 574 nm (A) a času reakce. Úrovně v_i a v , a koncentrace inhibitoru (I), mohou být použity, pro vypočítání IC_{50} dle výše uvedené rovnice.

Tabulka 2

	<u>Hodnoty IC_{50} (μM)</u>
<u>Inhibitor</u>	<u>Obecné proteázy stolice</u>
inhibitor trypsinu ze sóji	4,9
hexamidin	31
leupeptin	>320
pepstatin A	>32
chymostatin	64
hydrochlorid 4-(2-aminoethyl)-benzensulfonylfluorid	217

D. Testování absorpčního prostředku

Pro určení přítomnosti inhibitoru v kterékoliv části absorpčního prostředku (např. vrchní vrstva, absorpční jádro, spodní vrstva a/nebo další vrstvy, stehenní manžety, upínací části, boční části, vložené elementy nebo jejich kombinace), se odebere malý vzorek prostředku z dané části a provede se extrakce inhibitoru. Je zřejmé, že inhibitor rozpustný ve vodě, bude extrahován vodou nebo

vodným rozpouštědlem, zatímco inhibitor rozpustný v tucích bude extrahován organickým rozpouštědlem. Následující popis je pouze názorným příkladem stanovení inhibitoru proteázy (trypsinu) v prostředí a není tedy omezující, protože tento postup může být použit pro stanovení inhibitorů jiných proteáz a také proto, že v oboru je známá řada dalších postupů, které mohou být použity.

Pro zjištění inhibitoru trypsinu ve vrchní vrstvě prostředí, jsou náhodně vyraženy části absorpčního jádra o průměru 1,5 cm. Z vyražené části se odstraní vrchní vrstva a umístí se do 1,5 ml zkumavky do centrifugy. Vzorek se nechá přes noc v 0,75 ml vody nebo jiném rozpouštědle, jako např. pufru 50 mM TRIS, 20 mM CaCl_2 , pH 8,2, který byl popsán výše. Všechn (0,125 ml) supernatant se odebere a přidá se do kyvety, která obsahuje 0,025 ml čerstvě připraveného 160 nM lidského pankreatického trypsinu v TRIS-HCl, které obsahuje 20 mM CaCl_2 , pH 8,2 a nechá se inkubovat 10 minut při 25°C. Kontrolní vzorek, jenž obsahuje pouze pufr, se připraví stejným způsobem do druhé kyvety. Do každé kyvety se přidá Cbz-arginin-p-nitroanilid substrát (0,025 ml 4 mM roztoku) a testovaný i kontrolní vzorek se nechají inkubovat 5 minut. Potom se sleduje, po dobu 10 minut, změna absorbance každého vzorku při 405 nm. Je zřejmé, že tento protokol může být použit, při zjišťování inhibiční proteázové aktivity i v dalších částech prostředí, jako např. absorpčním jádru apod.

Absorpční prostředek má inhibiční proteázovou aktivitu, pokud extrakt vzorku sníží hydrolýzu substrátu proteázou nejméně o 10 %, lépe však o 20 %, ještě lépe o 50 % a nejlépe o 80 %, vzhledem ke kontrolnímu vzorku. Snížení hydrolýzy substrátu, se zpravidla

pohybuje od 10 % do 99 %, lépe však od 20 % do 99 %, ještě lépe od 50 % do 99 % a nejlépe od 80 % do 99 %.

Absorpční prostředek se také považuje, že má inhibiční aktivitu, pokud vzorek obsahuje nějakou inhibující látku, jako např. některý z dříve popsanych inhibitorů proteáz, stejně tak, jako látky, které nemusí splňovat kritéria IC_{50} , např. látky, jako L-1-chlor-3-(4-tosylamid)-amino-2-heptanon-HCl (TLCK), L-1-chlor-3-(4-tosylamid)-4-fenyl-2-butanon (TPCK), kyselina tranexamová apod.

E. *In vitro* kožní test inhibice tvorby IL-1 α

Při tomto *in vitro* testu, který určuje účinnost inhibitorů proteáz proti vzniku zánětlivé odpovědi kůže na stolici a její enzymy, se lidské keratinocyty, získané z epidermální tkáně, kultivují v médiu bez séra, v plastových nádobkách, jejichž povrch je potažen nylonovou sítí, dokud nedojde k jejich splynutí. Síťovaný povrch se potom vyzdvihne na rozhraní kapaliny a vody, aby se umožnila diferenciace a tvorba vícevrstevných organizovaných struktur, jež jsou analogické těm, které se nalézají *in vivo*, včetně dobře definované bariérové vrstvy stratum corneum. Může být použit jakýkoliv kultivační systém, který umožňuje růst a diferenciaci keratinocytů. Vhodným komerčním kultivačním systémem je Epiderm (MatTek Corporation, Ashland, Massachusetts).

Stolice dětí se sbírá tak, aby nebyla kontaminována močí a naředí se solným roztokem pufovaným fosfátem (PBS)(pH 7,2-7,4). Potom je směs, homogenizací nebo sonikací, důkladně promíchána, aby vznikla homogenní suspenze. Pro stanovení tvorby IL-1 α , v důsledku enzymové aktivity stolice, se jeden díl homogenátu naředí

PBS a přidá se k povrchu kontrolní kultury v kultivační nádobce. Pro stanovení inhibice tvorby IL-1 α , v důsledku proteázové aktivity, je přidáno určité množství domnělého inhibitoru proteázy k druhému dílu homogenátu, který je naředěn stejným způsobem a potom je přidán k povrchu testované kultury. Kultury se nechají inkubovat v řízené atmosféře. Kontrolní kultury, testované kultury s inhibitorem a kultivační médium, se po určité době sbírají. Kultivační médium se, běžným způsobem, testuje na přítomnost IL-1 α . Vhodným testem pro IL-1 α je například ELISA, která je komerčně dostupná jako Quantikine od R&D Systems, Minneapolis, Minnesota.

Procentuální snížení tvorby IL-1 α , v důsledku přítomnosti inhibitoru proteázy, se vypočítá následovně:

$$\% \text{ snížení} = \frac{\text{IL-1}\alpha \text{ kontrolní kultury} \text{ minus IL-1}\alpha \text{ testované kultury}}{\text{IL-1}\alpha \text{ kontrolní kultury}} \times 100 \%$$

Pomocí tohoto standardního testu, byla testována schopnost inhibitorů serinové proteázy, inhibitoru trypsinu ze sóji a hexamidin diisethionátu ("hexamidinu"), inhibovat tvorbu IL-1 α , kultivovanými keratinocyty, za přítomnosti stolice. Výsledky ukázaly, že hexamidin, v koncentracích 1 000 μ M a 100 μ M, snižuje tvorbu IL-1 α kulturami keratinocytů, které byly vystaveny působení stolice, o 51 až 88 % a 5 %, v daném pořadí. Koncentrace inhibitoru trypsinu ze sóji, 10 μ M, stačila ke snížení tvorby IL-1 α o 56 – 75 %. Tepelné zpracování (90°C) stolice, před testováním, vedlo k téměř úplnému potlačení tvorby IL-1 α , což znamená, že hlavní látkou nebo látkami, které vyvolávají cytokinovou odpověď, jsou

denaturovatelné proteiny. Výsledky naznačují, že inhibitory trypsinu (viz tabulka 1), jsou také účinné při snižování tvorby IL-1 α , kulturami kožních buněk.

VI. Začlenění inhibitorů do absorpčního prostředku

1. Nosná složka

Inhibitor proteázy, pro použití v absorpčním prostředku tohoto vynálezu, může být rozpustný ve vodě nebo v tucích a může být do absorpčního prostředku začleněn v čisté formě, jako např. ve formě prášku nebo částic, nebo ve formě roztoku, suspenze, disperze, emulze nebo podobně, ve farmaceuticky a dermatologicky přijatelném nosiči, který nebude ovlivňovat inhibiční aktivitu sloučeniny. Inhibitor může být také začleněn do jiné struktury, která je vložena do prostředku během výroby nebo sestavení. Inhibitor může být potažen nebo jinak připojen nebo připevněn, ke strukturám nanofáze nebo jiné pevné opoře, jako je např. sklo, plastové nebo agarosové korálky apod. nebo může být obsažen v mikrokapsulích, které prasknou tlakem nebo jsou rozpustné, nebo je obsažen v absorpční látce. Je zřejmé, že pro začlenění inhibitoru, může být použita řada dalších látek a způsobů.

Mezi nosiče inhibitoru patří složky, které jsou ve formě roztoků, krémů, olejů, mastí, prášků, pěn nebo gelů apod., a které mohou obsahovat jakoukoliv složku, která se v takových složkách v oboru běžně používá. Přísady těchto složek budou záviset na charakteru složky, takže např. roztoky budou obsahovat jiné přísady než prášky. Kosmetické složky mohou dále obsahovat širokou řadu možných přísad, jako např. hydratační látky, změkčující látky,

želatinující látky, neutralizační látky, parfémy, barvicí látky apod. Další přísady, jako např. surfaktanty apod., které mohou být přítomny ve složce, budou podrobněji popsány v části "Dermatologické složky". Složky obsahující inhibitor proteázy, které by měly přecházet na kůži, by neměly mít pH nižší než 4 a ne větší než 7,5.

2. Začlenění

Inhibitor proteázy použitý v absorpčním prostředku vynálezu, je začleněný do prostředku takovým způsobem, aby nenarušil funkce dalších struktur prostředku (např. absorpční schopnost jádra, propustnost vrchní vrstvy apod.). Inhibitor může být vložen do jakékoliv části nebo částí prostředku, včetně, mimo jiné, vrchní vrstvy, spodní vrstvy, absorpčního jádra, jakékoliv vložené vrstvy, stehenní manžety, boční části, oblasti pasu, upínacích částí, vložných částí, jako např. absorpční látky, vložené do absorpčního prostředku během jeho nošení, specializované struktury, jako např. části, jejíž funkcí je pojmout stolicí při vyprázdnění střeva apod. Inhibitor může být vložen do prostředku samostatně nebo může být eventuálně obsažen v distribučním systému, popsaném níže, který je součástí některé z předcházejících částí prostředku, a který přenáší inhibitor proteázy přímo nebo nepřímo na kůži uživatele, během běžného nošení prostředku.

Jakékoliv množství různých inhibitorů proteáz nebo jejich směsí, nezávisle na tom, zda jsou začleněny do distribučního systému, může být rovnoměrně nebo nerovnoměrně rozloženo v absorpčním prostředku. Absorpční prostředek zpravidla obsahuje takové množství inhibitoru proteázy nebo směsi inhibitorů, že tvoří 0,0001

% až 30 %, lépe však 0,0001 % až 10 %, ještě lépe 0,001 % až 5 % a nejlépe 0,001 % až 1 % hmotnosti prostředku.

Inhibitor může být vložen, přímo na povrch nebo do struktury kteréhokoliv typu vrchní vrstvy, včetně tkané, netkané a s otvory, spodní vrstvy a/nebo látky absorpčního jádra, nebo dalších částí prostředku, během výroby nebo sestavení, různými v oboru běžnými způsoby. Inhibitor může být například nanesen, po rozptýlení v kapalném nebo polotuhém nosiči, na vrchní vrstvu, absorpční jádro nebo na jádrovou stranu spodní vrstvy, nastříkáním, ponořením, potisknutím, nasáknutím nebo jiným způsobem. Mezi řadu dalších technik, které mohou být použity, patří spojná polymerace, vystavení strukturních částí působení páry, aby došlo k navázání inhibitoru vodíkovými můstky, které se snadno poruší po vystavení povrchu tělním výměškům, čímž se uvolní inhibitor.

Inhibitor je nanesen aspoň na část povrchu, který se dotýká uživatele, a je dostupný pro automatický přenos na kůži uživatele prostředku, během kontaktu, pohybu uživatele a/nebo působením tělního tepla. Nebo může absorpční prostředek obsahovat distribuční systém s inhibitorem enzymu, který během nošení přenáší aspoň část inhibitoru na kůži uživatele prostředku. Ve všech těchto provedeních se přenáší inhibitor na kůži, aby mohl působit na rozhraní kůže/stolice při vyprázdnění střeva. V jiném provedení, kterému se dává přednost, je distribučním systémem dermatologická složka obsahující inhibitor proteázy a různá změkčovadla a znehybňující činidla, jenž se přenáší přímo z povrchu dotýkajícího se uživatele na kůži, kde plní svoji bariérovou funkci a inhibuje enzymy stolice. Použití nebo lépe opakované použití takových prostředků, jenž přenáší inhibitor proteázy přímo nebo nepřímo na

kůži uživatele, by mělo hromadit inhibitor proteázy, a tím bránit vzniku zánětu kůže, který je způsoben proteázou stolice.

V jiném provedení vynálezu, je inhibitor proteázy umístěný v absorpčním prostředku samostatně nebo v distribučním systému, a to takovým způsobem a na takovém místě, že může inaktivovat proteázy ve stolici, především řídké, zachycené v prostředku, dříve než dojde k jejímu přenosu na kůži.

V dalším provedení vynálezu, je inhibitor proteázy umístěný uvnitř absorpčního prostředku tak, že může snížit nebo eliminovat aktivitu proteáz v tekutinách stolice nebo v moči kontaminované stolicí, které pronikly do nitra absorpčního prostředku, a které mohou, z nějakého důvodu, později přijít do kontaktu s povrchem dotýkajícím se uživatele. Inhibitor proteázy může být opět přítomen sám nebo je součástí distribučního systému.

VII. Distribuční systémy

Inhibitory proteázy nebo složky, které je obsahují, mohou být součástí kteréhokoliv distribučního systému, který je známý v oboru, jenž přímo či nepřímo usnadňuje přenos inhibitoru proteázy na kůži uživatele prostředku, a tím ji chrání proti podráždění proteázami ze stolice. Distribuční systém může obsahovat inhibitor proteázy v čisté formě, jako prášek nebo částice, nebo ve formě roztoku, suspenze, disperze, emulze apod., a to v nosné nebo dermatologické složce. Po uvolnění z distribučního systému, se inhibitor proteázy volně pohybuje z místa distribučního systému, k povrchu, který se dotýká uživatele, a potom dále na kůži. Distribuční systém může být složkou kterékoliv části nebo částí

absorpčního prostředku, včetně, mimo jiné, vrchní vrstvy, spodní vrstvy, absorpčního jádra, další vložené vrstvy, stehenních manžet, bočních částí, oblasti pasu, upínacích částí, vložných částí, jako např. absorpční látky vložené do absorpčního prostředku v průběhu jeho nošení, specializované struktury, jako např. té zachycující stolici (např. "kapsy" pro vyprázdnění střeva) apod. Distribuční systém je, pokud možno, umístěn do blízkosti kůže uživatele a měl by být součástí povrchů, jenž se dotýkají uživatele, částí prostředku, jako jsou vrchní vrstva, boční části, stehenní manžety, oblast pasu, upínací části apod. Nejlépe je pokud distribučním systémem, vloženým do vrchní vrstvy, je dermatologická složka, která bude popsána níže.

Distribuční systém může obsahovat a/nebo přenášet inhibitor proteázy v kterékoliv výše zmíněné formě, včetně, prášku, vloček nebo částeček, nebo ve formě roztoku, suspenze, disperze, emulze apod., ve farmaceuticky a dermatologicky přijatelné nosné složce. Po uvolnění z distribučního systému, může být inhibitor v aktivní funkční formě, jako např. v roztoku, suspenzi, emulzi apod., nebo může být nefunkční, jako např. v práškové nebo částicové formě, ale schopný se aktivovat působením vlhka z moče nebo stolice nebo jiným způsobem.

Typy distribučních systémů, které mohou být použity v absorpčních prostředcích tohoto vynálezu a usnadňující přenos inhibitoru proteázy z jakékoliv části prostředku na kůži, jsou pro odborníka snadno srozumitelné. Příklady distribučních systémů jsou, např. tlakem praskající nebo rozpustitelné mikrokapsle, které uvolňují inhibitor nebo složku s inhibitorem, při svém rozpuštění, v důsledku vlhka z moče nebo stolice, nebo při prasknutí vlivem

tělního tlaku nebo ručního rozrušení kapslí uživatelem, před aplikací prostředku na uživatele. Například ve vodě rozpustný film, který obsahuje a po vystavení vlhku odkrývá prášek, je popsán v patentu USA 4 790 836 a byl by vhodnou látkou pro použití v mikrokapslích obsahujících inhibitor proteázy v kterékoliv formě, jako např. práškové, částicové, tuhé nebo polotuhé. Příklady tlakem rozrušitelných mikrokapslí, které jsou vhodné pro inhibitor proteázy, jsou popsány v patentu USA 3 585 998. Takové mikrokapsle mohou být přítomny v kterékoliv části absorpčního prostředku, včetně vrchní vrstvy. Patent USA 4 623 339 popisuje vkladací výměnnou vrstvu, kterou je možné ručním tlakem aktivovat a vytlačit látku skrz štěrby v jejím povrchu. Popisy všech přecházejících patentů jsou zde zahrnuty odkazem.

Dalšími vhodnými distribučními systémy pro inhibitory nebo složky s inhibitorem jsou, mimo jiné, "komůrky" v prostředku, což jsou uzavřené nebo částečně otevřené prostory, pravidelného nebo nepravidelného tvaru, které uvolňují inhibitor působením vlhka, tepla nebo tlaku, a ve vodě rozpustná lepidla a další podobné složky, které uvolňují inhibitor působením vlhka apod.

Bez ohledu na použitý distribuční systém, by měly být, inhibitor proteázy nebo složka s jeho obsahem, schopny se pohybovat z místa svého uvolnění, např. působením toku moče, pohybu uživatele, tlaku apod. nebo v důsledku snížení viskozity působením tělního tepla, do dalších oblastí absorpčního prostředku. Inhibitory proteázy, které jsou hydrofilní nebo jsou součástí hydrofilních nosičů, mohou procházet skrz hydrofilní struktury absorpčního prostředku, jako např. hydrofilní póry nebo jiné otvory, které umožňují moči protékat z vrchní vrstvy do jádra. Distribuční systémy obsahující inhibitory

proteázy nebo složky s inhibitory, jsou však obvykle uloženy v blízkosti kůže uživatele. V navrhovaném provedení jsou inhibitory proteázy rozpuštěné, suspendované nebo emulgované součástí dermatologické složky, která může být v prostředku umístěna kdekoliv, ale nejlépe na povrchu, který se dotýká kůže, jako např. povrchu vrchní vrstvy, boční části, oblasti pasu, stehenní manžety, upínací části apod.

Dermatologické složky vhodné pro přenos inhibitoru proteázy jsou popsány níže. Ve všech těchto provedeních obsahuje dermatologická složka od 0,01 % do 50 %, lépe však od 0,5 % do 25 % a nejlépe od 1 % do 10 % hmotnosti inhibitor proteázy.

VIII. Dermatologické složky

Dermatologické složky vhodné pro použití v absorpčních prostředcích tohoto vynálezu jsou popsány v patentu USA 08/926 532 a 08/926 533, obě podané 10. 9. 1997, patentu USA 5 607 760 podaném 4. 3. 1997, patentu USA 5 609 587 podaném 11. 3. 1997, patentu USA 5 635 191 podaném 3. 6. 1997 a patentu USA 5 643 588 podaném 1. 7. 1997, jejichž popisy jsou zde zahrnuty odkazem.

Jako doplněk své funkce, kterou je zajištění účinné koncentrace inhibitoru proteázy na kůži uživatele, může, dermatologická složka obsahující inhibitor proteázy, také obsahovat přísady, které například snižují lpění stolice na kůži, vytvářejí bariéru kůže/stolice (např. pokryjí kůži, čímž zabrání přilnutí stolice), ale přitom zůstávají poměrně nepropustné, ale prodyšné, nebo mají jiný prospěšný vliv na kůži (např. zvláčňují pokožku, zlepšují nebo udržují kvalitu pokožky) apod. Dermatologická složka může mít

řadu forem, jako např. emulze, roztok, krém, mast, balzám, suspenze, gel apod.

Přenos účinné koncentrace inhibitoru enzymu, z absorpčního prostředku na kůži a účinné množství dermatologické složky, které je aplikované nebo přenesené na povrchy prostředku, jenž jsou v kontaktu s kůží uživatele, závisí především na použité dermatologické složce. Množství složky by mělo být, přinejmenším na části povrchu, který se dotýká kůže, od $0,0078 \text{ mg/cm}^2$ do 12 mg/cm^2 , lépe však od $0,16 \text{ mg/cm}^2$ do 6 mg/cm^2 a nejlépe od $0,6 \text{ mg/cm}^2$ do 4 mg/cm^2 . Avšak tato rozmezí jsou pouze názorná a zkušený odborník ví, že charakter složky určuje množství, které musí být aplikováno k přenesení dostatečné koncentrace inhibitoru enzymu a že požadované množství je zjistitelné běžným experimentem.

Množství dermatologické složky, nanesené na absorpční prostředek, je důležitým faktorem navrhovaného vynálezu, ale důležitější je množství složky přenesené na kůži uživatele, během používání jednoho nebo více takto upravených prostředků. Přestože množství dermatologické složky, obsahující inhibitor proteázy, přenesené na kůži, závisí do určitého rozsahu na charakteru použité složky, mohou být přenesena poměrně malá množství, která stále dostačují k vytvoření minimální inhibiční koncentrace inhibitoru proteázy na kůži. Toto platí obzvláště pro navrhované složky, které jsou popsány v příkladu 1.

Pro určení množství inhibitoru proteázy, které je přeneseno na kůži uživatele, během nošení jednoho nebo více upravených prostředků, je níže uveden způsob, který stanoví množství

dermatologické složky přenesené na kůži. Vzhledem k hladině dermatologické složky, která se přenesení na kůži, během nošení jednoho upraveného absorpčního prostředku po dobu 3 hodin (typická doba nošení) a především pro navrhované dermatologické složky popsané v příkladu 1, se navrhuje, aby bylo přeneseno na kůži, během tří hodin doby nošení, nejméně $0,0016 \text{ mg/cm}^2$, lépe však nejméně $0,0078 \text{ mg/cm}^2$ a nejlépe nejméně $0,016 \text{ mg/cm}^2$ dermatologické složky. Obvyklé přenesené množství dermatologické složky, jedním upraveným prostředkem, během tří hodin nošení, se pohybuje od $0,0016 \text{ mg/cm}^2$ do $0,78 \text{ mg/cm}^2$, lépe však od $0,0078 \text{ mg/cm}^2$ do $0,47 \text{ mg/cm}^2$ a nejlépe od $0,016 \text{ mg/cm}^2$ do $0,31 \text{ mg/cm}^2$.

Pro dlouhodobé použití upravených prostředků (výměna se obvykle provádí každé 3 až 4 hodiny během dne a také před nočním spánkem), jako např. po dobu 24 hodin, se dává přednost složkám, které se přenesou na kůži uživatele během 24 hodin v množství nejméně $0,0047 \text{ mg/cm}^2$, lépe však nejméně $0,016 \text{ mg/cm}^2$ a nejlépe nejméně $0,047 \text{ mg/cm}^2$. Množství složky přenesené během 24 hodin je obvykle od $0,0047 \text{ mg/cm}^2$ do $2,79 \text{ mg/cm}^2$, častěji však od $0,016 \text{ mg/cm}^2$ do 10 mg/cm^2 a nejčastěji od $0,047 \text{ mg/cm}^2$ do $0,93 \text{ mg/cm}^2$.

Je zřejmé, že z četných látek vhodných pro dermatologické složky s inhibítorem enzymu, které se přenáší na kůži podle vynálezu, byly logicky vybrány ty látky, které se považují za bezpečná a účinná dermatologická činidla. Tyto látky patří do I. kategorie tak, jak je definována U.S. Food and Drug Administration (FDA), (21 C.F.R. § 347), která nyní zahrnuje: alantoin, gel hydroxidu hlinitého, kalamín, kakaové máslo, dimeticon, rybí tuk (v kombinaci), glycerín, kaolín, vazelínu, lanolín, minerální olej, žraločí olej, bílou vazelínu, talek, škrob, octan zinečnatý, uhličitán

zinečnatý, oxid zinečnatý apod. Další vhodné látky patří do III. kategorie, definované U.S. Food and Drug Administration (FDA), která nyní zahrnuje: deriváty živých kvasinek, aldioxa, octan hlinitý, mikroporézní celulózu, cholekalciferol, koloidní ovesnou mouku, hydrochlorid cysteinu, dexpantenol, peruánský balzámový olej, hydrolyzáty proteinů, racemovaný methionin, bikarbonát sodný, vitamín A apod.

Řada dermatologických složek uvedených v FDA, se nyní běžně používá v komerčně dostupných dermatologických výrobcích, jako např. A a D Ointment®, Vaseline®, Petroleum Jelly, Desitin® Diaper Rash Ointment a Daily Care® ointment, Gold Bond® Medicated Baby Powder, Aquaphor® Healing Ointment, Baby Magic® Baby Lotion, Johnson's Ultra Sensitive® Baby Cream. Do kteréhokoliv z těchto komerčních výrobků, může být vpravena účinná koncentrace inhibitoru proteázy a nanesena na absorpční prostředek, čímž se vytvoří upravený prostředek, podle navrhovaného vynálezu.

Dále bude popsáno, že dermatologickými složkami vhodnými pro přenos inhibitorů enzymů na kůži uživatele jsou nejlépe, nikoliv nezbytně, složky s takovým profilem tání, který jim umožňuje zůstat při pokojové teplotě nehybně, na povrchu dotýkajícím se uživatele a při tělní teplotě snadno přestupovat na uživatele, a přitom při skladování za extrémních podmínek nezkapalnit. V tomto ohledu jsou složky, aspoň částečně, přenositelné na kůži vlivem kontaktu, pohybu uživatele a/nebo tělesného tepla. Protože je složka na povrchu prostředku, který se dotýká uživatele, zpravidla znehybněna, tak stačí poměrně nízké hladiny složky, ke vzniku žadoucích účinků na kůži. Dále může být nezbytné použít, pro

upravené prostředky navrhovaného vynálezu, speciální obalové materiály.

V navrhovaném provedení jsou dermatologické složky emulze vody v oleji, kde inhibitor proteázy je ve vodní fázi. Avšak samotná dermatologická složka může být při 20°C, tj. při teplotě okolí, tuhá nebo častěji polotuhá. Výraz "polotuhá" znamená, že složka má reologické vlastnosti typické pro pseudotvárné nebo tvárné kapaliny. Pokud nedochází ke tření, mohou mít složky vzhled polotuhé látky, ale při zvýšení tření mohou zkapalnit. To je způsobeno tím, že složka obsahuje primárně jak pevné tak i kapalné části. Viskozita dermatologické složky, obsahující inhibitor enzymu, by měla být při nulovém tření od $1,0 \times 10^4$ do $1,0 \times 10^6$ g/cm.s, lépe však od $5,0 \times 10^4$ do $5,0 \times 10^6$ g/cm.s. Výrazem "viskozita při nulovém tření" se míní viskozita měřená za velmi nízké úrovně tření (např. $1,0 \text{ s}^{-1}$) pomocí vhodné viskozimetru (např. model CSL 100 od TA Instruments of New Castle, DE). Odborník ví, že mohou být použity i jiné složky, než ty o vysokém bodu tání (viz níže), které budou mít srovnatelnou viskozitu, jenž může být změřena extrapolací křivky viskozity, vzhledem k úrovni tření pro takovou složku k nulové úrovni tření při teplotě asi 20°C.

Navrhované složky jsou při pokojové teplotě aspoň polotuhé, aby se zamezilo přechodu složky, do absorpčního prostředku, před jeho použitím. Navíc mají složky konečný bod tání (100% zkapalnění), nad možnými "nepříznivými" skladovacími podmínkami, který může být vyšší než 45°C (např. sklad v Arizoně, kamión na Floridě atd.). Příklady složek, které mají tyto znaky, jsou podrobně popsány v patentu USA 5 643 588, v patentu USA 5 607

760, v patentu USA 5 609 587 a v patentu USA 5 635 191.
Navrhované složky mají následující profily tání:

<u>Vlastnost</u>	<u>Navrhované rozmezí</u>	<u>Nejvhodnější rozmezí</u>
% kapaliny při pokojové teplotě (20°C)	2-50	3-25
% kapaliny při tělní teplotě (37°C)	25-95	30-90
konečný bod tání (°C)	38	45

Navrhované složky, obsahující inhibitor enzymu, nemají při teplotě zevního prostředí sklon téci a přecházet ve větším rozsahu do jiných oblastí prostředku, než na které byly nanесeny. To znamená, že k dosažení očekávaného terapeutického a ochranného efektu, je zapotřebí menšího množství dermatologické složky.

Aby se zabránilo přesunu složek, uvnitř prostředku, na nežádoucí místa, musí být zajištěna nehybnost složek tím, že bude jejich viskozita co nejvyšší. Bohužel v některých případech může vyšší viskozita snižovat přenos složky na kůži uživatele. A proto musí být dosažena taková rovnováha, která umožní jak udržet složku na povrchu prostředku, tak i její přenos na kůži uživatele. Vhodné viskozity těchto složek jsou v rozmezí od 0,05 do 5 g/cm.s, lépe však od 0,05 do 3 g/cm.s a nejlépe od 0,05 do 1 g/cm.s, měřeno při 60°C pomocí rotačního viskozimetru (vhodným viskozimetrem je model 4357 od Lab Line Instruments, Inc. of Melrose Park, IL). Viskozimetr pracuje na 60 rpm s použitím hřídele č. 2.

Kromě dermatologických složek upravených tak, aby měly terapeutický a/nebo ochranný efekt na kůži a pozitivnímu efektu inhibitorů proteáz, jsou dalšími aktivními látkami těchto složek, jedna nebo více ochranných látek nebo změkčovadel. Zde použitý výraz "změkčovadlo", je vyhrazen pro látku, která chrání proti vlhkosti a podráždění, změkčuje, uklidňuje, zvláčňuje, potahuje, promazává, zvlhčuje, chrání a/nebo čistí kůži. (Bude zřejmé, že řada látek zmíněných výše patří mezi změkčovadla.) V navrhovaném provedení jsou tato změkčovadla tvárná nebo kapalná, při teplotě okolního prostředí, tj. 20°C.

Příklady vhodných změkčovadel pro použití v tomto vynálezu jsou, mimo jiné, změkčovadla získaná z ropy, sacharózové estery mastných kyselin, polyethylenglykol a jeho deriváty, zvlhčující látky, estery mastných kyselin, alkylethoxyláty, ethoxylátové estery mastných kyselin, mastný alkohol, polysiloxan, propylenglykol a jeho deriváty, glycerín a jeho deriváty, včetně glyceridových, acetoglyceridových a etoxylátových glyceridů mastných kyselin C₁₂-C₂₈, triethylenglykol a jeho deriváty, vorvaní tuk a nebo jiné vosky, mastné kyseliny, mastné estery alkoholu, především ty které mají 12 až 28 atomů uhlíku ve svém řetězci, jako kyselina stearová, propoxylované mastné alkoholy, další mastné estery polyhydroxyalkoholů, lanolin a jeho deriváty, kaolín a jeho deriváty, jakékoliv dermatologické činidlo zmíněné výše nebo směsi těchto změkčovadel. Mezi vhodná změkčovadla, získaná z ropy, patří ty uhlovodíky nebo jejich směsi, které mají délku řetězce od 16 do 32 uhlíků. Mezi ropné uhlovodíky, s touto délkou řetězců, patří minerální olej a vazelína. Výrazem "minerální olej" se obvykle označuje méně viskózní směs uhlovodíků, která má od 16 do 20 uhlíků. Výrazem "vazelína" se obvykle označuje viskóznější směs

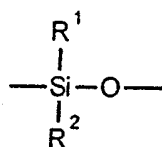
uhlovodíků s 16 až 32 uhlíky. Vazelína a minerální olej jsou preferovaná změkčovadla, pro použití v dermatologické složce tohoto vynálezu.

Mezi vhodná změkčovadla, typu esterů mastných kyselin, patří ty odvozené od mastných kyselin C_{12} - C_{28} , lépe však nasycených mastných kyselin C_{16} - C_{22} a alkoholů s krátkým řetězcem (C_1 - C_8 , lépe však C_1 - C_3). Vhodnými příklady takových esterů jsou methylpalmitát, methylstearát, isopropylaurát, isopropylmyristát, isopropylpalmitát, ethylhexylpalmitát a jejich směsi. Vhodná změkčovadla, typu esterů mastných kyselin, mohou být také získána z esterů mastných alkoholů o dlouhém řetězci (C_{12} - C_{28} , lépe však C_{12} - C_{16}) a mastných kyselin s kratším řetězcem, např. kyselina mléčná, jako jsou lauryllaktát a cetylaktát.

Vhodnými změkčovadly alkylethoxylátového typu jsou ethoxyláty mastných alkoholů C_{12} - C_{22} , které mají průměrný stupeň ethoxylace od 2 do 30. Tato změkčovadla jsou vybírána ze skupiny obsahující laurylové, cetylové a stearylové ethoxyláty nebo jejich směsi, které mají průměrný stupeň ethoxylace od 2 do 23. Náznými příklady takových alkylethoxylátů jsou laureth-3 (laurylethoxylát s průměrným stupněm ethoxylace 3), laureth-23 (s průměrným stupněm ethoxylace 23), ceteth-10 (cetylalkoholethoxylát s průměrným stupněm ethoxylace 10) a steareth-10 (stearyl-alkoholethoxylát s průměrným stupněm ethoxylace 10). Tato alkylethoxylátová změkčovadla jsou zpravidla použita v kombinaci se změkčovadly získanými z ropy, jako je např. vazelína, ve váhovém poměru alkylethoxylátového změkčovadla k změkčovadlu získanému z ropy od 1:1 do 1:5, lépe však od 1:2 do 1:4.

Vhodnými změkčovadly typu mastného alkoholu jsou mastné alkoholy C_{12} - C_{22} , lépe však mastné alkoholy C_{16} - C_{18} . Názornými příklady jsou cetylalkohol, stearylalkohol a jejich směsi. Tato změkčovadla se zpravidla používají v kombinaci se změkčovadly získanými z ropy, jako např. vazelínou, ve váhovém poměru změkčovadla typu mastného alkoholu k změkčovadlu získanému z ropy od 1:1 do 1:5, lépe však od 1:1 do 1:2.

Dalšími vhodnými typy změkčovadel jsou polysiloxanové sloučeniny. Obecně jsou pro použití v tomto vynálezu vhodné ty polysiloxanové látky, jejichž monomerová siloxanová jednotka má následující strukturu:



kde R^1 a R^2 může být, nezávisle pro každou monomerovou jednotku, vodík nebo alkyl, aryl, alkenyl, alkaryl, arakyl, cykloalkyl, halogenový uhlovodík nebo jiný zbytek. Všechny tyto zbytky mohou být vzájemně nahrazeny. Zbytky R^1 a R^2 každé jednotlivé monomerové jednotky mohou být odlišné od příslušných skupin sousední jednotky. Navíc polysiloxan může mít strukturu lineárního řetězce, rozvětveného řetězce nebo cyklickou strukturu. Zbytky R^1 a R^2 mohou být nezávisle i jiné skupiny, jako např. siloxany, polysiloxany, silany a polysilany. Zbytky R^1 a R^2 mohou obsahovat jakoukoliv z řady organických skupin včetně alkoholu, karboxylové kyseliny, fenylu a aminových skupin.

Příklady alkylových zbytků jsou methyl, ethyl, propyl, butyl, pentyl, hexyl, oktyl, decyl, oktadecyl apod. Příklady alkenylových zbytků jsou vinyl, allyl apod. Příklady arylových zbytků jsou fenyl, difenyl, naftyl apod. Příklady alkarylových zbytků jsou toyl, xylyl, ethylfenyl apod. Příklady aralkylových zbytků jsou benzyl, alfa-fenylethyl, beta-fenylethyl, alfa-fenylbutyl apod. Příklady cykloalkylových zbytků jsou cyklobutyl, cyklopentyl, cyklohexyl apod. Příklady halogenových uhlovodíkových zbytků jsou chloromethyl, bromoethyl, tetrafluoroethyl, fluoroethyl, trifluoroethyl, trifluorotoyl, hexafluoroxyl apod.

Viskozita vhodných polysiloxanů se může velmi lišit, stejně tak jako viskozita siloxanů obecně, a proto mohou být siloxany tekoucí nebo mohou být upraveny tak, aby se staly tekoucí. To znamená, že se jejich viskozita pohybuje od $5 \cdot 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$ (5 centistoke) (měřeno při 37°C pomocí skleněného viskozimetru) do $20 \text{ m}^2/\text{s}$ (20 000 000 centistoke), ale není omezena pouze na tyto hodnoty. Polysiloxany by měly mít viskozitu při 37°C v rozmezí od $5 \cdot 10^{-6}$ do $5 \cdot 10^{-3} \text{ m}^2/\text{s}$ (od 5 do 5 000 centistoke), lépe od $5 \cdot 10^{-6}$ do $2 \cdot 10^{-3} \text{ m}^2/\text{s}$ (od 5 do 2 000 centistoke), nejlépe však od 10^{-4} do $10^{-3} \text{ m}^2/\text{s}$ (od 100 do 1 000 centistoke). Polysiloxany o vysoké viskozitě, které nejsou tekoucí, mohou být účinně naneseny na absorpční prostředek tím, že se například vytvoří emulze polysiloxanu v surfaktantu nebo se vytvoří roztok siloxanu pomocí rozpouštědla, jako např. hexanu, který je zmíněn pouze jako příklad. Jednotlivé způsoby nanášení polysiloxanových změkčovadel na absorpční prostředky budou dále zmíněny podrobněji.

Polysiloxanové sloučeniny, navržené pro použití v tomto vynálezu, jsou popsány v patentu USA 5 059 282. Mezi

nejvhodnější polysiloxanové sloučeniny patří polymethylsiloxanové sloučeniny s fenylovou skupinou (např. Dow Corning 556 Cosmetic-Grade Fluid: polymethylfenylsiloxan) a nebo dimethicony s cetylovou nebo stearylovou skupinou, jako např. polysiloxanové tekutiny Dow 2502 a Dow 2503. Kromě těchto substitucí fenylovou nebo alkylovou skupinou, může být provedena také účinná substituce aminovou, karboxylovou, hydroxylovou, etherovou, polyetherovou, aldehydovou, ketonovou, amidovou, esterovou a thiolovou skupinou. Z této řady účinných substituentů se dává přednost skupinám fenolovým, aminovým, alkylovým, karboxylovým a hydroxylovým, ale nejvhodnější jsou skupiny fenolové.

Vhodnými změkčovadly typu mastných esterů jsou polyolpolyestery, které jsou popsány v patentu USA 5 609 587. Příklady polyolů jsou, mimo jiné, polyhydrické sloučeniny, jako např. pentaerytritol, cukry, jako např. rafinosa, maltodextrosa, galaktosa, sacharosa, glukosa, laktosa, manna a erytroza, a cukerné alkoholy, jako např. erytritol, xylitol, malitol, mannitol a sorbitol. Z takových polyolů jsou vytvářeny estery mastných kyselin a/nebo jiných organických zbytků, které mají od 2 do 30 uhlíků. Přestože není nezbytné, aby byly všechny hydroxylové skupiny polyolu esterifikovány, mají navrhovaná polyolpolyesterová změkčovadla téměř všechny (např. nejméně 85 %) hydroxylové skupiny esterifikovány. Velmi vhodné jsou sacharóзовые polyolpolyestery, jako např. sacharóзовый polykotonát, sacharóзовый polysoját a sacharóзовый polybehenát. Také směsi těchto polyolpolyesterů jsou vhodnými změkčovadly pro navrhovaný vynález.

Vhodnými hydratačními složkami jsou glycerín, propylenglykol, sorbitol, trihydroxystearin apod.

Množství změkčovacla, které může být obsaženo v dermatologické složce závisí na řadě faktorů, např. na typu příslušného změkčovacla, požadovaném účinku na kůži, dalších komponentách složky apod. Složka obsahuje změkčovacla od 0 do 100 % hmotnosti. Navrhované rozmezí je však od 10 do 95 %, lépe však od 20 do 80 % a nejlépe od 40 do 75 % hmotnosti.

Další prospěšnou komponentou dermatologické složky obsahující inhibitor enzymu může být látka, která je schopná znehybnit složku (včetně inhibitoru enzymu, navrženého změkčovacla a/nebo jiné ochranné látky) v požadované oblasti uvnitř nebo na upraveném prostředku. Protože některé z navrhovaných komponent složky jsou při 20°C tvárné nebo kapalné, budou mít sklon téci nebo migrovat i při vystavení pouze mírnému tření. Pokud jsou nanесeny na povrch dotýkající se uživatele nebo jinou oblast absorpčního prostředku v rozpuštěném nebo tekutém stavu, tak obvykle v dané oblasti nezůstanou, protože mají sklon k přesunu a přetečení do nežádoucí oblasti prostředku.

Pokud se některá z komponent dermatologické složky přesune do nitra prostředku, může to mít nežádoucí vliv na absorbanci jádra prostředku díky hydrofobním vlastnostem, např. změkčovadel nebo jiných komponent použitých v dermatologické složce prostředku navrhovaného vynálezu. To také znamená, že k dosažení požadovaného účinku musí být na prostředek nanесeno větší množství dermatologické složky. Zvýšení obsahu dermatologické složky nezvyšuje pouze náklady, ale i zesiluje nežádoucí účinek na

absorbanci jádra prostředku a nežádoucí přenos složky během zpracování upraveného prostředku.

Znehybňující činidlo působí proti sklonu komponent dermatologické složky přesunovat se nebo odtékat tím, že je zadržuje na povrchu nebo v oblasti prostředku na kterou byly naneseny. To je částečně způsobeno tím, že znehybňující činidlo zvyšuje bod tání a/nebo viskozitu složky nad hodnoty pohyblivých komponent. Protože je znehybňující činidlo obvykle mísitelné se změkčovadlem (nebo rozpustné ve změkčovadle pomocí vhodného emulgátoru), může zadržet změkčovadlo na povrchu, který se dotýká uživatele nebo v oblasti, na kterou je naneseno.

Je výhodné "uzamknout" znehybňující činidlo na povrchu, který se dotýká uživatele nebo v oblasti prostředku, na kterou je naneseno. Toho může být dosaženo při použití znehybňujících činidel, které se po aplikaci na prostředek rychle zpevní. Dále může být, pro urychlení krystalizace činidla, použito zevní chlazení prostředku pomocí ventilátorů, větráků apod.

Znehybňující činidlo by mělo mít takový profil tání, aby byla složka při teplotě okolí tuhá nebo polotuhá. Navrhovaná znehybňující činidla by tedy měla mít bod tání nejméně 35°C. Při této teplotě nebude mít znehybňující činidlo sklon se přesunovat nebo téci. Navrhovaná znehybňující činidla mají body tání nejméně 40°C. Zpravidla má znehybňující činidlo bod tání v rozmezí od 50°C do 150°C.

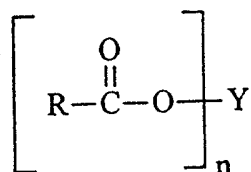
Znehybňující činidla mohou být vybrány z celé řady látek, pokud inhibiční vlastnosti dermatologické složky mají pozitivní účinek na

kůži zde popsany. Je zjištěno, že některá změkčovadla nebo třídy změkčovadel mají takové vlastnosti tání, že jsou vhodná jako znehybňující činidla. Takové látky mohou splňovat funkce změkčovadla i znehybňujícího činidla. Navrhované znehybňující činidlo bude patřit do skupiny obsahující mastné alkoholy $C_{14}-C_{22}$, mastné kyseliny $C_{12}-C_{22}$, ethoxyláty mastných alkoholů $C_{12}-C_{22}$ a jejich směsi, které mají průměrný stupeň ethoxylace od 2 do 30. Mezi navrhovaná znehybňující činidla patří mastné alkoholy $C_{16}-C_{18}$, nejlépe krystalické látky s vysokým bodem tání zvolené ze skupiny obsahující cetylalkohol, stearylalkohol, behenylalkohol a jejich směsi. (Lineární struktura těchto látek může urychlit tuhnutí na upraveném absorpčním prostředku.) Dává se přednost směsím cetylalkoholu a stearylalkoholu. Dalšími navrhovanými znehybňujícími činidly jsou mastné kyseliny $C_{16}-C_{18}$, nejlépe ze skupiny obsahující kyselinu palmitovou, kyselinu stearovou a jejich směsi. Dává se přednost směsím kyseliny palmitové a stearové. Mezi další navrhovaná znehybňující činidla patří ethoxyláty mastných alkoholů $C_{16}-C_{18}$ s průměrným stupněm ethoxylace od 5 do 20. Mastné alkoholy a mastné kyseliny by měly být lineární. Je důležité, že tato navrhovaná znehybňující činidla, jako např. mastné alkoholy $C_{16}-C_{18}$ zvyšují úroveň krystalizace složky, čímž působí urychlení krystalizace na povrchu substrátu.

Dalšími typy znehybňujících činidel, které zde mohou být použity jsou polyhydroxyestery mastných kyselin, polyhydroxyamidy mastných kyselin a jejich směsi. Navrhované estery a amidy mají tři nebo více volných hydroxylových skupin na polyhydroxylové skupině a mají zpravidla neiontový charakter. Vzhledem k možné kožní precitlivělosti uživatelů prostředků na

které byla složka nanесena, měli by být tyto estery a amidy poměrně jemné a nedráždivé vůči pokožce.

Polyhydroxyestery mastných kyselin, vhodné pro použití v navrhovaném vynálezu, mají tento vzorec:



kde R je uhlovodíková skupina C₅-C₃₁, zpravidla lineární řetězec C₇-C₁₉ alkylu nebo alkenylu, lépe však lineární řetězec C₉-C₁₇ alkylu nebo alkenylu, nejlépe však lineární řetězec C₁₁-C₁₇ alkylu nebo alkenylu nebo jejich směsi. Y je polyhydroxylová uhlovodíková skupina s uhlovodíkovým řetězcem, který má nejméně 2 volné hydroxyly přímo spojené s řetězcem a n je nejméně 1. Vhodné Y skupiny mohou být odvozeny do polyolů, jako např. glycerolu, pentaerytritolu, cukrů, jako např. rafinosy, maltodextrosy, galaktosy, sacharosy, glukosy, xylosy, fruktosy, maltosy, laktosy, mannosy a erytrosy, cukerných alkoholů, jako např. erytritolu, xylitolu, malitolu, mannitolu a sorbitolu a anhydridů cukerných alkoholů, jako např. sorbitanu.

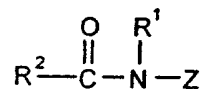
Jedna třída vhodných polyhydroxyesterů mastných kyselin zahrnuje některé estery sorbitanu, zejména sorbitanové estery nasycených mastných kyselin C₁₆-C₂₂. Tyto sorbitanové estery obvykle obsahují, vzhledem ke způsobu, kterým jsou vyráběny, směsi mono-, di-, tri-, atd. esterů. Náznornými příklady vhodných sorbitanových esterů jsou sorbitanové palmitáty (např. SPAN 40), sorbitanové stearáty (např. SPAN 60) a sorbitanové behenáty, které

zahrnují jednu nebo více mono-, di- a tri- esterových variant těchto sorbitanových esterů, např. sorbitan mono-, di- a tri- palmitát, sorbitan mono-, di- a tri- stearát, sorbitan mono-, di- a tri- behenát, stejně tak jako směsi sorbitanových mono-, di- a tri- esterů mastných kyselin. Mohou být použity také směsi různých sorbitanových esterů, jako např. sorbitan palmitáty se sorbitan stearáty. Obzvlášť vhodnými estery sorbitanu jsou sorbitan stearáty, zpravidla jako směsi mono-, di- a tri- esterů (plus nějaké tetraestery), jako např. SPAN 60 a sorbitan stearáty prodávané pod označením GLYCOMUL-S firmy Lonza, Inc. Ačkoliv tyto sorbitanové estery zpravidla obsahují směsi mono-, di- a tri- esterů, plus nějaké tetraestery, obvykle v těchto směsích převažují mono- a di- estery.

Další třída vhodných polyhydroxyesterů mastných kyselin obsahuje některé monoestery glycerylu, zejména glycerylové monoestery nasycených mastných kyselin C_{16} - C_{22} , jako např. glycerylmonostearát, glycerylmonopalmitát a glycerylmonobehenát. Směsi monoesterů glycerylu obsahují, stejně tak jako estery sorbitanu, obvykle nějaké di- a triestery. Avšak aby tyto směsi byly použitelné v tomto vynálezu, měli by obsahovat především monoestery glycerylu.

Další třída vhodných polyhydroxyesterů mastných kyselin obsahuje sacharosové estery mastných kyselin, zejména sacharosové estery mastných kyselin C_{12} - C_{22} . Obzvlášť vhodné jsou monoestery a diestery sacharosy a také sacharosové mono- a distearáty a sacharosové mono- a dilauráty.

Polyhydroxyamidy mastných kyselin vhodné pro použití v tomto vynálezu mají tento vzorec:



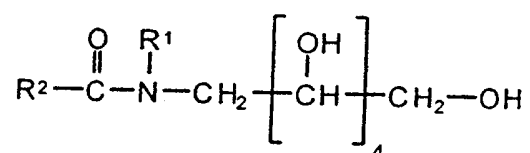
kde R^1 je H, C_1 - C_4 uhlovodík, 2-hydroxyethyl, 2-hydroxypropyl, methoxyethyl, methoxypropyl nebo jejich směsi, zejména C_1 - C_4 alkyl, methoxyethyl nebo methoxypropyl, lépe však C_1 nebo C_2 alkyl nebo methoxypropyl, nejlépe C_1 alkyl (tj. methyl) nebo methoxypropyl a R^2 je uhlovodíková skupina C_5 - C_{31} , zpravidla lineární řetězec C_7 - C_{19} alkylu nebo alkenylu, lépe však lineární řetězec C_9 - C_{17} alkylu nebo alkenylu, nejlépe lineární řetězec C_{11} - C_{17} alkylu nebo alkenylu nebo jejich směsi a Z je polyhydroxylový uhlovodík, jenž má lineární řetězec s nejméně 3 hydroxylovými skupinami přímo spojenými s řetězcem. Viz patent USA 5 174 927, který popisuje tyto polyhydroxyamidy mastných kyselin a jejich přípravu.

Skupina Z je odvozena z redukčního cukru v reakci redukční aminace, nejlépe glycitylu. Vhodnými redukčními cukry jsou glukosa, fruktosa, maltosa, laktosa, galaktosa, mannos a xylosa. Kromě těchto cukrů mohou být použity také kukuřičný sirup s vysokým obsahem dextrosy, kukuřičný sirup s vysokým obsahem fruktosy a kukuřičný sirup s vysokým obsahem maltosy. Z těchto kukuřičných sirupů může být vytvořena směs cukerných komponent pro Z skupinu.

Skupina Z je zvolena z množiny, která obsahuje $-\text{CH}_2-(\text{CHOH})_n-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}_2(\text{CH}_2\text{OH})-((\text{CHOH})_{n-1})-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}_2\text{OH}-\text{CH}_2-(\text{CHOH})_2(\text{CHOR}^3)-(\text{CHOH})-\text{CH}_2\text{OH}$, kde n je celé číslo do 3 do 5 a R^3 je H nebo cyklický nebo alifatický monosacharid. Obzvlášť vhodné jsou glycityly, kde n je 4, zejména $-\text{CH}_2-(\text{CHOH})_4-\text{CH}_2\text{OH}$.

Ve výše uvedeném vzorci může být R^1 například N-methyl, N-ethyl, N-propyl, N-isopropyl, N-butyl, N-2-hydroxyethyl, N-methoxypropyl nebo N-2-hydroxypropyl. R^2 může být zvoleno tak, například, aby vznikly kokamidy, stearamidy, oleamidy, lauramidy, myristamidy, kaprikamidy, palmitamidy, tallowamidy apod. Skupina Z může být 1-deoxyglucityl, 2-deoxyfruktityl, 1-deoxymaltityl, 1-deoxylaktityl, 1-deoxygalaktityl, 1-deoxymanityl, 1-deoxymalto-triotityl apod.

Nejvhodnější polyhydroxyamidy mastných kyselin mají tento obecný vzorec:



kde R^1 je methyl nebo methoxypropyl, R^2 je $\text{C}_{11}-\text{C}_{17}$ alkylová nebo alkenylová skupina s lineárním řetězcem. Patří sem N-lauryl-N-methyl glukamid, N-lauryl-N-methoxypropyl glukamid, N-kokoyl-N-methyl glukamid, N-kokoyl-N-methoxypropyl glukamid, N-palmityl-N-methoxypropyl glukamid, N-tallowyl-N-methyl glukamid nebo N-tallowyl-N-methoxypropyl glukamid.

Jak bylo dříve uvedeno potřebují některá znehybňující činidla emulgátor pro rozpuštění ve změkčovadle. To se vztahuje především na některé glukamidy, jako např. N-alkyl-N-methoxypropyl glukamidy s hodnotou HLB nejméně 7. Vhodnými emulgátory jsou zpravidla ty, které mají hodnotu HLB menší než 7. V tomto ohledu bylo zjištěno, že estery sorbitanu, jako např. stearát sorbitanu, které mají hodnotu HLB 4,9 a nižší jsou vhodné pro rozpouštění glukamidových znehybňujících činidel ve vazelině. Dalšími vhodnými emulgátory jsou steareth-2 (polyethylenglykolové ethery stearylalkoholu, které jsou vytvořeny podle vzorce $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$, kde průměrná hodnota n je 2, sorbitan tristearát, isosorbid laurát a glycerylmonostearát. Emulgátor může být obsažen v takovém množství, které umožní rozpuštění znehybňujícího činidla ve změkčovadle a vytvoření homogenní směsi. Například směs asi 1:1 N-kokoyl-N-methyl glukamidu a vazelíny, která se běžně nerozpustí do jednofázové směsi, se po přidání 20% Stearethu-2 a sorbitanu tristearátu jako emulgátoru rozpustí do jednofázové směsi.

Další typy přísad, které mohou být použity jako znehybňující činidla, buď samotná nebo v kombinaci s výše zmíněnými znehybňujícími činidly, jsou vosky, jako např. vosk z karnaubové palmy, zemní vosk, včelí vosk, kandelila, parafín, ceresin, esparto, ouricuri, rezovosk, izoparafín a další známé těžené a minerální vosky. Vysoký bod tání těchto látek umožňuje znehybnit složku na žádaném povrchu nebo oblasti prostředku. Dobrymi znehybňujícími činidly jsou také mikrokrytalické vosky. Mikrokrytalické vosky pomáhají "uzamknout" nízkomolekulární uhlovodíky uvnitř dermatologické složky. Vhodný je vosk parafínový. Příkladem

alternativního znehybňujícího činidla je parafínový vosk, jako např. Parrafin S.P. 434 od Strahl and Pitsch Inc.

Množství znehybňujícího činidla, které bude obsaženo ve složce závisí na řadě faktorů, včetně obsahu účinných látek (např. změkčovadel), typu příslušného znehybňujícího činidla, pokud je použito, dalších komponentách složky, na tom zda je potřebný emulgátor k rozpuštění znehybňujícího činidla v dalších komponentách a jiných podobných faktorech. Pokud je znehybňující činidlo použito, potom je zpravidla jeho obsah ve složce 5 až 90%. Lépe je pokud je obsah znehybňujícího činidla ve složce od 5 do 50%, nejlépe od 10 do 40%.

Je žádoucí, aby aspoň část vrchní vrstvy prostředku byla vyrobena z hydrofilní látky, jenž by usnadnila přenos tekutin (např. moče). Dále je také žádoucí, aby dermatologická složka byla dostatečně smáčivá a umožnila rychlý přenos tekutin skrz vrchní vrstvu. Mohou být použity také hydrofobní dermatologické složky, ale pouze do té míry, aby nedošlo k porušení potřebných vlastností vrchní vrstvy. (Jednou z možností je například nanesení složky pouze na část vrchní vrstvy.) To sníží pravděpodobnost, že tělní výměšky odtečou z takto upravené vrchní vrstvy dříve, než mohou být absorbovány skrz vrchní vrstvu do absorpčního jádra.

Pokud se požaduje hydrofilní složka, může být nutné přidat pro zlepšení smáčivosti hydrofilní surfaktant (nebo směs hydrofilních surfaktantů), a to v závislosti na příslušných komponentách použitých ve složce. Ala některá znehybňující činidla, jako např. N-kokoyl-N-methoxypropyl glukamid mají hodnoty HLB nad 7 a jsou dostatečně smáčivé i bez přidání hydrofilního surfaktantu. Jiná

znehýbňující činidla, jako např. mastné alkoholy C_{16} - C_{18} s hodnotami HLB pod 7 mohou ke zlepšení smáčivosti vyžadovat přidání hydrofilního surfaktantu. Podobně musí být hydrofilní surfaktant přidán i k hydrofobnímu změkčovačce, jako např. vazelině, pokud se vyžaduje, aby byla složka hydrofilní. Samozřejmě, že nemá význam se zabývat smáčivostí, pokud povrchem dotýkajícím se uživatele není vrchní vrstva prostředku nebo pokud jsou požadované vlastnosti vrchní vrstvy zajištěny jiným způsobem (např. částečným nanesením).

Vhodné hydrofilní surfaktanty by měly mísitelné s ostatními komponentami dermatologické složky tak, aby vytvářeli směsi. Kvůli možné přecitlivělosti kůže uživatelů absorpčních prostředků s nanesenou dermatologickou složkou, by měly být tyto surfaktanty poměrně jemné a nedráždivé. Tyto hydrofilní surfaktanty by měly být neiontové, aby nedráždily kůži, ale také, aby se zamezilo nežádoucím účinkům na další části upraveného prostředku. Např. snížení pevnosti v tahu, kvality adhezivních spojů apod.

Vhodné neiontové surfaktanty by měly být po nanesení složky na prostředek nepohyblivé a jejich hodnoty HLB by měly být v rozmezí od 4 do 20, lépe však od 7 do 20. Aby byly nepohyblivé, mají tyto neiontové surfaktanty bod tání zpravidla vyšší než jsou teploty, kterým jsou absorpční prostředky vystaveny během skladování, přepravy, prodeje a použití, např. nejméně 30°C . V tomto ohledu mají neiontové surfaktanty body tání zpravidla podobné jako dříve popsaná znehýbňující činidla.

Vhodnými neiontovými surfaktanty pro použití ve složkách nanesených na prostředek, aspoň v oblasti výtoku, jsou

alkylglykosidy, alkylglykosidové ethery popsané v patentu USA 4 011 389, alkylpolyethoxylové estery, jako např. Pegosperse 1000MS od Lonza, Inc., Fair Lawn, New Jersey, ethoxylové sorbitan mono-, di- a/nebo tri- estery mastných kyselin C_{12} - C_{18} s průměrným stupněm ethoxylace od 2 do 20, nejlépe od 2 do 10, jako např. TWEEN 60 (sorbitanové estery stearové kyseliny s průměrným stupněm ethoxylace 4) a produkty kondenzace alifatických alkoholů s 1 až 54 moly ethylenoxidu. Alkylový řetězec alifatického alkoholu má zpravidla lineární konfiguraci a obsahuje od 8 do 22 atomů uhlíku. Obzvláště vhodné jsou produkty kondenzace alkoholů s alkylovou skupinou obsahující od 11 do 22 atomu uhlíku s 2 až 30 moly ethylenoxidu na mol alkoholu. Příklady takových ethoxylovaných alkoholů jsou produkty kondenzace myristylalkoholu se 7 moly ethylenoxidu na mol alkoholu, produkty kondenzace kokosového alkoholu (směs mastných alkoholů s alkylovými řetězci o délce 10 až 14 atomů uhlíku) s 6 moly ethylenoxidu. Řada vhodných ethoxylových alkoholů je komerčně dostupná, včetně Tergitolu 15-S-9 (produkt kondenzace lineárních alkoholů C_{11} - C_{15} s 9 moly ethylenoxidu) prodáváný Union Carbide Corporation, KYRO EOB (produkt kondenzace lineárních alkoholů C_{13} - C_{15} s 9 moly ethylenoxidu) od The Procter & Gamble Co., surfaktanty NEODOL od Shell Chemical Co., především NEODOL 25-12 (produkt kondenzace lineárních alkoholů C_{12} - C_{15} s 12 moly ethylenoxidu) a NEODOL 23-6.5T (produkt kondenzace lineárních alkoholů C_{12} - C_{13} s 6,5 moly ethylenoxidu, který byl destilován pro odstranění nečistot) a obzvláště surfaktanty PLURAFAC do BASF Corp., zejména PLURAFAC A-38 (produkt kondenzace lineárního alkoholu C_{18} s 27 moly ethylenoxidu). (Některé hydrofilní surfaktanty, především ethoxylované alkoholy, jako např. NEODOL 25-12, mohou působit jako alkylethoxylátová změkčovadla).

Dalšími vhodnými příklady ethoxyalkoholových surfaktantů jsou surfaktanty Brij a jejich směsi, především Brij 72 (tj. Steareth-2) a Brij 76 (tj. Steareth-10). Dále mohou být jako hydrofilní surfaktanty použity také směsi ethoxylovaného cetylalkoholu a stearylalkoholu s průměrným stupněm ethoxylace od 10 do 20.

Dalším surfaktantem vhodným pro použití ve složce je Aerosol OT, dioctylester sodné sulfosukcinylové kyseliny prodáváný American Cyanamid Company.

Jiným vhodným surfaktantem jsou kopolymery silikonu, jako např. General Electric SF 1188 (kopolymer polydimethylsiloxanu a polyoxyalkylenového etheru) a General Electric SF 1228 (silikonový kopolymer polyetheru). Tyto silikonové surfaktanty mohou být použity v kombinaci s dalšími typy hydrofilních surfaktantů zmíněnými výše, jako např. ethoxylovanými alkoholy. Bylo zjištěno, že tyto silikonové surfaktanty jsou účinné již při koncentraci 0,1 %, lépe však do 0,25 do 1,0 % hmotnosti složky.

Pokud je zapotřebí použít hydrofilní složku, je množství hydrofilního surfaktantu, nutné ke zvýšení smáčivosti složky na požadovanou úroveň, závislé částečně na hodnotě HLB a množství znehybňujícího činidla, pokud je použito, hodnotě HLB použitého surfaktantu a dalších podobných faktorech. Ke zvýšení smáčivosti může složka obsahovat od 0,1 do 50 % hydrofilního surfaktantu. Pro zvýšení smáčivosti však složka obvykle obsahuje od 1 do 25 %, lépe však od 10 do 20 % hydrofilního surfaktantu.

Složka může obsahovat další komponenty běžně přítomné v emulzích, mastích, roztocích, suspenzích atd., tohoto typu. Mezi

tyto komponenty patří voda, modifikátory viskozity, parfémy, desinfekční antibakteriální látky, antivirové látky, vitamíny, farmaceutické látky, látky vytvářející povlak, deodoranty, zakalující látky, adstringencia, rozpouštědla, konzervační látky apod. Dále mohou být pro prodloužení expirace složky přidány stabilizátory, jako např. deriváty celulózy, proteiny a lecitin. Všechny tyto látky jsou v oboru dobře známé jako přísady a mohou být v příslušných množstvích použity v těchto složkách.

Pokud je použita dermatologická složka s vodním základem, je nutné použít konzervační prostředek. Vhodnými konzervačními prostředky jsou propylparaben, methylparaben, benzylalkohol, benzylkonium, tribazický kalciumfosfát, BHT nebo kyseliny, jako např. kyselina citronová, vinná, maleová, mléčná, malová, benzoová, salicylová apod. Mezi vhodná činidla zvyšující viskozitu patří některé látky popsané jako účinná znehybňující činidla. Dalšími vhodnými činidly zvyšujícími viskozitu jsou, např. alkylgalaktomanan, oxid křemičitý, mastek, křemičitan hořečnatý, sorbitol, koloidní silikondioxid, křemičitan hořečnatohlinitý, stearát zinečnatý, alkohol z vlněného vosku, sorbiton, seskvioleát, cetylhydroxyethylcelulóza a další upravené celulózy. Vhodnými rozpouštědly jsou propylenglykol, glycerín, cyklomethikon, polyethylenglykoly, hexalenglykol, diol a rozpouštědla s více hydroxyskupinami. Vhodnými vitamíny jsou A, D₃, E, B₅ a E acetát.

IX. Nanesení složky na prostředek

Absorpční prostředek musí být upraven tak, aby se, během nošení, přenesla, aspoň část dermatologické složky s obsahem inhibitoru proteázy, z prostředku na kůži uživatele. A proto se

dermatologická složka nanáší, buď přímo na jeden nebo více povrchů, které jsou v kontaktu s uživatelem nebo se nanáší na jiných místech nebo jiným způsobem tak, aby byla snadno dostupná pro přenos z jednoho nebo více povrchů, které se dotýkají uživatele během nošení. (Například látky uložené pod povrchem, který se dotýká uživatele, opouzdřené složky atd.) Je samozřejmé, že pro zefektivnění přenosu složky do oblastí nejvíce zatížených, je nutné nanést složku na části vrchní vrstvy a manžety, které jsou v kontaktu s hýžděmi, genitálem, oblastí třísel a oblastí anální. Navíc může být složka nanesena na jiné oblasti prostředku, aby došlo k přenosu na boky, břicho, záda, pas, stehna atd. Mezi vhodné způsoby patří nastříkávání, potiskování (např. flexografické potiskování), potahování (např. štěrbínové potahování, otiskové potahování), protlačování nebo kombinace těchto aplikačních způsobů, např. nastříkávání dermatologické složky na rotujícím povrchu, jako např. lisovacím válečku, který potom přenáší složku do požadované části prostředku. Dermatologická složka s obsahem inhibitoru enzymu může být nanesena jako tuhá látka pomocí některého z řady postupů, např. protlačování.

Pokud má složka hydrofobní charakter, může se při nanášení na vrchní vrstvu prostředku stát, že vrstva nebude v oblasti, která odpovídá výtokové oblasti prostředku zcela nasycena složkou. Pokud je vrchní vrstva nasycena složkou ve výtokové oblasti, potom je velké riziko, že složka bude blokovat otvory vrchní vrstvy, čímž se sníží schopnost vrchní vrstvy přenášet tekutiny do níže uloženého absorpčního jádra. Nasycení vrchní vrstvy je také nežádoucí pro dosažení léčebného a/nebo ochranného efektu. Podobně nemusí být žádoucí ani nasycení dalších komponent prostředku. Vhodnými způsoby aplikace jsou ty způsoby, při kterých

dojde k nanesení složky především na vnější povrch vrchní vrstvy prostředku.

Minimální množství složky obsahující inhibitor enzymu, která je nanesena na povrch prostředku dotýkající se uživatele dle vynálezu, odpovídá množství dostatečnému pro zajištění léčebného, ochranného a/nebo stav kůže zlepšujícího efektu. Množství nanesené složky závisí na různých faktorech, včetně látky upravovaného prostředku, relativní části povrchu dotýkajícího se uživatele, jenž není pokryt složkou, složení složky apod. Obecně řečeno, pokud jsou použity poměrně hydrofobní složky a jsou naneseny na celou vrchní vrstvu, potom je množství nanesené složky v rozmezí od $0,016 \text{ mg/cm}^2$ do $2,33 \text{ mg/cm}^2$, lépe však od $0,16 \text{ mg/cm}^2$ do $1,55 \text{ mg/cm}^2$. Je zřejmé, že větší množství dermatologické složky může být naneseno na další části prostředku, kde není poškozena distribuce tekutin (např. manžety, pásová část, boční díly atd.). Dále je zřejmé, že poměrně hydrofilní složky mohou být na vrchní vrstvu naneseny ve větším množství, aniž by došlo k výraznějšímu postižení distribučních vlastností. Naopak větší množství hydrofilní složky může být nežádoucí, pokud je naneseno na části (např. manžeta, pas) jiné než je vrchní vrstva, kde by mohlo dojít k nasávání výměšků ke hranám a následnému úniku tekutin.

Protože je složka na povrchu zcela znehyněna stačí pouze její malé množství k tomu, aby došlo k přenosu účinného množství inhibitoru enzymu. Domníváme se, že tato malá množství stačí k dosažení žádaného účinku na kůži, protože je složka během nošení trvale, samovolně uvolňována. To znamená, že možnost použít poměrně nízké hladiny dermatologické složky, způsobuje, že je

vrchní vrstva prostředku schopna udržet své přenosové vlastnosti v oblasti výtoku tekutin.

Složka může být nanesena na povrch dotýkající se uživatele nejednotně. Výrazem "nejednotně" se míní, že množství, umístění, vzor rozložení atd., složky, může být na povrchu dotýkajícím se uživatele odlišné a může se lišit i v dalších oblastech prostředku. Například pro udržení distribučních vlastností vrchní vrstvy může být nezbytné nanést složku nejednotně, obzvláště pokud má tato hydrofobní charakter. Z toho důvodu musí mít některé části upraveného povrchu prostředku (a jeho oblasti), větší nebo menší množství složky, včetně částí na které složka není nanesena. V jednom takovém provedení, kde je složka poměrně hydrofobní, má povrch vrchní vrstvy oblasti, na které složka nebyla nanesena, a to především v oblasti vrchní vrstvy, která odpovídá oblasti rozkroku. Oblast rozkroku prostředku, tak jak je zde použita, je obdélník, definovaný níže, který je vystředěn podélně i příčně podle bodu rozkroku. "Bod rozkroku" je určen při oblečení prostředku stojícím uživatelem a natažením vlákna kolem nohou ve tvaru osmičky. Bod prostředku, který odpovídá průniku vláken se považuje za bod rozkroku. (Je zřejmé, že bod rozkroku je určen umístěním absorpčního prostředku na uživatele určeným způsobem a stanovením místa, kde se zkřížená vlákna dotknou prostředku). U inkontinenčních prostředků (např. plenky, inkontinenční prostředky pro dospělé) odpovídá délka oblasti rozkroku 40 % celkové délky absorpčního prostředku (tj. v rozměru y). U menstruačních vložek odpovídá délka oblasti rozkroku 80 % celkové délky absorpčního prostředku. Šířka oblasti rozkroku je stejná jako šířka nejširší části absorpčního jádra měřená v bodě rozkroku. (Části "absorpčního jádra" jsou látky, které se účastní absorpce, přenosu, distribuce

a/nebo uložení tělních tekutin. Výraz absorpční jádro nezahrnuje vrchní vrstvu nebo spodní vrstvu absorpčního prostředku.) Příkladem může být inkontinenční prostředek o délce 50 cm a šířce jádra v oblasti bodu rozkroku 10 cm, oblast rozkroku je pravoúhlá, vystředěná na bod rozkroku a její délka je 20 cm a šířka 10 cm.

Je překvapivé, že při nejednotném nanesení složky na vrchní vrstvu nebo její části (např. mikroskopické nebo makroskopické oblasti, kde není nanesena žádná složka), je přenášena složka na uživatele dokonce i v oblastech kůže, které odpovídají neupraveným okrskům vrchní vrstvy nebo jejích částí. Množství a rovnoměrnost složky přenesené na kůži závisí na řadě vlivů, včetně, např. způsobu nanesení dermatologické složky, kontaktu kůže uživatele a upravené oblasti, tření, které vzniká během nošení mezi kůží uživatele a upravenou oblastí, teple vytvořeném uživatelem, které zesiluje přenos složky, vlastnostech složky, látkách, které vytváří složku apod.

Při nejednotném nanášení složky může být použita řada vzorů, včetně, např. nanesení malých kapek (např. nastříkáním), drobných teček (např. gravírovaným tiskem), podélných nebo příčných proužků (vytvořené dotekovým šterbinovým potažením), spirál, které se posunují příčně nebo podélně atd., vzorového tisku atd. V těchto provedeních, kde vrchní vrstva obsahuje oddělené, neupravené okrsky, může rozsah otevřené části oblasti vrchní vrstvy, která odpovídá oblasti rozkroku, značně kolísat. ("Rozsah otevřené části" vrchní vrstvy se určí (i) změřením povrchu vrchní vrstvy, který patří do oblasti rozkroku, (ii) změřením celkového povrchu neupravené oblasti v této části vrchní vrstvy a (iii) vydělení výsledku měření z (ii) výsledkem měření z (i). Zde použitý

výraz "neupravený" znamená, že oblast vrchní vrstvy obsahuje méně než $0,0016 \text{ mg/cm}^2$ složky. V tomto ohledu může být rozsah otevřené části od 1 % do 99 %, od 5 % do 95 %, od 10 % do 90 %, od 15 % do 85 %, od 20 % do 80 %, od 25 % do 75 %, od 30 % do 70 % nebo od 35 % do 65 %. Rozsah otevřené části nezbytný k dosažení požadovaných účinků složky a požadovaných distribučních vlastností vrchní vrstvy, je do značné míry určován vlastnostmi složky (především jejím složením a poměrem hydrofobních a hydrofilních vlastností). Zkušený odborník ocení, že žádaný rozsah otevřené části je možné snadno určit jednoduchým experimentem.

Složky, které jsou poměrně hydrofobní a nemají být nanесeny na oblasti vrchní vrstvy, se nejdříve nanášejí na vrchní vrstvu prostředku v množství od $0,0078 \text{ mg/cm}^2$ do $5,43 \text{ mg/cm}^2$, lépe však od $0,16 \text{ mg/cm}^2$ do $3,88 \text{ mg/cm}^2$ a nejlépe od $0,62 \text{ mg/cm}^2$ do $3,1 \text{ mg/cm}^2$. Je zřejmé, že složky, které jsou poměrně hydrofilní, mohou být nanášeny ve větším množství, aniž by byly výrazně postiženy distribuční vlastnosti vrchní vrstvy. Samozřejmě také prostředky s poměrně vysokým procentem otevřených oblastí v rozkroku, mohou mít nanесena větší množství složky, aniž by byly výrazně postiženy distribuční vlastnosti vrchní vrstvy.

V jednom navrhovaném provedení je vrchní vrstva potažena podélnými proužky složky. Tyto podélné proužky (nebo spirály) jsou od sebe odděleny podélnými proužky, kde je složky nanесeno málo nebo žádná. V těchto provedeních má zpravidla každý proužek složky šířku od 3 mm do 20 mm, lépe však od 3 mm do 13 mm a šířka proužků neobsahujících složku je obvykle od 3 mm do 26 mm, lépe však od 4 mm do 13 mm. Tato rozmezí jsou použitelná pro

běžné dětské plenky. U větších výrobků, jako např. inkontinenčních prostředků pro dospělé, mohou být tato rozmezí větší.

Dermatologická složka může také být v nejednotném vzoru nanесena na další části prostředku. V těchto případech může být otevřená oblast vypočítána z obdélníku určeného obvodem dermatologické složky.

Složka může být nanесena na prostředek kdykoliv během skládání. Složka může být například nanесena na hotový absorpční výrobek před jeho zabalením. Složka může být také nanесena na danou část (např. vrchní vrstva, manžety, bočnice, pas atd.) na místě výměny nebo dodavatelem látky, předtím než je spojena s dalšími částmi do hotového absorpčního prostředku. Složka může být také nanесena na další oblasti prostředku tak, že bude možný její přechod během nošení na jeden nebo více povrchů dotýkajících se uživatele.

Složka se zpravidla nanáší na prostředek ve svém rozehrátém stavu, protože její teplota tání je podstatně vyšší než teplota okolí. Složka je obvykle před nanášením na prostředek ohřána na teplotu v rozmezí od 35°C do 150°C, lépe však od 40°C do 100°C. Inhibitor enzymu může být ke složce přidán před nebo po jejím ohřátí. Pokud je přidán před ohřátím, musí být teplota zvolena tak, aby nedošlo k jeho denaturaci. Eventuelně může být inhibitor enzymu přidán k předehráté složce, u které již došlo k částečnému ochlazení na teplotu, která nepoškodí inhibitor enzymu, ale je dostatečná k nanесení složky na prostředek. Tekutá složka se, po svém nanесení na prostředek, nechá ochladit a ztuhnout. Postup nanášení složky je obvykle upraven tak, že chlazení je aktivní.

Při nanášení složky na prostředek se dává přednost štěrbínové potahování, nastříkování, gravírovanému potahování a protlačování. Jedním z těchto způsobů je štěrbínové potahování vrchní vrstvy složeného hotového prostředku.

X. Způsoby testování

A. Přenos dermatologické složky a inhibitoru proteázy na kůži uživatele

Přehled

Tento postup využívá odstranitelný kožní analog, který se umístí na kůži uživatele na určitý časový úsek. Kožní analog se potom odstraní a pomocí běžných analytických postupů se stanoví množství dermatologické složky nebo množství inhibitoru proteázy v extraktu z analogu získaném pomocí rozpouštědla. Tento postup je popsán pro použití u dětských plenek obsahujících dermatologickou složku s inhibitorem enzymu. Zkušený odborník dokáže stanovit příslušné změny u jiných dermatologických složek, inhibitorů proteáz, absorpčních prostředků nebo typů uživatelů.

Testování jedinci

Podle následujících znaků, by měly být vybrány, dvě přibližně stejné skupiny dětí mužského a ženského pohlaví. Mělo by být vybráno dostatečné množství dětí, aby bylo zajištěno, že při každé zkoušce bude nejméně patnáct jedinců, kteří dokončí všechny její části.

Podmínky začlenění

- a. Zdravé dítě.
- b. Pečující osoba ochotná, během trvání testu, nepoužívat v oblasti plenky roztoky, krémy, zásypy nebo jiné dermatologické přípravky.
- c. Děti, které nosí plenky po celý den.
- d. Pečující osoba ochotná vykoupat dítě den před testem ne dříve než je dokončen.
- e. Pečující osoba, která je ochotná upustit od plavání dítěte od večera před testem až do jeho dokončení.

Podmínky vyčlenění

- a. Dítě bylo během posledních čtyř dnů nemocné.
- b. Průjem (řídká stolice) během čtyř dnů před testem.
- c. Léky, které mohou zvýšit střevní vyprazdňování (např. orálně užívaná antibiotika, antimykotika, kortikosteroidy).
- d. Poškozená kůže v místě testování nebo kolem něho (např. popálení, aktivní kožní léze apod.).
- e. Známé alergie nebo podráždění z lepících nebo dermatologických složek.

Použitý materiál

Přenos in vivo

Kožní analog: dermatologická páska – TEGADERM Tape 1622W dostupná od 3M Health Cares, St. Paul, MN

Zásobník vzorku: sklenice s uzávěrem od VWR Scientific, West Chester, PA pod označením 15900-242

Prášek na uvolnění pásky: Baby powder (obsahující pouze mastek a vonnou kompozici) do Johnson & Johnson, New Brunswick, NJ

Chirurgické rukavice: od Best Manufacturing Co., Menlo GA, pod označením 6005PFM

Extrakce a rozbor dermatologické složky

Rozpouštědlo: dichlormethan od Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 27056-3

Stearylalkohol: Aldrich 25876-8

1-hexadekanol: Aldrich 25874-1

Lahvička na přípravu: 10 ml

Plynový chromatograf: vhodný je ionizační detektor od Hewlett Packard model 5890

Kolona: kapilární kolona Chrompack CP Sil-5 CB, 2 metry x 0,25 mm z křemičitého skla s filmem o tloušťce 0,12 μm (bez náhrad)

Přístrojové údaje systému: musí umožňovat opakované určení oblastí s nejvyššími hodnotami

Extrakce a rozbor typického inhibitoru (např. hexamidinu) enzymu (např. proteázy)

Rozpouštědlo: dichlormethan od Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 27056-3

Lahvička na přípravu: 10 ml

Kolona: Hewlett Packard Zorbax SB-CN s úzkým vývrtem 5 μm , 2,1 x 150 mm s Waters

Bondapack CN 10 μ m, ochranná kolona
3,9 x 20 mm

Přístrojové údaje systému: musí umožňovat opakované určení
oblastí s nejvyššími hodnotami

Způsob

Přenos in vivo

A. Potvrzení od pečující osoby, že dítě bylo během posledních 24 hodin vykoupáno a že na oblast krytou plenkou nebyly od té doby naneseny žádné roztoky, zásypy atd.

B. Natažení chirurgických rukavic, umístění dítěte na stůl a odstranění jeho plenek.

C. Otočení dítěte na bříško.

D. Odstranění krycí folie z pásky TEGADERM a jemné poprášení přilnavého povrchu s J&J Baby Powder (vše se provádí v chirurgických rukavicích, aby se zabránilo znečištění pásky). Nanesení dostatečného množství prášku v celém rozsahu pásky vyjma okrajů. (Tento krok se provádí proto, aby se zabránilo příliš agresivnímu přilnutí pásky ke kůži dítěte).

E. Obrázky 2a a 2b znázorňují umístění pásky TEGADERM, zde označené jako páska 700. Páska 700 se přiloží na pravou hýždí dítěte. Páska 700 se přiloží na nejvyšší místo hýždě dítěte v blízkosti gluteální rýhy. Pro měření přenosu ve dvou časových úsecích nebo pro měření účinku další plenky, může být přiložena

druhá páska 700. Pokud je použita druhá páska 700, potom je přiložena na levou hýžď stejným způsobem.

F. Výměna plenek se provádí podle následujícího protokolu: přenosový čas 3 hodiny – 1 plenka, přenosový čas 6 hodin – 2 plenky (výměna po 3 hodinách), přenosový čas 24 hodin *ad lib* pečující osoby. U přenosového času 24 hodin je nutné postupovat podle následujících dodatečných pokynů:

1. Pro čištění plenkové oblasti během testu používat pouze vodu a žínku. Nepoužívat dětské utěrky. Nedotýkat se oblasti kolem pásek rukami nebo čistícím nástrojem.

2. Během trvání testu nepoužívat dermatologické přípravky (roztoky, masti, krémy, mýdla atd.).

3. Nekoupat dítě během testu.

4. Používat pouze testované plenky.

5. Zaznamenat čas vyměšování a omýt dítě vodou a žínkou.

G. Zaznamenat čas přiložení každé testované plenky.

H. Zavolat dítě před uplynutím určeného přenosového času.

I. Odstranit testovanou plenku. Pokud u dítěte došlo k vyprázdnění střev, měla by se páska 700 odstranit a vyhodit (dítě dokončilo test a údaje nebudou zahrnuty v rozboru). Pokus se dítě vymočilo, je páska 700 přijatelná pro rozbor, který je uvedený níže.

J. Pracovník provádějící test odstraní pásku 700, tím že uchopí její okraj pomocí pinzety a jemně ji odlepí od kůže. Vše v chirurgických rukavicích.

K. Připravit si sklenici a pečlivě označit vzorek pro pozdější identifikaci.

L. Po dokončení testu uložte všechny vzorky do sklenic pro rozbor popsany níže.

1. Extrakce a rozbor testovaných vzorků dermatologické složky

Tento způsob je určený pro testování navrhované dermatologické složky, složky z tabulky 4. Zkušený odborník ví, jaké úpravy jsou nezbytné pro extrakci a rozbor jiných dermatologických složek. Obecně: 1) jedna z hlavních částí dermatologické složky se extrahuje z kožního analogu pomocí příslušného rozpouštědla, 2) k určení množství hlavní části v extraktu je použit plynový chromatograf nebo jiná vhodná kvantitativní analytická technika, 3) množství dermatologické složky se vypočítá z jednotky plochy na množství hlavní části v extraktu a plochy pásy.

Vnitřní standard/rozpouštědlo

Připravte si vnitřní standard/rozpouštědlo přesným navážením 100 ± 2 mg 1-hexadekanolu do malé kádinky. Rozpusťte 1-hexadekanol v dichlormethanu a přelejte je do odměrného válce. Vypláchněte kádinku 3x dichlormethanem a obsah vždy přelijte do odměrného válce. Doplňte objem válce a dobře ho promíchejte. Tento roztok bude použit pro vytvoření vnitřního standardu a extrahování dermatologické složky z pásek. Nádobu s

rozpouštědlem by měla být těsně uzavřena, aby se zamezilo jeho odpařování.

Kalibrace standardu

Připravte kalibrační standard o známé koncentraci přesným navážením ($\pm 0,1$ mg) 10 ± 1 mg stearylalkoholu do 100 ml odměrného válce. Zaznamenejte hmotnost použitého stearylalkoholu. Přidejte do válce vnitřní standard/rozpouštědlo a míchejte dokud se nerozpustí. Doplňte objem a znovu promíchejte. Nádoba s rozpouštědlem by měla být těsně uzavřena, aby se zamezilo jeho odpařování. Tento roztok bude použit při určování vzájemné odpovědi stearylalkoholu a 1-hexadekanolového vnitřního standardu při kalibraci přístroje.

Příprava a kalibrace plynového chromatografu

Nainstalujte kolonu a zkontrolujte průtok plynu kolonou při 100°C a vstřikovací otvor a detektor při provozních teplotách. Průtokový chromatograf bude pracovat za následujících podmínek:

- Nosný plyn: vodík (může být použito také helium),
průtoková rychlost 1,5 ml/min.
- Vstřikovací otvor: 325°C , rychlost průtoku 30 ml/min, čištění
příčky 2 ml/min, vložka ze skleněné vaty,
mikrotěsnění Merlin.
- Vstřikovaný objem: 2 μl rozděleně.
- FID detektor: 350°C , nastavený plyn proudí podle pokynů
výrobce. Obvyklý průtok plynu je 400 ml/min
pro vzduch, 30 ml/min pro vodík a 30 ml/min
pro přídavný plyn.

Termostat kolony: 100°C s přírůstkem 15°C/min do 325°C, trvá 10 minut.

Ujistěte se, že všechna spojení jsou těsná a nepodcházejí. Zapalte detektor a nechte ho stabilizovat. Ponechte kolonu při 325°C 30 minut. Vyčistěte stříkačku dichlormethanem. Stříkačka by také měla být několikrát propláchnuta po každé injekci. Proved'te několik slepých kol s dichlormethanem, dokud nedostanete dobrou základní linku bez nepatřičných vrcholů. Pokud se objeví nepatřičné vrcholy nebo není dobrá základní linka, pokuste se odstranit závadu.

Nastavte přístroj podle kalibračního standardu dříve připraveného. Při stanovování správného pořadí úkonů postupujte podle doporučení výrobce. Výpočty by měly být provedeny podobným způsobem jako je ten popsán níže.

Postup rozboru vzorku

- 1) Odstraňte víčko skleničky se vzorkem a přidejte 10 ml roztoku extrakčního rozpouštědla/vnitřního standardu pomocí dávkovače. Zavřete víčkem a zatočte obsahem tak, aby páska 700 nebyla přichycena na stěnách skleničky a byla zcela ponořena v rozpouštědle. Zopakujte se všemi vzorky.
- 2) Ponechte vzorky 16 hodin (obvykle přes noc).
- 3) Promíchejte obsah skleničky. Pomocí pipety přeneste všechn extrakt vzorku do označené ampulky. Zavřete ampulku víčkem. Uzavřete skleničku a ponechte jí dokud není rozbor ukončen. Opakujte se všemi vzorky.

4) Vložte ampulky v náhodném pořadí do testovacího automatu a začněte rozbor v podmínkách popsaných výše. První ampulka by měla být slepá kontrola s dichloromethanem. Pro ověření správnosti měření by mělo být zařazeno několik "kontrolních" standardů (asi každý 20. vzorek).

5) Po skončení měření zkontrolujte každý chromatogram pro potvrzení správnosti rozboru. Pokud se vyskytne problém, pokuste se ho určit a odstranit. Pokud je potřeba, znovu analyzujte vzorky.

Výpočty

Počet mikrogramů stearylalkoholu v extraktů každého vzorku se vypočítá na základě poměrné odpovědi vrcholu stearylalkoholu k vrcholu vnitřního standardu 1-hexadekanolu. Poměr plochy vrcholů se vynásobí relativním reakčním činitelem (určeným při kalibraci přístroje) a mikrogramy vnitřního standardu v extraktu tak, abychom získali celkový počet μg stearylalkoholu ve vzorku.

Kalibrace přístroje

Určení relativního reakčního činitele přístroje pro stearylalkohol a vnitřního standardu, které jsou odvozeny z plochy vrcholů stearylalkoholu a 1-hexadekanolu v chromatogramu kalibračního standardu.

$$\text{Reakční činitel } (R_{\text{r}}) = \frac{\text{plocha}_{\text{vst}}}{\text{hmotnost}_{\text{vst}}} \times \frac{\text{hmotnost}_{\text{sa}}}{\text{plocha}_{\text{sa}}} \times 10$$

kde $\text{plocha}_{\text{vst}}$ = plocha vrcholu pro vnitřní standard.

$\text{plocha}_{\text{sa}}$ = plocha vrcholu pro stearylalkohol.

$hmotnost_{vst}$ = mikrogramy vnitřního standardu použité pro přípravu vnitřního standardu/extrakčního rozpouštědla.

$hmotnost_{sa}$ = mikrogramy stearylalkoholu použité pro přípravu kalibračního standardu

Výpočty vzorku

Počet mikrogramů stearylalkoholu v každém vzorku se vypočítá z plochy vrcholu na chromatogramu vzorku dle následující rovnice:

$$\text{Počet } \mu\text{g SA} = \frac{\text{plocha}_{sa}}{\text{plocha}_{vst}} \times R_f \times \frac{\text{hmotnost}_{vst}}{100}$$

kde plocha_{vst} = plocha vrcholu vnitřního standardu.

plocha_{sa} = plocha vrcholu stearylalkoholu.

$hmotnost_{vst}$ = mikrogramy vnitřního standardu použité pro přípravu vnitřního standardu/extrakčního rozpouštědla.

Vypočtete přenesené množství dermatologické složky v mg/cm^2 kde:

$$\text{Přenesená složka} = \frac{0,001 \times \mu\text{g stearylalkoholu}}{(\text{koncentrace SA ve složce}) \times (\text{plocha pásky})}$$

Ve způsobu popsaném výše je koncentrace stearylalkoholu ve složce 41 % a rozměry pásky jsou 4,4 cm x 4,4 cm.

$$\text{Přenesená složka} = (0,001 \times \mu\text{g stearylalkoholu ve složce}) / (0,41 \times 4,4 \text{ cm} \times 4,4 \text{ cm}) = 0,000126 \times \mu\text{g stearylalkoholu} (\text{mg}/\text{cm}^2)$$

2. Extrakce a rozbor inhibitoru proteázy v testovaném vzorku

Tento způsob je upravený pro použití s dermatologickou složkou obsahující inhibitor proteázy z tabulky 1. Zkušený odborník ví jaké úpravy je nutné provést pro extrakci a rozbor jiných inhibitorů proteáz. Obecně: 1) inhibitor proteázy je uvolněn z kožního analogu působením příslušného rozpouštědla, 2) potom je pro určení hladiny inhibitoru v extraktu použita HPLC nebo jiná kvantitativní analytická technika, 3) množství inhibitoru proteázy se vypočítá jako jednotka plochy na množství inhibitoru v extraktu a plochu pásy.

Příprava standardů

Pro přípravu 10 µg/ml standardního roztoku hexamidinu, odvažte 0,10 gramu +/- 0,02 gramu hexamidindiisethionátu a rozpust'ete jej v mobilní fázi (10 % krystalické kyseliny octové a 17,5 % methanolu) HPLC roztoku. Připravte další standardy hexamidinu ze standardního roztoku 10 µg/ml, viz tabulka 2, a doplňte objem do 100 ml roztokem mobilní fáze HPLC.

Tabulka 3

Příprava standardů*

standard	roztok standardu hexamidinu (ml)	konečný objem (ml)	nominální koncentrace ($\mu\text{g/ml}$)
1	5,0	100	0,5
2	10,0	100	1,0
3	25,0	100	2,5
4	50,0	100	5,0

Příprava vzorku

1. Vložte testovaný přenosový pásek do 40 ml skleněné lahvičky.
2. Přilijte 10 ml dichlormethanu a lahvičku pevně zavřete.
3. Nechte lahvičku 30 minut třepat.
4. Vyjměte lahvičku z třepačky, sejměte víčko lahvičky a přilijte 10 ml mobilní fáze HPLC roztoku. Zavřete lahvičku a dejte ji znovu třepat.
5. Vzorek nechte třepat 30 minut, aby se ve vodní fázi rozpustil hexamidin.
6. Nejméně 30 minut nechte vzorek usadit a vrstvy separovat.
7. Po oddělení vzorku, odeberte stříkačkou vodní (horní) vrstvu a přefiltrujte ji přes 0,45 μm filtr.

Rozbor vzorku

Proveďte chromatografii standardů a vzorků podle podmínek popsanych v tabulce 3.

Tabulka 4
Chromatografické podmínky

Průtok mobilní fáze:	0,25 ml/min
Mobilní fáze:	10 % krystalická kyselina octová, 17,5 % methanol
Vstřikovaný objem:	10 ml
Vlnová délka UV detektoru:	254 nm
Senzitivita UV detektoru:	1,000 AUFS
Filtr UV detektoru:	2,0 s
Doba:	10,0 min

Výpočty

1. Koncentrace standardu (mg/ml):

$$S_i(\text{mg/ml}) = W(\text{mg})/100 \cdot (V_1/100) \quad (1)$$

W = hmotnost hexamidinu pro zásobní roztok standardu

V_1 = objem zásobního roztoku hexamidinu použitého pro přípravu standardu (tabulka I)

2. Kalibrační křivka

A. Vytvořte tabulku mg/ml hexamidinu v každém standardu (S_i) a odpovědí (plocha vrcholů nebo výška vrcholů), R_i , pro každý z roztoků.

B. Vytvořte kalibrační křivku podle rovnice (2).

$$R_i = mS_i + b \quad (2)$$

3. Testované vzorky

A. Vypočtete množství hexamidinu (H_1) v extraktech vzorků pomocí změřené odpovědi R a kalibrační rovnice:

$$H_1 = (R-b)/m \quad (3)$$

B. Vypočtete množství hexamidinu (H) ve vzorcích v mg podle rovnice 4.

$$H = H_1 * 10 \quad (4)$$

C. Vydělte množství hexamidinu (H) plochou pásky k určení koncentrace hexamidinu na jednotku plochy kožního analogu.

VII. Příklady provedení vynálezu

Následují jednotlivé příklady (a) nanášení dermatologické složky na vrchní vrstvu plenky a (b) způsobů navrhovaného vynálezu, které využívají prostředky obsahující tyto vrchní vrstvy. Obdobný přístup může být použit při úpravě dalších částí takového prostředku.

Příklad 1

Příprava a testování absorpčního prostředku s vrchní vrstvou obsahující dermatologickou složku a inhibitor proteázy

A. Příprava dermatologické složky

Dermatologická složka (složka A) je vytvořena smícháním následujících komponent: (i) 99 dílů rozehráté (tj. kapalné) základní kompozice obsahující 58 dílů vazelíny (od Witco Corp., Greenwich,

CT jako White Protopet), 41 dílů stearylalkoholu (od Procter & Gamble Co., Cincinnati, OH jako CO1897) a 1 díl extraktu aloe (od Madis Botanicals, Inc., S. Hackensack, NJ jako Veragel Lipoid v Kaydolu), s (ii) 1 dílem hexamidindiisothionátu (od Laboratories Serobilogiques, Pulnoy, France jako Elestab HP100).

B. Příprava prostředku kontaktním štěrbínovým potahováním

Složka z tabulky 1 se umístí do ohřívací nádrže s pracovní teplotou 77°C. Potom se složka nanese kontaktním aplikátorem (např. Meltex EP45) na vrchní vrstvu prostředku v proužkách, které běží podélně. Přesně se nanáší 5 proužků, z nichž každý má šířku 0,54 cm. (tj. v příčném rozměru prostředku) a délku 25,4 cm a nanesené množství je 1,19 mg/cm². Vzdálenost mezi proužky je 0,67 cm.

C. Testování inhibičních vlastností upraveného prostředku

Tento příklad popisuje způsob testování pleny na inhibiční proteázovou aktivitu. Tento příklad není omezující, protože mohou být testovány i jiné části jiných absorpčních prostředků a pro testování mohou být použity jiné způsoby, využívající jiných rozpouštědel a jiných substrátových systémů.

V oblasti jádra absorpčního prostředku, napuštěného složkou A, je vyraženo 10 otvorů o průměru 1,7 cm a tyto otvory jsou také vyraženy do kontrolního prostředku, jenž neobsahuje žádný inhibitor. Každé z vyražených koleček je následně testováno na trypsinovou inhibiční aktivitu. Z vyseknutého kolečka se odstraní vrchní vrstva a vloží se do 1,5 ml centrifugové zkumavky. Vzorek se

přes noc nechá v 0,75 ml vody. 0,125 ml supernatantu se odebere a přidá se do kyvety, která obsahuje 0,025 ml 160 nM lidského pankreatického trypsinu v TRIS-HCl s 20 mM CaCl_2 , pH 8,2 a nechá se inkubovat 10 minut při 25°C. Do každé kyvety se přidá Cbz-arginin-p-nitroanilidsubstrát (0,025 ml 4 mM roztoku) a testované i kontrolní vzorky se nechají inkubovat 5 minut. Potom se u každého vzorku, po 10 minutách, sleduje změna absorbance v 405 nm. Výsledky testu, uvedené v tabulce 5, naznačují, že absorpční prostředek, jenž obsahuje inhibitor, způsobuje snížení měřené trypsinové aktivity (vzhledem ke kontrolnímu prostředku, který je identický, s tou výjimkou, že neobsahuje žádný inhibitor).

Tabulka 5

	<u>Změna OH/min x 10⁻³</u>
Kontrolní prostředek	8,292±0,6
Druhý prostředek	3,804±2

Příklad 2

Způsob zlepšení stavu kůže

Dospělý člověk s inkontinencí, který váží 82,5 kg, používá absorpční prostředky a trpí mírným erytémem, nosí inkontinenční prostředek pro dospělé podobný plence z příkladu 1, a to nejméně po dobu 5 dnů. Prostředek je vyměňován způsobem běžným pro uživatele (obvykle každé 4 až 5 hodin během dne a před spaním). Během této doby nedochází k žádným zásahům uživatele (např.

nanášení dermatologických přípravků). Ke konci těchto 5 dnů se pozoruje zmenšení nebo vymizení erytému.

Příklad 3

Způsob zlepšení stavu kůže

Dítě, které váží 16 kg a trpí plenkovou vyrážkou a erytémem, nosí nejméně 5 dnů na noc plenky z příkladu 1 (tj. během dne používá neupravený prostředek). Plenky vyměňuje pečující osoba běžným způsobem. Během této doby nedochází k žádným zásahům pečující osoby (např. nanášení dermatologických přípravků). Ke konci těchto 5 dnů se pozoruje zmenšení nebo vymizení vyrážky a erytému.

Příklad 4

Způsob udržení stavu kůže

Dítě, které váží 12,5 kg a nemá plenkovou vyrážku ani erytém, je vyšetřováno pro otitis media a je mu předepsána léčba systémovými antibiotiky. Na základě zkušeností s konvenčními (neupravenými) plenkami pečující osoba předpokládá, že se u dítěte rozvine erytém a/nebo plenková vyrážka v důsledku řidší stolice. Plenky, které jsou popsány v příkladu 1, jsou nepřetržitě nošeny v průběhu užívání antibiotik. Během této doby nedochází k žádným zásahům uživatele (např. nanášení dermatologických přípravků). Během podávání antibiotik se nepozoruje u dítěte žádný erytém ani plenková vyrážka.

Popisy všech patentů, patentových přihlášek (a všechny patenty, které se týkají dané problematiky, stejně jako příslušné publikované

příhlášky zahraničních patentů) a publikace zmíněné v tomto popisu, jsou zde zahrnuty odkazem. Avšak nepřipouštíme, že by některý z dokumentů zde uvedených popisoval navrhovaný vynález.

Přestože byla jednotlivá provedení navrhovaného vynálezu znázorněna a popsána, je znalci oboru zřejmé, že různé další změny a modifikace mohou být provedeny, aniž by byl překročen rozsah vynálezu. Naším úmyslem je tedy pokrýt v přiložených nárocích všechny takové změny a modifikace, které jsou v rozsahu tohoto vynálezu.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

2000-1102

1. Absorpční prostředek, **vyznačující se tím**, že aspoň jeho část obsahuje inhibitor proteázy, který má IC_{50} , při měření způsobem čištěné proteázy, 30 μM nebo méně.
2. Prostředek podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že IC_{50} je od 0,00001 μM do 30 μM , lépe však od 0,0001 μM do 20 μM a nejlépe od 0,001 μM do 10 μM .
3. Absorpční prostředek, **vyznačující se tím**, že aspoň jeho část obsahuje inhibitor proteázy, který má IC_{50} , při měření způsobem specifické fekální proteázy, 90 μM nebo méně.
4. Prostředek podle nároku 3, **vyznačující se tím**, že IC_{50} je od 0,00001 μM do 90 μM , lépe však od 0,0001 μM do 30 μM a nejlépe od 0,001 μM do 10 μM .
5. Absorpční prostředek, jehož část obsahuje inhibitor proteázy, **vyznačující se tím**, že má IC_{50} , při měření způsobem obecné fekální proteázy, 500 μM nebo méně.
6. Prostředek podle nároku 5, **vyznačující se tím**, že IC_{50} není více než 500 μM , lépe ne více než 300 μM a nejlépe ne více než 100 μM .
7. Prostředek podle nároků 1-6, **vyznačující se tím**, že inhibitor proteázy je zvolený ze skupiny obsahující inhibitor serinové proteázy, inhibitor metaloproteázy, inhibitor cysteinové proteázy, inhibitor aspartylové proteázy a jejich směsi.

8. Prostředek podle nároků 1-7, **vyznačující se tím**, že inhibitor proteázy je zvolený ze skupiny obsahující inhibitor trypsinu ze sóji, inhibitor proteázy z limské fazole (*Phaseolus limensis*), inhibitor proteázy z kukuřice, Bowman-Birkův inhibitor, inhibitor lidského trypsinu ze slinivky, inhibitor hovězího zásaditého trypsinu ze slinivky, inhibitor trypsinu z vaječného bílku, ovomukoidy vaječného bílku obsahující ovoinhibitory, chymostatin, aprotinin, leupeptin a jeho analoga, amastatin a jeho analoga, antipain, antitrombin III, hirudin, cystatin, E-64 a jeho analoga, α_2 -makroglobulin, α_1 -antitrypsin, pepstatin a jeho analoga, apstatin, (2R)-2-merkaptomethyl-4-methylpentanoyl-b-(2-naftyl)-Ala-Ala amid, (2R)-2-merkaptomethyl-4-methyl-pentanoyl-Phe-Ala amid, N-acetyl-Leu-Leu-methioninal, N-acetyl-Leu-Leu-norleucinal, p-aminobenzoyl-Gly-Pro-D-Leu-D-Ala hydroxamovou kyselinu, 2(R)-(N-(4-methoxyfenylsulfonyl)-N-(3-pyridylmethyl)-amino)-3-methyl-butano-hydroxamovou kyselinu, hexamidin a jeho soli, pentamidin a jeho soli, benzamidin a jeho soli a deriváty, p-aminobenzamidin a jeho soli a deriváty, kyselinu guanidinbenzoovou a její soli a deriváty a jejich směsi.

9. Prostředek podle nároku 5 nebo 6, **vyznačující se tím**, že inhibitorem proteázy je hydrochlorid 4-(2-aminoethyl)-benzen-sulfonylfluoridu.

10. Prostředek podle nároku 1-9, **vyznačující se tím**, že obsahuje inhibitor proteázy nejméně od 0,0001 % až do 30 % hmotnosti, lépe však od 0,0001 % do 10 % hmotnosti.

11. Prostředek podle nároků 1-10, **vyznačující se tím**, že extrakt z jeho části způsobí snížení hydrolýzy substrátu proteázou v testovacím způsobu absorpčního prostředku.

12. Prostředek podle nároků 1-11, **vyznačující se tím**, že dále zahrnuje distribuční systém obsahující inhibitor proteázy a přenášející inhibitor aspoň na část kůže uživatele prostředku.

13. Prostředek podle nároku 12, **vyznačující se tím**, že distribučním systémem je dermatologická složka, která obsahuje inhibitor proteázy od 0,01 % do 50 % hmotnosti, a jenž je přenášena během nošení prostředku, aspoň částečně, na kůži uživatele.

14. Prostředek podle nároku 12 nebo 13, **vyznačující se tím**, že dermatologická složka obsahuje inhibitor proteázy od 0,05 % do 25 % hmotnosti, lépe však od 0,1 % do 10 % hmotnosti.

15. Prostředek podle nároků 1-14, **vyznačující se tím**, že dále zahrnuje povrch dotýkající se uživatele, jehož část obsahuje dermatologickou složku s inhibitorem proteázy, a tímto povrchem dotýkajícím se uživatele je nejlépe vrchní vrstva.

16. Absorpční prostředek, **vyznačující se tím**, že extrakt jeho části působí snížení hydrolýzy substrátu proteázou, v testovacím způsobu absorpčního prostředku, nejméně o 10 %, lépe však o 20 % a nejlépe o 50 až 90 %.

17. Absorpční prostředek, **vyznačující se tím**, že obsahuje látku vybranou ze skupiny obsahující inhibitor trypsinu ze sóji, inhibitor proteázy z limské fazole (*Phaseolus limensis*), inhibitor proteázy

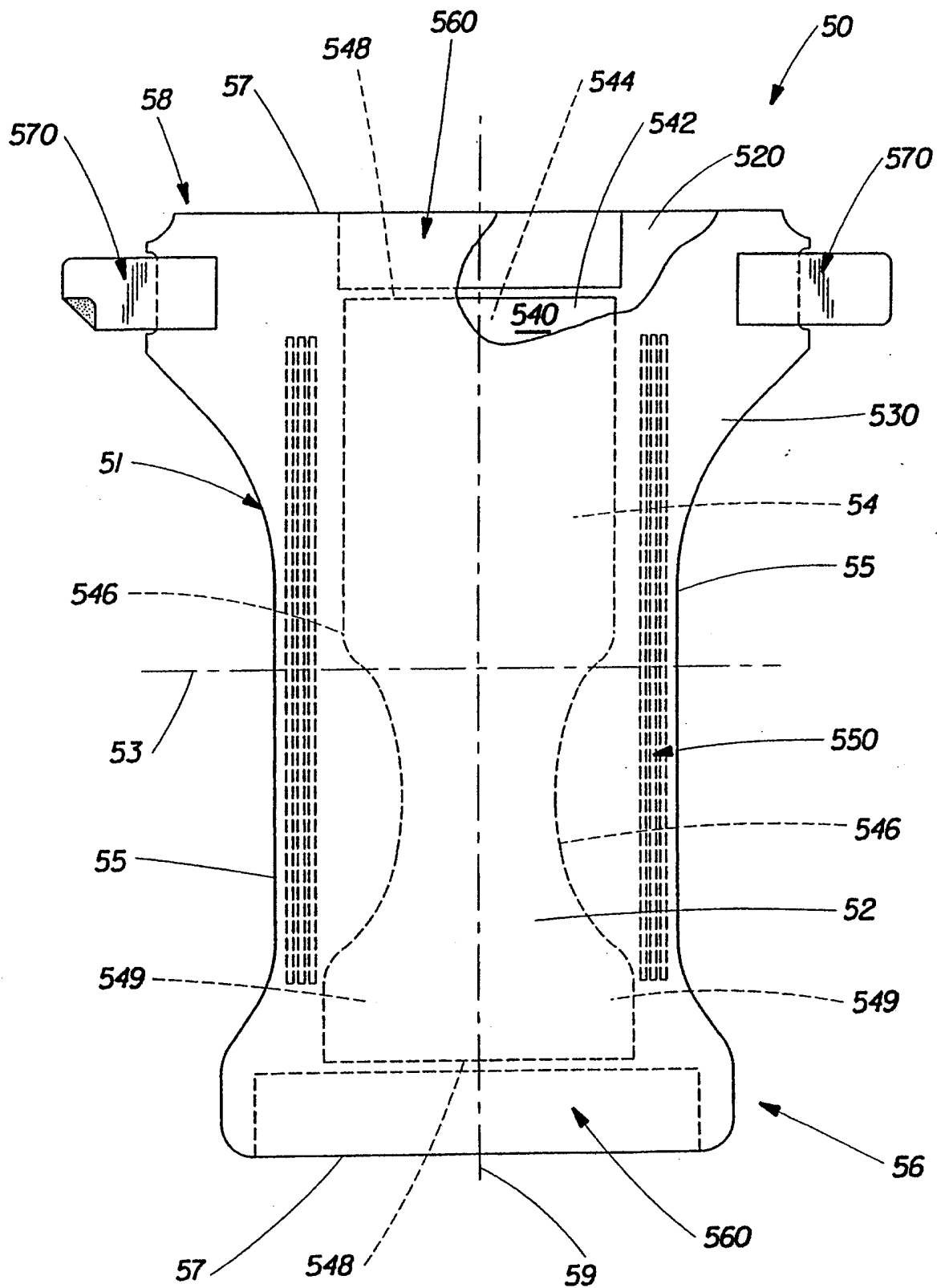
z kukuřice, Bowman-Birkův inhibitor, inhibitor lidského trypsinu ze slinivky, inhibitor hovězího zásaditého trypsinu ze slinivky, inhibitor trypsinu z vaječného bílku, ovomukoidy vaječného bílku obsahující ovoinhibitory, chymostatin, aprotinin, leupeptin a jeho analoga, amastatin a jeho analoga, antipain, antitrombin III, hirudin, cystatin, E-64 a jeho analoga, α_2 -makroglobulin, α_1 -antitrypsin, pepstatin a jeho analoga, apstatin, (2R)-2-merkaptomethyl-4-methylpentanoyl-b-(2-naftyl)-Ala-Ala amid, (2R)-2-merkaptomethyl-4-methyl-pentanoyl-Phe-Ala amid, N-acetyl-Leu-Leu-methioninal, N-acetyl-Leu-Leu-norleucinal, p-aminobenzoyl-Gly-Pro-D-Leu-D-Ala hydroxamovou kyselinu, 2(R)-(N-(4-methoxyfenylsulfonyl)-N-(3-pyridyl-methyl)-amino)-3-methyl-butanohydroxamovou kyselinu, hexamidin a jeho soli, pentamidin a jeho soli, benzamidin a jeho soli a deriváty, p-aminobenzamidin a jeho soli a deriváty, kyselinu guanidinbenzoovou a její soli a deriváty, TLCK, TPCK, kyselinu tranexamovou a jejich směsi.

18. Prostředek podle nároku 17, **vyznačující se tím**, že látka je zvolena ze skupiny obsahující inhibitor trypsinu ze sóji, aprotinin, hexamidin, p-aminobenzamidin, leupeptin, pepstatin A, chymostatin, deriváty kyseliny guanidinbenzoové a jejich směsi.

19. Způsob snižující proteolytickou aktivitu proteázy stolice v absorpčním prostředku, **vyznačující se tím**, že zahrnuje (i) vložení inhibitoru proteázy do části absorpčního prostředku dotýkající se stolice a (ii) aplikaci prostředku na uživatele tak, aby inhibitor proteázy přišel do styku s proteázou stolice.

20. Způsob snižující proteolytickou aktivitu proteázy stolice na části kůže dotýkající se absorpčního prostředku, jenž zahrnuje (i)

vložení inhibitoru proteázy do distribučního systému absorpčního prostředku, **vyznačujícího se tím**, že distribuční systém je schopný přenést aspoň část inhibitoru enzymu na kůži uživatele prostředku a (ii) aplikování absorpčního prostředku na kůži uživatele.

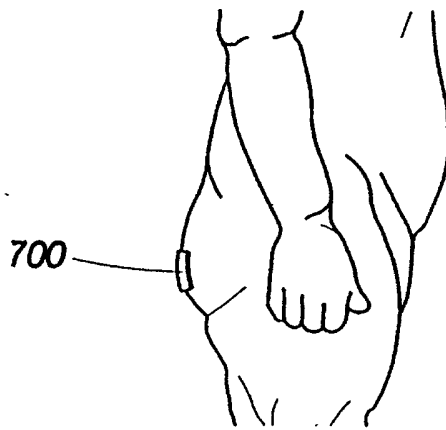


Obr. 1

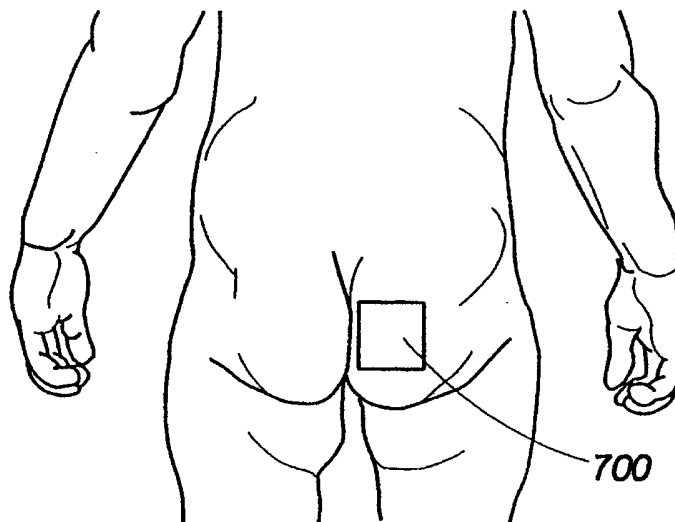
2/3

13.12.00

2000-1102



Obr. 2A



Obr. 2B

1/3

13.12.00

2000-1102

Všechny odkazy k
OBRÁZKU 3
jsou považovány za
NEEXISTUJÍCÍ
(viz. Článek 14(2))