PATENTOVÝ SPIS

(19) ČESKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **1999-3368**
(22) Přihlášeno: **24.03.1998**
(30) Právo přednosti: **26.03.1997 US 1997/824041**
(40) Zveřejněno: **12.07.2000**
(Věstník č. 7/2000)
(47) Uděleno: **15.08.2007**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **26.09.2007**
(Věstník č. 39/2007)
(86) PCT číslo: **PCT/US1998/005792**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 1998/042188**

(11) Číslo dokumentu:
298 406
(13) Druh dokumentu: **B6**
(51) Int. Cl.:
A61K 36/28 (2006.01)
A61K 36/32 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:
US 5455033; US 4797420; DE 3521143 A1.
WAINBERG ET AL "EFFECT OF BENZALKONIUM CHLORIDE ON HIV AND RELATED INFECTIONS AND ON OTHER INFECTIOUS AGENTS", ARCH. AIDS RES,1(1),1987, P.57-68.

(73) Majitel patentu:
SQUIRES Meryl J., Barrington Hills, IL, US
(72) Původce:
Squires Meryl J., Barrington Hills, IL, US
(74) Zástupce:
PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1, Praha 4, 14000

(54) Název vynálezu:
Farmaceutický prostředek obsahující antimikrobiální prostředek pro léčbu lidské imunodeficience a dalších infekčních onemocnění

(57) Anotace:
Použití antimikrobiálního prostředku, který obsahuje inhibitory mikrobů, fytochemikálie nebo izoláty pro přípravu léčiva pro léčení virové imunitní nedostatečnosti např. pro rychlé a bezpečné řešení HIV a jiných mikrobiálních infekcí. Antimikrobiální prostředek ve výhodné formě obsahuje fytochemikálie Echinacea a Commophora myrrha, chlorid benzalkonia, sterilní vodný roztok a kyselinu listovou. Léčivo potom dále obsahuje surfaktant a vodný nosič nebo rozpouštědlo a živinu.

CZ 298406 B6

Farmaceutický prostředek obsahující antimikrobiální prostředek pro léčbu lidské imunodeficience a dalších infekčních onemocnění

Oblast techniky

Současný vynález se týká farmaceutického prostředku obsahujícího antimikrobiální prostředek pro léčbu a prevenci lidské imunodeficience a dalších infekčních onemocnění.

Dosavadní stav techniky

Je hlášeno, že v současné době je na světě 22 miliónů lidí nakažených lidským virem imunodeficience (HIV). Největší podíl nových případů HIV pochází z Afriky a Karibské oblasti. Typický zdroj HIV infekce se rozděluje do různých stadií: 1) přenos viru; 2) akutní retrovirový syndrom; 3) serokonverze; 4) klinicky němé období s nebo bez perzistentní generalizované lymfadenopatie (PGL); 5) časná symptomatická HIV infekce dříve známá jako komplex týkající se AIDS neboli ARC (AIDS–related complex) nověji označovaný jako „B příznaky" podle klasifikace CDC z roku 1993; 6) syndrom získaného defektu imunity (AIDS) (ukazatelem podmínky ADIS podle kritérií CDC z roku 1987 a upravených z roku 1993 je počet buněk CD4 < 200 / mm^3); a 7) pokročilá infekce HIV, pro kterou je typický počet buněk CD4 < 50 / mm^3. CD4 jsou mízní buňky (lymfocyty), které jsou napadány virem HIV. V roce 1993 byla změněna definice AIDS, kde tento pojem zahrnuje všechny pacienty s počtem buněk CD4 < 200/mm^3; tato definice zahrnuje všechny pacienty ve stadiích 4 až 7 bez ohledu na klinické příznaky.

Počáteční akutní retrovirový syndrom je doprovázen rychlým poklesem počtu buněk CD4, vysokou plasmatickou virémií s možností kultivací a vysokou hladinou HIV–RNA v plazmě. Objeví se klinické zotavení a vysoké hladiny virémie HIV–RNA v plazmě se snižují s rozvojem cytotoxické odpovědi T–lymfocytů (CPL). Počet buněk CD4 postupně klesá v průběhu několika let a následuje zrychlený pokles během 1,5 až 2 let před diagnózou AIDS dle definice. Koncentrace HIV RNA v plazmě jsou relativně stabilní až do doby kdy HIV dospěje k pozdnímu stadiu, kdy počet CD4 je < 200 / mm^3 a klinický průběh je charakterizován infekcemi, vybranými nádory, hubnutím a neurologickým komplikacemi. Obecně se u 10 % pacientů rozvine AIDS dle definice dříve než poklesne počet CD4 pod 200 / mm^3. Současný medián času k rozvoji komplikací AIDS po poklesu CD4 na 200 / mm^3 je 12 až 18 měsíců. Pokud chybí léčba přímo proti HIV nebo prevence PCP (Pneumocystic Carini Pneumonia), průměrný čas od přenosu viru k diagnóze AIDS dle definice je 10 let, a přežívání po vzniku komplikací AIDS bylo doposud jeden rok.

Při sledování všech případů průměrný pacient, pokud nedostává léčbu přímo proti HIV, umírá přibližně do deseti let od serokonverze. Popisuje se, že medián času od serokonverze HIV k AIDS 7 let pro příjemce transfúzí, 10 let pro hemofiliky, 10 let pro narkomany a 8 až 12 let pro homosexuální muže. Stupeň progrese onemocnění je nezávislý na pohlaví, rase, rizikové kategorii, a závisí na kvalitě péče. Pro nemocné, kteří jsou v období serokonverze ve věku 16 až 24 let byl medián času 15 let; pro ty, kteří byli ve věku nad 35 let v období serokonverze byl medián 6 let.

Infekce HIV může být získána pohlavním stykem, transfúzemi nakažené krve, u narkomanů pomocí nakažených jehel nebo přenosem při porodu. Symptomatická primární infekce HIV, také popisována jako akutní retrovirový syndrom, se udává u předchozích rizikových kategorií s četností 50 až 90 %. Tento syndrom byl také zjištěn u sedmi nebo osmi pracovníků ve zdravotnictví, kteří byli vystaveni přenosu při výkonu povolání.

Období od expozice k nástupu příznaků trvá obvykle 2 až 4 týdny, ale inkubační doba může trvat až šest týdnů. Typickými příznaky jsou: zvýšená teplota, zvětšené uzliny, zánět nosohltanu, vyrážka, která obsahuje zčervenání se skvrnkami o velikosti 5 až 10 mm na obličeji a na trupu,

někdy i na končetinách na dlaních a na chodidlech nebo slizničně kožní vřídky v ústech, jícnu nebo na genitáliích, bolesti svalů nebo kloubů, průjem, bolesti hlavy, zvětšená játra a slezina, afty, nevolnost a zvracení. Mezi neurologické příznaky patří: zánět mozkomíšních blan, periferní neuropatie, obrna lícního nervu, syndrom Guillian–Barré, zánět pažního nervu, onemocnění nervových kořenů, zhoršení poznávacích schopností, a psychózy. Akutní onemocnění je všeobecně doprovázeno vysokou hladinou virémie HIV s vysokou hladinou antigenu p24, plasmatickou virémií, a vysokými titry HIV v periferních krevních jednojaderných buňkách (monofágách).

Primární je cytotoxická odpověď T lymfocytu (CTL) a obvykle předchází měřitelnou humorální (protilátkovou) odpověď o několik týdnů. Cytotoxická odpověď T lymfocytu (CTL) je doprovázena poklesem koncentrace HIV v periferní krvi o 3 až 5 řádů. Vysoká hladina virémie během této akutní fáze onemocnění může souviset s rozšířením viru do CNS a lymfatických tkáních. Lymfatická tkáň slouží jako hlavní rezervoár pomnožování HIV. Infekce nelymfatických orgánů s vysokými hladinami HIV se začíná objevovat v pozdních stadiích HIV.

Přítomnost příznaků spíše než serokonverze bez příznaků stejně tak jako vleklé onemocnění delší než 14 dní koreluje s rychlejší progresí AIDS. K serokonverzi s pozitivní sérologií HIV všeobecně dochází po 6 až 12 týdnech po přenosu, jako např. transfuzí nebo poraněním o jehlu u pracovníků ve zdravotnictví. Medián tohoto intervalu je 63 dní. Cytotoxická odpověď T lymfocytu (CTL) je doprovázena prudkou redukcí kvantitativního virového obsahu v krvi, klinické zotavení z akutního retrovirového syndromu a návrat počtu buněk CD4 k vyšším hladinám, které se pohybují ve většině laboratořích v normálním rozmezí.

HIV pacient se stává klinicky asymptomatickým a všeobecně nemá žádný nález na fyzikálním vyšetření kromě přetrvávajícího všeobecného postižení uzlin (Persistent Generalized Lymphadenopathy – PGL), kam patří zvětšení uzlin. Studie lymfatických uzlin dokazují vysoké koncentrace HIV, který je zachycen extracelulárně na folikulárních dendritických buňkách a intracelulárně je virus převážně ve skryté formě. Lymfatická tkáň slouží jako hlavní rezervoár HIV, folikulární dendritické buňky filtrují a zachycují volný virus a nakažené buňky CD4 a virová zátěž v periferních jednojaderných buňkách (mononukleárech) je relativně nízká. S pokročilým onemocněním dochází v důsledku HIV k poškození uspořádání lymfatické uzliny.

Virologické studie pacientů s bezpříznakovou infekcí HIV ukazují vysoký stupeň pomnožování HIV s denní produkcí o průměru 10^9 virionů. Pomnožování viru je doprovázeno masivním ničením a produkcí 10^9 CD4 buněk denně. Obměna CD4 buněk představuje 6 až 7 % celkových CD4 buněk těla, takže veškerá zásoba se obnoví každých 15 dní. AIDS se pokládá za následek neustálého vysokého stupně pomnožování HIV–1, které vedou k virovému a imunitně zprostředkovanému zničení CD4 lymfocytů.

Pokročilá HIV infekce se objevuje u pacientů s počtem buněk CD4 < 50 /mm^3. U těchto pacientů se předpokládá zkrácené přežívání s mediánem přežití 12 až 18 měsíců. Ve skutečnosti u všech pacientů, kteří zemřou na komplikace související s HIV je počet CD4 buněk na této hodnotě. Ve skutečnosti u všech nemocných, kteří zemřeli na komplikace HIV byl počet CD4 buněk na těchto hodnotách.

Úřad pro potraviny a léky (Food & Druh Administration – FDA) povolil mnoho inhibitorů reverzní transkriptázy (RT). RT enzymy přeměňují virovou RNA na DNA. Inhibitory RT dokážou přerušit tento proces. Inhibitor RT AZT od firmy Glaxo Wellcome povolil FDA v roce 1987 a prodává se pod obchodní značkou Retrovir a zivodudin. Inhibitor RT ddI, který se prodává pod obchodním jménem Videx a didanosin od firmy Bristol–Myers Squibb, FDA povolil v roce 1991. Inhibitor RT ddC, který se prodává pod obchodním jménem HIVID a dideoxycytidin od firmy Hoffman–LaRoche, FDA povolil v roce 1992. Inhibitor RT d4T, který se prodává pod obchodním jménem Zerit a stavudin od firmy Bristol–Myers Squibb, FDA povolil v roce 1994. Inhibitor RT 3TC, který se prodává pod obchodním jménem Epivir a lamivundin od firmy Glaxo Wellco-

me, který FDA povolil v roce 1995. Inhibitor RT Nevirapin, který se prodává pod obchodním jménem Viramune od firmy Boehringer Ingelheim, FDA povolil v roce 1996.

Úřad pro potraviny a léky (Food & Drug Administration – FDA) nyní povolil tři inhibitory proteázy k léčbě infekce lidským virem imunodeficience HIV. Saquinavir, který se prodává pod obchodním jménem Invirase od firmy Hoffman–LaRoche Laboratories, byla první látka inhibující proteázu, kterou FDA povolil. Ritonavir, další inhibitor proteázy, který se prodává pod obchodním jménem Norvir od firmy Abbott Laboratories, získal povolení FDA v březnu 1996, stejně tak, jako Indinavir, který se prodává pod obchodním jménem Crixivan od firmy Merck & Co.

Inhibitory proteázy účinkují různými mechanizmy na rozdíl od léků, které se dříve používaly jako léky proti HIV, jako jsou například analogy nukleosidů AZT a 3TC, které se prodávají pod obchodními jmény zidovudin a lamivundin od firmy Glaxo Wellcome, ddl a d4T, které se prodávají pod obchodním jménem didanosin a stavudin od firmy Bristol–Myers Squibb, a ddC, který se prodává obchodním jménem dideoxycytidin od firmy Roche Laboratories. Inhibitory proteázy blokují enzym, který HIV potřebuje k dokončení replikačního cyklu a produkci životaschopných virů. Bez enzymu proteázy se správně nevytvoří strukturální bílkoviny a vytvoří se chybný neinfekční virus. Analogy nukleosidů blokují různé enzymové reverzní transkriptázy. Tento děj může zabránit virové RNA, aby vytvářela virovou DNA, která by potom byla začleněna do DNA lidských buněk. O kombinaci jednoho nebo více inhibitorů reverzní transkriptázy a inhibitoru proteázy, někdy označované jako „koktejl", se tvrdí, že napadají replikaci HIV ve dvou bodech replikačního cyklu. Klinické pokusy, které kombinují saquinavir s AZT, ddC nebo oběmi, vykazují větší pokles v počtu částic HIV v krvi, někdy označovaných jako virová zátěž a větší vzestup buněk CD4 (T lymfocytů), než bylo dříve pozorováno u samotných inhibitorů reverzní transkriptázy. Koktejly bývají někdy pro některé pacienty toxické a neúčinné. Klinické výhody z pohledu zlepšení přežívání nebo zmírnění progrese onemocnění však nebyly pro kombinaci (koktejly) inhibitorů RT s inhibitory proteázy plně prokázány. Nicméně již lékaři začínají považovat HIV za chronické zvládnutelné onemocnění než rozsudek smrti.

Saquinavirové inhibitory proteázy povolil FDA pro použití v kombinaci s inhibitory reverzní transkriptázy u pacientů s pokročilým aIDS. Saquinavirové inhibitory proteázy bývají tolerovány některými nemocnými bez hematologických a neurologických toxicit v porovnání s analogy nukleosidů. Určité léky na lékařský předpis, mezi které patří rifampin, rifabutin, fenobarbital, dilantin a dexametazon, mohou významně snižovat plasmatické hladiny saquinavirových inhibitorů proteázy a neměly by se používat u nemocných, kteří užívají saquinavir. Byla popsána virová rezistence na saquinavirové inhibitory proteázy, stejně tak, jako i na další léky proti HIV.

Inhibitory proteázy ritonavir a indinavir se jeví být účinnější proti HIV než saquinovir. Rinonavirové inhibitory proteázy vyžadují chlazení. Rinonavirové inhibitory proteázy se v současné době používají v kombinaci s analogy nukleosidů (léky jako je AZT) nebo se používají v monoterapii. Ve dřívější studii bylo léčeno 32 nemocných pomocí ritonaviru s AZT a s ddC. Po 20 týdnech medián počtu CD4 buněk vzrostl ze základní hodnoty 83 buněk / mm^3 na hodnotu 106 buněk / mm^3. Virová zátěž, měřená jako počet virových kopií v krvi, se snížila 100–krát. Ritonavir se podíval v dávce 600 mg ústy dvakrát denně, což znamená 12 kapslí denně. Lék je k dispozici v kapslích po 100 mg. Vedlejší účinky jsou dosti běžné a zahrnují: gastrointestinální příznaky s nevolností, zvracením a průjmem. Mezi další vedlejší účinky patří snížená citlivost a brnění, zvláště okolo úst a zánět jater, který je druhem hepatitidy.

Indinavirové inhibitory proteázy získaly zrychlené povolení FDA na základě studií, které dokazují průměrný vzestup počtu CD4 100 buněk / mm^3 a 100–násobný pokles virové zátěže při kombinaci AZT s 3TC a indinavirem. Indinavir se podával v dávce 800 mg ústy třikrát denně, (2 kapsle třikrát denně). Na rozdíl od ritonaviru indinavir se může podávat při prázdném žaludku pro zlepšení vstřebávání. Indinavir způsobuje méně gastrointestinálních vedlejších účinků než ritonavir a zdá se, že je některými nemocnými obecně lépe tolerován. Hlavním vedlejším účin-

kem indinavirových inhibitorů proteázy je vznik ledvinných kamenů. Lék je vylučován částečně močí, může krystalizovat a vytvářet kameny, pokud není zajištěna adekvátní hydratace. Indinavirové inhibitory proteázy mohou také poškodit játra, způsobí vzestup hladin bilirubinu v krvi, tzn. žlučového barviva, které vzniká po rozpadu červených krvinek. Indinavirové inhibitory proteázy mohou také způsobit lékové interakce.

Zatím není dokončen rozbor rezistence na inhibitory proteázy. Saquinavirové a ritonavirové inhibitory proteázy stojí v současné době jednoho nemocného v USA 600 dolarů na měsíc. Ceny za indinavirové inhibitory proteázy jsou o 30 % nižší. Kombinace tří léků AZT s 3TC a ritonavirových inhibitorů proteázy stojí nemocného v USA přes 1000 dolarů / měsíc. Ceny kombinací (koktejly) inhibitorů RT a inhibitorů proteázy mohou dosahovat až 25 000 dolarů za rok. Ačkoliv inhibitory proteázy jsou prospěšné, lékařská veřejnost a společnost doposud nevyřešila finanční problémy s těmito drahými léky.

Herpes simplex virus (HSV), který se běžně označuje jako „herpes virus“ nebo „herpes“, je infekční onemocnění, které rovněž tvoří celostátně významný podíl. Odhaduje se počet 70 až 80 % infikovaných nemocných v naší populaci, jak bylo oznámeno americkou zdravotnickou společností (American Societal Health Association – ASHA). Tento počet roste ročně o 500 000 lidí. Existují dva běžné typy herpes virů: herpes simplex virus 1 (HSV 1) a herpes simplex virus 2 (HSV 2). Herpes proniká do lidského těla přes drobná poranění pokožky obvykle po kontaktu s infikovaným člověkem a vyznačuje se výsevem jednoho nebo více puchýřků, obvykle ve skupinách, po uplynutí inkubační doby, která je přibližně čtyři dni. Typicky probíhá onemocnění, tak, že začíná prodromálním stadiem; pokračuje výsevem puchýřků; následuje vznik vřídků; jejich splývání; vymizení a latentní období. Vypuknutí může trvat několik týdnů a průměrné trvá dva až tři týdny. U některých jedinců s oslabenou obranyschopností může vzplanutí trvat několik měsíců. Puchýřky se mohou objevit kdekoliv na kůži nebo na sliznicích, jako opar na rtech, žlázách, sliznici dutiny ústní, spojivce a rohovce, na genitáliích, na sliznici konečníku a ve tkáni kolem konečníku.

Mezi herpetické příznaky patří: otok třísel, horečka, malátnost, bolesti hlavy, bolesti svalů, a oteklé žlázy. Někteří jedinci, kteří mají trojklanný nerv postižený tímto virem, mají kruté bolesti na tváři, obtížně polykají, jedí a mají tvář oteklou. Jedinci, kteří mají postižený kostrční nerv, trpí velkými bolestmi horní části stehen, otokem a mají potíže s chůzí.

Infekce virem herpes simplex může probíhat opakovaně, udržuje se v nervových gangliích a opakovaně se objevuje jako důsledek nějakých doposud neznámých podnětů. Opakované herpetické infekce mohou být vyvolány téměř čímkoliv, a patří mezi ně: přílišné slunění; chyby ve výživě; stres; menstruace; imunosuprese; určité potraviny; léky; horečnatá onemocnění, atd. V poslední době byl herpetický virus izolován ze srdeční tkáně.

Infekce viry HSV1 a HSV 2 velmi vážně ohrožují zdravotní stav, často způsobují: slepotu; zvýšené riziko vzniku zhoubného nádoru děložního čípku; aseptický zánět mozkových blan a mozku; úmrtí novorozenců; virémie; atd. Toto onemocnění se vyznačuje devastujícími účinky a přesahují hranice lidského utrpení. Infekce HSV způsobují vážné psychologická a emocionální potíže stejně tak jako způsobují podstatné ekonomické ztráty pro lidstvo a pro svět.

Byly navrženy různé druhy léčby pro herpetické infekce a patří mezi ně místní aplikace takových látek jako je povodon–jod, idoxirudin, trifluorthymidin nebo acyklovir. Tyto druhy léčby dosáhly různé stupně úspěšnosti. Většina předchozích druhů léčby zklamala. Acyklovir, který se podává ústy k celkové léčbě HSV infekce, je dosti účinný. Nicméně, acyklovir je jediný úspěšný lék, který dokáže zastavit replikaci viru. Není účinný v léčbě infekčního onemocnění, které již propuklo ani systémově ani místně. Jsou již popsány kmeny, které jsou rezistentní na acyklovir. Jedinci se syndromem získaného defektu imunity (AIDS) mají silně narušenou imunitu trpí zvláště oslabujícími atakami HSV. Navíc jedinci s AIDS jsou nosiči kmenů rezistentních na acyklovir, což znamená, že je u těchto jedinců acyklovir neúčinný.

Je tedy žádoucí vyvinout bezpečnou a úspěšnou léčbu, aby bylo umožnění léčit a předcházet velmi závažným komplikacím HIV a dalších infekčních onemocnění.

Podstata vynálezu

Vynález se týká použití antimikrobiálního prostředku obsahujícího v hmotnostních procentech

- 40 až 60 % fytochemického koncentrátu bylinných botanikálií obsahující Commiphora myrrha a Echinacea purpurea, přičemž tento fytochemický koncentrát poskytuje antimikrobiální izoláty;
- 20 až 60 % sterilní vody, která poskytuje rozpouštědlo a nosič pro uvedený fytochemický koncentrát;
- 0,02 % až 0,3 % amoniové povrchově aktivní látky obsahující benzalkonium chlorid;
- 2 % až 12 % listové kyseliny poskytující živinu;

kde antimikrobiální izoláty z uvedeného fytochemického koncentrátu obsahují v hmotnostních procentech vztaženo na celkovou hmotnost léčivého prostředku:

- 0,3 až 9 % echinolinu,
- 0,1 až 7 % PS 1, kterým je 4–O–methylglukoronoarabinoxylan s rel. molekulovou hmotností 35 kDa a PS 2, kterým je ramnoarabinogalaktanová kyselina s rel. molekulovou hmotností 450 kDa);
- 0,1 až 10 % cynarinu (1,5–di–o–kafeoylchinolinové kyseliny) a chiorové kyseliny (2,3kafeoylvinné kyseliny) a jejích derivátů;
- 0,2 až 4 % echinolonu;
- 0,2 až 8 % echinacinu B;
- 0,1 až 6 % echinacinu;
- 2 % až 7 % antonokyaninů obsahujících kyanidin 3–O–B–D–glukopyranosid a 3–O–(6–O–malonyl)–B–D–glukopyranosid;
- 0,01 až 0,06 % pyrrolizidinových alkaloidů obsahující tusilagin a isotusilagin;
- 0,003 až 0,009 izomerních dodeka–izobutylamidů a tetroenové kyseliny; a kde fytochemické látky z Commiphora myrrha obsahují členy vybrané ze skupiny skládající se z karyofylenů, seskviterpenů, kurzerenonu, dihydrofhanodien–6–onu, 2–methoxyfuradinu, elemolu, lyndesterenu, kyseliny octové, α–amyronu, arabinos, α–bisabolenu, γ–bisabolenu, kadinenu, kampesterolu, cholesterolu, skořicového aldehydu, komiferinu, α–komiforové kyseliny, β–komiforové kyseliny, γ–komiforové kyseliny, komiforinové kyseliny, m–kresolu, kumylalkoholu, kuminaldehydu, dipentenu, elemolu, 3–epi–α–amyrinu, eugenolu, furandienu, furandienonu, galaktózy, rostlinné gumy, herabolenu, α–herabomyrolu, β–herabomyrolu, heraboresenu, limonenu, 4–(O–methyl–glukuronové kyseliny, n–nonakesanu, p–sitolsterolu, xylózy, pro výrobu léčiva pro léčení virové imunitní nedostatečnosti.

Vynález se tedy týká použití antimikrobiálního prostředku pro výrobu léčiva pro zdokonalenou lékařskou péči a medikamentózní léčbu, které pokud je podáváno systémově, brání připojení lidského viru imunodeficience (lidský virus imunodeficience) (HIV) k cílovým buňkám a tím zabrání rozšíření HIV. Použití nového léčiva je prospěšné k prevenci sexuálního přenosu HIV a dalších virů. Zdokonalená lékařská péče a medikamentózní léčba je významně bezpečnější, levnější a účinnější.

Zdokonalená léčba, také označována jako Viracea 2 HIV–4, obsahuje léčivou sloučeninu, formulaci, antimikrobiální látku a roztok. Nová antimikrobiální léčba a mikrobicidní léky jsou úspěšné v systémové primární léčbě HIV infekce a mohou se používat při léčbě jiných mikrobiálních infekcí, včetně následujících, bez omezení: virus varicella zoster (herpes zoster), a cytomegalovirus. Za některých okolností může být žádoucí podávat nový lék lokálně.

Zatímco nový lék a antimikrobiální látka jsou zvláště užitečné v překvapivé inhibici infekce lidským virem imunodeficience (HIV), může se použít i k léčbě jiných mikrobiálních infekcí (onemocnění vyvolaných mikroby) jako např. Epstein–Barr, papilloma virus, celulitida, stafylokok, streptokok, mykobakterie, chřipka, virové onemocnění podobné chřipce, adenoviry, zánět mozku, zánět mozkových blan, arbovirus, arenavirus, anaerobní bacily, varicella zoster virus a cytomegalovirus.

Zatímco léčba a lék je zvláště užitečný k inhibici HIV a dalších infekčních onemocnění u lidí (lidských jedinců) (homo sapiens), mohou se také použít pro veterinární účely k léčbě virových a bakteriálních infekcí a infekčních onemocnění u zvířat, jako jsou např.: psi, kočky, ptáci, koně, krávy, ovce, prasata, a jiná zemědělská zvířata, stejně tak jako i hlodavci a další zvířata, která jsou v zoologických zahradách.

Zdokonalená lékařská péče a medikamentózní léčba tohoto vynálezu přináší s výhodou překvapivě neočekávané dobré výsledky. Tento mikrobicidní roztok k jednoduchému použití zajišťuje okamžité vstřebání při parenterálním podání. Při podávání může dojít ke slabému mravenčení. Během několika minutového podávání se může vyskytnout pachuť v ústech. Testování nové léčby a léku ve zkumavce na počátku ukazovalo velmi překvapivý inhibiční účinek na HIV virus. Je žádoucí, aby byl nový lék vyráběn z hotových dostupných chemikálií (OTC) nebo výrobků a aby zajišťoval bezpečnou, pohodlnou a ekonomickou léčbu.

Je žádoucí, aby nový lék (léčivá sloučenina) obsahoval inhibitory mikrobů, které inhibují, potlačují a zastavují mikrobiální infekce. Inhibitory mikrobů obsahují antimikrobiální výtažky, rostlinné výtažky nebo fytochemikálie, nebo alespoň podíl jedné nebo více speciálních rostlin, které jsou uvedeny níže. Inhibitory mikrobů mohou obsahovat inhibitory virů k inhibici virových onemocnění, jako je např.: HIV, herpes simplex 1 virus (HSV 1), herpes simplex 2 virus (HSV 2), varicella zoster virus (herpes zoster), cytomegalovirus, virus Epstein–Barr, papilloma virus, virová chřipka, virové onemocnění podobné chřipce, adenovirus, virový zánět mozku, virový zánět mozkových blan, arbovirus, arenavirus, pikornavirus, koronavirus a syncitiální virus. Inhibitory mikrobů mohou obsahovat inhibitory baktérií k inhibici bakteriálních onemocnění, jako je např.: celulitida, stafylokoky, streptokoky, mykobakterie, bakteriální zánět mozku, bakteriální zánět mozkových blan a anaerobní bacily. Za některých okolností mohou inhibitory mikrobů obsahovat inhibitory plísní.

Lepších výsledků se dosáhne, pokud se Echinacea a Commophora (také označované jako Cimmiphora) nebo jiné rostliny nepoužívají v léčivu v syrovém neupraveném a nepokrájeném stavu. Pro ještě lepší výsledky se v léčivu nepoužívá: arabinóza, betain, celulóza, měď, fruktóza, mastné kyseliny, galaktóza, glukóza, železo, draslík, bílkovina, pryskyřice, sacharóza, a xylóza.

Zdokonalená léčba poskytuje nový způsob a postup používaný k léčbě výše zmíněných infekčních onemocnění. U některých infekčních onemocnění se inhibitory mikrobů aplikují a ponechávají na mikrobem infikovaném místě (oblasti nebo povrchu) dokud nevymizí zevní příznaky

a fyzikální projevy infikované oblasti. Léčivo se může podávat injekcí stříkačkou, pod jazyk, ve formě aerosolu, nanášením, rozprášením, potíráním štětičkou, houbou, kartáčkem, poléváním, dávkováním, překrytím a nebo silným nanesením na místa infikovaná mikrobem, jako jsou např. lymfatické uzliny, lymfatický systém, T–buňky, sliznice dutiny ústní, sliznice dutiny nosní, poševní tkáň, tkáň pysků, tkáň kolem konečníku, rty, kůže, tkáň oka, spojivka a oční víčka.

Výhodněji se inhibitory mikrobů nebo antimikrobiální látky podávají systémově pomocí stříkačky do konečníku nebo do pochvy k léčbě nebo prevenci sexuálního přenosu HIV infekce. Inhibitory mikrobů nebo antimikrobiální látky se podávají předešlým způsobem 4 až 20 krát denně po dobu 4 až 18 po sobě jdoucích dní tak, aby došlo k podstatnému snížení virové zátěže u pacientů, kteří jsou nakaženi virem HIV, tzn. ke snížení množství viru HIV a AIDS v těle.

Výhodněji je zdokonalené léčivo, léčivá sloučenina nebo mikrobiální látka fytochemický koncentrát, který se při podávání kombinuje současně nebo následně se surfaktantem, živinou a nosičem, nebo rozpouštědlem nebo diluentem. Tím se získá mikrobicidní léčivý roztok. Živina slouží jako katalyzátor, aktivátor, fytochemický iniciátor, výživná náhražka a pomocný nosič. Živina může obsahovat jednu nebo více následujících látek: vitamín rozpustný ve vodě, vitamín rozpustný v tucích, vitamin A, komplex vitamínů skupiny B, (B vitamínový komplex), vitamin D, vitamin E, vitamin K, vitamin B1, vitamin B2, vitamin B5, vitamin B6, vitamin B12, vitamin B15 a s výhodou kyselinu listovou.

Doposud zajímavý mikrobicidní roztok obsahuje antimikrobiální detergentní surfaktant s rostlinnými výtažky. Surfaktanty jsou nejlépe kladně nabité surfaktanty, které mohou obsahovat jednoduché nebo kvartérní chloridy amonné, které obsahují 6 až 18 atomů uhlíku, jako je např. chlorid alkylbenzyldimethylamonný, směsi chloridu alkylbenzyldimethylamonného, chloridu alkyldimethyl/ethylbenzylamonného, chloridu n–alkyldimethylbenzylamonného, chloridu diizobuthylfenoxyethoxyethyldimethylbenzylamonného, chloridu N–($C_{12}H_{14}C_{16}$)–dimethylbenzylamonného, chloridu benzalkonia, chloridu oktyldecyldimethylamonného, chloridu didecyldimethylamonného, chloridu dioktyldimethylamonného, chloridu dialkyldimethylamonného, chloridu dialkylmethylbenzylamonného, chloridu oktyldecyldimethylamonného, chloridu dimethylbenzylamonného, chloridu lauryldimethylbenzylamonného, o–benzyl–p–chlorfenolu, chloridu didecyldimethylamonného, chloridu dioktyldimethylamonného, chloridu alkyl–($C_{12}C_{14}C_{16}$)–dimethylbenzylamonného a s výhodou obsahují chlorid alkylbenzyldimethylamonný a nejvýhodněji chlorid benzalkonia. Rozsah aktivity kladně nabitého surfaktantu je 5 až 90 %, ale nejlepší výsledky jsou od 8 až do 20 %. Kvartérní amonné soli jsou komerčně k dispozici již hotové. Za určitých okolností může být užitečné používání dalších surfaktantů, jako je např., ale bez omezení: DMSO, surfaktanty, kyseliny glykolové, enzymové surfaktanty, amfolytické surfaktanty, zwitterické surfaktanty a neionogenní surfaktanty. Surfaktanty mohou obsahovat detergenty, zvlhčující látky, emulgátory, odpěňovače a/nebo přídatné látky snižující povrchové napětí.

Nosiče jsou užitečné pro smísení jednotlivých složek, udržování složek v roztoku a k zajištění jednoduchého způsobu aplikace na postižené místo buď aerosolem, kapátkem, nebo aplikátorem. Zatímco se s lepšími výsledky používá vodný roztok, s výhodou sterilní vodný nosič nebo rozpouštědlo, za jistých okolností může být žádoucí použít jiné tekuté nebo pevné nosiče, jako je např.: glycerin, minerální olej, oxid křemičitý, olej z bavlněných semínek, kokosový olej, zeleninový olej, jádrový olej, rybí olej nebo zvířecí olej, alkohol, talek, kukuřičná moučka, včelí vosk, karnaubský vosk, beta karoten, česnekový olej, kafrový olej, rozpustné vitaminy, rozpustné minerály, olej řepky olejné, ořechový olej, olivový olej, lipozómy, kyselina askorbová, olej pupalky dvouleté, pyknogel, olej ze semen vinné révy, lanolin, ethocyn, kolagen, aloe vera, včelí pyl, mateří kašička, chondroitin sulfát A, mořské rostliny, EDTA, mastné kyseliny, byliny lecitin, bioflavonidy, obilný olej nebo prášek, řasy, čaje, octy, acidofily, buněčné soli, kyseliny askorbové, hydra 5, žlázy, aminokyseliny, psyllium, rostlinné deriváty nebo jiné sterilní nosiče.

Antimikrobiální izoláty rostlinných extraktů nebo fytochemikálie, které jsou obsaženy v tomto novém léčivu a používají se k léčbě, mohou obsahovat lepkavé pryskyřice myrhy, seskviterpeny,

kurzenon, dihydrofuranodien–6–on, 2–methoxyfurandien, elemol, kyselinu octovou, alfa–amyron, arabinózu, alfa–bisabolen, gama–bisabolen, kadinen, kampesterol, cholesterol, cinamaldehyd, komiferin, kyselinu alfa–komiforovou, kyselinu beta–komiforovou, kyselina gama–komiforovou, kyselinu komiforovou, m–kresol, kumin alkohol, kumin aldehyd, dipenten, elemol, 3–epi–alfa–amyrin, eugenol, furanodien, furanodienon, galaktózu, klovatinu, herabolen, alfa–herabomyrhol, beta–herabomyrhol, heraboresen, limonen, kyselinu 4–0–methylglukuronovou, n–nonacesan, beta–sitoserol, xylózu, karofyleny, lindestyren, arabinózu, betain, měď, echinacen, chinacin B, echinakosid, echinolon, enzymy, fruktózu, mastné kyseliny, galaktózu, glukózu, kyselinu glukuronovou, inulin, inuloid, železo, pentadekadien, polyacetylenové látky; polysacharidy jako je např. bez omezení: arabinogalaktan; draslík, bílkovinu, pryskyřice, ramnózu, sacharózu, síru, taniny, vitaminy A, C, a E, alkylamidy, apigenin, arabinogalaktu, kyselinu askorbovou, kyselinu behenovou, kyselinu octovou, betain, borneol, bornylacetát, kyselinu kávovou, kyselinu 2–0–kafeoyl–3–(5–alfakarboxybeta) 3, 4 dihydroxyfenylovou, kyselinu 2–0–kafeoyl–3–0–kumaroyltaraovou, 6–0–kafeoylechinakosid, kyselinu 2–0–kaffeoyl–3–0–feruloyltartarovou, kyselinu 2–0–kafeoyltartarovou, vápník, uhličitan, beta karoten, karofylen, karofylenepoxid, chlorid, kyselinu chlornou, kyselinu cikorovou, methylester kyseliny cikorové, kobalt, kyanadin–3–0–(beta–d–glykopyranosid, cynadin–3–(6–0–malonyl–beta–d–glykopyranosid), cynarin, izobutylamid kyseliny deka–(2e,4e,6e)–trienové, des–ramnosylverbaskosid, kyselinu 3,5–dikafeoylkvinnou, kyselinu 4–5–0–dikafeoylkvinnou, kyselinu 2–3–0–diferulotartarovou, izobutylamid kyseliny dodeka–(2e,4e)–dienové, dodeka–2,4–dien–1–yl izovalerát, izobutylamid kyseliny dodeka–(2e,6z,8e,10e)–tetraenové, epizobunol, beta–fernezen, kyselinu 2–0–ferulotartarovou, germakren, heptadeka–(8z,11z)–dien–2–on, heteroxylan, humulen 8–12,(e)–10–hydroxy–4,10–dimethyl 4,11–dodekadien–2–on, kyselinu 13–hydroxyoktadeka–(9z,11e,15z)–trienovou, inulin, železo, kyselinu izochlorovou, izohamnetin–3–rutinosid, izotusilagin, kampferol, kampferol–3–glukózid, kampferol–3–rutinosid, limonen, luteolin, luteolin–7–glukózid, hořčík, mangan, 2–methyltetradeka–5,12–dien, 2–methyltetradeka–6,12–dien, methyl–p–hydroxycinamát, marcen, niacin, kyselinu palmitovou, pentadeka–(8z,11z)–dien–2–on, pentadeka–(8z,11z)–dien–11–lyn–2–on, pentadeka–(8z,13z)–dien–11–lyn–2–on, pentadeka–8en–2–on, pentadeka–(8z)–en–2–on, pentadeka–(8z)–en–11,13 dien–2–on, 1–pentadecen, penta–(1,8z)–dien, fosfor, alfa–pinen, beta–pinen, polyacetyleny, pontika epoxid, draslík, protein, kvercetagetin–7–glukózid, kvercetin, kvercetin–3–galaktózid, kvercetin–3–glukózid, kvercetin–3–robinosid, kvercetin–3–xylózid, kvercetin–3–xylózylgalaktózid, ramnoarabinogalaktan, riboflavin, rutin, rutosid, selen, silikát, beta–sitosterol, sitosterol–3–beta o–glukózid, sodík, stigmasterol, sulfát, kyselinu tartarovou, tetradeka–(8z)–en–11,13 dien–2–on, tiamin, n–triakontanol, trideka–1–en–3,5,7,9,10–pentayn, tussilagin, vanallin, verbaskosid. Lepších výsledků se dosahuje s koncentráty fytochemikálií, které obsahují výše zmíněné fytochemikálie, kromě arabinózy, betainu, celulózy, mědi, fruktózy, mastných kyselin, galaktózy, glukózy, železa, draslíku, proteinu, pryskyřice, sacharózy a xylózy.

Rostlinné výtažky, antimikrobiální izoláty a fytochemikálie se oddělují, extrahují a izolují z částí rostlin, jako je např.: pimpinella anisum, myroxylon, arctostaphylos, carum, capsicum, eugenia mytacea, koriandr, inula, allium, gentiana, juniperus, calendula, origanum, mentha labiate, commiphora, plantago, rosmarinus, ruta, lamiacea, meliosa, baptisa, artemisa, sage, mentha, pertheinum integrifolium, eucalyptus, asteriacea a s výhodou: (1) rodu Escherichia čeledi Asteriacea, jmenovitě: Echinacea purpurea, Echinacea angustifolium (Echinacea pallidae), Echinacea vegetalis, Echinacea atribactilus, Echinacea pallidum a jejich odrůdy, stejně tak jako z rodu Commiphora, jmenovitě Commiphora myrrha, Commiphora molmol a Commpihora erythrea a jejich odrůdy. Lepších výsledků se dosahuje s fytochemikáliemi a antimikrobiálními izoláty, které jsou výtažky z Echinacea purpurea, Echinacea angustifolium a Commiphora myrrha.

Objevená technologie, léčba a léčivo poskytují velmi atraktivní, nenákladné, překvapivě dobré a konzistentní výsledky. Testy dokazují, že mikrobicidní roztok (léčivo) a medikamentózní léčba jsou výjimečně užitečné k: regulaci HIV infekce, inhibici připojení viru HIV na cílové buňky, působení jakožto preventivní mikrobicid, prodloužení období latence HIV a jiných onemocnění

a významné inhibici HIV a jiných virů, a přesto jsou všeobecně bezpečné pro nemocného i pro životní prostředí.

Podrobnější vysvětlení tohoto vynálezu je obsaženo v následujícím popisu vynálezu a přídatných patentových nárocích.

Podrobný popis vynálezu

Poskytuje se prostředek ničící mikroby a léčba vedoucí k inhibici lidského viru imunodeficience, také uváděného jako lidského imunodeficientního viru nebo HIV. Je žádoucí, aby mikrobicidní prostředek a léčba kompletně inhibovaly HIV, stejně tak i další mikrobiální onemocnění a aby byly bezpečné a netoxické pro člověka, zvířata i pro životní prostředí.

Mikrobicidní látka HIV a léčivo může obsahovat surfaktant a rostlinný extrakt, fytochemikálie, antimikrobiální extrakt, antivirový extrakt, inhibitor mikrobů a inhibitor virů. Upřednostňovaná mikrobicidní sloučenina může obsahovat: surfaktant; vodný diluent; živinu; a rostlinné extrakty rodu Echinacea (E), druhu Assteracea, směsi: purpurea, angustifolia, pallidae, vegetalis, atribactilus, a jejich odrůdy, stejně tak jako i rostlinné extrakty rodu Commiphora: Commiphora myrrha, Commiphora molmol, Commiphora erythraea, a jejich odrůdy. Upřednostňované rostlinné extrakty obsahují fytochemikálie rodu Commiphora a Echinacea, tak, jak se nacházejí v extraktech z Commiphora myrrha, Echinacea purpurea, Echinacea pallidae a Echinacea angustofolia. Lepších výsledků se dosahuje, když léčivo a mikrobicidní látka obsahuje: kladně nabitý surfaktant, fytochemikálie z Echinacea purpurea, Echinacea angustofolia a Commiphora myrrha, sterilní vodný diluent a kyselinu listovou. Poměr Commiphora myrrha ku Echinacea purpurea a Echinacea angustofolia je výhodný v rozmezí 1:2 až 1:4.

Surfaktant zajišťuje určité vyčištění na buněčné úrovni se širokospektrým antimikrobiálním účinkem. Surfaktanty tohoto druhu mohou obsahovat kvartérní amonné soli, které obsahují 6 až 18 atomů uhlíku. Výhodnější surfaktant kvartérní amonné soli je směsí alkyl dimethylbenzylamonných chloridů, mezi které patří: benzalkoniový halogenid, bromid benzalkoniový, chlorid benzalthoniový a nejvýhodnější je chlorid benzalkoniový. Léčba HIV může obsahovat 100 % aktivní vodný roztok, ale může se použít i jako koncentrát. Roztok může obsahovat hmotnostně různé koncentrace surfaktantů, jako např. od 0,005 do 0,8 %, s výhodou od 0,02 do 0,30 % a nejvýhodněji od 0,02 do 0,26 %.

Fytochemikálie z rodu Echinacea prokázaly obrovskou aktivitu proti baktériím, virům a některým plísním. Přesný mechanizmus není znám. Když byla objevená mikrobicidní látka testována lokálně u HIV a HSV 1 & 2, byla účinná při léčbě propuknuvší infekce herpes simplex. Když byla látka testována ve zkumavce, byla prokázána inhibiční aktivita proti HIV–1 a HSV 1 & 2.

Sloučenina z fytochemického koncentrátu obsahuje následující extrakty, rostlinné extrakty, inhibitory mikrobů a antimikrobiální izoláty: polysacharidy, echinacen, echinacein, echinacosid, (ester kyseliny kávové), echinolon; echinadiol, enzymy, kyselinu glukuronovou, inuloid, pentadekadien, polyacetylenové látky, arabinogalaktan, ramnózu, PS 1 (4–0–methylglukuronoarabinoxylan, rel. mol. hmotn. 35 kDa); PS 2 (kyselý ramnoarabinogalaktan, s rel. mol. hmotn. 450 kDa), cynarin, (kyselinu 1,5–di–0–kafeoylkvinovou), kyselinu cikorovou, (kyselinu 2,3–0–dikafeoyltartarovou), a jejich deriváty, alkylamidy, ketoalkiny a ketoalkeny, kvinony, oleje zahrnující: borneol, bornylacetát; pentadeka–8(z)–en–2–on, germakren D; karyofylen, karyofylen–epoxid, antokyanin, alkaloid pyrrolizidinu, lipofilní amid, izobutylamid; polyacetyleny; klovatinu z myrhy, kurzenon (furanoeudesmanového typu); dihydrofuranodien–6–on; 2–methoxyfurandien (furanoelemenového typu); elamol; lyndesteren (furanogernakranového typu); alkylamidy, apigenin, arabinogalaktu, kyselinu askorbovou, kyselinu behenovou, kyselinu octovou, betain, borneol, bornylacetát, kyselinu kávovou, kyselinou 2–0–kafeoyl–3–(5–alfa–karboxybeta)–3,4–dihydroxyfenyl, 2–0–kafeoyl–3–0–kumaroyltartarovou, 6–0–kafeoylekinakosid, kyselinu 2–0–

kafeoyl–3–0–furuloyltartarovou, kyselinu 2–0–kafeoyltartarovou, kalcium, karbonát, beta karoten, karofylen, karyofylen–epoxid, chlorid, chlorogenní kyselinu, kyselinu cikorovou, methylester kyseliny cikorové, kobalt, kyanadin–3–0–(beta–d–glukopyranosid), kyanadin–3–(6–0–malonyl–beta–d–glukopyranosid), cynarin, izobutylamid kyseliny deka–(2e,4e,6e)–trienové, des–ramnosylverbaskosid, kyselinu 3,5–dikafeoylkvinovou, kyselinu 4–5–0–dikafeoylkvinovou, kyselinu 2,3–0–diferuloltartarovou, izobutylamid kyseliny dodeka–(2e,4e)–dienové, dodeka–2,4–dien–1–yl izovalerát, izobutylamid kyseliny dodeka–(2e,6z,8e,10e)–tetraenové, epizobunol, beta–farnezen, kyselinu 2–0–ferulotartarovou, germakren, heptadeka–(8z,11z)–dien–2–on, heteroxylan, humulen 8–12, (e)–10–hydroxy–4,10–dimethyl–4,11–dodekadien–2–on, kyselinu 13–hydroxyoktadeka–(9z,11e,15z)–trienovou, inulin, železo, izochlorogenní kyselinu, izohamnetin–3–rutinosid, izotussilagin, kampferol, kampferol–3–glukózid, kampferol–3–rutinosid, limonen, luteolin, luteolin–7–glukózid, hořčík, mangan, 2–methyltetradeka–5,12–dien, 2–methyltetradeka–6,12–dien, methyl–p–hydroxycinamát, marcen, niacin, kyselinu palmitovou, pentadeka–(8z,11z)–dien–2–on, pentadeka–(8z,13z)–dien–11–lyn–2–on, pentadeka–8–en–2–on, pentadeka–(8z)–en–2–on, pentadeka–(8z)–en–11,13–dien–2–on, 1–pentadecen, penta–(1,8z)–dien, fosfor, alfa pinen, beta pinen, polyacetyleny, pontika–epoxid, draslík, protein, kvercetagetin–7–glukózid, kvercetin, kvercetin–3–galaktózid, kvercetin–3–glukózid, kvercetin–3–robinosid, kvercetin–3–xylózid, kvercetin–3–xylózylgalaktózid, ramnoarabinogalaktan, riboflavin, rutin, rutosid, selen, silikát, beta–sitosterol, sitosterol–3–beta–o–glukózid, sodík, stigmasterol, sulfát, kyselinu tartarovou, tetradeka–(8z)–en–11,13–dien–2–on, thiamin, n–triakontanol, trideka–1–en–3,5,7,9,10–pentayn, tussilagin, vanallin, verbaskosid, seskviterpeny, kyselinu octovou, alfa–amyron, arabinózu, alfa–bisabolen, gama–bisabolen, kadinen, kampesterol, cholesterol, cinamaldehyd, komiferin, kyselinu alfa–komiforovou, kyselinu beta–komiforovou, kyselinu gama–komiforovou, kyselinu komiforionovou, m–kresol, kumidinalkohol, kuminaldehyd, dipenten, elemol, 3–epi–alfa–amyrin, eugenol, furanodien, furanodienon, galaktózu, klovatinu, herabolen, alfa–herabomyrhol, beta–herabomyrhol, herabosen, limonen, kyselinu 4–0–methylglukuronovou, n–nonacesan, beta–sitosterol, xylózu, karofyleny, klovatinu myrhy, kurzenon, dihydrofuanodien–6–on a 2–methoxyfurandien.

Lepších výsledků se dosahuje, když antimikrobiální izoláty koncentrátu fytochemikálií obsahují hmotnostně (vztaženo k celkové hmotnosti vynalezené léčebné sloučeniny): 0,3 až 9 % echinakosidu; 0,1 až 7 % PS 1 (4–0–methylglukuronoarabinoxylanu, rel. mol. hmotn. 35 kDa); PS 2 (kyselého ramnoarabinogalaktanu, rel. mol. hmotn. 450 kDa); 0,1 až 10 % cynarinu (kyseliny 1,5–di–o–kafeoylkvinické) a kyseliny chiorické (kyseliny 2,3–0–di–kafeoyltartarové) a jejich derivátů; 0,2 až 4 % echinolonu; 0,2 až 8 % echinacinu B; 0,1 až 6 % echinaceinu; 2 až 7 % antokyaninů obsahujících kyanidin 3–0–β–D–glukopyranosid a 3–0–(6–0–malonyl)–β–D–glukopyranosid; 0,01 až 0,06 % alkaloidů pyrrolizidinu obsahujících tussilagin a izotussilagin; 0,003 až 0,009 % izomerických dodekaizobutylamidů a kyseliny tetroenové; 0,01 až 2 % karofylenů dihydrofuanodien–6–on; 2–methoxyfurandien; lyndesteren; seskviterpeny, kyselinu octovou, alfa–amyron, arabinózu, alfa–bisabolen, gama–bisabolen, kadinen, kampesterol, cholesterol, cinamaldehyd, komiferin, kyselinu alfa–komiforovou, kyselinu beta–komiforovou, kyselinu gama–komiforovou, kyselinu komiforionovou, m–kresol, kumidinalkohol, kuminaldehyd, dipenten, elemol, 3–epi–alfa–amyrin, eugenol, furanodien, furanodienon, galaktózu, klovatinu, herabolen, alfa–herabomyrhol, beta–herabomyrhol, herabosen, limonen, kyselinu 4–0–methylglukuronovou, n–nonacesan, beta–sitosterol, xylózu, karofyleny a lyndesteren.

Fytochemické koncentráty mohou obsahovat hmotnostně 2 až 90 % léčebné sloučeniny a roztoku a s výhodou neobsahuje méně než 15 % sloučeniny a roztoku a k dosažení nejlepších výsledků obsahuje 40 až 60 % léčebné sloučeniny a roztoku.

Diluent rozpouští chlorid benzalkoniový (surfaktant) a fytochemické koncentráty a slouží jako nosič v aerosolu, lahvičkách a kapacích lahvičkách. Výhodnější diluent je vodný diluent a nejvýhodnější diluent je sterilní vodný diluent. Poměr vody ve vodném roztoku k chloridu benzalkoniovému je v rozmezí od 30 000:1 do 250:1 s výhodou od 5000:1 do 750:1. Poměr vody ku kom-

binovaným koncentrátům chloridu benzalkoniového a fytochemikálií je v rozmezí od 2:1 do 100:1, výhodnější poměr je od 4:1 do 40:1 a nejlepších výsledků dosahují poměry od 6:1 do 20:1.

Nejlepší výsledky jsou u zdokonalené mikrobicidní léčby a léčiva na herpes, které obsahuje dle hmotnosti: 0,02 až 0,3% chlorid benzalkoniový. Aby se předešlo toxicitě, je výhodnější méně než 0,26%; 40 až 60 % fytochemikálií Echinacea a Commiphora; 0,01 až 25 % a nejvýhodnější 2 až 12 % živin a 20 až 60 %, nejvýhodněji 29,74 až 59,8 % sterilní vody.

Je žádoucí, aby léčivo (mikrobicidní látka) obsahovalo vitaminovou živinu, která slouží jako nosič živiny a zajišťuje synergický účinek, když je skombinuje s Commiphora myrrha, Echinacea purpurea a Echinacea angustofolia. Živina může obsahovat jednu nebo více následujících látek: vitamin A, komplex vitamínů skupiny B, vitamin D, vitamin E, vitamin K, vitaminy rozpustné ve vodě, vitaminy rozpustné v tucích, vitamin B1, vitamin B2, vitamin B5, vitamin B6, vitamin B12, vitamin B15, a s výhodou kyselinu listovou.

I když je voda upřednostňovaná jako rozpouštědlo a vodný nosič, za určitých okolností je žádoucí, aby se použilo jiných nosičů, které usnadní protlačení koncentrátu skrz jehlu nebo aerosol, nebo k dosažení lepší rozpustnosti a účinnosti. Je také žádoucí za určitých okolností zahrnout látku, která upravuje viskozitu. Dále, aby skladovatelnost zdokonaleného léčiva byla dva roky, je nutno přidat vhodné konzervační látky.

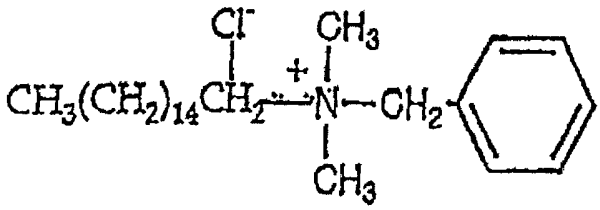
Aby byl zajištěn preventivní mikrobicidní účinek proti HIV, musí se léčebný roztok podávat systematicky pochvou nebo konečníkem. Způsob podání léčiva může být cestou: pomocí injekční stříkačky, aerosolem, jemným nanesením, kapkami nebo jiným způsobem. Podání nebo nanesení roztoku (léčiva) by mělo vydržet během pohlavního styku. Aniontová mýdla a aniontové detergenty a zvláště mýdla, která obsahují protein, mohou být kontraindikována. Místa, na která se léčivo podává, mají být umyta, vyčištěna a vysušena před jeho podáním. Léčivo za účelem antivirové HIV léčby se podává pomocí injekční stříkačky do konečníku nebo do pochvy nebo i dalšími způsoby.

Benzalkonium chlorid

Benzalkonium chlorid je upřednostňovaným surfaktantem. Benzalkonium chlorid je vodný roztok a je komerčně k dispozici pod obchodní značkou a obchodním jménem Zephiran® a je distribuován firmou Sanofi Winthrop Pharmaceuticals (dříve Winthrop labs). Benzalkonium chlorid je rychle účinkující protiinfekční látka se středně dlouhou dobou účinku. Surfaktant je účinný proti baktériím a některým virům, plísním a prvokům. Bakteriální spory se považují za rezistentní. Podle koncentrace jsou roztoky benzalkonium chloridu bakteriostatické nebo bakteriocidní. Není znám přesný mechanizmus benzalkonium chloridu na baktérie, ale předpokládá se, že účinkuje přes inaktivaci enzymů. Účinek benzalkonium chloridu se obecně zvyšuje se stoupající teplotou a pH. Gram–pozitivní baktérie jsou citlivější na benzalkonium chlorid než gram–negativní baktérie.

Benzalkonium chlorid se bohužel inaktivuje mýdly, aniontovými detergenty, sérem a určitými proteiny. Pro tyto výše zmíněné důvody vypadl benzalkonium chlorid z obliby mnoha laboratoří. Benzalkonium chlorid byl neúčinný při vzplanutí infekce herpes simplex, když byl použit samostatně a testován lokálně *in vivo*. Když byl benzalkonium chlorid testován in vitro na HIV a HSV1 & 2, byla prokázána nežádoucí vysoká toxicita na buňky dokonce i u vysokých ředění, což je lékařsky nepřípustné. Chemický vzorec benzalkonium chloridu je znázorněn níže. Mohou se použít i jiné druhy benzalkonium chloridu.

Sloučenina obecného vzorce I:



(I).

Fytochemikálie

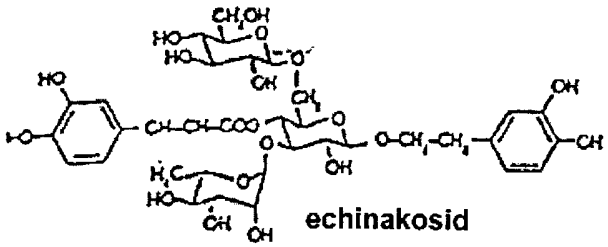
Syrová, neupravená a neizolovaná Echinacea je obecně nevhodná k léčbě HIV a herpes k vnitřnímu použitím, avšak pokud se vhodně filtruje, je vhodná k vnitřnímu použití.

Bylo zjištěno, že některé, ne však všechny z izolovaných složek a botanických extraktů Echinacea a Commiphora (jak je již dříve výše popsáno) poskytují fytochemikálie, antimikrobiální extrakty, botanické extrakty a inhibitory mikrobů, které mají nebo vykazují antimikrobiální účinek, který se jeví jako účinný při léčbě HIV, herpes virus a dalších virových onemocnění.

Jak je dříve uvedeno, fytochemická koncentrovaná sloučenina obsahuje následující izolované složky, botanické extrakty, inhibitory mikrobů a antimikrobiální extrakty: polysacharidy, echinacen, echinacein, echinakosid, (ester kyseliny kávové), echinolon echinadiol, enzymy, kyselinu glukuronovou, inuloid, pentadekadien, polyacetylenové látky, arabinogalaktan, ramnózu, PS 1 (4–0–methylglukuronara binoxylan s rel. mol. hmotností 35 kDa); PS 2 (kyselý ramnoarabinogalaktan s rel. mol. hmotností 450 kDa), cynarin, (kyselinu 1,5–di–0–kafeoylkvinovou), kyselinu 2–3–0–dikafeoyltartarovou, a jejich deriváty, alkylamidy, ketoalkiny a ketoalkeny, kvinony; oleje zahrnující: borneol, bornylacetát; pentadeka–8(z)–en–2–on, germakren D; karyofylen; karyofylen–epoxid, antokyaniny, alkaloidy pyrrolizidinu, lipofilní amidy, izobutylamidy; polyacetyleny; klovatinu z myrhy, kurzenon (furanoeudesmanového typu;) dihydrofuranodien–6–on; 2–methoxyfurandien (furanoelemenového typu); elamol; lyndesteren (furanogernakranového typu); alkylamidy, apigenin, arabinogalaktu, kyselinu askorbovou, kyselinu behenovou, kyselinu octovou, betain, borneol, bornylacetát, kyselinu kávovou, kyselinou 2–0–kafeoyl–3–(5–alfa–karboxybeta)–3,4–dihydroxyfenyl, 2–0–kafeoyl–3–0–kumaroyltartarovou, 6–0–kafeoylekinakosid, kyselinou 2–0–kafeoyl–3–0–feruloyltartarovou, kyselinu 2–0–kafeoyltartarovou, kalcium, karbonát, beta karoten, karofylen, karyofylen–epoxid, chlorid, chlorogenní kyselinu, kyselinu cikorovou, methylester kyseliny cikorové, kobalt, kyanadin–3–0–(beta–d–glukopyranosid), kyanadin–3–(6–0–malonyl–beta–d–glukopyranosid), cynarin, izobutylamid kyseliny deka–(2e,4e,6e)–trienové, des–ramnosylverbaskosid, kyselinu 3,5–dikafeoylkvinovou, kyselinu 4–5–0–dikafeoylkvinovou, kyselinu 2,3–0–diferuloltartarovou, izobutylamid kyseliny dodeka–(2e,4e)–dienové, dodeka–2,4–dien–1–yl izovalerát, izobutylamid kyseliny dodeka–(2e,6z,8e,10e)–tetraenové, epizobunol, beta–farnezen, kyselinu 2–0–ferulotartarovou, germakren, heptadeka–(8z,11z)–dien–2–on, heteroxylan, humulen 8–12, (e)–10–hydroxy–4,10–dimethyl–4,11–dodekadien–2–on, kyselinu 13–hydroxyoktadeka–(9z,11e,15z)–trienovou, inulin, železo, izochlorogenní kyselinu, izohamnetin–3–rutinosid, izotussilagin, kampferol, kampferol–3–glukózid, kampferol–3–rutinosid, limonen, luteolin, luteolin–7–glukózid, hořčík, mangan, 2–methyltetradeka–5,12–dien, 2–methyltetradeka–6,12–dien, methyl–p–hydroxycinamát, marcen, niacin, kyselinu palmitovou, pentadeka–(8z,11z)–dien–2–on, pentadeka–(8z,13z)–dien–11–lyn–2–on, pentadeka–8–en–2–on, pentadeka–(8z)–en–2–on, pentadeka–(8z)–en–11,13–dien–2–on, 1–pentadecen, penta–(1,8z)–dien, fosfor, alfa pinen, beta pinen, polyacetyleny, pontika–epoxid, draslík, protein, kvercetagetin–7–glukózid, kvercetin, kvercetin–3–galaktózid, kvercetin–3–glukózid, kvercetin–3–robinosid, kvercetin–3–xylózid, kvercetin–3–xylózylgalaktózid, ramnoarabinogalaktan, riboflavin, rutin, rutosid, selen, silikát, beta–sitosterol, sitosterol–3–beta–o–

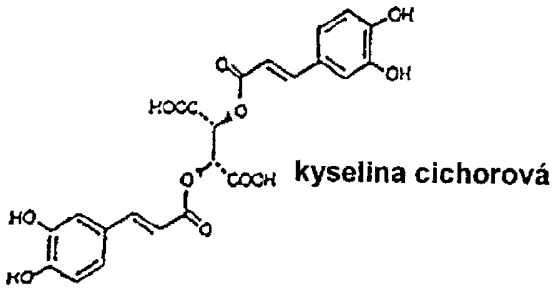
glukózid, sodík, stigmasterol, sulfát, kyselinu tartarovou, tetradeka–(8z)–en–11,13–dien–2–on, thiamin, n–triakontanol, trideka–1–en–3,5,7,9,10–pentayn, tussilagin, vanallin, verbaskosid, seskviterpeny, kyselinu octovou, alfa amyron, arabinózu, alfa–bisabolen, gama–bisabolen, kadinen, kampesterol, cholesterol, cinamaldehyd, komiferin, kyselinu alfa–komiforovou, kyselinu beta–komiforovou, kyselinu gama–komiforovou, kyselinu komiforionovou, m–kresol, kumidinalkohol, kuminaldehyd, dipenten, elemol, 3–epi–alfa–amyrin, eugenol, furanodien, furanodienon, galaktózu, klovatinu, herabolen, alfa–herabomyrhol, beta–herabomyrhol, herabosen, limonen, kyselinu 4–0–methylglukuronovou, n–nonacesan, beta–sitosterol, xylózu, karofyleny, lyndestyren, karofyleny, klovatinu myrhy, kurzenon, dihydrofuanodien–6–on a 2–methoxyfurandien, lyndestyren.

Chemické vzorce některých botanických extraktů Echinacea jsou obecného vzorce II, III, a IV a jsou znázorněny níže:



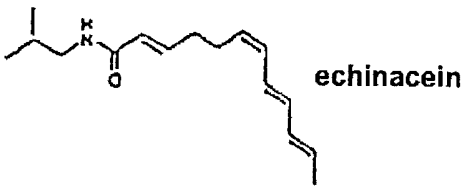
echinakosid

(II),



kyselina cichorová

(III),



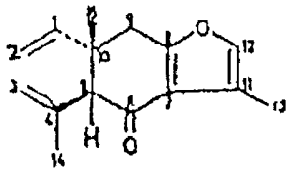
echinacein

(IV).



echinolon

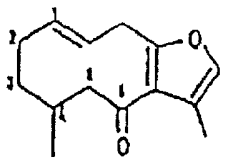
Chemické vzorce některých botanických extraktů Commiphora myrrha jsou obecného vzorce V, VI, VII a VIII a jsou znázorněny níže:



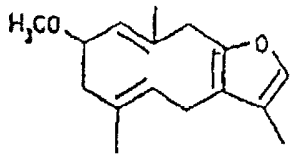
curzerenon

(furanoeudesmanový typ)

(V),



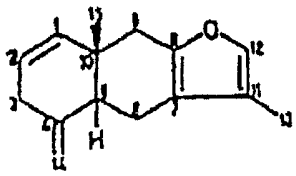
4,5-dihydrofuranodien-8-on



2-methoxyfuranodien

(furanoelemenový typ)

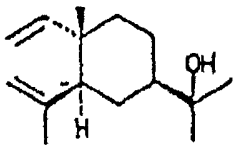
(VII),



lindestren

(furanogernakranový typ)

(VII),



elemol

(VIII),

Myrha je někdy také uváděna jako: myrrh, mirre, myrrhis, gumi myrha, myrrha vera, gum myrrh, Commiphora resin, gruggal gum, gruggal resin, eerabol myrrh, myrrhe, Manniliche myrrhe, Opopanax, a Hirabol myrrh. Myrha také může obsahovat klovatinu, která se získává z řezů, které se provádějí do kůry stromů rodu Commiphora myrrha, tzn. stromu myrhy. Myrha také obsahuje balzámové šťávy z balsamodendron myrrha, tzn. arabské myrty. Myrha se také může extrahovat z Osmorhiza nebo Washingtonia, které se někdy uvádějí jako sladké cicely. Strom myrhy je původem z Erythrei, Habeše, Somálska, Jemenu, Súdánu a jinde.

Druhy Commiphory, které produkují myrhu jsou křoviny nebo malé stromy se širokými ostrými ostny na kmeni. Nestejné trojité listy jsou střídavé a drobné květy jsou uspořádány ve formě koncových dat. Pokud je poškozen, schizogenní pryskyřicové kanálky poskytují drogu myrhu.

Myrha je na vzduchu vyschlá olejová klejopryskyřice, která vykapává z kůry druhů Commiphora. Hmota obsahuje nepravidelná, okrouhlá zrníčka nebo hrudky, které se liší velikostí dírek a barevnými odstíny od tmavě hnědé a téměř černé až ke světlé nebo tmavě oranžově–hnědé barvě; některé části mohou být žluté nebo bezbarvé až bledě žluté. Povrch je většinou pokryt šedým až nažloutle šedým práškem; lomy jsou lasturové a poskytují tenké průhledné fragmenty. Myrha má sladkou vůni a ostrý aromatický zápach. Myrha má hořkou aromatickou chuť. Myrha je štiplavá a lepí se při žvýkání na zuby.

Commiphora molmol a jiné druhy Commiphora, pokud jde o chemické složení jejich klejopryskyřice, jsou srovnatelné s myrhou DAB 10. Je rozhodně zmatek v literatuře, která se týká zdrojů myrhy a shodnosti druhů Commiphora. Běžně používaná myrha pochází od Commiphora myrrha. Somálská myrha pochází z Commiphora molmol. Nicméně systematický (taxonomický) vztah mezi Commiphora myrrha a Commiphora molmol není objasněn. Původem habešské myrhy je Commiphora madagaskarská nebo Commiphora habešská. Má se za to, že Opopanax, která je také uváděn jako bisabolská myrha nebo parfémované bdelium pochází z jak Commiphora erythrea (Ehrenb) nebo Opopanax.

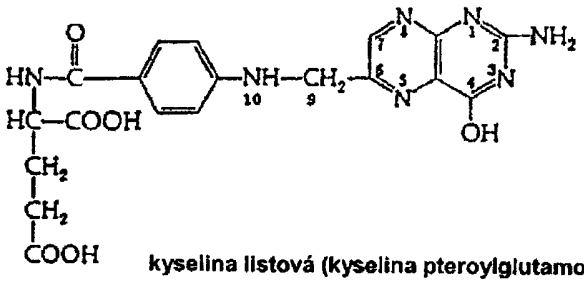
Složení myrhy je velmi komplikované, a jen částečně známé z 40 až 60 %, myrha je rozpustná v ethanolu a obsahuje pryskyřici a esenciální olej. Myrha obsahuje téměř výhradně seskviterpeny. Hlavní složkou seskviterpenů jsou: furanoseskviterpeny germakran eleman, eudesman a typy guaian. Navíc obsahuje seskviterpeny cukrů, např. β a δ–elemen, β–bourbonen, β–karyofylen, humulen a seskviterpenové alkoholy, např. elemol. Pravděpodobně některé z furanoseskviterpenů jsou typické pro farmaceutickou myrhu. Surová klovatina myrhy nebo surový klíh obsahují 20 % proteinů a 65 % cukrů, které jsou tvořeny galaktózu, kyselinou 4–0–methylglukuronovou a arabinózou. Sloučeniny Commiphory myrrhaphyto obsahují: kyselinu octovou, alfa–amyron, arabinózu, alfa–bisabolen, gama–bisabolen, kadinen, kampesterol, cholesterol, cinamaldehyd, komiferin, kyselinu alfa–komiforovou, kyselinu beta–komiforovou, kyselinu komiforovou, m–kresol, kuminalkohol, kuminaldehyd, dipenten, elemol, 3–epi–alfa–amyrin, eugenol, furanodien, furanodienon, galaktózu, pryskyřici, herabolen, alfa–herabomyrhol, beta–herabomyrhol, heraboresen, limonen, kyselinou 4–0–methylglukuronovou, n–nonacesan, beta–siterol, xylózu, karopyleny (karofyleny), klejopryskyřici myrhy, kursenon, dihydrofuanodien–6–on, 2–methoxyfurandien a lyndestyren (lindestyren).

Tinktury myrhy mají protizánětlivý účinek. Makroskopicky a mikroskopicky se myrha jeví jako hnědožlutý prášek, s charakteristickými žlutavými střípky nebo okrouhlými zrnky různé velikosti společně s jemnou zrnitou látkou, která bobtná ve vodě. V chloralhydrátovém preparátu je jenom málo zlomků tkáně rostlinného původu: červenohnědé zlomky korku, jednotlivé nebo skupiny mnohostěnných až protáhlých buněk, částečně s velmi ztluštěnými a zdřevnatělými stěnami a hnědavým obsahem; zlomky tenkostěnného parenchymu a sklerenchymatostními vlákny a 10 až 25 μm nepravidelnými hranolovými až mnohostěnnými krystaly šťavelanu vápenatého.

Myrha se má chránit před světlem a vlhkostí v dobře uzavřených nádobách. Nejlepší je spolu s vysoušecím prostředkem, protože cukerná složka léčiva rychle absorbuje vodu. Myrha by neměla být skladována v práškové formě.

Kyselina listová

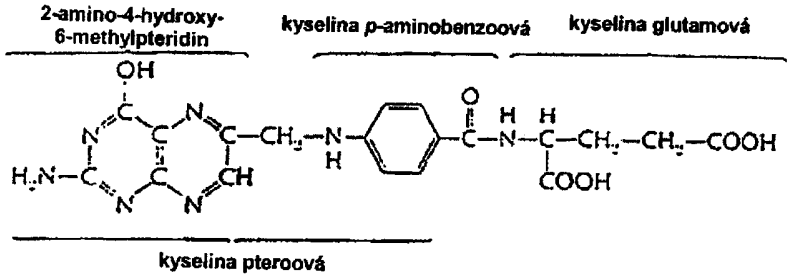
S nejlepšími výsledky se přednostně používá kyselina listová jako živina. Kyselina listová, také uváděná jako kyselina pteroylglutamová, foldin, folaemin, foliamin, folicet, folipac, folletes, folsan, folvite, incafolic, millafol nebo cytofol je žlutý, krystalický, ve vodě rozpustný vitamín skupiny B–komplexu, nezbytně nutný pro růst buněk a jejich reprodukci. Kyseliny listová jakožto koenzym spolu s vitamínem B_{12} a vitamínem C mají svoji funkci při štěpení a utilizaci proteinů a při tvorbě nukleových kyselin a hemu v hemoglobinu. Kyselina listová zvyšuje chuť k jídlu a stimuluje tvorbu kyseliny chlorovodíkové v zažívacím ústrojí. Kyselina listová se skladuje v játrech a je syntetizována bakteriální flórou v gastrointestinálním traktu. Nedostatek kyseliny listové vede k malému růstu, šedivění vlasů, zánětu jazyka, zánětu v dutině ústní, lézi v zažívacím ústrojí, průjmu a může vést k megaloblastické anémii. Nedostatek je způsoben neadekvátním příjmem vitamínu v potravě, malabsorpcí nebo metabolickými odchylkami. Spotřeba kyseliny listové se zvyšuje v těhotenství, v dětství a při stresu. Kyselina listová je nestabilní na světle a termolabilní a k významným ztrátám dochází, pokud se vitamín skladuje po dlouhou dobu. Kyselina listová je netoxická a je účinná při léčbě specifických stavů, kdy chybí. Obecný vzorec kyseliny listové IX je znázorněn níže:



kyselina listová (kyselina pteroylglutamová)

(IX),

Struktury kyseliny listové je znázorněna níže:

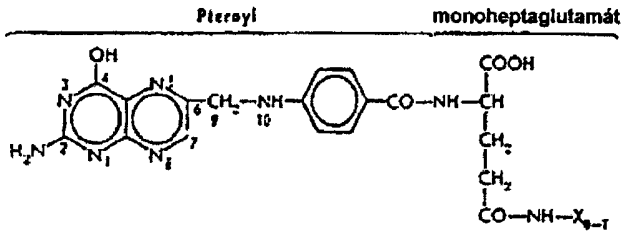


kyselina pteroylglutamová (kyselina listová)

(X),

Molekula kyseliny listové obsahuje kyselinu glutamovou, kyselinu p–aminobenzoovou a pterin; sloučením pterinu a kyseliny p–aminobenzoové vzniká kyselina pteroová. Uvedený vzorec je kyselinou pteroylglutamovou z jater. Kyselina listová, kterou produkují baktérie, obsahuje tři rezidua kyseliny glutamové, které jsou spojené γ–glutamovou vazbou. Mnoho tkání zvířat obsahuje kyselinu pteroylheptaglutamovou, rezidua kyseliny glutamové jsou opět spojeny γ–glutamovou vazbou. Syntetické kyseliny pteroylpolyglutamové, ve kterých jsou molekuly kyseliny glutamové spojeny α–glutamovými vazbami, jsou aktivní při testech bakteriálního růstu; kyseliny pteroyl–γ–glutamové jsou účinné jak u bakterií, tak i při léčbě makrocytární anémie u člověka. Enzym ve tkáni zvířat hydrolyzuje přirozeně se vyskytující sloučeniny pteroylglutamátu na kyselinu pteroylglutamovou a volné kyseliny glutamové.

Níže je znázorněn jiný obecný vzorec XI kyseliny pteroylglutamové ($PteGlu_1$):



pozice	radikál	kongener	
N^5	$-CH_3$	$CH_3H_4PteGlu$	methyltetrahydrofolát
N^5	$-CHO$	$5\text{-}CHOH_4PteGlu$	kyselina folinová
N^{10}	$-CHO$	$10\text{-}CHOH_4PteGlu$	10-formyltetrahydrofolát
N^{5-10}	$-CH-$	$5,10\text{-}CHH_4PteGlu$	5,10-methenyltetrahydrofolát
N^{5-10}	$-CH_2-$	$5,10\text{-}CH_2H_4PteGlu$	5,10-methylentetrahydrofolát
N^5	$-CHNH$	$CHNHH_4PteGlu$	Formiminotetrahydrofolát
N^{10}	$-CH_2OH$	$CH_2OHH_4PteGlu$	hydroxymethyltetrahydrofolát

Vzorce a názvosloví pteroylglutamové kyseliny (kyseliny listové)

(XI),

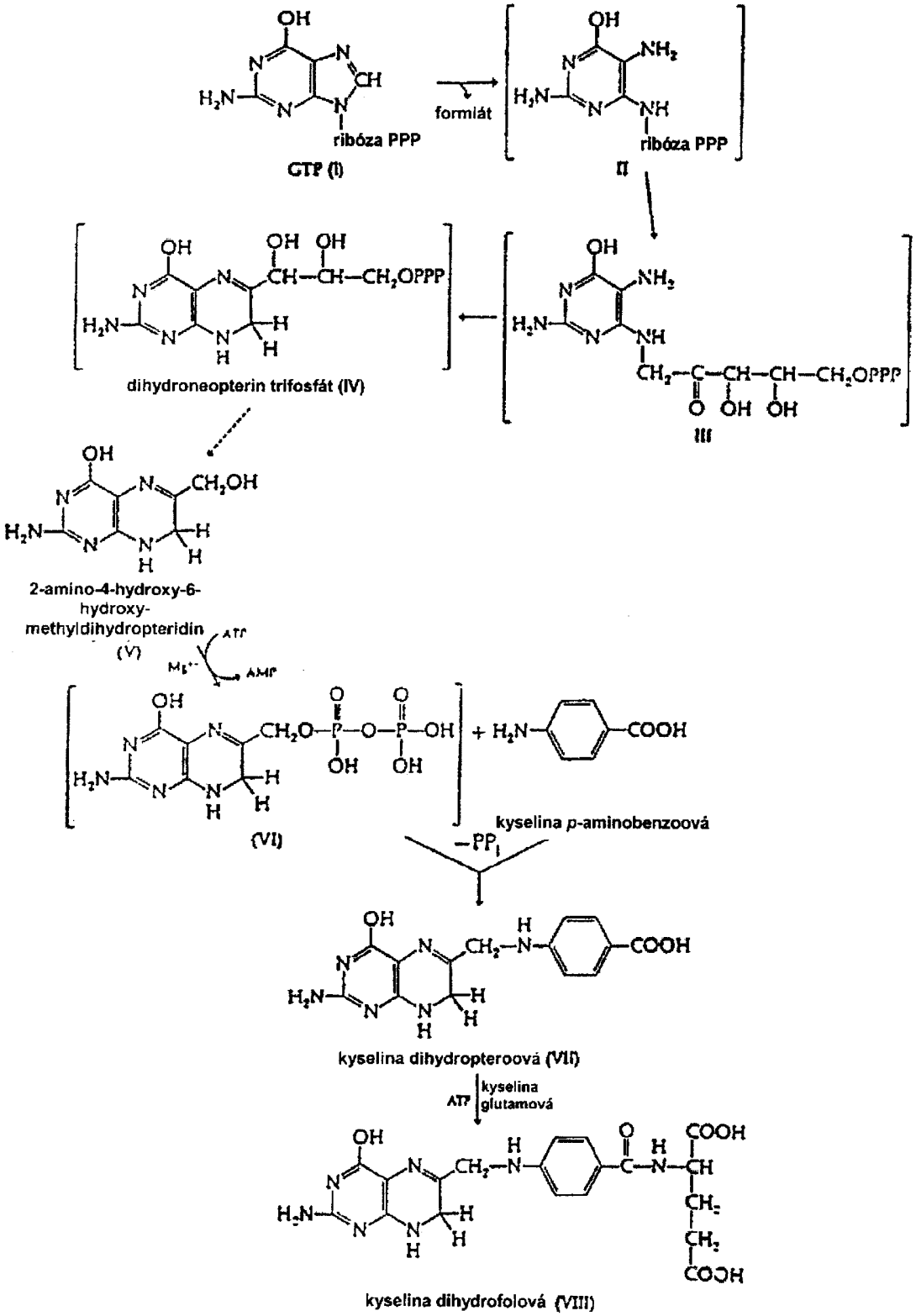
Hlavní část molekuly kyseliny listové obsahuje pteridinový kruh připojený pomocí methylenového můstku na paraaminobenzoovou kyselinu, která je připojena pomocí amidové vazby na kyselinu glutamovou. Zatímco kyselina pteroylglutamová je běžnou farmaceutickou formou kyseliny listové, není ani hlavním protějškem v potravě ani aktivním koenzymem nitrobuněčného metabolismu. Následně po vstřebání je $PteGlu_1$ rychle redukována na pozicích 5, 6, 7 a 7 na kyselinu tetrahydrolistovou ($H_4PteGlu_1$), která potom působí jako příjemce počtu jednouhlíkatých jednotek. Ty jsou napojeny buď na pozici 5, nebo na pozici 10 pteridinového kruhu nebo se tyto atomy přemostí a vytvoří nový pětičlenný kruh.

Vitamín B_{12} a kyselina listová jsou z hlediska potravy esenciální pro člověka. Nedostatek kteréhokoliv z těchto vitamínů vede k defektní syntéze DNA jakékoliv buňky, u které se chystá replikace chromozomů a dělení. Vzhledem k tomu, že tkáně s nejvyšším buněčným obratem vykazují nejdramatičtější změny, je hematopoetický systém obzvlášť citlivý na nedostatek těchto vitamínů. Klinicky se nejčastějším příznakem nedostatku těchto vitamínů megaloblastická anémie, kde porucha syntézy DNA vede k charakteristickým morfologickým abnormalitách prekurzorových buněk v kostní dřeni. Výsledkem jsou abnormální makrocytární červené krevní buňky a pacient se stává těžce anemickým.

Methylkobalamin podporuje reakci methionin syntetázy, která je esenciální pro normální metabolismus kyseliny listové. Methylové skupiny, které jsou součástí kyseliny methyltetrahydrolistové ($CH_3H_4PteGlu_1$) se používají pro tvorbu methylkobalaminu, který potom působí jako dárce methylové skupiny při konverzi homocysteinu na methionin. Tato interakce kyselina listová – kobalamin je klíčová pro normální syntézu purinů a pyrimidnů a tím i DNA. Reakce methionin syntetázy je zodpovědná za kontrolu recyklujících kofaktorů kyseliny listové; udržování nitrobuněčných koncentrací folylpolyglutamátů a přes syntézu methioninu a jeho produktu S–adenosylmethioninu udržování počtu methylačních reakcí. Vzhledem k tomu, že kyselina methyltetrahydrolistová je hlavním reprezentantem kyseliny listové, kterou jsou zásobovány buňky, přenos methylové skupiny na kobalamin je esenciální pro dostatečný přísun kyseliny tetrahydrolistové ($H_4PteGlu_1$), která je substrátem pro řadu metabolických kroků. Kyseliny tetrahydrolistová je prekurzorem pro vznik nitrobuněčných folylpolyglutamátů, také působí jako příjemce jednouhlíkatých jednotek při konverzi serinu na glycin, s výslednou tvorbou kyseliny 5,10–methylentetrahydrolistové ($5,10–CH_2H_4PteGlu_1$). Další deriváty poskytují methylenové skupiny do deoxyuridylátu pro syntézu thymidylátu – velmi důležitou reakci pro syntézu DNA. $5,10–CH_2H_4PteGlu_1$ je v průběhu konvertována na kyselinu dihydrolistovou ($H_2PteGlu_1$). Cyklus je potom dokončen redukcí $H_2PteGlu_1$ na $H_4PteGlu_1$ pomocí dihydrofolátreduktázy. Tento krok je blokován antagonisty kyseliny listové jako je např. methotrexát. I jiné cesty také vedou k syntéze kyseliny 5, 10 methylen tetrahydrolistové.

Tabulka A: Biosyntéza kyseliny listové

Níže je znázorněna biosyntéza kyseliny listové. Symbol ppp představuje trifosfát.



Kyselina listová může být do tkání transportována jako $CH_3H_4PteGlu_1$. Játra aktivně redukují a methylují $PteGlu_1$ (a H_2 nebo H_4 $PteGlu_1$) a potom transportují $CH_3H_4PteGlu_1$ do žluče. Pomocí té je reabsorbována střevem a následně dodána do tkání, $CH_3H_4PteGlu_1$ působí jako dárce

methylu při tvorbě methylkobalaminu a jako zdroj $H_4PteGlu_1$ a dalších homologů kyseliny listové, jak byli již dříve uvedeno. Kyselina listová se skladuje v buňkách ve formě polyglutamátů.

Surfaktanty

I když benzalkonium chlorid je upřednostňovaným surfaktantem s nejlepšími výsledky, za určitých okolností může být žádoucí použití jiných kvartérních amonných surfaktantů a jiných surfaktantů.

Kvartérní amonnou látkou může být chlorid dikokodiamonný, který je také znám jako dikokoalkyldimethyl chlorid nebo jako dikokodimethyl amonium chlorid nebo Di–C8–18–alkyldimethyl chlorid. Ten se může použít v kombinaci s izopropanolem, jako je např. 20 až 30% izopropanol. Upřednostňovaný zdroj kvartérní látky obsahuje: 70 až 80% kvartérní amonnou látku a méně než 0,03% methyl chlorid, má specifickou hmotnost 0,87 při 115 °F (46 °C), parciální tlak je 4,4kPa (33 mmHg) při teplotě 68 °F (20 °C), výchozí teplota varu je 180 °F (82,2 °C) při 101 kPa (760 mmHg) a těkavost 20 až 30 %, a je vyráběný pod obchodním jménem CarSpray 300 firmou Witco Corporation, Dublim, Ohio, USA. Kvartérní amonná látka má dezinfekční vlastnosti a může se používat jako fungicid při léčbě houbových a plísňových infekcí.

Další kvartérní amonné látky, které jsou užitečné, jsou vyráběny pod obchodním jménem Jet Quat 2C–75 firmou Jetco Chemicals, Inc., Corsicana, Texas, USA nebo jsou vyráběny pod obchodními jmény Carspray 400 a Carnauba Spray 200 firmou Witco Corporation, Dublin, Ohio, USA, nebo obsahují 9% denaturovaný ethylalkohol, který se prodává pod obchodním jménem BTC 2125M firmou Strephan Company, Northfield, Illinois, USA, nebo následující produkty MAQUAT, které obsahují n–alkyl dimethyl benzyl amonium chlorid, který vyrábí firma Mason Chemical Company, Arlington Heights, Illinois, USA. LC–12S (67% C12, 25% C14, 7% C16, 1% C18), MC 1416 (% C12, 60% C14, 30% C16, 5% C18), MC1412 (40% C12, 50% C14, 10% C16), SC–18 stearylová pasta nebo vločka (5% C16, 95% C18), TC–76 nebo MQ–2525 (5% C12, 60% C14, 30% C16 a 5% C18), a MC–6025–50% (25% C12, 60% C14 a 15% C16). Jet Quat 2C–75 obsahuje: 50 až 75 % dikokodimethyl kvartérní chlorid amonný, 20 až 50 % izopropyl alkoholu, má specifickou hmotnost 0,88 a teplota varu 180 °F (82,2 °C). CarSpray 400 obsahuje: 55 až 65 % kvartérních amonných látek, 20 až 30 % aminů, C14 až C18 a C16 až 18 nenasycený ethoxylovaný alkyl, 10 až 20 % izopropanolu a méně než 0,03 % methyl chloridu, má specifickou hmotnost 0,88 při teplotě 75 °F (23,9 °C), parciální tlak je 4,4 kPa (33 mmHg) při teplotě 68 °F (20 °C), výchozí teplota varu je 180 °F (82,2 °C) při tlaku 101 kPa (760 mmHg) a těkavost je 10 až 20 %. Carnauba Spray 200 obsahuje: 50 až 60 % kvartérních amonných látek, 10 až 20 % izopropanolu, 15 až 25 % vody, 1 až 10 % alkoylovaného karnaubského vosku a méně než 0,03 % methyl chloridu, má specifickou hmotnost 0,90 při teplotě 80 °F (26,7 °C), parciální tlak je 4,4 kPa (33 mmHg) při teplotě 68 °F (20 °C), výchozí teplota varu je 180 °F (82,2 °C) při tlaku 101 kPa (760 mm/Hg) a těkavost je 20 až 40 %.

Neionické surfaktanty jsou látky působící povrchově, které neionizují ve vodném roztoku. Ty mají velmi často hydrofilní vlastnosti, protože obsahují oxygenovaný řetězec (např. polyoxyethylenový řetězec), lyofilní část molekuly je odvozená od mastných kyselin, fenolů, alkoholů, amidů nebo aminů. Ukázkovými látkami jsou kondenzáty polyethylenoxidů a alkylových fenolů, např. kondenzační produkt vzniklý z jednoho molu nonyl fenolu a deseti molů ethylenoxidu a kondenzační produkty alifatických alkoholů a ethylenoxidu, např. kondenzační produkt vzniklý z jednoho molu tridekanolu a 12 molů ethylenoxidu.

Neionické surfaktanty mohou obsahovat fenolethoxyláty, které obsahují kondenzační produkt ethylenoxidu a alkylfenolu nebo alifatického alkoholu. Neionické surfaktanty s výhodou obsahují nonolfenolethoxylát jako je T–DET a/nebo oktafenolethoxylát. Neionické surfaktanty jsou reakčními produkty ethylenoxidu a nonolfenolu a/nebo oktafenolu. Poměr fenolu ku ethylenoxidu se může pohybovat v rozmezí od 2:20 až k 4:16 a s výhodou je 8:12.

Neionické syntetické surfaktanty mohou zahrnovat i neionické detergenty. Neionické syntetické surfaktanty mohou také vznikat kondenzací ethylenoxidu s hydrofobní bází, která vzniká kondenzací propylenoxidu s propylenglykolem. Hydrofobní část molekuly, která se samozřejmě vyznačuje nerozpustností ve vodě, má molekulovou hmotnost od 1200 do 2500. Přidání polyoxyethylenových radikálů k takové hydrofobní části má tendenci ke zvýšení rozpustnosti molekuly jako celku ve vodě a tekutá povaha látky se udržuje až do té míry, kdy obsah polyethylenu je 50 % celkové hmotnosti kondenzační látky. Jiné neionické syntetické surfaktanty obsahují: polyethylenoxidové kondenzáty alkylfenolů, např. kondenzační látky alkylfenolů nebo dialkylfenolů, kde alkylová skupina obsahuje 6 až 12 atomů uhlíku v konfiguraci jak nerozvětvených, tak i rozvětvených řetězců s ethylenoxidem. Ethylenoxid je přítomný v množství ekvivalentním od 8 do 25 mol ethylenoxidu na mol alkylfenolu. Alkylový substituent v těchto látkách bývá odvozen od polymerovaného propylenu, diizobutylenu, n–oktenu nebo n–nonenu.

Neionické surfaktanty mohou také vzniknout kondenzací ethylenoxidu s reakčním produktem propylenoxidu a ethylendiaminu, např. látek, které obsahují od 40 do 80 % polyoxyethylenu podle hmotnosti a které mají molekulovou hmotnost od 5000 do 11 000. Vznikají reakcí ethylenoxidových skupin s hydrofobní bází, které obsahují reakční produkt ethylendiaminu a přebytek propylenoxidu; tyto báze mají molekulovou hmotnost od 2500 do 3000.

Mezi jiné neionické surfaktanty patří kondenzační produkt alifatických alkoholů, které obsahují od 8 do 18 atomů uhlíku v konfiguraci jak nerozvětvených, tak i rozvětvených řetězců s ethylenoxidem, např. kondenzace ethylenoxidu a kokosového alkoholu, kde koncentrace ethylenoxidu je 10 až 30 molů na mol kokosového alkoholu a frakce kokosového alkoholu obsahuje od 10 do 14 atomů uhlíku.

Mezi další neionické surfaktanty patří terciární aminoxidy s dlouhými řetězci obecného vzorce XII:

$$R_1R_3R_2N\rightarrow O \qquad \text{(XII)},$$

kde R_1 je alkylový radikál o 8 až 18 atomech uhlíku, R_2 a R_3 jsou methylové nebo ethylové radikály. Šipka ve vzorci je konvenčním znázorněním semipolární vazby. Mezi příklady aminoxidů vhodných pro použití patří: dimethyldodecylaminoxid, dimethyldecylaminoxid, dimethyltetradecylaminoxid a dimethylhexadecylaminoxid.

Mezi další neionické surfaktanty patří terciární fosfinoxidy s dlouhými řetězci obecného vzorce XIII:

$$R\,R'\,R''\,P\rightarrow O \qquad \text{(XIII)},$$

kde R je alkyl, alkenyl nebo monohydroxyalkylový radikál s délkou řetězce o počtu atomů uhlíku od 10 do 18 a R′ a R″ jsou alkylové nebo monohydroxyalkylové skupiny, které obsahují od 1 do 3 atomů uhlíku. Šipka ve vzorci je konvenčním znázorněním semipolární vazby. Mezi příklady vhodných fosfinoxidů patří: dimethyldodecylfosfinoxid, dimethyltetradecylfosfinoxid, ethylmethyltetradecylfosfinoxid, cethyldimethylfosfinoxid, dimethylstearylfosfinoxid, cethylethylpropylfosfinoxid, diethyldodecylfosfinoxid, diethyltetradecylfosfinoxid, dipropyldodecylfosfinoxid, bis–(2–hydroxymethyl)dodecylfosfinoxid, bis–(2–hydroxyethyl)dodecylfosfinoxid, (2–hydroxypropyl)methyltetradecylfosfinoxid, dimethyloleylfosfinoxid a dimethyl–(2–hydroxydodecyl)fosfinoxid.

Za některých okolností je užitečné použití jiných surfaktantů jako jsou např. jiné kationtové surfaktanty, amfolytické surfaktanty nebo zwitteriontové surfaktanty.

Kationtové surfaktanty obsahují kationtové detergenty. Kationtové surfaktanty obsahují látky, které ionizují ve vodném médiu za vzniku kationtů, které obsahují lyofilní skupinu. Typickým

příkladem takovýchto látek jsou kvartérní amonné soli, které obsahují alkylovou skupinu o 12 až 18 atomech uhlíku, jako je např. laurylbenzyldimethylamonium chlorid.

Amfolytické surfaktanty jsou látky, které obsahují v jedné molekule jak aniontové tak i kationtové skupiny. Příkladem takovýchto látek jsou deriváty alifatických aminů, které obsahují dlouhé řetězce s 8 až 18 atomy uhlíku a aniontovou skupinu ve vodě rozpustných látek, např. karboxy-sulfo, sulfo nebo sulfátovou skupinu. Příkladem amfolytických detergentů jsou: 3–dodecylaminopropansulfonát sodný, N–methyltaurát sodný a podobné látky, jako např. vyšší alkylem substituované aminokyseliny, betainy, thetiny, sulfonované dlouhé řetězce nenasycených aminů a sulfonované deriváty imidazolinu.

Zwitteriontové surfaktanty obsahují syntetické detergenty. Zwitteriontové surfaktanty jsou obecně deriváty alifatických kvartérních látek, ve kterých alifatický radikál může obsahovat nerozvětvený nebo rozvětvený řetězec a kde jeden z alifatických substituentů obsahuje 8 až 18 atomů uhlíku a další obsahuje aniontovou skupinu ve vodě rozpustných látek, např. karboxy, sulfo nebo sulfáto skupinu. Příkladem látek vyhovující této definici jsou: 3–(N,N–dimethyl–N–hexadecylamonio)propan–1–sulfát a 3–(N,N–dimethyl–N–hexadecylamonio)–2–hydroxypropan–1–sulfát.

Klinická farmakologie.

Když se smísí fytochemikálie Echinacea a Commiphora (antimikrobiální izoláty, botanické extrakty a inhibitory mikrobů), sloučí se a aplikují společně s: surfaktantem, s výhodou benzalkonium chloridem; nosičem živiny, s výhodou kyselinou listovou; a sterilním vodným nosičem; bylo dosaženo nepředpokládaných a překvapivě dobrých výsledků při odstraňování (léčbě) HIV a jiných infekčních onemocnění a dramaticky se zvýšila účinnost léčiva (mikrobicidní látky). Při testování ve zkumavce unikátní látka vykazovala nepředpokládanou a překvapivě dobrou protivirovou aktivitu proti HIV, zahrnující inhibici přilnutí HIV na cílové buňky. Když bylo synergické léčivo testováno in vivo, byly okamžitě potlačeny infekce herpes simplex. Když bylo synergické léčivo testováno in vitro, benzalkonium chlorid byl významně méně toxický a v bezpečných hladinách vykazoval vyšší úroveň inhibičního účinku proti HIV a HSV 1 & 2. Byla dokázána a pozorována synergická interakce směsi fytochemikálií Echinacea a Commiphora, kyseliny listové a surfaktantu sledováním rychlé rozpustnosti směšovaných složek a vzhledem k vlastnostem roztoku bylo dosaženo mírné adhezívní schopnosti. Dále chemické zdokonalené vlastnosti fytochemikálií Echinacea a Commiphora, nosiče surfaktantové živiny (živiny) a vodného nosiče, jako je zlepšená stabilita a zvýšená reaktivita, která je užitečná při léčbě infekčních onemocnění.

Léčivo se může použít v různých roztocích na: ústní a nosní sliznici; tkáň pochvy, stydké pysky; konečníkovou a kolem konečníkovou tkáň; tkáň penisu; kožní tkáň; otevřenou podkožní tkáň a při vyšších ředěních se může použít na oční infekce a s výhodou pro podání pochvou nebo konečníkem. Změnou koncentrace se může podávat léčivo i parenterálně. Léčivo je kontraindikováno pro použití skrze pochvu nebo konečník; v balíčkové úpravě; do ušního kanálu; na tlakové obvazy; výplně nebo požití, neboť takovéto použití léku může způsobit podráždění a chemické spáleniny. Také se nedoporučuje použít léčivo k léčbě anaerobních plísňových infekcí, vzhledem k tomu, že některé plísně jsou rezistentní.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1 až 7

Testování *in vivo*

V prvotní *in–vivo* studii lokálního podání léčiva byly hodnoceny účinky léčby a léčiva současného vynálezu na sedmi testovaných osobách, které byly testovány jako pozitivní na HSV 1 nebo 2. Osoby byly léčeny lokálně pomocí léčiva, které obsahuje benzalkonium chloridový surfaktant ve vodném roztoku (v poměru 1:750) v kombinaci s Echinacea purpurea v práškové formě obsahující již uvedené fytochemikálie. Podání sloučeniny bylo provedeno dvoukrokovým postupem, nejprve se navlhčilo postižené místo nebo puchýřek benzalkonium chloridovým surfaktantem ve vodném roztoku pomocí aerosolu, jemným nanesením nebo použitím kapátka. Potom se zvlhčené místo překrylo práškovými fytochemikáliemi buď štětičkou, nebo ručním nasýpáním na postižené místo. Důležitým hlediskem v této léčbě je udržování kompletního překrytí postiženého místa po celou dobu propuknutí onemocnění. Proto bylo postižené místo udržováno překryté léčebnou sloučeninou opakovaným nanášením dle potřeby.

Ze sedmi osob bylo 6 žen a jeden muž. Na počátku této studie byl věk může 38 let a ženy byly ve věku 8, 27, 30, 32, 38 a 39 let. Během 6 týdnů infekce vzplála přibližně 12–krát. V 9 případech se jednalo o HSV 2, genitální opar a v třech případech HSV 1 (opary). U 8–leté a 27–leté ženy je vyskytl HSV 1 (opar). U 30–leté, 38–leté a 39–leté ženy se vyskytl HSV 2 (genitální opar). 38–letá žena měla také HSV 1 opar. U 38–letého muže se vyskytl HSV 2 (genitální opar). U všech sledovaných osob byla dobře sestavená anamnéza onemocnění a průběh jejich onemocnění byl označený za standardní. Žádná sledovaná osoba nevěděla nic o testované léčbě ani o účinku léčiva, aby byly získány objektivní údaje. Při opakovaných testech jim bylo sděleno, že ve vzorcích léčiva může být přimícháno placebo.

V sedmi případech byla antimikrobiální látka (léčivo) nanášena přímo na tkáň v prodromálním stadiu. V pěti případech byla antimikrobiální látka nanesena přímo na prasklé puchýřky. Antimikrobiální látka byla opakovaně nanášena dle potřeby, aby bylo se udrželo pokrytí.

Pozorování: Každý jednotlivec (sledovaná osoba) udávala pocit brnění několik sekund po každém nanesení látky. Také udávali, že byl výrazný stupeň přilnavosti léčebné (antimikrobiální) látky k puchýřkům nebo postižené oblasti. Přilnavost určitého stupně sloučeniny k epiteliálním tkáním přetrvávala dokonce i po osprchování nebo opláchnutí místa vodou.

Výsledky: Výsledky testování 7 osob s léčbou a léčivem byly překvapivě neočekávaně dobré a velmi shodné. Každá osoba šťastně udávala, že jakmile byla sloučenina jednou nanesena na postižené místo, bolest zcela vymizela během 10 až 20 minut, i když k určité úlevě došli již i před tím. V sedmi případech, ve kterých byla látka (léčivo) podávána v prodromálním stadiu, osoby udávaly, že bolest ustala, všechny příznaky, které by se dříve stupňovaly až k úplnému vzplanutí, se zmírnily a ke vzplanutí nikdy znovu nedošlo. Všechny vnější příznaky a fyzikální projevy herpes vymizely v průběhu několika hodin po podání léčiva. V pěti případech, u kterých byla látka (léčivo) nanášeno na prasklé puchýřky, osoby udávaly, že bolest ustala během několika minut a pálení a svědění a podráždění vymizely během dvou až čtyř hodin a puchýřky se vysušily a vymizely během dvaceti jedna hodin. Ve všech případech ustaly ostatní vyčerpávající příznaky: horečka, malátnost, otok třísel, mokvající rány a bolestivé močení, jakmile bylo léčivo jednou podáno.

V dalším sledování, kdy osoby obdržely zásobu sloučeniny (léčiva) pro testování při budoucích vzplanutích, bylo udáváno, že jakmile se objevily počáteční příznaky, které signalizovaly prodromální stadium vzplanutí infekce, látka (léčivo) byla ihned osobami nanesena podle návodu a vzplanutí infekce bylo plně zastaveno. Bylo také udáváno, že osoby, které měly dříve zkuše-

nosti s několika vzplanutími infekce za rok, pozorovaly významně delší období latence. Dále byla v tříletém období sledována jedna osoba, která udávala těžká vzplanutí infekce každý měsíc po dobu čtyř let před použitím tohoto léčiva. Ta nyní udávala, že se u ní nevyskytlo při použití tohoto léčiva nové vzplanutí infekce více než rok.

Další pozorování: Jedna sledovaná osoba mužského pohlaví udávala, že po počátečním podávání během prodromální fáze vzplanutí infekce, si osprchovala a zapomněla nanést sloučeninu (léčivo) po dobu přibližně 30 hodin. Několik puchýřků následně prasklo a začalo splývat. Osoba začala znovu sloučeninu (léčivo) nanášet a poté udržovala místo dobře pokryté sloučeninou. Vzplanutí vymizelo do 21 hodin stejným způsobem, který popisovaly i jiné osoby.

Jiné pozorování ukazuje, že sloučenina (léčivo) může být slabší nebo méně účinná za přítomnosti určitých proteinů nebo mýdel. Jedna sledovaná osoba ženského pohlaví byla příliš horlivá při čištění postiženého místa před nanášením sloučeniny (léčiva). Toto se přihodilo v průběhu třetího vzplanutí infekce po úspěšném použití sloučeniny (léčiva) na dvě předchozí vzplanutí infekce. V tomto případě, kdy sloučenina (léčivo) byla nanášena, se nevyskytl známý pocit brnění a příznaky se nezmírnily. Uběhlo přibližně 24 hodin, než vyhledala nějakou pomoc a vzplanutí infekce se vystupňovalo až do úplného stadia výsevu puchýřků se všemi doprovodnými příznaky tohoto onemocnění. Byla poučena, že místo se musí důkladně opláchnout od zbytků mýdla, místo se musí vysušit a potom se na místo opět nanese sloučenina (léčivo). Poté, co dodržovala instrukce, udávala, že vzplanutí infekce bylo pomocí léčebné sloučeniny plně vyléčeno, tak, jak tomu bylo u dvou předchozích vzplanutí infekce.

Příklady 8 až 13

Dermatologické a veterinární testování

Bylo provedeno testování zvířat, aby se určila jakákoliv možná dermatologická alergická reakce vyvolaná léčebnou sloučeninou (léčivem). Sledovalo se šest zvířat. Mezi zvířata patřily 3 králičí samice (neznámého věku); 2 psi (1 samice ve věku 2 let a 1 samec ve věku 9 let); a jeden vykastrovaný kocour ve věku 3 let. U těchto pokusů se zvířaty byla nanášena každému zvířeti výše zmíněná sloučenina (léčivo), již dříve zmíněným způsobem, na vnitřní část zevního ucha. Ve všech případech bylo místo určené k léčbě udržováno překryté látkou po dobu 24 hodin a bylo porovnáváno s časem, po který toto sledované osoby používaly. Test provedený na šesti zvířecích jedincích prokázaly, že nebyl zjištěn žádný příznak kožního podráždění nebo alergické reakce.

Příklad 14

Výše zmíněná sloučenina (léčivo), která obsahuje virové inhibitory, byla také testována na papilloma viru, který způsobuje bradavice na čenichu vykleštěného čistokrevného koně. Bradavice Papilloma viru se velmi obtížně léčí. Bradavice měřila v průměru 25 mm. Antimikrobiální látka (léčivo) byla nanášena dvakrát denně. Při každém nanášení byla měřena velikost bradavice.

Výsledky: Zcela nepředpokládané se bradavice dramaticky zmenšila co do velikosti přibližně o 3 mm denně, pokud bylo léčivo nanášeno na bradavici a vymizela kompletně pátý den. Bylo zjištěno, že bradavice začala ustupovat v prvních povrchových vrstvách, a odhalily se široké zčervenalé pupínky. Poté se bradavice nezmenšily jenom co do velikosti odrolením nebo odloupáním, zmenšily v místě nasednutí na pokožku a potom se odlouply aniž by zanechaly po sobě jizvy.

V probíhající dlouhodobé *in vivo* studii tohoto vynálezu, která začala s prvními sedmi osobami v dubnu 1989 a která již probíhá 7 let, bylo léčeno přibližně 100 infekčních vzplanutí pomocí

léčiva v různých koncentracích, jak již bylo dříve popisováno. Ve všech případech bylo dosaženo překvapivě stejných dobrých výsledků: 1. Bolest vymizí během minut; 2. neobjeví se žádné vzplanutí infekce, pokud je sloučenina podávána v prodromálním stadiu; 3. Vzplanutí infekce odezní během dvaceti jedna hodin, pokud je látka podávána ve stadiu puchýřků.

Testování *in vitro*

Laboratorní testování bylo prováděno na Univerzitě v Chicagu, v laboratořích klinické mikrobiologie, aby se určila inhibiční aktivita *in vitro* léčby a sloučeniny (léčiva). Laboratorní testování vedl zástupce přednosty PhDr., a docent patologie. Při testování léčebné sloučeniny *in vitro*, dále uváděné jako „lék", bylo dosaženo překvapivě dobrých výsledků. Bylo zjištěno, že léčba a sloučenina poskytovaly neočekávaně, překvapivě vynikající inhibiční aktivitu proti HSV 1 a HSV 2. Patologové uvedli, že již testovali „stovky" jiných látek a doposud nikdy neviděli tak dobrou látku jako je tato.

Následují lékařské testy, které byly provedeny a jejichž výsledky byly získány na Univerzitě v Chicagu. Pro jednodušší interpretaci některých vědeckých údajů a výsledků testů jsou níže uvedeny následující definice pojmů:

„MEM" znamená minimální esenciální médium. To znamená kultivační médium, které se používá k růstu buněk, na kterých probíhá testování.

„Fibroblast" je mezenchymální lidská buňka (buňka, která se nachází v pojivové tkáni, krvi, kosti, lymfatické tkáni a chrupavce).

„IC_{50}" znamená inhibiční koncentrace. Pro toto testování byl vybrán 50% koncový bod, jak je obvyklé. Číslo určuje největší ředění pod 50 %. Proto je toto definice koncového bodu.

Jestliže místo pod ředěním zůstává čisté, znamená to, že toto ředění může být toxické, test nemá cenu hodnotit nebo nejsou k dispozici hodnotitelné údaje.

Pokud je místo pod ředěním označeno rozdělovací čárkou (–), znamená to, že nejsou žádné povlaky a tím, že došlo k úspěšné inhibici herpes (HSV).

Příklady 15 až 17

U těchto in vitro testů byly použity následující léky (léčiva):

Lék č. 1 = Surfaktant benzalkonium chlorid ve vodném roztoku v poměru 1:750. Surfaktant ve vodném roztoku se před použitím filtruje a ředí v poměru rovném 2xMEM a pro zisk poměru 1:1500 1xMEM.

Lék č. 2 = Prášek Echinacea (fytochemikálie) ve vodném roztoku. Tento přípravek byl extrahován teplou extrakcí pomocí sterilní vody. Extrahované fytochemikálie byly před použitím centrifugovány a filtrovány. Filtrované fytochemikálie byly naředěny v poměru rovném 2xMEM a pro výrobu neředěného přípravku 1xMEM.

Lék č. 3 = Prášek Echinacea (fytochemikálie) byl extrahován a sloučen se surfaktantem benzalkonium chlorid procesem studené extrakce. Sloučený přípravek byl před použitím centrifugován a filtrován a v poměru rovném 2xMEM a pro výrobu neředěného přípravku v 1xMEM.

1. Tři 24–jamkové plotny byly naočkovány fibroblasty. Byly použity tři různé výtažky (pro porovnání) v pěti koncentracích k ověření protivirové aktivity v následujících koncentracích.

Neředěný, 1:2, 1:4, 1:8 a 1:16 v 1xMEM. V každé plotně byly čtyři jamky, které obsahovaly MEM bez léku.

2. Z jamek se odstranila růstová média a do každého kompartmentu horní poloviny plotny se přidalo 200 µl HSV–1. HSV–1 byl ředěn v poměru 1:5000 (2,0 µl kmene HSV–1 v 10 ml MEM). Virový titr byl $3x10^6$ na ml. Do každé jamky dolní poloviny plotny se přidalo 200 µl HSV–2. HSV–2 byl ředěn v poměru 1:2000 (5,0 µl kmene HSV–2 v 10 ml MEM). Virový titr byl $6x10^5$ na ml.

3. Plotny se nechaly inkubovat při teplotě 37 °C po dobu dvou hodin.

4. Odstranila se očkovací látka a do čtyř jamek se přidal 1 ml MEM obsahující léky č. 1 až 3. Níže je uvedená koncentrace léku v porovnání s MEM:

Tabulka 1

Koncentrace:	Neředěno	1:2	1:4	1:8	1:16
Lék (µl):	4000	2000	1000	500	250
MEM (µl):	–	2000	3000	3500	3750

5. Výsledky: HSV–1, překrytí tekutinou, lék přidán ihned po pohlcení viru.

Plotna 1, lék č. 1 kontaminována baktériemi !, žádný růst., zřejmě mrtvé.

Plotna 2, lék č. 2 kontaminována baktériemi !, žádný růst, zřejmě mrtvé.

Plotna 3, lék č. 3 výsledky jsou uvedeny níže v tabulce 2 a 3.

Tabulka 2 – Výsledky testu na HSV 1 s lékem č. 3

Koncentrace:	Neředěno	1:2	1:4	1:8	1:16
plaky 54	toxické	toxické	–	6*	12**
plaky 42	toxické	toxické	–	4*	16**
Průměr: 48				5	14
					IC_{50}>1:16

Tabulka 3 – Výsledky testu na HSV 2 s lékem č. 3

Koncentrace:	Neředěno	1:2	1:4	1:8	1:16
plaky 46	toxické	toxické	–	22*	32**
plaky 49	toxické	toxické	–	21*	28**
Průměr: 48				22	30
					IC_{50}>1:8

*mírná toxicita

**velmi malé plaky

Poznámky: Při testování léčiva (léku č. 3) bylo dosaženo vynikajících výsledků. Buňky vypadaly dobře bez známek kontaminace. Přípravek může být na některé buňky toxický při nižších ředění. Inhibiční aktivita tohoto přípravku byla neočekávaně úspěšná.

Příklady 18 až 20

Tři 24–jamkové plotny byly naočkovány fibroblasty a následujícími léky.

Testovaný lék č. 1A = surfaktant benzalkonium chlorid ve vodném roztoku. Surfaktant benzalkonium chlorid byl připraven ředěním ve vodě v poměru 1:375 (32 µl ve 12,0 ml sterilní vody). Před použitím byl filtrován. Pak byl naředěn do objemu ekvivalentnímu 2xMEM a pro ředění 1:750 v 1xMEM. Ředění se provádělo, aby byl zachován poměr.

Testovaný lék č. 2A = Prášek Echinacea purpurea (fytochemikálie) ve vodném roztoku. Tento přípravek byl roztok o koncentraci 50 mg/ml (300 mg v 6,0ml vody) prášku *Echinacea purpurea* ve sterilní vodě. Tato směs se nechala míchat a chladit po dobu čtyř hodin. Přípravek prášku Echinacea byl před použitím centrifugován při 3500 otáčkách za minutu po dobu 15 minut při teplotě 10 °C, filtrován a naředěn v ekvivalentním objemu 2xMEM a pro výrobu neředěného přípravku v 1xMEM.

Testovaný lék č. 3A = Prášek Echinacea purpurea (fytochemikálie) rozpuštěný v surfaktantu benzalkonium chlorid. Tento přípravek byl roztok o koncentraci 50 mg/ml (300 mg v 6,0 ml benzalkonium chloridu, 1:375). Tato směs se nechala míchat a chladit po dobu čtyř hodin. Směs fytochemikálií a surfaktantu byla před použitím centrifugována při 3500 otáčkách za minutu po dobu 15 minut při teplotě 10 °C, filtrována a potom naředěna v ekvivalentním objemu 2xMEM a pro výrobu naředěného přípravku v 1xMEM.

1. Byly použity tři plotny k ověření tří přípravků léku. K ověření protivirové aktivity bylo zapotřebí koncentrace: 1:2, 1:4, 1:8 a 1:16 v 1xMEM. V každé plotně byly čtyři kontrolní jamky, které obsahovaly MEM bez léku.

2. Z jamek se odstranila růstová média a do každé jamky horní poloviny plotny se přidalo 200 µl HSV–1. HSV–1 byl ředěn v poměru 1:5000 (2,0 µl kmene HSV–1 v 10 MEM). Virový titr byl $3x10^6$ na ml.

3. Plotny se nechaly inkubovat při teplotě 37 °C po dobu čtyř hodin.

4. Odstranila se očkovací látka a do čtyř jamek se přidal 1 ml MEM obsahující léky č. 1A až 3A. Níže je uvedená koncentrace léku v porovnání s MEM:

Tabulka 4

Koncentrace:	Neředěno	1:2	1:4	1:8	1:16
Lék (µl):	4000	2000	1000	500	250
MEM (µl):	–	2000	3000	3500	3750

5. Výsledky: HSV–1, překrytí tekutinou, sloučenina přidána ihned po pohlcení viru.

Tabulka 5 – Výsledky testu na HSV 1 s lékem č 1A

Koncentrace:	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
plaky 70	toxické	toxické	toxické	toxické	toxické
plaky 68					
plaky 58					
plaky 74					
Průměr: 70					

IC_{50}

Poznámky: Tyto jamky obsahovaly jemný precipitát pokrývající buňky. Benzalkonium chlorid pravděpodobně precipituje s proteinem média.

Tabulka 6 – Výsledky testu na HSV 1 s lékem č. 2A

Koncentrace:	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
plaky 72	–	–	–	9*	12*
plaky 74	–	–	–	7	8
plaky 79	–	–	–	4	12
plaky 71	–	–	–	7	11
Průměr: 70					

IC_{50}>1:32

Poznámky: Ačkoliv se objevily některé plaky, byly velmi malé.

Tabulka 7 – Výsledky testu na HSV 1 s lékem č. 3A

Koncentrace:	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
plaky 72	toxické	toxické	toxické	toxické	–*
plaky 68					–
plaky 67					–
plaky 70					–
Průměr: 70					

IC_{50}>1:32

Poznámky: Ačkoliv se objevila určitá toxicita, lék byl velmi účinný ve virové inhibici, žádné plaky se neobjevily.

Příklady 21 až 24

Tři 24–jamkové plotny byly naočkovány fibroblasty.

Testovaný lék č. 1B = Surfaktant benzalkonium chlorid ve vodném rozpouštědle. Surfaktant benzalkonium chlorid byl připraven ředěním ve vodě v poměru 1:1000 (10 µl ve 12,0 ml sterilní vody). Před použitím byl filtrován a naředěn v ekvivalentním objemu 2xMEM a pro ředění 1:2000 v 1xMEM (500 µl léku plus 500 µl 2xMEM).

Testovaný lék č. 2B = Prášek Echinacea purpurea (fytochemikálie) ve vodném roztoku. Tento přípravek byl roztok o koncentraci 50 mg/ml (250 mg v 5,0 ml vody) prášku *Echinacea purpurea* ve sterilní vodě. Tato směs se nechala míchat a chladit po dobu čtyř hodin. Tento práškový přípravek Echinacea byl před použitím centrifugován při 3500 otáčkách za minutu po dobu 15 minut při teplotě 10 °C, filtrován a naředěn v ekvivalentním objemu 2xMEM a pro výrobu neředěného přípravku v 1xMEM (500 µl léku plus 500 µl 2xMEM).

Testovaný lék č. 3B = Prášek Echinacea purpurea (fytochemikálie) rozpuštěný v surfaktantu benzalkonium chlorid. Tento přípravek byl roztok o koncentraci 50 mg/ml (250 mg v 5,0 ml benzalkonium chloridu, 1:1000). Tato směs se nechala míchat a chladit po dobu čtyř hodin. Fytochemikálie a surfaktant byly před použitím centrifugovány při 3500 otáčkách za minutu po dobu

15 minut při teplotě 10 °C, filtrována a potom naředěna v ekvivalentním objemu 2xMEM a pro výrobu neředěného přípravku v 1xMEM. (500 µl léku plus 500 µl 2xMEM).

Testovaný lék č. 4B = Prášek Echinacea purpurea (fytochemikálie) ve vodném roztoku (rozpouštědle) a potom smíchaný se surfaktantem benzalkonium chloridem v poměru 1:1000. Tento přípravek byl roztok o koncentraci 50 mg/ml (250 mg v 5,0 ml ve vodě) prášku *Echinacea purpurea* ve sterilní vodě. Tato směs se nechala míchat a chladit po dobu čtyř hodin. Vodné fytochemikálie byly před použitím centrifugovány při 3500 otáčkách za minutu po dobu 15 minut při teplotě 10 °C a filtrován. Přípravek se potom naředil v ekvivalentním objemu benzalkonium chloridu v poměru 1:1000 za vzniku směsi Echinacea – benzalkonium chlorid. Směs se potom naředila s ekvivalentním objemem 2xMEM za vzniku přípravku v poměru 1:4 v 1xMEM. (500 µl léku č. 1 plus 500 µl 2xMEM).

1. K ověření čtyř přípravků léku byly použity čtyři plotny. K ověření protivirové aktivity bylo zapotřebí koncentrace: 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 a 1:320 v 1xMEM. V každé plotně byly čtyři kontrolní jamky, které obsahovaly MEM bez léku.

2. Z jamek se odstranila růstová média a do každé jamky horních dvou řádků každé plotny se přidalo 200 µl HSV–1. HSV–1 byl naředěn v poměru 1:5000 (2,0 µl kmene HSV–1 v 10 MEM). Virový titr byl $3x10^6$ na ml. Do každé jamky dolní poloviny plotny se přidalo 200 µl HSV–2. HSV–2 byl naředěn v poměru 1:2000 (5,0 µl kmene HSV–2 v 10 ml MEM). Virový titr byl $6x10^5$ na ml.

3. Plotny se nechaly inkubovat při teplotě 37 °C po dobu čtyř hodin.

4. Odstranila se očkovací látka a do čtyř jamek se přidal 1 ml MEM obsahující léky č. 1 až 4.

Tabulka 8

Koncentrace:	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320
Lék (µl):	400	200	100	50	25
MEM (µl):	3600	3800	3900	3950	3975

5. Výsledky: HSV–1, překrytí tekutinou, léky přidány ihned po pohlcení viru.

Tabulka 9 – Výsledky testu na HSV 1 s lékem č. 1B

Koncentrace:	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320
plaky 37	toxické	toxické	toxické	toxické	15?*
plaky 45					18?*
Průměr: 41				IC_{50}	

Poznámky: Mírné toxické, bylo obtížné test odečítat.

Výsledky: HSV–1, překrytí tekutinou, léky přidány ihned po pohlcení viru.

Tabulka 10 – Výsledky testu na HSV 2 s lékem č. 1B

Koncentrace:	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320
plaky 38	toxické	toxické	toxické	toxické	21
plaky 42					17
Průměr: 40					19
				IC_{50}>1:320	

Poznámky: Test byl příliš toxický aby poskytl dobré odečítání.

Tabulka 11 – Výsledky testu na HSV 1 s lékem č. 2B

Koncentrace:	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320
plaky 39	2*	8*	23*	24*	44
plaky 40	3	18	11	28	38
Průměr: 40	3	13	17	26	
				IC_{50}>1:80	

Poznámky: malé plaky.

Tabulka 12 – Výsledky testu na HSV 2 s lékem č. 2B

Koncentrace:	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320
plaky 48	21	33			
plaky 52	22	38			
Průměr: 50	21,5	35,5			
				IC_{50}>1:20	

Tabulka 13 – Výsledky testu na HSV 1 s lékem č 3B

Koncentrace:	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320
plaky 44	1*	17	31	37	
plaky 46	–	16	28	27	
Průměr: 45	–	17	30	32	
				IC_{50}>1:40	

Poznámky: Ačkoliv se objevila určitá toxicita, lék byl velmi účinný ve virové inhibici, žádné plaky se neobjevily.

Tabulka 14 – Výsledky testu na HSV 2 s lékem č 3B

Koncentrace:	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320
několik buněk	11*	27	30	35	
plaky 44	10	32			
Průměr: 44	11	29,5			
				IC_{50}>1:20	

Poznámky: Obtížný test pro dobré odečítání. Nicméně lék vykazoval úspěšnou inhibiční aktivitu.

Tabulka 15 – Výsledky testu na HSV 1 s lékem č 4B

Koncentrace:	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640
plaky 47	toxické	toxické	toxické	33	
plaky 48			28		
Průměr: 48			30		
				IC_{50}>1:320	

Poznámky: Příliš toxické při vyšších hladinách. Nicméně inhibiční aktivita byla při 1:320.

Tabulka 16 – Výsledky testu na HSV 2 s lékem č 4B

Koncentrace:	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640
plaky 38	toxické	toxické	toxické	2*	16
plaky 40				4	20
Průměr: 40				3	18
				IC_{50}>1:640	

Poznámky: Toxicita pravděpodobně z důvodu benzalkonium chloridu. Lék vykazoval při ředění 1:320 velmi silnou inhibiční aktivitu.

U *in vitro* testů v příkladech 21 až 24 se používalo surových látek bez úprav. Přesto však tyto testy prokázaly překvapivě dobrou virovou inhibiční aktivitu a pravděpodobně synergii mezi složkami.

Předcházející in vitro testy, kde byly léky č. 3, 3A a 3B fytochemikálie Echinacea purpurea extrahovány a kombinovány se surfaktantem benzalkonium chloridem, výsledné léčivo prokázalo větší protivirovou aktivitu a nejznamenitěji prokázalo synergii mezi složkami: Echinacea purpurea a benzalkonium chloridem. Toto se pravděpodobně může vysvětlit podílem stability a zlepšené reaktivity mezi dvěma složkami. Benzalkonium chlorid v synergické směsi vykazoval menší stupeň toxicity a synergická kombinace (léčivo) větší stupeň protivirové aktivity, zvláště u HSV–2.

Testy HIV

Viracea–1 a Viracea–2 byly testovány pro zhodnocení anti–HIV aktivity u modelu akutní infekce. Byly provedeny další testy k určení rozsahu a mechanismu působení dvou látek.

Látky Viracea–1 a Viracea–2 byly používány ve formě roztoků. Formulace zahrnovaly filtrování roztoku a centrifugaci. Vysoká testovaná koncentrace použitá v každém testu se měnila od ředění 1:5 až po 1:100 v médiu tkáňové kultury. Každá látka byla před použitím skladována při teplotě 70 °C.

Pomnožování a kvantifikace buněčných linií a virových kmenů

Buňky, které se používaly při testech k ověřování látek, byly buňky buněčné linie CEM–SS. Tyto buňky jsou vysoce citlivé na infekci HIV, rychle vytvářejí mnohojaderné shluky a posléze jsou usmrceny HIV. Tyto buňky se jednoduše uchovávají (2 až 7 x 10^3 buněk na ml) v médiu tkáňové kultury RPMI 1640 s 10% fetálním hovězím sérem, glutaminem a antibiotiky. Tyto buňky se pasážují dvakrát týdně při ředění 1:20. Číslo pasážování se každý týden zaznamenává a buňky se vyřazují po dvaceti týdnech pasážování a čerstvé CEM–SS buňky se rozehřejí a používají v testech. Kmeny CEM–SS buněk se zamrazí v tekutém dusíku v 1 ml NUNC zkumavkách v 90 %

fetálního telecího séra a 10 % dimethylsulfoxidu (DMSO). Následně po rozmrazení po dvou týdnech v kultuře jsou buňky běžně připraveny k použití v testech primárního ověřování. Před nahrazením později pasážované buněčné linie jsou nové CEM–SS buňky testované ověřovacím testem za použití stávajícího kmene infekčního viru a AZT. Pokud se infekčnost viru u nových buněk významně odlišuje nebo pokud se ukáže, že AZT je méně účinné, než se očekávalo, nové buňky se v ověřovacím programu nepoužijí. Mycoplasmatické testování se běžně provádělo na všech buněčných liniích (viz výše).

Jednotlivé várky viru se připravují a titrují na CEM–SS buňkách, uloží se do 5 ml alikvotních zkumavek a zamrazí se při teplotě –135 °C. Nepoužitý virus se po rozmrazení vyhazuje, aby se předešlo změnám v infekčním titru. Testy optimalizace prokázaly, že dochází k redukci virového titru o jeden řád při prvním cyklu rozmrazení a méně výraznému snižování titru při následujících cyklech zmrazování–rozmrazování. Dávky viru se připravují akutní infekcí 5×10^5 CEM–SS buněk pomocí HIV v objemu 200 µl při několikanásobné infekci, která zajistí kompletní usmrcení buněk do 7 dnů po infekci (přibližně 0,05 pro izolát III_B HIV–1 a 0,01 pro izolát RF HIV–1). Infekce se nechá působit po dobu jedné hodiny při teplotě 37 °C a potom se buňky přemístí do nádoby T25 a objem se zvýší na 2 ml. První den po infekci se objem zvýší na 5 ml a druhý den se zvýší na 10 ml. Počátkem čtvrtého dne se buňky peletují, supernatant se stáhne a buňky se resuspendují do média tkáňových kultur v čerstvé 10ml alikvotní zkumavce. Kompletní denní výměny média, dovolující růst buněk v médiu po delší dobu a umožňují použití očkovací látky k primárním testům s neochuzeným živným médiem při infikování buněk. Barvicí utilizační reakce vyžaduje, aby zůstaly koncentrace glukózy vysoké. V jamkách, ve kterých se při buněčném růstu spotřebovala glukóza nedochází k metabolické konverzi tetrazoliového barviva na formazan.

Supernatant bez buněk z akutně infikovaných buněk se sbírá 4., 5., 6. a 7. den. Alikvotní zkumavka supernatantu z každého dne se uchovává odděleně za účelem stanovení titru. Mezi stanovení titru patří test na stanovení aktivity reverzní transkriptázy, end–point titrace a test na kvantifikaci infekčních částic (CEM–SS) a kvantifikace kinetiky usmrcování buněk. Bylo zjištěno, že vrcholové hladiny infekčního viru se tvoří v akutně infikovaných kulturách, když se viabilita buněk snižuje na 50% úroveň. Primární vyhledávací test stanovuje kvantitativně ochranný účinek testované látky tak, že se hodnotí její schopnost inhibovat virem HIV způsobený cytopatický efekt. Stanovuje se množství viru potřebného na jednu jamku k usmrcení CEM–SS buněk v šesti dnech, které se běžně spotřebuje, určuje množství viru potřebného na jednu jamku. V primárním vyhledávacím testu XXT se titruje várka z každého dne tak, že se provede dvakrát ředění viru počínaje vysokými koncentracemi 50 µl viru na jednu jamku. Ke stanovení přesného množství viru potřebného k usmrcení všech buněk CEM–SS v každé jamce se používá metoda barvení pomocí tetrazoliového barviva a toto minimální množství viru se používá při provádění všech primárních testů. Stejné metody se používají k laboratorní přípravě všech virových izolátů, včetně laboratorně upravených kmenů HIV–1, HIV–2 a STV. Používané klinické izoláty se pasážují na čerstvých lidských buňkách a metody růstu těchto buněk a pomnožování virového fondu je popsán níže.

Mikrotitrační antivirový XTT test

Příprava buněk

V těchto pokusech se používají buňky CEM–SS nebo jiné vypěstované lidské buněčné linie, které byly pasážovány v lahvích T–150. Den před zahájením testu se buňky rozdělily v poměru 1:2, aby se zajistilo, že budou ve fázi exponenciálního růstu v době infekce. V den testu se buňky dvakrát promyjí pomocí tkáňového kultivačního média a resuspendují se v čerstvém tkáňovém kultivačním médiu. Stanoví se počet buněk a jejich životaschopnost pomocí hemacytometru a vyloučením barvivem trypanové modři. Životaschopnost buněk potřebných k testu byla větší než 95 %. Buňky se nechaly shlukovat a resuspendovaly se na $2,5 \times 10^4$ buněk na jeden ml tkáňového kultivačního média. Buňky v objemu 50 µl se přidaly do ploten, které obsahovaly lék.

Příprava viru

Předtitrovaná alikvotní zkumavka s virem se vyndala z mrazáku (–80 °C) a nechala se v biologicky zabezpečené skříňce pomalu rozmrazovat na teplotu místnosti. Tento virus se resuspendoval a naředil v tkáňovém kultivačním médiu tak, že množství viru přidaného do každé jamky o objemu 50 µl je stanovené množství, které zajišťuje kompletní usmrcení buněk do 6 dnů po infekci. Obecně se virový fond produkuje pomocí izolátu IIIB HIV viru tak, že se přidá 5 µl viru na jednu jamku. Fond RF viru byl opět až desetkrát silnější, bylo zapotřebí 0,5 až 1 µl na jednu jamku. Výpočet $TCID_{50}$ pomocí end–point titrace v CENM–SS buňkách dokazuje, že mnohočetnost infekce se u těchto testů pohybuje v rozmezí 0,005 až 2,5.

Formát plotny

Formát plotny je standardizovaný a obsahuje kontrolní jamky na buňky (pouze buňky), kontrolní jamky na virus (buňky plus virus), kontrolní jamky na toxicitu léku (buňky plus lék) a stejně tak i experimentální buňky (lék plus buňky plus virus).

Příklady 25 až 48

XTT barvení vyhledávacích ploten

Po 6 denní inkubaci při teplotě 37 °C v inkubátoru s 5% CO_2 byly plotny analyzovány barvením pomocí tetrazoliového barviva XTT. XTT–tetrazolium je metabolizováno mitochondriálními enzymy metabolicky aktivních buněk na rozpustný formazan, který umožňuje rychlé kvantitativní stanovení inhibice HIV indukovaných buněk usmrcených látkami anti–HIV. 6. den po infekci se plotny vyndaly z inkubátoru a sledovaly se. Používání mikrotitračních ploten s kulatým dnem umožňuje rychlé makroskopické stanovení aktivity dané látky tím, že se hodnotí velikost shlukování. Výsledky makroskopického pozorování byly potvrzeny další mikroskopickou analýzou. Roztok XTT se připravoval do zásoby v koncentraci 1 mg/ml v PBS. Roztok fenazinmethosulfátu (PMS) se připravoval v koncentraci 15 mg/ml v PBS a skladoval se v temnu při teplotě –20 °C, zásoba XTT/PMS se připravovala hned před použitím naředěním PMS v poměru 1:100 v PBS a přidáním roztoku XTT v množství 40 µl na 1 ml. Padesát mikrolitrů XTT/PMS se přidalo do každé jamky a plotna se nechala znovu inkubovat po dobu 4 hodin při teplotě 37 °C. Místo víčka se používaly samolepicí fólie, zalepené plotny se několikrát obrátily, aby se promíchal rozpuštěný formazan a potom se odečítaly spektrofotometrem při vlnové délce 450 nm pomocí čtečky Molecular Devices Vmax. Použitím % CPE redukce, % životaschopnost buněk, $IC_{25,\ 50\ \&\ 95}$ se vypočítaly další parametry.

TABULKA 17
ANTIVIROVÉ VÝSLEDKY IN VITRO
TEST XTT
PRO VIRACEA 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Pozadí reagencií						Plastové pozadí					
0,169	0,160	0,160	0,159	0,154	0,167	0,066	0,063	0,058	0,061	0,063	0,067
Tox	cc/vc	Pokusné vysoké konc.			Tox	Tox	Pokusné nízké koncentr.			cc/vc	Tox
1,498	1,461	0,196	0,378	0,278	1,466	1,474	0,204	0,211	0,208	1,517	1,511
1,392	1,461	0,192	0,196	0,293	1,414	1,479	0,205	0,247	0,185	1,496	1,497
1,333	1,426	0,318	1,410	1,372	1,356	1,482	0,242	0,182	0,215	1,478	1,519
1,208	0,219	1,134	1,181	1,110	1,206	1,487	0,219	0,208	0,215	0,189	1,512
1,032	0,193	0,940	0,828	0,968	0,944	1,480	0,192	0,207	0,254	0,309	1,506
0,656	0,222	0,596	0,582	0,544	0,572	1,464	0,206	0,254	0,186	0,184	1,468
Kolorimetrické pozadí - nízké koncentrace						Kolorimetrické pozadí - vysoké koncentrace					
0,289	0,182	0,168	0,171	0,166	0,167	0,163	0,173	0,172	0,166	0,164	0,180

TABULKA 18
VIRACEA 1

STRN RF

Reagencie	0,62	Lék Viracea 1	25%	50%	95%
Virová kontrola	0,058	TC	1:66	1:18.5	1:10
Buněčná kontrola	1,312	IC	1:625	1:400	
Rozdíl	1,254	Antivirový index	9,47	21,6	

TABULKA 19
VIRACEA 1

	Lék Viracea 1		Hodnoty antivirového testu		Hodnoty testu cytotoxicity		
	Řada desky	Konc. (μm)	Půměr O.D.	% červen. ve virové CPE	Průměr O.D	% životasch buněk	Kolorimetrická kontrola
Na podkladě sloupců 7 až 12 (pravá strana desky)	Níz. B	0,00003	-.030	0%	1,313	100%	0,018
	C	0,0001	-.010	0%	1,324	100%	0,003
	D	0,00032	-.011	0%	1,334	100%	0,005
	E	0,001	-.015	0%	1,328	100%	0,010
	F	0,0032	-.013	0%	1,321	100%	0,011
	G	0,01	-.006	0%	1,303	99%	0,002
Na podkladě sloupců 1 až 6 (levá strana desky)	B	0,032	0,059	5%	1,315	100%	0,006
	C	0,1	0,003	0%	1,237	94%	0,005
	D	0,32	0,804	64%	1,173	89%	0,010
	E	1	0,915	73%	1,039	79%	0,007
	F	3,2	0,673	54%	0,807	62%	0,020
	Vys. G	10	0,228	18%	0,326	25%	0,127

TABULKA 20
ANTIVIROVÉ VÝSLEDKY IN VITRO
TEST XTT
PRO VIRACEA 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Pozadí reagencií						Plastové pozadí					
0,169	0,163	0,164	0,166	0,160	0,170	0,074	0,072	0,067	0,067	0,067	0,068
Tox	cc/vc	Pokusné vysoké koncentr			Tox	Tox	Pokusné nízké koncentr			cc/vc	Tox
1,468	1,421	0,461	0,257	1,170	1,467	1,501	0,207	0,222	0,214	1,506	1,503
1,321	1,397	1,316	0,209	0,191	1,340	1,494	0,200	0,202	0,204	1,446	1,487
0,906	1,345	0,249	0,764	0,836	0,953	1,485	0,227	0,179	0,179	1,453	1,500
0,219	0,256	1,190	0,207	0,210	0,234	1,491	0,204	0,190	0,228	0,192	1,506
0,168	0,190	0,161	0,161	0,148	0,157	1,503	0,237	0,195	0,202	0,186	1,501
0,242	0,223	0,238	0,239	0,230	0,242	1,495	0,201	0,204	0,227	0,189	1,503
Kolorimetrické pozadí - vysoké koncentrace						Kolorimetrické pozadí - nízké koncentrace					
0,258	0,172	0,159	0,165	0,163	0,165	0,165	0,166	0,166	0,171	0,159	0,169

TABULKA 21
VIRACEA 2

STRN RF

Reagencie	0,165	Lék Viracea 2	25%	50%	95%
Virová kontrola	0,041	TC	1:450	.250	1:100
Buněčná kontrola	1,263	IC	1:900		
Rozdíl	1,222	Antivirový index	2,02		

TABULKA 22
VIRACEA 2

	Lék Viracea 2		Hodnoty antivirového testu		Hodnoty testu cytotoxicity		
	Řada desky	Konc. (μm)	Půměr O.D.	% červen. ve virové CPE	Průměr O.D	% životasch buněk	Kolorimetrická kontrola
Na podkladě sloupců 7 až 12 (pravá strana desky)	Níz. B	0,00003	0,004	0%	1,335	100%	0,004
	C	0,0001	0,002	0%	1,331	100%	-,006
	D	0,00032	-,017	0%	1,321	100%	0,006
	E	0,001	0,000	0%	1,332	100%	0,001
	F	0,0032	0,004	0%	1,336	100%	0,001
	G	0,01	0,005	0%	1,334	100%	0,000
Na podkladě sloupců 1 až 6 (levá strana desky)	B	0,032	0,090	7%	1,302	100%	0,000
	C	0,1	0,368	30%	1,167	92%	-,002
	D	0,32	0,410	34%	1,764	61%	0,000
	E	1	0,002	0%	1,067	5%	-,006
	Vys. F	3,2	-,056	0%	-,010	0%	0,007
	G	10	-,063	0%	-,016	0%	0,093

Příklady 49 až 54

Test na stanovení aktivity reverzní transkriptázy

Byla použita mikrotitrační reakce reverzní transkriptázy. Tritiem značený thymidin trifosfát (NEN) (TTP) byl resuspendován v destilované H_2O při 5 Ci/ml. Poly rA a oligo dT byly připraveny do zásoby ve formě roztoků a skladovaly se při teplotě –20 °C. Reakční RT pufr se připravoval denně čerstvý a obsahoval 125 µl 1M EGTA, 125 µl dH_2O, 125 µl Triton X–100, 50 µl 1M Tris (pH 7,4), 50 µl 1M DTT a 40 µl 1M $MgCl_2$. Tyto tři roztoky se smíchaly dohromady v poměru 1 díl TTP, 2,5 dílů poly rA: oligo dT, 2,5 dílů reakčního pufru a 4 díly destilované vody. Deset mikrolitrů této reakční směsi se dalo na kruhové dno mikrotitrační plotny, přidalo se 15 µl supernatantu obsahujícího virus a obojí se smíchalo. Plotna se nechala inkubovat při teplotě 37 °C po dobu 60 minut. Po reakci se celý objem nakapal na filtrační papír, 6–krát se promyl po dobu 5 minut v 5% sodno fosfátového pufru a 2–krát po dobu 1 minuty v destilované vodě, 2–krát po dobu 1 minuty v 70% ethanolu a potom se nechal usušit. Potom se filtrační papír vložil do plastikového sáčku. Přidala se scintilační tekutina a sáček se teplem zavařil. Zachycená radioaktivita se měřila kvantitativně za pomoci scintilačního počítače Wallac Microbeta.

TABULKA 23
VIRACEA –1: PBMC/ROJO

AKTIVITA REVERZNÍ TRANSKRIPTÁZY										
Konc.	1:0	1:100,000	1:32,000	1:10,000	1:3200	1:1000	1:320	1:100	1:32	1:10
Vzorek 1	28139	31490	35838	42526	39967	38024	20042	12715	415	1742
Vzorek 2	24587	35989	35757	32780	34191	25895	16677	7587	12495	12513
Vzorek 3	32527	34334	34782	31899	43755	34038	28838	10896	4251	7551
Vzorek 4	28418	33938	35459	35768	39304	32652	21852	10399	5720	7269
%VC	100,0	119,4	124,8	125,9	138,3	114,9	76,9	36,6	20,1	25,6

TABULKA 24
VIRACEA –1: PBMC/ROJO

HODNOTY TOXICITY										
Konc.	1:0	1:100,000	1:32,000	1:10,000	1:3200	1:1000	1:320	1:100	1:32	1:10
Vzorek 1	2,029	2,167	2,200	2,137	1,975	2,025	0,966	0,764	0,840	1,033
Vzorek 2	2,120	2,234	2,169	2,203	2,263	1,895	1,009	0,696	0,916	1,058
Vzorek 3	1,879	2,176	2,160	2,053	2,038	1,847	0,916	0,734	0,768	1,128
Vzorek 4	2,009	2,192	2,176	2,131	2,092	1,922	0,964	0,731	0,841	1,073
%VC	100,0	109,1	108,3	106,1	104,1	96,7	48,0	38,4	41,9	53,4

TABULKA 25
VIRACEA –2: PBMC/ROJO

AKTIVITA REVERZNÍ TRANSKRIPTÁZY										
Konc.	1:0	1:100,000	1:32,000	1:10,000	1:3200	1:1000	1:320	1:100	1:32	1:10
Vzorek 1	28139	31734	36488	34880	31240	2287	7436	463	96	38
Vzorek 2	24587	27559	33120	23103	33408	20550	9478	265	103	81
Vzorek 3	32527	24114	23828	28137	23174	25825	11132	309	77	55
Vzorek 4	28418	27802	31145	26677	29274	16221	9349	346	92	58
%VC	100,0	97,8	109,6	100,9	103,0	57,1	32,9	1,2	0,3	0,2

TABULKA 26
VIRACEA –2: PBMC/ROJO

HODNOTY TOXICITY										
Konc.	1:0	1:100,000	1:32,000	1:10,000	1:3200	1:1000	1:320	1:100	1:32	1:10
Vzorek 1	2,029	1,547	1,460	1,488	1,345	1,354	0,860	0,546	0,429	0,611
Vzorek 2	2,120	1,503	1,548	1,622	1,902	1,489	0,971	0,529	0,434	0,627
Vzorek 3	1,879	1,364	1,463	1,720	1,649	1,223	0,772	0,451	0,433	0,633
Vzorek 4	2,009	1,471	1,490	1,610	1,632	1,355	0,868	0,509	0,432	0,624
%VC	100,0	73,2	74,2	80,1	81,2	67,5	43,2	25,3	21,5	31,0

ELISA

Soupravy ELISA byly zakoupeny od firmy Coulter. Test se provádí podle návodu od výrobce. Před testem ELISA se rutinně prováděly testy na stanovení aktivity reverzní transkriptázy a hodnoty byly použity pro zachycenou radioaktivitu v testu na stanovení aktivity RT pro určení ředění vzorků potřebné pro ELISA. Při každém testu byly vytvořeny kontrolní křivky, aby bylo přesně kvantitativně stanoveno množství kapsidového proteinu v každém vzorku. Údaje se získávaly spektrofotometrickou analýzou při 450 nm za použití čtečky ploten Molecular Devices Vmax. Počítala se koncentrace p24 z hodnot optické denzity za použití balíku programů firmy Molecular Devices Soft Max.

Infekční částice

Infekční virové částice se stanovovaly kvantitativně za použití testu CEM–SS plaků a testu kvantitativní infektivity pro HIV–1 a HIV–2. Mikrotitrační plotny s 96 jamkami s plochými dny se potahovaly pomocí 50 µl poly–L–lysinu v 50 µg/ml po dobu 2 hodin při teplotě 37 °C. Jamky se potom propláchly pomocí PBS a 2,5 x 10^5 CEM–SS buněk se dalo do jedné mikrotitrační jamky, které se přichytily na dno plotny. Přidal se dostatek buněk, aby se v každé jamce vytvořila jednoduchá vrstva buněk CEM–SS. Do každé jamky XTT fáze se přidal supernatant obsahující virus, včetně virových a buněčných kontrol a včetně každého sériového ředění testované látky. 4 dny po infekci byl stanovován počet shluků kvantitativně na plochém dnu 96–jamkové plotny pomocí inverzního mikroskopu Olympus CK2. Každé syncytium vzniklo z jednoho infekčního HIV virionu.

Anti–HIV aktivita u čerstvých lidských buněk: Test na čerstvých lidských T–lymfocytech

Čerstvé lidské lymfocyty periferní krve (PBL) byly izolovány od dárců Červeného kříže, seronegativních na HIV a HBV. Leukoforezovaná krev byla naředěna 1:1 fosfátem pufrovaným fyziologickým roztokem (dle Dulbecca) (PBS) a převrstvena přes 14 ml Ficoll–Hypaque hustotního gradientu v 50 ml centrifugační zkumavce. Zkumavky byly centrifugovány po dobu 30 minut při 600 G. Shluky PBL se opatrně odsály z výsledného rozhraní a následně se 2–krát promyly pomocí PBS centrifugací při nízkých otáčkách. Po posledním promytí se buňky spočítaly vyloučením pomocí trypanové modři a resuspendovaly v 1 x 10^7/ml v RPMI 1640 s 15% fetálním hovězím sérem (FBS), 2 mM L–glutaminu, 4 µg/ml PHA–P a nechaly se inkubovat po dobu 48 až 72 hodin při teplotě 37 °C. Po inkubaci se PBL nechaly centrifugovat a znovu se nasadily do RPMI 1640 s 15% fetálním hovězím sérem (FBS), 2 mM L–glutaminu, 100 IU/ml penicilinu, 100 µg/ml streptomycinu, 10 µg/ml gentamycinu a 20 IU/ml rekombinantního lidského IL–2. PBS se přechovávaly v tomto médiu až do použití v koncentraci 1 až 2 x 10^6/ml, médium se dvakrát týdně vyměňovalo.

Pro test PBL se získaly buňky stimulované pomocí PHA–P alespoň od dvou normálních dárců, umístily se do čerstvého média v koncentraci 2 x 10^6/ml, daly se do jamek 96–jamkové mikrotitrační desky s kruhovými dny v množství 50 µl/jamku. Ředění testovaných léků se připravovala ve 2 násobné koncentraci v mikrotitračních zkumavkách a 100 µl každé koncentrace se nalilo do příslušných jamek standardního formátu. Do každé testovací jamky se dalo 50 µl předem určeného ředění virového kmene. Jako virové kontroly se použily jamky s buňkami a samotným virem. Jednotlivé desky se připravily identicky bez viru pro sledování toxicity léku za použití testovacího systému XTT.

Při standardním PBL testu (MOI: 0,2) test končí 7. den po sesbírání vzorku supernatantu bez buněk pro testy na stanovení aktivity reverzní transkriptázy. Při nízkém MO PBL testu (MOI: 0,02) se sbíraly vzorky supernatantu 6., 11. a 14. den po infekci a testovaly se aktivitu RI. Tritiem značený thymidin trifosfát (NEN) (TTP) byl resuspendován v destilované H_2O při 5 Ci/ml. Poly rA a oligo dT byly připraveny do zásoby ve formě roztoků a skladovaly se při

teplotě –20 °C. Reakční RT pufr se připravoval denně čerstvý a obsahoval 125 µl 1M EGTA, 125 µl dH_2O, 110 µl 10% SDS, 50 µl 1M Tris (pH 7,4), 50 µl 1M DTT a 40 µl 1M $MgCl_2$. Tyto tři roztoky se smíchaly dohromady v poměru 2 díly TTP, 1 díl poly rA:oligo dT, 1 díl reakčního pufru. Deset mikrolitrů této reakční směsi se dalo na kruhové dno mikrotitrační plotny, přidalo se 15 µl supernatantu obsahujícího virus a obojí se smíchalo. Plotna se nechala inkubovat při teplotě 37 °C po dobu 60 minut ve vodní lázni s pevnou oporou, aby se předešlo potopení plotny. Po reakci se celý objem nakapal na filtrační papír DE81, 5–krát se promyl po dobu 5 minut v 5% snadno fosfátovém pufru a 2–krát po dobu 1 minuty v destilované vodě, 2–krát po dobu 1 minuty v 70% ethanolu a potom se nechal usušit. Do každého vzorku se přidal Opti–Fluor O a zachycená radioaktivita se měřila kvantitativně za pomoci scintilačního čítače pro tekutiny 1450 Microbeta-plus.

Zachycení tritiem značeného thymidinu se měřilo v paralelních kulturách 7. den. Každá jamka byla iniciována dávkou 1 µCi tritiovaného thymidinu a buňky se sbíraly o 18 hodin později pomocí sběrače buněk Skarton na filtrační papír ze skleněných vláken. Filtry se usušily, umístily se do scintilační nádobky s 1 ml scintilačního koktejlu a zachycená aktivita se měřila kvantitativně na scintilačním čítači pro tekutiny Packard Tri–Carbh 1900 TR.

Příklady 55 až 78

Anti HIV aktivita u čerstvých lidských buněk: Test na čerstvých lidských monocytárních makrofázích

K izolaci přilnutých buněk se resuspendovalo 3 x 10^6 periferních krvinek nestimulovaných pomocí PHA v Hanksově pufrovaném fyziologickém roztoku s 10% lidským AB sérem doplňujícím vápník a hořčík. Buňky se ponechaly ve 24–jamkové mikrotitrační plotně po dobu 2 hodin při teplotě 37 °C. Nepřilnuté buňky se odstranily důkladným šestinásobným promýváním. Přilnuté buňky se kultivovaly po dobu 7 dnů v tkáňovém kultivačním médiu RPMI 1640 s 15% fetálním hovězím sérem. Kultury se po dobu inkubace pozorně monitorovaly na splývání buněk. Provedla se nákaza buněk pomocí monocytotropických kmenů HIV–1 BaL nebo ADA, a to přizpůsobenými dvojicemi virových izolátů AZT–senzitivními a AZT–rezistentními. Každý z těchto virových izolátů byl získán z NLAID AIDS Research and Reference Reagent Program. Vysoce titrové dávky každého z těchto virů se sbíraly z infikovaných kultur přilnutých periferních krvinek a zamrazily se v 1,0 ml alikvotních zkumavkách při teplotě –80 °C. Monocyto–makrofágové monovrstvy se nechaly infikovat 0,1 MOI. Látky sledované v monovrstvách se nechaly infikovat 0,1 MOI. Látky sledované v monocytomakrofágovém testu se přidaly k monovrstvám krátce před infekcí aby se maximalizovala schopnost těchto určitých aktivních látek.

Dva dny po infekci se médium slilo a kultury se dvakrát promyly pomocí kompletního média, aby se odstranil přebytečný virus. Přidalo se samotné čerstvé médium nebo médium obsahující příslušnou koncentraci léků a dále pokračovala inkubace po dobu dalších 5 dnů. 7. den po infekci byly provedeny testy pomocí XTT–tetrazolia nebo test pomocí trypanové modři na stanovení životaschopnosti buněk a testy HIV p24 ELISA na stanovení tvorby p24 dřeňového antigenu. Soupravy ELISA byly zakoupeny od firmy Coulter. U každého testu byly vytvořeny kontrolní křivky, aby bylo přesně kvantitativně stanoveno množství kapsidového proteinu v každém vzorku. Údaje se získávaly spektrofotometrickou analýzou při 450 nm za použití čtečky ploten Molecular Devices Vmax. Počítala se koncentrace p24 z hodnot optické denzity za použití balíku programů firmy Molecular Devices Soft Max.

TABULKA 27
TEST MAKROFÁGŮ NA VIRACEA 1
pg/ml Aktivita P-24

AZT kontrola					Viracea #1		
µmol	vs. ADA			Ředění	vs. ADA		
4	20,94	27,07	57,73	1:100	110,1	46,0	78,9
1,28	3,66	11,46	35,99	1:312	145,2	87,3	143,0
0,410	25,96	20,94	27,07	1:976	505,4	126,9	590,1
0,131	28,19	28,19	57,17	1:3051	811,9	98,4	652,5
0,042	34,87	79,47	105,70	1:9536	129,6	1055,0	1106,0
0,013	149,10	279,60	217,70	1:29802	1058,0	1098,0	1266,0
0,004	470,80	660,90	912,30	1:93132	1185,0	1067,0	1195,0
0,0014	919,00	1150,00	678,70	1:291038	1043,0	754,0	1287,0
0,0004	1005,00	1252,00	954,10	1:909494	1053,0	1035,0	712,7

TABULKA 28
TEST MAKROFÁGŮ NA VIRACEA 2
pg/ml Aktivita P-24

AZT kontrola					Viracea #2		
µmol		vs. ADA		Ředění		vs. ADA	
4	8,65	8,65	17,45	1:100	42,19	22,95	34,49
1,28	9,20	6,45	25,15	1:312	4,25	15,25	41,09
0,410	13,60	10,00	16,35	1:976	14,70	17,45	39,44
0,131	53,74	13,60	62,54	1:3051	63,64	26,25	48,79
0,042	82,89	72,44	96,63	1:9536	48,79	570,60	180,80
0,013	175,80	168,70	316,00	1:29802	278,60	243,50	450,80
0,004	914,90	891,20	499,20	1:93132	305,60	599,80	435,90
0,0014	821,90	594,80	983,10	1:291038	548,10	947,90	913,20
0,0004	1097,00	1160,00	1098,00	1:909494	814,80	790,60	820,80

TABULKA 29
TEST MAKROFÁGŮ NA VIRACEA 1
pg/ml Aktivita P-24

	AZT - kontrola				Viracea #1		
µmol	vs. XTT			Ředění	vs. XTT		
4	1,947	1,750	2,022	1:100	1,936	1,754	2,089
1,28	2,244	2,021	2,097	1:312	1,835	1,850	1,931
0,410	2,205	2,107	2,144	1:976	2,039	2,007	1,992
0,131	2,067	2,223	2,191	1:3051	2,040	1,710	1,903
0,042	2,357	2,175	2,339	1:9536	2,156	2,057	2,156
0,013	2,506	2,204	2,160	1:29802	2,073	1,573	1,858
0,004	2,372	2,325	2,191	1:93132	2,225	1,978	2,433
0,0014	2,558	2,091	1,884	1:291038	2,037	1,559	2,169
0,0004	2,037	2,389	2,166	1:909494	2,405	2,198	2,275

TABULKA 30
TEST MAKROFÁGŮ NA VIRACEA 2
Absorbance studie toxicity

	AZT kontrola				Viracea #1		
µmol	vs. ADA			Ředění	vs. ADA		
4	1,140	0,981	1,427	1:100	1,271	1,244	1,289
1,28	1,692	1,318	0,985	1:312	1,081	1,154	1,393
0,410	1,505	1,258	1,522	1:976	1,073	1,183	1,536
0,131	1,427	1,347	1,043	1:3051	1,482	1,032	1,518
0,042	1,534	1,725	1,720	1:9536	1,031	1,330	1,053
0,013	1,818	1,526	1,363	1:29802	1,344	1,449	1,497
0,004	1,578	1,112	1,034	1:93132	1,024	1,554	1,446
0,0014	1,386	1,350	1,133	1:291038	1,692	1,112	1,411
0,0004	1,451	1,081	1,342	1:909494	1,182	1,163	1,373

TABULKA 31
ANTI-HIV TEST MAKROFÁGŮ (P24)
Pro VIRACEA # 2 až 4

Aktivita P24 (pg/ml)										
Ředění	0	1:909494	1:291038	1:93132	1:29802	1:9536	1:3051	1:976	1:312	1:100
Vzorek 1	1366,8	1347	524,1	634,4	457,5	349,9	193,5	138	120,9	46,96
Vzorek 2	1366,8	1151	693,8	782,2	321,5	228	271,4	190,2	4,718	96,46
Vzorek 3	1366,8	1000	877,9	642,9	507	382,2	136,1	202,1	171,7	92,5
Průměr	1366,8	1166.0	695,6	686,5	428,7	320,0	200,3	176,8	99,1	78,5
%VC	100,0	85,3	51,1	50,2	31,4	23,4	14,7	12,9	7,3	5,8

TABULKA 32
VIRACEA # 2 až 4

Hodnota toxicity XTT (Absorbance)										
Ředění	0	1:909494	1:291038	1:93132	1:29802	1:9536	1:3051	1:976	1:312	1:100
Vzorek 1	3,293	3,85	3,606	3,787	3,693	3,657	2,927	3,134	3,131	3,393
Vzorek 2	3,293	3,005	3,662	3,542	3,685	3,828	3,408	2,833	3,074	3,263
Vzorek 3	3,293	3,457	3,648	2,59	2,808	2,558	2,735	2,932	2,892	3,345
Průměr	3,293	3,437	3,639	3,306	3,395	3,348	3,023	2,966	3,032	3,334
%CC	100,0	104,4	110,5	100,4	103,1	101,7	91,8	90,1	92,1	101,2

TABULKA 33
ANTI-HIV TEST MAKROFÁGŮ (P24)
Pro VIRACEA # 2 až 5

Aktivita P24 (pg/ml)										
Ředění	0	1:909494	1:291038	1:93132	1:29802	1:9536	1:3051	1:976	1:312	1:100
Vzorek 1	1298,2	1350	793.9	1001	515,9	274	196,3	65,8	16,28	3,904
Vzorek 2	1298,2	1350	858.6	851	780,4	393,3	102,9	110,2	38,79	16,28
Vzorek 3	1298,2	1454	1262	801,2	837,8	396,1	222,2	113,1	42,73	15,72
Průměr	1298,2	1384,7	971,5	884,4	711,4	354,5	173,8	96,4	32,6	12,0
%VC	100,0	106,7	74,8	68,1	54,8	27,3	13,4	7,4	2,5	0,9

TABULKA 34
VIRACEA # 2 až 5

Hodnota toxicity XTT (Absorbance)										
Ředění	0	1:909494	1:291038	1:93132	1:29802	1:9536	1:3051	1:976	1:312	1:100
Vzorek 1	3,139	3,459	3,568	3,567	3,634	3,562	3,134	3,311	3,171	2,974
Vzorek 2	3,139	3,018	3,295	3,505	3,533	3,359	2,833	3,313	3,133	2,909
Vzorek 3	3,139	3,21	3,261	3,263	3,297	3,051	2,932	2,829	3,151	3,35
Půměr	3,139	3,228	3,375	3,445	3,488	3,312	2,966	3,151	3,152	3,078
%CC	100,0	102,9	107,5	109.7	111,1	105,5	91,8	100,4	100,4	98,0

TABULKA 35
ANTI-HIV TEST MAKROFÁGŮ IN VITRO (P24)
Pro VIRACEA 1

P24 (pg/ml)										
Ředění	0	1:909494	1:291038	1:93132	1:29802	1:9536	1:3051	1:976	1:312	1:100
Vzorek 1	1171,0	712,7	1287,0	1196,0	1266,0	1106,0	652,5	590,1	143,0	78,9
Vzorek 2	1171,0	1035,0	754,0	1067,0	1098,0	1055,0	98,4	126,9	87,3	46,0
Vzorek 3	1171,0	1053,0	1043,0	1185,0	1058,0	129,6	811,9	505,4	145,2	110,1
Průměr	1171,0	933,6	1028,0	1149,0	1140,7	763,5	520,9	407,5	125,2	78,3
%VC	100,0	79,7	87,8	98,1	97,4	65,2	44,5	34,8	10,7	6,7

TABULKA 36
VIRACEA 1

Hodnota toxicity XTT (Absorbance)										
Ředění	0	1:909494	1:291038	1:93132	1:29802	1:9536	1:3051	1:976	1:312	1:100
Vzorek 1	2,275	2,275	2,169	2,433	1,856	2,156	1,903	1,992	1,931	2,089
Vzorek 2	2,275	2,198	1,559	1,978	1,573	2,057	1,710	2,007	1,850	1,754
Vzorek 3	2,275	2,405	2,037	2,225	2,073	2,156	2,040	2,089	1,835	1,936
Průměr	2,275	2,293	1,922	2,212	1,835	2,123	1,884	2,013	1,872	1,926
%CC	100,0	100.8	84,5	97,2	80,6	93,3	82,8	88,5	82,3	84,7

TABULKA 37
ANTI-HIV TEST MAKROFÁGŮ IN VITRO (P24)
Pro VIRACEA 2

P24 (pg/ml)										
Ředění	0	1:909494	1:291038	1:93132	1:29802	1:9536	1:3051	1:976	1:312	1:100
Vzorek 1	1045,9	820,80	913,20	435,90	450,80	180,80	48,78	39,44	41,09	34,49
Vzorek 2	1046,8	790,60	947,90	599,80	243,50	570,60	26,25	17,45	15,25	22,95
Vzorek 3	1045,8	814,80	548,10	305,60	276,60	48,79	63,64	14,70	4,25	42,19
Průměr	1045,8	808,7	803,1	447,1	324,3	266,7	46,2	23,9	20,2	33,2
%VC	100,0	77,3	76,8	42,8	31,0	26,6	4,4	2,3	1,9	3,2

TABULKA 38
VIRACEA 2

Hodnota toxicity XTT (Absorbance)										
Ředění	0	1:909494	1:291038	1:93132	1:29802	1:9535	1:3051	1:976	1:312	1:100
Vzorek 1	1,439	1,373	1,411	1,446	1,497	1,053	1,518	1,536	1,393	1,289
Vzorek 2	1,439	1,163	1,112	1,554	1,494	1,330	1,032	1,183	1,154	1,244
Vzorek 3	1,439	1,182	1,692	1,024	1,334	1,031	1,482	1,073	1,081	1,271
Průměr	1,439	1,239	1,405	1,341	1,442	1,138	1,344	1,264	1,209	1,268
%CC	100,0	86,1	97,6	93,2	100,2	78,1	93,4	87,8	84,0	88,1

Příklady 79 až 90

Testy inhibice vazby a splývání

U těchto testů se používaly HeLa–CD4–LTR–β–galaktózidázové buňky, které používají tat proteinem indukovanou transaktivaci β–galaktózidázového genu řízeného HIV–1 LTR (long terminal repeat) promotorem. Test byl použit jak ke kvantitativnímu stanovení vazby infekčního virionu na buňky, tak i na stanovení splývání buněk navzájem. Infikované buňky vytváří shluky, které se snadno mikroskopicky počítají po inkubaci s X–gal. Test na stanovení inhibice vazby zahrnoval umístění 1 x 10^4 HeLa–CD4–LTR–β–galaktózidázových buněk do 200 µl 96–jamkových mikrotitračních ploten s plochým dnem. Tyto buňky se nechaly přes noc inkubovat, odstranilo se médium a nahradilo se 100 µl různých koncentrací ISIS 5320 nebo kontrolní látky. O hodinu později se do každé jamky přidalo 100 µl média obsahujícího virus. Buňky se nechaly inkubovat další hodinu a monovrstva se důkladně promyla, aby se odstranil nenavázaný virus a extracelulární látka. Po 48 hodinách se buňky fixovaly a nabarvily pomocí X–gal. Modré mnohojaderné buňky se potom počítaly pod inverzním mikroskopem. Test na stanovení inhibice splývání buněk se také prováděl na 96–jamkových mikrotitračních plotnách s plochými dny. Do každé jamky se přidaly HeLa–CD4–LTR–β–galaktózidázové buňky (5 x 10^3) nechaly se inkubovat s testovanou látkou po dobu 1 hodiny před přidáním 5 x 10^3 HL2/3 buněk (28). Buňky se nechaly inkubovat po dobu dalších 48 hodin, potom se fixovaly a nabarvily pomocí X–gal. Modré shluky buněk se počítaly mikroskopicky. Barvení buněk se provádělo fixací buněk roztokem 1% formaldehydu a 0,2% glutaraldehydu a obarvením fixovaných buněk pomocí 4 µM ferrokyanidu draselného, 4µM ferrikyanidu draselného, 2 µM $MgCl_2$ a 0,4% X–gal v PBS. Exprese transaktivace β–galaktózidázy byla také monitorována pomocí ELISA: Extrakty buněk se připravovaly zmrazováním a rozmrazováním a β–galaktózidázová aktivita se měřila podle návodu výrobce. Výsledky ELISA testu se hodnotily kvantitativně spektrofotometricky při 450 nm za použití čtečky ploten Molecular Devices Vmax.

TABULKA 39

Test fúze Beta-gal: Viracea #1/SK1

Počet modrých buněk na jednu jamku							
Ředění	0	1:3200	1:1000	1:320	1:100	1:32	1:10
Vzorek 1	49,0	10,0	11,0	19,0	4,0	6,0	3,0
Vzorek 2	32,0	15,0	10,0	4,0	5,0	5,0	8,0
Vzorek 3	59,0	15,0	10,0	5,0	4,0	4,0	4,0
Průměr	46,7	13,3	10,3	9,3	4,3	5,0	5,0
% VC	100,0	28,6	22,1	20,0	9,3	10,7	10,7
STD DEV	29,3	6,2	1,2	18,0	1,2	2,1	5

TABULKA 40

Test fúze Beta-gal: Viracea #1/SK1

Tocixita v procentech							
Ředění	0	1:3200	1:1000	1:320	1:100	1:32	1:10
Vzorek 1	1,596	1,574	1,931	1,925	1,34	1,576	1,63
Vzorek 2	1,578	1,692	1,734	1,728	2,152	1,633	1,711
Vzorek 3	1,66	1,38	1,811	1,646	1,647	1,308	1,545
Průměr	1,612	1,649	1,825	1,768	1,946	1,672	1,629
% Viability	100,0	96,1	113,2	109,6	120,7	103,07	101,0

TABULKA 41
Test fúze Beta-gal: Viracea #2/SK1

Počet modrých buněk na jednu jamku							
Ředění	0	1:3200	1:1000	1:320	1:100	1:32	1:10
Vzorek 1	49,0	26,0	16,0	17,0	10,0	2,0	1,0
Vzorek 2	32,0	18,0	16,0	11,0	3,0	2,0	0,0
Vzorek 3	59,0	19,0	20,0	14,0	5,0	3,0	1,0
Průměr	46,7	21,0	17,3	14,0	6,0	2,3	0,7
% VC	100,0	45,0	37,1	30,0	12,8	5,0	1,4
STD DEV	29,3	9,3	4,9	6,4	7,7	1,2	1,2

TABULKA 42
Test fúze Beta-gal: Viracea #2/SK2

Tocixita v procentech (							
Ředění	0	1:3200	1:1000	1:320	1:100	1:32	1:10
Vzorek 1	1,441	1,59	1,965	1,972	1,799	1,932	0,829
Vzorek 2	1,5	1,543	1,83	1,835	1,897	1,386	0,882
Vzorek 3	1,425	1,536	1,839	1,867	2,036	1,615	0,758
Průměr	1,455	1,558	1,875	1,891	1,911	1,644	0,823
% životasch.	100,0	106,9	129,0	130,0	131,3	113,0	56,6

TABULKA 43

Test fúze Beta-gal: Viracea #1

Počet modrých buněk na jednu jamku							
Konc.	0	1:3200	1:1000	1:320	1:100	1:32	1:10
Vzorek 1	38,0	37,0	47,0	37,0	42,0	55,0	18,0
Vzorek 2	48,0	34,0	75,0	37,0	37,0	50,0	14,0
Vzorek 3	32,0	41,0	48,0	52,0	57,0	64,0	9,0
Průměr	39,3	37,3	56,7	42,0	45,3	56,3	13,7
% VC	100,0	94,9	144,1	106,8	115,3	143,2	34,7
STD DEV	20,5	8,9	40,4	22,0	26,5	18,0	11,5

TABULKA 44

Test fúze Beta-gal: Viracea #1

Tocixita v procentech γ							
Konc.	0	1:3200	1:1000	1:32	1:100	1:32	1:10
Vzorek 1	1,425	1,951	1,981	1,815	1,796	1,639	1,644
Vzorek 2	1,5	1,971	1,983	1,826	1,833	1,845	1,547
Vzorek 3	1,441	1,913	1,942	1,835	1,823	1,932	1,644
Průměr	1,455	1,945	1,969	1,825	1,817	1,872	1,612
% Viability	100,0	133,6	135,3	125,4	124,9	126,6	110,7

TABULKA 45
Test fúze Beta-gal: Viracea #2

Počet modrých buněk na jednu jamku							
Konc.	0	1:3200	1 :1000	1:320	1:100	1:32	1:10
Vzorek 1	38,0	64,0	50,0	56,0	40,0	50,0	0,0
Vzorek 2	48,0	56,0	77,0	54,0	53,0	54,0	0,0
Vzorek 3	32,0	44,0	46,0	42,0	48,0	47,0	0,0
Průměr	39,3	54,7	57,7	50,7	47,0	50,3	0,0
% VC	100,0	139,0	146,6	128,8	119,5	128,0	0,0
STD DEV	20,5	25,6	42,9	19,3	16,7	8,9	0,0

TABULKA 46
Viracea #2

Tocixita v procentech							
Konc.	0	1:3200	1:1000	1:320	1:100	1:32	1:10
Vzorek 1	1,425	1,998	1,87	1,85	1,592	0,956	0,174
Vzorek 2	1,5	1,911	1,959	1,904	1,645	0,988	0,174
Vzorek 3	1,441	1,976	1,902	1,939	1,623	0,965	0,182
Průměr	1,456	1,962	1,914	1,898	1,620	0,970	0,177
% životasch.	100,0	134,8	131,5	130,4	111,3	56,6	12,1

Test na stanovení topické mikrobicidní aktivity

Cervikální epiteliální buňky MEI 180 se daly dovnitř jamek 96–jamkových mikrotitračních ploten s plochým dnem o hustotě 5 x 10 buněk na jamku a nechaly se inkubovat přes noc. Chronicky infikované buňky H9 se léčily pomocí 200 μg/ml mitomycinu C v kompletním médiu po dobu jedné hodiny, důkladně se promyly a resuspendovaly se na 4 x 10^5 na ml. Použitá koncentrace mitomycinu C způsobila usmrcení chronicky infikovaných buněk během 48 hodin, což je dostatečná doba k mezibuněčnému přenosu viru na ME–180 buňky, avšak tato doba zajišťuje, že konečné množství viru nebude zahrnovat podíl od chronicky infikovaných buněk. Do každé jamky obsahující buňky ME 180 se přidaly antivirové látky a chronicky infikované buňky (2 x 10^4) a nechaly se inkubovat po dobu 6 hodin. Po kultivaci se monovrstva důkladně promyla a v době 24 a 48 hodin po infekci se přidalo čerstvé médium, aby se odstranily mrtvé lymfocyty. 6. den po infekci se odebraly vzorky supernatantu a analyzovaly se na virový obsah pomocí testu p24 ELISA.

Testy exprese CD4

Bylo provedeno stanovení efektu Viracea na expresi CD4 za použití standardní techniky průtokového cytometru. Buňky se léčily pomocí Viracea po dobu 1 hodiny při teplotě 37 °C v tkáňovém kultivačním médiu. Stručně, 10^6 buněk CEM–SS se nechalo inkubovat s nebo bez látky po dobu 60 minut při teplotě místnosti. Přidaly se anti–CD4 monoklonální protilátky (20 μl, 3 μg/ml) (Becton–Dickinson, San Jose, CA) a buňky se nechaly inkubovat při teplotě 4 °C po dobu 40 minut. Potom se buňky dvakrát propláchly pomocí PBS, resuspendovaly v 1 °C paraformaldehydu a analyzovaly za použití průtokového cytometru Becton–Dickinson FACSort.

Makromolekulární syntéza

Buňky CEM–SS se nechaly kultivovat v tripletu za přítomnosti nebo nepřítomnosti látky po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C v inkubátoru se zvlhčeným CO_2. Po 24 hodinách se ke kultuře přidalo 1 μCi [methyl–^{3}H]–thymidinu, [5–^{3}H]–uridinu nebo [3,4,5–^{3}H]–leucinu a inkubace se nechala probíhat po dobu dalších 8 hodin. Buňky se přendaly na filtrační papír ze skleněných vláken za použití sběrače buněk Skarton. Skleněná vlákna se promyla destilovanou vodou, vložila se do scintilační nádobky a kvantitativně se měřila zachycená radioaktivita pomocí scintilačního čítače Packard Tri–Carb.

Výsledky testu HIV

Byly hodnoceny Viracea–1 a Viracea–2 mikrotitračním testem anti–HIV, který stanovuje kvantitativně schopnost testované látky inhibovat replikaci HIV a destrukci buněk vyvolanou HIV. Bylo zjištěno, že dvě látky jsou aktivní proti RF kmenům HIV–1 u CEM–SS buněk. Látka Viracea–1 inhibovala HIV–indukovaný cytopatický efekt (IC_{30}) při ředění 1:400, zatímco Viracea–2 vykazovala IC_{25} při ředění 1:900 a nedosáhla 50% hodnoty inhibice. Jak Viracea–1, tak i Viracea–2 vykazovaly toxicitu (TC_{30}) na buňkách CEM–SS při příslušných ředěních přibližně 1:20 a 1:250. Látka pozitivní kontroly, ddC, vykazovala očekávanou úroveň aktivity proti RF viru.

Byla stanovena aktivita látek Viracea–1 a Viracea–2 u čerstvých lidských buněk PBMC infikovaných klinických HIV izolátem ROJO. Tento nízko pasážovaný izolát byl určen jako virový izolát senzitivní na lék (AZT, ddC, nevirapin) a indukující tvorbu buněčných shluků. Ani Viracea–1 ani Viracea–2 neinhibovaly replikaci tohoto izolátu v netoxických koncentracích. Byla provedena další testování látek na buňkách PBMC infikovaných ROJO za použití stimulace buněk PBMC přednostně pomocí IL2 než PHA blastogenézou. Opět nebyla stanovena žádná aktivita pod koncentracemi, které inhibovaly růst buněk PBMC. AZT vykazovala v těchto testech očekávanou úroveň aktivity.

Látky Viracea–1 a Viracea–2 byly testovány na lidských monocyto–makrofázích infikovaných nízko pasážovaným klinickým izolátem ADA. Obě látky v těchto testech vykazovaly vysokou úroveň aktivity s Viracea–2, která byla jasně lepší. 50% účinná koncentrace Viracea–1 a Viracea–2 byla při ředění 1:4000 a 1:10 000. Při morfologickém vyšetření nebo při barvení pomocí XTT–tetrazolium nebyla zjištěna toxicita na monocyto–makrofágovou monovrstvu. AZT vykazovala v těchto testech očekávanou úroveň aktivity.

Bylo zjištěno, že látky Viracea–1 a Viracea–2 inhibují zachycení infekčního viru na HeLa–CD4–LTR–β–galaktózidázové buňky s exprimovaným CD4. Byla zjištěna inhibice vazby viru na cílové buňky pro obě látky při ředěních přibližně 1:1000 až 1:3200. Žádná z látek neměla antivirový účinek na splývání buněk HL2/3 s exprimovaným pláštěm s HeLa–CD4–LTR–β–galaktózidázovými buňkami. Byla zjištěna toxicita obou látek v testu na splývání buněk, ve kterém byla látka přítomna v jamce v celém průběhu trvání testu stejně tak jako toxicita látky Viracea–2 v testu vazby, kde byla látka přítomna pouze po dobu 2 hodin. Chicago Sky Blue, sulfonované barvivo, vykazovalo v každém z těchto testů očekávanou úroveň aktivity.

Látka Viracea–2 zabránila přenosu viru z chronicky infikovaných lymfocytů na cervikální epiteliální buněčnou linii ME 180 při ředění přibližně 1:500 (IC_{30}). U tohoto testu nebyla zjištěna toxicita na buňky ME 180. U tohoto testu byl lék přítomen pouze v době infekce (4 hodiny). Dextran sulfát (pozitivní kontrola, sulfonovaný polysacharid) a dextran (negativní kontrola) vykazovaly v těchto testech očekávanou úroveň aktivity.

Viracea–2 neměla žádný efekt na expresi CD4 na povrchu buněk.

Inhibice začlenění thymidinu (DNA), uridinu (RNA) nebo leucinu (protein) do makromolekul o vysoké molekulové hmotnosti byla zjištěna u ředění vyšších než 1:320. Inhibice makromolekulární syntézy se shodovala s toxicitou látek u buněk CEM–SS.

Souhrnné výsledky testu HIV

Látky Viracea–1 a Viracea–2 inhibují HIV infekci s úzkým terapeutickým indexem u stanovených T–buněk. Látky Viracea–1 a Viracea–2 potenciálně inhibují replikaci HIV u monocyto–makrofágů. Látky Viracea–1 a Viracea–2 inhibují připevnění viru na cílové buňky, ale nebrání splývání infikovaných buněk s neinfikovanými buňkami. Viracea–2 inhibuje přenos viru v testu na stanovení topické mikrobicidní aktivity a může být užitečná v prevenci sexuálního přenosu HIV. Viracea–2 nemá žádný efekt na expresi CD4 na povrchu buněk.

Prevence a léčba

Antimikrobiální látka zajišťuje antimikrobicidní látku a léčivo, které (1) pomáhá v prevenci sexuálního přenosu HIV; (2) řídí virovou zátěž virem HIV a jinými viry; (3) zajišťuje eradikaci HIV; (4) prodlužuje latentní období syndromu autoimunodeficience (AIDS) u nemocných, kteří onemocněli HIV; (5) zmírňují bolest a utrpení nemocných s HIV; (6) omezují rozšiřování infekce HIV; a (7) zajišťují lepší a úspěšnější léčbu nemocných s HIV. Medikamentózní léčba také zmírňuje fyzické příznaky vzplanutí infekce HIV, viru herpes simplex 1 nebo 2 (HSV 1 nebo HSV 2) nebo jiných infekčních mikrobiálních onemocnění. Výše zmíněných výsledků lze dosáhnout systematickou aplikací nebo injekčním podáváním výhodné výše popsané antimikrobiální látky (léčiva) pomocí jehly do konečníku (konečník, konečníková tkáň) nebo do pochvy (poševní tkáň) pacienta infikovaného HIV nebo jinými infekčními mikrobiálními onemocněními, a to 8 až 12–krát denně, s výhodou 10–krát denně v intervalu každých dvou hodin, po dobu 10 až 18 po sobě jdoucích dnů, s výhodou nejlepších výsledků po dobu 14 po sobě jdoucích dnů (dvou týdnů). Dávka, koncentrace a množství antimikrobiální látky (léčiva) je různá v závislosti na závažnosti a rozsahu onemocnění stejně tak jako na věku, pohlaví, hmotnosti, rase a zdravotním stavu nemocného. Je žádoucí, aby se před aplikací antimikrobiální látky (léčiva) infikovaná oblast opláchla (omyla) a usušila, aby se z infikované oblasti odstranilo mýdlo nebo jeho zbytky. Anti-

mikrobiální látka se při léčbě viru herpes simplex 1 nebo 2 nanáší na infikované místo po dobu 19 až 24 hodin. Výsev puchýřků herpes viru se zabrzdí během 19 až 24 hodin a postižená místa se následně zahojí.

Mezi mnoho výhod medikamentózní léčby a léčiva (sloučenin) tohoto vynálezu patří:

1. Skvělá léčba a prevence HIV a jiných infekčních onemocnění.
2. Vynikající výsledky s odstraněním bolesti u virových onemocnění HIV a herpes simplex a jiných infekčních onemocnění bez toxicity.
3. Vynikající působení při rychle se hojících vzplanutí u HIV, herpes simplex a jiných infekčních onemocnění.
4. Záchrana životů novorozenců, dětí, dospělých i zvířat.
5. Snižování světových ekonomických ztrát způsobených HIV, herpes simplex a jiných infekčních onemocnění.
6. Odstranění mnoha vážných emocionálních a mentálních trápení u nemocných trpících HIV a herpetickou infekcí.
7. Snadno dostupné látky (ingredience).
8. Ekonomika.
9. Bezpečnost.
10. Jednoduché použití.
11. Spolehlivost.
12. Účinnost.

Ačkoliv je zde popsána podstata vynálezu a příklady, znamená to, že jsou možné i různé obměny a záměny stejně tak jako i jiné uspořádání částí, složek a postupů, způsobu a léčby, prováděné odborníky, aniž by se odklonili od novosti a rozsahu tohoto vynálezu.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Použití antimikrobiálního prostředku obsahujícího v hmotnostních procentech

– 40 až 60 % fytochemického koncentrátu bylinných botanikálií obsahující Commiphora myrrha a Echinacea purpurea, přičemž tento fytochemický koncentrát poskytuje antimikrobiální izoláty;

– 20 až 60 % sterilní vody, která poskytuje rozpouštědlo a nosič pro uvedený fytochemický koncentrát;

– 0,02 % až 0,3 % amoniové povrchově aktivní látky obsahující benzalkonium chlorid;

– 2 % až 12 % listové kyseliny poskytující živinu;

kde antimikrobiální izoláty z uvedeného fytochemického koncentrátu obsahují v hmotnostních procentech vztaženo na celkovou hmotnost léčivého prostředku:

– 0,3 až 9 % echinolinu,

– 0,1 až 7 % 4–O–methylglukoronoarabinoxylanu s rel. molekulovou hmotností 35 kDa a ramnoarabinogalaktanové kyseliny s rel. molekulovou hmotností 450 kDa;

– 0,1 až 10 % cynarinu (1,5–di–O–kafeoylchinolinové kyseliny) a chiorové kyseliny (2,3–O–kafeoylvinné kyseliny) a jejích derivátů;

– 0,2 až 4 % echinolonu;

– 0,2 až 8 % echinacinu B;

– 0,1 až 6 % echinacinu;

– 2 % až 7 % antonokyaninů obsahujících kyanidin 3–O–B–D–glukopyranosid a 3–O–(6–O–malonyl)–B–D–glukopyranosid;

– 0,01 až 0,06 % pyrolizidinových alkaloidů obsahující tusilagin a isotusilagin;

– 0,003 až 0,009 izomerních dodeka–izobutylamidů a tetroenové kyseliny; a kde fytochemické látky z Commiphora myrrha obsahují členy vybrané ze skupiny skládající se z karyofylenů, seskviterpenů, kurzerenonu, dihydrofhanodien–6–onu, 2–methoxyfuradinu, elemolu, lyndesterenu, kyseliny octové, α–amyronu, arabinos, α–bisabolenu, γ–bisabolenu, kadinenu, kampesterolu, cholesterolu, skořicového aldehydu, komiferinu, α–komiforové kyseliny, β–komiforové kyseliny, γ–komiforové kyseliny, komiforinové kyseliny, m–kresolu, kumylalkoholu, kuminaldehydu, dipentenu, elemolu, 3–epi–α–amyrinu, eugenolu, furandienu, furandienonu, galaktózy, rostlinné gumy, herabolenu, α–herabomyrolu, β–herabomyrolu, heraboresenu, limonenu, 4–(O–methyl–glukuronové kyseliny, n–nonakesanu, p–sitosterolu, xylózy,

pro výrobu léčiva pro léčení virové imunitní nedostatečnosti.

2. Použití antimikrobiálního prostředku obsahujícího v hmotnostních procentech:

– 40 až 60 % fytochemického koncentrátu bylinných botanikálií obsahující Commiphora myrrha a Echinacea purpurea;

– 20 až 60 % sterilní vody, která poskytuje rozpouštědlo a nosič pro uvedený fytochemický koncentrát;

– 2 % až 12 % listové kyseliny poskytující živinu; a

kde antimikrobiální izoláty z uvedeného fytochemického koncentrátu obsahují v hmotnostních procentech vztaženo na celkovou hmotnost léčivého prostředku:

– 0,3 až 9 % echinakosidu,

– 0,1 až 7 % 4–O–methylglukoronoarabinoxylanu s rel. molekulovou hmotností 35 kDa a ramnoarabinogalaktanové kyseliny s rel. molekulovou hmotností 450 kDa;

– 0,1 až 10 % cynarinu (1,5–di–O–kafeoylchinolinové kyseliny) a chiorové kyseliny (2,3–O–kafeoylvinné kyseliny) a jejích derivátů;

– 0,2 až 4 % echinolonu;

– 0,2 až 8 % echinacinu B;

– 0,1 až 6 % echinacinu;

– 2 % až 7 % antonokyaninů obsahujících kyanidin 3–O–B–D–glukopyranosid a 3–O–(6–O–malonyl)–B–D–glukopyranosid;

– 0,01 až 0,06 % pyrrolizidinových alkaloidů obsahující tusilagin a isotusilagin;

– 0,003 až 0,009 izomerních dodeka–izobutylamidů a tetroenové kyseliny; a kde fytochemické látky z Commiphora myrrha obsahují členy vybrané ze skupiny skládající se z karyofylenů, seskviterpenů, kurzerenonu, dihydrofhanodien–6–onu, 2–methoxyfuradinu, elemolu, lyndesterenu, kyseliny octové, α–amyronu, arabinos, α–bisabolenu, γ–bisabolenu, kadinenu, kampesterolu, cholesterolu, skořicového aldehydu, komiferinu, α–komiforové kyseliny, β–komiforové kyseliny, γ–komiforové kyseliny, komiforinové kyseliny, m–kresolu, kumylalkoholu, kuminaldehydu, dipentenu, elemolu, 3–epi–α–amyrinu, eugenolu, furandienu, furandienonu, galaktózy, rostlinné gumy, herabolenu, α–herabomyrolu, β–herabomyrolu, heraboresenu, limonenu, 4–(O–methyl–glukuronové kyseliny, n–nonakesanu, p–sitosterolu, xylózy,

pro výrobu léčiva pro léčení virové imunitní nedostatečnosti.

Konec dokumentu