

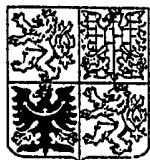
UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

8277

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLUVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **8339-98**

(22) Přihlášeno: **29. 07. 98**

(47) Zapsáno: **15. 02. 99**

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.⁶:

A 61 K 33/14

A 61 K 33/18

A 61 K 31/70

A 61 K 31/74

(73) Majitel:

ILJIN Aleksandr Ivanovič, Almaty, KZ;
SARKESJAN Albert Artuševič, Almaty, KZ;
BORISOV Pavel Georgievič, Almaty, KZ;
BOŽKOV Jevgenij Alexejevič, Oktjabr, KZ;
ARAKELJAN Norjan Garibalděvič, Almaty, KZ;
VERBKIN Anatolij Vasiljevič, Almaty, KZ;
FRANC Petr, Praha, CZ;

(72) Původce:

Iljin Aleksandr Ivanovič, Almaty, KZ;
Sarkesjan Albert Artuševič, Almaty, KZ;
Borisov Pavel Georgievič, Almaty, KZ;
Božkov Jevgenij Alexejevič, Oktjabr, KZ;
Arakeljan Norjan Garibalděvič, Almaty, KZ;
Verbkin Anatolij Vasiljevič, Almaty, KZ;
Franc Petr, Praha, CZ;

(74) Zástupce:

Chlustina Jiří Ing., Jana Masaryka 43-47,
Praha 2, 12000;

(54) Název užitého vzoru:

Léčebný přípravek s virucidním účinkem

CZ 8277 U1

Léčebný přípravek s virucidním účinkem

Oblast techniky

Technické řešení se týká léčebného přípravku s virucidním účinkem, zejména na viry obsahující DNA a RNA u savců, včetně člověka, obsahující jod, jodid draselný nebo sodný, syntetický polymer rozpustný ve vodě, přírodní polymery, například polysacharidy, monosacharidy a oligosacharidy, a vodu. Technické řešení se tedy týká oblasti medicíny, konkrétně léčebných přípravků se širokým spektrem účinku, včetně účinku na viry obsahující DNA a RNA u savců, včetně člověka. Léčebný přípravek se může použít pro léčení infekčních nemocí virové povahy, včetně viru vyvolávajícího onemocnění AIDS.

Dosavadní stav techniky

V průběhu posledních třiceti let bylo navrženo mnoho přípravků pro léčení virových onemocnění. V minulosti se však v důsledku nesprávného vyhodnocení skutečného rozvoje většiny virových infekcí a neznalosti působení virů na živé buňky organismu došlo k chybným závěrům terapeutických výzkumů. V poslední době však zásluhou detailnějšího studia a rozpracování metod specifické virové diagnostiky, rozšiřování biochemických znalostí o procesech replikace virů a také lepšího pochopení chování virů ve specifických populacích buněk hostitelů vznikla tendence rozpracování účinnějších přípravků, které se používají k potírání virových infekcí. Významnou událostí byl objev endogenního interferonu a zjištění jeho antivirové aktivity. V současné době je zjištěno, že účinek řady imunostimulačních a antivirových prostředků je spojen s jejich interferonovou aktivitou, to jest schopností stimulovat tvorbu endogenního interferonu (M. D. Maškovskij, Lekarstvennye sredstva, Posobie dlja vračej, T 2 Charkov, "Torsing", 1998, str. 349).

Pro profylaxi a léčení chřipky a jiných virových infekcí se dále používá přírodní (leukocytový lidský) interferon. Z moderních neúčinnějších syntetických antivirových přípravků je třeba vyzdvihnout remantadin, který se používá k léčení onemocnění, vyvolávaných virem chřipky, adenoviry, pikornaviry a jinými (Kukajin R. A a kol., Antivirusnaja aktivnost' i mehanizm dějstvija različnyh chimičeskich sojedinenij, Riga; Znanie.-1979). Nebezpečnou vlastností virů je jejich schopnost mutace. Takové epidemie virových onemocnění, jako je španělská chřipka, hongkongská chřipka a nakonec i AIDS, mají za původce retroviry, které jsou viry živočichů, a neméně na ně onemocní i člověk.

Pro léčení AIDS se používá známá lipozomní farmaceutická kompozice, která obsahuje lipid a polyen, například nistatin a amfotericin B.

Lipozomní kompozice jsou však značně toxické pro infikované HIV-1-buňky (WO 92/118415, Int. Cl. A61K9/127, 31/71, r. 1992). Pro léčení AIDS se používá také rapamicin nebo jeho analogy, které zpomalují rozvoj, popřípadě šíření HIV-1-infekce u savců (WO 94/05300, Int.Cl. A61K31/71, r. 1994).

Je také znám farmaceutický přípravek, který jako aktivní složku obsahuje benanomicin A nebo B pro inhibici nákazy virem AIDS (EP 0356330A, Int. Cl. 4 A61K31/71, zveřejnění 15. 09. 1990). Nedostatkem uvedených přípravků, které se používají pro léčbu nebo inhibici AIDS, je to, že vyvolávají řadu vedlejších reakcí organismu. Jedním z nejvíce používaných přípravků pro zpomalení rozvoje infekce AIDS je 3'-acido-2'didezoxotimidin (nazývaný též acidotimidin nebo ziovudin). Tento přípravek má pozitivní účinek při patogenní retrovirové infekci, nelze však bohužel hovořit o úplném potlačení viru AIDS pomocí tohoto přípravku (V mire nauki, il. žurnal, No. 12, M., Mir, - 1988, str. 80-81). Nejbližším k dosaženému výsledku je svou technickou podstatou léčebný přípravek s bakteriocidním a virucidním účinkem, který obsahuje jod, jodid draselný nebo sodný, syntetický polymer rozpustný ve vodě, přírodní polymery, například polysacharidy a mono- a oligosacharidy, s následujícím složením:

	g/l
jod	6 až 10
chlorid draselný nebo sodný	9 až 15
syntetický polymer rozpustný ve vodě	3 až 6
5 přírodní polymer (mono- nebo oligosacharidy)	8 až 120
voda	zbytek.

Tento léčebný přípravek je popsán v CZ-užitném vzoru č. 5435, A61K33/18, A61K31/715.

Nedostatkem tohoto přípravku je jeho poměrně vysoká toxicita.

10 Působení na viry, které již pronikly do buňky, je složité, protože buňka sama je účinně brání před jakýmkoliv působením. Naopak, uvnitř buňky provádí rozkladnou činnost přizpůsobený vir. Problém spočívá v tom, aby se na molekulární úrovni potlačily specifické procesy biologické syntézy virových částic, aniž by se pokud možno narušila životaschopnost buněk virem nepostižených.

15 S přihlédnutím k uvedenému spočívá úkol technického řešení v nalezení přípravku schopného potlačovat vir jak vně tak i uvnitř napadené buňky, aniž by se přitom tato buňka organismu zahubila.

Navíc, přípravek má mít široké spektrum účinku při nízké toxicitě. Uvedený úkol je vyřešen dále popsaným přípravkem.

Podstata technického řešení

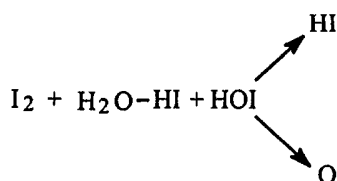
20 Uvedené nedostatky známých léčebných přípravků tohoto druhu do značné míry odstraňuje léčebný přípravek s virucidním účinkem, zejména na viry obsahující DNA a RNA u savců, včetně člověka, obsahující jod, jodid draselný nebo sodný, syntetický polymer rozpustný ve vodě, přírodní polymery, například polysacharidy, monosacharidy a oligosacharidy, a vodu, podle tohoto technického řešení, jehož podstata spočívá v tom, že přidavně obsahuje chlorid

25 litný, při následujícím složení:

	g/l
jod	0,8 až 25
jodid draselný nebo sodný	1,2 až 38
chlorid litný	0,1 až 20
30 syntetický polymer rozpustný ve vodě	0 až 6
přírodní polymery - polysacharidy, monosacharidy a oligosacharidy	8 až 400
voda	zbytek do 1 l.

35 Interval koncentrací složek nebyly vybrány náhodně. Všechny znaky složení navrženého přípravku s virucidním účinkem jsou nezbytné a dostatečné pro dosažení stanoveného cíle. Žádný z těchto znaků nemůže být vypuštěn nebo nahrazen jiným, v opačném případě se nedosáhne technického účinku. Volba jak druhu, tak i koncentrace složek navrženého léčebného přípravku je založena na početných experimentálních údajích. Složení léčebného přípravku, to jest jeho složky, je z hlediska jejich známosti z literatury, očividně známé, novým překvapivým

40 zjištěním však je, že v součinnosti s ostatními složkami se jednotlivé složky tohoto léčebného přípravku projevují ne zcela očekávatelnými vlastnostmi. S přihlédnutím k tomu, že chemicky a biologicky aktivní složkou je jod, je podstatné, že při jeho koncentraci nižší než 0,8 g/l probíhá jeho následující hydrolýza:



to jest léčebný přípravek nelze uchovávat.

Při koncentraci jodu vyšší než 25 g/l vznikají v důsledku strukturní tvorby komplexních sloučenin jodu se složkami léčebného přípravku systémy ve formě žele, které jsou nevhodné pro medicínskou aplikaci. V čase kromě toho probíhají procesy halogenizace mono-, oligo- a polysacharidů, čímž se zvyšuje toxicita léčebného přípravku. Interval koncentrací ostatních složek slouží pro zajištění průběhu komplexotvorných reakcí, asociace a agregace při výrobě léčebného přípravku za účelem dosažení jeho virucidních účinků.

Syntetické, ve vodě rozpustné polymery, například polyvinylalkohol, poly-N-vinylpyrolidon, plní při zavedení do krve funkci náhrady plazmy, sorbentů (například toxinů) nebo prolongátorů.

V případě léčebného přípravku podle tohoto technického řešení plní ve vodě rozpustný syntetický polymer funkci vytváření žele.

Je třeba také poznamenat, že jedním z důležitých kritérií při volbě složek léčebného přípravku je to, že úlohu matrice plní komplexní sloučeniny jodu s nízko- a vysokomolekulárními ligandy, které vytvářejí asociáty svého druhu. Jejich vodný roztok má některé vlastnosti gelu.

Je známo, že uhlovodany, ke kterým patří mono- a polysacharidy, spolu s bílkovinami a lipidy, jsou součástí biologických membrán, oddělujících prostory mezi buňkami nebo uvnitř buňky.

Projevem bílkoviny v membránách jsou obvykle fermenty (R. Coleman, Biochim. Biophys. Acta, 1973, 300.1). Membrány svými vlastnostmi zajišťují nezbytnou prostorovou součinnost mezi fermenty, v důsledku čehož produkt reakce katalyzované jedním fermentem se stává substrátem pro jiný sousední ferment.

Na vnitrobuněčné úrovni hrají v regulaci procesů metabolismu důležitou úlohu hormony. Spojování hormonů s jejich receptory je podobné vzájemnému působení fermentu a jeho substrátu.

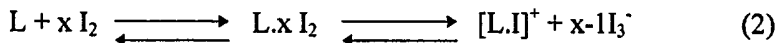
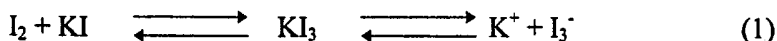
Vytváření komplexů ferment-substrát a hormon-receptor předpokládá vzájemné "respektování" molekul mezi sebou. Tuto schopnost mají na vysoké úrovni buňky. Například, leukocyty v krevním řečišti rozeznávají a narušují cizorodé buňky, například bakterie, nenapadají však vlastní buňky krve. Rozeznávání se projevuje i kontaktní inhibicí: některé buňky vyšších organismů se v živném prostředí dělí dále do doby, dokud nepřijdou do styku s jinými buňkami. Rakovinné buňky za stejných podmínek pokračují v dělení.

Procesy buněčného rozeznávání jsou závislé na pohyblivosti složek membrány (M. S. Bretscher, M. C. Raff, Nature, 1975, 258,43).

Uhlovodany, ke kterým patří mono-, oligo- a polysacharidy, zvolené pro předmětný léčebný přípravek jako přírodní polymery, jsou mimořádně důležitým druhem přírodních sloučenin. V biologii a medicíně má význam uhlovodanů dominující roli, kterou tyto hrají v živých organismech a také ve složitosti jejich funkcí. Uhlovodany se účastní většiny biochemických procesů jako vysokomolekulární částice, ačkoliv v mnoha biologických kapalinách jsou obsaženy mono- a oligosacharidy (Comprehensive Organic Chemistry/Edited by E. Hasla, V 5. Biological Compounds, Pergamon Press, 19).

Mono-, oligo- a polysacharidy, které jsou součástí léčebného přípravku, nejsou pro organismy savců včetně člověka, cizorodé a hrají důležitou roli v procesu buněčného uznávání.

Jod, který je součástí léčebného přípravku jak v molekulární formě, tak ve formě solí (jodid draselný nebo jodid sodný), se v léčebném přípravku nachází v několika aktivních formách, a to zásluhou komplexotvorných reakcí:



kde L = ligand (mono-, oligo-, polysacharid a ve vodě rozpustný syntetický polymer).

- 5 Asociace komplexních sloučenin, vznikajících reakcí (1), vede k vytváření gelu v léčebném přípravku. Velmi důležitá je při vytváření gelu funkce ve vodě rozpustného syntetického polymeru.

V současné době je všeobecně přijímán kapalino-mosaikový model biologických membrán, který předpokládá, že membrána se ve fyziologických podmínkách chová jako tekoucí, tedy nikoliv statická (S. J. Singer, Ann. New York, Acad. Sci. 1972, 195,16).

Dvouvrstvy, které tvoří strukturu membrány a sestávají z fosfolipidů a také glykolipidů a sulfolipidů, procházejí při charakteristické teplotě dobře vyjádřeným fázovým přechodem ze stavu poměrně pevného gelu ve stav tekutých krystalů. Složky membrány jsou v důsledku toho schopny v ploše membrány laterálně difundovat. Koeficient difuze pro bílkovinu s molekulovou hmotností $1 \cdot 10^{10}$, obsaženou v membráně, činí $3 \cdot 10^{10} \text{ cm}^2/\text{s}$, (M. Edidjan, Ann. Rev. Biophys. Bioeng, 1974, 4,179). Laterální difuze v biologických membránách je do značné míry regulovaným procesem.

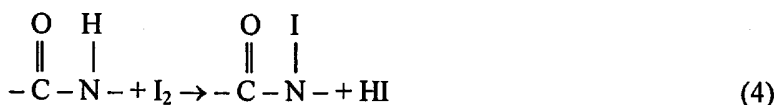
Příčné přemísťování složek membrán mezi vnitřní a vnější polovinou dvouvrstvy probíhá v čase, rychlost tohoto přemísťování však může být výrazně zvýšena přítomností jiných složek biologických membrán (do $t_{1/2} = 5 \text{ min.}$) (D. Marsh. Essays Biochem., 1975, 11,139).

Jod a jeho různé formy, který je součástí léčebného přípravku, je schopen spolupůsobit prakticky se všemi třídami látek, které jsou součástí organismu savce, včetně člověka, jakož i membrány a vlastní buňky, například bílkovinami, uhlovodany, lipidy, aminokyselinami, glyko- a fosfolipidy, hormony, fermenty, vitaminy a podobně. Probíhají přitom procesy vytváření komplexů a halogenizace, posloupnost biochemických procesů v živém organismu však vede k tomu, že po spolupůsobení jedné z aktivních forem jodu vzniká nová aktivní forma jodu, která se stává součástí jiných komplexů, například jod-ferment, jod-hormon a jod-biologická membrána, jod-bílkovina a podobně.

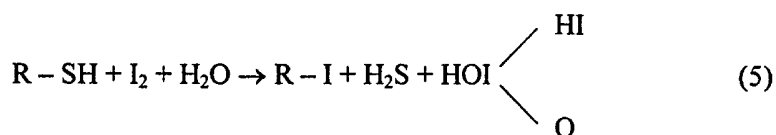
Každý nově vznikající komplex je biologicky aktivní a "vlastní" pro živý organismus savce, včetně člověka.

Jod, který je součástí léčebného přípravku, a také komplexy jodu, které vznikají v organismu, zásluhou mechanismu uznávání a specifického chemického spolupůsobení halogenizují (jodují) viry obsahující DNA a RNA, nacházející se jak uvnitř, tak i vně buňky.

Halogenizace probíhá především cestou náhrady vodíkového atomu v peptidové vazbě molekuly viru:



a náhrady SH-skupiny v síti molekuly viru:



- 5 V důsledku halogenizace vznikají nové látky, které nemají vlastnosti výchozího viru. Na tomto je založen specifický virucidní účinek léčebného přípravku.

Posloupností biochemických reakcí, které při aplikaci léčebného přípravku probíhají v organismu savců, včetně člověka, se vysvětluje imunomodulační, imunostimulační účinek léčebného přípravku.

- 10 Chlorid litný, který je součástí léčebného přípravku, plní úlohu pro halogenidy alkalických kovů neobvyklou. Zlepšuje vodivost v buněčných membránách, vyvolává zlepšení laterální difuze v dvouvrstvě buněčných membrán, a to zásluhou malých rozměrů kationtu lithia a jeho pevnější koordinace s donorovými atomy mono-, oligo- a polysacharidů.

- 15 Navržený léčebný přípravek s virucidním účinkem, zejména na viry obsahující DNA a RNA, je vodný roztok, tmavě modré barvy, molekulárních a iontových komplexů jodu s asocianty ve vodě rozpustných syntetických polymerů, vytvářejících gel, a přírodních mono-, oligo- a polysacharidů. Teplota tání léčebného přípravku je $-1,40\text{ }^{\circ}\text{C}$, měrná hmotnost $1,048\text{ g/cm}^3$, hmotnostní podíl sušiny nejméně 25 %. Hodnota pH léčebného přípravku s virucidním účinkem činí 6-7. Všechny jeho složky jsou rozpuštěny v izotonickém roztoku chloridu sodného.

- 20 Léčebný přípravek s virucidním účinkem má nízkou toxicitu. Letální dávka LD_{100} činí při perorálním podávání 75 g/kg živé hmotnosti (pro bílé myši).

Léčebný přípravek s virucidním účinkem má široké spektrum tohoto účinku. Je účinný při infekcích vyvolaných viry poliomyelidy, slintavky a kulhavky, encefalomyokarditidy, chřipky, spalničky (viry obsahující RNA), herpes, neštovic ovčí, ectimy a dalších (viry obsahující DNA).

- 25 Léčebný přípravek je netoxický k buněčným kulturám rozředěným vodou v poměru 1:20 až 1:100.

Antivirový účinek léčebného přípravku se projevuje na všech úrovních při zavedení současně s viry, či při zavedení předcházejícím nebo následujícím zavedení virů.

Léčebný přípravek je účinným prostředkem pro chemoterapii virových infekcí.

- 30 Léčebný přípravek má schopnost stimulovat tvorbu protilátek v kulturách lymfocytů.

Léčebný přípravek s virucidním účinkem se u savců, včetně člověka, aplikuje vnitřně, vnitrosvalově, vnitrobřišně a podkožně. Je také možná perorální aplikace a podobně.

Způsob výroby předmětného léčebného přípravku je založen na reakcích vytvářejících komplexy jodu s polyfunkčními nízko- a vysokomolekulárními ligandy.

- 35 Vlastní způsob přípravy léčebného přípravku s antivirovým účinkem je následující. Ve 100 ml vody se rozpustí 9 g jodidu draselného, přidá se 6 g krystalického jodu a roztokem se míchá do úplného rozpuštění jodu. Odděleně se ve 100 ml vody rozpustí 2 g polyvinylalkoholu. Odděleně se ve 200 ml vody rozpustí 30 g směsi mono-, oligo- a polysacharidů. Získané roztoky se smíchají v následujícím pořadí: k roztoku polyvinylalkoholu se přidá roztok směsi mono-, oligo-
40 a polysacharidů a poté roztok jodu a jodidu draselného. Poté se doplní destilovaná voda do 1 litru, přičemž předem se přidá 9 g chloridu sodného a 2 g chloridu litného.

Uvedeným způsobem se se stejným pořadí kroků připravují roztoky léčebného přípravku s koncentracemi složek podle předmětu tohoto technického řešení.

- 45 Antivirová aktivita předmětného léčebného přípravku se zkoumala na viru chřipky A, kmen A/Aichi 2/68 (H_3N_2) - představitel orthomixovirů, viru prostého herpes u člověka druhého

serotypu (rodina herpesvirů), viru encefalomyokarditidy (rodina pikornavirů), vakcinového atenuovaného polioviru typu III, kmen Sebin, v provozních podmínkách na kulhavce a slintavce ovcí.

- 5 Toxicita léčebného účinku přípravku s virucidním účinkem se studovala na buněčné kultuře, na myších a na kuřecích embryích a také na lymfocytech.

Pro posílení a shromáždění virů se za účelem studia antivirové aktivity použila transformovaná linie adenokarcinomu hrtanu člověka Hep-2 a primární kultura fibroplastů KE-FEK. Buňky se kultivovaly v prostředí podle Eagle s glutaminem a kravskou syrovátkou (Hep-2) a v prostředí 199 se syrovátkou (FEK).

- 10 Vliv předmětného léčebného přípravku na indukci humorální a buněčné imunní odezvy lymfocytů člověka v kultuře se studoval metodikou popsanou v Nejrochimia, t 15, v 1, 1998, str. 45-50.

Při zkoumání antivirové aktivity se použily standardní metody.

- 15 - Titrování viru na buněčných kulturách podle cytopatického účinku.
- Určení titrátů podle Kerber.
- Titrování virů u myší metodou Reed a Mencha.
- Titrování virů u kuřecích embryí.
- V reakci hemaglutinace.

- 20 Léčebný přípravek s virucidním účinkem se používal ve formě vodných roztoků v ředění 1:5 až 1:100, připravovaných ex tempore.

Pro kontrolu se u myší a kuřecích embryí použily oficiální antivirové přípravky - remantadin a acyklovir.

Statistické zpracování výsledků fyzikálně-chemických pokusů a biologických výzkumů se provádělo metodikou popsanou v GF X1 SSSR, str. 199-251.

- 25 Výpočet dávky předmětného léčebného přípravku při pokusech na myších, kuřecích embryích, ovčích a člověku se prováděl podle vzorce:

$$D = \frac{1}{N_a} \frac{n \cdot n' \cdot k \cdot 1000}{k'} \cdot M \cdot P,$$

- 30 kde

- n je počet infekčních jednotek na 1 ml krve savce;
n' je počet molekul přípravku potřebných pro likvidaci jedné infekční jednotky;
k je obsah vody v organismu savce (0,585 u člověka);
N_a je Avogadrovo číslo;
35 k' je obsah vody v krvi savce (0,72 u člověka);
M je molekulová hmotnost aktivní látky přípravku;
P je hmotnost savce v kg.

Dosazením hodnot do vzorce dostaneme:

$$D = 0,187 \cdot 10^{-4} \cdot M \cdot P, \text{ g}$$

- 40 to jest jednu dávku přípravku.

Pro potvrzení rozsahu koncentrací složek léčebného přípravku se při provádění výzkumů použila následující složení:

		g/l
I.	jod krystalický	0,8
	jodid draselný (sodný)	1,2
	chlorid litný	0,1
5	přírodní mono-, oligo a polysacharidy	100
	voda	zbytek do 1 l.
II.	jod krystalický	8
	jodid draselný (sodný)	12
	chlorid litný	2
10	ve vodě rozpustný syntetický polymer	3
	přírodní mono-, oligo a polysacharidy	100
	voda	zbytek do 1 l.
III.	jod krystalický	25
	jodid draselný (sodný)	38
15	chlorid litný	20
	ve vodě rozpustný syntetický polymer	6
	přírodní mono-, oligo a polysacharidy	400
	voda	zbytek do 1 l.
20	Jako přírodní polysacharidy se používají všechny přírodní polysacharidy, včetně antibiotik, patřící k této třídě látek, a jejich deriváty, vytvářející s jodem ve vodě rozpustné komplexní sloučeniny, ve zde popsaném rozsahu koncentrací jodu a ostatních složek. Jako ve vodě rozpustné syntetické polymery se schopností vytvářet gely se použijí polymery povolené Mezinárodním seznamem povolených léčiv a o odpovídajícím SSSR seznamem XI vyd., vytvářející s jodem ve zde popsaném rozsahu koncentrací jodu a ostatních složek ve vodě rozpustné komplexy.	
25	Profylaktický a terapeutický účinek předmětného léčebného přípravku se zkoumal na bílých myších s tělesnou hmotností 12 až 14 g, u kterých se po titrování virem a stanovení letální dávky LD ₅₀ vyvolala pokusná chřipková infekce, a to cestou intranazálního zavedení virové suspenze, obsahující 100 LD ₅₀ v množství 0,05 ml.	
30	Titř chřipkového viru, stanovený metodou Reed a Mechta, činil 10 ^{2,5} /0,05 ml.	
	V tabulkách 1 až 3 jsou uvedeny údaje o profylaktickém účinku předmětného léčebného přípravku v různých ředěních při vnitrobřišní aplikaci 2 hodiny před infekcí chřipkovým virem.	
	Jako pozitivní kontrola se myším aplikoval remantadin, jeden z nejúčinnějších chemických preparátů proti viru chřipky typu A.	
35	Jak je patrné z údajů v tabulkách 1 až 3, předmětný léčebný přípravek v rozředění 1/10 a 1/20 při aplikaci 2 hodiny před infekcí spolehlivě chrání zvířata před chřipkovou infekcí.	
	Nízká počáteční koncentrace jodu v léčebném přípravku podle příkladu 1 (Tab. 2) přirozeně nedává možnost dosažení pozitivního účinku při další aplikaci léčebného přípravku.	
40	V tab. 4 jsou uvedeny údaje o zkoumání terapeutického účinku léčebného přípravku na chřipkovou infekci u myší. Dávky léčebného přípravku, vykazujícího virucidní účinek při profylaktické aplikaci, se myším aplikovaly vnitrobřišně počínaje 2 hodiny po infikování chřipkovým virem.	
	Analýza údajů tabulky 4 svědčí o hodnověrném snížení letality při aplikaci výchozího léčebného přípravku a léčebného přípravku v rozředění 1:10.	
45	V tabulce 5 jsou uvedeny údaje o zkoumání způsobilosti předmětného léčebného přípravku v rozředění 1/20 a 1/40 neutralizovat 100 TCD ₅₀ viru encefalomyokardu při aplikaci 1 hodina před a po infekci tímto virem. Způsobilost léčebného přípravku neutralizovat účinky viru se	

posuzovala podle míry cytopatického účinku na pokusných a kontrolních vzorcích s monovrstvou buněk Ner-2, ze kterých byla odtitrována živná kapalina.

Jak je patrné z údajů v tabulce 5, dokonce při aplikaci léčebného přípravku v rozředění 1/40, aplikovaného po infikování virem v dávce 100 TCD₅₀, rozdíl mezi pokusným a kontrolním souborem činil 3,5 až 4,0 log, což svědčí o značném potlačení viru.

Antivirový účinek předmětného léčebného přípravku na reprodukci prostého herpesviru (VPG) se zkoumal na vyvíjejících se kuřecích embryích, na jejichž vnějším zárodečném obalu se reprodukce VPG projevuje jako proliferace.

Výsledky pokusů, které jsou uvedeny v tabulce 6, svědčí o inhibici reprodukce viru působením léčebného přípravku v rozředění 1:10. Rozdíl mezi výsledky titrace viru u pokusného a kontrolního vzorku převyšuje 2 log, což svědčí o potlačení titru virů při pokusech 1 a 2 na 60 %, popřípadě 65 %.

V tabulce 7 jsou uvedeny údaje o vlivu předmětného léčebného přípravku na indukci humorální imunní odpovědi tonzilárních lymfocytů člověka na *Jersinia enterocolitica* a *Staphylococcus aureus*.

Jak vyplývá z údajů v tabulce 7, předmětný léčebný přípravek má schopnost stimulovat tvorbu protilátek v kulturách lymfocytů v koncentracích od 1/10 do 1/100 proti *Jersinia enterocolitica* a *Staphylococcus aureus*.

Předmětný léčebný přípravek také stimuluje baktericidní aktivitu lymfocytů člověka proti *Jersinia enterocolitica* a *Staphylococcus aureus*.

Byly zkoumány účinky předmětného léčebného přípravku na slintavku a kulhavku ovčí v provozních podmínkách. Získané údaje jsou uvedeny v tabulkách 8 a 9.

Údaje v tabulkách 8 a 9 potvrzují výše uvedená zjištění o profylaktickém účinku léčebného přípravku, protože po dvou injekcích léčebného přípravku se již neobjevovalo onemocnění zvířat s klinickými příznaky slintavky a kulhavky.

Údaje v tabulkách 8 a 9 také svědčí o nadějném terapeutickém účinku léčebného přípravku s virucidním účinkem, protože po dvou injekcích léčebného přípravku hromadné hynutí ustalo a zbylá nemocná zvířata se během 7-10 dní uzdravila. Celkový úhyn zvířat v pokusné skupině činil 1,83 %, zatímco v kontrolní skupině, nehledě na karanténní opatření, činil 14 %.

V tabulce 10 jsou uvedeny údaje o terapeutickém účinku předmětného léčebného přípravku při onemocněních člověka, vyvolaných virem obsahujícími jak DNA, tak i RNA. Léčebný přípravek se aplikoval dobrovolníkům.

Jak je patrné z údajů v tabulce 10, léčebný přípravek je účinný ve všech případech, zejména pak při rychle probíhajících infekcích, například chřipce, diarrhoea, prudkém respiračním onemocnění, slintavce a kulhavce. V žádném z případů nebyly pozorovány nějaké komplikace.

Výše uvedené příklady jsou pouze ilustrací podstaty technického řešení, aniž by toto nějak omezovaly.

Takto při pokusech in vitro a in vivo získané údaje o antivirovém účinku předmětného léčebného přípravku, absenci toxicity, schopnosti ničit vir vně buňky i uvnitř buňky, přítomnosti jak profylaktického, tak i terapeutického účinku a širokém spektru účinku dovolují přiřadit léčebný přípravek k účinným prostředkům pro chemoterapii virových infekcí.

Tabulka 1

Vliv profylaktické aplikace léčebného přípravku s virucidním účinkem na výsledek experimentální chřipkové infekce u myši. Složení léčebného přípravku podle příkladu 1.

podmínky pokusu	dávka přípravku mg/kg	počet molekul jodu v 1 l	poměr 1 IE k počtu molekul jodu	počet myši	absolutní počet uhynulých	% letality
P ¹ (1/10)+VG ²	12,32	5.10 ¹⁹	1:5.10 ¹⁰	100	12/100	12
P(1/20)+VG	6, 16	2,5.10 ¹⁹	1:2,5.10 ¹⁰	100	28/100	28
P(1/40)+VG	3, 08	1,25.10 ¹⁹	1:1,25.10 ¹⁰	100	50/100	50
remantadin+VG	1,66	7,9.10 ¹⁸	1:7,9.10 ⁹	100	16/100	16
VG				100	70/100	70

Poznámky:

- 5 1. P - přípravek (léčebný přípravek s virucidním účinkem)
2. VG - vir chřipky
3. v přepočtu na jod
4. IE - infekční jednotka

Tabulka 2

- 10 Vliv profylaktické aplikace léčebného přípravku s virucidním účinkem na výsledek experimentální chřipkové infekce u myši. Složení léčebného přípravku podle příkladu 1.

podmínky pokusu	dávka přípravku mg/kg	počet molekul jodu v 1 l	poměr 1 IE k počtu molekul jodu	počet myši	absolutní počet uhynulých	% letality
P+VG	3,69	1,50.10 ¹⁹	1:1,5.10 ¹⁰	100	38/100	38
P(1/10)+VG	0,369	1,50.10 ¹⁸	1:1,50.10 ¹⁹	100	60/100	60
remantadin	1,66	7,9.10 ¹⁸	1:7,9.10 ⁹	100	16/100	16
VG				100	70/100	70

Tabulka 3

Vliv profylaktické aplikace léčebného přípravku s virucidním účinkem na výsledek experimentální chřipkové infekce u myši. Složení léčebného přípravku podle příkladu 3.

podmínky pokusu	dávka přípravku mg/kg	počet molekul jodu v 1 l	poměr 1 IE k počtu molekul jodu	počet myši	absolutní počet uhynulých	% letality
P(1/31)+VG	12,32	5.10 ¹⁹	1:5.10 ¹⁰	100	11/100	11
P(1/62)+VG	6,16	2,5.10 ¹⁹	1:2,5.10 ¹⁰	100	27/100	27
P(1/124)+VG	3,08	1,25.10 ¹⁹	1:1,25.10 ¹⁰	100	51/100	51
remantadin+VG	1,66	7,9.10 ¹⁹	1:7,9.10 ⁹	100	16/100	16
VG				100	70/100	70

Tabulka 4

Vliv profylaktické aplikace léčebného přípravku s virucidním účinkem na výsledek experimentální chřipkové infekce u myši. Složení léčebného přípravku podle příkladu 2.

podmínky pokusu	dávka přípravku mg/kg	počet molekul jodu v 1 l	poměr 1 IE k počtu molekul jodu	počet myši	absolutní počet uhynulých	% letality
VG+P	123,2	$5 \cdot 10^{20}$	$1:5 \cdot 10^{11}$	100	3/100	3
VG+P(1/10)	12,32	$5 \cdot 10^{19}$	$1:5 \cdot 10^{10}$	100	21/100	21
VG+P(1/20)	6,16	$2,5 \cdot 10^{19}$	$1:2,5 \cdot 10^{10}$	100	42/100	42
VG+remantadin	1,66	$7,9 \cdot 10^{18}$	$1:7,9 \cdot 10^9$	100	20/100	20
VG				100	60/100	60

Tabulka 5

- 5 Vliv předchozí a následné aplikace léčebného přípravku s virucidním účinkem na reprodukci viru encefalomyokarditu (VEM) v buňkách kultury Ner-2. Složení přípravku podle příkladu 2.

podmínky pokusu	vyjádření CPD		výsledky titrování vzorků		stupeň inhibice v log	
	1. pokus	2. pokus	1. pokus	2. pokus	1. pokus	2. pokus
P(1/20)+VEM	0/4	1/4	1,0	2,0	5,5	4,5
P(1/40)+VEM	0/4	1/4	0,75	2,25	5,75	4,25
VEM+P(1/20)	1/4	1/4	1,5	1,75	5,0	4,75
VEM+P(1/40)	2/4	3/4	2,5	3,0	4,0	3,5
kontrolní VEM	4/4	4/4	6,5	6,5		

Tabulka 6

Výsledky zkoumání inhibičního účinku léčebného přípravku s virucidním účinkem na reprodukci viru prostého herpesviru (VPG) v kuřecích embryích (KE).

ředění viru	počet objektů (KE)	počet infikovaných KE				titry VPG v log			
		kontrolní		pokus		kontrolní		pokus	
		1.	2.	1.	2.	1.	2.	1.	2.
10^{-1}	100	100/100	75/100	50/100	50/100	3,75	3,5	1,5	1,25
10^{-2}	100	100/100	75/100	50/100	25/100				
10^{-3}	100	75/100	50/100	0/100	0/100				
10^{-4}	100	50/	50/	0/100	0/100				
10^{-5}	100	0/100	25/100	0/100	0/100				

Tabulka 7

Vliv různých koncentrací léčebného přípravku na tvorbu protilátek (AOK) v kultuře na antigeny. Složení přípravku podle příkladu 2.

podmínky pokusu	počet antigenspecifických AOK (v přepočtu na 1.10^6 buněk)	
	<i>Jersenia entercolitica</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
kontrolní	54	39
PWM*	155	74
ředění přípravku		
1:10	153	102
1:20	129	148
1:50	114	153
1:100	89	75

Poznámka:

- 5 *PWM - mitogen amerického lakonosu.

Tabulka 8

Výsledky působení léčebného přípravku s virucidním účinkem při slintavce a kulhavce ovčí. Složení přípravku podle příkladu 2. První aplikace přípravku.

počet ovcí, hlav	počet onemocnělých zvířat		dávka přípravku - 0,1 ml/kg živé hmotnosti vnitrosvalově			
	hlav	%	počet uhynulých zvířat		počet onemocnělých zvířat	
			hlav	%	hlav	%
pokus 1200	52	4,3	20	1,7	5	0,42
kontrola 500	25	5,0	15	3,0	20	4,1

Tabulka 9

- 10 Výsledky působení léčebného přípravku s virucidním účinkem při slintavce a kulhavce ovčí. Složení přípravku podle příkladu 2. Druhá aplikace přípravku za 24 hodin.

počet ovcí, hlav	počet onemocnělých zvířat		dávka přípravku - 0,3 ml/kg živé hmotnosti vnitrosvalově			
	hlav	%	počet uhynulých zvířat		počet onemocnělých zvířat	
			hlav	%	hlav	%
pokus 1200	52	4,3	2	0,17	-	-
kontrola 500	25	5,0	20	4,3	25	5,4*

* Poté byla u kontrolní skupiny provedena vakcinace, celkový úhyn činil 14 %.

Tabulka 10

Výsledky působení léčebného přípravku s virucidním účinkem při onemocnění virové povahy. Vnitrosvalová aplikace. Složení přípravku podle příkladu 2.

rodina, druh viru	onemocnění	počet dobrovolníků	dávka za 24 hod.	dobu léčení, dny	počet dávek
viry obsahující DNA:					
Herpetoviridae Herpesvirus 2	herpes	22	0,2	3 - 5	3
Adenoviridae Mastadenovirus	katar horních cest dýchacích	15	0,2	2 - 3	2 - 3
viry obsahující RNA:					
Reoviridae Rotavirus	diarrhoea	18	0,2	1 - 3	1 - 3
Coronaviridae Coronavirus	prudké respirační onemocnění	50	0,2	1 - 3	1 - 3
Ortomyxoviridae Influenzavirus A	chřipka	35	0,2	1 - 3	1 - 2
Picornaviridae Aphthovirus	slintavka, kulhavka	3	0,2	2 - 3	2

N Á R O K Y N A O C H R A N U

- 5 1. Léčebný přípravek s virucidním účinkem, zejména na viry obsahující DNA a RNA u savců, včetně člověka, obsahující jod, jodid draselný nebo sodný, syntetický polymer rozpustný ve vodě, přírodní polymery, například polysacharidy, monosacharidy a oligosacharidy, a vodu, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že přidavně obsahuje chlorid litný, při následujícím složení:

g/l

- 10 jod 0,8 až 25
jodid draselný nebo sodný 1,2 až 38
chlorid litný 0,1 až 20
syntetický polymer rozpustný ve vodě . . 0 až 6
přírodní polymery - polysacharidy,
15 monosacharidy a oligosacharidy 8 až 400
voda zbytek do 1 l.

2. Léčebný přípravek podle nároku 1, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že má imunomodulační a imunostimulační účinek.