



(51) МПК
A61L 15/38 (2006.01)
A61L 15/44 (2006.01)
A61K 38/44 (2006.01)
A61F 13/00 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2011148938/15, 30.04.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 30.04.2010

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
 01.05.2009 GB 0907553.2

(43) Дата публикации заявки: 10.06.2013 Бюл. № 16

(45) Опубликовано: 27.08.2014 Бюл. № 24

(56) Список документов, цитированных в отчете о
 поиске: WO 2006/133523 A2, 21.12.2006 . WO
 03/090800 A1, 06.11.2003 . RU 2340182 C2,
 10.12.2008

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
 национальной фазе: 01.12.2011

(86) Заявка РСТ:
 GB 2010/050721 (30.04.2010)

(87) Публикация заявки РСТ:
 WO 2010/125398 (04.11.2010)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, строение 3,
 ООО "Юридическая фирма Городисский и
 Партнеры"

(72) Автор(ы):

ДЭВИС Пол (GB),
 ОСТИН Эндрю (GB)

(73) Патентообладатель(и):

ИНСЕНС ЛИМИТЕД (GB)

(54) ЛЕЧЕНИЕ ИНФЕКЦИИ ПОВЕРХНОСТИ ТЕЛА ЧЕЛОВЕКА ИЛИ ЖИВОТНОГО

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине. Описан способ лечения инфекции поверхности тела человека или животного, в частности заражения грибами, включающий нанесение водной жидкости на инфицированную поверхность тела, например ногтевую область, с последующим наложением повязки, включающей источник

перекиси водорода. Также обеспечены комбинации жидкости повязки для применения в способе. Комбинация позволяет значительно уменьшить или ликвидировать инфекцию в ногтевой области. 3 н. и 13 з.п. ф-лы, 1 табл., 2 ил., 2 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A61L 15/38 (2006.01)
A61L 15/44 (2006.01)
A61K 38/44 (2006.01)
A61F 13/00 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2011148938/15, 30.04.2010**
(24) Effective date for property rights:
30.04.2010
Priority:
(30) Convention priority:
01.05.2009 GB 0907553.2
(43) Application published: **10.06.2013** Bull. № 16
(45) Date of publication: **27.08.2014** Bull. № 24
(85) Commencement of national phase: **01.12.2011**
(86) PCT application:
GB 2010/050721 (30.04.2010)
(87) PCT publication:
WO 2010/125398 (04.11.2010)
Mail address:
**129090, Moskva, ul. B. Spasskaja, 25, stroenie 3,
OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery"**

(72) Inventor(s):
**DEhVIS Pol (GB),
OSTIN Ehndrju (GB)**
(73) Proprietor(s):
INSENS LIMITED (GB)

(54) **TREATMENT OF INFECTION OF HUMAN OR ANIMAL BODY SURFACE**

(57) Abstract:
FIELD: medicine.
SUBSTANCE: invention relates to medicine.
Described is method of treating infection of human or animal body surface, in particular, contamination with fungi, including application of water liquid on infected body surface, for instance, nail area, with further

application of bandage, which includes hydrogen peroxide source. Combinations of bandage liquid for application in method are also provided.
EFFECT: combination makes it possible to considerably reduce or eliminate infection in nail area.
16 cl, 1 tbl, 2 dwg, 2 ex

C 2
1 4 3 7 2 5 2
R U

R U
2 5 2 7 3 4 1
C 2

Область техники

Данное изобретение относится к лечению инфекций поверхности тела человека или животного, в частности заражения грибами ногтевой области человека.

Предпосылки изобретения

5 Здоровые ногти в явно хорошем состоянии являются важными и высоко ценимыми аспектами внешнего вида человека. Часто на внешний вид, прочность и здоровье ногтей может неблагоприятно воздействовать заражение клетками патогенных грибов, как правило, из рода *Trichophyton*, и существует большая потребность в методах лечения, которые улучшают внешний вид пораженных ногтей путем удаления инфицирующих
10 грибов. Несмотря на наличие на рынке многочисленных лечебных средств, существует широко распространенная неудовлетворенность имеющимися технологиями и продуктами.

Системно доставляемые средства могут достигать ногтевой области через кровоток, но слабое проникновение в ногтевую область из кровотока и серьезные побочные
15 эффекты ограничивают пригодность подхода.

Зараженные грибом ногти часто становятся пористыми или открытыми вследствие воздействия внедряющегося гриба. Таким образом, часто ноготь является совместно колонизированным бактериями, которые могут усугубить повреждающее действие грибка, выделяя дополнительные разрушающие ферменты и местно активные токсины.

20 Хорошо известно, что даже если заражение грибами ногтя уменьшено с помощью известных методов лечения, оно редко полностью ликвидируется, и для инфекций свойственно рецидивировать вскоре после прекращения лечения.

Краткое описание изобретения

Изобретатели обнаружили, что активные ингредиенты нелегко проникают в ноготь, и малое количество, если вообще таковое имеется, материала, приложенного к верхней
25 поверхности, достигает расположенных ниже структур, где грибковые клетки могут находиться в относительной безопасности.

В первом аспекте изобретение относится к способу лечения инфекции поверхности тела человека или животного, например заражения грибами, включающему нанесение
30 водной жидкости на инфицированную поверхность тела, например ногтевую область, с последующим наложением повязки, включающей источник перекиси водорода.

Во втором аспекте изобретение относится к комбинации водной жидкости и повязки, включающей источник перекиси водорода, в лечении инфекции поверхности тела человека или животного, например, заражения грибами, в частности, но не
35 исключительно, ногтевой области человека или животного.

В третьем аспекте изобретение относится к применению комбинации водной жидкости и повязки, включающей источник перекиси водорода, в производстве лекарственного препарата для лечения инфекции поверхности тела человека или животного, например
40 заражения грибами, в частности, но не исключительно, ногтевой области человека или животного.

Посредством нанесения водной жидкости на инфицированную поверхность тела поверхность тела смягчается и становится более пористой. Например, это может позволить жидкости проникать вглубь ногтевой области через существующую пористость. Таким образом, жидкость обеспечивает водный поток вглубь поверхности
45 тела, например ногтевую область.

Последующее наложение повязки, содержащей источник перекиси водорода, таким образом приводит к эффективной диффузии перекиси водорода по образованному водному потоку во внутренние менее доступные части поверхности тела, например

ногтевую область, что дает возможность перекиси водорода проникать глубже, позволяя значительно уменьшить или ликвидировать инфекцию, например заражение грибами во всех составных частях, например ногтевой области.

5 Ногти имеют характерную анатомию и состав, которые должны учитываться при рассмотрении новых подходов в лечении, направленных на ногтевую пластинку и расположенное под ней ногтевое ложе, а также все связанные структуры. Самая заметная часть ногтя, ногтевая пластинка, состоит из твердой кератинизированной структуры, которую составляют мертвые ороговевшие клетки (корнеоциты), вытолкнутые наверх из матрикса у основания ногтя. Большая часть ногтевой пластинки полупрозрачна, 10 позволяя цвету кровоснабжения в дерме просвечивать, придавая розоватый цвет. Ноготь сам по себе сравнительно лишен влаги, но при контакте с водой он может стать сравнительно гидратированным, принимая смягченное и гибкое состояние.

Ногтевой валик, складка кожи, которая покрывает стороны ногтя, удерживает ногтевую пластинку на месте и защищает ее края. Только живые репродуцирующиеся 15 части ногтя являются ногтевым матриксом, расположенным непосредственно под кутикулой. Новые клетки образуются в этом месте и постоянно продвигаются по мере взросления с образованием ногтевой пластинки. Матрикс к тому же снабжен нервами, а также изобилует кровеносными сосудами для обеспечения клеток питанием и кислородом.

20 Ногтевая пластинка лежит на ногтевом ложе, которое непрерывно с матриксом. Оно тоже обильно снабжено кровеносными сосудами и нервами. Его поверхность образована многочисленными параллельными складками, точно совпадающими со складками на нижней поверхности ногтевой пластинки. Кутикула является частью эпидермиса кожи, которая покрывает ноготь. Она защищает матрикс от поражения 25 бактериями и физического повреждения.

Клетки гриба могут жить и расти в любой части этих структур, и для любого лечения очень важно проникать во все участки в целях удаления любых остаточных очагов инфекции, а также удаления инфекции в основных участках ногтевой пластинки.

30 Выражение «ногтевая область» определено в данном документе для включения ногтевой пластинки, ногтевого ложа, ногтевого матрикса, ногтевого валика и кутикулы.

Изобретение также относится к способу обработки клеток, инфицированных вирусом папилломы человека, включающего нанесение водной жидкости, как определено в данном документе, на инфицированные клетки с последующим наложением повязки, включающей источник перекиси водорода, как определено в данном документе.

35 Изобретение также относится к комбинации водной жидкости, как определено в данном документе, и повязки, включающей источник перекиси водорода, как определено в данном документе, для обработки клеток, инфицированных вирусом папилломы человека.

40 В предпочтительном варианте осуществления водная жидкость включает фермент пероксидазу. Пероксидаза проникает внутрь поверхности тела, например ногтевой области.

Фермент пероксидазы после проникновения во внутреннюю область поверхности тела, например ногтя, остается по существу неактивным до тех пор, пока перекись водорода не диффундирует через водный путь из повязки. В присутствии пероксидазы 45 окислительные эффекты перекиси водорода усиливаются.

Пероксидаза, таким образом, как было установлено, существенно усиливает активность, в частности противогрибковую активность, перекиси водорода, поскольку она катализирует окисление восприимчивых, но необходимых молекул гриба на или в

клеточной мембране и/или цитоплазме клеток гриба.

Любые подходящие пероксидазы могут быть использованы, в том числе лактопероксидаза, пероксидаза хрена, йодид-пероксидаза, хлорид-пероксидаза и миелопероксидаза. Однако лактопероксидаза и пероксидаза хрена в настоящее время
5 предпочтительны.

Концентрация фермента пероксидазы в водной жидкости предпочтительно находится в диапазоне от 1 до 1000 мкг/мл, предпочтительно от 50 до 1000 мкг/мл, более предпочтительно от 100 до 500 мкг/мл.

Водная жидкость также предпочтительно содержит поверхностно-активные вещества и/или растворители, которые, как было обнаружено, усиливают проникновение жидкости
10 в поверхность тела, например ноготь.

Повязка предпочтительна в гидратированном состоянии для того, чтобы перекись водорода могла эффективно диффундировать в ногтевую область сразу после наложения повязки. Достаточное количество воды необходимо в повязке для образования
15 контактного жидкостного соединения между ногтевой областью и повязкой.

Предпочтительно, осмотическая сила водной жидкости является такой же или подобной таковой в жидкости повязки для усиления желаемых потоков жидкости и растворенного вещества.

Повязка предпочтительно отдает воду ногтевой области при использовании, что
20 достигается подбором соответствующих осмотических свойств известным способом.

Материал повязки может быть в форме гидрогеля, губки, пены или любой другой формы гидрофильной матрицы, которая может содержать достаточное количество воды, чтобы позволять контролируемый поток диффузии между повязкой и ногтевой
25 областью. Предпочтительно, повязка содержит растворенные вещества, которые служат для регулирования прохождения перекиси водорода, например, путем образования водородных связей, что может быть достигнуто путем соответствующих концентраций полимеров, например полисахаридов, в том числе гликозаминогликанов.

Повязка может включать влажную хлопковую повязку или может содержать структурный тампонный материал с влажными компонентами. Предпочтительно,
30 однако, чтобы повязка содержала один или несколько гелей на основе воды или водных, также упоминаемых как гидратированные гидрогели. Такие гели могут быть образованы из различных материалов и могут содержать различные реагенты, как будет обсуждаться ниже.

Обычно повязка будет в форме пластины, слоя или пленки. Повязка, альтернативно,
35 может быть в форме аморфного геля или лосьона, предпочтительно, гидрогеля, не имеющего определенной формы или очертаний, который может быть деформирован и которому можно придать форму в трех измерениях, в том числе путем выдавливания через насадку. Аморфные гели, как правило, не являются сшитыми или имеют низкие уровни поперечных связей. Разжижающийся при сдвиге аморфный гель может быть
40 применен. Такой гель является жидкостью, когда подвергается напряжению сдвига (например, когда выливается или выдавливается через насадку), но он застывает, когда статичен.

Подходящие гидратированные гидрогели раскрыты в WO №03/090800. Гидратированный гидрогель легко включает гидрофильный полимерный материал.
45 Подходящие гидрофильные полимерные материалы включают полиакрилаты и метакрилаты, например, поставляемые First Water Ltd в форме гидрогелевых пластин, включающих поли-2-акриламидо-2-метилпропансульфоновую кислоту (polyAMPS) или ее соли (например, как описано в WO №01/96422), полисахариды, например

полисахаридные камеди, в частности ксантановую камедь (например, доступная под торговой маркой Keltrol), различные сахара, поликарбоновые кислоты (например, доступные под торговой маркой Gantrez-169 BF от ISP Europe), сополимер метилвинилового эфира и малеинового ангидрида (например, доступен под торговой маркой Gantrez 139, имеющий молекулярную массу в диапазоне от 20000 до 40000), поливинилпирролидон (например, в виде коммерчески доступных марок, известных как PVP K-30 и PVP K-90), полиэтиленоксид (например, доступен под торговой маркой Polyox WSR-301), поливиниловый спирт (например, доступен под торговой маркой Elvanol), сшитый полиакриловый полимер (например, доступен под торговой маркой Carbopol EZ-1), целлюлозы и модифицированные целлюлозы, в том числе гидроксипропилцеллюлозу (например, доступная под торговой маркой Klucel EEF), карбоксиметилцеллюлозу натрия (например, доступная под торговой маркой Cellulose Gum 7LF) и гидроксипропилцеллюлозу (например, доступная под торговой маркой NATROSOL 250 LR).

Смеси гидрофильных полимерных материалов могут быть применены в геле.

В гидратированном гидрогеле из гидрофильного полимерного материала гидрофильный полимерный материал желательно присутствует в концентрации, по меньшей мере, 0,1%, предпочтительно, по меньшей мере, 0,5%, предпочтительно, по меньшей мере, 1%, предпочтительно, по меньшей мере, 2%, более предпочтительно, по меньшей мере, 5%, еще более предпочтительно, по меньшей мере, 10% или, по меньшей мере, 20%, желательно не менее 25% и даже более желательно, по меньшей мере, 30% по весу на основе общего веса геля. Еще большие количества примерно до 40% по весу на основе общего веса геля могут быть использованы.

Предпочтительный гидратированный гидрогель включает поли-2-акриламидо-2-метилпропансульфоновую кислоту (полиAMPS) или ее соли, предпочтительно в количестве около 20% по весу от общего веса геля.

Источник перекиси водорода может включать перекись водорода per se или перекись водорода в сочетании с или в комплексе с другим элементом. Альтернативно, источником перекиси водорода могут быть средства, генерирующие перекись водорода.

В предпочтительном варианте осуществления источником перекиси водорода являются средства, генерирующие перекись водорода, включающие оксидоредуктазный фермент, источник кислорода и источник субстрата для фермента. Оксидоредуктазный фермент катализирует реакцию соответствующего субстрата с кислородом с образованием перекиси водорода.

Оксидоредуктазные ферменты, подходящие для применения в изобретении, и соответствующие субстраты (которые присутствуют в крови и тканевых жидкостях) содержат следующее:

Фермент	Субстрат
Глюкозооксидаза	β -D глюкоза
Гексозооксидаза	Гексоза
Холестеролоксидаза	Холестерин
Галактозооксидаза	D-галактоза
Пиранозоксидаза	Пираноза
Холиноксидаза	Холин
Пируватоксидаза	Пируват
Гликолатоксидаза	Гликолат
Оксидаза аминокислот	Аминокислота

В настоящее время предпочтительным оксидоредуктастным ферментом является глюкозооксидаза. Она катализирует реакцию субстрата β -D глюкозы с образованием

перекиси водорода и глюконовой кислоты.

Может быть применена смесь оксидоредуктазных ферментов.

Оксидоредуктазный фермент и глюкоза могут быть тщательно смешаны, факультативно, вместе с источником кислорода. Кислород может быть предоставлен
любым удобным донором кислорода, но удобным источником является атмосферный
кислород.

Если источником кислорода является атмосферный кислород, повязка предпочтительно включает отдельные первый и второй слои. Первый слой включает оксидоредуктазный фермент и находится вблизи наружных частей повязки, то есть удален при применении от ногтевой области, где уровни атмосферного кислорода являются самыми высокими. Второй слой включает источник субстрата и расположен вблизи внутренних частей повязки, то есть примыкает к ногтевой области, так что произведенная гидрогелем перекись может поступать непосредственно в ногтевую область.

В предпочтительной форме слоистого варианта осуществления как первый, так и второй слои включают сшитые гидратированные гидрогели. Гидрогели можно залить по механически усиленной структуре, такой как слой хлопковой марли или инертная гибкая сетка, например, чтобы обеспечить структурно усиленный гидрогелевый слой или пластину.

Альтернативно, первый слой, содержащий фермент, может быть в высушенном состоянии, но размещаться в жидкостной связи со вторым слоем во время применения, в результате чего вода перемещается к первому слою с гидратацией фермента.

В слоистом варианте осуществления предпочтительно, чтобы первый слой был относительно тонким, т.е. от 0,01 до 2,0 мм, и второй слой был относительно толстым, т.е. от 0,5 до 5,0 мм. Если первый слой является гидратированным гидрогелем, тогда его толщина составляет предпочтительно от 0,1 до 2,0 мм. Если первый слой является сухой пленкой, тогда его толщина составляет предпочтительно от 0,01 до 0,1 мм.

Соотношение толщины первого слоя к данному показателю второго слоя составляет предпочтительно от 1:2 до 1:200, предпочтительно от 1:5 до 1:50, более предпочтительно от 1:5 до 1:20.

Оксидоредуктазный фермент может быть легко иммобилизован, чтобы это предотвратило его перемещение во второй слой.

Субстрат, например глюкоза, может быть представлен в различных формах, включая растворенные в гидратированной структуре гидрогеля, присутствующие в виде медленно растворяющегося твердого вещества или инкапсулированные в другой структуре для медленного высвобождения.

Предпочтительно приспособить повязку, чтобы она имела избыток субстрата, чтобы повязка была в состоянии функционировать при применении для образования перекиси водорода в течение длительного периода времени, например, по меньшей мере, один час, например от 1 до 10 часов или более.

Комбинация согласно изобретению, является, как правило, упакованным набором, включающим комбинацию водного раствора и повязки, включающей источник перекиси водорода, как описано выше.

Компоненты, как правило, находятся в герметичных водонепроницаемых пакетах.

Изобретение будет проиллюстрировано в качестве примера и со ссылкой на следующие чертежи, в которых:

фигура 1 представляет собой график, показывающий измеренный электрический ток по отношению ко времени, показывающим образование перекиси водорода;

фигура 2a представляет собой график, показывающий кривые уничтожения гриба *T. Rubrum*;

фигура 2b представляет собой еще один график, показывающий кривые уничтожения гриба *T. rubrum*.

5 Примеры

Краткое описание эксперимента

Тестовые диски были пропитаны 50% сывороткой крови, содержащей 10^7 клеток гриба для воссоздания высокобелковой среды. Они были размещены на гелевом подстилающем слое, также содержащем 50% сыворотки крови для имитирования контакта с ногтевым ложем. На диски дозировали водные растворы с пероксидазой хрена или лактопероксидазой, каждый комплект дисков имел разные уровни дозы ферментов. Контрольные диски оставили без какой-либо пероксидазы. Эксперимент был начат наложением образующих перекись водорода слоистых пластырей (см. ниже) на поверхности большинства тестовых дисков и их оставили на месте на определенные периоды времени. Некоторые диски оставили непокрытыми в качестве дополнительных экспериментальных контролей для определения, насколько хорошо клетки грибов выживали при отсутствии лечения. В установленные временные интервалы диски, являющиеся типичными представителями, извлекали для отбора проб, и количество выживших клеток грибов определяли согласно стандартным способам. Эти эксперименты показали, что перекись водорода, доставляемая слоистыми гелевыми пластырями, способна убивать клетки грибов, если оставлена на месте в течение нескольких часов. Однако скорость уничтожения гриба сильно повышалась за счет дополнительного присутствия фермента пероксидазы в контакте с грибом. Фермент пероксидазы хрена был более мощным, чем лактопероксидаза, и эффект в целом увеличивался с дозой.

Пример 1: Конструирование и оценка пластыря со слоями, передающего перекись водорода относительно генерирования перекиси водорода.

Генерирование перекиси водорода (H_2O_2) измеряли, применяя электрохимию (методика занимающая продолжительное время). Повязка была помещена на специальный датчик, измерялся потенциал, прилагаемый к электродам в присутствии H_2O_2 .

Повязка включала два слоя: (i) слой гидратированного гидрогеля и (ii) активационный слой сухой пленки, содержащий глюкозооксидазу.

35 Приготовление слоя 1: гидрогелевая пластина была приготовлена, как изложено ниже:

Водный раствор 20% натриевой соли 2-акриламидо-2-метилпропансульфоновой кислоты (Lubrizol Corporation, 50% водный маточный раствор), 10% глюкозы (Fisher Scientific, качество для анализа), 0,1% лактата цинка (Aldrich) был приготовлен. PEG (полиэтиленгликоль) 700 диакрилат (Aldrich) был включен в качестве сшивающего агента, и 2-гидрокси-2-метилпропиофенон (Aldrich) - в качестве фотоинициатора. 6,5 г и 13 г раствора были распределены в 10×10 см чашку Петри и подвергались действию ультрафиолетового света 100 мВт/см^2 в течение 20 секунд.

Приготовление слоя 2: сухая пленка была приготовлена, как изложено ниже/

45 Водный раствор 25 вес.% раствора PVA (поливиниловый спирт Gohsenol, код EG05P, поставляемый Nippon Gohsei) был приготовлен. Кроме того, 40,3 мг глюкозооксидазы (Biocatalysts, 150000 ед./г) + 300 мг гистидина (Sigma) + 150 мг лимонной кислоты (Fisher, качество для анализа) + 75 мг йодида калия (Sigma) растворили в 2 мл воды качества

для анализа (Fisher). 30 г 25% раствора PVA смешали с раствором глюкозооксидаза/ гистидин/ лимонная кислота/ йодид калия и дали отстояться, чтобы удалить любые захваченные воздушные пузырьки. Смесь затем высушивали с осаждением при 50°C, чтобы получить сухую пленку толщиной 40-45 микрон.

5 Электрохимический анализ

Специальный 3-электродный датчик (рабочий электрод, противэлектрод и электрод сравнения) был использован для анализа. Аппаратура и программное обеспечение Ezescan были приобретены у Whistonbrook Technologies, Лутон, Великобритания. Электроды были установлены внутри тefлоновой коробки и помещены в инкубатор при 25°C. При применении 20 мкл 0,1 М раствора хлорида калия были нанесены на конец электрода датчика. 1,5×2 см срезы слоя 1 пластины гидрогеля (образцы весом 6,5 г и 13 г) были вырезаны и помещены на раствор KCl, обеспечивая равномерный контакт с электродами и то, что пузырьки воздуха не улавливались между гелем и датчиком. Гели были накрыты для уменьшения испарения. Напряжение +950 мВ приложили к концам электродов и записали генерируемый ток. Если постоянный фоновый ток был получен, 1,5×2 см срезы сухой пленки накладывали на поверхность слоя 1 гидрогелевых пластин. Генерируемый ток был записан (см. фигуру 1)

Фигура 1 показывает, что когда напряжение +950 мВ было приложено к слою 1 гидрогелевой пластины на датчике, наблюдался очень небольшой измеряемый фоновый ток, таким образом отмечены небольшие помехи от материалов, используемых в приготовлении гидрогеля, при заданном напряжении. После нанесения сухой пленки фермента (около 4000 секунд на графике) активируется химический процесс глюкозооксидазы и производится H₂O₂, которая быстро диффундирует через слой 1 гидрогеля к электроду, где отмечается значительное повышение тока. Это ясно показывает, что двухслойная система образует H₂O₂ внутри двухслойной системы и доставляет ее к контактной поверхности. Ток, генерируемый по отношению к основному плато графика (от 5000 до 13000 секунд), в целом соответствует примерно 0,1% H₂O₂ (водн.). Кроме того, от разных толщин слоя 1 гидрогеля получают очень похожие кривые, за исключением того, что более тонкий гель (6,5 г геля на площадь 10×10 см) давал значительно более высокий пиковый ток (следовательно, концентрацию H₂O₂) через час приложения (около 3000 секунд после активации). Измеряемый показатель H₂O₂ затем постепенно снижается, пока кривые не возвращаются к плоской частотной характеристике при около 40 000 секунд (примерно 11 часов) после активации.

35 Пример 2: Приготовление содержащих пероксидазу первичных образцов в качестве водных растворов.

Подходящий основной носитель для пероксидазы готовили следующим образом: 50 мМ натрий-фосфатного буфера pH 6-6,5 смешивали с 0,2% по весу поверхностно-активным веществом Tween 20 (Sigma). Для этого фермент пероксидазы растворяли до получения конечной концентрации 100 мкг/мл.

40 Состав носителя может быть изменен для обеспечения различных свойств, если требуется. Например, концентрация и тип буферной соли могут быть изменены для обеспечения диапазона пределов буферного действия и для изменения pH раствора в зависимости от применения и оптимума pH используемого фермента (например, пероксидазы); концентрация и тип поверхностно-активного вещества могут быть изменены для обеспечения различных характеристик смачивания, дополнительные полимерные загустители могут быть включены для снижения характеристик текучести жидкости (например, чтобы помочь предотвратить стекание раствора с ногтя после

нанесения); применяемый уровень фермента также может быть изменен, чтобы позволить усиленное или пониженное опосредованное пероксидазой воздействие на поверхность или внутри обрабатываемой структуры. Дополнительные добавки могут быть также включены для повышения эффективности повязки, например антимикробные средства.

Пример 3: Испытание системы обработки против грибов данного изобретения против *Trichophyton rubrum* в модельной системе.

In vitro модель статической диффузии в плоском слое была использована согласно методикам, описанным в "In vitro diffusion bed, 3-day repeat challenge 'capacity' test for antimicrobial wound dressings", J. Greenman, R. M. S. Thorn, S. Saad, A. Austin International Wound Journal (2006), 3, 322-329.

Инокулят для испытания был получен путем эмульгирования биомассы *Trichophyton rubrum* зрелого поверхностного роста на агаре из картофельной декстрозы в жидкой среде Saboraud, извлечения суспензии, смешивания на вортекс-мешалке и затем осаждения крупных частиц из раствора. Полученную суспензию корректировали

спектрофотометрически для получения стандартизированного инокулята около 10^7 КОЕ/мл, что является достаточной плотностью, чтобы сделать возможным обнаружение любых фунгицидных эффектов (снижение $>10^3$ КОЕ/мл рассматривается как свидетельство фунгицидного эффекта).

100 мкл определенного инокулята ресуспендировали в повторностях на целлюлозных дисках на поверхности поли-AMPS испытательной модели (состав которой идентичен слою 1 гидрогеля, как описано в примере 1, но отлитой в виде 25 г гелевой пластины на чашке 10×10 см), в результате чего тестируемые продукты могут быть применены здесь (фигура 1). Испытывали двухслойную повязку. Слои готовили, как описано в примере 1. Ферменты лактопероксидазы или пероксидазы хрена готовили растворением в воде качества для анализа до необходимой концентрации перед применением. Считается, что лактопероксидаза может усиливать любые противогрибковые эффекты нового местного лечения, и для некоторых экспериментальных систем целлюлозные диски были предварительно обработаны раствором лактопероксидазы или пероксидазы хрена для установления различных эффектов. Диапазон предлагаемых экспериментальных условий для тестируемых образцов и контролей приведен в таблице 1.

Двухслойные повязки были активированы путем соединения двух слоев вместе. Гидрогелевая пластина помещалась в контакте с целлюлозным диском, и сухая пленка затем накладывалась на самую верхнюю поверхность гидрогелевой пластины. Испытуемые подложки инкубировали при 28°C и установленных временных интервалах (0, 1, 2, 4 и 24 ч); целлюлозные диски удаляли, ресуспендировали в PBS, делали последовательное разведение и затем спирально высевали на декстрозный агар Saboraud. После инкубации (5 дней) число дерматофитов, выживших в различные моменты времени после воздействия лечения, определялось подсчетом колоний (КОЕ/диск). Результаты были графически отображены и проанализированы с помощью GraphPad Prism (v.4).

Результаты

Результаты эксперимента представлены на фигуре 2, и очевидно, что все тестовые условия проявили значительные антимикробные эффекты, и на 3 час после воздействия обработки жизнеспособные клетки невозможно было обнаружить при любой из местных обработок. Лактопероксидаза внутри диска показывает усиление эффектов местной обработки зависимым от концентрации образом, хотя 1 мкг/мл не оказывал существенного эффекта по сравнению с только тестовой обработкой (фигура 2а).

Пероксидаза хрена внутри диска также усиливает эффекты местной обработки зависимым от концентрации образом, где даже самая низкая концентрация (1 мкг/мл) имеет существенный эффект (фигура 2b). В контрольных образцах было отмечено некоторое снижение числа слеток *T. rubrum*, показывая, что этот организм не очень хорошо поддерживался на аналитических планшетах грибковой испытательной модели, особенно, после 24 часов инкубации, хотя все тестовые обработки показали значительные эффекты по сравнению с контролем. Интересным оказалось, что контроль неактивной обработки предлагает некоторую защиту организма по сравнению с непокрытым контролем при 24 часах.

Выводы

Как свидетельствуют результаты, местная обработка имеет существенный антимикробный эффект на *T. rubrum*, снижая количество жизнеспособных клеток до уровня ниже минимальной точки обнаружения для этой системы (2×10^2 клеток) в пределах 3 часов, что свидетельствует о фунгицидном эффекте ($>3 \log$ -кратное снижение). Как пероксидаза, так и пероксидаза хрена, усиливали эффекты местной обработки, хотя очевидно, что пероксидаза хрена является более эффективной.

Таблица 1. Экспериментальные тестовые и контрольные условия для определения противогрибкового потенциала различных новых обработок.	
Контроль 1	Непокрытый диск
Контроль 2	Неактивная местная обработка
Тест 1	Активная местная обработка
Тест 2	Активная местная обработка + 1 мкг/мл лактопероксидазы в диске
Тест 3	Активная местная обработка + 100 мкг/мл лактопероксидазы в диске
Тест 4	Активная местная обработка + 500 мкг/мл лактопероксидазы в диске
Тест 5	Активная местная обработка + 1 мкг/мл пероксидазы хрена в диске
Тест 6	Активная местная обработка + 100 мкг/мл пероксидазы хрена в диске
Тест 7	Активная местная обработка+500 мкг/мл пероксидазы хрена в диске

Формула изобретения

1. Комбинация водной жидкости для смягчения поверхности тела человека или животного с грибковой инфекцией и повязки, включающей источник перекиси водорода, для последовательного нанесения на поверхность тела, для применения в лечении грибковой инфекции поверхности тела человека или животного.

2. Комбинация по п.1, где поверхность тела является ногтевой областью, особенно ногтевой областью человека.

3. Комбинация по п.1, где водная жидкость включает фермент пероксидазы.

4. Комбинация по п.3, где пероксидаза включает лактопероксидазу, пероксидазу хрена или их смесь.

5. Комбинация по п.3 или 4, где концентрация фермента пероксидазы в водной жидкости находится в диапазоне от 1 до 1000 мкг/мл.

6. Комбинация по п.1, где водная жидкость включает поверхностно-активные вещества и/или растворители.

7. Комбинация по п.1, где повязка передает воду в ногтевую область при применении.

8. Комбинация по п.1, где повязка включает гидратированный гидрогелевый материал.

9. Комбинация по п.1, где источником перекиси водорода является средство для получения перекиси водорода, включающее оксидоредуктазный фермент, источник кислорода и источник субстрата для фермента.

10. Комбинация по п.9, где оксидоредуктазный фермент включает глюкозооксидазу.

11. Комбинация по п.9 или 10, где повязка включает отдельные первый и второй слои, первый слой включает оксидоредуктазный фермент и расположен вблизи наружных частей повязки, второй слой включает источник субстрата и расположен

5 вблизи внутренних частей повязки.

12. Способ лечения инфекции поверхности тела человека или животного, включающий нанесение комбинации, определенной в любом из пп. 1-11.

13. Способ по п.12, где инфекция поверхности тела является грибковой инфекцией.

14. Способ по п.12, где поверхность тела является ногтевой областью, особенно

10 ногтевой областью человека.

15. Применение комбинации, определенной в любом из пп. 1-11, для изготовления лекарственного препарата для лечения грибковой инфекции поверхности тела человека или животного.

16. Применение по п.15, где поверхность тела является ногтевой областью, особенно

15 ногтевой областью человека.

20

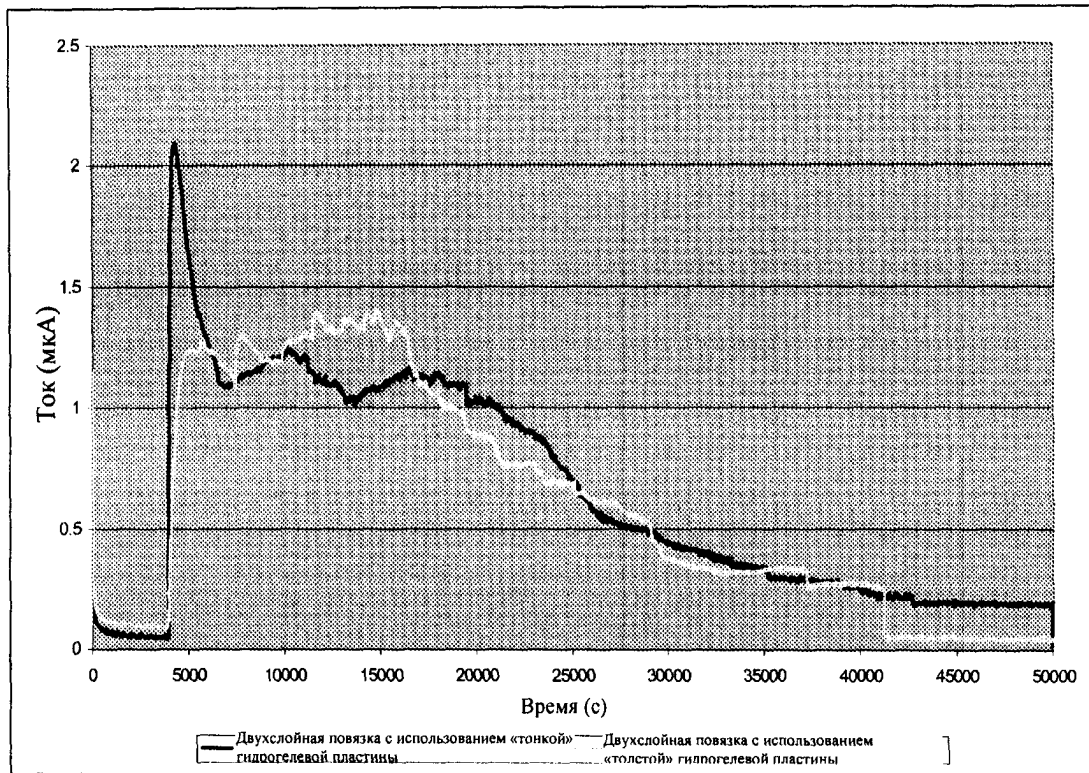
25

30

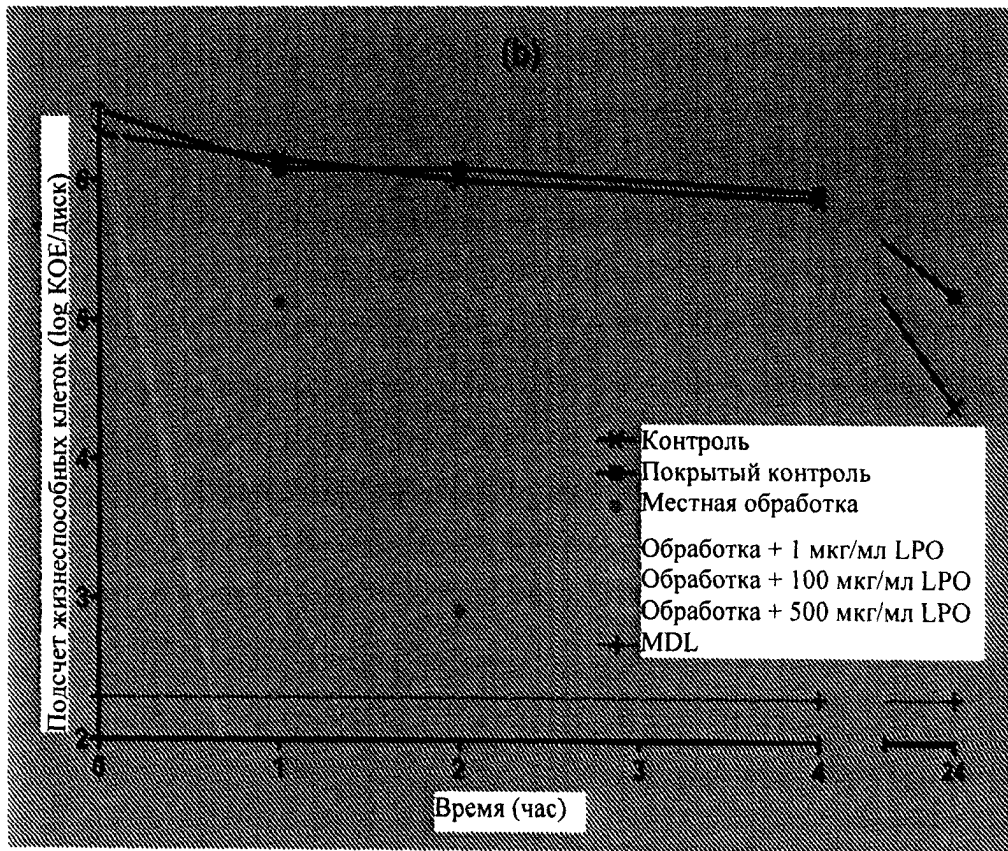
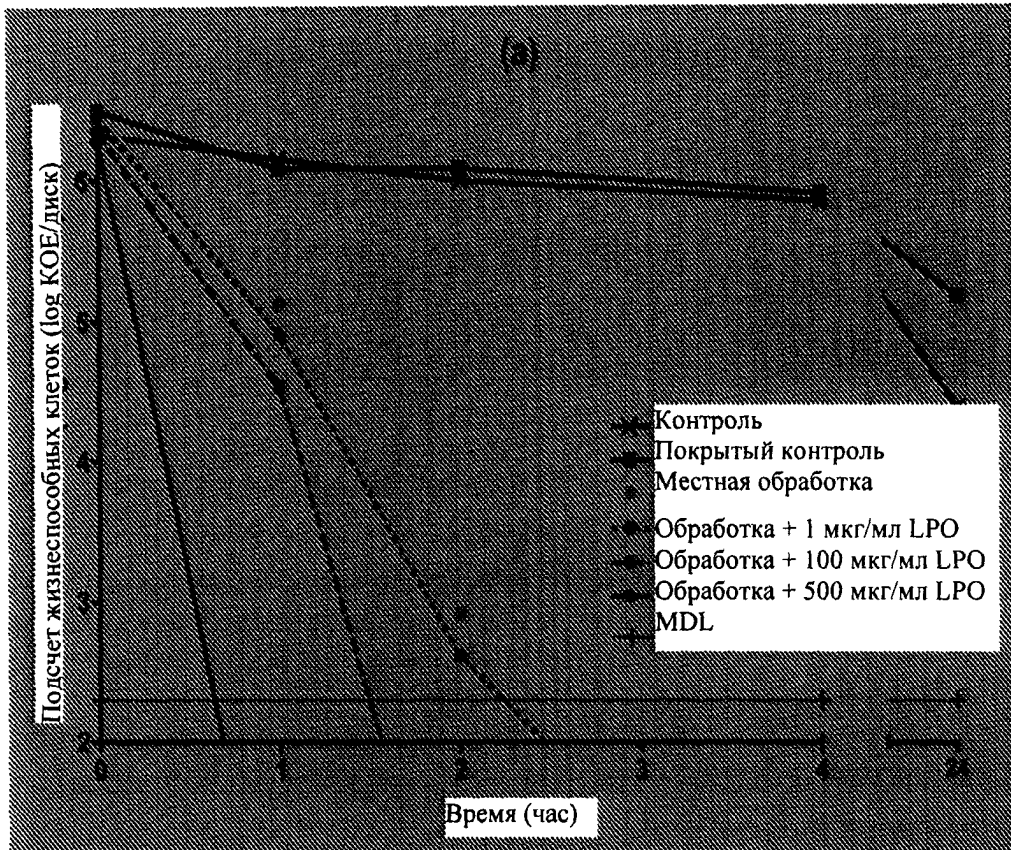
35

40

45



Фиг. 1



Фиг. 2