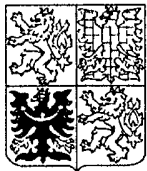


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: 21.04.1999
(32) Datum podání prioritní přihlášky: 21.04.1998 23.12.1998
(31) Číslo prioritní přihlášky: 1998/2235427 1998/2257001
(33) Země priority: CA CA
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: 14.03.2001
(Věstník č. 3/2001)
(86) PCT číslo: PCT/CA99/00359
(87) PCT číslo zveřejnění: WO99/53897

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 3899

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:
A 61 K 9/00

(71) Přihlašovatel:
INFECTIO RECHERCHE INC., Sainte-Foy, CA;

(72) Původce:
Bergeron Michel G., Sillery, CA;
Omar Rabeea F., Ste-Foy, CA;
Désormeaux André, Neufchatel, CA;
Juhasz Julianna, Quebec, CA;

(74) Zástupce:
PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1, Praha 4,
14000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Přípravky pro prevenci nebo léčbu onemocnění
postihujících sliznice nebo kůže nebo pro prevenci
otěhotnění a aplikátor pro dodávání místních
přípravků do slizničních kavit**

(57) Anotace:

Vynález se týká přípravků pro prevenci infekce a/nebo nenormálních stavů sliznice a/nebo kůže, způsobených jakýmkoli patogenem a/nebo jakýmkoli onemocněním a zejména pro prevenci pohlavně přenášených infekcí, speciálně HIV a HSV. Tento vynález se rovněž týká přípravků pro léčbu infekcí a/nebo nenormálních stavů kůže a/nebo sliznice a zejména léčbu oparových lézí. Přípravek je použitelný jako profylaktické činidlo pro prevenci náhodných infekcí zdravotníků. Přípravek je použitelný pro hojení a/nebo ošetřování popálenin a pro prevenci další infekce. Tento vynález se rovněž týká specifického vaginálního/anorektálního aplikátoru pro rovnoměrné dodávání jakýchkoli místních přípravků pro léčbu a/nebo prevenci jakékoli infekce a/nebo nenormálních stavů slizniční kavity, způsobených jakýmkoli patogenem a/nebo onemocněním.

CZ 2000 - 3899 A3

Přípravky pro prevenci nebo léčbu onemocnění postihujících sliznice nebo kůži nebo pro prevenci otěhotnění a aplikátor pro dodávání místních přípravků do slizničních kavit

Oblast techniky

Tento vynález se týká přípravků, které se skládají z film vytvářejících složek a jakékoli aktivní přísady, zvláště místních přípravků. Zejména se tento vynález týká místních přípravků pro prevenci onemocnění nebo pro léčbu onemocnění spojených s nebo přenášených skrze sliznici nebo kůži, způsobených jakýmkoli příčinným původcem, zvláště patogenem. Tento vynález se rovněž týká aplikátoru pro rovnoměrné dodávání místních přípravků pro prevenci nebo pro léčbu jakýchkoli onemocnění, spojených s přenosem skrze slizniční kavity nebo pro prevenci napadení vnějším původcem, například spermií nebo mikroblem.

Dosavadní stav techniky

Šíření pohlavně přenášených onemocnění (STD) (Sexually Transmitted Disease), vyvolávaných virem nedostatečné imunity člověka (HIV – Human Immunodeficiency Virus), oparem (herpes) a jinými patogeny probíhá zářející rychlostí. Globální výskyt, nemocnost a úmrtnost na STD jsou velmi význačné. Celosvětově se odhaduje, že více než 900 milionů jedinců je infikováno pohlavně patogeny. Každoročně je v USA více než 12 milionů lidí nově infikováno patogeny, které jdou na vrub STD. Nejobvyklejšími příčinami tvorby vředů na pohlavních orgánech v rozvinutých zemích jsou vir oparu rtu typu 1 (HSV-1) a typu 2 (HSV-2) (HSV – Herpes Simplex Virus). Oparová infekce pohlavních orgánů je celoživotní a může mít za následek bolestivé a recidivující genitální léze, systemické komplikace a psychosociální nemocnost a rovněž vážná novorozenecká onemocnění po přenosu HSV v období během porodu. Přenos pohlavními orgány těchto patogenů je obvykle následkem bezpříznakového virového uvolňování endometria u lidí, kteří si nejsou vědomi, že jsou infikováni. HSV-2 je nyní zjištělný u jednoho z pěti Američanů ve věku 12 let nebo starších. Kromě toho se odhaduje, že více než jedna třetina světové populace má recidivující infekce HSV a je proto schopna přenášet vir během záchvatů produktivní infekce. Neisseria gonorrhoeae a Chlamydia trachomatis jsou uznávané jako nejvíce se vyskytující pohlavně přenášené bakteriální infekce. Celosvětově se odhaduje roční výskyt 25 milionů případů kapavky a 50 milionů případů chlamydie. Naproti tomu nedávné epidemiologické údaje naznačují, že počet jedinců infikovaných HIV, dramaticky

v celém světě vzrůstá. Podle úředních míst OSN odhady epidemiologických údajů uvádějí, že každý den se v roce 1997 infikovalo HIV 16.000 jedinců. Nedávné statistiky (např. z konce 1997) Světové zdravotnické organizace WHO (World Health Organization) uvádějí, že na celém světě je 31 milionů lidí infikovaných HIV a rýsuje se, že v roce 2000 tento počet dosáhne 40 milionů.

Celosvětově je heterosexuální přenos zdrojem 85 – 90 % infekcí HIV. Jelikož neexistuje vakcína proti HIV, tak preventivní opatření jsou jedinými nástroji, které v současnosti mohou omezit přenášení těchto retrovirů. Důsledné a pečlivé používání kondomů představuje účinnou bariéru proti pohlavnímu přenosu HIV a dalších pohlavně přenášených patogenů, ale musí být používány při všech rizikových pohlavních stycích, aby se pravděpodobnost druhotné infekce podstatně snížila. V Africe byly nejintenzivnější preventivní programy schopny zvýšit používání kondomů o přibližně 70 % při všech pohlavních stycích prostitutek. Proto vznikají pochybnosti o možnostech kondomové pomoci při potírání epidemie AIDS u vysoce rizikových skupin. V situacích, kde heterosexuální přenos HIV je významný, tak preventivní opatření, kterými by ženy mohly zabránit riziku získání STD, by mohla být přídavným nástrojem pro potlačení epidemie. Takovýto ochranný nástroj lze rovněž použít při mužských homosexuálních vztazích, neboť může poskytnout přídavnou ochranu pod kontrolou receptivního partnera. Proto je důležité vyvinout bariérový způsob, který lze použít jako alternativu ke kondomu tam, kde osoba může chránit sama sebe před infekcí, aniž by musela ptát svých sexuálních partnerů. Preventivní opatření, směřující k blokování počátečního přenosu patogenů, které jsou příčinnými původci AIDS, oparů a dalších STD, budou přirozeně nesmírně prospěšná.

Vývoj bezpečných místních mikrobicidů má pro Světovou zdravotnickou organizaci (WHO) a pro Národní instituty zdraví (NIH) (National Institutes of Health) na poli prevence HIV velmi vysokou prioritu. Místní mikrobicid se často skládá z aktivní přísady a nosiče. Aktivní přísada působí prostřednictvím různých mechanismů, včetně: i) rozrušení buněčných membrán organismů, obalových nebo kapsidových lipidových nebo proteinových složek (např. spermicidy/mikrobicidy detergentového typu, jako je nonoxynol-9), ii) blokování receptor-ligandových interakcí, nezbytných pro infekčnost (např. mikrobiálními adhezními inhibitory, jako jsou sulfatizované sloučeniny), iii) inhibice nitrobuňkové nebo mimobuněčné replikace patogenu (např. antimikrobiálními léky), iv) změna vaginálního prostředí a snížením náchylnosti k infekci (např. pufrovacími činidly a produkty udržujícími normální vaginální flóru a prostředí) nebo v) zvýšení místní imunitní odezvy (např. modifikátory imunitní odezvy). Všeobecná

účinnost místního mikrobicidu vůči pohlavnímu přenosu patogenu, který způsobuje STD, závisí na účinnosti aktivní složky, která má být dodána a na její schopnosti pokrývat celou oblast vaginy/cervixu s maximální účinností proti patogenům. Schopnost těchto aktivních činidel pokrývat celou vaginální dutinu závisí ve velké míře na typu použitého nosiče. Typické přípravky nosičů zahrnují gely, krémy, pěny, čípky, tampony a filmy.

Nejnověji dostupné vaginální přípravky používají jako mikrobicid spermicid nonoxynol-9, neiontové povrchově aktivní činidlo. Při zkoumání mimo živý organizmus nonoxynol-9 inaktivuje vyvinuté viry, např. HSV, HIV a další mikroorganismy včetně Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae. Avšak v úvahu přicházející účinnost látky nonoxynol-9 vůči HIV není dosud zcela jasně stanovena a výsledky klinický pokusů jsou sporné. Nedávné řízené pokusy, prováděné s 1292 HIV negativními ženskými sexuálními pracovníci v Kamerunu ukázaly, že použití vaginálního filmu s obsahem 70 mg látky nonoxynol-9 nesnížilo počet nových infekcí HIV, kapavky nebo chlamydie (Roddy a spolupr., 1998, N. Engl. J. Med., 339:504-510). Selhání filmu látky nonoxynol-9 při snižování přenosu původců infekce lze připsat neúplnému pokrytí celé oblasti vaginy/cervixu systémem dodávajícím lék nonoxynol-9 nebo výskytem mukózní toxicity, podporující infekci mikroorganismů. Pro dramatický nárůst počtu jedinců ve světě, kteří jsou infikováni HIV, opary nebo dalšími pohlavně přenášenými patogeny, existuje naléhavá potřeba vyvinout účinné produkty a/nebo patřičné dodávací systémy, které mohou snížit pohlavní přenos těchto patogenů při minimálním mukózním podráždění a minimálním účinku na vaginální flóru a pH.

Natrium-laurylsulfát (SLS – Sodium Lauryl Sulfate) je sulfatizované povrchově aktivní činidlo, které denaturuje membránové proteiny patogenů. Proto působí podvojně: jako detergent a jako chaotropní činidlo. S touto představou jsme vykonali pokusy vyhodnotit potenciální mikrobicidní účinek SLS na HSV a HIV. Naše počáteční studie jasně ukázaly, že SLS pozměňuje při zkoumání mimo živý organizmus infekčnost obou virů. Zcela nedávno Howett a kol. potvrdili naše nálezy, že SLS je rovněž silný inaktivátor HSV-2 a HIV-1 (Antimicrob. Agents Chemother. 43(2): 314-321, 1999). Kromě toho ukázali, že SLS je účinný proti králičím, hovězí a lidským papilomavirům (nevyvinutým virům) po krátkém ošetření nízkou koncentrací tohoto produktu. Nicméně tento odkaz nepoučuje o použití nosiče pro dodání tohoto potenciálního mikrobicidu. Volba nosiče je velmi důležitá, protože ovlivňuje koncentraci léků, které jsou k dispozici, trvání dostupnosti léku a stupeň pokrytí sliznice přípravkem, což jsou klíčové faktory pro poskytování ochrany proti invazivním patogenům. Další zajímavou kategorií

obcidů přicházejících v úvahu pro použití jako mikrobicidy jsou mikrobiální adhezní faktory, např. sulfatizované sloučeniny, které blokují interakce mezi receptorem hostitelské buňky a mikroblem. Znáмым příkladem mikrobiálních adhezních inhibitorů je dextransulfát, což je polysulfatizovaný cukr, který, jak se ukázalo při zkoumání mimo živý organizmus, snižuje infekčnost HIV a skupiny oparových virů.

Nedávno jsme vyvinuli gelový přípravek, který se aplikuje na vaginální, cervikální nebo anorektální sliznice a který je účinný pro prevenci pohlavně přenášených patogenů. Jedním z hlavních znakem tohoto gelového přípravku je jeho termoreverzibilita. Přejít z kapalného stavu při teplotě místnosti do gelovitého stavu při teplotě těla má základní důležitost, protože přilnutí na drsné biologické povrchy, například na vaginální nebo anorektální epitel, musí gel přilnout do nejmenších nepravidlostí a tak tvořit dobrou fyzickou bariéru proti původcům onemocnění. Gelový přípravek má následující klíčové znaky, které jak FDA, tak i NIH považují za důležité: i) je bezbarvý, bez zápachu, netvoří skvrny, ii) pokrývá celou vaginu/cervix, proto se používá v tekutém stavu, iii) je kompatibilní s latexovým kondomem, iv) odolává vymývání vodou, v) má pH, které se podobá pH zdravé vaginy (pH 4,0 – 4,5), vi) uchovává si přirozené reologické vlastnosti v podmínkách extrémního tepla a chladu a vii) neovlivňuje, pokud je aplikováno mimo živý organizmus, normální vaginální flóru, zejména *Lactobacillus spp.*

Naše mezinárodní zveřejnění (WO 97/42962) uvádí použití přípravků, které se skládají z tenkých vytvářejících film, které jako takové jsou schopné tvořit fyzickou bariéru pro patogeny. Pro použití výhodné pro toto použití jsou termoreverzibilní gely, například poloxamery. Filmové přípravky dále obsahují mikrobicidy, spermicidy nebo jakékoli další léky, jejichž účinnost se řídí tím, jaké patogeny, organizmy nebo onemocnění mají být inaktivovány nebo zabity.

Přípravky jsou proto účinné jako fyzická a volitelně jako chemická nebo farmakologická bariéra a rovněž použitelné jako systém trvale uvolňující léky na místě podávání. Tyto přípravky jsou určeny pro použití při prevenci pohlavně přenášených onemocnění a rovněž při léčbě

gonorey, rakoviny, zánětu nebo jakékoli onemocnění nebo stavu, který vyžaduje farmakologickou léčbu.

Kromě toho toto zveřejnění poučuje, že přípravek snižuje toxicitu silných

obcidů/mikrobicidů, například látky nonoxynol-9. Avšak toto zveřejnění konkrétně

se týká použití SLS jako chemické látky přicházející v úvahu pro začlenění do místního přípravku.

HSV-1 a HSV-2 jsou neurotropní viry, které infikují v první řadě neuroektodermální tkáň, včetně kůže, periferní nervy a ústřední nervový systém. Sliznice nebo povrch kůže jsou obvykle místy primární infekce. Recidivující herpes labialis a herpes genitalis představují nejobvyklejší klinické projevy spojené s infekcemi HSV-1 a HSV-2. Recidivy jsou spontánní, ale jsou spojeny s fyzickým nebo citovým stresem, horečkou, vystavením ultrafialovému záření, poškozením tkáně a potlačením imunity. Ačkoli u jedinců s patřičnou imunitou jsou infekce HSV mírné onemocnění, tak pro pacienty, zejména s častými příhodami, jsou obtížné. Pacienti ohrožení buď imunologickou léčbou nebo probíhajícím onemocněním mají zvýšené riziko, že se u nich vyvine infekce HSV. U příjemců ledvinových nebo srdečních transplantátů je zvýšená závažnost infekce. Kromě toho vypuknutí AIDS posílilo u imunitně ohrožených hostitelů vážnost klinických onemocnění HSV.

Současná dostupná místní antivirová léčba má jenom omezenou účinnost zvláště proti symptomaticky recidivujícímu oparu. Omezená účinnost těchto místních přípravků na vývoj oparových mukokutánních poškození je připisována chabé schopnosti léků pronikat do kůže. Stratum corneum nebo rohovitá vrstva představuje bariéru pro pronikání většiny látek do kůže. Tato vrstva se skládá z korneocytů, uložených v dvouvrstvé lipidové matrici, která se skládá z cholesterolu, volných alifatických kyselin a ceramidů. V důsledku toho použití látek, které zvyšují pronikání kůží, představuje pohodlnou strategii pro zvyšování pronikání přípravku místního léku do kůže.

SLS je povrchově aktivní činidlo, jehož vlastností je zvyšování pronikání kůží zvýšením tekutosti epidermálních lipidů. Vlastnost SLS zvyšovat pronikání kůží, kombinovaná s jeho schopností měnit virovou infekčnost cestou jeho detergentních a chaotropních vlastností, dále zvyšuje účinnost přípravků místních léků. Pro své chaotropní vlastnosti má SLS kromě toho širší spektrum účinnosti než jiný prostý detergent proti spermii, bakteriím, houbám a virům.

Poloxamery jsou široce využívané v četných farmaceutických aplikacích a jejich netoxické vlastnosti je činí vhodnými pro systémy trvalého dodávání léku. Poloxamery představují vhodné matrice pro dermatologické aplikace. Při nanášení v kapalně formě poloxamery fakticky umožňují lepší pokrytí povrchu pronikáním do nejmenších nepravidelností sliznice a/nebo pokožky. Kromě toho těmito poloxamery vytvořené retikulární uspořádání působí jako systém trvalého uvolňování léku a tak prodlužuje působení léku.

stata vynálezu

V souladu s předloženým vynálezem je prvním předmětem poskytnout přípravky, které se skládají z film vytvářející složky, která se nanáší na povrch sliznice nebo kůže, výhodně ve formě gelu, krému nebo masti. Gelové přípravky jsou určeny pro povlékání různých typů sliznice, například vaginy, cervixu, anorekta, oka, úst, nosu nebo kůže pro prevenci infekce nebo nenormálních stavů sliznice a/nebo kůže. Kromě toho se gelové přípravky nanášejí také do oka pro léčbu a/nebo prevenci infekcí očních stavů. Výhodně se používá termoreverzibilní gel, který se nanese v tekuté formě, namaže na povrch a po dosažení teploty povrchu těla vytvoří polotuhý povlak. Výhodněji se termoreverzibilní gel skládá z poloxameru 407. Podobné polymery, například poloxaminy, jsou rovněž použitelné. Shora uvedené přípravky rovněž obsahují činidlo, které je schopno interferovat s buněčnou membránou mikroorganismů, obalovými nebo kapsidovými lipidovými nebo proteinovými složkami v cílové tkáni nebo mikrobu. Shora uvedená kombinace film vytvářející složky a shora uvedeného činidla poskytnou přípravky se zlepšenou účinností a sníženou toxicitou.

Ve specifickém provedení je činidlo schopno interferovat s vazáním se mikrobiálního proteinu na hostitelský receptor. Ve specifičtějším provedení je činidlo mikrobiální membránový inhibitor nebo je to detergent nebo chaotropní činidlo, schopné rozrušovat integritu vnějšího mikrobiálního proteinu. V ještě specifičtějším provedení je mikrobiální membránový inhibitor je dextran-sulfát; detergent se vybere ze skupiny, která se skládá z natrium-sulfátu, benzalkoniumchloridu, lauroylsarkosinu, polyoxyethylenových alifatických derivátů a polyoxyethylensorbitanových alifatických acylesterderivátů; a chaotropní činidlo je natrium-laurylsulfát nebo guanidin. V nejspecifičtějším provedení je činidlem SLS, který je nejvíce vhodným činidlem přicházejícím v úvahu pro použití z důvodu jeho četných vlastností jako membránový inhibitor a chaotropní činidlo a předpokládaný mikrobiální adhezni inhibitor. SLS samotný je účinný proti mikrobům. Účinnost SLS se dále zlepšuje při začlenění do těchto přípravků. Proto se předpokládá, že SLS nebo jakýkoli rovnocenný produkt je použitelný samostatně nebo v kombinaci se shora uvedenými film vytvářející složkou pro prevenci mikrobiální infekce. SLS může být použito samostatně nebo v kombinaci se shora uvedenými přípravky v jakékoli vhodné koncentraci, výhodně v koncentraci 0,1 – 25 % (hmotnostních/objem) a výhodněji v koncentraci 5 – 25 % (hmotnostních/objem). Poloxamer 407 se použije v jakékoli vhodné koncentraci, výhodně v koncentraci 5 – 50 % (hmotnostních/objem) a výhodněji v koncentraci 15 – 35 % (hmotnostních/objem). Fyzikální vlastnosti finálních přípravků velice závisí na léku, který se do

nich začlenění, na pH a rozpuštěných látkách, použitých při přípravě přípravků a na viskozitě požadované pro daný účel. Shora uvedené přípravky dále obsahují lék, který je účinný pro prevenci infekce a/nebo nenormálních stavů sliznice nebo kůže. Vaginální přípravky představují fyzickou a chemickou bariéru následkem jejich film vytvářejících a mikrobiálně rozrušujících složek. Společně s tím, s účinností proti původcům infekce, jsou tyto přípravky rovněž účinné pro prevenci těhotenství. SLS v přípravcích výhodně nahradí nonoxynol-9. Pro použití v tomto přípravku přichází v úvahu SLS, které má širší spektrum aktivity mj. proti spermii, obaleným a neobaleným virům. Gel obsahuje lék, který je účinný pro prevenci infekce a/nebo nenormálních stavů sliznice a/nebo kůže. Pro účel tohoto vynálezu je výraz „lék“ určen pro pokrytí jakéhokoli antibakteriálního, baktericidního, antivirového, chemoterapeutického, protizánětlivého, protinádorového, imunomodulačního a jakéhokoli jiného činidla nebo jejich kombinace, které je účinné pro prevenci infekce sliznice a/nebo kůže. Výraz „lék“ se rovněž týká cytokinů nebo antigenů, které povzbuzují imunitní odezvu chránící proti infekci. Léky se začlení do nosičů léku, například gelů, liposomů, mikročástic nebo cyklodextrinů, jejich zapouzdření má za následek zlepšenou prevenci infekce.

Dále je předmětem tohoto vynálezu poskytnutí specifického aplikátoru, který lze použít vaginálně a/nebo anorektálně pro dodávání místních přípravků pro léčbu a/nebo prevenci infekce a/nebo nenormálních stavů sliznice. Aplikátor se konstruuje různými způsoby tak, aby dával stejné požadované znaky, specifikované v podrobném popisu vynálezu. V podrobném popisu jsou rovněž diskutovány příklady několika rozdílných návrhů, které jsou určeny pro popis několika obecných konstrukčních možností aplikátoru, ale v žádném případě nejsou určeny pro omezení rámce tohoto dokumentu. Důležité je zmínit, že konečný vzhled aplikátoru se může lišit od příkladů, které jsou zde uvedeny.

V dalších výhodných provedeních se tyto přípravky používají pro léčbu virových onemocnění a dále obsahují jako lék antivirové činidlo, například acyclovir nebo foscarnet nebo jakákoli další antimikrobiální činidla, použitá samotná nebo v kombinaci, v jakékoli vhodné koncentraci. V nejvýhodnějším provedení se přípravek skládá z poloxameru 407 a obsahuje foscarnet v koncentračním rozmezí od 0,5 do 5 % (hmotnostních/objem). V dalším nejvýhodnějším provedení se přípravek skládá z poloxameru 407 a obsahuje acyclovir v koncentračním rozmezí od 0,5 do 5 % (hmotnostních/objem). V ještě dalším nejvýhodnějším provedení se přípravek skládá z poloxameru 407 a obsahuje SLS v koncentračním rozmezí od 1 do 10 % a foscarnet nebo acyclovir ve shora uvedených koncentracích.

Rovněž je předmětem tohoto vynálezu vyvinutí nových místních přípravků pro prevenci a sliznice a/nebo kůže, zejména pohlavně přenášených infekcí a to ještě zejména infekcí oboustranných HIV a opary. Mikrobicidy nebo jakýkoli další lék se zachytí do gelových přípravků buď jako volné nebo zapouzdřené do nosičů léku, například liposomů, mikročástic dextranů. Tyto mikrobicidní gely prodlužují lokální mikrobicidní aktivitu, vylučují podráždění a snižují systemické vedlejší účinky začleněných aktivních činidel.

Rovněž je předmětem vynálezu vyvinutí specifického aplikátoru pro vaginální aplikace, umožňuje rovnoměrnou distribuci obsahu do celé vaginy (dodávání na stěny) a na cervix (dodávání na přední stranu) pro maximální ochranu před pohlavním přenosem patogenů. Proto navrhl specifický aplikátor, který umožňuje 360stupňovou distribuci jeho obsahu do vaginy a dále na cervix, což je velké zlepšení ve srovnání s existujícími obvyklými vaginálními aplikátory, které dodávají obsahy jenom na přední stranu (jen do oblasti cervixu).

Dalším předmětem tohoto vynálezu je vyvinutí místních přípravků léků, které zlepšují účinnost chemicky nebo farmakologicky aktivních činidel proti mukokutánním infekcím a také proti infekcím HSV. Zlepšená účinnost léků po začlenění do vhodných matric a/nebo aplikátorů redukuje dávkovací interval a v důsledku toho zlepšuje jakost života pacientů.

Rovněž je předmětem tohoto vynálezu vyvinutí místních přípravků pro léčbu a/nebo hojení ran a rovněž pro prevenci jejich potenciální infekce.

Popis specifických provedení tohoto vynálezu

Tento vynález bude v dokumentu dále popsán odkazováním na specifická provedení a přiložená vyobrazení, jejichž účelem je vynález spíše objasnit, než omezit jeho rámeček.

Stručný popis vyobrazení

Obr. 1 ukazuje infekčnost HSV-1 (kmen F) pro buňky Vero po předošetření virů různými koncentracemi SLS (panel A) nebo DS (panel B) po dobu 1 h při 37 °C (●) nebo po přidání SLS nebo DS k virům bez předošetření (○). Plak tvořící jednotky (PFU - Plaque Forming Units) jsou vyjádřeny jako procenta kontrolního vzorku. Výsledky jsou ± střední hodnota SD čtyř nezávislých pokusů.

Obr. 2 ukazuje účinnost různých koncentrací SLS (panel A) nebo DS (panel B) na HSV-1 (kmen F) v buňkách Vero. Plak tvořící jednotky (PFU) jsou vyjádřeny jako procenta kontrolního vzorku. Výsledky jsou ± střední hodnota SD čtyř nezávislých pokusů.

Obr. 3 objasňuje vliv předošetření HIV-1 (kmen NL4-3) po dobu 1 h při 37 °C 500 μM SLS na jeho infekčnost pro buňky 1G5. Hodnoty představují ± střední hodnotu SD tří stanovení.

Obr. 4 ukazuje elektronický mikrosnímek buněk Vero infikovaných virem HSV-1 (kmenem F), předošetřovaným 1 h při 37 °C 50 μM SLS (panel B), 75 μM SLS (panel C) a 100 μM SLS (panel D). Buňky infikované virem HSV-1 (kmen F) v nepřítomnosti SLS byly použity jako kontrolní (panel A). Zvětšení je 70.000násobné.

Obr. 5 ukazuje hodnocení množství glykoproteinu D HSV-1 (kmen F) předošetřovaného po dobu 1 h při 37 °C 12,5 μM SLS, 25 μM SLS, 50 μM SLS, 75 μM SLS a 100 μM SLS v buňkách Vero. Jako kontrolní byly použity buňky infikované HSV-1 (kmen F) v EMEM + 2 % FBS. Hodnoty jsou vyjádřeny jako procenta hybridizace signální intenzity ve srovnání s kontrolním vzorkem.

Obr. 6 ukazuje časový průběh přežívání myši infikovaných intranazálně virem HSV-2 (kmen 22), předošetřovaným po dobu 1 h při 37 °C 6,25 μM SLS (●), 25 μM SLS (○) a 100 μM SLS (▲). Jako kontrolní (□) byly použity myši, které byly infikovány neošetřenými virem. Výsledky jsou vyjádřeny jako střední hodnota 8 zvířat na skupinu.

Obr. 7 ukazuje časový průběh středního bodového ohodnocení lézí myši infikovaných virem HSV-1 (kmen F), předošetřovaným 1 h při 37 °C různými koncentracemi [6,25 μM SLS (●), 25 μM SLS (○) a 100 μM SLS (▲) (panel A)] nebo různými koncentracemi 5 nM DS (●), 1 nM DS (○) a 10 nM DS (▲) (panel B)]. Jako kontrolní (□) byly použity myši, které byly infikovány neošetřenými virem. Výsledky jsou vyjádřeny jako střední hodnota 6 zvířat na skupinu.

Obr. 8 ukazuje časový průběh středního bodového ohodnocení lézí myši infikovaných virem HSV-1 (kmen F) po předošetření myši poloxamerovým přípravkem samotným 5 min (○) nebo 1 h (Δ) před infikováním nebo poloxamerovým přípravkem s obsahem 5 % SLS, rovněž 5 min (●) nebo 1 h (▲) před infikováním. Jako kontrolní (□) byly použity myši, které nebyly předošetřeny. Výsledky jsou vyjádřeny jako střední hodnota 6 zvířat na skupinu.

Obr. 9 ukazuje časový průběh středního bodového ohodnocení lézí (panel A) a přežití (panel B) myši infikovaných intravaginálně virem HSV-2 (kmen 333), předošetřených gelem samotným (■, ▲, ●) 5 min před infikováním. Jako kontrolní (□, Δ, ○) byly použity infikované neošetřené myši. Výsledky jsou střední hodnota 8 zvířat na skupinu.

Obr. 10 ukazuje časový průběh přežití myši infikovaných intravaginálně virem HSV-2 (kmen 333), předošetřených 2,5% SLS (★) nebo gelem + 2,5% SLS (●) 5 min před infikováním. Jako kontrolní (□) byly použity infikované neošetřené myši. Výsledky jsou vyjádřeny jako střední hodnota 8 zvířat na skupinu.

Obr. 11 ukazuje časový průběh přežití myši infikovaných intravaginálně virem HSV-2 (kmen 333), předošetřených gelem + 5% polyoxyethylen-40-stearátem (●), gelem + 5% laurylsulfátem (○), gelem + 2,5% lauroylsarkosinem (▲), gelem + 2,5% benzalkoniumchloridem (◇) nebo gelem + 5% tween 80 (◆) 5 min před infikováním. Jako kontrolní (□) byly použity infikované neošetřené myši. Výsledky jsou střední hodnota 7 až 10 zvířat na skupinu.

Obr. 12A je celkový pohled, objasňující první provedení aplikátoru podle hlediska tohoto vynálezu.

Obr. 12B je pohled z boku, ukazující rozměry v palcích aplikátoru z Obr. 12A.

Obr. 12C je rozložený pohled na složky aplikátoru z Obr. 12A.

Obr. 12D je pohled, objasňující podrobnosti vnějšího povrchu proximálního konce vnitřní stěny aplikátoru z Obr. 12A.

Obr. 13A je celkový pohled, objasňující druhé provedení aplikátoru podle hlediska tohoto vynálezu.

Obr. 13B je pohled z boku, objasňující rozměry v palcích aplikátoru z Obr. 13A jak ve vkládací, tak i v činné poloze.

Obr. 13C je rozložený pohled na složky aplikátoru z Obr. 13A.

Obr. 14A je celkový pohled na třetí provedení aplikátoru podle hlediska tohoto vynálezu; aplikátor je vyobrazen ve vkládací poloze.

Obr. 14B je celkový pohled na aplikátor z Obr. 14A, vyobrazený v činné poloze.

Obr. 14C je pohled z boku, objasňující vnitřní podrobnosti aplikátoru z Obr. 14A ve vkládací poloze.

Obr. 14D je pohled z boku, objasňující vnitřní podrobnosti aplikátoru z Obr. 14A v činné poloze.

Obr. 15A je celkový pohled na čtvrté provedení aplikátoru podle hlediska tohoto vynálezu.

Obr. 15B je rozložený pohled na aplikátor z Obr. 15A.

Obr. 15C je pohled z boku, objasňující vnější stěnu aplikátoru z Obr. 15A, kde rozměry jsou udány v palcích.

Obr. 15D je pohled z boku na píst/zásobník aplikátoru z Obr. 15A, kde rozměry jsou udány v palcích.

Obr. 15E je pohled z boku v řezu na díl aplikátoru z Obr. 15A, objasňující podrobnosti uspořádání píst/zásobník se zřetelem na vnitřní a vnější stěny těla aplikátoru.

Obr. 16 ukazuje časový průběh středního bodového ohodnocení lézí (panel A) a přežití (panel B) bezsrstých myši infikovaných kožně virem HSV-1 a ošetřených místně samotným poloxamerem (■), 0,5% foscarnetem ve vodném roztoku (○) nebo poloxamerem s obsahem 0,5 % foscarnetu (●). Infikované neošetřené myši byly použity (□) jako kontrolní. S ošetřováním se bylo začalo 24 h po infikování a opakovalo se třikrát denně po 4 dny. Výsledky jsou vyjádřeny jako střední hodnota 4 zvířat na skupinu.

Obr. 17 ukazuje časový průběh středního bodového ohodnocení lézí (panel A) a přežití (panel B) bezsrstých myši infikovaných kožně virem HSV-1 (kmen F) a ošetřených 24 h po infikování jedinou aplikací buď poloxameru s obsahem 5 % acycloviru (●) nebo mastí Zovirax[®] (○). Infikované neošetřené myši byly použity (□) jako kontrolní. Výsledky jsou vyjádřeny jako střední hodnota 7 až 10 zvířat na skupinu.

Obr. 18 ukazuje časový průběh středního bodového ohodnocení lézí (panel A) a přežití (panel B) bezsrstých myši infikovaných kožně virem HSV-1 (kmen F) a ošetřených místně samotným poloxamerem (■), poloxamerem s obsahem 5 % acycloviru (●) nebo mastí Zovirax[®] (○). Infikované neošetřené myši byly použity (□) jako kontrolní. S ošetřováním se začalo 5 dnů po infikování a opakovalo se třikrát denně po 4 dny. Výsledky jsou vyjádřeny jako střední hodnota 7 až 10 zvířat na skupinu.

Obr. 19 ukazuje distribuci foscarnetu (Δ, ▲) a acycloviru (○, ●) v kožní tkáni neinfikovaných (panely A, C, E) a infikovaných (panely B, D, F) myši 24 h po místní aplikaci buď ve fosfátovém pufru (obrysové symboly) nebo v poloxameru (plné symboly). Panely A a B ukazují distribuci foscarnetu a acycloviru v proužcích stratum corneum. Panely C a D ukazují koncentraci foscarnetu a acycloviru v epidermis, zatímco panely E a F ukazují koncentraci foscarnetu a acycloviru v dermis. Hodnoty jsou vyjádřeny jako střední hodnota 4 až 6 zvířat na skupinu.

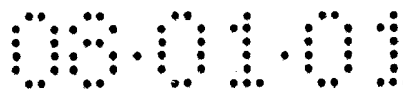
Obr. 20 ukazuje koncentraci acycloviru v plazmě neinfikovaných a infikovaných myší 24 h po místní aplikaci buď ve fosfátovém pufru (obrysové sloupce grafu) nebo v poloxameru (plné sloupce). Hodnoty jsou vyjádřeny jako střední hodnota 4 až 6 zvířat na skupinu.

Obr. 21 ukazuje časový průběh středního bodového ohodnocení lézí (panel A) a přežití (panel B) bezsrstých myší infikovaných kožně virem HSV-1 (kmen F), ošetřených samotným poloxamerem (■), poloxamerem s obsahem 3 % foscarnetu (○), poloxamerem s obsahem 5 % SLS (●) nebo poloxamerem s obsahem 3 % foscarnetu + 5 % SLS (Δ). Infikované neošetřené myši byly použity (□) jako kontrolní. Výsledky jsou vyjádřeny jako střední hodnota 5 zvířat na skupinu.

Obr. 22 ukazuje citlivost HSV-1 (kmen F) na kombinace různých koncentrací foscarnetu a SLS v buňkách Vero. Hodnoty jsou vyjádřeny jako střední hodnota ± SD tří stanovení.

Gelové přípravky

Poloxamer 407 je blokovaný kopolymer polyoxyethylenu a polyoxypropylenu v hmotnostním poměru 7 : 3, s průměrnou relativní molekulovou hmotností 12.500. Jedním důležitým znakem tohoto blokového kopolymeru je jeho schopnost tvořit termoreverzibilní gel. Přechod z kapalného stavu při nízké teplotě do gelového stavu při teplotě těla (teplota fázového přechodu částečně závisí na koncentraci gelu, iontové koncentraci a začleněných rozpuštěných látkách) umožňuje řadu zajímavých léčebných aplikací, včetně aplikací místních. Tento znak má prvořadou důležitost, protože při místním aplikování v kapalném stavu na sliznici musí gelový přípravek umožnit během aplikace lepší pronikání do nepravidelností kůže a/nebo sliznice a delší přetrvávání, jakmile gel dosáhl teploty těla. Jelikož naše gelové přípravky mají mimořádně nízkou toxicitu a dráždivost, tak představují přitažlivé pojetí systémů pro místní dodávání léku. Podrobnosti pro přípravu gelových přípravků jsou poskytnuty dále v tomto dokumentu. Tento vynález pokrývá gelové přípravky poloxameru 407 jakékoli vhodné koncentrace a zejména koncentrací mezi 10 a 35 % hmotnostními/objem. Tento vynález rovněž pokrývá jakoukoli další film vytvářející složku, gel, krém, mast nebo termoreverzibilní látku včetně jiných poloxamerů, poloxaminů nebo chemikálií.



Léky

Do rámce tohoto vynálezu spadá jakýkoli antimikrobiální, baktericidní, antivirový, chemoterapeutický, protizánětlivý, protinádorový, imunomodulační lék nebo jejich kombinace, který je účinný pro prevenci nebo léčbu infekce a/nebo nenormálních stavů sliznice a/nebo kůže, způsobených jakýmkoli patogenem a/nebo jakýmkoli onemocněním. V rámci tohoto vynálezu jsou rovněž jakýkoli detergent, který je schopen rozrušit membránu patogenů, jakékoli činidlo zvyšující pronikání kůží, které zvyšuje pronikání léků a/nebo nosičů léků do sliznice a/nebo kůže, jakýkoli mikrobiální adsorpční inhibitor, zabraňující patogenům ve vstupu do cílové buňky, jakýkoli cytokin nebo antigen, schopný podpořit imunitní odezvu, které by chránily proti infekci patogeny. Tento vynález rovněž pokrývá jakoukoli kombinaci místních přípravků a/nebo léků.

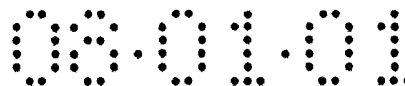
Příklady provedení vynálezu

Příklady týkající se našich gelových přípravků pro prevenci infekce

Následující příklady jsou určeny pro ukázání přípravy gelových přípravků, které jsou účinné pro prevenci infekce a/nebo nenormálních stavů sliznice a/nebo kůže, způsobených jakýmkoli patogenem a/nebo onemocněním, ale v žádném případě nejsou určeny jako omezující rámec tohoto vynálezu.

Příprava gelových přípravků

Gelové přípravky se připraví přidáním příslušného objemu destilované vody, pufru nebo jakéhokoli vhodného vodného roztoku do poloxameru 407, aby se získala požadovaná koncentrace. Potom se přidá příslušné množství léků do prášku nebo roztoku poloxameru, aby se docílila požadovaná koncentrace. Hodnota pH gelového přípravku se nastaví tak, aby vyhovovala požadavkům dotyčné cílové tkáně, která má být těmito přípravky pokryta. Například má-li se přípravek použít pro povlečení vaginální sliznice, tak se použije kyselý roztok s pH 4,0 – 4,5. Procento polymeru se nastaví tak, aby se získala odpovídající teplota přechodu z kapalného do tuhého stavu. Tato nastavení jsou v mezích znalostí a schopností zkušeného odborníka.



Ačkoli popis tohoto vynálezu je omezen na specifické případy, jsou jakékoli film vytvářející složky a/nebo léky a/nebo liposomy (nebo jiné nosiče léků) nebo jakékoli kombinace shora uvedených materiálů považovány za potenciálně přicházející v úvahu pro vývoj těchto místních přípravků a jsou v rámci tohoto vynálezu. Přípravky rovněž zahrnují jakoukoli film vytvářející složku a/nebo lék a/nebo liposomy (nebo jiné nosiče léků) nebo jakékoli kombinace těchto produktů v jakékoli vhodné koncentraci.

Infekčnost oparových virů předošetřených SLS nebo DS při zkoumání mimo živý organizmus

Vyhodnocován byl účinek předošetření různých kmenů oparových virů látkami SLS nebo DS na jejich virovou infekčnost pro choulostivé buňky. Ve stručnosti: buňky byly rozočkovány do dvacetičtyřjamkových ploten (Costar, Montreal, QC, Kanada). Před infikováním byl vir buď suspendován do kulturního média nebo do fosfátové pufované solanky (PBS – Phosphate Buffered Saline) nebo byl inkubován 1 h při 37 °C s různými koncentracemi SLS v PBS. Při splývání byly buňky inkubovány s virovými suspenzemi odstředováním ploten (750 × g po dobu 45 min při 20 °C), aby se umožnila adsorpce virů. Viry byly odstraněny a listy buněk potom byly překryty 0,5 ml 0,6% agarózového přípravku Seaplaque (Marine Colloids, Rockland, MA, USA), připraveným v příslušném kulturním médiu. Plotny byly inkubovány 2 dny při 37 °C. Potom byly buňky 20 min fixovány v 10% formaldehydu v PBS, byly promyty deionizovanou vodou a zbarveny 0,05% methylenovou modří. Virová infekčnost byla vyhodnocována stanovením plak tvořících jednotek (PFU – Plaque Forming Units).

Tabulka 1 ukazuje, že předošetření různých kmenů HSV-1 a HSV-2 látkou SLS po dobu 1 h při 37 °C snižuje, způsobem závislým na koncentraci, jejich infekčnost pro buňky Vero. Infekčnost HSV-1 (kmen F) byla snížena na 21 %, když byly virové částice předošetřeny 25 μM SLS. Infekčnosti všech kmenů HSV-2 byly mezi 50 a 70 % po preinkubaci s 25 μM SLS. Úplná ztráta infekčnosti všech zkoušených kmenů byla docílena po předošetření virů 50 μM SLS. Preinkubace buněk Vero po dobu 1 h při 37 °C s koncentracemi SLS v rozmezí od 6,25 do 100 μM před jejich infikováním HSV-1 (kmen F) neměla za následek ztrátu infekčnosti viru (údaje neuvedeny). Tyto výsledky naznačují, že SLS působí přímo na vir a nikoli na buňky.

Tabulka 1: Infekčnost některých kmenů HSV-1 a HSV-2, předošetřených 1 h při 37 °C různými koncentracemi SLS

Koncentrace SLS (μ M)	PFU (% kontrolního vzorku) pro				
	HSV-1 (F) ^a	HSV-2 (333) ^a	HSV-2 (22) ^a	HSV-2 (6) ^b	HSV-2 (15589) ^c
6,25	101,1 \pm 7,0	102,9 \pm 23,5	128,0 \pm 18,5	105,3 \pm 12,4	108,7 \pm 22,2
12,5	79,2 \pm 36,4	115,4 \pm 17,0	103,4 \pm 14,9	82,1 \pm 40,7	115,1 \pm 17,5
25	21,2 \pm 18,0	72,9 \pm 9,1	63,8 \pm 11,9	51,1 \pm 30,1	59,0 \pm 24,0
50	0	0	0	0	0

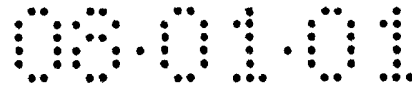
^a kmen divokého typu

^b kmen odolný vůči acycloviru

^c kmen odolný vůči foscarnetu

Obr. 1 ukazuje vliv předošetření HSV-1 (kmen F) různými koncentracemi SLS a DS na jeho infekčnost pro buňky Vero. Jestliže byl SLS přidán k buňkám Vero hned po jejich infikování, byla ztráta virové infekčnosti méně dramatická ve srovnání s infekčností, která se docílila virem předošetřovaným 1 h při 37 °C stejnými koncentracemi SLS. Po předošetření byla pozorována ztráta 50 % virové infekčnosti při koncentraci 20 μ M ve srovnání se 75 μ M, jestliže vir nebyl předošetřen. Kromě toho, ačkoli úplné potlačení virové infekčnosti bylo docíleno po preinkubaci 50 μ M SLS, potlačení bez předošetření nebylo úplné ani při 100 μ M. Podobně, předošetření HSV-2 (kmen 333) látkou SLS rovněž ovlivnilo infekčnost tohoto kmenu (údaje neuvedeny). Naproti tomu DS snižuje infekčnost viru nezávisle na tom, zda vir byl předošetřen látkou DS. V tomto případě byla pozorována ztráta 50 % virové infekčnosti při koncentraci 1 nM.

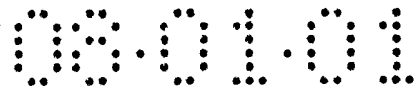
S použitím zkoušky MTS byla rovněž zkoušena životaschopnost buněk Vero, vystavených po dobu 1 h při 37 °C koncentracím SLS nebo DS, podobných koncentracím, které byly použity v Obr. 1 a v Tabulce 1. V mezích použitých koncentrací nebyly prokázány žádné znaky škodlivosti pro buňky (údaje neuvedeny).



Obr. 2 ukazuje účinnost různých koncentrací SLS (panel A) nebo DS (panel B) vůči HSV-1 (kmen F) v buňkách Vero. Stručně: buňky byly 2 h při 37 °C infikovány virem. Potom byla z povrchu odstraněna kapalina a buňky byly překryty 0,5 ml EMEM + 2 % FBS s obsahem 0,6 % agarózového přípravku Seaplaque a SLS nebo DS v požadované koncentraci. Potom byly 2 dny plotny inkubovány při 37 °C v atmosféře 5 % CO₂. Buňky byly 20 min fixovány 10% formaldehydem v PBS, promyty deionizovanou vodou a obarveny 0,05% methylenovou modří. Virová infekčnost byla vyhodnocována stanovením PFU. Výsledky ukazují, že jak SLS, tak i DS snižuje způsobem závislejícím na koncentraci virovou replikaci podobným způsobem s úplnou účinností při 100 μM pro SLS, respektive 20 nM pro DS. Bez vázání se na jakýkoli mechanismus shora uvedené výsledky naznačují, že SLS má mikrobiálně adhezně inhibiční účinek.

Infekčnost HIV-1 předošetřeného látkou SLS, při zkoumání mimo živý organizmus

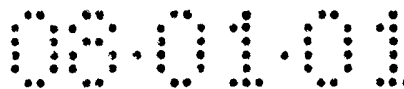
Rovněž byl vyhodnocován vliv předošetření HIV-1 (kmen NL4-3) látkou SLS na jeho infekčnost pro buňky 1G5, derivát Jurkat E6-1, který v sobě skrývá dvě pevně integrované konstrukce vytvořené z luciferázového genu pod vlivem HIV-1_{SF2}LTR. Ve stručnosti: před infikováním byl vir 1 h při 37 °C inkubován buď s kulturním médiem nebo s 500 μM SLS. Potom byly buňky (1 × 10⁵ buněk/jamku) 2 h při 37 °C inkubovány v atmosféře 5 % CO₂ s HIV-1 kmenem NL4-3 (10 ng p24). Potom byly buňky promyty, zpětně suspendovány do 200 μl úplného kulturního média a přeneseny do devadesátijamkových ploten s plochými dny pro tkáňové kultury (Microtest III, Falcon; Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ, USA). Po čtyřicetiosmihodinové inkubování době při 37 °C byly buňky lyzovány, podrobeny cyklu mrznutí a tání a aktivita luciferázy byla sledována s použitím mikroplotnového luminometru (MLX; Dynex Technologies, Chantilly, VA, USA). Výsledky z tohoto souboru zkoušek jasně ukazují, že předošetření HIV-1 (kmen NL4-3) 500 μM SLS po dobu 1 h při 37 °C téměř zcela potlačilo infekčnost HIV-1 pro buňky 1G5. (Obr. 3).



Elektronová mikroskopie buněk Vero infikovaných virem HSV-1 (kmen F), předošetřeným SLS

S použitím elektronové mikroskopie byl v buňkách Vero vyhodnocován výskyt viru HSV-1 (kmen F), předošetřovaného po dobu 1 h při 37 °C různými koncentracemi SLS (50, 75 a 100 μM). Ve stručnosti: buňky (80 – 90 % splývání) byly 48 h při 37 °C v atmosféře 5 % CO₂ infikovány virem (přibližně 70 PFU/ml ve 14 ml). Buňky byly seškrábány z misek a zpětně suspendovány do kulturního média. Buňky byly odstředěny (515 × g, 10 min při 4 °C) a kapalina nad sedimentem byla dekantována a buňky byly zpětně suspendovány do přibližně 500 μl média. Buňky byly přeneseny do eppendorfské trubice a byly odstředěny (10.000 × g, 5 min při 4 °C). Hrudky byly zpětně suspendovány do přibližně 200 μl 20% albuminu z hovězího séra (BSA – Bovine Serum Albumin). Ke směsi bylo přidáno několik kapek 25% glutaraldehydu a vzorky byly hned vloženy do ledové lázně, aby se umožnila polymerace BSA. Hrudky byly potom rozřezány na 1mm³ vzorky, které byly potom 1 h fixovány ve 2% glutaraldehydu v PBS, v 1% OsO₄ v PBS 1 h a potom 30 min v 0,1% kyselině taninové v PBS. Vzorky byly 3krát propláchnuty v PBS s 5 minutami mezi každým krokem. Vzorky byly 30 min barveny 2% uranylacetátem v 10% ethanolu. Vzorky byly dehydratovány a běžným postupem uloženy do Eponu. Řezy (o tloušťce přibližně 75 nm) byly upevněny na měděnou mřížku (200 meš). Vzorky byly obarveny uranylacetátem, kontrastně zbarveny citranem olova a pozorovány pod elektronovým mikroskopem JEOL 1010 (JEOL Canada Inc., St-Hubert, QC, Kanada).

Obr. 4 (panel A) ukazuje normální výskyt viru v jádru buněk Vero. Virové částice se skládaly z kapsidu hexagonálního tvaru a obsahujícího elektronově husté jádro DNA. V cytoplazmě většiny buněk byly rovněž nalezeny úplné virové částice, tvořené obalem obklopeným nukleokapsidem. V buňkách Vero, infikovaných virem předošetřenými 50 μM SLS (panel B), 75 μM SLS (panel C) a 100 (panel D) μM SLS byly izolovány virové částice z jader, nikoli však z cytoplazmy. V jádrech nebyly pozorovány žádné zralé nukleokapsidy, ale virové částice byly tvořeny kapsidy s obsahem nespojitě nahromaděného elektronově hustého materiálu. Počet prázdných kapsidů, nalezených v jádrech buněk infikovaných virem předošetřeným SLS, se snižuje se zvyšujícími se koncentracemi léku použitého pro předošetření. V buňkách infikovaných virem předošetřenými 100 μM SLS bylo v jádrech zjištěno jen několik buněk s prázdnými kapsidy. Shrnutí: tyto výsledky vysvětlují ztrátu infekčnosti oparových virů v přítomnosti SLS.



Stanovení množství glykoproteinového D genu HSV

Pro stanovení přítomnosti virové DNA v infikovaných buňkách bylo rovněž na buňkách Vero vyhodnocováno množství glykoproteinového D genu HSV-1 (kmen F) po předošetření látkou SLS. Ve stručnosti: HSV-1 (kmen F) byl 1 h při 37 °C předošetřován různými koncentracemi SLS (12,5, 25, 50, 75 a 100 μM) v EMEM + 2 % FBS. Buňky Vero (80 – 90 % splývání) byly 48 h při 37 °C v atmosféře 5 % CO₂ infikovány virem (100 PFU/ml ve 20 ml). Kulturní médium bylo odstraněno a povlak buněk byl dvakrát promyt přípravkem 1X HBSS. Buňky byly seškrabány z misek a znovu suspendovány do EMEM + 2 % FBS. Veškerá DNA byla extrahována standardním fenol/chloroformovým postupem. Množství celkové DNA bylo stanoveno s použitím Burtonova postupu. Pro tuto studii použitý vzorek odpovídá části glykoproteinu D HSV-2 (kmen 333), vytvořeného pomocí PCR s použitím následujících primerů:

P1 (5'-GCCACCATGGGGCGTTTGACC-3') a

P2 (5'-AAACTCAGTTATCTAGTCCTCGGGGTC-3')

a byl označován [³²P] náhodným značením. Hybridizace byla prováděna při 65 °C v 0,25 M Na₂HPO₄ (pH 6,8 s kyselinou orthofosforečnou) a 7% SDS. Promytí bylo provedeno ve 40 nM Na₂HPO₄ (pH 6,8 s kyselinou orthofosforečnou) a 1% SDS po dobu 20 min při 65 °C a následně po dobu 20 min při 25 °C.

Obr. 5 (panel A) ukazuje hodnocení množství glykoproteinového D genu HSV-1 (kmen F) předošetřeného různými koncentracemi látky SLS v buňkách Vero. Po čtyřicetiosmihodinové inkubaci byly buňky zachyceny a extrahována byla veškerá DNA. Panel A ukazuje podíly *BgIII*-fragmentované DNA (325 ng), nanesené na 0,8% agarózový gel, přenesené na nylonovou membránu a hybridizované glykoproteinovou D sondou. Panel B ukazuje kvantitativní měření hladin HSV-1 DNA, získaných skanovací denzitometrií autoradiogramu přístrojem AlphaImager. Žádné velké změny obsahu glykoproteinového D genu viru v buňkách infikovaných HSV-1 (kmen F), předošetřených 12,5 μM SLS, 25 μM SLS a 50 μM SLS, nebyly při srovnání s kontrolním vzorkem pozorovány. Kvantitativní měření hladin DNA HSV-1, získaných skanovací denzitometrií autoradiogramu (panel B) byla podobná. Nicméně když byl vir předošetřen vyššími koncentracemi SLS (75 μM a 100 μM), bylo pozorováno výrazné snížení obsahu glykoproteinového D genu se snížením hladin DNA na 65,1 %, respektive 34,9 % kontrolních hodnot. Tyto údaje naznačují, že SLS je interferuje s dozráváním virových



nukleokapsidů buď snížením jejich rychlosti dozrávání nebo interferováním se zakapsidováním DNA do kapsidové slupky.

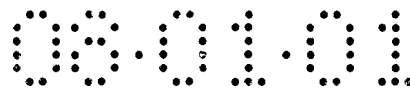
Zkoumání infekčnosti oparových virů, předošetřených látkou SLS, na živém organismu (intranazální model)

Účinek předošetření HSV-2 (kmen 22) látkou SLS na virovou infekčnost byl rovněž vyhodnocován na myším infekčním intranazálním modelu. Ve stručnosti: v této studii byly používány 4 týdny staré samice myši Balb/c (Charles River Breeding Laboratories Inc., St-Constant, QC, Kanada). Před infikováním byl HSV-2 (kmen 22) inkubován 1 h při 37 °C s PBS nebo s různými koncentracemi SLS (6,25 μM, 25 μM nebo 100 μM) pro dosažení konečné virového inokula o 2000 PFU/20 μl. Myši byly slabě narkotizovány použitím přípravku Aerrane® (Isolflurane, USP; Jansens, North York, On, Kanada) a virová suspenze (celkový objem 20 μl) byla aplikována do levé nosní dírky myši. Potom byly myši vráceny do klecí a denně bylo vyhodnocováno přežívání.

Obr. 6 ukazuje, že všechny myši, infikované neošetřeným virem, pošly na encefalitidu mezi 9. a 11. dnem. Na rozdíl od toho 67 % myši, infikovaných virovým inokulem předošetřeným 6,25 μM SLS a 25 μM SLS, infekci přežilo. Zvláštní význam má to, že všechny myši, infikované virovou suspenzí předošetřenou 100 μM SLS, infekci přežily a nevykazovaly žádné příznaky nemoci.

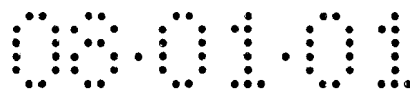
Zkoumání infekčnosti oparových virů, předošetřených SLS nebo DS, na živém organismu (kožní model)

Účinek předošetření HSV-1 (kmen F) látkou SLS na virovou infekčnost byl rovněž vyhodnocován na modelu myši kožní infekce. V této studii byly používány 5 až 6 týdnů staré samice bezsrstých myši (SKH1; Charles River Breeding Laboratories Inc., St-Constant, QC, Kanada). Před infikováním byl HSV-1 (kmen F) 1 h při 37 °C inkubován s PBS, se 6,25 μM SLS, 25 μM SLS nebo 100 μM SLS nebo s 0,25 nM DS, 1 nM DS nebo 10 nM DS pro získání virového inokula o 3×10^5 PFU/50 μl. Myši byly narkotizovány intraperitoneální injekcí směsi obsahující 70 mg/kg ketaminhydrochloridu (injekce Rogarsetic® USP; Rogar/STB Inc., Montreal, QC, Kanada) a 11,5 mg/kg xylazinu (Rompun®; Miles Canada Inc., Etobicoke, ON,



Kanada). Virus byl naočkován na laterální stranu těla v levé bederní kožní oblasti. Kůže byla šestkrát škrábnuta zkříženými čarami svisle drženou jehlou kalibru 27. Virová suspenze (50 μ l) byla nanesena na poškrábanou oblast a zatírána 10 až 15 sekund aplikátorem s bavlněnou špičkou, nasycenou roztoky EMEM + 2 % FBS nebo SLS nebo DS. Poškrábaná oblast byla chráněna polštářkem na kuří oka, který byl na tělech myši přidržován chirurgickou páskou. Pórovitá vnitřní stěna otvoru v polštářku na kuří oka byla před použitím impregnována tkáňovým lepidlem, aby se zabránilo absorpci léku. Otvor polštářku na kuří oka byl rovněž uzavřen chirurgickou páskou. Potom byly myši vráceny do klecí a dvakrát denně byly pozorovány.

Obr. 7 ukazuje časový vývoj středního bodového ohodnocení lézí bezsrstých myši, kožně infikovaných HSV-1 (kmen F), předběžně 1 h při 37 °C ošetřovaným různými koncentracemi SLS nebo DS. Vyhodnocení bodového ohodnocení lézí bylo prováděno podle kriteria, které je uvedeno v Tabulce . U infikovaných neošetřených myši během prvních čtyřech dnů po infikování nebyly viditelné žádné chorobné příznaky kožní infekce a zůstávala patrná jenom poškrábaná oblast. Pátý den se u některých myši počaly objevovat oparové léze kůže ve formě malých puchýřků, vzdálených od místa očkování. Šestý den se u téměř všech neošetřených myši vyvinula oparová léze kůže infikovaného dermatomu ve formě 4 až 5 mm širokého pruhu, probíhajícího od páteře k břišní středové čáře, podobajícího se infekci pásovým oparem. Maximální střední bodové ohodnocení lézí bylo pozorováno osmý den. Střední bodové ohodnocení lézí potom u některých myši od 11. do 15. dne následkem živelného ústupu kožních lézí klesalo. Myši infikované virem, předošetřeným 6,25 μ M SLS a 25 μ M SLS, nevykazovaly významné snížení středního bodového ohodnocení lézí. Avšak myši infikované virem, předošetřeným 100 μ M SLS nevykazovaly žádný příznak kožních lézí. Základní důležitost má poznatek, že všechny myši, infikované virem předošetřeným 100 μ M SLS, infekci přežily (údaje se neuvádějí). Naproti tomu myši infikované virem předošetřeným 0,25 nM DS, vykazovaly částečné snížení středního bodového ohodnocení lézí, zatím co myši infikované virem předošetřeným buď 1 nM DS nebo 10 nM DS vykazovaly lepší ochranu proti vývoji oparových lézí.

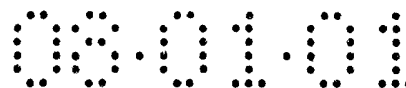


Tabulka 2: Kritéria použitá pro vyhodnocení oparových kožních lézí

Bodové ohodnocení	Vzhled lézí
0	Žádná viditelná infekce
1	Infekce viditelná jenom na místě očkování, oblast poškrábání
2	Infekce jenom na místě očkování, s otokem, strupem a zarudnutím kůže
3	Infekce na místě očkování s nespojitými lézemi, vytvářejícími se dále od očkovacího místa
4	Exantém viditelný na polovině těla, ale ještě nesplývající
5	Exantém splývající, ale ještě nikoli nekrozní nebo zvrhodovatělý
6	Úplný exantém s nekrozou nebo zvrhodováním, paralýza zadních končetin, nadmutí břicha, smrt

Profylaktický účinek poloxamerových přípravků obsahujících nebo neobsahujících SLS, zkoumaný na živém organismu (kožní model)

Rovněž byla vyhodnocována účinnost poloxameru samotného a poloxameru s obsahem 5 % SLS pro zabránění vývoje kožních lézí u myši. V této studii byly použity samice bezsrstých myši (staré 5 - 6 týdnů). Ve stručnosti: myši byly narkotizovány intraperitoneální injekcí směsi obsahující 70 mg/kg ketaminhydrochloridu a 11,5 mg/kg xylazinu. Přípravky byly nanášeny místně na laterální stranu těla v levé bederní kožní oblasti. Pět minut a 1 hodinu po nanášení byla jedna kapka inokula ($3,15 \times 10^8$ PFU/ml) nanášena na kůži a poškrábání bylo provedeno jehlou 27G sem a tam v kapce, aby byla napodobena nehoda, která se může přihodit zdravotníkům. V tomto modelu musí být virové inokulum vyšší, aby se získal úplný exantém formy pásového oparu u téměř všech myši. Avšak úmrtnost spojená s infekcí byla nízká a nebyla použitelná jako kritérium pro vyhodnocení účinnosti ošetření. Poškrábaná oblast byla chráněna polštářkem na kuří oka, který byl na tělech myši přidržován chirurgickou páskou. Otvor polštářku na kuří oka byl rovněž uzavřen chirurgickou páskou. Potom byly myši vráceny do klecí a byly dvakrát denně pozorovány.



Obr. 8 ukazuje časový vývoj středního bodového ohodnocení lézí infikovaných a neošetřených myši a myši předošetřených poloxamerem samotným nebo poloxamerem s obsahem 5 % SLS 5 minut nebo 1 h před jejich kožní infekcí HSV-1 (kmen F). Výsledky ukazují, že předošetření myši gelem samotným 5 minut nebo 1 h před infekcí poskytovalo jenom skromnou ochranu proti vývoji kožních lézí. Nejdůležitější zajímavostí je to, že u myši předošetřených jak 5 minut, tak i 1 h poloxamerem s obsahem 5 % SLS byla pozorována úplná ochrana proti kožním lézím. Tyto výsledky ukazují velké možnosti našich přípravků jako profylaktický přístup pro zabránění infekcí patogeny. Tento nástroj fakticky chrání proti náhodné infekci zdravotníků.

Účinnost gelových přípravků při ochraně proti infekci způsobené oparovými viry, zkoumaná na živém organismu (intravaginální model)

Účinnost gelových přípravků pro prevenci genitálního přenosu HSV-2 byla vyhodnocována na myším intravaginálním infekčním modelu. Ve stručnosti: pro tuto studii byly použity samice myši Balb/c 4 týdny staré. Pro zvýšení náchylnosti myši na opar byl každé myši podán subkutánně progesteron (Depo-Provera) v množství 2,5 mg sedm dní před a jeden den před naočkováním HSV-2. Narkotizované myši byly naočkovány 5 μ l $2,4 \times 10^7$ PFU/ml HSV-2 (kmen 333) po vytření vaginy kalcium-alginátem na tence zašpičatěném tamponu. Pro stanovení účinnosti gelových přípravků v blokování oparové infekce bylo 15 μ l gelu dodáno špičkou pipety do vaginy několik minut před očkováním. Špičkou pipety bylo pohybováno čtyřikrát tam a ven pro simulování pohybové akce při pohlavním styku, přičemž bylo dbáno, aby nebylo způsobeno krvácení.

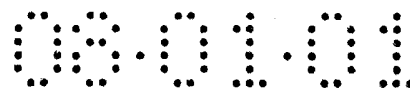
Obr. 9 ukazuje střední bodové ohodnocení lézí a poměr přežití infikovaných neošetřených myši a myši předošetřených intravaginálně gelem samotným před infekcí HSV-2 (kmen 333). Čtyři dny po infikování vykazovala infikovaná neošetřená zvířata edém a zčervenání a za 6 až 12 dní většina z nich pošla na encefalitidu. Základní význam má to, že všechny myši ošetřené samotným gelem infekci přežily a do 16 dnů po infikování nevykazovaly žádné příznaky onemocnění. Přítomnost samotného gelu proto infekci HSV-2 ruší.

Obr. 10 ukazuje poměr přežití infikovaných neošetřených myši a myši předošetřených intravaginálně 2,5% SLS nebo gelem s obsahem 2,5 % SLS před infikováním HSV-2 (kmenem 333). Čtyři dny po infikování vykazovala infikovaná neošetřená zvířata perineální



edém a zčervenání a za 6 až 12 dní většina z nich pošla na encefalitidu. Základní význam má to, že všechny myši ošetřené buď 2,5% SLS samotným nebo gelem s obsahem 2,5 % SLS infekci přežily a do 16 dnů po infikování nevykazovaly žádné příznaky onemocnění. Shrnutí: tyto výsledky jasně naznačují, že použití našeho gelového přípravku představuje inovativní preventivní opatření pro snížení pohlavního přenosu oparu, HIV a dalších patogenů, které způsobují STD.

Obr. 11 ukazuje poměr přežití infikovaných neošetřených myší a myší předběžně intravaginálně ošetřených gelem obsahujícím různé sloučeniny před infikováním HSV-2 (kmen 333). Tyto sloučeniny byly vybrány tak, aby zastupovaly další sulfatizované a nesulfatizované sloučeniny, které nemají detergentní vlastnosti. Rovněž zastupují různé iontové (aniontové a kationtové) a neiontové sloučeniny. Tento vyšetřovací přístup byl určen pro nalezení dalších potenciálních látek, přicházejících v úvahu jako mikrobicidy. Výsledky ukázaly, že gelové přípravky s obsahem 2,5 % lauroylsarkosinu poskytovaly úplnou ochranu před infekcí (100% přežití). Na druhou stranu gelové přípravky s obsahem 2,5 % benzalkoniumchloridu, 5 % polyoxyethylen-40-stearátu a 5 % guanidinu dávaly 60%, resp. 60% a 30% přežití. Naše přípravné výsledky ukázaly, že lauroylsarkosin má dobrý potenciál, aby byl vzat v úvahu jako mikrobicid, což nyní zkoumáme. Nicméně další sloučeniny, například benzalkoniumchlorid, polyoxyethylen-40-stearát a guanidin, která prokázaly částečný mikrobicidní potenciál, lze rovněž využít při optimalizaci jejich koncentrace pro lepší účinnost. Alternativně mohou kombinace těchto sloučenin, pokud jsou kompatibilní, poskytnout optimální účinnost. Bez vázání se na jakoukoli teorii lze předpovídat, že kombinace detergentu s chaotropním činidlem zajistí účinnost stejně tak dobrou nebo lepší než SLS. Toto jsou specifické příklady potenciálních mikrobicidů, ale v žádném případě nejsou určeny pro omezení rámec tohoto dokumentu.



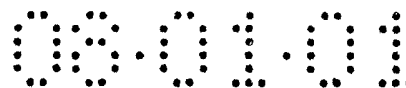
Konstrukce aplikátoru pro vaginální/anorektální dodávání přípravků

Jak bylo uvedeno shora, předmětem tohoto vynálezu je poskytnutí přípravků pro prevenci infekcí a/nebo nenormálních stavů sliznice a/nebo kůže způsobených jakýmkoli patogenem a/nebo onemocněním. Pro vaginální aplikace musí být jakékoli místní přípravky podávány pomocí aplikátoru, který pro maximální účinnost umožňuje rovnoměrnou distribuci obsahu do celé vaginy (dodávání na stěny) a cervix (dodávání na přední stranu). Proto jsme zkonstruovali specifický aplikátor, který umožňuje 360stupňovou distribuci obsahu do vaginy a dále na cervix, což je veliké zlepšení proti existujícím obvyklým vaginálním aplikátorům, které dodávají obsah jenom na přední stranu (oblast cervixu). Rozdílné cíle, které musí být dosaženy a hlavní znaky, který náš specifický aplikátor musí pro dodávání místních přípravků mít, zahrnují:

- a) rovnoměrnou distribuci místních přípravků jako jsou kapalina nebo gel do celé vaginy/cervixu
- b) účinné a rychlé dodání jeho obsahu
- c) odolnost vůči teplotním změnám (-40 až 60 °C)
- d) kompatibilitu polymeru aplikátoru s gelovými přípravky
- e) snadnost sterilizace
- f) těsnost
- g) snadné ovládání a vkládání
- h) odolnost vůči rozbití, rozpínání obsahu a otřesům následkem dopravy
- i) kompatibilitu s činnidly a/nebo podmínkami, které jsou přítomny v okolním prostředí

Technické předpoklady a strategie

Účinnost přípravků blokovat pohlavní přenos patogenů, které způsobují STD závisí i) na povaze přípravku, který má být dodáván a ii) na jeho schopnosti pokrývat celou oblast vaginy/cervixu. Na rozdíl od jiných produktů my máme specifický přípravek s termoreverzibilní vlastností, který je dodáván v kapalné formě, zajišťující dobré pronikání přípravku do nejmenších nepravidelností vaginální/cervikální sliznice. Pro maximální ochranu musí tento přípravek pokrývat celou vaginu/cervix. Avšak existující vaginální aplikátory mají jediný otvor na špičce, takže obsah je dodáván jenom do oblasti cervixu s vyloučením vaginy a tím omezují svoji účinnost. Náš specifický vaginální aplikátor bude mít více otvorů a/nebo štěrbin (na špičce a po stranách) pro dodávání přípravku nebo jakékoli film vytvářející složky, gelu, krému, masti a/nebo antimikrobiálního, baktericidního, antivirového, chemoterapeutického, protizánětlivého,



protinádorového nebo imunomodulačního činidla, detergentu, mikrobiálně absorpčního inhibitoru, činidla zvyšujícího pronikání kůží, cytokinu, antigenu, vakcíny nebo jejich kombinace pro léčbu nebo prevenci STD, rakoviny nebo jakékoli jiného onemocnění, pro rovnoměrné pokrytí jak vaginy tak cervixu pro maximální ochranu. Literární průzkum odhalil, že na trhu neexistují aplikátory nebo podobné produkty, které mají takovou konstrukci, která umožňuje dodávání jejich obsahu do celé vaginy/cervixu.

Znaky našeho aplikátoru

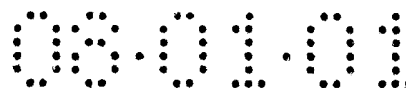
Všechny existující aplikátory dodávají přípravky ve formě gelu/krému, což má tu nevýhodu, že není pokrývána celá oblast vaginy/cervixu. Na druhou stranu náš přípravek má důležitou vlastnost termoreverzibility být kapalný při teplotě místnosti a gelovat při teplotě těla. Při dodávání jako kapalina náš přípravek pokrývá celou vaginu/cervix a proniká do nejmenších nepravidelností vaginální a cervikální sliznice. Pro náš specifický přípravek nebo jinou film vytvářející složku, gel, krém, mast a/nebo antimikrobiální, baktericidní, antivirové, chemoterapeutické, protizánětlivé, protinádorové nebo imunomodulační činidlo, detergent, mikrobiálně absorpční inhibitor, činidlo zvyšujícího pronikání kůží, cytokin, antigen, vakcínu nebo jejich kombinace pro léčbu nebo prevenci STD, rakoviny nebo jakékoli jiného onemocnění potřebujeme specifický aplikátor, dodávající tak, aby pokryl od naprostého konce a rovněž stěn celou vaginu/cervix, což je klíčový činitel pro poskytnutí maximální ochrany proti patogenům, které způsobují STD. Hlavní rysy aplikátoru jsou diskutovány dole (viz rovněž Tabulku 3).

a) Rovnoměrná distribuce místních přípravků jako kapaliny nebo gelu do celé vaginy/cervixu

Aplikátor musí dodávat přípravek rovnoměrně a musí pokrýt celou oblast vaginy/cervixu dodáváním apikálními a laterálními otvory. Kromě toho aplikátor musí dodávat dostatečné množství pro pokrytí jak cervixu, tak i vaginy. To umožní maximální ochranu jednotlivců proti patogenům, které způsobují STD.

b) Účinné a rychlé dodávání obsahu

Většina existujících vaginálních aplikátorů dodává jenom část svého obsahu, což omezuje účinnost přípravku. Proto aplikátor musí dodávat buď celý svůj obsah bez zanechání zbytkového materiálu v zásobníku, nebo dodávat množství, požadované pro dostačující pro pokrytí celé cílové sliznice. To bude dosaženo konstrukcí zásobníku a propočením průměrné síly prstů, které na zásobník tlačí, aby se obsah uvolnil. Doba dodávání se bude měnit v závislosti na tom, zda



obsah je dodáván jako kapalina, poloviskózní materiál nebo gel. Avšak dodávání obsahu aplikátoru musí být rychlé.

c) Odolnost vůči teplotním změnám

Polymer použitý pro vývoj vaginálního aplikátoru nesmí ovlivňovat vlastnosti gelového přípravku (stálost, viskozitní parametry, nejedovatost, účinnost v blokování patogenů atd.)

e) Snadnost sterilizace

Konstrukce a materiál aplikátoru musí zajišťovat možnost sterilizace s použitím vhodného způsobu a nesmí mít za následek změny charakteristik aplikátoru nebo jeho obsahu.

f) Těsnost

Aplikátor musí být nepropustný v podmínkách skladování a dopravy. Jestliže krabice jsou naskládány na sobě, tak aplikátor nesmí propouštět svůj obsah.

g) Snadnost ovladatelnosti a vkládání

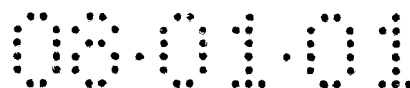
Aplikátor musí být příjemný pro uživatele, snadno ovladatelný a snadno vkladatelný bez způsobení nepohodlí pro jeho uživatele. Kromě toho musí být pro uživatele přitažlivý.

h) Odolnost vůči rozbití, rozpínání obsahu a otřesům následkem dopravy

Aplikátor musí odolávat rozbití když uživateli vypadne z rukou nebo při manipulaci během dopravy. Musí být také odolný proti rozpínání svého obsahu. Kromě toho musí být aplikátor stabilní a odolávat otřesům během dopravy.

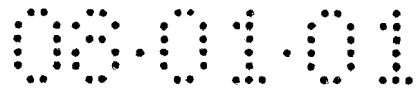
i) Kompatibilita s činnidly a/nebo podmínkami, které jsou přítomny v okolním prostředí

Aplikátor musí odolávat činnidlům a/nebo různým podmínkám v okolním prostředí. Na aplikátor nesmí například působit kyselé pH vaginy, vaginální sekrety a podobné podmínky.



Tabulka 3: Požadované funkce a cílové hodnoty aplikátoru

Čís.	Funkce	Popis	Cílová hodnota
1	Distribuuje přípravek jako kapalinu, poloviskózní látku, gel, krém, mast nebo jinou film vytvářející složku	Jakmile jednou zahájeno, tak pokračuje vypuzování a distribuce přípravku	Množství 3 až 5 ml
2	Rovnoměrná distribuce přípravku	Distribuce přípravku tak, aby pokryla celou vaginu/cervix	Distribuce v 360° ve vagině a v 360° v cervixu
3	Obsahuje přípravek jako kapalinu, poloviskózní látku, gel, krém, mast nebo jinou film vytvářející složku	Aplikátor má zásobník	Minimálně o obsahu injikovaného objemu
4	Nepropustnost	Žádný únik z balení a po počáteční manipulaci	0 ml
5	Snadná ovladatelnost	Aplikátor lze snadno držet a je pro uživatele příjemný	Příznivý názor dobrovolníků (7/10)
6	Snadnost vkládání	Aplikátor se vkládá bezbolestně a s minimálním odporem	Střední průměr 0,5 palce (12,5 mm)
7	Dodává do vaginy/cervixu	Délka aplikátoru umožňuje dosažení cervixu	Střední délka 4,5 palce (115 mm) včetně zásobníku a držáku
8	Odolnost při pádu	Aplikátor se nesmí rozbít a obsah nesmí uniknout, když vypadne uživateli z rukou	Pád z výše 60 palců (1,5 m)
9	Odolnost proti vlivům okolního prostředí	Na aplikátor nesmí působit vlastní obsah, vaginální sekrety ani obalový materiál	Údaje od výrobce termoplastické pryskyřice
10	Nejedovatost a neovlivňování stavu okolního prostředí	Nepůsobí na složení nebo jakost přípravku; rovněž nepůsobí na okolní prostředí	Údaje od výrobce termoplastické pryskyřice a majitele místního přípravku
11	Odolnost proti otřesům během dopravy	Aplikátor a zásobník se nesmí poškodit a musí po dopravě normálně fungovat	Ověřit standardy
12	Být účinný	Je funkční (obsah dodává a distribuuje rovnoměrně bez selhání)	Příznivý názor dobrovolníků (9/10)
13	Rychlé dodávání	Obsah je z aplikátoru injikován rychle	Přibližně 5 s
14	Odolávat teplotním změnám	Aplikátor nesmí být ovlivněn změnami teploty	-40 °C až +60 °C
15	Oplachovatelný vodou	Lze ho opláchnout, když uživateli vypadne z rukou	Údaje od výrobce termoplastické pryskyřice
16	Sterilizovatelnost	Vybrat vhodné způsoby	Ověřit standardy



V následujícím textu jsou příklady některých odlišných konceptů, které jsou určeny pro popis některých z obecných konstrukčních možností aplikátoru, ale v žádném případě nejsou určeny jako omezující rámec tohoto dokumentu. Důležité je zmínit, že konečný tvar aplikátoru se může odchylovat od příkladů uvedených v tomto dokumentu. Považuje se za vhodné, že tyto konstrukce lze upravovat tak, aby vyhovovaly anorektálnímu použití.

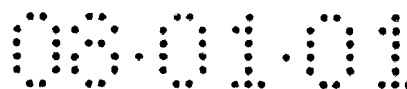
Obr. 12 až 15 objasňují specifické příklady aplikátorů podle jednoho hlediska tohoto vynálezu. Následující pojednání popisuje čtyři provedení na těchto nákresech vyobrazených aplikátorů.

Obecně konstatováno, tento aplikátor je konstruován pro rovnoměrné dodávání jakéhokoli přípravku, jak kapaliny, poloviskózní látky, gelu, krému, masti nebo jakékoli jiné film vytvářející složky, popsané shora v tomto dokumentu, do sliznicové kavity, s nejmenším zbytkovým množstvím, které v aplikátoru zůstane. Tento aplikátor se skládá z podélného těla, které má proximální a distální konec. Proximální konec je umístěn blízko vnějšího místa sliznicové kavity, přístupného pacientovi. Tělo má vnější perforace pro rovnoměrné dodávání jakéhokoli shora popsaného přípravku do pacientovy sliznicové kavity, provedené jako řadu štěrbin nebo otvorů. Po vložení aplikátoru a vypuzení přípravku do sliznicové kavity musí přípravek, který je obsažen v zásobníku, před vypuzením skrz perforace výhodně putovat difuzním kanálem o malém objemu. To fakticky umožní rychlé vypuzení přípravku a minimalizování množství přípravku, který v aplikátoru po vypuzení zůstane.

Difuzní kanál je tvořen volným prostorem mezi dvěma tělo vymezujícími stěnami. První stěna je vnější stěna těla a jsou v ní otvory. Druhá, neperforovaná, vnitřní stěna je uvnitř stěny první, aby byl vytvořen difuzní kanál. Vnitřní stěna má takový tvar a velikost, že je kluzně vložena do první stěny. Alternativně je vnitřní stěna, dimenzovaná jako menší než první stěna, integrálně vylišovaná s vnější stěnou těla.

Vnitřní stěna má proximální konec, který je vstupním koncem pro přípravek do difuzního kanálu. Pro usměrnění přípravku do vstupního konce difuzního kanálu lze také zabudovat usměrňovací prvek. Usměrňovací prvek tudíž zabraňuje vstupu přípravku do jiného oddělení než do difuzního kanálu.

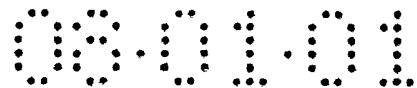
Částí aplikátoru je rovněž zásobník, schopný pojmout přípravek. Zásobník je umístěn blízko těla aplikátoru nebo uvnitř těla. Zásobník je funkčně spojen s vypuzovacím prvkem. Vypuzovací prvek je jako takový spojen s proximálním koncem těla spojovacím prvkem.



Vypuzovací prvek je ovládán pacientem. Po vynaložení tlaku, tahu nebo posunu uvolňuje vypuzovací prvek obsah zásobníku, který je ve styku s proximálním vstupním koncem difuzního kanálu. Přípravek proto putuje difuzním kanálem do sliznicové kavity jsa vypuzován skrz perforace.

Na Obr. 12A až 12D na přiložených nákresech bude popsáno první provedení aplikátoru podle hlediska tohoto vynálezu. Obr. 12B ukazuje rozložený pohled na tento první aplikátor. Vnější strana 1 těla aplikátoru má perforace 2 (vyobrazena jen jedna), provedené jako jedna jednoduchá štěrbin, probíhající z jedné strany těla k protilehlé straně bez přerušení na distální konci vnější stěny 1. Podlouhlá štěrbin proto vymezuje laterální a distální perforace. V tomto provedení jsou zásobník a vypuzovací prvek jeden jediný prvek 3, vyrobený ze stlačitelného materiálu. Přípravek je obsažen v zásobníku, ze něhož je obsah vypuzován stlačováním prsty. Zásobník je zakončen membránou s malou pevností v tlaku 4. Zásobník, který je vypuzovacím prvkem, je připojen na proximální konec těla prostřednictvím spojovacího prvku 5, představovaného našroubovatelným nebo zaskakovacím spojovacím prvkem. V tomto konkrétním provedení je vnitřní stěna 6 těla provedena jako oddělený prvek, dimenzovaný tak, aby byl menší než vnější stěna. Proximální konec vnitřní stěny končí přesahujícím nákrůžkem, který sedí ve spojovacím prvku, vytvořeném na proximálním konci vnější stěny. Proximální část vnitřní stěny má uzavírací prvek 7, který uzavírá vnitřní dutinu, tvořenou vnitřní stěnou. Uzavírací prvek má tvar kotouče. Pro jednoduché zavírání je alternativně proximální konec vnitřní stěny vylisován integrálně s posledně uvedeným. Soustředně k tomuto uzavíracímu prvku se nachází otevřený soustředný prvek 8, umístění na periferii uzavíracího prvku. Tyto prvky zajišťují obecně nazývaný usměrňovací prvek, který usměrňuje přípravek do difuzního kanálu, vytvořeného mezi vnitřní a vnější stěnou a směrem od vnitřního povrchu vnitřní stěny 6. Obr. 12C rovněž ukazuje kónický prvek 9, umístěný ve středu usměrňovacího prvku, určený pro protržení membrány 4, když je vyvinut patřičný tlak.

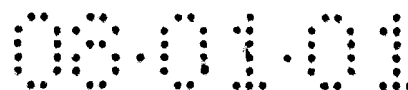
Druhé provedení aplikátor je objasněno na Obr. 13. V tomto aplikátoru jsou použity stejné periferní a vnitřní stěny jako na Obr. 12. Avšak na vnější stěně je rozmístěno více pravidelně od sebe vzdálených štěrbin. V tomto specifickém provedení jsou zásobník a vypuzovací prvek také jeden jediný prvek. Avšak vypuzovací prvek není stlačitelným zásobníkem. Je to spíše konstrukce podoby pístu 10, která obsahuje přípravek v tobolce 11. V tomto provedení je spojovací prvek 5 teleskopicky vložitelný do pístové konstrukce 10. Tobolka je vyrobena z materiálu s nízkou pevností v tlaku. Pro protržení této membrány je na proximálním konci



vnitřní stěny kónusovitý prvek. Obr. 13 ukazuje tento kónusovitý prvek 9 jako kotouč opatřený zahrocenou částí. Kotouč sedí na proximálním konci vnitřní stěny, zahrocená část směřuje na tobolku 11. Při použití uživatel stlačuje pístovou konstrukci 10, membrána se zahroceným dílem proděraví a přípravek je potom hnán difuzním kanálem a vypuzován perforacemi.

Obr. 14 objasňuje třetí provedení toho aplikátoru. Zatím co dvě předchozí provedení mají zásobník umístěný blízko proximálního konce difuzního kanálu, tak třetí provedení má zásobník 12 dále od proximálního konce difuzního kanálu. V tomto případě je pamatováno na dosedací plochu 13, umístěnou mimo zásobník. Dosedací plocha je funkčně spojena s pístem 14, umístěným proximálně vzhledem k zásobníku 12. Uživatel táhne za píst a tím stlačuje zásobník, jehož obsah je zaveden do proximálního vstupního konce difuzního kanálu. Přípravek je vypuzován perforacemi, vytvořenými ve vnější stěně těla aplikátoru, které jsou na Obr. 14 znázorněny jako množství otvorů 2. Otvory jsou rozmístěny takovým způsobem, že přípravek je rovnoměrně distribuován do sliznicové kavity. Otvory jsou rozmístěny v podélné sekci vnější stěny a rovněž i na jejím distálním konci. Obr. 14 dále ukazuje to, že vnitřní a vnější stěna těla aplikátoru jsou vytvarovány integrálně. Alternativně také má vnitřní stěna tvar stěny z Obr. 12 a 13, bez potřeby existence kónusovitého prvku. Zásobník má membránu s nízkou pevností v tlaku, takže při stlačení tažným pohybem pístu 14 se membrána protrhne a obsah se dostane do difuzního kanálu. V tomto provedení aplikátoru je usměrňovací prvek tvořen proximálním vstupním koncem difuzního kanálu a uzavíracím prvkem, umístěným tentokrát na proximálním konci těl (není vyobrazeno).

Obr. 15 ukazuje čtvrté provedení aplikátoru podle jednoho hlediska tohoto vynálezu. V tomto provedení jsou zásobník a vypuzovací prvek prvkem jedním. Membrána 4 s nízkou pevností je umístěna na proximálním konci těla 1. Vnější stěna aplikátoru má štěrbinu, které jsou provedeny jako množství drážek. Vnitřní stěna 6 je vytvarována integrálně s vnější stěnou. Vnitřní stěna končí na svém proximálním konci kónusovitým prvkem 15. Zásobník/ píst 16 má průměr, který je poněkud větší než vnější průměr vnitřní stěny, ale menší než vnitřní průměr vnější stěny tělesa aplikátoru. Při použití se zásobník kluzně vsune mezi dvě stěny, membrána se propíchne a jeho obsah je hnán do difuzního kanálu a do perforací po stranách a na distálním konci vnější stěny.



Poznamenává se, že ve všech shora popsaných provedeních je usměrňovací prvek vytvarován integrálně s proximálním koncem vnitřní stěny těla nebo je proveden jako uzavírací prvek nebo kotouč pro blokování průchodu přípravku do vnitřní dutiny tvořené vnitřní stěnou a pro usměrnění toku přípravku do difuzního kanálu.

Dále, pro snadnost použití, se u některých provedení vyskytují uchopovací prvky, které pomáhají uživateli udržet aplikátor na místě během ovládání vypuzovacího prvku. Konkrétněji: ve druhém provedení je uchopovací prvek vymezen prstencovou objímkou 17, vytvořenou na vnější periferii spojovacího prvku 5. Prstencová objímka má vnější tloušťku takovou, že uživatel má dosti prostoru pro uchopení distálního konce objímky mezi prsty a pro tlačení pístu dalším prstem. Ve třetím provedení je uchopovací prvek proveden na proximálním konci pístu (viz 18). Vnější stěna těla má větší průřez než píst, uživatel drží tělo aplikátoru za jeho proximální konec jednou rukou a táhne za píst druhou. Konečně ve čtvrtém provedení je uchopovací prvek proveden jako elipsovité držátko 19, umístěné na proximální konci těla aplikátoru a obepíná spojovací prvek. Toto držátko se drží mezi dvěma prsty a píst se tlačí dalším prstem.

Příklady týkající se poloxamerových přípravků pro léčbu infekcí

Pro účely zkoušení účinnosti našich gelových přípravků na myším modelu kožní infekce HSV-1 byl připraven roztok ve fosfátovém pufru (0,2 M, pH 6), aby byl kompatibilní s pH kůže.

Porovnávací účinnost místních přípravků foscarnetu, acycloviru a masti Zovirax na kožní léze HSV-1 na myších

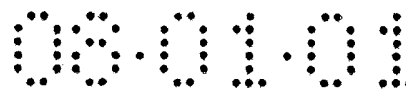
Účinnost našich různých místních přípravků byla vyhodnocována na myším modelu kožních lézí HSV-1. Ve stručnost: samice bezsrstých myší (SKH1; Charles River Breeding Laboratories Inc., St- Constant, QC, Kanada), 5 až 7 týdnů staré byly narkotizovány intraperitoneální injekcí směsi obsahující 70 mg/kg ketaminhydrochloridu a 11,5 mg/kg xylazinu. Vir byl naočkován na laterální stranu těla v levé bederní kožní oblasti. Kůže byla šestkrát škrábnuta zkříženými čarami svisle drženou jehlou kalibru 27. Padesát μ l virové suspenze [HSV-1 kmen F, $1,5 \times 10^6$ plak tvořících jednotek (PFU)/ml] bylo zatíráno 10 až 15 sekund na poškrábanou oblast aplikátorem s bavlněnou špičkou, nasyceným kulturním médiem [minimální esenciální médium (MEM) doplněné 100 U/ml penicilin-streptomycinu, 2 mM L-glutaminu a 2 % plodového hovězího séra (MEM-E + 2 % FBS)]. Poškrábaná oblast byla

chráněna polštářkem na kuří oka, který byl na tělech myši přidržován chirurgickou páskou. Pórovitá vnitřní stěna otvoru v polštářku na kuří oka byla před použitím impregnována tkáňovým lepidlem, aby se zabránilo absorpci léku. Otvor polštářku na kuří oka byl rovněž uzavřen chirurgickou páskou. Potom byly myši vráceny do klecí a dvakrát denně pozorovány.

V této studii byly vyhodnocovány různé léčebné režimy. Ve stručnosti: páska uzavírající otvor v polštářku na kuří oka byla odstraněna a poškrábaná oblast byla očištěna bavlněným zašpičatělým aplikátorem nasyceným studenou vodou. Na poškrábanou oblast bylo nanášeno 15 μ l různých přípravků. Otvor v náplasti na kuří oka byl uzavřen chirurgickou páskou, aby se předešlo tomu, že myš lék rychle odstraní. Postup rovněž zabraňuje náhodné systemické léčbě, ke které by došlo potenciálním lízáním léčené léze. Účinnost různých přípravků byla vyhodnocována bodovým ohodnocením lézí a přežitím.

Obr. 16 (panel A) ukazuje časový průběh středního bodového ohodnocení lézí infikovaných neošetřených myši nebo myši ošetřených foscarnetem v roztoku nebo začleněným do poloxameru. Ošetřování začalo 24 h po infikování a opakovalo se třikrát denně po 4 dny. U myši ošetřených samotným poloxamerem bylo pozorováno schéma podobné tomu, které bylo vidět u neošetřených myši s výjimkou toho, že ústup kožních lézí se zdál probíhat u druhé skupiny rychleji. U myši ošetřených roztokem 0,5 % foscarnetu jsme pozorovaly velké snížení středního bodového ohodnocení lézí, které bylo výraznější, jestliže lék byl zapojen do poloxamerového přípravku. Obr. 16 (panel B) ukazuje odpovídající přežití infikovaných neošetřených myši a myši ošetřených lékovými přípravky. Smrt následkem encefalitidy nastala u 75 % neošetřených infikovaných mezi 7. a 8. dnem. Úmrtnost byla podobná u myši, které dostaly samotný poloxamer a nastala mezi 8. a 10. dnem. Polovina myši ošetřených foscarnetem v roztoku infekci přežila. Nejdůležitější zajímavostí je to, že 75 % myši ošetřených poloxamerovým přípravkem foscarnetu infekci přežilo ($p < 0,05$).

Obr. 17 (panel A) ukazuje časový průběh středního bodového ohodnocení lézí infikovaných neošetřených myši a myši ošetřených jedinou aplikací 24 h po infikování poloxamerem s obsahem 5 % acycloviru nebo mastí Zovirax[®]. Nejdůležitější zajímavostí je to, že poloxamerový přípravek s obsahem 5 % acycloviru vykazoval dobrou účinnost proti vývoji kožních lézí u myši, kdežto mast Zovirax[®] se projevila jen skromným účinkem. Acyclovir, začleněný do poloxameru, letalitu významně snížil ($p < 0,05$), ale nesnížila ji mast Zovirax[®] (panel B). Vyšší účinnost poloxamerového přípravku acycloviru než má komerční mast Zovirax[®] vysoce nasvědčuje, že poloxamer je lepší nosič pro místní dodávání tohoto léku.

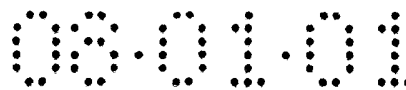


Obr. 18 (panel A) ukazuje časový průběh středního bodového ohodnocení lézí kontrolních myší a myší ošetřovaných 3krát denně během 4 dní a iniciovaných 5 dní po infekci samotným poloxamerem, poloxamerem s obsahem 5 % acycloviru nebo mastí Zovirax[®]. U myší, které dostaly poloxamer samotný, bylo pozorováno snížení středního bodové ohodnocení lézí ve srovnání s infikovanými neošetřenými myšmi. Ošetření mastí Zovirax[®] se projevuje jen skromným účinkem. Výrazné snížení středního bodového ohodnocení lézí bylo pozorováno u myší ošetřených poloxamerovým přípravkem s obsahem 5 % acycloviru ve srovnání neošetřenými infikovanými zvířaty. Nejdůležitější zajímavostí je to, že všechny myši ošetřené poloxamerem s obsahem 5 % acycloviru infekci přežily ($p < 0,001$) (Obr. 18, panel B). Ošetření mastí Zovirax[®] zvyšuje přežití infikovaných myší v menším rozsahu ($p < 0,05$).

Na živém organismu zkoumané pronikání antivirových činidel kůží

Obr. 19 ukazuje distribuci foscarnetu a acycloviru (○, ●) v kožní tkáni neinfikovaných (panely A, C, E) a infikovaných (panely B, D, F) myší 24 h po místní aplikaci buď ve fosfátovém pufru nebo v poloxamerové matrici. Distribuce obou přípravků foscarnetu a pufrovaného roztoku acycloviru na prouzcích stratum corneum u neinfikovaných a infikovaných myší byla podobná. Na rozdíl od toho začlenění acycloviru do poloxameru výrazně zvýšilo množství léku izolovaného ze stratum corneum jak neinfikovaných, tak infikovaných myší; zvýšené pronikání léku bylo vyslovenější u infikovaných myší. Žádná nebo zanedbatelná množství foscarnetu byla nalezena ve vespod leží epidermis a dermis neinfikovaných myší bez ohledu na nosič, který byl pro aplikaci léku použit. Koncentrace foscarnetu v epidermis a dermis infikovaných myší byla význačně vyšší, když lék byl začleněn do poloxameru. Koncentrace acycloviru byla vyšší než koncentrace foscarnetu v epidermis a dermis jak neinfikovaných, tak infikovaných myší bez ohledu na použitý nosič. Koncentrace acycloviru začleněného do poloxameru v epidermis neinfikovaných myší byla 6,1násobně vyšší než koncentrace léku v pufrovaném roztoku. Infekce myší významně nezvýšila množství acycloviru v epidermis. Koncentrace acycloviru v dermis infikovaných myší byla 7,9násobně větší než koncentrace u neinfikovaných myší, jestliže lék byl podáván v poloxamerové matrici.

Obr. 20 ukazuje koncentraci acycloviru v plazmě neinfikovaných a infikovaných myší 24 h po místní aplikaci buď ve fosfátovém pufru nebo v poloxamerové matrici. Podobné koncentrace acycloviru byly zjištěny v plazmě neinfikovaných myší pro oba přípravky. Infekce myší výrazně zvýšila koncentraci acycloviru v plazmě, zejména když lék byl začleněn do poloxamerové



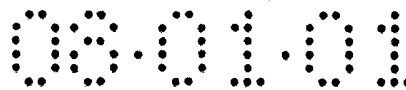
matrice, pro kterou bylo dosaženo čtyřnásobné zvýšení koncentrace. Koncentrace acycloviru v plazmě infikovaných myší byla 2,1krát vyšší, jestliže lék byl začleněn do poloxamerové matrice.

Vliv SLS na účinnost poloxamerových přípravků s obsahem foscarnetu a acycloviru na kožní léze HSV-1 u myší

Na myších byl rovněž vyhodnocován vliv SLS na účinnost poloxamerových přípravků s obsahem foscarnetu na infekci HSV-1. Obr. 21 (panel A) ukazuje časový průběh středního bodového ohodnocení lézí a přežití infikovaných myší a neinfikovaných myší ošetřených jedinou aplikací (podanou 24 h po infekci) samotného poloxameru, poloxameru s obsahem 3 % foscarnetu, poloxamerem s obsahem 5 % SLS nebo poloxameru s obsahem 3 % foscarnetu + 5 % SLS. Samotný poloxamer nedával žádnou ochranu proti infekci. Kromě toho u myší ošetřených poloxamerem s obsahem buď 5 % SLS nebo 3 % foscarnetu bylo pozorováno mírné snížení středního bodového ohodnocení lézí při srovnání s neošetřenými infikovanými myšmi. Nejdůležitější zajímavostí je to, že u myší ošetřených poloxamerem s obsahem 3 % foscarnetu a 5 % SLS jsme pozorovali výrazné a významné snížení ($p < 0,05$) středního bodového ohodnocení lézí ve srovnání se středním bodovým ohodnocením lézí u neošetřených infikovaných myší. Odpovídají míry přežití pro stejně ošetřované skupiny jsou uvedeny v panelu B, což podporuje výsledky středního bodového ohodnocení lézí. Vlastnost SLS, zvyšovat pronikání kůží, kombinovaná s jeho schopností modifikovat virovou infekčnost, vysvětluje zvýšenou účinnost foscarnetového přípravku.

Vnímavost HSV-1 na kombinaci foscarnetu a SLS při zkouškách mimo živý organismus

Vliv SLS na účinnost foscarnetu proti HSV-1 (kmen F) byla zkoumána na buňkách Vero. Ve stručnost: buňky byly rozočkovány do dvacetičtyřjamkových ploten (Costar, Montreal, QC, Kanada) a byly inkubovány s kmenem F HSV-1 (přibližně 100 PFU/ml) po 2 h při 37 °C, aby se umožnila adsorpce viru. Potom byl vir odstraněn a buňky byly překryty 0,5 ml 0,6% agarózovým přípravkem Seaplaque (Marine Colloids, Rockland, MA, USA) obsahujícím různé koncentrace foscarnetu, SLS nebo kombinace obou sloučenin. Plotny byly inkubovány 2 dny při 37 °C. Pak byly buňky 20 minut fixovány 10% formaldehydem v PBS, promyty deionizovanou vodou a obarveny 0,05% methylenovou modří. Vnímavost viru byla vyhodnocována stanovením PFU. Obr. 22 ukazuje vnímavost kmenu F HSV-1 na kombinaci různých koncentrací foscarnetu a SLS



na buňky Vero. Výsledky ukazují, že přítomnost SLS zvyšuje účinnost foscarnetu vůči HSV-1 (kmen F) v buňkách Vero.

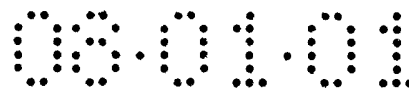
Potenciální aplikace

Následující příklady, popsané dole v tomto dokumentu, jsou specifické potenciální aplikace našich místních přípravků, ale v žádném případě nejsou určeny pro omezení rámce tohoto dokumentu. Jak je ukázáno na shora uvedených výsledcích, naše gelové přípravky jsou použitelné pro prevenci infekce kůže a/nebo sliznice a zejména pro prevenci HSV a HIV. Kromě toho naše výsledky ukázaly, že naše gelové přípravky mohou sloužit jako profylaktické činidlo pro prevenci náhodných infekcí zdravotníků. Jak bylo rovněž ukázáno ve shora uvedených výsledcích, naše gelové přípravky jsou použitelné pro léčbu a prevenci infekce a stavů kůže a/nebo sliznice a zejména pro léčbu a prevenci oparových lézí. Kromě shora uvedených aplikací jsou další potenciální aplikace použití našich gelových přípravků i) pro hojení a/nebo ošetřování popálenin a prevenci další infekce a ii) pro léčbu a/nebo prevenci infekce očních stavů. Ve shora uvedených příkladech naše gelové přípravky obsahují jakékoli antimikrobiální, baktericidní, antivirové, chemoterapeutické, protizánětlivé, protinádorové, imunomodulační nebo jakékoli další činidlo nebo jejich kombinace, které je účinné pro léčbu a/nebo prevenci infekce a/nebo nenormálních stavů sliznice a/nebo kůže, způsobené jakýmkoli patogenem a/nebo onemocněním.

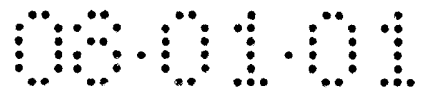
Následující příklady, popsané dole v tomto dokumentu, jsou specifická potenciální použití našeho specifického aplikátoru, ale nejsou v žádném případě míněny jako omezující rámec tohoto dokumentu. Jak popsáno shora, náš aplikátor je použitelný pro dodávání jakýchkoli místních přípravků, používaných pro pokrytí cervikální/vaginální/anorektální sliznice pro léčbu a/nebo prevenci infekce a/nebo nenormálních stavů sliznice. Náš aplikátor je také použitelný pro dodávání i) jakýchkoli místních přípravků, které zabrání pohlavnímu přenosu patogenů způsobujících STD, ii) vaginálních antikoncepčních přípravků, iii) místních mikrobicidních přípravků proti specifickým onemocněním a iv) jakéhokoli antimikrobiálního, baktericidního, antivirového, chemoterapeutického, protizánětlivého, protinádorového nebo imunomodulačního činidla, detergentů, mikrobiálně absorpčního inhibitoru, činidla zvyšujícího pronikání kůží, cytokinu, antigenu, vakcíny, radioaktivních činidel nebo jejich kombinace.

PATENTOVÉ NÁROKY

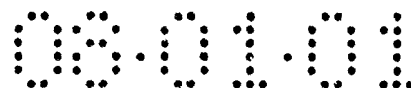
1. Použití činidla schopného interferovat s proteinovými interakcemi nebo rozrušovat proteinovou strukturu v cílové buňce, tkanině nebo mikrobu, pro přípravu místního přípravku pro léčbu nebo pro prevenci onemocnění, které postihuje pacientovu sliznici nebo kůži nebo pro prevenci napadení vnějším činidlem, například spermií nebo mikroblem, s tou výhradou, že toto činidlo není nonoxynol-9.
2. Místní přípravek, vyznačující se tím, že obsahuje vhodné množství film vytvářející složky, schopné šířit a vytvářet ochrannou vrstvu na pacientově sliznici nebo kůži a účinné množství činidla schopného interferovat s proteinovými interakcemi nebo rozrušit proteinovou strukturu v cílové buňce, tkanině nebo mikrobu s tou výhradou, že toto činidlo není nonoxynol-9.
3. Místní přípravek podle nároku 1 nebo 2, vyznačující se tím, že činidlo je schopno interferovat s vázání se mikrobiálního vnějšího proteinu na hostitelský receptor.
4. Místní přípravek podle kteréhokoli z nároků 1 až 3, vyznačující se tím, že činidlo je mikrobiální adhezní inhibitor nebo je to detergent nebo chaotropní činidlo, schopné rozrušovat integritu proteinu.
5. Místní přípravek podle nároku 4, vyznačující se tím, že mikrobiální adhezní inhibitor je dextransulfát.
6. Místní přípravek podle nároku 4 vyznačující se tím, že detergent se vybere ze skupiny, která se skládá z: natrium-laurylsulfátu, benzalkoniumchloridu, lauroylsarkosinu, polyoxyethylenových alifatických acylderivátů a polyoxyethylensorbitanových alifatických acylesterderivátů.
7. Místní přípravek podle nároku 4 vyznačující se tím, že chaotropní činidlo je natrium-laurylsulfát nebo guanidin.
8. Místní přípravek podle kteréhokoli z nároků 1 až 7, vyznačující se tím, že činidlo je natrium-laurylsulfát.



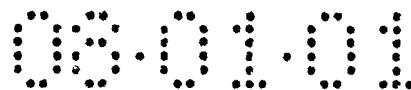
9. Místní přípravek podle nároku 8, vyznačující se tím, že činidlo je natrium-laurylsulfát v koncentraci 1 až 15 % (hmotnostních/objem).
10. Místní přípravek podle kteréhokoli z nároků 1 až 9, vyznačující se tím, že film vytvářející složka je poloxamer 407.
11. Místní přípravek podle nároku 10, vyznačující se tím, že poloxamer 407 se použije v koncentraci 15 až 35 % (hmotnostních/objem).
12. Místní přípravek podle kteréhokoli z nároků 1 až 11, vyznačující se tím, že dále obsahuje lék účinný proti onemocnění, působící na sliznici nebo kůži nebo přenášené skrz kůži nebo sliznici.
13. Místní přípravek podle nároku 12, vyznačující se tím, že lék je jeden nebo více léků vybraných ze skupiny, která se skládá z antimikrobiálního, spermicidního, baktericidního, antivirového, chemoterapeutického, protizánětlivého, protinádorového, imunomodulačního nebo jakéhokoli jiného činidla.
14. Místní přípravek podle nároku 13, vyznačující se tím, že obsahuje antivirové činidlo.
15. Místní přípravek podle nároku 14, vyznačující se tím, že antivirové činidlo je acyclovir nebo foscarnet.
16. Místní přípravek podle kteréhokoli z nároků 1 až 15, vyznačující se tím, že dále obsahuje činidlo zvyšující pronikání kůži.
17. Aplikátor pro dodávání kapalného nebo polotuhého přípravku do pacientovy slizniční kavity, vyznačující se tím, že se skládá z:
 - těla, které má proximální a distální konec, podélně probíhající vnější stěnu opatřenou perforacemi a podélně probíhající vnitřní stěnu uspořádanou a dimenzovanou tak, že je prostorově oddělena od vnější stěny difuzním kanálem mezi nimi; difuzní kanál má proximální vstupní konec;
 - zásobníku schopného pojmout jakýkoli přípravek;



- vypuzovacího prvku, funkčně spojeného se zásobníkem a uváděného v činnost pacientem pro vypuzení jakékoli přípravku ze zásobníku do difuzního kanálu; čímž, když se uvede v činnost, tak vypuzovací prvek žene přípravek ze zásobníku do difuzního kanálu skrz jeho proximální vstupní konec a přípravek se dodává do slizniční kavity skrze perforace.
18. Aplikátor podle nároku 17, v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále se skládá ze:
- spojovacího prvku pro spojení vypuzovacího prvku s proximálním koncem těla; a
 - usměrňovacího prvku, umístěného na proximálním konci těla pro usměrňování jakéhokoli přípravku do proximálního vstupního konce difuzního kanálu.
19. Aplikátor podle nároku 17, v y z n a č u j í c í s e t í m, že perforace vnější stěny zahrnují jak podélné, tak distální perforace.
20. Aplikátor podle nároku 17, v y z n a č u j í c í s e t í m, že vypuzovací prvek a zásobník jsou jeden jediný prvek.
21. Aplikátor podle nároku 20, v y z n a č u j í c í s e t í m, že vypuzovací prvek je pružný prvek, který se uvádí v činnost stlačením.
22. Aplikátor podle nároku 20, v y z n a č u j í c í s e t í m, že vypuzovací prvek je píst, který uvádí v činnost pacient.
23. Aplikátor podle nároku 17, v y z n a č u j í c í s e t í m, že vypuzovací prvek zahrnuje píst, uváděný v činnost pacientem.
24. Aplikátor podle nároku 23, v y z n a č u j í c í s e t í m, že vypuzovací prvek rovněž má jako součást dosedací plochu, umístěnou distálně vzhledem k zásobníku v dutině tvořené vnitřní stěnou, kterážto dosedací plocha je funkčně spojena s pístem umístěným blízko zásobníku; čímž, když pacient táhne za píst, dosedací plocha stlačuje zásobník, což vypuzuje přípravek do difuzního kanálu.

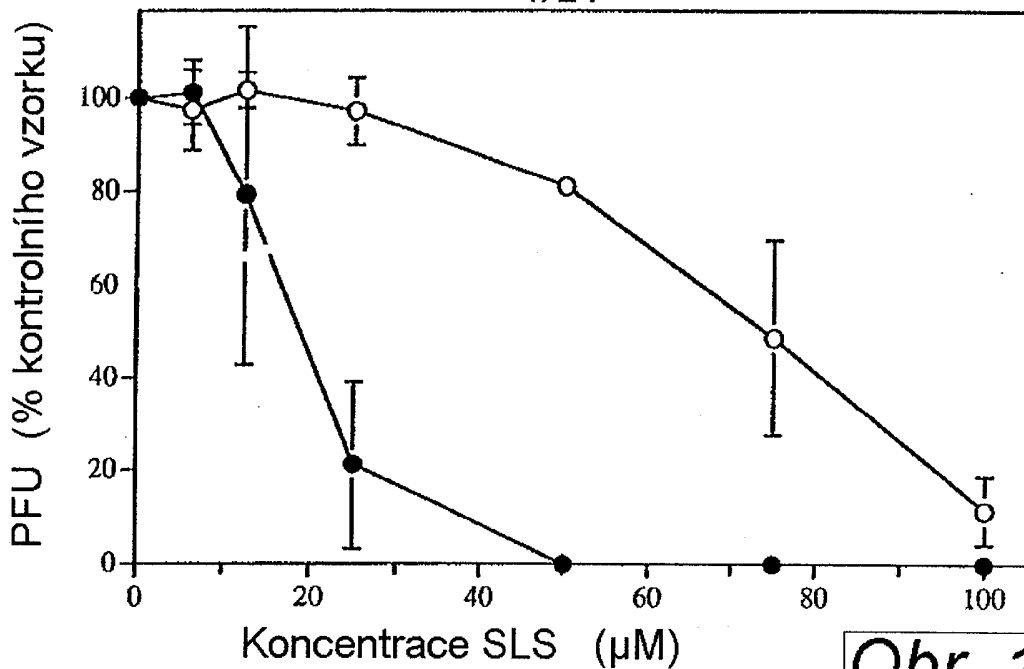


25. Aplikátor podle nároku 23, v y z n a č u j í c í s e t í m, že píst má vnější stěnu s průměrem větším než je vnější průměr vnitřní stěny a menší než je vnitřní průměr vnější stěny těla a pacient uvádí píst v činnost kluzným ovládním jeho vnější stěny mezi vnitřní a vnější stěnou těla.
26. Aplikátor podle kteréhokoli z nároků 17 až 23 a 25, v y z n a č u j í c í s e t í m, že usměřňovací prvek zahrnuje uzavírací prvek pro uzavírání vnitřní dutiny tvořené vnitřní stěnou těla.
27. Aplikátor podle nároku 26, v y z n a č u j í c í s e t í m, že usměřňovací prvek se dále skládá z otevřeného prvku, soustředného s uzavíracím prvkem, kterýžto otevřený prvek se otevírá do proximálního vstupního konce difuzního kanálu a skrz který se přípravek žene uváděním v činnost vypuzovacího prvku.
28. Aplikátor podle nároků 26 nebo 27, v y z n a č u j í c í s e t í m, že usměřňovací prvek je vytvořen integrálně s proximálním koncem vnitřní stěny tělesa.
29. Aplikátor podle nároku 24, v y z n a č u j í c í s e t í m, že usměřňovací prvek je tvořen proximálním vstupním kanálem a uzavíracím prvkem na proximálním konci těla.
30. Aplikátor podle kteréhokoli z nároků 17 až 29, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se dále skládá z membrány o malé pevnosti, umístěné mezi zásobníkem a proximálním koncem těla.
31. Aplikátor podle nároku 30, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se dále skládá z kónusovitého prvku pro protržení membrány, kterýžto kónusovitý prvek je umístěn na proximálním konci usměřňovacího prvku.
32. Aplikátor podle kteréhokoli z nároků 17 až 31, v y z n a č u j í c í s e t í m, že perforace tvoří alespoň dvě štěrbinu podélně umístěné v podstatně stejné vzdálenosti a distální perforace.
33. Aplikátor podle nároku 32, v y z n a č u j í c í s e t í m, že štěrbinu a distální perforace jsou souvislé.



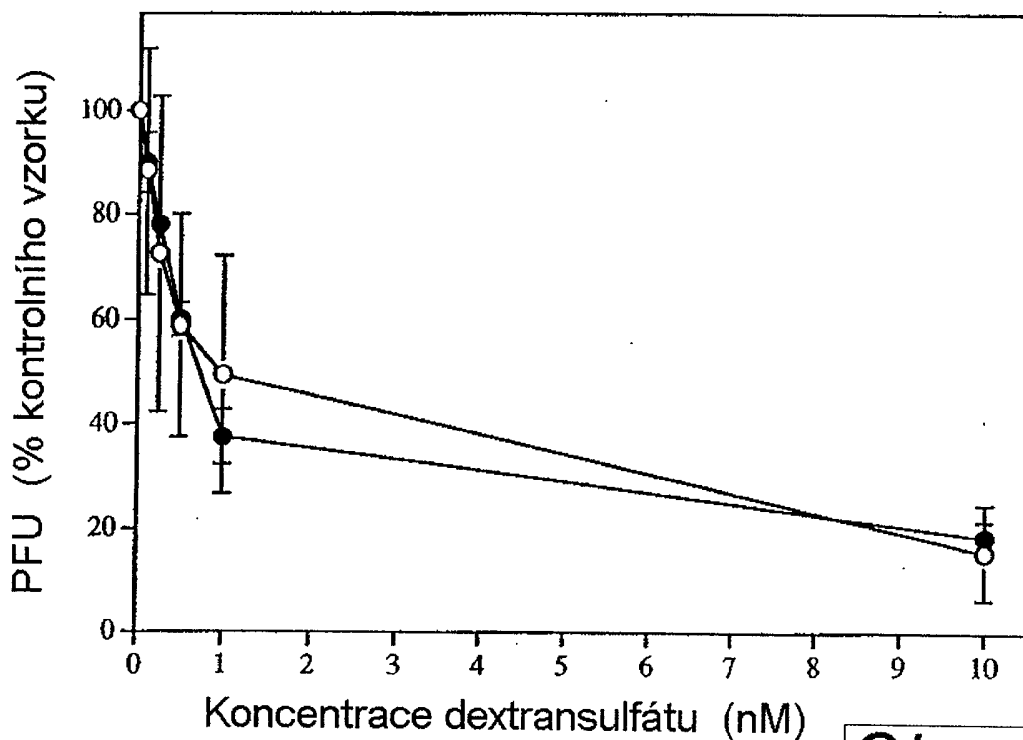
34. Aplikátor podle kteréhokoli z nároků 17 až 31, vyznačující se tím, že perforace tvoří množství otvorů, které jsou rozmístěny takovým způsobem, že přípravek se dodává podstatně rovnoměrně do slizniční kavity.
35. Aplikátor podle kteréhokoli z nároků 17 až 34, vyznačující se tím, že dále obsahuje uchopovací prvek, umístěný na vnější periferii spojovacího prvku.
36. Aplikátor podle kteréhokoli z nároků 17 až 34, vyznačující se tím, že dále obsahuje uchopovací prvek, vytvořený integrálně se spojovacím prvkem.

1/24



Obr. 1A

Legenda: —○— infekčnost viru inkubovaného s SLS (panel A) nebo s DS (panel B) (bez předošetření) —●— infekčnost viru inkubovaného s SLS (panel A) nebo s DS (panel B) (předošetření 1 h)

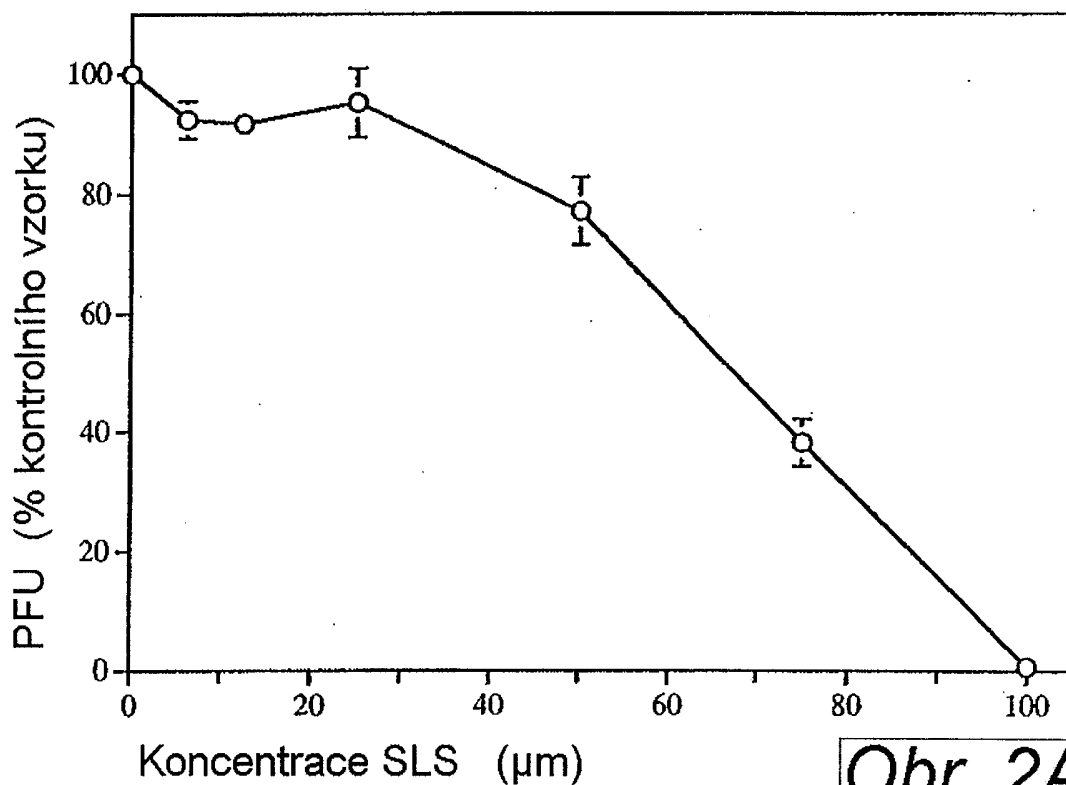


Obr. 1B

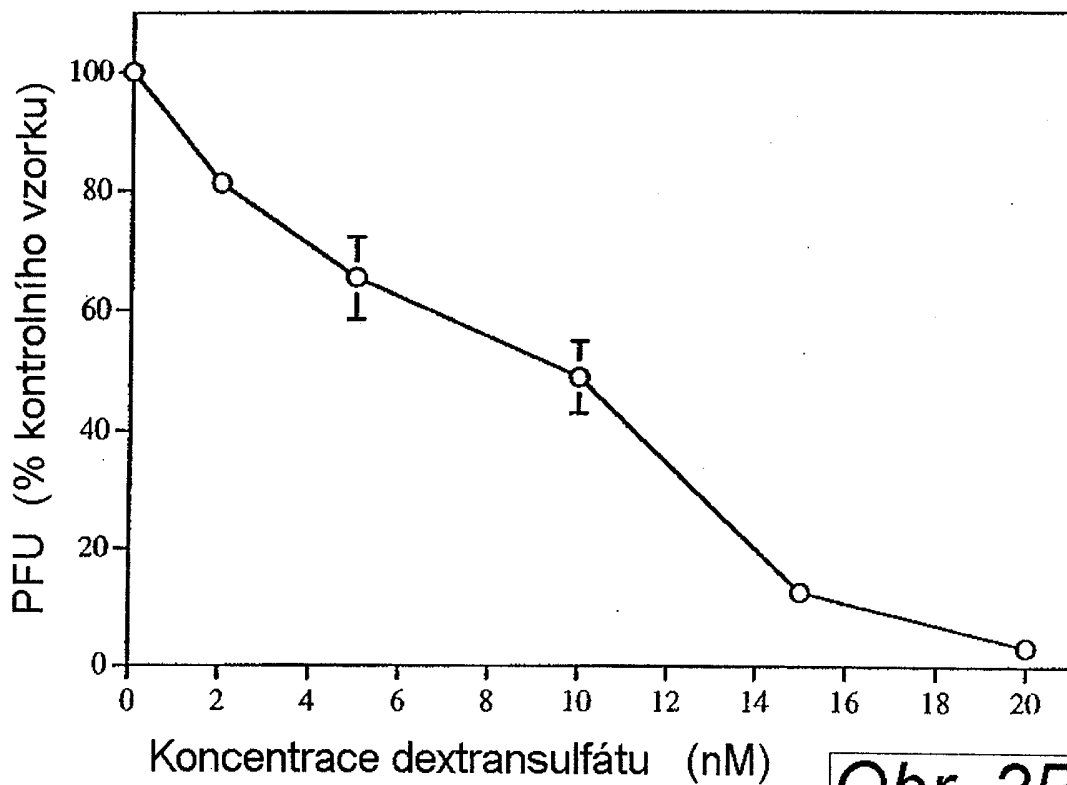
Legenda: —○— infekčnost viru inkubovaného s SLS (panel A) nebo s DS (panel B) (bez předošetření) —●— infekčnost viru inkubovaného s SLS (panel A) nebo s DS (panel B) (předošetření 1 h)

08.01.01

2/24

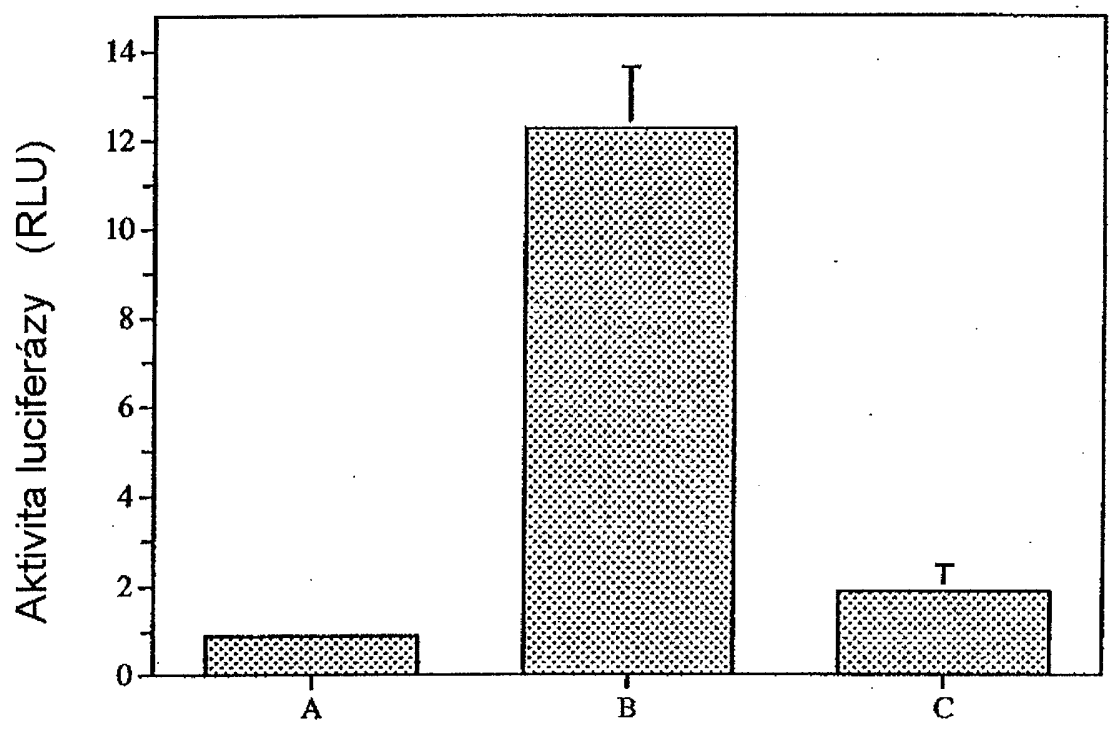


Obr. 2A



Obr. 2B

3/24



Legenda:

- A: neinfikované neošetřené buňky
- B: buňky infikované neošetřeným virem
- C: buňky infikované virem předošetřeným 500 µM SLS

Obr. 3

08.01.01

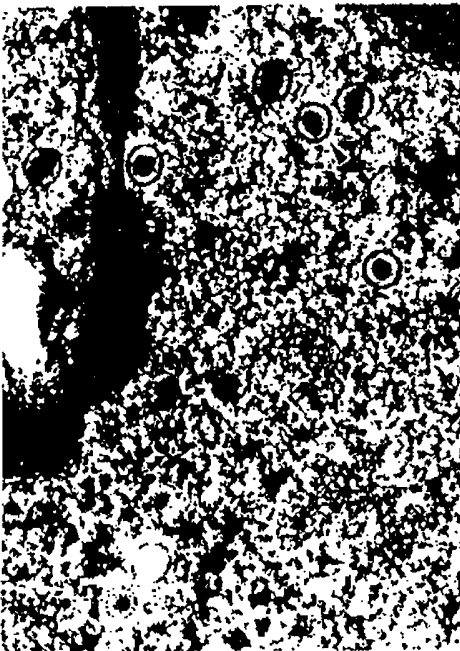
4/24



Obr. 4B



Obr. 4D



Obr. 4A



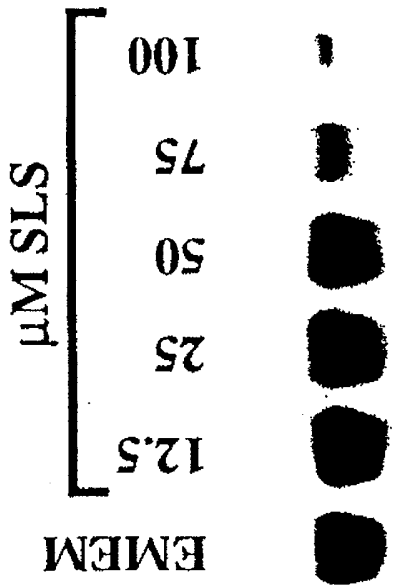
Obr. 4C

B

C

08.01.01

5/24

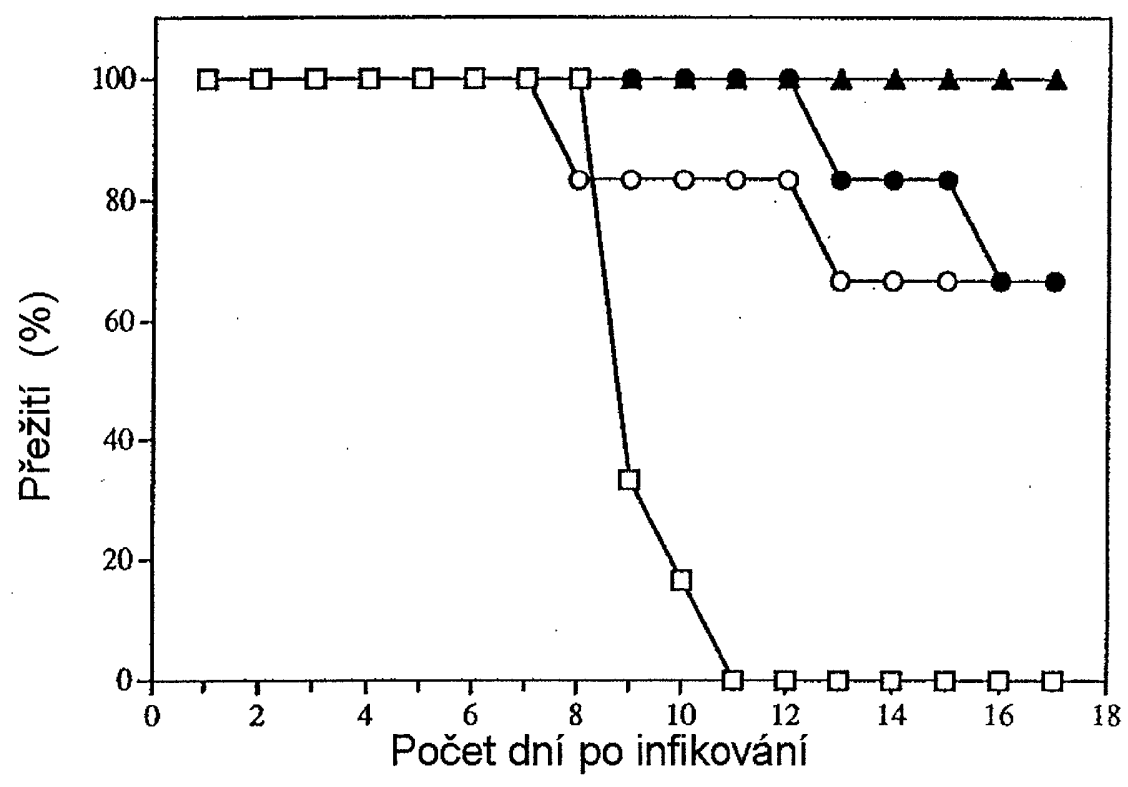


Obr. 5A

Koncentrace SLS (μM)	Procenta kontrolního vzorku
0 (EMEM)	100
12.5	120.6
25	123.8
50	114.3
75	65.1
100	34.9

Obr. 5B

6/24



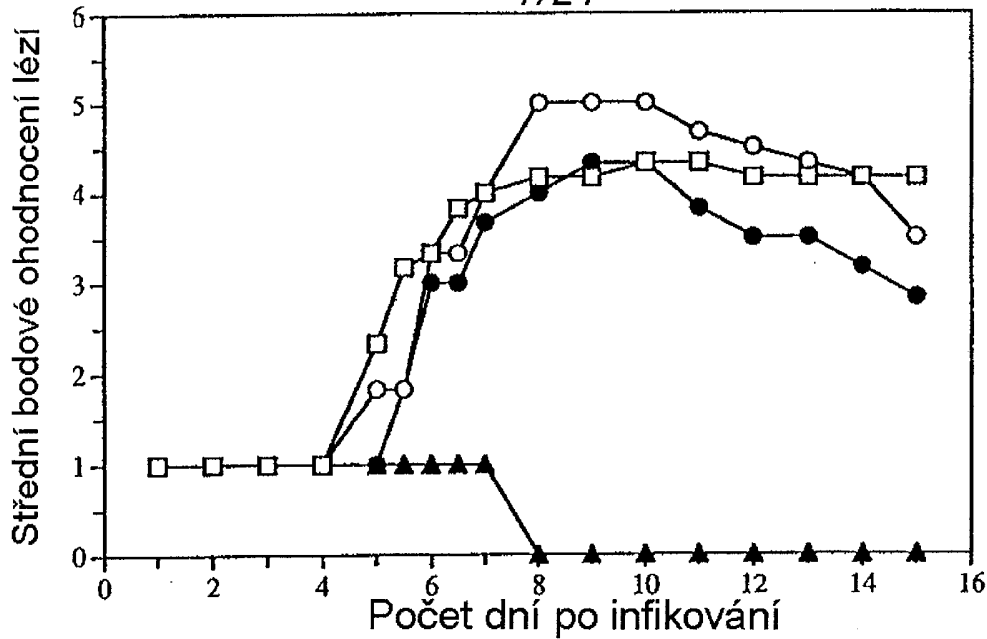
Legenda:

- myši infikované neošetřeným virem
- myši infikované virem předošetřeným 6,25 μM SLS
- myši infikované virem předošetřeným 25 μM SLS
- ▲— myši infikované virem předošetřeným 100 μM SLS

Obr. 6

08.01.01

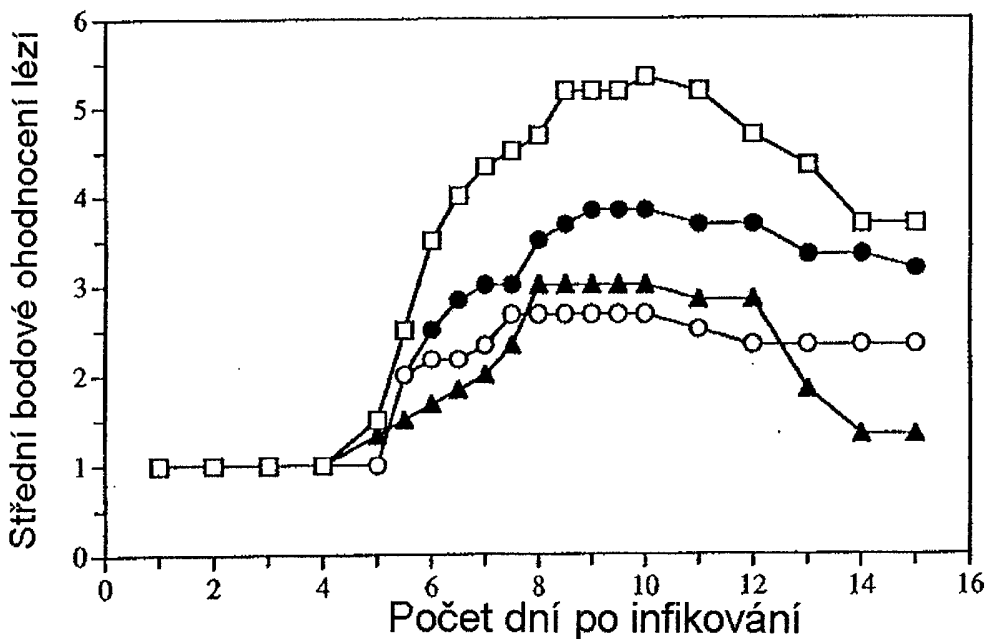
7/24



Legenda:

- myši infikované neošetřeným virem
- myši infikované virem předošetřeným 6,25 μM SLS (panel A) nebo 0,25 nM DS (panel B)
- myši infikované virem předošetřeným 25 μM SLS (panel A) nebo 1 nM DS (panel B)
- ▲— myši infikované virem předošetřeným 100 μM SLS (panel A) nebo 10 nM DS (panel B)

Obr. 7A

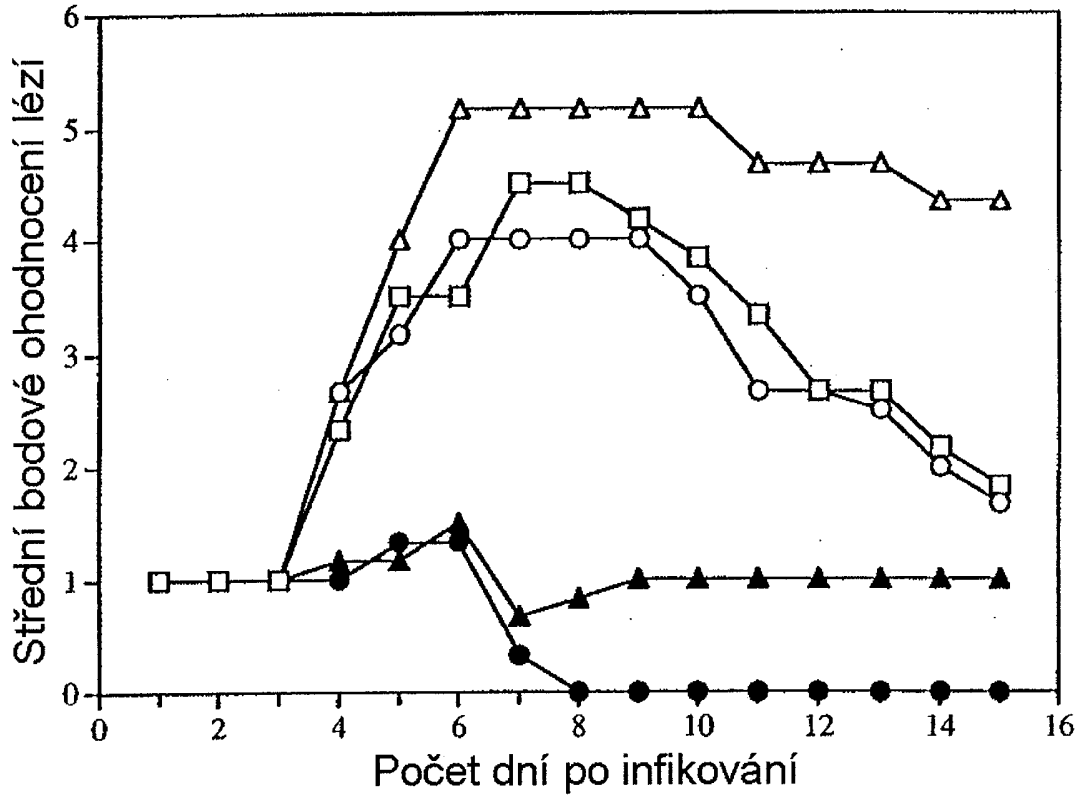


Legenda:

- myši infikované neošetřeným virem
- myši infikované virem předošetřeným 6,25 μM SLS (panel A) nebo 0,25 nM DS (panel B)
- myši infikované virem předošetřeným 25 μM SLS (panel A) nebo 1 nM DS (panel B)
- ▲— myši infikované virem předošetřeným 100 μM SLS (panel A) nebo 10 nM DS (panel B)

Obr. 7B

8/24

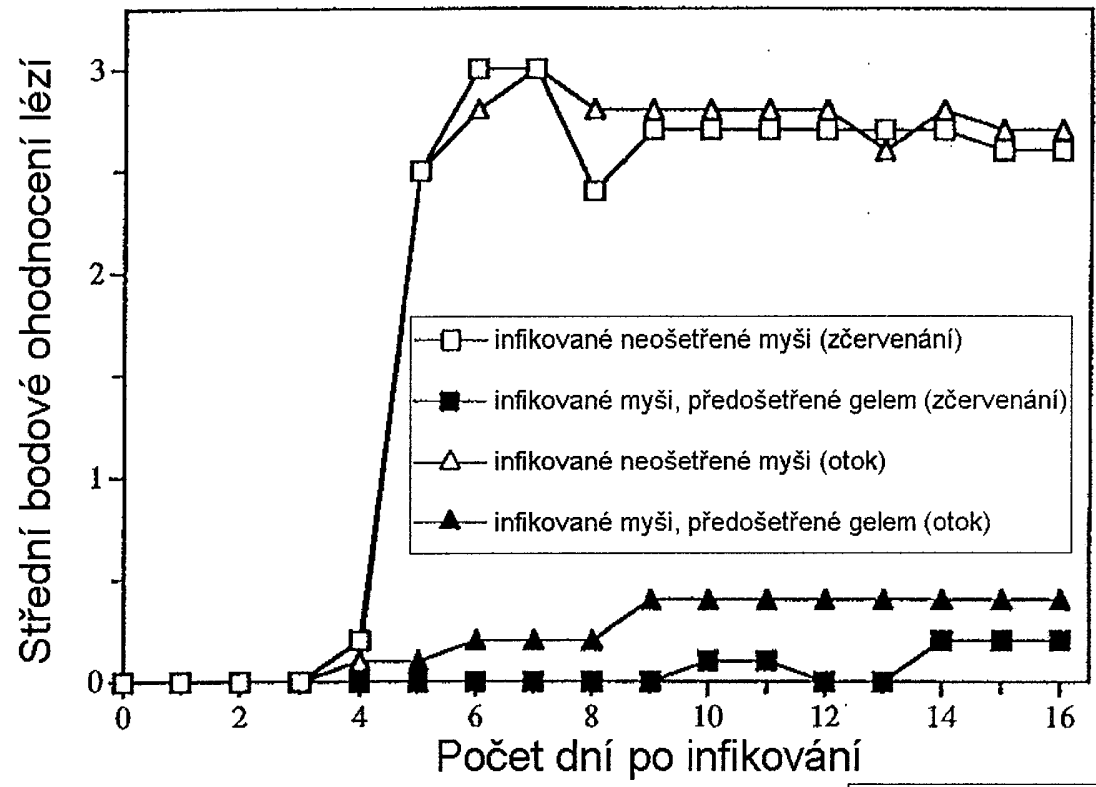


Legenda:

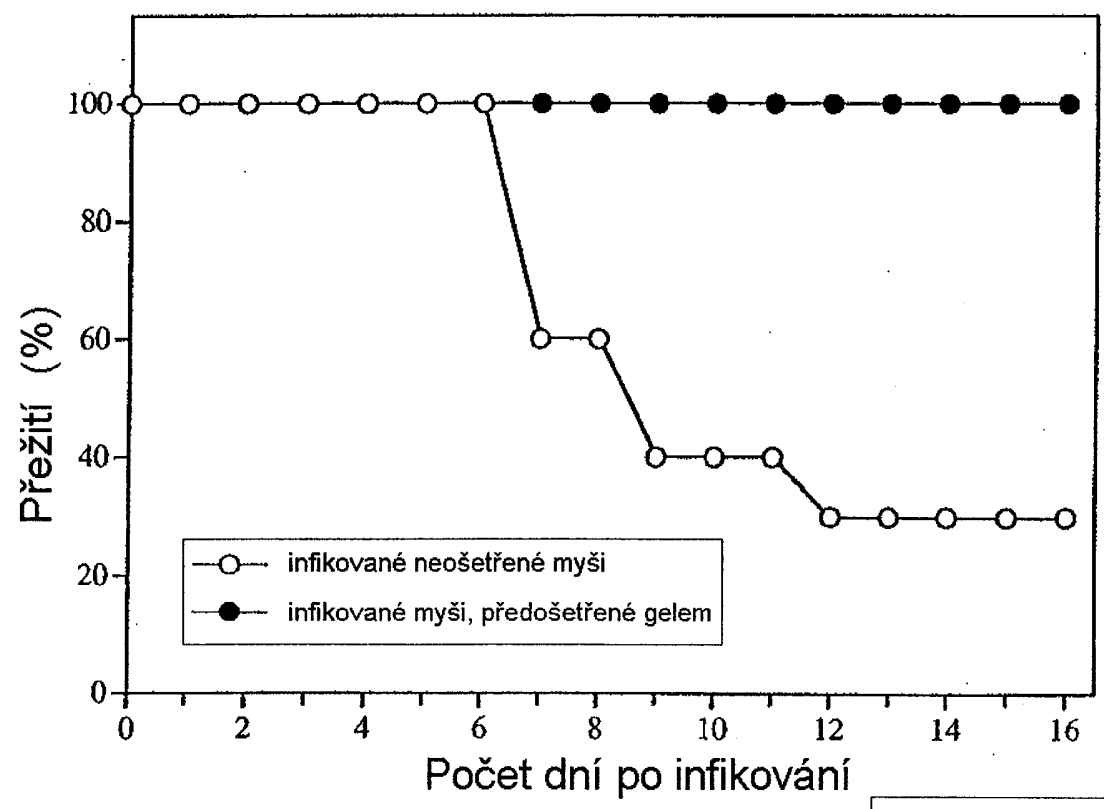
- infikované neošetřené myši
- infikované myši, předošetřené (5 minut před infek.) samotným poloxamerem
- △— infikované myši, předošetřené (1 h před infek.) samotným poloxamerem
- infikované myši, předošetřené (5 minut před infek.) poloxamerem + 5 % SLS
- ▲— infikované myši, předošetřené (1 h před infek.) poloxamerem + 5 % SLS

Obr. 8

9/24

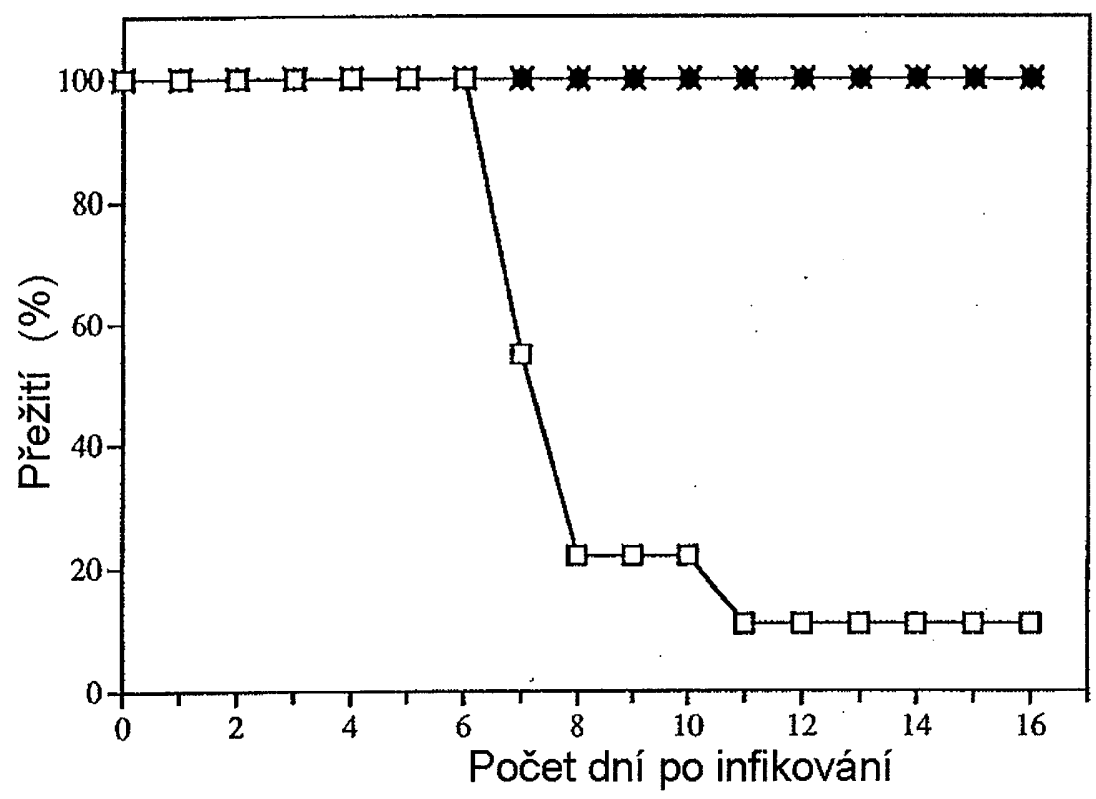


Obr. 9A



Obr. 9B

10/24

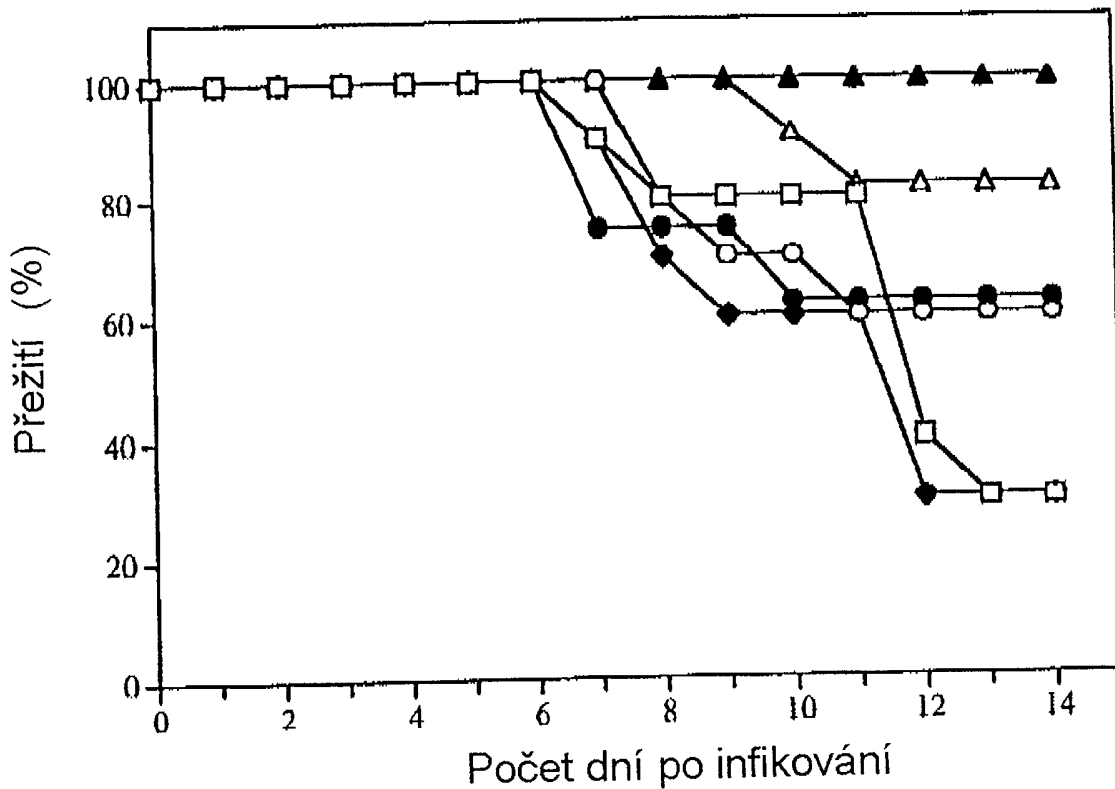


Legenda:

- infikované neošetřené myši
- infikované myši, předošetřené gelem + 2,5 % SLS
- *— infikované myši, předošetřené 2,5% roztokem SLS

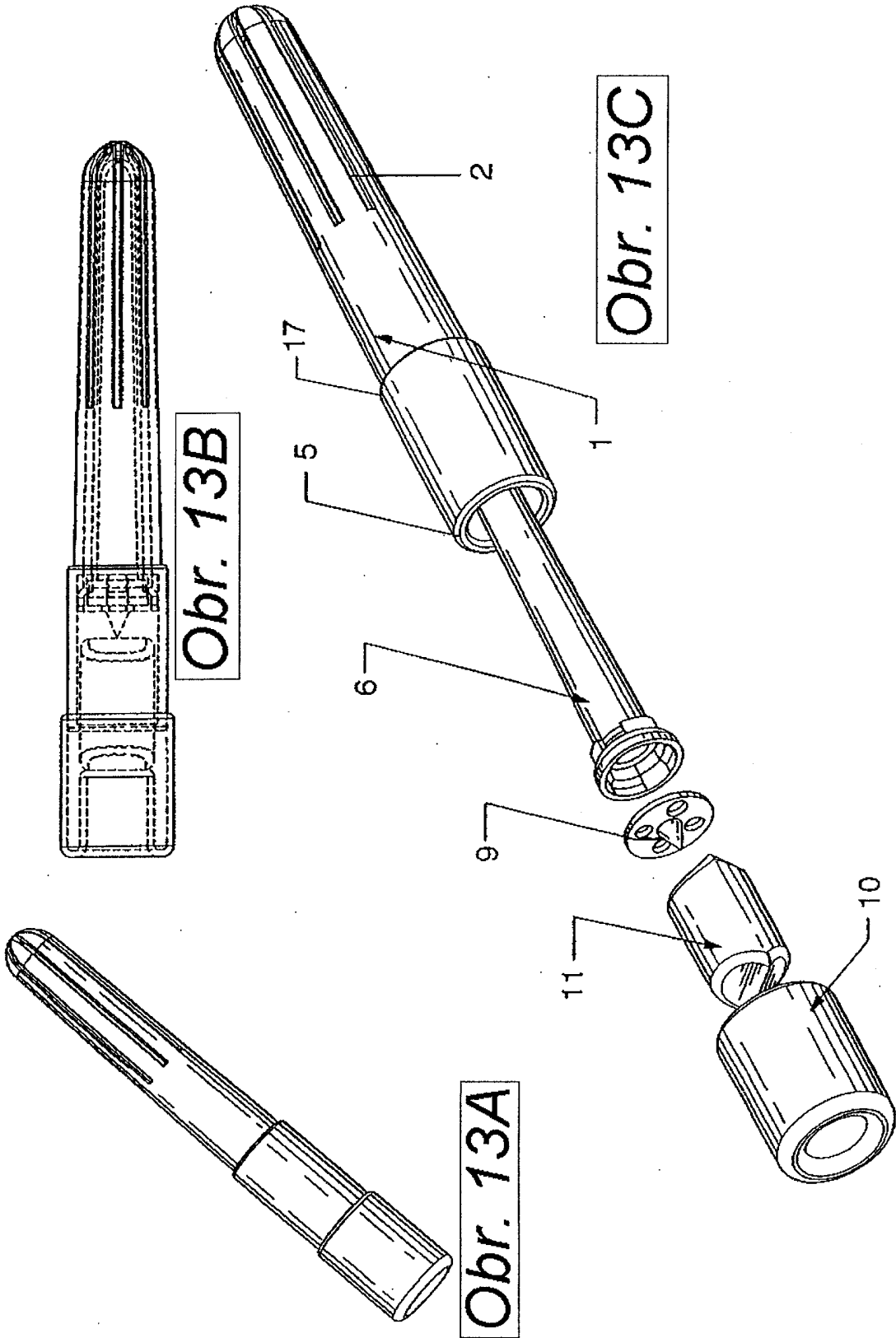
Obr. 10

11/24



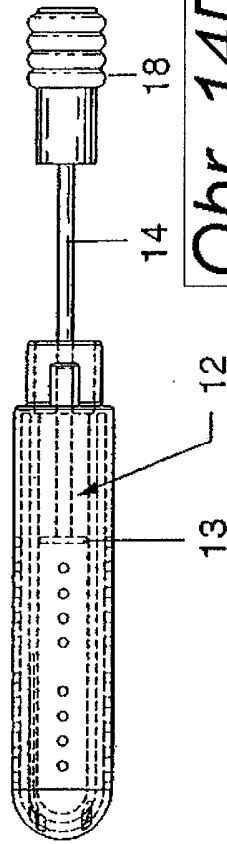
- Legenda:
- infikované neošetřené myši
 - infikované myši, předošetřené gelem+5% polyethylen 40 stearát
 - infikované myši, předošetřené gelem+5% guanidinu
 - ▲— infikované myši, předošetřené gelem+2,5% lauroylsarkosinu
 - △— infikované myši, předošetřené gelem+2,5% benzalkoniumchloridu
 - ◆— infikované myši, předošetřené gelem+5% tweenu 80

Obr.11

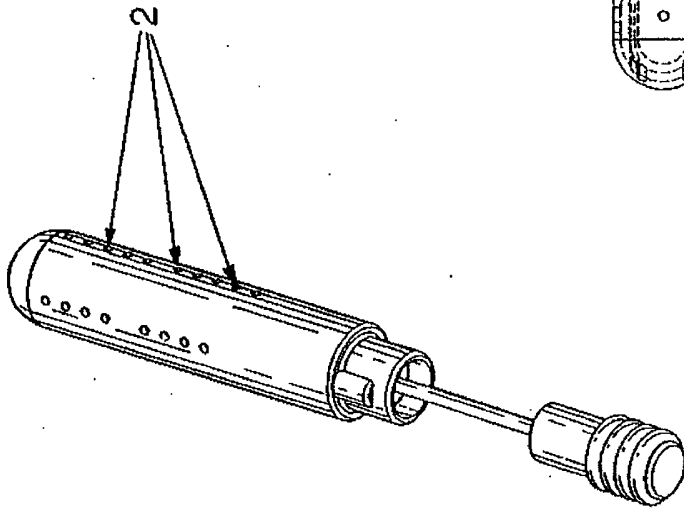




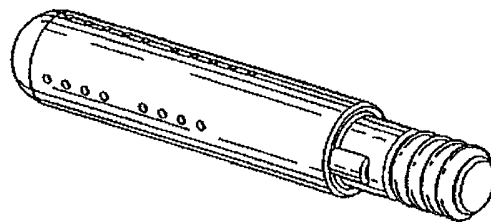
Obr. 14C



Obr. 14D



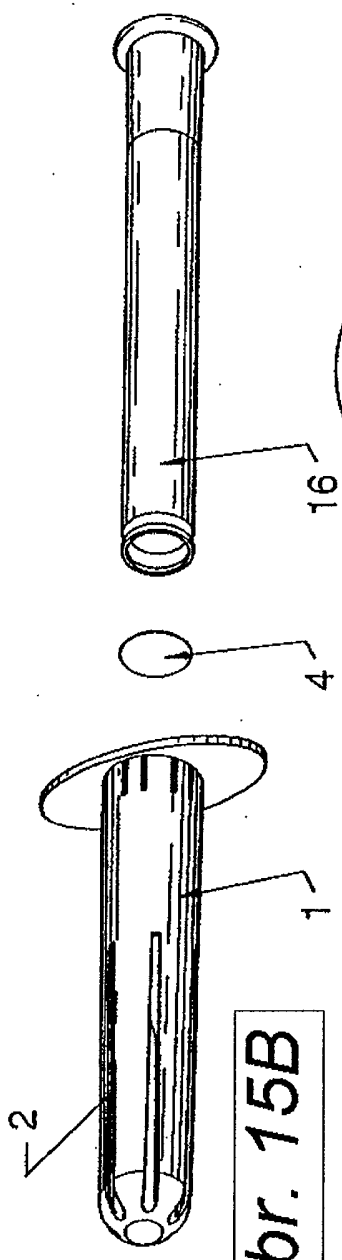
Obr. 14B



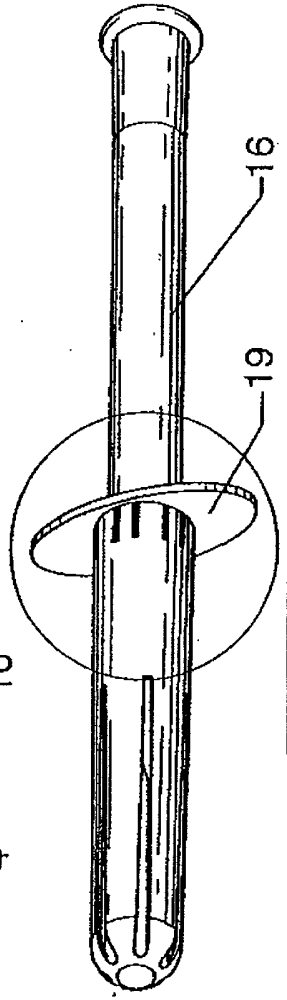
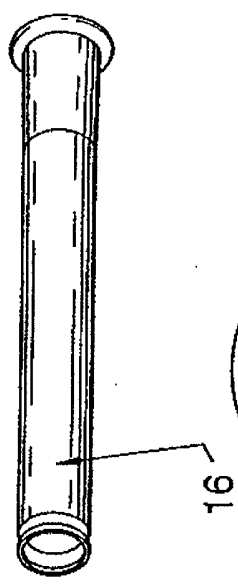
Obr. 14A

08.01.01

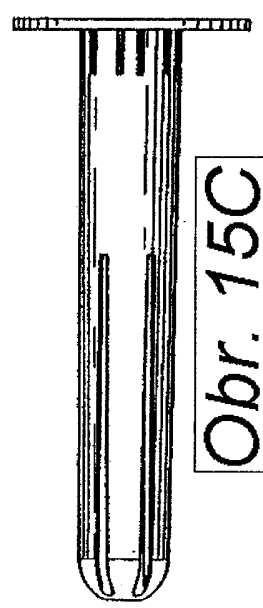
15/24



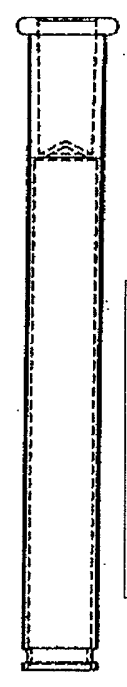
Obr. 15B



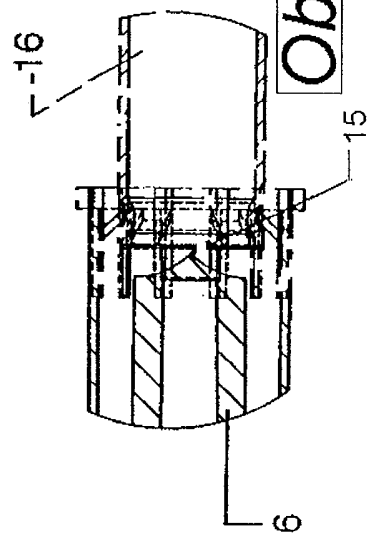
Obr. 15A



Obr. 15C



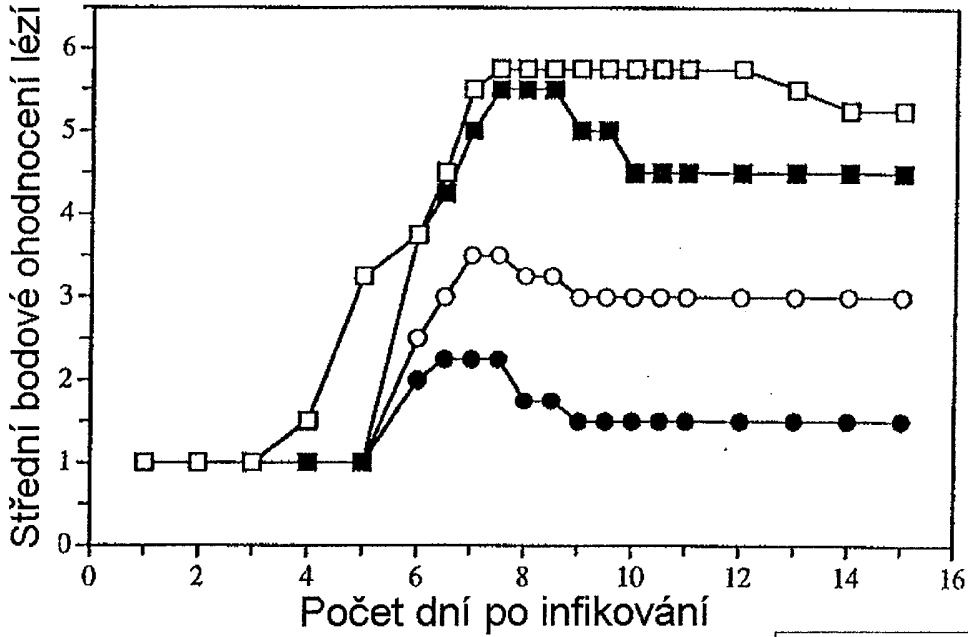
Obr. 15D



Obr. 15

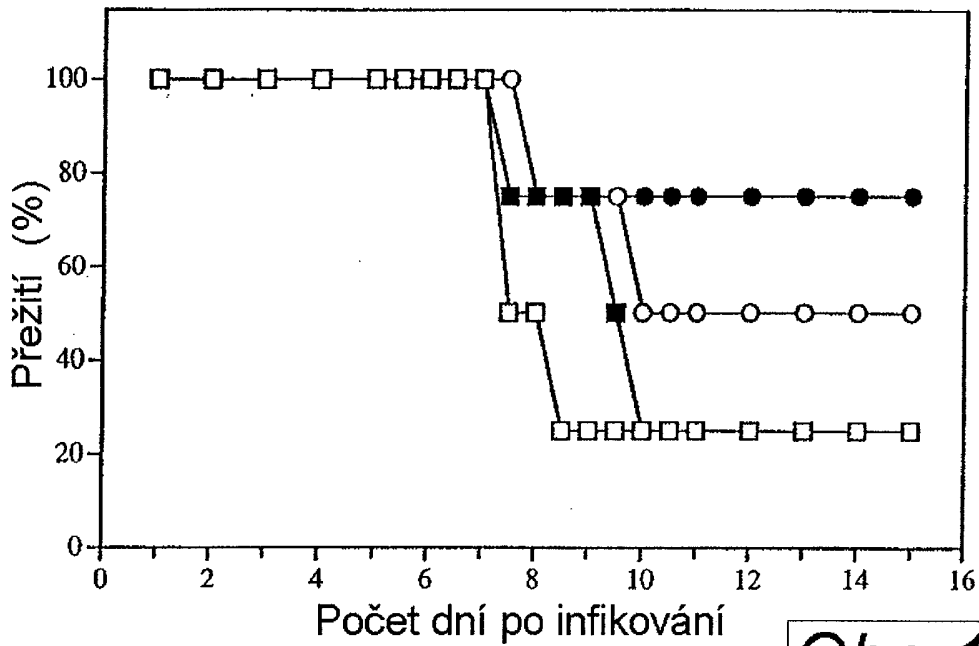
08.01.01

16/24



Obr. 16A

- Legenda:
- infikované neošetřené myši
 - infikované myši, ošetřené samotným poloxamerem
 - infikované myši, ošetřené 0,5% foscarnetem
 - infikované myši, ošetřené poloxamerem + 0,5% foscarnetu

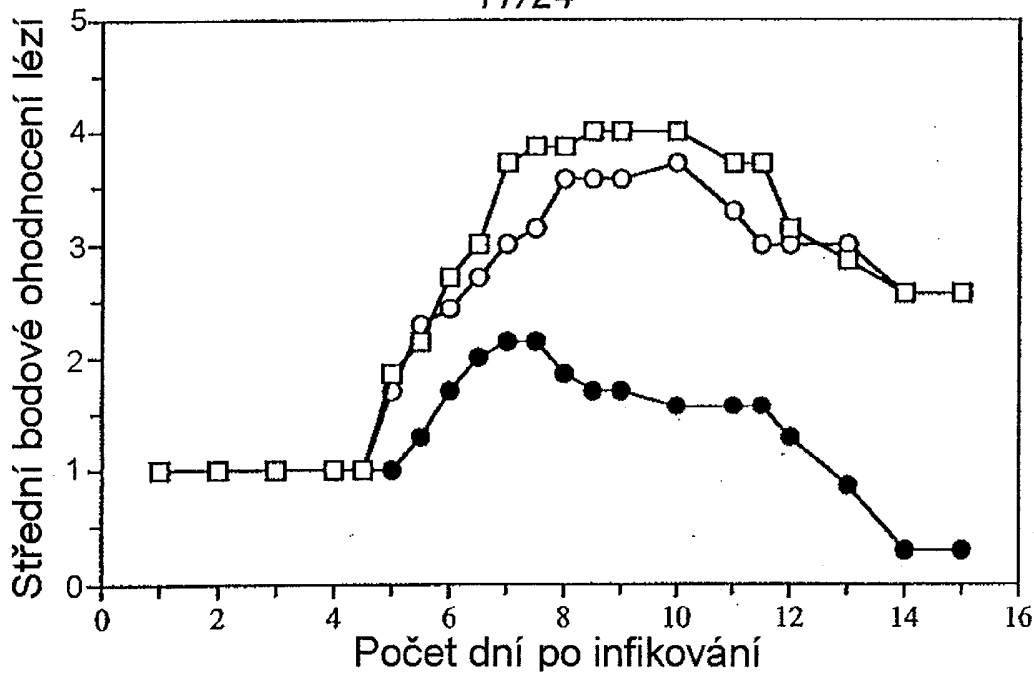


Obr. 16B

- Legenda:
- infikované neošetřené myši
 - infikované myši, ošetřené samotným poloxamerem
 - infikované myši, ošetřené mastí Zovirax
 - infikované myši, ošetřené poloxamerem + 5% acycloviru

08.01.01

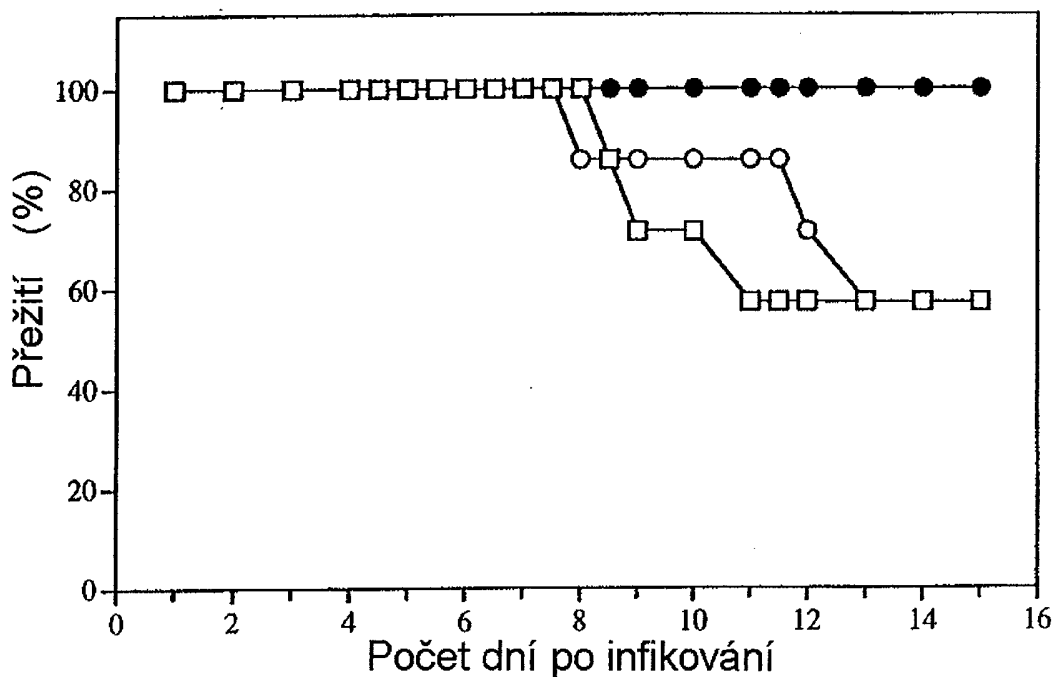
17/24



Legenda:

- infikované neošetřené myši
- infikované myši, ošetřené mastí Zovirax
- infikované myši, ošetřené poloxamerem + 5 % acycloviru

Obr. 17A

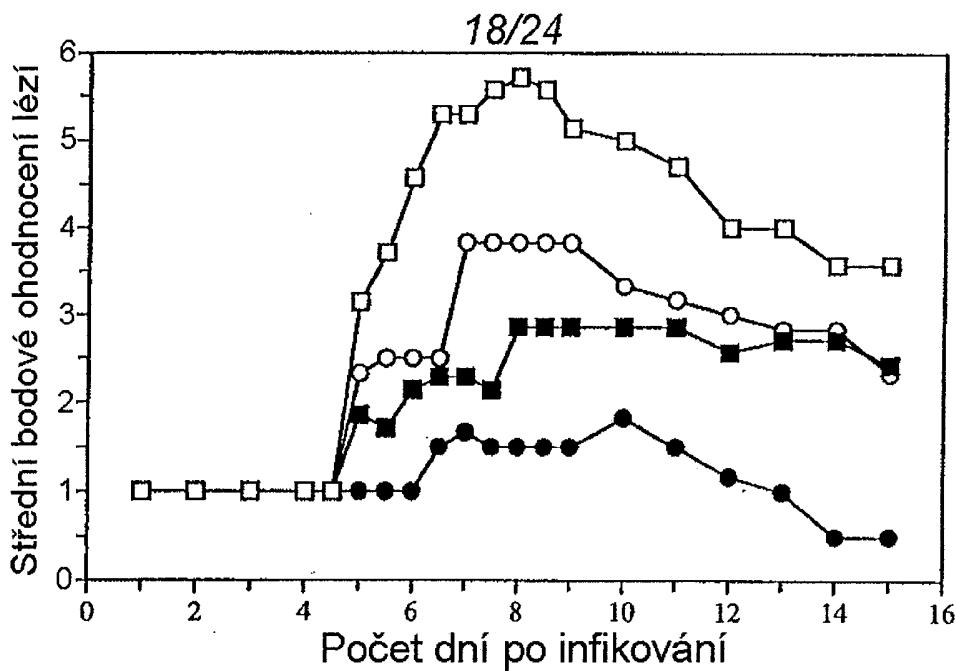


Legenda:

- infikované neošetřené myši
- infikované myši, ošetřené mastí Zovirax
- infikované myši, ošetřené poloxamerem + 5 % acycloviru

Obr. 17B

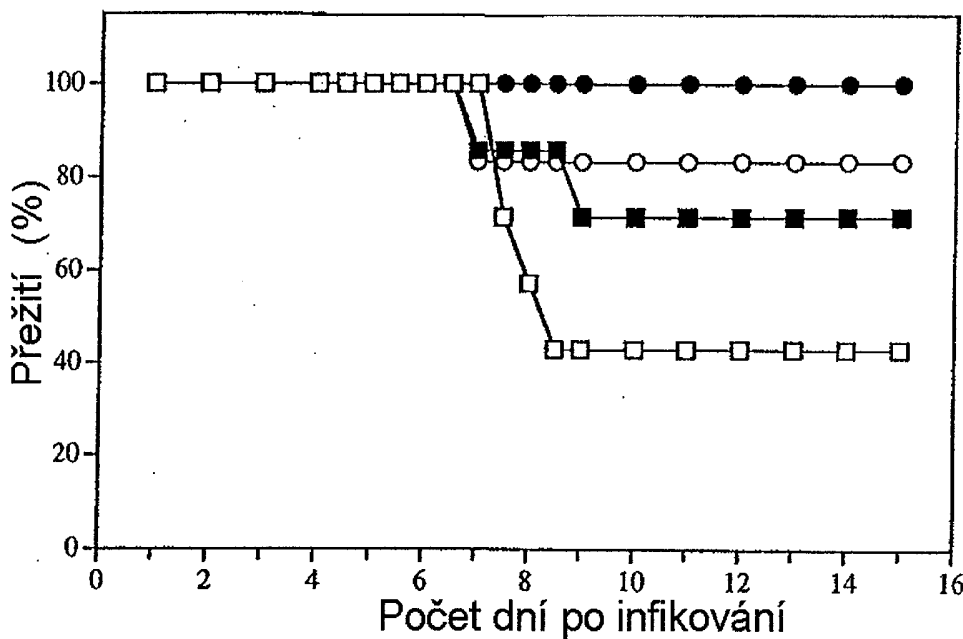
08.01.01



Legenda:

- infikované neošetřené myši
- infikované myši, ošetřené samotným poloxamerem
- infikované myši, ošetřené mastí Zovirax
- infikované myši, ošetřené poloxamerem + 5 % acycloviru

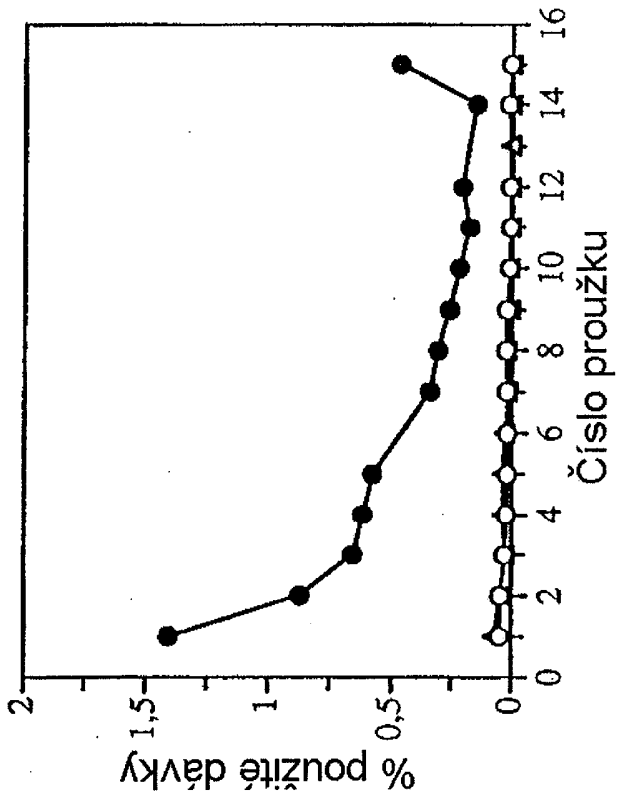
Obr. 18A



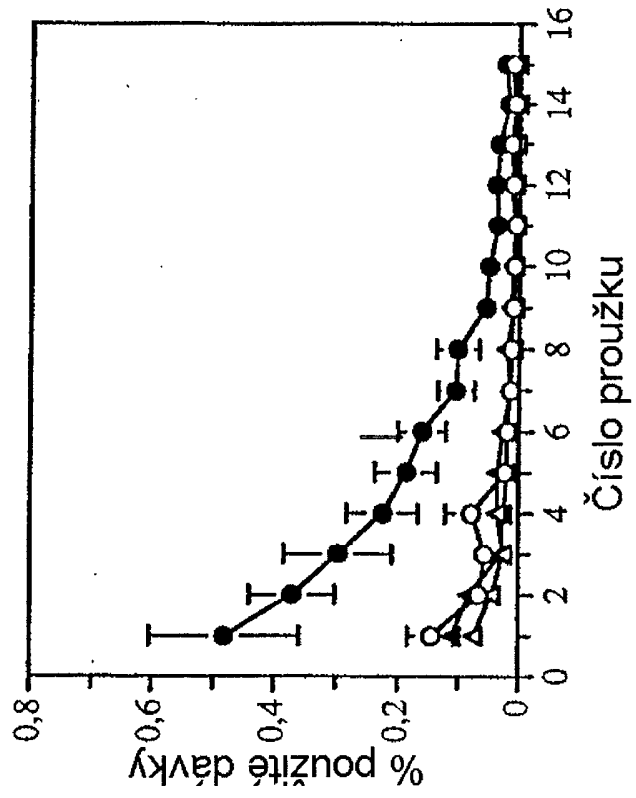
Legenda:

- infikované neošetřené myši
- infikované myši, ošetřené samotným poloxamerem
- infikované myši, ošetřené 0,5% foscarnetem
- infikované myši, ošetřené poloxamerem + 5 % foscarnetu

Obr. 18B

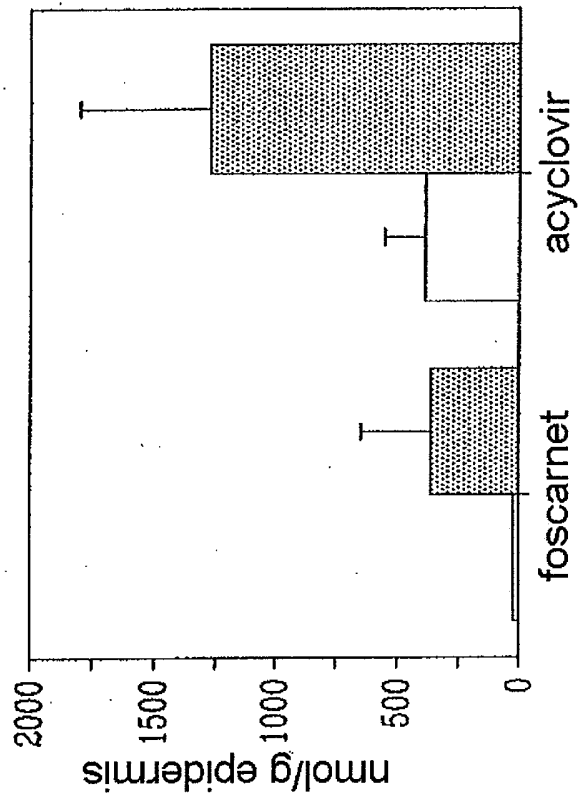


Obr. 19B

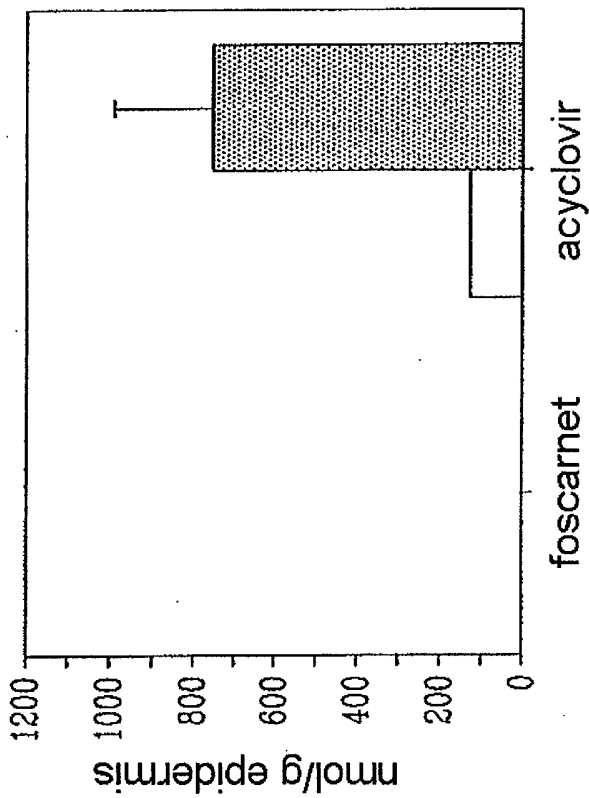


Obr. 19A

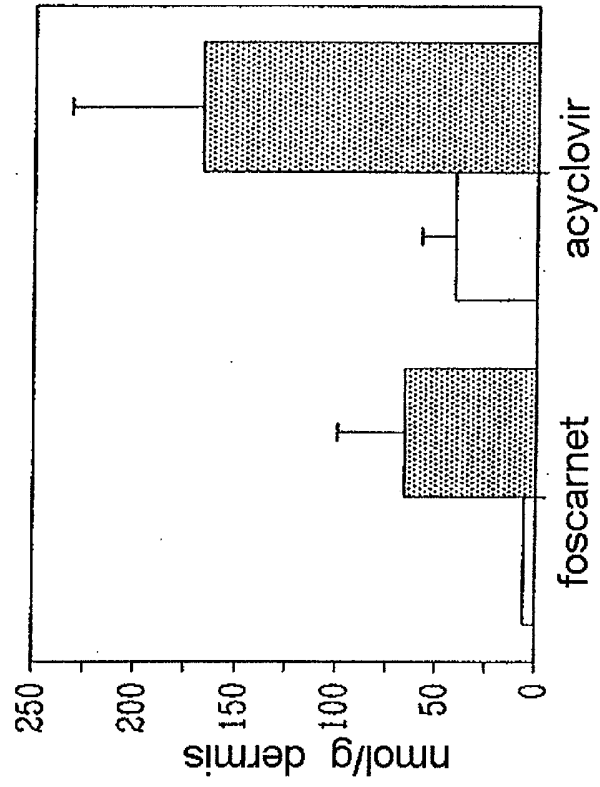
20/24



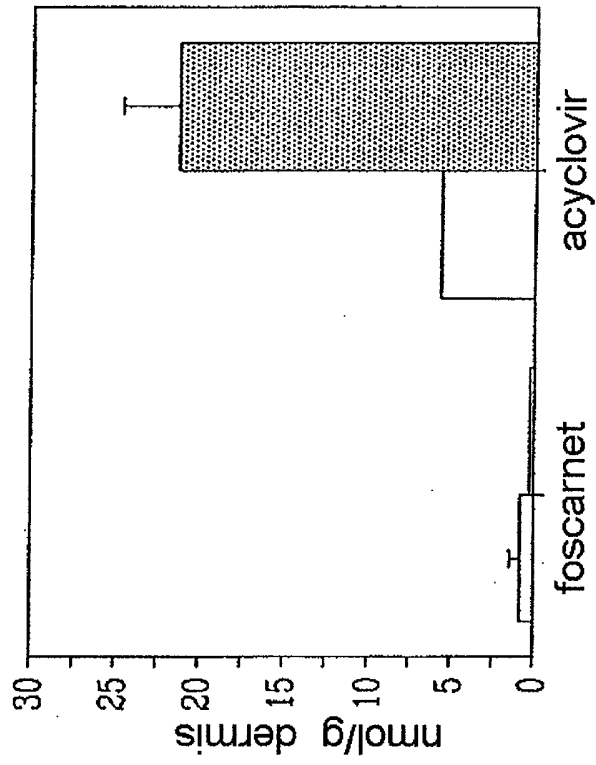
Obr. 19D



Obr. 19C

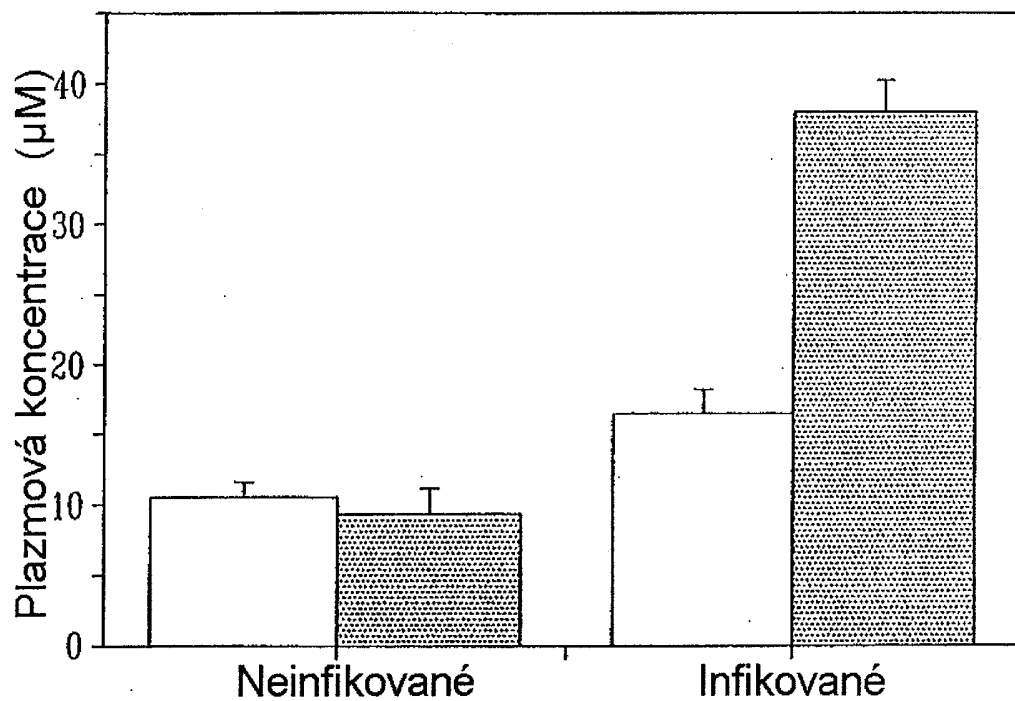


Obr. 19F



Obr. 19E

22/24



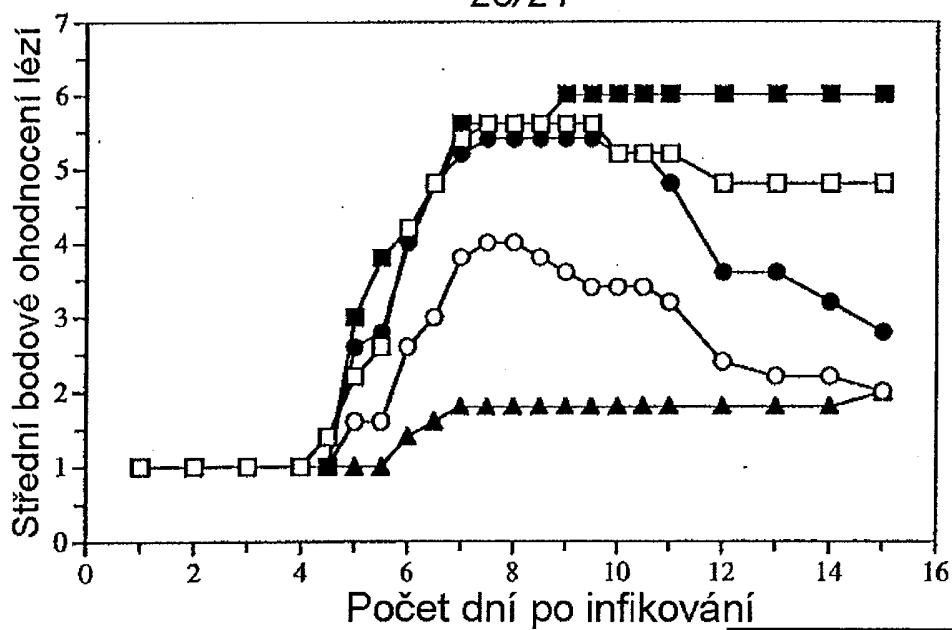
Legenda:

- plazmová koncentrace acycloviru při aplikaci v roztoku
- plazmová koncentrace acycloviru při aplikaci v poloxameru

Obr. 20

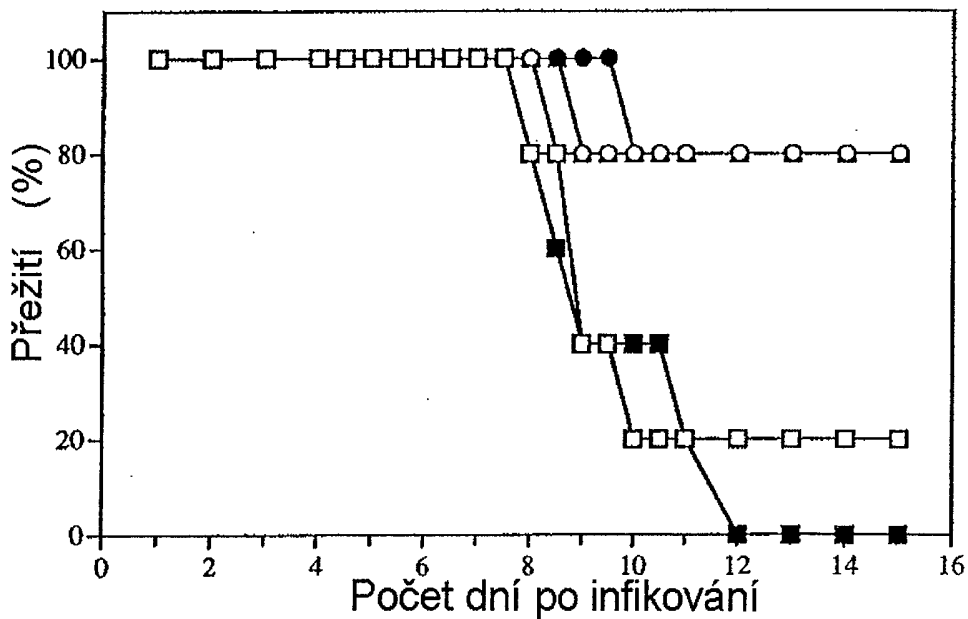
08.01.01

23/24



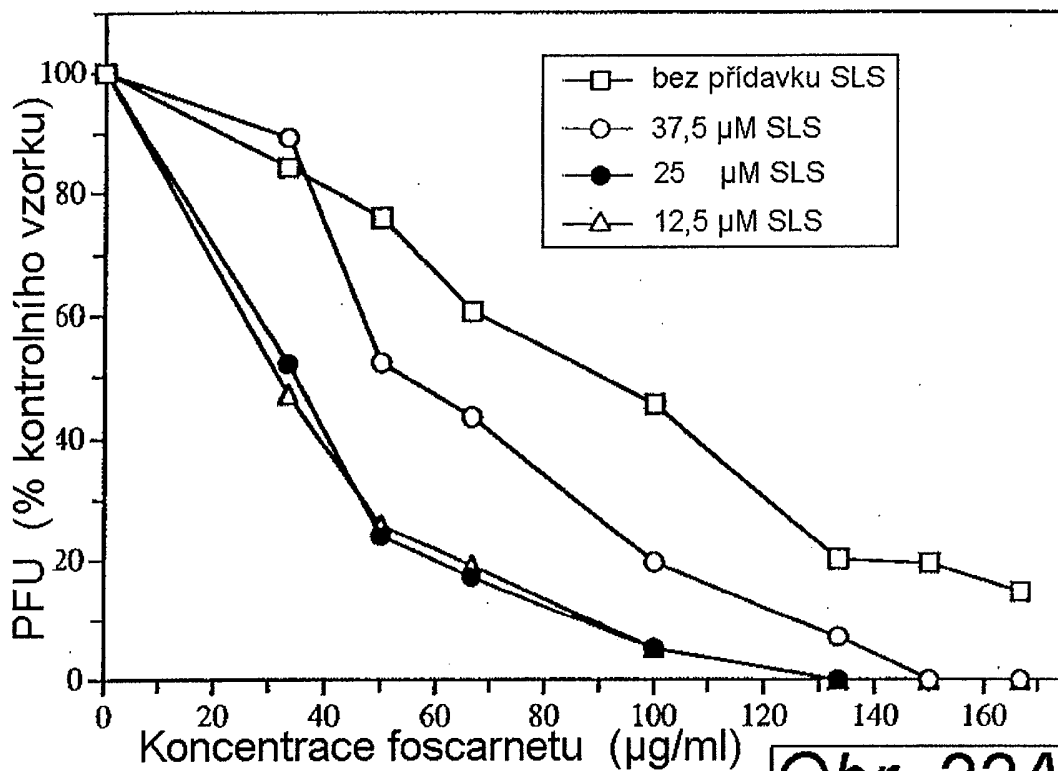
Obr. 21A

- Legenda:
- infikované neošetřené myši
 - infikované myši, ošetřené samotným poloxamerem
 - infikované myši, ošetřené poloxamerem + 3 % foscarnetu
 - infikované myši, ošetřené poloxamerem + 5 % SLS
 - △ infikované myši, ošetřené poloxamerem + 3 % foscarnetu + 5 % SLS

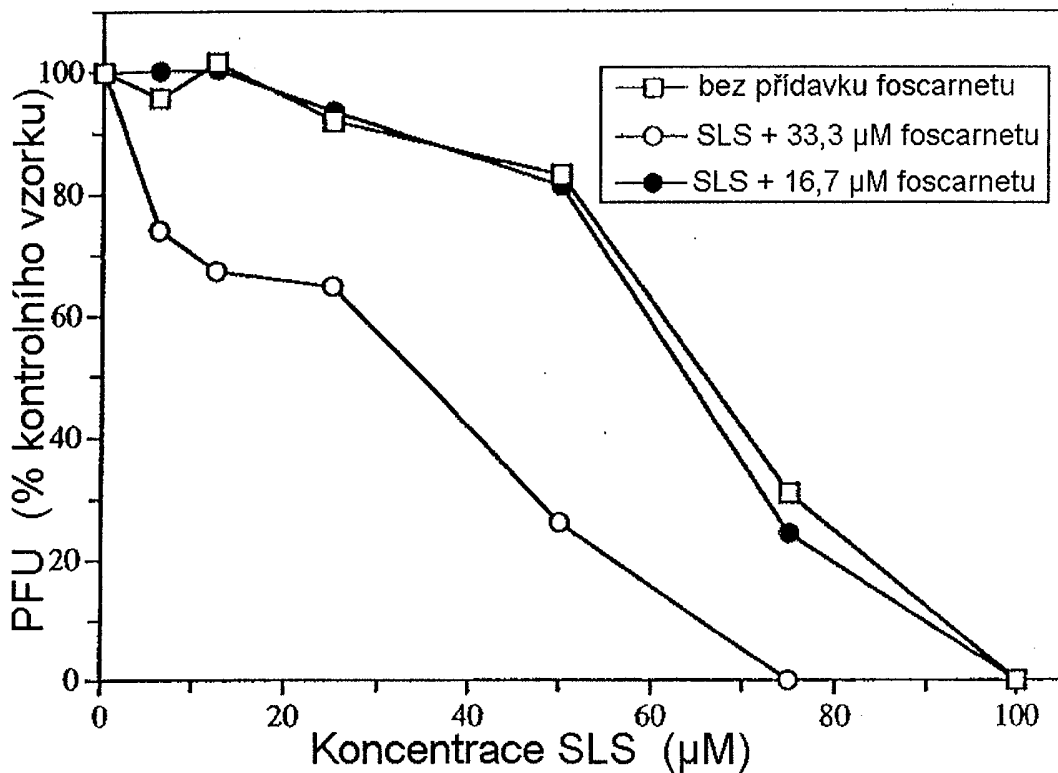


Obr. 21B

- Legenda:
- infikované neošetřené myši
 - infikované myši, ošetřené samotným poloxamerem
 - infikované myši, ošetřené poloxamerem + 3 % foscarnetu
 - infikované myši, ošetřené poloxamerem + 5 % SLS
 - △ infikované myši, ošetřené poloxamerem + 3 % foscarnetu + 5 % SLS



Obr. 22A



Obr. 22B