

(19)



(10)

LT 4736 B

(12)

PATENTO APRAŠYMAS

(11) Patento numeris: **4736**

(51) Int. Cl.⁷ **A61K 47/42**

A61K 9/08

(21) Paraiškos numeris: **2000 018**

(22) Paraiškos padavimo data: **2000 03 17**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **2000 08 25**

(45) Patento paskelbimo data: **2000 12 27**

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/HU98/00086**

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **1998 09 17**

(85) Nacionalinės procedūros pradžia: **2000 03 17**

(31, 32, 33) Prioritetas: **P 9701554, 1997 09 18, HU**

(72) Išradėjas:

Lajos Hegedues, HU
Krisztina Krempels, HU
Krisztina Paal, HU
Gabor Petho, HU

(73) Patento savininkas:

HUMAN RT., Tancsics ut 82, H-2100, Goedoello, HU

(74) Patentinis patikėtinis:

Liudmila Gerasimovič, 9, J. Basanavičiaus g. 16/5-41, 2009 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Farmacinės kompozicijos, turinčios plazmos proteino

(57) Referatas:

Išradimas priklauso vandenyje tirpiems produktams bei kietos ir skystos formos farmacinėms kompozicijoms, skirtoms parenteraliam naudojimui. Farmacinės kompozicijos susideda ar turi terapiškai aktyvią medžiagą, pasižyminčią mažu tirpumu vandenyje ir žymiu rišamuoju giminingumu plazmos proteinui, ir plazmos proteino frakciją reguliuojamoje agregatinėje būsenoje, kurioje minėta aktyvi medžiaga ir minėta proteino frakcija tarpusavyje surištos nekovalentiniais ryšiais. Išradimas apima produkto gamybos būdą ir farmacinės kompozicijas.

Išradimas aprašo naują būdą, produktus ir kompozicijas, skirtus patiekti terapiškai aktyvius junginius, pasižyminčius mažu tirpumu vandenyje bei žymiu rišamuoju giminingumu plazmos proteinams, ir tokių produktų bei kompozicijų, skirtų terapiniam vartojimui, paruošimo procesus.

Labiau konkretizuojant, svarbiausi išradimo objektai yra kieti arba skysti produktai ir farmacinės kompozicijos, skirti daugiausia parenteraliniam vartojimui ir savo sudėtyje turintys:

a) terapiškai aktyviąją medžiagą, pasižyminčią mažu tirpumu vandenyje ir žymiu rišamuoju giminingumu plazmos proteinams (toliau "aktyvioji medžiaga") ir

b) plazmos proteinų frakciją reguliuojamoje agregatinėje būsenoje,

kur minėta aktyvioji medžiaga ir minėta proteinų frakcija tarpusavyje surištos nekovalentiniais ryšiais ir

c) turi, nebūtinai, papildomą farmaciškai priimtina ir parenteraliai tinkamą kompozicijos priedą(us) - pvz., vandenį, stabilizatorių(s), proteino agregacijos reguliatorių(s).

Išradimo homogeniniai kieti produktai, turintys minėtą proteiną ir minėtą medžiagą, yra tirpūs vandenyje ir jų vandeniniai tirpalai gali būti vartojami parenteraliai arba iš jų gali būti ruošiami parenteraliniai farmaciniai preparatai.

Specialistams yra žinoma, jog kai kurie biologiškai aktyvūs junginiai pasižymi stipriu terapiniu aktyvumu, bet dėl jų mažo tirpumo vandeninėje terpėje niekuomet nebuvo galima parodyti jų naudingumo. Kai kurie iš jų niekuomet nebuvo įtraukti į receptūras, keletas tepasiekė klinikinių tyrimų I fazę. Kai kurie pasirodė esą "sunkiai biosuderinami" kompozicijose dėl santykinai aukšto toksiškumo, kurį sąlygojo kompozicijoje naudojamos medžiagos. Tipiškas tam pavyzdys yra taksonų grupės atstovai, konkrečiai, paklitakselis, stiprus

citostatikas, kurio pritaikymas buvo nepakankamas dėl toksiškumo žinomos Klucel kompozicijos su tvinu 80 arba Klucel ir skiediklis 12, mišinys Cremaphor EL:etanolis 1:1 [Cancer Chemotherapy and Pharmacology (1994) 34:465-471; Journal of the National Cancer Institute (1990) 1247-1259]. Cremaphor EL (polioksietilintas ricinos aliejus) pasižymi būdingu toksiškumu, sukeliančiu vazodilataciją (kraujagyslių plėtimą), letargiją, hipotenziją (sumažėjusį kraujospūdį) ir t. t. Siekiant sumažinti tirpiklio ir adjuvanto toksišką pašalinį poveikį, buvo siūlomi tam tikri metodai: ilgalaikis vartojimas labai mažų dozių, paruošiamasis gydymas prieš vartojimą ir t. t. (JAV patentas 5665761; JAV patentas 5621001; JAV patentas 5670537 ir t. t.). Kito pasiūlymo esmę sudarė aktyviosios medžiagos derinimas su dispergatoriumi, turinčiu proteinu dengtą sluoksnį (JAV patentas 5560933), suformuotą reaguojant proteinui su aliejumi, pvz., sojos pupelių aliejumi - tokios kompozicijos buvo siūlomos paklitakseliui ir amfotericinui. Tačiau net naujausia literatūra įspėja dėl pritaikymo, pvz., dėl paklitakselio (žr., pvz., "Guidance for Industry", išl. U.S. Department of Health and Human Service CDER September 1997, OGD-L-8), kur, dėl hipersensibilumo reakcijų, visi pacientai prieš gydymą paklitakseliu turi gauti kortikosteroidų, difenhidramino ir H₂ antagonistų kursą.

Vėliau buvo pasiūlyta ruošiant tam tikrų vandenyje netirpių dihidropiridinių parenteralines kompozicijas, dihidropiridinus tirpinti organiniame tirpiklyje arba organinio tirpiklio ir vandens mišinyje bei pridėti HSP (žmogaus serumo proteinai) tirpalo į minėtą skystį, tam, kad iki minimumo būtų sumažintas netirpios aktyviosios medžiagos kristalizavimasis (Vengrijos patentas 198381, Vokietijos patentinė paraiška 3702105). Tačiau gautas skystis vis dėl to nebuvo skaidrus tirpalas ir turėjo organinio tirpiklio.

Pagal Japonijos patento 58216126 publikaciją (žr. EPO Patent Abstracts of Japan) kai kurie karboksirūgšties dariniai, turintys stipriai stabdančią funkcinę aromatinę grupę ir pasižymintys apie 0,1 mg/ml tirpumu vandenyje, buvo soliubilizuojami, sudedant juos į praskiestą vandeninį žmogaus serumo albumino tirpalą.

Taip pat yra žinoma, jog peroralinės farmacinės kompozicijos yra gaunamos dideliu greičiu (nuo 5000 iki 40000 aps./min.) sumaišant aktyvųjį ingredientą su kiaušinio albuminu vandeniniame tirpiklyje, po to tirpiklį nudistiliuojant (Europos patentinė paraiška 326618). Gaunama peroraliniam vartojimui skirta vandeninė suspensija, pasižyminti kai kuriais sumažintais aktyvaus ingrediento pašaliniais poveikiais.

Be to, žinoma, jog kai kurios vandenyje netirpios aktyviosios medžiagos turi žymų giminingumą proteinui arba serumo proteinui. Kai kurie šaltiniai mini paklitakselį [Cancer Chem. and Pharm. (1994) 34: 465-471]; mikonazolį, flukonazolį, amfotericiną B [Infection, 23(5): 292-297 (1995) Sept.]; karbamazepiną [J.Chromatogr. B. Biomed. Appl. 669(2): 281-288 (1995 July 21)]; azatiopriną [Ann. N. Y. Acad. Sci, 685 (1993): 175-192], propofolį [J. Chromatogr. Sci (1992): 164-166]. Remiantis naujausia literatūra [The Lancet vol. 352 (1998): 540-542], vaistinis preparatas Taxol® sukelia raudonųjų ląstelių agregaciją ir taip veikia polioksietilinto ricinos aliejus, kuris yra minėto vaistinio preparato tirpiklis. Kai kurie vandenyje netirpūs vaistiniai preparatai yra ruošiami, naudojant toksišką Cremaphor (ciklosporinas, teniposidas, paklitakselis, amfotericinas B). Kiek mums yra žinoma, aukšto aktyvumo, bet vandenyje netirpių vaistinių preparatų serijos iki šiol iš viso nepasirodė prekyboje

parenteralinėje ir interveninėje skyrimo formose, pvz.,
ritonavitas, karbamazepinas, kamptotecinas, azatioprinas,
mikonazolis, flukonazolis ir t. t.

- 5 Todėl būtina problemą išspręsti taip, kad terapiškai
vertingos vandenyje netirpios medžiagos galėtų būti
skiriamos vandenyje tirpios formos pavidale, geriau
parenteraliniu būdu, pacientams, kuriems reikalingas
gydymas minėtais aktyviaisiais ingredientais.

10

Šio išradimo tikslas yra patenkinti šį reikalavimą,
liečiantį praktiškai vandenyje netirpius aktyviuosius
ingredientus, pasižyminčius žymiu rišamuoju giminingumu
plazmos proteinams.

15

Šis išradimas remiasi suvokimu, kad aktyviųjų medžiagų
susirišimas nekovalentiniais ryšiais su atitinkamais
proteinais prieš jų vartojimą pateikia naują ir labai
potencialią aktyviųjų ingredientų su mažu tirpumu
20 vandenyje pristatymo sistemą. Sutinkamai su išradimu yra
paruošiami homogeniniai kieti produktai, kurie po to
ištirpinami vandenyje ir tokiu būdu gaunami
biosuderinami, skaidrūs vandeniniai tirpalai, tinkami
parenteraliniam skyrimui. Tokiu būdu išradimas pateikia
25 reikalingų, vandenyje netirpių aktyviųjų ingredientų
skyrimo priemonės, neįvedant toksiškų elementų, ir kai
kuriais atvejais - žymiai efektyvesnėmis dozėmis negu
anksčiau.

- 30 Žymėjimai, naudojami šioje paraiškoje, kurie toliau nebus
kartojami:

R^1 žymi tret-butiloksikarboksirūgšties amidą arba
benzoilamidą;

R^2 žymi vandenilį arba bet kokią acilo grupę,
35 optimalu acetilą.

Mažas tirpumas vandenyje reiškia, jog tirpumas vandenyje kambario temperatūroje, yra $<1 \cdot 10^{-4}$ M/l;

Žymus rišamasis giminingumas plazmos proteinams reiškia, kad $> 90\%$ medžiagos yra susirišusi su proteinais vandeninėje terpėje ir yra spontaninėje pusiausvyroje kambario temperatūroje;

HSA - žmogaus serumo albuminas,

WFI - vanduo injekcijoms.

10

Vienas išradimo objektų yra vandenyje tirpi žmonėms skirta farmacinė kompozicija, daugiausia parenteraliniam vartojimui, turinti terapiškai aktyvųjį junginį, pasižymintį mažu tirpumu vandenyje ir žymiu rišamuoju giminingumu plazmos proteinams arba žmogaus plazmos baltymų frakcijai reguliuojamoje agregatinėje būsenoje.

15

Kiti išradimo objektai yra vandenyje tirpios veterinarinės farmacinės kompozicijos, daugiausia skirtos parenteraliniam vartojimui, turinčios terapiškai aktyvųjį junginį, pasižymintį mažu tirpumu vandenyje ir žymiu rišamuoju giminingumu gyvulių plazmos proteinams reguliuojamoje agregatinėje būsenoje.

20

Žmogaus arba gyvulių plazmos, kurios pagal išradimą gali būti produktuose ir farmacinėse kompozicijose ir, atitinkamai, panaudotos produktų ir kompozicijų gavimo būduose, gali būti bet kokie natūralios kilmės proteinai arba plazmos frakcijos, pvz., serumo albuminas, imunoglobulinas, glikoproteinas, interferonas ir/arba interleukinas, taip pat jų rekombinantiniai analogai. Gali būti naudojami žmogaus ir gyvulių proteinai. Žmonių gydymui skirtuose junginiuose ir kompozicijose pageidautina naudoti natūralius žmogaus serumo ir rekombinantinius žmogaus serumo proteinus.

35

Pagal išradimą praktiškai vandenyje netirpūs aktyvieji ingredientai apima platų junginių diapazoną, esant vienai išlygai - jie turi pasižymėti žymiu giminingumu pasirinktiems plazmos proteinams. Aktyviųjų ingredientų

5 pavyzdžiai apima tokias terapinių agentų grupes: citostatiką, pvz., taksonoidą, antibiotiką, vitaminą, priešūždegiminį agentą, analgetiką, antispazminį agentą, imunosupresantą, antiepilepsinį agentą, raminamąjį agentą, hipnotiką, priešgrybinį agentą, antikoagulantą, 10 lipidinės peroksidazės inhibitorių, koronarinį vazodilatatorių, antiaritmijos agentą, kardiotoniką, urikacidurinį agentą, antitrombotiką, steroidinį hormoną (progesteroną, androgeną, testosteroną) ir/arba fotosensibilizatorių. Kai kurie aktyvieji ingredientai 15 gali būti naudojami tuo pačiu metu, kruopščiai apsvarsčius ir adaptavus terapines dozes ir patikrinus rišamuosius giminingumus pasirinktiems proteinams, kurie turi būti tinkami, esant tokiems pakitusiems reikalavimams.

20

Išradimo realizavimas numato produktus ir farmacines kompozicijas (atsižvelgiant į ankstesnes pastabas), turinčias bent vieną iš sekančių aktyviųjų medžiagų: amfotericiną B, adriamicino analogą, apazoną, 25 azatiopriną, bromazepamą, kamptoteciną, karbamazepiną, klonazepamą, ciklosporiną A, diazepamą, dikumarolį, digitoksiną, dipiridamolį, dizopiramidą, flunitrazepamą, gemfibrozilą, ketochloriną, ketokonazolį, mikonazolį, nifluminę rūgštį, oksazepamą, fenobarbitalį, fenitoiną, 30 progesteroną, propofolį, ritonavirą, sulfinpirazoną, suprofeną, takrolimus, tamoksifeną, taksonoidą, testosteroną, tirilazadą, trioksaleną, valproinę rūgštį ir/arba varfariną.

35 Optimalus išradimo variantas apima aukščiau aprašytą produktą arba kompoziciją, turinčią taksonoidą, atvaizduotą bendra formule I.

- Kitas optimalus išradimo variantas apima arba susideda iš paklitakselio ir žmogaus serumo albumino, imunoglobulino, glikoproteino, interferono ir/arba interleukino arba kai kurių kitų žmogaus plazmos proteinų frakcijų.
- Ypatingai svarbūs išradimo objektai yra homogeniniai, vandenyje tirpūs produktai kietoje formoje, savo sudėtyje turintys bent vieną aktyviąją medžiagą iš grupės: amfotericiną B, adriamicino analogą, apazoną, azatiopriną, bromazepamą, kamptoteciną, karbamazepiną, klonazepamą, ciklosporiną A, diazepamą, dikumarolį, digitoksiną, dipiridamolį, dizopiramidą, flunitrazepamą, gemfibrozilą, ketochloriną, ketokonazolį, mikonazolį, nifluminę rūgštį, oksazepamą, fenobarbitalį, fenitoiną, progesteroną, propofolį, ritonavirą, sulfinpirazoną, suprofeną, takrolimus, tamoksifeną, taksonoidą, testosteroną, tirilazadą, trioksaleną, valproinę rūgštį ir/arba varfariną ir taip pat turintys bent vieną proteiną iš žmogaus serumo albumino, imunoglobulino, glikoproteino, interferono ir/arba interleukino grupės arba bet kurią kitą natūralaus arba rekombinantinio žmogaus plazmos proteino frakciją, kur minėta aktyvioji medžiaga ir minėta proteinų frakcija tarpusavyje susirišę nekovalentiniais ryšiais ir molinis santykis tarp aktyviosios medžiagos ir proteinų frakcijos yra diapazone nuo 1:0,05 iki 1:100, optimalu - nuo 1:0,1 iki 1:50.
- Optimalūs aukščiau pateiktų objektų pavyzdžiai yra homogeniniai, kietos formos, vandenyje tirpūs produktai, savo sudėtyje turintys sekančias aktyviųjų medžiagų ir proteinų poras: bendros formulės I taksonoidą, kurioje:
- R^1 žymi tret-butiloksikarboksirūgšties amidą arba benzoilamidą,
- R^2 žymi vandenilį arba bet kokią acilo grupę, optimalu acetilą -
- ir plazmos proteino frakciją;

- paklitakselį ir žmogaus serumo albuminą, rekombinantinį žmogaus plazmos albuminą ir/arba γ -globuliną;
- 5 amfotericiną B ir žmogaus serumo albuminą, rekombinantinį žmogaus plazmos albuminą ir/arba γ -globuliną;
- kamptoteciną ir žmogaus serumo albuminą, rekombinantinį žmogaus plazmos albuminą ir/arba γ -globuliną;
- karbamazepiną ir žmogaus serumo albuminą, rekombinantinį žmogaus plazmos albuminą ir/arba γ -globuliną;
- 10 ciklosporiną A ir žmogaus serumo albuminą, rekombinantinį žmogaus plazmos albuminą ir/arba γ -globuliną;
- propofolį ir žmogaus serumo albuminą, rekombinantinį žmogaus plazmos albuminą ir/arba γ -globuliną;
- 15
- Iš aukščiau pateiktų paaiškinimų matosi, jog išradimas apima anksčiau minėtas kompozicijas abiejose - tiek kietoje, tiek vandeninių tirpalų - formose.
- 20 Kas liečia jų gamtinę struktūrą - konkrečiau, jų cheminę sudėtį - tai proteino molekulės linkusios agreguotis savo specifinėmis susirišimo sritimis. Agregavimosi laipsnis priklauso nuo tirpalo, kuriame proteinas randasi, parametrų (temperatūros, sudėties, santykinės ir
- 25 absoliutinės komponentų koncentracijos, pH, joninės jėgos).

Pageidautina, kad sutinkamai su išradimu naudojami plazmos proteinai būtų stabilizuotame arba reguliuojamame būvyje. Tikslas yra išvengti tokios proteinų agregacijos, kuri galėtų inhibuoti optimalų aktyviojo ingrediento susirišimą. Nepageidaujama proteinų agregacija gali būti reguliuojama, esant kitoms molekulėms, galinčioms užimti keletą arba visas susirišimo sritis dalyvaujančiose

35 agregacijoje makromolekulėse ir taip išvengti

daugkartinės proteinas - proteinas asociacijos. Kai kurie komerciškai gaunami proteinais iš anksto jau būna reguliuojamoje agregatinėje būsenoje: turi stabilizatorius agregacijai išvengti. Tačiau ši būsena ne visada yra optimali būsenai ryšiui su aktyviaja medžiaga, numatyta naudoti išradime.

Sutinkamai su išradimu terminas "kontroliuojama agregatinė būsena" reiškia geriausią būseną prisirišimui, t. y., kada proteinas sugeba pririšti aktyviąją medžiagą tiksliai taip, kaip tai yra reikalinga. Tai nebūtinai yra būsena, kada su proteinu susirišęs maksimalus aktyviosios medžiagos molekulių kiekis, bet būna atvejų, kada aukščiausias surišimo laipsnis yra pageidautinas.

Tai reiškia, kad mes kai kuriais atvejais turime pašalinti kitus užpildus iš, pvz., komerciškai gaunamos serumo albumino frakcijos, pvz., stabilizatorius, joninius komponentus ir pan. Tai galėtų būti būtina pradinė proceso stadija, kada yra naudojamas būdas pagal išradimą. Sąlygos, reikalingos tinkamos agregacinės būsenos nustatymui, griežtai priklauso nuo esamos aktyviosios medžiagos ir tinkamos proteinų frakcijos.

Žemiau pateikti pavyzdžiai demonstruoja (pvz., paklitakselis ir ciklosporinas A), kad surišimas su plazmos proteinų frakcija aukštesniu laipsniu pasireiškia tuomet, kada nėra kitų užpildų (pvz., stabilizatorių, joninių komponentų, druskų ir t. t.). Tačiau yra kitos aktyviosios medžiagos (pvz., amfotericinas B ir propofolis), kurios nerodo jokios interferencijos susiriant, pvz., proteinų stabilizatorius.

Tokiu būdu, naudojamų proteinų tinkama agregatinė būsena turi būti nustatoma atskirai kiekvienai naudojamai aktyviosios medžiagos/proteino porai.

Naudojant paklitakselio ir HSA porą, svarbu pašalinti visus komerciškąjį HSA lydinčius stabilizatorius, pvz., N-acetil-D,L-triptotaną, šarminius oktanoatus, kurie buvo naudojami proteino stabilizavimui pasterizavimo 60°C

temperatūroje metu. Amfotericinas B arba propofolis gali būti surišti su HSA taip pat ir esant šiems stabilizatoriams. Atskirais atvejais, kuomet norima agregatinė būseną gali būti pasiekama vandens pagalba, 5 kiti komponentai turi būti pašalinami, pvz., atliekant procedūrą, aprašytą viename iš pavyzdžių.

Siekiant optimalaus specifinių medžiagų ir specifinių plazmos proteinų frakcijų susirišimo turi būti atsižvelgiama į tokius aspektus:

10 a) medžiagos užimtos surišimo srities ant proteino charakteristikas;

b) tirpale esančius kitus komponentus, galinčius užimti tą pačią sritį arba net konkuruoti dėl jos;

c) fiziko-chemines sąlygas, lemiančias esamos 15 surišimo srities konformaciją ir pririšimo rezultatą;

d) žinomus terapinius aspektus, pvz.:

i) paklitakselį ant HSA, turintį unikalias transportines charakteristikas;

20 ii) paklitakselį ant interleukinų su išbandytu terapiniu nešiklio aktyvumu;

iii) ciklosporiną A ant gamaimunoglobulino su išbandytu terapiniu nešiklio aktyvumu;

iv) ritonavirą ant gamaimunoglobulino su išbandytu terapiniu nešiklio aktyvumu;

25 kompozicijos stabilumą.

Vienas iš paprasčiausių agregaciją reguliuojančių agentų yra vanduo. Naudojant tinkamą vandens kiekį, nepageidaujama agregacija gali būti inhibuojama, ir 30 proteinas esti paruoštas naudojimui pagal išradimą - jis yra "reguliuojamoje agregatinėje formoje".

Sutinkamai su išradimu, junginiai ir kompozicijos savo sudėtyje kaip priedą gali turėti agregacijos reguliatorių arba stabilizatorių ir/arba pagalbinį tirpalą 35 stabilizuojantį priedą. Tokių priedų pavyzdžiai yra: vanduo, natrio chloridas, buferis, polialkoholis, pvz., glicerolis, vandenyje tirpus cukraus darinys,

pageidautina, manitolis, sorbitolis ir/arba dulcitolis ir kiti.

Kitas išradimo objektas - naujų produktų ir farmacinių kompozicijų gavimo būdas. Būdą sudaro sekančios stadijos:

a) terapiškai aktyvų junginį, pasižymintį mažu tirpumu vandenyje ir žymiu rišamuoju giminingumu plazmos proteinams ("aktyvioji medžiaga") ištirpina farmaciniu požiūriu priimtina, su vandeniu besimaišančiame organiniame tirpiklyje,

b) minėtą tirpalą sumaišo su plazmos proteinų frakcijos reguliuojamoje agregatinėje būsenoje vandeniniu tirpalu ir, nebūtinai,

c) su papildomu farmaciniu požiūriu priimtinu pagalbinu priedu, pvz., proteino agregacijos reguliatoriumi ir/arba stabilizatoriumi, dėka ko gaunamas tikrasis tirpalas, turintis minėtą aktyviąją medžiagą ir minėtą proteinų frakciją, tarpusavyje susirišusius nekovalentiniais ryšiais;

d) organinį tirpiklį pašalina, pageidautina, ultrafiltruojant, dializuojant, diafiltruojant ir/arba liofilinant tirpalą arba jo koncentratą arba derinant šiuos procesus, dėka ko gaunamas homogeninis, vandenyje tirpus skystis arba kietas produktas, arba farmacinė kompozicija, turinti aktyviąją medžiagą ir plazmos proteinų frakciją;

e) nebūtinai, kietą medžiagą arba skystį ištirpina arba praskiedžia vandeniu, gaunant skaidrią, skystą kompoziciją, tinkamą terapiniam skyrimui,

f) nebūtinai, įveda šį produktą į parenteralinę kompoziciją (dozavimo formą), skirtą tiesioginiam vartojimui.

Ruošiant naujus homogeninius kietus produktus, savo sudėtyje turinčius aktyviasias medžiagas ir proteinus, tarpusavyje susirišusius nekovalentiniais ryšiais, yra tikslinga naudotis būdu, kurį sudaro sekančios stadijos:

a) terapiškai aktyvų junginį ištirpina su vandeniu besimaišančiame, farmaciniu požiūriu priimtinaame organiniame tirpiklyje,

5 b) minėtą tirpalą sumaišo su atrinktos plazmos proteinų frakcijos vandeniniu tirpalu reguliuojamoje agregatinėje būsenoje, dėka ko gaunamas tikrasis tirpalas, savo sudėtyje turintis minėtą aktyviąją medžiagą ir minėtą proteinų frakciją, tarpusavyje susirišusius nekovalentiniais ryšiais;

10 c) pašalina organinį tirpiklį ir liofilina tirpalą arba jo koncentratą.

Tinkamiausias būdas pašalinti organinį tirpiklį priklauso nuo aktyviosios medžiagos ir proteino. Iš aktyviojo
15 produkto (aktyviosios medžiagos ir proteino poros) prigimties seka, jog taikomi metodai turi užtikrinti švelnias sąlygas. Liofilinant gaunami homogeniniai, kieti, vandenyje tirpūs produktai, kuriuos, iš naujo ištirpinus vandenyje, galima skirti intraperitoniškai (į
20 pilvaplovės ertmės vidų). Galima naudingai apjungti anksčiau minėtas stadijas, pvz., procesą padaryti ekonomiškiau, iš pradžių paruošiant aktyviosios medžiagos/proteino poros koncentratą, o po to minėtą koncentratą išliofilinant. Kai kurios aktyviosios
25 medžiagos/proteino poros (pvz., amfotericino B/serumo albumino pora) gali būti sėkmingai koncentruojamos, naudojant ultrafiltravimą arba dializę. Kai kurios kitos poros (pvz., paklitakselis/HSA), pageidautina, liofilinamos. Kitos poros pirmiausia turi būti
30 ultrafiltruojamos ir gautas koncentratas po to liofilinamas.

Specialistams aišku, jog ruošiant parenteralinius farmacinius preparatus, skiedimas vandeniu atliekamas
35 naudojant tokius vandeninius tirpalus, kurie turi papildomus, parenteraliai priimtinus priedus, pvz., natrio chloridą.

Pagal išradimą tinkamas tirpiklis, skirtas aktyviojo ingrediento ištirpinimui anksčiau minėtoje stadijoje a), turi pasižymėti tokiomis savybėmis:

* jis turi pilnai ištirpinti aktyvųjį ingredientą jo mišinyje su vandeniu ir

* jo mišinys su >50% vandens neturi denatūruoti naudojamo proteino.

Prieš pradedant vykdyti procesą, naudojant aktyvųjį ingredientą ir atrinktą proteiną, remiantis anksčiau išdėstytais reikalavimais turi būti parinktas atitinkamas tirpiklis. Naudojimui yra tinkami tirpikliai, kurie, mišiniuose turėdami >50% vandens, dar sugeba ištirpinti aktyvųjį ingredientą.

15

Optimalūs tirpikliai, kurie gali būti naudojami anksčiau aprašyto proceso stadijoje a), yra, pvz., bet kokie tirpikliai iš grupės, susidedančios iš alifatinio $C_{(2-4)}$ monoalkoholio arba polialkoholio, 70-100% etanolio, dimetilformamido, metilformamido.

20

Kada ruošiamas proteino turintis tirpalas, jame gali būti agregacijos reguliatorius ir/arba stabilizatorius. Tokie priedai yra papildomas arba optimalus kiekis vandens. Jie taip pat gali apimti agentus, galinčius dalinai užimti kai kurias proteino surišimo sritis, kad būtų išvengta agregacijos; tai, pvz., natrio chloridas, buferis, polialkoholis, pvz., glicerolis, ir/arba vandenyje tirpus cukraus darinys, pageidautina, manitolis, sorbitolis, dulcitolis.

30

Prenkant optimalias sąlygas bet kokiam aktyviajam ingredientui, išankstiniais bandymais turi būti nustatomi optimalūs surišantys giminingumai ir atitinkamos agregatinės savybės. Žemiau pateikiamuose pavyzdžiuose atskleidžiami išsamūs tokių nustatymų metodai.

35

Optimaliam stadijos a) variante naudojami junginiai yra paklitakselis ir natūralios plazmos komponentas, pvz., serumo albuminas, imunoglobulinas, glikoproteinas, interferonas ir/arba interleukinas arba naudojami jų rekombinantai. Kituose išradimo variantuose kaip aktyvioji medžiaga yra naudojamas vandenyje netirpus citostatikas, pvz., taksonoidas, antibiotikas, vitaminas, priešūždegiminis agentas, analgetikas, antispazminis agentas, imunosupresantas, antiepilepsinis agentas, ramiantis agentas, hipnotikas, priešgrybinis agentas, antikoaguliantas, lipidinės peroksidazės inhibitorius, koronarinis vazodilatatorius, antiaritmijos agentas, kardiotonikas, urikacidurinis agentas, antitrombotikas, steroidinis hormonas (progesteronas, androgenas, testosteronas) ir/arba fotosensibilizatorius. Tinkamos išradimo procesui aktyviosios medžiagos apima: amfotericiną B, adriamicino analogą, apazoną, azatiopriną, bromazepamą, kamptoteciną, karbamazepiną, klonazepamą, ciklosporiną A, diazepamą, dikumarolį, digitoksiną, dipiridamolį, dizopiramidą, flunitrazepamą, gemfibrozilą, ketochloriną, ketokonazolį, mikonazolį, nifluminę rūgštį, oksazepamą, fenobarbitalį, fenitoiną, progesteroną, propofolį, ritonavirą, sulfinpirazoną, suprofeną, takrolimus, tamoksifeną, taksonoidą, testosteroną, tirilazadą, triksaleną, valproinę rūgštį ir/arba varfariną.

Optimalus išradimo variantas apima homogeninio, kieto, vandenyje tirpaus produkto, turinčio paklitakselio ir žmogaus serumo albumino, gavimą, kur aktyvusis ingredientas ir plazmos proteinų frakcija gali būti susirišę nekovalentiškai. Kitas optimalus variantas apima homogeninio, kieto, vandenyje tirpaus produkto, turinčio bendros formulės I taksonoidą ir plazmos proteinų frakciją, gavimą, kur aktyvusis ingredientas ir plazmos proteinų frakcija yra susirišę nekovalentiškai.

Iš ankstesnių paaiškinimų matosi, jog šis išradimas nėra ribojamas nei jokiais aktyviosiomis medžiagomis, nei jokiais proteinais, išvardytais anksčiau.

- 5 Kitą išradimo objektą sudaro žmonių arba veterinarinių pacientų gydymui skirtų produktų ir kompozicijų naudojimas. Jis apima kompozicijos, paruoštos sutinkamai su išradimu, efektyvios dozės skyrimą pacientui, kuriam reikalingas gydymas aktyviuoju ingredientu. Naudojamos
- 10 dozės priklauso nuo aktyviojo ingrediento, taip pat ir nuo naudojamo proteino. Gali būti skiriamos tokio dydžio dozės, kad jos užtikrintų bent tuos pačius lygius, kraujuje, kai būna naudojamos konkrečios žinomos aktyviosios medžiagos kitais skyrimo būdais.
- 15 Čia pateikiami produktai arba farmacinės kompozicijos, skirtos žmonių ir veterinarinių pacientų parenteraliniam gydymui, naudojant vandenyje netirpią terapiškai aktyviąją medžiagą, pasižyminčią žymiu rišamuoju giminingumu plazmos proteinui, skiriant parenteraliniu
- 20 būdu pacientui, kuriam reikalingas gydymas minėta aktyviąja medžiaga, efektyvią dozę sekančių produktų, naudojant atitinkamas dozes (skaičiuojant aktyviajai medžiagai): paklitakselis/albuminas 70-280 mg/gydymui; propofolis/albuminas 6-10 mg/kg/val.; kamptoteci-
- 25 nas/albuminas, gemfibrozilas/albuminas, ciklosporinas A/albuminas 3-5 mg/kg/dienai; amfotericinas B/albuminas iki 1,5 mg/kg/dienai; tos pačios dozės naudojamos junginiams, savo sudėtyje turintiems atitinkamus rekombinantinius proteinus.
- 30 Išradimo junginiai, kompozicijos ir būdai turi tokius pranašumus:
- * galimybė išvengti biologiškai nesuderinamų nešiklių, sumažinti arba visiškai pašalinti dozę ribojančius pašalinius poveikius, susijusius su tokiais
- 35 komponentais, kaip toksiški tirpikliai, paviršinio aktyvumo agentai, emulsikliai ir pan.

* plazmos proteinų frakcijų naudojimas vaistinių preparatų nešikliais neiššaukia papildomų toksiškų efektų - priešingai, jie gali pagerinti pacientams toleraciją, pvz., chemoterapijai.

- 5 * atskirais atvejais taikoma dozė gali būti padidinama, lyginant su dabar parduodamais vaistais, ir tokiu būdu yra galimybė pagerinti bendrą terapijos rezultata.

Išradimas detaliau iliustruojamas sekančiuose
10 pavyzdžiuose, neapribojant jais.

PAVYZDŽIAI

I.GAVIMO METODAI, TYRIMAI

- 15 Atyviojo ingrediento (medžiagos) susirišimui su proteinu nustatyti buvo taikomi metodai:

a) Ultrafiltracija

- 1 ml skaidraus tirpalo, gauto sumaišius reguliuojamoje agregatinėje būsenoje esančio proteino vandeninį tirpalą
20 su aktyviojo ingrediento atitinkamame tirpiklyje tirpalu, bandinys filtruojamas per ultrafiltravimo membraną (skiriamoji riba >30000 Da) ir ultrafiltrato frakcijoje yra nustatomas aktyvusis ingredientas. Kada aktyviojo ingrediento koncentracija matuojama nefiltruotame
25 tirpale, visas kiekis (>90%) yra regeneruojamas nepakitusioje formoje.

b) Liofilizacija

- Liofilinimas 1 ml anksčiau minėto tirpalo. Po liofilinimo kietos nuosėdos ištirpinamos 1 ml distiliuoto vandens,
30 gaunant skaidrą tirpalą. Matuojant šiame tirpale aktyviojo ingrediento koncentraciją, vandeninėje fazėje aktyviojo ingrediento nerasta, bet jo 100% regeneruojama iš proteino frakcijos.

c) Aktyviojo ingrediento analizė

- 35 Aktyviojo ingrediento tyrimai atliekami naudojant aukšto slėgio skystą chromatografiją (HPLC), matavimus atliekant UV spektroskopijos pagalba.

HPLC analizė gali būti atliekama, pvz., naudojantis Waters Millenium (Waters, MA, JAV) HPLC sistema. Jos komponentai: Waters 616 siurbliukas; Waters 600 S reguliatorius; Waters 717 plus automatinis bandinių
5 inektorius su termostatu, nustatytu +5°C; Waters 996 diodinis UV/VIS (ultravioletinės/matomos šviesos bangų) diapazono detektorius. Sistema paleidžiama, ir Waters Millennium v. 2.02.0 gauti duomenys patenka į Digital P486/166 (Digital Equipments, Irvin, UK) personalinę
10 kompiuterį. Kiekvienam junginiui sąlygos turi būti optimizuojamos individualiai, kaip žemiau parodyta kai kuriems produktams.

d) Cheminės struktūros patikrinimas

LC/MS (skystos chromatografijos/masių spektroskopijos)
15 metodas buvo naudojamos medžiagos, regeneruotos iš likusios nepakitusios frakcijos, cheminės struktūros patikrinimui. LC/MS analizė buvo atliekama Finnigan Navigator (Finnigan, Manchester, UK) vieno kvadrupolio LC/MS masių spektrofotometru, naudojant ES arba APCI+
20 jonizacijos metodą, MassLab v.2,0 duomenų priėmimo sistemai duomenis perduodant į Digital Venturis FX/166 (Digital Equipments, Irvin, UK) personalinę kompiuterį. Bandymo sąlygos turi būti optimizuotos individualiai kiekvienai konkrečiai medžiagai, remiantis nurodymais -
25 kaip pateikta keletyje sekančių pavyzdžių.

e) Bandinių paruošimas

Čia pateikiamas tipiškas bandinio paruošimo metodas, naudojamas nustatant bendrą medžiagos koncentraciją/kiekį bandinyje HPLC ir/arba LC/MS analizės pagalba.
30 Kietas liofilinimo indelio turinys ištirpinamas vandenyje, tirpalas sumaišomas su absoliučiuoju etanolio santykiu 1:1 pagal tūrį, išsodinant plazmos proteinus, tuo tarpu tirinama medžiaga būna ištirpusi. Nedelsiant greitai nucentrifugavus, tirpalas yra paruoštas HPLC arba
35 LC/MS analizei. Naudojant LC/MS, bandinys analizei įvedamas tiesiogiai, o atliekant HPLC, komponentai atskiriami vienas nuo kito. Abu metodai duoda vertingą

informaciją apie pagrindinio junginio cheminę struktūrą ir/arba apie galimus skilimo produktus, toliau kai kuriems produktams tai yra parodyta detaliau.

Chromatografijos ir masių spektroskopijos duomenys, gauti HPLC ir LC/MS tyrimais, gali patvirtinti cheminę ekvivalentiškumą tarp žinomos biologiškai aktyviosios medžiagos, naudotos kaip pradinė medžiaga, ir regeneruoto junginio, gauto po jo surišimo su proteinų frakcija.

f) Medžiagos

Visos naudojamos aktyviosios medžiagos buvo USP XXIII kvalifikacijos.

Eksperimentuose buvo naudojamos plazmos proteinų frakcijos : (*=Eur. Farm. kvalifikacija)

	Žmogaus Albuminas 20%*	HUMAN Rt., Gödöllő, Hungary
15	Rekombumin™ 25%	DELTA Biot. Ltd, Nottingham, UK
	Humanalbumin 20%*	Biotech Ph., Dreieich, Germany
	Albumeon USP	Centeon Bio-Services, Little Rock, AR, USA
	Human Albumin 20% Behring*	Centeon Ph. GmbH, Wien, Austria
20	Human Gamma Globulin 16%*	HUMAN Rt., Gödöllő, Hungary

II. PARUOŠIMAS IR CHEMINIAI BEI FIZIKINIAI TYRIMAI

Sekančiuose pavyzdžiuose susirišimo santykiai plazmos proteinas:substratas yra diapazone 1:0,1-100. Susirišimo santykiai medžiaga:HSA apskaičiuojami remiantis prielaida, jog HSA molekulinė masė=66500, o žmogaus gamaglobulino molekulinė masė=150000 [žr. 11 Science, vol. 244. p. 1195-1198, 1989; Vox Sang, 70: p. 203-209, 1996].

II. 1 pavyzdys

20% ($3,08 \times 10^{-3} M$) koncentracijos žmogaus serumo albumino reguliuojamoje agregatinėje būsenoje tirpalas ir 1 mg/ml ($1,17 \times 10^{-3} M$) koncentracijos paklitakselio tirpalas absoliučiajame etanolyje sumaišomi santykiu 4:1 ir maišomi tol, kol gaunamas skaidrus tirpalas.

Tirpalas yra liofilinamas; kieta liekana vėl tirpinama pakankamame kiekyje vandens, kad gauti skaidrų tirpalą, turintį 20% žmogaus serumo albumino koncentraciją. Susirišimas yra nustatomas iš UF filtrato ir užsilaikiusių frakcijų, rodančių, jog 99% paklitakselio susirišę su žmogaus serumo albuminu. Tai reiškia, jog santykis žmogaus serumo albuminas:paklitakselis yra 1:0,1.

10 II.2 pavyzdys

4,44% ($6,67 \times 10^{-4} \text{M}$) koncentracijos žmogaus serumo albumino reguliuojamoje agregatinėje būsenoje tirpalas ir 2,0 mg/ml ($2,34 \times 10^{-3} \text{M}$) koncentracijos paklitakselio (molekulinė masė=853,92) tirpalas absoliučiajame etanolyje sumaišomi santykiu 9:1 ir maišomi tol, kol gaunamas skaidrus tirpalas. Toliau tirpalas apdorojamas kaip aprašyta II.1 pavyzdyje.

15 Susirišimas yra nustatomas iš UF filtrato ir užsilaikiusių frakcijų, rodančių, jog 99% paklitakselio susirišę su žmogaus serumo albuminu. Tai reiškia, jog santykis žmogaus serumo albuminas:paklitakselis yra 1:0,39.

II. 3 pavyzdys

25 4,44% ($6,67 \times 10^{-4} \text{M}$) koncentracijos rekombinantinio žmogaus serumo albumino reguliuojamoje agregatinėje būsenoje tirpalas ir 2,0 mg/ml ($1,40 \times 10^{-3} \text{M}$) koncentracijos paklitakselio tirpalas absoliučiajame etanolyje sumaišomi santykiu 9:1 ir maišomi tol, kol gaunamas skaidrus tirpalas.

30 Tirpalas yra liofilinamas; kieta liekana vėl tirpinama pakankamame kiekyje vandens, kad gautųsi skaidrus tirpalas, turintis 20% rekombinantinio žmogaus serumo albumino.

35 Susirišimas yra nustatomas iš UF filtrato ir užsilaikiusių frakcijų, rodančių, jog 99% paklitakselio susirišę su rekombinantiniu žmogaus serumo albuminu. Tai

reiškia, jog santykis rekombinantinis žmogaus serumo albuminas: paklitakselis yra 1:0,24.

II.4 pavyzdys

- 5 2,25% ($1,5 \times 10^{-4} \text{M}$) koncentracijos žmogaus gamaglobulino reguliuojamoje agregatinėje būsenoje tirpalas ir 0,1 mg/ml ($1,171 \times 10^{-4} \text{M}$) koncentracijos paklitakselio tirpalas absoliučiajame etanolyje sumaišomi santykiu 9:1 ir maišomi tol, kol gaunamas skaidrus tirpalas.
- 10 Tirpalas yra liofilinamas; kieta liekana vėl ištirpinama pakankamame kiekyje vandens, kad gautųsi skaidrus tirpalas, turintis 16% žmogaus gamaglobulino.
- Susirišimas yra nustatomas iš UF filtrato ir užsilaikiusių frakcijų, rodančių, jog 98% paklitakselio
- 15 susirišę su žmogaus gamaglobulinu. Tai reiškia, jog santykis žmogaus gamaglobulinas: paklitakselis yra 1:0,71.
- II.1-II.3 pavyzdžiuose paklitakselio kiekis buvo matuojamas HPLC metodu:

- | | | |
|----|---------------------|--|
| | kolonėlė | NN Nucleosil C_{18} 5 μm 250 x2 mm |
| 20 | judrioji fazė | acetonitrilas:vanduo=73:27 |
| | tekėjimo greitis | 0,30 ml/min |
| | temperatūra | kambario |
| | detekcija | prie 273 nm |
| | tipiška užsilaikymo | |
| 25 | trukmė | 5,9 min; $k'=2,93$ |

- Naudojant LC/MC [žr. Rapid Communications in Mass Spektrometry VOL. 11: p. 1025-1032, 1997 ir Rapid Communications in Mass Spectrometry, VOL. 9, p. 495-502, 1995], buvo nustatyta, kad medžiaga yra nepakitusi.
- 30 Palyginamieji duomenys pateikti 6 Fig: 6A Fig. parodytas standarto masių spektras, 6B Fig. - pakartotinai ištirpinto bandinio kreivė. 6C Fig. rodo paklitakselio fragmentaciją.
- LC/MS parametrai: jonizacija: APCI + tarpfazinė riba;
- 35 azoto dujų srovės greitis: 300 l/val., tirpiklis: acetonitrilas:buferis=60:40, kur buferis yra 10 mM amonio

formiatas pH 5,0, koreguotas 10% skruzdžių rūgštimi;
tekėjimo greitis: 0,300 ml/min.

Paklitakselio nustatymas:

- 5 Paklitakselio kiekybiniam nustatymui iš II.1-II.27 pavyzdžių skirtingų tirpalų buvo taikomas HPLC C-18 atvirkštinių fazių metodas. Bandiniai į HPLC sistemą buvo įvedami $\geq 50\%$ etanolio tirpale, kad būtų išvengta medžiagos precipitacijos.

Susirišimas

- 10 Medžiagos susirišimas su plazmos proteinais buvo nustatomas praėjus 15 min. po pusiausvyros nusistovėjimo $8 \pm 2^\circ\text{C}$ temperatūroje.

- 15 Medžiagos pasiskirstymą galima matuoti po ultrafiltravimo per atitinkamą membraną (skiriamoji riba turi būti didesnė negu proteino molekulinė masė), nustatant medžiagos koncentraciją ultrafiltrato frakcijoje (atspindint nesurištą medžiagą) ir tirpale prieš filtravimą, atmetant surištą dalį dėl proteino denatūravimo (atspindint bendrą kiekį). Proteino
- 20 denatūravimui ir surištų frakcijos atskyrimui naudojamas atšaldytas ($8 \pm 2^\circ\text{C}$) absoliutusias etanolis santykiu 1:1. Tikslūs koncentracijos dydžiai ir kiekiai yra išskaičiuojami, atsižvelgiant į praskiedimo faktorių.

- 25 II.5-II.21 pavyzdžiai

20% ($3,08 \times 10^{-3}\text{M}$)-0,02% ($3,08 \times 10^{-6}\text{M}$) koncentracijų diapazono žmogaus serumo albumino tirpalas sumaišomas su 20 mg/ml ($2,34 \times 10^{-2}\text{M}$)-0,01 mg/ml ($1,17 \times 10^{-5}\text{M}$) koncentracijų diapazono paklitakselio tirpalu absoliučiajame etanolyje,

- 30 gaunant kiekvienu atveju skaidrius tirpalus. Detalės pateiktos I lentelėje. Visi matavimai atlikti tris kartus ir išskaičiuoti rezultatų vidurkiai.

I lentelė

Pavyzdys	[T]T mM	[HSA] (mM)	n(TB)/n(HSA)	n(TB)/n/TT/x100%
II.5	0,2342	2,410	0,093	97,4
II.6	0,2342	1,205	0,177	93,2
II.7	0,2342	0,602	0,346	91,0
II.8	0,2342	0,301	0,648	85,2
II.9	0,2342	0,121	1,545	81,2
II.10	0,2342	0,0602	3,125	82,1
II.11	0,2342	0,0241	5,662	59,5
II.12	0,2342	0,0121	4,948	26,0
II.13	0,2342	0,00602	5,823	15,3
II.14	0,2342	0,00241	10,419	11,0
II.15	0,2342	0,00121	14,367	7,6
II.16	0,2342	0,000602	12,370	3,3
II.17	4,6843	0,121	4,135	10,9
II.18	2,3421	0,121	8,401	44,2
II.19	1,1711	0,121	4,585	48,2
II.20	0,4648	0,121	2,864	75,3
II.21	0,1171	0,121	0,765	80,4

kur,

[T]T

bendra paklitakselio koncentracija,

5

pridėjus žmogaus serumo albumino

[HSA]

žmogaus serumo albumino koncentracija

n(TB)/n(HSA)

susirišusių paklitakselio molekulių skaičius vienam žmogaus serumo albumino molekuliui

10

n(TB)/n/TT/x100%

susirišusio paklitakselio procentinė dalis

Paklitakselio koncentracijos (su 0,08% HSA, 10% etanolio, 0,002 mg/ml paklitakselio) kitimai parodyti 7 Fig, albumino koncentracijos (su 0,004-16,0% HSA, 20% etanolio, 0,2 mg/ml paklitakselio) kitimai pateikti 8 Fig; susirišusio su HSA paklitakselio (su 0,8% HSA, 10% etanolio, 0,1-2,0 mg/ml paklitakselio) kitimai, kaip

15

pH (4,0-8,5) funkcija, atvaizduoti 9 Fig. Grafiniai žymėjimai atitinka sekančius pavyzdžius:

II.18 pavyzdys - ◆ - ◆ -

II.19 pavyzdys - 0 - 0 -

5 II.20 pavyzdys - x - x -

II.15 pavyzdys - ◇ - ◇ -

II.21 pavyzdys - ▲ - ▲ -

II.22 pavyzdys

10 Su gyvulių serumo albuminu, imunoglobulinu, glikoproteinais, interferonais ir interleukinais buvo naudojami panašūs į II.2 - II.21 pavyzdžiuose aprašyti metodai.

15 II.23 pavyzdys

Norint gauti reguliuojamą agregatinę būseną su molekulei geriausiomis susirišimui sąlygomis, komerciškai gaunamas žmogaus serumo albuminas arba rekombinantinis žmogaus serumo albuminas (toliau "albuminas") yra apdorojamas, pašalinant stabilizatorius, pvz., natrio oktaonatą, N-acetil-D,L-triptofaną ir kitus joninius komponentus bei druskas.

a.) Ultrafiltracijos metodas

25 Vandenilio chlorido pagalba nustato tirpalo, turinčio 10% albumino, pH lygų 3,0 ir bidistiliuotu vandeniu tirpalą praskiedžia iki 5% proteino koncentracijos. Naudojant ultrafiltravimą (membranos skiriamoji riba 30000 kD), tirpalą koncentruoja iki 10% proteino koncentracijos.

30 Tirpalą 1,0 mM vandenilio chloridu vėl praskiedžia iki 5% proteino koncentracijos. Tirpalą sukonzentruoja iki 10% proteino koncentracijos, naudojant ultrafiltravimą (membranos skiriamoji riba 30000 kD).

35 Procedūrą kartoja 12 kartų, po to 2,0 M vandeniniu natrio hidroksido tirpalu nustato pH lygų 6,9 ir bidistiliuotu vandeniu tirpalą praskiedžia iki 5% proteino koncentracijos. Vėl koncentruoja tirpalą iki 10% proteino

koncentracijos, pakartotinai naudojant ultrafiltravimą (membranos skiriamoji riba 30000 kD).

5 Tirpalą bidistiliuotu vandeniu vėl praskiedžia iki 5% proteino koncentracijos. Naudojant ultrafiltravimą (membranos skiriamoji riba 30000 kD), tirpalą koncentruoja iki 10% proteino koncentracijos. Procedūrą pakartoja 10 kartų, gaunant gryną proteino frakciją, pakankamai laisvą nuo kitų priemaišų. Tam momentui ultrafiltrato laidumas elektrai artimas skiedimui
10 naudojamo bidistiliuoto vandens. Šis proteinas yra tinkamas paklitakselio arba ciklosporino surišimui.

b.)

Vietoj ultrafiltravimo naudojant dializę, gaunami panašūs rezultatai. Apdorojimas trunka 48 val.

15

II. 24 pavyzdys

0,8% ($1,203 \times 10^{-4} \text{M}$) koncentracijos HSA tirpalas ir 4,0 mg/ml ($4,33 \times 10^{-3} \text{M}$) koncentracijos amfotericino B (molekulinė masė=924,09) tirpalas DMF sumaišomi santykiu
20 9:1 ir maišomi tol, kol gaunamas skaidrus tirpalas.

Tirpalas liofilinamas; kieta liekana vėl ištirpinama pakankamame kiekyje vandens, kad gautųsi skaidrus tirpalas, turintis galutinę 20% HSA koncentraciją. Susirišimas nustatomas iš UF filtrato ir užsilaikiusių
25 frakcijų, rodančių, jog 99,7% amfotericino B susirišę su HSA. Tai reiškia, jog santykis HSA:amfotericinas B yra 1:4.

II. 25 pavyzdys

30 0,8% ($1,203 \times 10^{-4} \text{M}$) koncentracijos rekombinantinio žmogaus serumo albumino tirpalas ir 40,0 mg/ml ($4,33 \times 10^{-2} \text{M}$) amfotericino B tirpalas DMF + HCL terpėje sumaišomi santykiu 9:1 ir maišomi tol, kol gaunamas skaidrus tirpalas.

35 Tirpalas liofilinamas; kieta liekana vėl ištirpinama pakankamame kiekyje vandens, kad gautųsi skaidrus tirpalas, turintis galutinę 20% rekombinantinio HSA

koncentraciją. Susirišimas yra nustatomas iš UF filtrato ir užsilaikiusių frakcijų, rodančių, jog 99,5% amfotericino B susirišę su HSA. Tai reiškia, jog santykis HSA:amfotericinas B yra 1:40.

5 Amfotericinas B buvo matuojamas HPLC metodu:

kolonėlė	MN Nucleosil C ₁₈ 5 μm 250x2 mm
judrioji fazė	acetonitrilas:buferis=1:1 (buferis: 0,2% skruzdžių rūgštis, pH koreguotas trietilaminu iki 4,0)
tekėjimo greitis	0,30 ml/min
temperatūra	kambario
detekcija	prie 365 nm
tipiška užsilaikymo trukmė	5,3 min; k'=1,41

Naudojant LC/MC, buvo nustatoma medžiaga ir randama esanti nepakitusi. Palyginamieji duomenys parodyti 2 Fig.: 2A Fig. pateiktas standarto masių spektras, 2b Fig. 10 - vėl ištirpinto bandinio kreivė. 2C Fig. rodo amfotericino B fragmentaciją.

LC/MS parametrai: jonizacija: ESI + tarpfazinė riba; azoto dujų srovės greitis: 300 l/val.; tirpiklis: 20 mM amonio formiatas pH 4,0, koreguotas 10% skruzdžių rūgštimi, tekėjimo greitis: 0,300 ml/min.

II.26 pavyzdys

0,4%(6,015x10⁻⁵M) koncentracijos HSA reguliuojamoje agregatinėje būsenoje tirpalas ir 0,14 mg/ml (4,02x10⁻⁴M) 20 koncentracijos kamptotecino (molekulinė masė= 348,36) tirpalas absoliučiajame etanolyje sumaišomi santykiu 4:1 ir maišomi, kol gaunamas skaidrus tirpalas. Tirpalas liofilinamas; kieta liekana vėl ištirpinama pakankamame vandens kiekyje, kad gautųsi skaidrus tirpalas, turintis 25 galutinę 20% HSA koncentraciją. Susirišimas yra nustatomas iš UF filtrato ir užsilaikiusių frakcijų,

rodančių, jog 98% kamptotecino susirišę su HSA. Tai reiškia, jog santykis HSA:kamptotecinas yra 1:5,34.

II. 27 pavyzdys

- 5 0,4% ($6,015 \times 10^{-5} \text{M}$) koncentracijos rekombinantinio HSA reguliuojamoje agregatinėje būsenoje tirpalas ir 0,14 mg/ml ($4,02 \times 10^{-4} \text{M}$) koncentracijos kamptotecino tirpalas absoliučiajame etanolyje sumaišomi santykiu 4:1 ir maišomi, kol gaunamas skaidrus tirpalas.
- 10 Tirpalas liofilinamas; kieta liekana vėl ištirpinama pakankamame kiekyje vandens, kad gautųsi skaidrus tirpalas, turintis galutinę 20% rekombinantinio HSA koncentraciją. Susirišimas yra nustatomas iš UF filtrato ir užsilaikiusių frakcijų, rodančių, jog 98% kamptotecino
- 15 susirišę su HSA. Tai reiškia, jog santykis rekombinantinis HSA:kamptotecinas yra 1:5,34.

Kamptoteciną nustato HPLC metodu:

kolonėlė	MN Nucleosil C_{18} 5 μm 250x2 mm
judrioji fazė	acetonitrilas:buferis=33:67
tekėjimo greitis	0,33 ml/min
temperatūra	kambario
detekcija	prie 356 nm
tipiška užsilaikymo trukmė	6,9 min; $k' = 2,45$

Medžiaga nustatyta ir rasta nepakitusi LC/MS pagalba

- 20 [Cancer Research, VOL. 56: p. 3689-3694, 1996.]

II. 29 pavyzdys

- 4,0% ($6,015 \times 10^{-4} \text{M}$) koncentracijos HSA reguliuojamoje agregatinėje būsenoje tirpalas ir 8,0 mg/ml ($3,39 \times 10^{-2} \text{M}$) koncentracijos karbamazepino (molekulinė masė=236,27) tirpalas absoliučiajame etanolyje sumaišomi santykiu 19:1 ir maišomi, kol gaunamas skaidrus tirpalas. Tirpalas liofilinamas; kieta liekana vėl ištirpinama pakankamame kiekyje vandens, kad gautųsi skaidrus tirpalas, turintis
- 25 galutinę 20% HSA koncentraciją. Susirišimas yra
- 30

nustatomas iš UF filtrato ir užsilaikiusių frakcijų, rodančių, jog 98% karbamazepino susirišę su HSA. Tai reiškia, jog santykis HSA: karbamazepinas yra 1:2,8.

Karbamazepinas buvo matuojamas HPLC metodu:

kolonėlė	MN Nucleosil C ₁₈ 5 μm 250x2 mm
judrioji fazė	acetonitrilas:buferis=1:1 (buferis: 0,2% skruzdžių rūgštis, pH koreguotas trietilaminu iki 7,0)
tekėjimo greitis	0,25 ml/min
temperatūra	kambario
detekcija	prie 285 nm
tipiška užsilaikymo trukmė	5,3 min; k'=1,12

5

Naudojant LC/MS [Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem, VOL. 35(10): p. 755-759, 1997], buvo nustatoma medžiaga ir randama esanti nepakitusi. Palyginamieji duomenys parodyti 3 Fig.: 3A Fig. atvaizduotas standarto masių spektras, 3B Fig. - vėl ištirpinto bandinio kreivė. 3C Fig. rodo karbamazepino fragmentaciją.

10

LC/MS parametrai: jonizacija: ESI + tarpfazinė riba; azoto dujų srovės greitis: 300 l/val; tirpiklis: 2 mM amonio formiatas; tekėjimo greitis: 0,250 ml/min.

15

II. 30 pavyzdys

4,0% ($6,015 \times 10^{-4} M$) koncentracijos HSA reguliuojamoje agregatinėje būsenoje tirpalas ir 1,0 mg/ml ($8,33 \times 10^{-4} M$) koncentracijos ciklosporino A (molekulinė masė=1202,63) tirpalas absoliučiajame etanolyje sumaišomi santykiu 9:1 ir maišomi, kol gaunamas skaidrus tirpalas.

20

Tirpalas liofilinamas; kieta liekana vėl ištirpinama pakankamame kiekyje vandens, kad gautųsi skaidrus tirpalas, turintis galutinę 20% HSA koncentraciją.

25

Susirišimas yra nustatomas iš UF filtrato ir užsilaikiusių frakcijų, rodančių, jog 97% ciklosporino A

susirišę su HSA. Tai reiškia, jog santykis HSA:ciklosporinas A yra 1:0,14.

II. 31 pavyzdys

- 5 2,0% ($3,008 \times 10^{-4} \text{M}$) koncentracijos rekombinantinio HSA reguliuojamoje agregatinėje būsenoje tirpalas ir 1,0 mg/ml ($8,33 \times 10^{-4} \text{M}$) koncentracijos ciklosporino A tirpalas absoliučiajame etanolyje sumaišomi santykiu 9:1 ir maišomi, kol gaunamas skaidrus tirpalas.
- 10 Tirpalas liofilinamas; kieta liekana vėl ištirpinama pakankamame kiekyje vandens, kad gautųsi skaidrus tirpalas, turintis galutinę 20% rekombinantinio HSA koncentraciją. Susirišimas yra nustatomas iš UF filtrato ir užsilaikiusių frakcijų, rodančių, jog 98% ciklosporino
- 15 A susirišę su rekombinantiniu HSA. Tai reiškia, jog santykis rekombinantinis HSA:ciklosporinas A yra 1:0,29.

II. 32 pavyzdys

- 2,25% ($1,50 \times 10^{-4} \text{M}$) koncentracijos žmogaus gamaglobulino
- 20 tirpalas ir 1,0 mg/ml ($8,33 \times 10^{-4} \text{M}$) koncentracijos ciklosporino A tirpalas absoliučiajame etanolyje sumaišomi santykiu 9:1 ir maišomi, kol gaunamas skaidrus tirpalas.
- Tirpalas liofilinamas; kieta liekana vėl ištirpinama
- 25 pakankamame kiekyje vandens, kad gautųsi skaidrus tirpalas, turintis 16% žmogaus gamaglobulino koncentraciją. Susirišimas nustatomas iš UF filtrato ir užsilaikiusių frakcijų, rodančių, jog 98% ciklosporino A
- 30 susirišę su žmogaus gamaglobulinu. Tai reiškia, jog santykis žmogaus gamaglobulinas:ciklosporinas A yra 1:0,56.

Ciklosporinas buvo matuojamas HPLC metodu:

kolonėlė	MN Nucleosil C ₁₈ 5 μm 250x2 mm
judrioji fazė	acetonitrilas: vanduo:metanolis:fosforo rūgštis=700:260:40:0,05
tekėjimo greitis	0,350 ml/min
temperatūra	80°C termostatas
detekcija	prie 205 nm
tipiška užsilaikymo trukmė	7,5 min; k'=2,95

Kaip rodo rezultatai, naudojant LC/MC, buvo nustatoma medžiaga ir randama esanti nepakitusi. Palyginamieji duomenys parodyti 4 Fig.: 4A Fig. pateiktas standarto masių spektras, 4B Fig. - vėl ištirpinto bandinio kreivė. 4C Fig. rodo ciklosporino A fragmentaciją.

LC/MS parametrai: jonizacija: ESI + tarpfazinė riba; azoto dujų srovės greitis: 300 l/val.; tirpiklis: acetonitrilas/vanduo=60/40; tirpiklio srovės greitis: 0,350 ml/min.

II. 33 pavyzdys

0,4% ($6,015 \times 10^{-5} M$) koncentracijos HSA tirpalas ir 2,0 mg/ml ($1,12 \times 10^{-2} M$) koncentracijos propofolio (molekulinė masė=178,27) tirpalas absoliučiajame etanolyje sumaišomi santykiu 9:1 ir maišomi, kol gaunamas skaidrus tirpalas. Tirpalas liofilinamas; kieta liekana vėl ištirpinama pakankamame kiekyje vandens, kad gautųsi skaidrus tirpalas, turintis galutinę 20% HSA koncentraciją. Susirišimas yra nustatomas iš UF filtrato ir užsilaikiusių frakcijų, rodančių, jog 99% propofolio susirišę su HSA. Tai reiškia, jog santykis HSA: propofolis yra 1:18,3.

II. 34 pavyzdys

0,4% ($6,015 \times 10^{-5} \text{M}$) koncentracijos rekombinantinio HSA tirpalas ir 2,0 mg/ml ($1,12 \times 10^{-2} \text{M}$) koncentracijos propofolio tirpalas absoliučiajame etanolyje sumaišomi santykiu 9:1 ir maišomi, kol gaunamas skaidrus tirpalas. Tirpalas liofilinamas; kieta liekana vėl ištirpinama pakankamame kiekyje vandens, kad gautųsi skaidrus tirpalas, turintis galutinę 20% rekombinantinio HSA koncentraciją. Susirišimas yra nustatomas iš UF filtrato ir užsilaikiusių frakcijų, rodančių, jog 99% propofolio susirišę su rekombinantiniu HSA. Tai reiškia, jog santykis rekombinantinis HSA:propofolis yra 1:18,3.

Propofolis buvo matuojamas HPLC metodu:

kolonėlė	MN Nucleosil C ₁₈ 5 μm 250x2 mm
judrioji fazė	acetonitrilas:vanduo=73:27
tekėjimo greitis	0,30 ml/min
temperatūra	kambario
detekcija	prie 273 nm
tipiška užsilaikymo trukmė	6,1 min; $k' = 1,77$

15

Naudojant LC/MS [J. of Chromatography B, 669: p. 358-365, 1995], buvo nustatoma medžiaga ir randama esanti nepakitusi. Palyginamieji duomenys parodyti 5 Fig.: 5A Fig. pateikta standarto masių spektras, 5B Fig. - pakartotinai ištirpinto bandinio kreivė. 5C Fig. rodo propofolio fragmentaciją.

20

LC/MS parametrai: jonizacija: APCI + tarpfazinė riba; azoto dujų srovės greitis: 300 l/val; tirpiklis: acetonitrilas/vanduo=73/23; srovės greitis: 0,300 ml/min.

25

II. 35 pavyzdys

9,0 ml 0,8% ($1,213 \times 10^{-4} \text{M}$) koncentracijos HSA tirpalo ir 1,0 ml 4,0 mg/ml ($4,33 \times 10^{-3} \text{M}$) koncentracijos amfotericino B tirpalo sumaišomi dimetilformamide, kad gautųsi

skaidrus tirpalas. Šis tirpalas 20 val. 4°C temperatūroje (tamsoje) dializuojamas prieš 2,0 l vandens (WFI).

Naudojant II. 24 pavyzdžio nustatymo metodą, rasta, jog susirišimas yra 99% ir santykis HSA:amfotericinas B lygus

5 1:3,5.

Pakartojus dializę penkis kartus, DMF koncentracija tirpale sumažėja žemiau nustatymo ribos ($2 \times 10^{-9} \text{M}$).

III. FARMACINIŲ KOMPOZICIJŲ DOZAVIMO FORMOS

10

II.1-III.6 pavyzdžiai

Atliekant anksčiau aprašytą liofilinimo procedūrą, gaunama atitinkama farmacinė kompozicija. Vėl ištirpinus kietą medžiagą atitinkamame WFI tūryje, kad gautųsi 20%

15 HSA koncentracija, tirpalas įgauna terapiniam vartojimui tinkamą koncentraciją, kas kai kurioms aktyviosioms medžiagoms apibendrinta žemiau:

Pavyzdys	Pavadinimas	Konc., mg/ml
III.1	amfotericinas B	11,09
III.2	kamptotecinas	6,8
III.3	karbamazepinas	1,98
III.4	ciklosporinas A	0,50
III.5	paklitakselis	1,0
III.6	propofolis	10,0

20 Šios kompozicijos vėliau gali būti supilstytos į buteliukus, skirtus injekcijoms ir infuzijoms.

IV. BIOLOGINIAI PAVYZDŽIAI

25 Biologinio ekvivalentiškumo tyrimai

Biologinis ekvivalentiškumas nustatomas, lyginant naujas kompozicijas su terapijoje jau naudojamomis kompozicijomis, turinčiomis tą pačią aktyviąją medžiagą, pasižyminčią žemu tirpumu vandenyje. Tokios žinomos

kompozicijos yra paruošiamos, naudojant polioksietilintą ricinos aliejų (Cremaphor EL) ir absoliutųjį etanolį.

Naudojamos medžiagos:

- 5 Paklitakselis, ištirpintas mišinyje polioksietilintas ricinos aliejus (Cremaphor EL):absoliutus etanolis=1:1, lyginamas su išradimo vandeniniu paklitakselio/HSA tirpalu, paruoštu pagal II. 2 pavyzdį.

IV.1 pavyzdys Tyrimai *in vitro*

- 10 Norint nustatyti antiproliferacinį ir citotoksinį aktyvumą žmogaus auglių ląstelių linijoms, buvo atliekami palyginamieji tyrimai *in vitro*. Paklitakselio Cremophor EL/absoliutaus etanolio kompozicija ir paklitakselio/HSA kompozicija buvo palyginamos, išbandant ant K562 žmogaus
- 15 mieloidinių leukocitų, MCF-7 ir MDA-231 krūties ir OVCAR-5 kiaušidžių karcinomos ląstelių linijų [Anticancer Research, Vol.16: p. 2469-2478, 1996].

Metodika:

- Kolonijos augimo inhibicijos tyrimas: ląstelių linijų
- 20 monosluoksnės kultūros apdorojamos vaistų, esančių dviejose anksčiau aprašytose kompozicijose, be to, palyginimui, DMSO/druskos tirpalu, aštuoniomis skirtingomis koncentracijomis. Kultūros inkubuojamos, atitinkamai, 24, 48, 72, 96 ir 120 val. Kolonijos dažomos
- 25 kristalo violetiniu, ir apdorotų ląstelių gyvybingumas išskaičiuojamas kaip procentinė dalis kolonijų, kurias sudaro neapdorotos ląstelės. IIA-IVB lentelės pateikia rezultatus, gautus su skirtingomis ląstelių linijomis. Kiekviename tyrime apdorotų ląstelių gyvybingumas
- 30 pateikiamas kaip procentinė dalis kolonijų, kurias sudaro neapdorotos ląstelės. Visi pateikiami dydžiai yra trijų eksperimentų vidurkiai.

IIA lentelė

- 5 ląstelių linija: MCF7 krūties karcinoma
kompozicija: paklitakselis/Cremophor EL ir absol. etanolis

Ptxcc[μM]\laikas[val]	24 val	48 val	72 val	96 val	120 val
0,005	92*	86	76	42	30
0,01	90	81	72	33	26
0,02	86	71	67	29	23
0,025	84	64	60	24	18
0,05	82	60	52	23	16
0,1	80	57	38	18	15
1,0	68	46	28	15	6,5
10,0	62	33	21	10	4,6

10 IIB lentelė

- ląstelių linija: MCF7 krūties karcinoma
kompozicija: paklitakselis/HSA

Ptxcc[μM]\laikas[val]	24 val	48 val	72 val	96 val	120 val
0,005	91	84	75	41	27
0,01	88	81	69	35	23
0,02	84	76	64	31	20
0,025	80	70	59	28	16
0,05	77	66	53	25	12
0,1	75	59	46	20	9,5
1,0	67	42	30	17	6,2
10,0	58	31	21	9,0	3,0

5 IIIA lentelė

ląstelių linija: MDA-231 krūties karcinoma

kompozicija: paklitakselis/Cremophor EL ir absol. etanolis

Ptxcc[μ M]\laikas[val]	24 val	48 val	72 val	96 val	120 val
0,005	97	89	80	47	34
0,01	94	87	75	41	30
0,02	89	82	69	37	28
0,025	86	76	65	34	23
0,05	84	72	59	29	21
0,1	83	66	53	26	18
1,0	73	49	34	21	9,5
10,0	65	37	24	14	8,2

10

IIIB lentelė

ląstelių linija: MDA-231 krūties karcinoma

15 kompozicija: paklitakselis/HSA

Ptxcc[μ M]\laikas[val]	24 val	48 val	72 val	96 val	120 val
0,005	92	78	51	30	10
0,01	86	65	38	24	8,3
0,02	75	51	33	22	7,0
0,025	64	47	28	19	6,4
0,05	60	42	26	18	5,3
0,1	55	36	24	16	4,0
1,0	49	33	22	15	3,2
10,0	45	26	20	10	2,6

20

IVA lentelė

ląstelių linija: K562 žmogaus mieloidinė leukemija

5 kompozicija: paklitakselis/Cremophor EL ir absol. etanolis

Ptxcc[μ M]\lai- kas[val]	24 val	48 val	72 val	96 val	120 val
0,005	88	59	30	21	10
0,01	79	40	21	15	8,7
0,02	66	31	19	12	7,2
0,025	62	29	17	10	6,0
0,05	56	25	14	9,4	5,4
0,1	51	23	12	7,7	4,6
1,0	47	20	10,5	6,0	3,0
10,0	39	16	9,5	4,2	2,0

10 IVB lentelė

ląstelių linija: K562 žmogaus mieloidinės leukemijos

bandinys: paklitakselis/HSA

Ptxcc[μ M]\lai- kas[val]	24 val	48 val	72 val	96 val	120 val
0,005	89	53	31	18	5,4
0,01	75	40	22	11	4,7
0,02	69	32	18	9,0	4,0
0,025	65	30	14	7,6	3,5
0,05	58	25	11	7,0	3,0
0,1	53	21	9,5	5,6	2,4
1,0	47	18	8,0	5,0	1,7
10,0	41	16	7,1	4,7	1,0

15

IV. 2 pavyzdys: Farmakokinetinis testas *in vivo*

is terapinės pusės, biokvivalentiskumas gali būti

20 svarstomas, parodant vienodas farmakokinetines

charakteristikas, pvz., AUC (plotas po kreive), eliminavimo konstantos, plazmos pusperiodis, paskyrus tą pačią dozę toms pačioms rūšims. Tokie eksperimentai buvo atliekami su žiurkėmis, išbandant dvi kompozicijas iš IV.1 pavyzdžio [Semin Oncol, VOL. 21 (5 Suppl. 8): p.53-62, 1994].

AUC reiškia plotą po kreive (plazmos koncentracija priklausomai nuo laiko). Kreivė gaunama, matuojant junginio, skiriamo įvairiais laiko tarpais, koncentraciją plazmoje.

Farmakokinetiniai tyrimai su žiurkėmis:

Metodika: paklitakselio 2,5 mg/kg dozė buvo skiriama, 1,0 ml tūrio įvedus i. v.. boliusą CR.(Wi)BR žiurkėms (kūno svoris 380-420 gramų) ir, kaip nurodyta žemiau, kiekvienu laiko momentu į heparinizuotą mėgintuvėlį buvo imama po 1,0 ml trijų gyvuliukų kraujo bandinio:

#	0'	10'	20'	30'	45'	60'	90'	2val	3val	4val	5val	6val
1	+	+	+									
2		+	+	+								
3			+	+	+							
4				+	+	+						
5					+	+	+					
6						+	+	+				
7							+	+	+			
8								+	+	+		
9									+	+	+	
10										+	+	+
11	+										+	+
12	+	+										+

Plazmos frakcija atskiriama nedelsiant nucentrifuguojant +5°C temperatūroje ir laikoma -70°C temperatūroje iki analitinių tyrimų atlikimo.

Bandinio paruošimas: užšaldyti plazmos pavyzdžiai atšildomi iki +8°C, 5 min. centrifuguojami 5000 aps./min. greičiu. Paimama 0,300-0,500 ml skaidraus plazmos tirpalo

ir patalpinama ant Oasis HLB 1 cc SPE (kieta fazė) ekstrakcijos kasetės. Prieš patalpinant plazmą, kasetė kondicionuojama, ją praplaunant 1 ml metanolio, po to 1 ml vandens. Paklitakselis absorbuojamas ant SPE kasetės, tuo tarpu bandinio komponentų likutis nuplaunamas 1 ml vandens ir 1 ml 30% acetonitrilo/vandens tirpalu. Kasetė ore sausai išdžiovinama. Paklitakselis nuo kasetės eliuojuojamas 1 ml absoliučiojo etanolio. Bandinys azoto pagalba sausai išgarinamas ir iki analizavimo laikomas (-20°C) temperatūroje. Likutis ištirpinamas 0,200 ml absoliučiojo etanolio ir injekuojamas HPLC analizei. HPLC sąlygos identiškos toms, kuriomis buvo identifikuojama medžiaga.

Rezultatai:

Gauti taškai yra trijų individualių gyvuliukų trijų bandinių vidurkiai. Matosi, jog skirtumas tarp dviejų kreivių, gautų atliekant dviejų skirtingų kompozicijų vienodų dozių farmakokinetinius tyrimus, pasilieka individualių bandinių nukrypimų ribose. Ta pati kreivė apibrėžia visus individualius duomenis, nužymėdama, jog tarp dviejų kompozicijų nėra farmakokinetinių charakteristikų skirtumo arba jis minimalus.

IV. 3 pavyzdys

Tyrimai *in vivo*, vertinant antiproliferacinį ir citotoksinį aktyvumą, rodo, jog naujos kompozicijos turi teigiamą efektą kovojant prieš žmogaus auglių ksenograftus CH1 ir CH1_{tax}, atliekant bandymus su plikomis pelėmis.

30

IV pavyzdys

Hipersensibilumo bandymai

Apytikriai 45% pacientų, gydytų paklitakseliu, pasireiškė hipersensibilumo reakcijos. Įrodyta, jog šie pašaliniai efektai susiję su vienu kompozicijos užpildu, Cremophor EL, kas pastebėta ir su kitais farmaciniais produktais,

turinčiais tą patį komponentą. Ši hipersensibilumo reakcija nustatyta kaip anafilaksinis toksiškumas, pasireiškiantis per histamino indukciją, sužadinamą Cremorhor EL.

- 5 Tyrimai buvo atliekami su CRL (WI) BR žiurkių patiniais, sveriančiais 130-150 g. Skiriama paklitakselio dozė buvo apie 7,0 mg/kg, suleidžiant i. v. bendrą 1,0 ml tūrį. Kiekvienam laiko taškui ir kiekvienai dozei buvo skirtos grupės po 5 gyvuliukus. Kraujo pavyzdžiai buvo surenkami
- 10 į heparino turinčius mėgintuvėlius, praėjus 2,5 ir 10 min. po dozės įvedimo. Plazma buvo nedelsiant atskiriama greitai centrifuguojant. Bandiniai buvo laikomi - 70°C temperatūroje.
- Bandinyje esantis histaminas buvo C-¹⁴-metilintas,
- 15 naudojant specifinę fermentą histamin-N-metil-transferazę. Histamino lygis plazmos bandiniuose buvo nustatomas, matuojant C-¹⁴ radioaktyvumą.
- Gauti duomenys rodo, jog Cremophor EL ir jį turinti kompozicija iššaukia žymią histamino indukciją, tuo tarpu
- 20 HSA ir HSA turinti kompozicija bei pats paklitakselis nerodo tokio efekto.

IV. 5 pavyzdys

- Tas pats fenomenas kaip ir IV. 4 pavyzdyje aptinkamas,
- 25 atliekant *in vitro* eksperimentus su žmonių kraujo bandiniais, remiantis kraujo limfocitų chromatino aktyvacijos kiekybiniais tyrimais [Metodas: Analytical and Quantitative Cytology and Histology, VOL. 8: p.1, 1986].

30

35

40

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

5 1. Vandenyje tirpus produktas arba farmacinė kompozicija kietoje arba skystoje formoje, ir jų tikrieji vandeniniai tirpalai, neturintys organinio tirpiklio, daugiausia skirti parenteraliniam vartojimui, b e s i s k i r i a n t y s tuo, kad turi:

10 a) terapiškai aktyvųjį junginį, pasižymintį žemu tirpumu vandenyje ($<1 \cdot 10^{-4}$ M/l, $<1 \cdot 10^{-5}$ M/l, $<1 \cdot 10^{-6}$ M/l) ir žymiu rišamuoju giminingumu plazmos proteinams (toliau "aktyvioji medžiaga"), tarpusavyje surištoje būsenoje

b) plazmos proteinų frakciją reguliuojamoje
15 agregatinėje būsenoje, kur minėta aktyvioji medžiaga ir minėta proteinų frakcija tarpusavyje susirišę nekovalentiniais ryšiais ir, nebūtinai, papildomai turintys

c) farmaciniu požiūriu priimtina ir daugiausia
20 parenteraliai tinkamą tokį(us) vandenyje tirpios kompozicijos priedą(us) kaip vandenį, stabilizatorių(s), proteinų agregacijos reguliatorių(s).

2. Vandenyje tirpus produktas arba farmacinė kompozicija
25 kietoje arba skystoje formoje ir jų vandeniniai tirpalai, neturintys organinio tirpiklio, pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t y s tuo, kad molinis santykis aktyvus ingredientas:proteinai yra nuo 1:0,05 iki 1:100 diapazone, optimalu nuo 1:0,1 iki 1:50.

30 3. Vandenyje tirpus produktas arba žmogui skirta farmacinė kompozicija pagal 1 arba 2 punktą, b e s i s k i r i a n t y s tuo, kad savo sudėtyje turi žmogaus plazmos proteinų frakciją reguliuojamoje agregatinėje
35 būsenoje.

4. Vandenyje tirpus produktas arba veterinarinė farmacinė kompozicija pagal 1 arba 2 punktą, b e s i s k i r i a n t y s tuo, kad

r i a n t y s tuo, kad savo sudėtyje turi gyvulinės plazmos proteinų frakciją reguliuojamoje agregatinėje būsenoje.

- 5 5. Produktas arba farmacinė kompozicija pagal bet kurią iš 1-4 punktų, b e s i s k i r i a n t y s tuo, kad savo sudėtyje kaip plazmos proteinų frakciją turi natūralios plazmos komponentą, pvz., serumo albuminą arba rekombinantinį serumo albuminą.

10

6. Produktas arba farmacinė kompozicija pagal bet kurią iš 1-5 punktų, b e s i s k i r i a n t y s tuo, kad savo sudėtyje kaip plazmos proteinų frakciją turi natūralų imunoglobuliną, glikoproteiną, interferoną ir/arba
15 interleukiną arba rekombinantinį minėtą plazmos komponentą.

20

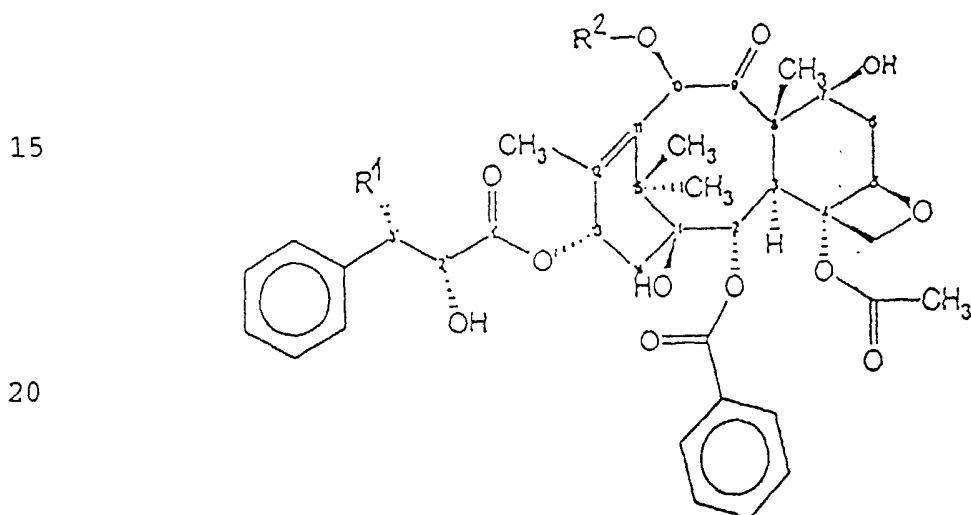
7. Produktas arba farmacinė kompozicija pagal bet kurią iš 1-6 punktų, b e s i s k i r i a n t y s tuo, kad savo
20 sudėtyje kaip vandenyje netirpią aktyviąją medžiagą turi citostatiką, pvz., taksonoidą, antibiotiką, vitaminą, priešuždegiminį agentą, analgetiką, antivirusinį agentą, antispazminį agentą, imunosupresantą, antiepilepsinį agentą, raminamąjį agentą, hipnotiką, priešgrybinį
25 agentą, antikoaguliantą, lipidinės peroksidazės inhibitorių, koronarinių vazodilatatorių, antiaritmijos agentą, kardiotoniką, urikacidurinį agentą, antitrombotiką, steroidinį hormoną (progesteroną, androgeną, testosteroną) ir/arba fotosensibilizatorių.

30

8. Produktas arba farmacinė kompozicija pagal bet kurią iš 1-6 punktų, b e s i s k i r i a n t y s tuo, kad savo
35 sudėtyje turi bent vieną iš aktyviųjų medžiagų: amfotericiną B, adriamicino analogą, apazoną, azatiopriną, bromazepamą, kamptoteciną, karbamazepiną, klonazepamą, ciklosporiną A, diazepamą, dikumarolį, digitoksiną, dipiridamolį, dizopiramidą, flunitrazepamą,

gemfibrozilą, ketochloriną, ketokonazolį, mikonazolį, niflumine rūgštį, oksazepamą, fenobarbitalį, fenitoiną, progesteroną, propofolį, ritonavirą, sulfinpirazoną, suprofeną, takrolimus, tamoksifeną, taksonoidą, 5 testosteroną, tirilazadą, trioksaleną, valproinę rūgštį, varfariną.

9. Produktas arba farmacinė kompozicija pagal bet kuri iš 1-7 punktų, b e s i s k i r i a n t y s tuo, kad savo 10 sudėtyje turi taksonoidą, kurio bendra formulė I:



kurioje

25 R^1 žymi tret-butiloksikarboksirūgšties amidą arba benzoilamidą,

R^2 žymi vandenilį arba bet kokią acilo grupę, optimalu acetilą.

30 10. Produktas arba farmacinė kompozicija pagal bet kuri iš 1-7 punktų, b e s i s k i r i a n t y s tuo, kad savo sudėtyje taksonoidu turi paklitakselį ir žmogaus serumo albuminą, imunoglobuliną, glikoproteiną, interferoną ir/arba interleukiną arba kitą natūralią arba 35 rekombinantinę žmogaus plazmos proteinų frakciją moliniu santykiu nuo 1:0,05 iki 1:100, optimalu - nuo 1:0,1 iki 1:50.

11. Produktas arba farmacinė kompozicija pagal bet kurią iš 1-9 punktų, b e s i s k i r i a n t y s tuo, kad savo sudėtyje turi azatiopriną ir žmogaus serumo albuminą, imunoglobuliną, glikoproteiną, interferoną ir/arba interleukiną arba kitą natūralią arba rekombinantinę žmogaus plazmos proteinų frakciją moliniu santykiu nuo 1:0,05 iki 1:100, optimalu - nuo 1:0,1 iki 1:50.
- 10 12. Kompozicija pagal bet kurią iš 1-8 punktų, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad savo sudėtyje turi kamptoteciną ir žmogaus serumo albuminą, imunoglobuliną, glikoproteiną, interferoną ir/arba interleukiną arba kitą natūralią arba rekombinantinę žmogaus plazmos proteinų frakciją moliniu santykiu nuo 1:0,05 iki 1:100, optimalu - nuo 1:0,1 iki 1:50.
- 20 13. Kompozicija pagal bet kurią iš 1-8 punktų, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad savo sudėtyje turi gemfibrozilą ir žmogaus serumo albuminą, imunoglobuliną, glikoproteiną, interferoną ir/arba interleukiną arba kitą natūralią arba rekombinantinę žmogaus plazmos proteinų frakciją moliniu santykiu nuo 1:0,05 iki 1:100, optimalu - nuo 1:0,1 iki 1:50.
- 25 14. Produktas arba farmacinė kompozicija pagal bet kurią iš 1-8 punktų, b e s i s k i r i a n t y s tuo, kad savo sudėtyje turi mikonazolį ir žmogaus serumo albuminą, imunoglobuliną, glikoproteiną, interferoną ir/arba interleukiną arba kitą natūralią arba rekombinantinę žmogaus plazmos proteinų frakciją moliniu santykiu nuo 1:0,05 iki 1:100, optimalu - nuo 1:0,1 iki 1:50.
- 30 15. Produktas arba farmacinė kompozicija pagal bet kurią iš 1-8 punktų, b e s i s k i r i a n t y s tuo, kad savo sudėtyje turi propofolį ir žmogaus serumo albuminą, imunoglobuliną, glikoproteiną, interferoną ir/arba

interleukiną arba kitą natūralią arba rekombinantinę žmogaus plazmos proteinų frakciją moliniu santykiu nuo 1:0,05 iki 1:100, optimalu - nuo 1:0,1 iki 1:50.

- 5 16. Produktas arba farmacinė kompozicija pagal bet kurią iš 1-8 punktų, b e s i s k i r i a n t y s tuo, kad savo sudėtyje turi tamoksifeną ir žmogaus serumo albuminą, imunoglobuliną, glikoproteiną, interferoną ir/arba interleukiną arba kitą natūralią arba rekombinantinę žmogaus plazmos proteinų frakciją moliniu santykiu nuo 10 1:0,05 iki 1:100, optimalu - nuo 1:0,1 iki 1:50.

- 15 17. Produktas arba farmacinė kompozicija pagal bet kurią iš 1-8 punktų, b e s i s k i r i a n t y s tuo, kad savo sudėtyje turi ritonavirą ir žmogaus serumo albuminą, imunoglobuliną, glikoproteiną, interferoną ir/arba interleukiną arba kitą natūralią arba rekombinantinę žmogaus plazmos proteinų frakciją moliniu santykiu nuo 1:0,05 iki 1:100, optimalu - nuo 1:0,1 iki 1:50.

- 20 18. Farmacinė kompozicija pagal bet kurią iš 1-8 punktų, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad savo sudėtyje turi takrolimus ir žmogaus serumo albuminą, imunoglobuliną, glikoproteiną, interferoną ir/arba interleukiną arba 25 kitą natūralią arba rekombinantinę žmogaus plazmos proteinų frakciją moliniu santykiu nuo 1:0,05 iki 1:100, optimalu - nuo 1:0,1 iki 1:50.

- 30 19. Farmacinė kompozicija pagal bet kurią iš 1-8 punktų, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad savo sudėtyje turi tirilazadą ir žmogaus serumo albuminą, imunoglobuliną, glikoproteiną, interferoną ir/arba interleukiną arba kitą natūralią arba rekombinantinę žmogaus plazmos proteinų frakciją moliniu santykiu nuo 1:0,05 iki 1:100, opti- 35 malu - nuo 1:0,1 iki 1:50.

20. Farmacinė kompozicija pagal bet kurią iš 1-8 punktų, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad savo sudėtyje turi trioksaleną ir žmogaus serumo albuminą, imunoglobuliną, glikoproteiną, interferoną ir/arba interleukiną arba kitą natūralią arba rekombinantinę žmogaus plazmos proteinų frakciją moliniu santykiu nuo 1:0,05 iki 1:100, optimalu - nuo 1:0,1 iki 1:50.

21. Farmacinė kompozicija pagal bet kurią iš 1-20 punktų, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad yra kietoje formoje arba vandeninio tirpalo formoje.

22. Farmacinė kompozicija pagal bet kurią iš 1-20 punktų, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad savo sudėtyje kaip priedą turi tirpalą ir/arba proteiną stabilizuojantį agentą.

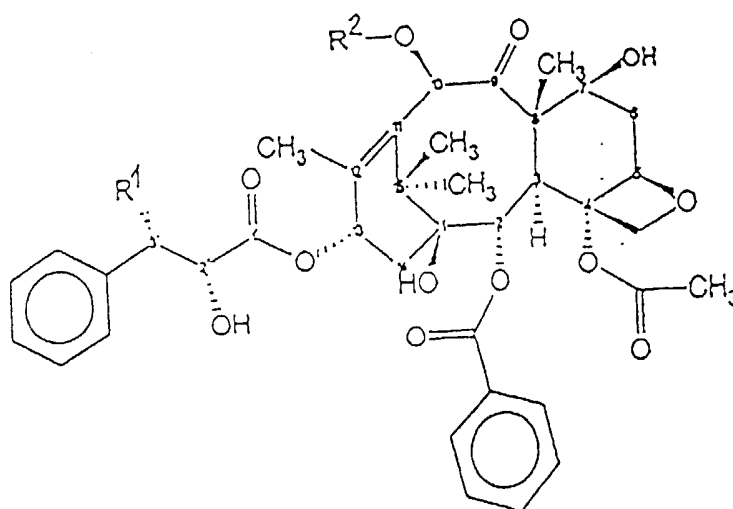
23. Farmacinė kompozicija pagal 22 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad savo sudėtyje kaip tirpalą ir/arba proteiną stabilizuojantį agentą turi bet kokią iš medžiagų: natrio chloridą, buferį, alkoholį, pvz., glicerolį, ir/arba vandenyje tirpų cukraus darinį, pageidautina, manitolį, sorbitolį, dulcitolį.

24. Homogeninis, kietas, vandenyje tirpus produktas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad savo sudėtyje turi bent vieną aktyviąją medžiagą, pasižyminčią mažu tirpumu vandenyje ($<1 \cdot 10^{-4}$ M/l, $<1 \cdot 10^{-5}$ M/l, $<1 \cdot 10^{-6}$ M/l), iš grupės susidedančios iš: amfotericino B, adriamicino analogo, apazono, azatioprino, bromazepamo, kamptotecino, karbamazepino, klonazepamo, ciklosporino A, diazepamo, dikumarolio, digitoksino, dipiridamolio, dizopiramido, flunitrazepamo, gemfibrozilo, ketochlorino, ketokonazolio, mikonazolio, nifluminės rūgšties, oksazepamo, fenobarbitalio, fenitoino, progesterono, propofolio, ritonaviro, sulfinpirazono, suprefeno, takrolimus, tamoksifeno, taksonoido, testosterono,

tirilazado, trioksaleno, valproinės rūgšties, ir/arba varfarino

ir taip pat turintis bent vieną proteiną iš grupės susidedančios iš: žmogaus serumo albumino, imunoglobulino, glikoproteino, interferono ir/arba interleukino arba kitų natūralių arba rekombinantinių žmogaus plazmos proteinų frakcijų, kur minėta aktyvioji medžiaga ir minėta proteinų frakcija tarpusavyje susirišę nekovalentiniais ryšiais ir kur molinis santykis tarp aktyviosios medžiagos ir proteinų frakcijos yra diapazone nuo 1:0,05 iki 1:100, optimalu - nuo 1:0,1 iki 1:50.

25. Homogeninis, kietas, vandenyje tirpus produktas pagal 24 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad savo sudėtyje turi taksonoidą, kurio bendra formulė I:



kurioje

R^1 žymi tret-butiloksikarboksirūgšties amidą arba benzoilamidą,

R^2 žymi vandenilį arba bet kokią acilo grupę, optimalu acetilą

ir plazmos proteinų frakciją.

26. Homogeninis, kietas, vandenyje tirpus produktas pagal 24 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad savo sudėtyje turi paklitakselį ir žmogaus serumo albuminą,

rekombinantinį žmogaus plazmos albuminą ir/arba γ -globuliną.

27. Homogeninis, kietas, vandenyje tirpus produktas pagal 24 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad savo sudėtyje turi amfotericiną B ir žmogaus serumo albuminą, rekombinantinį žmogaus plazmos albuminą ir/arba γ -globuliną.

28. Homogeninis, kietas, vandenyje tirpus produktas pagal 24 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad savo sudėtyje turi kamptoteciną ir žmogaus serumo albuminą, rekombinantinį žmogaus plazmos albuminą ir/arba γ -globuliną.

29. Homogeninis, kietas, vandenyje tirpus produktas pagal 24 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad savo sudėtyje turi karbamazepiną ir žmogaus serumo albuminą, rekombinantinį žmogaus plazmos albuminą ir/arba γ -globuliną.

30. Homogeninis, kietas, vandenyje tirpus produktas pagal 24 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad savo sudėtyje turi ciklosporiną A ir žmogaus serumo albuminą, rekombinantinį žmogaus plazmos albuminą ir/arba γ -globuliną.

31. Homogeninis, kietas, vandenyje tirpus produktas pagal 24 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad savo sudėtyje turi propofolį ir žmogaus serumo albuminą, rekombinantinį žmogaus plazmos albuminą ir/arba γ -globuliną.

32. Vandenyje tirpaus produkto arba farmacinės kompozicijos kietoje arba skystoje formoje, pagal bet kurį iš 1-33 punktų arba naujo produkto pagal bet kurį iš 24-31 punktų ir jų tikrųjų vandeninių tirpalų gavimo

būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad tikriesiems vandeniniams tirpalams gauti:

a) ištirpina terapiškai aktyvųjį junginį, pasižymintį mažu tirpumu vandenyje ($<1 \cdot 10^{-4}$ M/l, $<1 \cdot 10^{-5}$ M/l, $<1 \cdot 10^{-6}$ M/l) ir žymiu rišamuoju giminingumu plazmos proteinams ("aktyvioji medžiaga") su vandeniu besimaišančiame farmaciniu požiūriu priimtinaame organiniame tirpiklyje;

b) sumaišo minėtą tirpalą su plazmos proteinų frakcijos reguliuojamoje agregatinėje būsenoje vandeniniu tirpalu;

c) ir, nebūtinai, su papildomu farmaciniu požiūriu priimtinu vandenyje tirpiu pagalbiniu priedu - pvz., proteino agregacijos reguliatoriumi ir/arba stabilizatoriumi -

tuo būdu gauna tikrąjį tirpalą, turintį minėtą aktyviąją medžiagą ir minėtą proteinų frakciją, tarpusavyje susirišusius nekovalentiniais ryšiais;

d) pašalina organinį tirpiklį ir, nebūtinai, vandenį, pageidautina, ultrafiltruojant, dializuojant, diafiltruojant ir/arba liofilinant tirpalą arba jo koncentratą arba derinant šias procedūras, tuo būdu gauna homogeninį, vandenyje tirpų skystą arba kietą farmacinį produktą, turintį aktyviąją medžiagą, susirišusią su plazmos proteinų frakcija;

e) nebūtinai ištirpina kietą produktą vandenyje arba praskiedžia skystą produktą vandeniu, tuo būdu gauna skaidrų, tikrąjį vandeninį tirpalą, neturintį organinio tirpiklio, kuris yra tinkamas terapiniam skyrimui ir,

f) nebūtinai, įveda šį produktą į parenteralinę kompoziciją (dozavimo formą) tiesioginiam vartojimui.

33. Vandenyje tirpaus produkto arba farmacinės kompozicijos kietoje arba skystoje formoje, pagal bet kurią iš 1-23 punktų arba naujo produkto pagal bet kurią iš 24-32 punktų ir jų tikrąjį vandeninį tirpalą, neturintį

organinio tirpiklio, gavimo būdas, b e s i s k i -
r i a n t i s tuo, kad

a) terapiškai aktyvųjį junginį ištirpina su vandeniu
besimaišančiame farmaciniu požiūriu priimtina
5 organiniame tirpiklyje,

b) minėtą tirpalą sumaišo su atrinktos plazmos
proteinių frakcijos reguliuojamoje agregatinėje būsenoje
vandeniniu tirpalu,

c) minėtas tirpalas, nebūtinai, turi papildomą
10 farmaciniu požiūriu priimtina tokį pagalbinį priedą kaip
proteinių agregacijos reguliatorių ir/arba stabiliza-
torių -

tuo būdu gauna tikrąjį tirpalą, turintį minėtą aktyvią
medžiagą ir minėtą proteinų frakciją, tarpusavyje
15 susirišusią nekovalentiniais ryšiais;

d) pašalina organinį tirpiklį ir tirpalą arba jo
koncentratą liofilina.

34. Būdas pagal a) stadiją bet kurio iš 32 - 33 punktų,
20 b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad aktyviosios
medžiagos ištirpinimui naudoja tirpiklį, pasižymintį
tokiomis savybėmis:

a) mišinyje su vandeniu jis sugeba pilnai ištirpinti
aktyviąją medžiagą ir

25 b) jo mišinys su <50 % vandens nedenatūruoja
naudojamo proteino.

35. Būdas pagal 34 punktą, b e s i s k i r i a n t i s
tuo, kad tirpikliu naudoja bet kokią junginį iš grupės,
30 susidedančios iš alifatinio $C_{(2-4)}$ monoalkoholio arba
polialkoholio, 70-100 % etanolio, dimetilformamido,
metilformamido.

36. Būdas pagal a) stadiją bet kurio iš 32-35 punktų, b e
35 s i s k i r i a n t i s tuo, kad proteino agregacijos
regulatoriumi arba stabilizatoriumi ir/arba tirpalą
stabilizuojančiu pagalbiniu priedu naudoja bet kokią iš

agentų: vanduo, natrio chloridas, buferis, polialkoholis, pvz., glicerolis, ir/arba vandenyje tirpus cukraus darinys, pageidautina, manitolis, sorbitolis ir/arba dulcitolis.

5

37. Būdas pagal a) stadiją bet kurio iš 32-36 punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad naudoja paklitakselį ir natūralios plazmos tokį komponentą kaip serumo albuminą, imunoglobuliną, glikoproteiną, interferoną ir/arba
10 interleukiną arba jų rekombinantus.

38. Produktas arba farmacinė kompozicija, b e s i s k i r i a n t y s tuo, kad turi aktyvios medžiagos pagal arba gautos pagal bet kurią iš 1-37 punktų efektyvią dozę,
15 skirti žmonių arba veterinarinių pacientų gydymui vandenyje netirpia terapiškai aktyvia medžiaga, pasižyminčia žymiu giminingumu plazmos proteinams.

39. Produktas arba farmacinė kompozicija, b e s i s k i r i a n t y s tuo, kad turi tokius produktus, vartotinus, pageidautina, atitinkamų dozių intervale, (skaičiuojant aktyviosios medžiagos efektyviajai dozei):
paklitakselis/albuminas 70-280 mg/kursui,
propofolis/albuminas 6-10 mg/kg/val.,
25 kamptotecinas/albuminas,
gemfibrozilas/albuminas,
ciklosporinas A/albuminas 3-5 mg/kg/dienai,
amfotericinas B/albuminas iki 1,5 mg/kg/dienai,
vartojant junginius, turinčius atitinkamus
30 rekombinantinius proteinus tomis pačiomis dozėmis,
skirti žmonių arba veterinarinių pacientų gydymui vandenyje netirpia terapiškai aktyviaja medžiaga, pasižyminčia žymiu giminingumu plazmos proteinams, susirišant su jais.

35

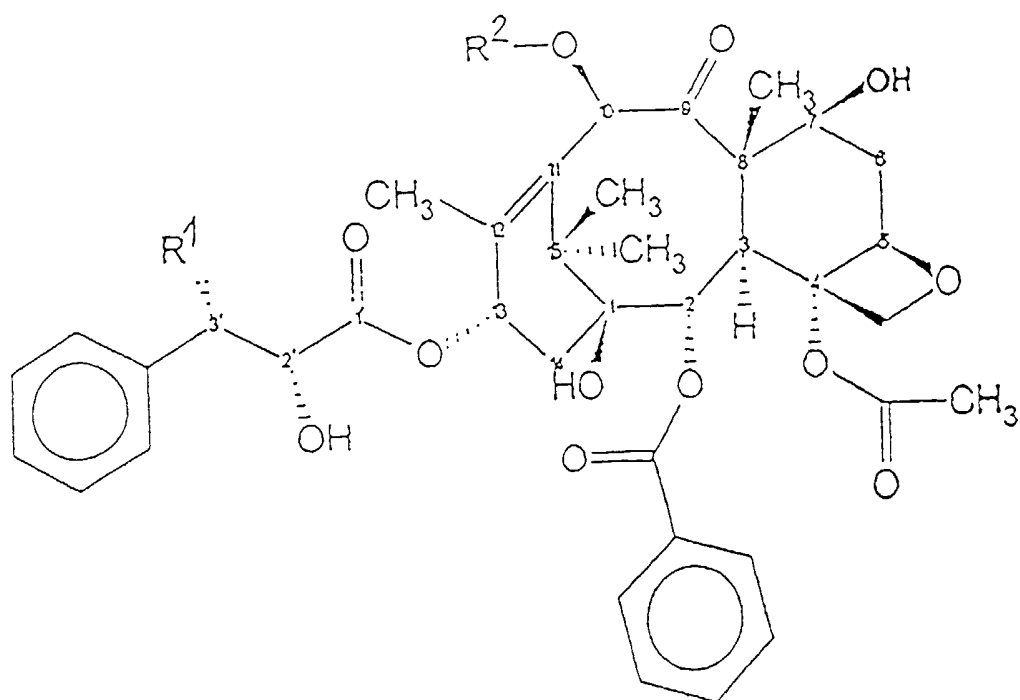
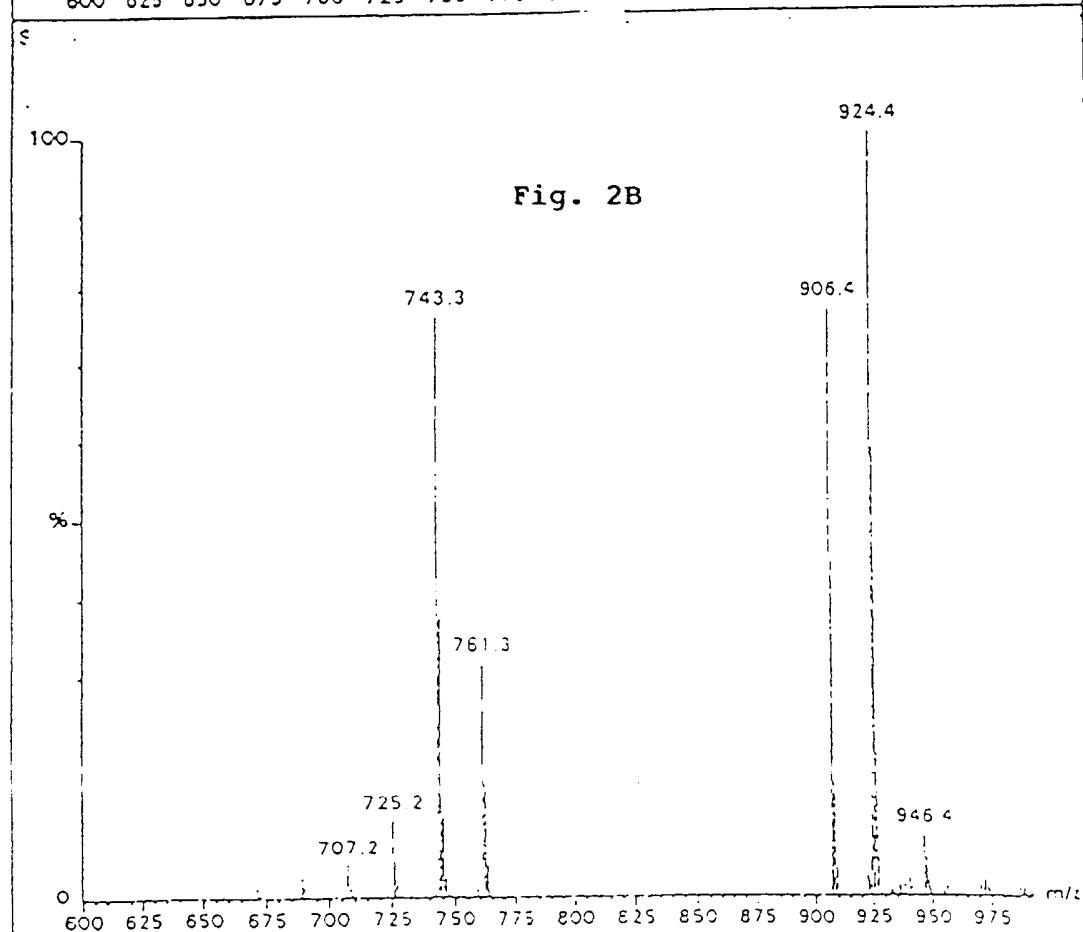
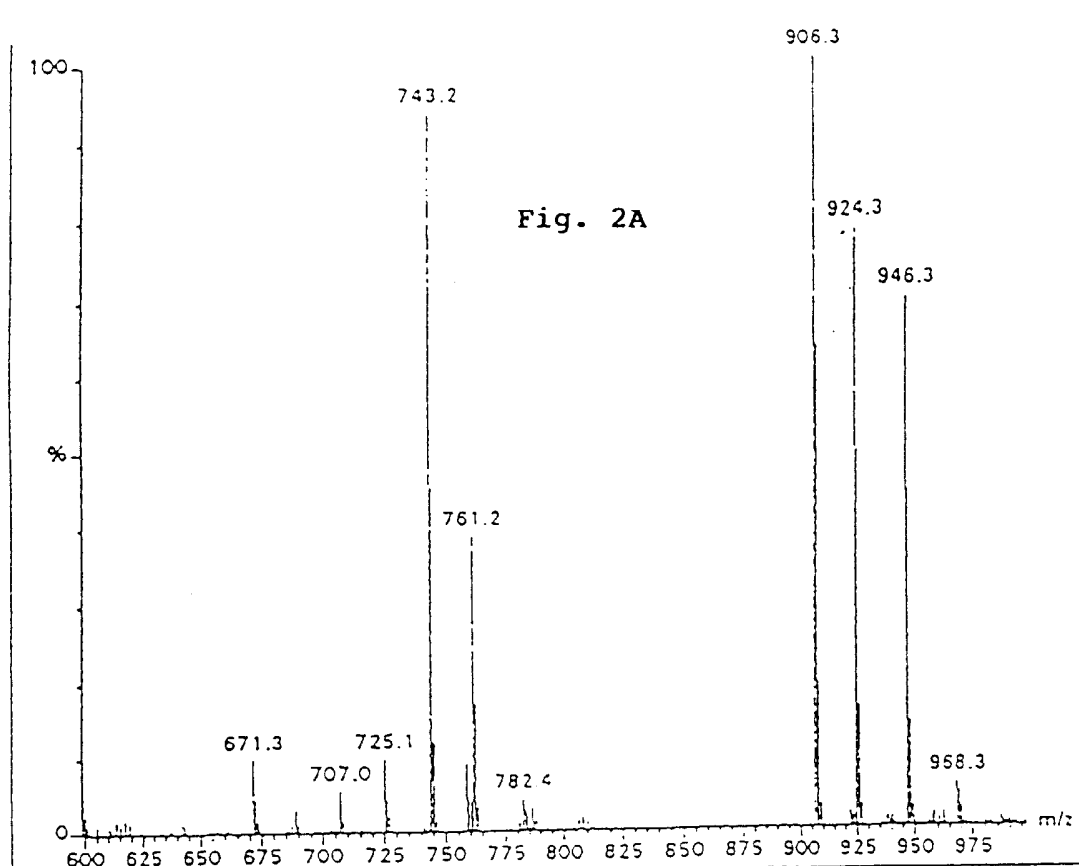


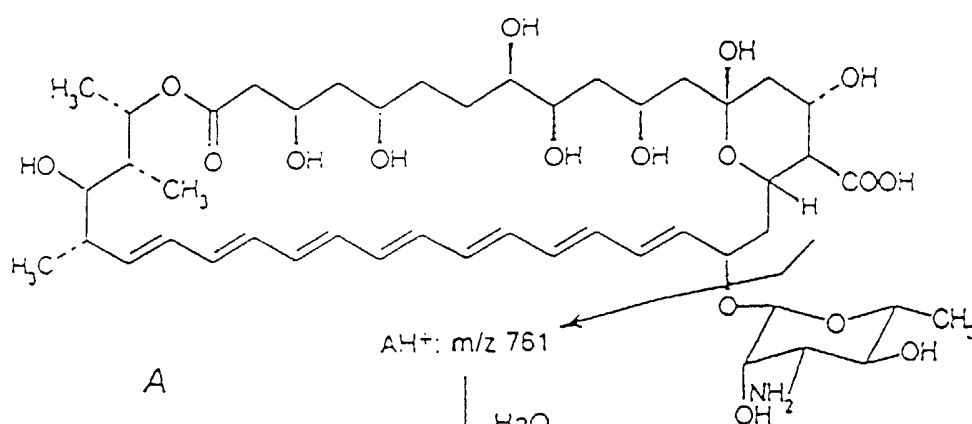
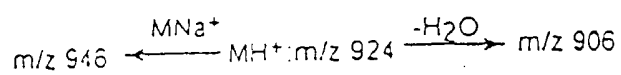
Fig. 1

2/14



3/14

M



AH⁺: m/z 761

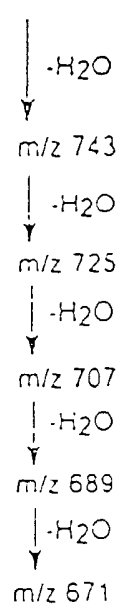
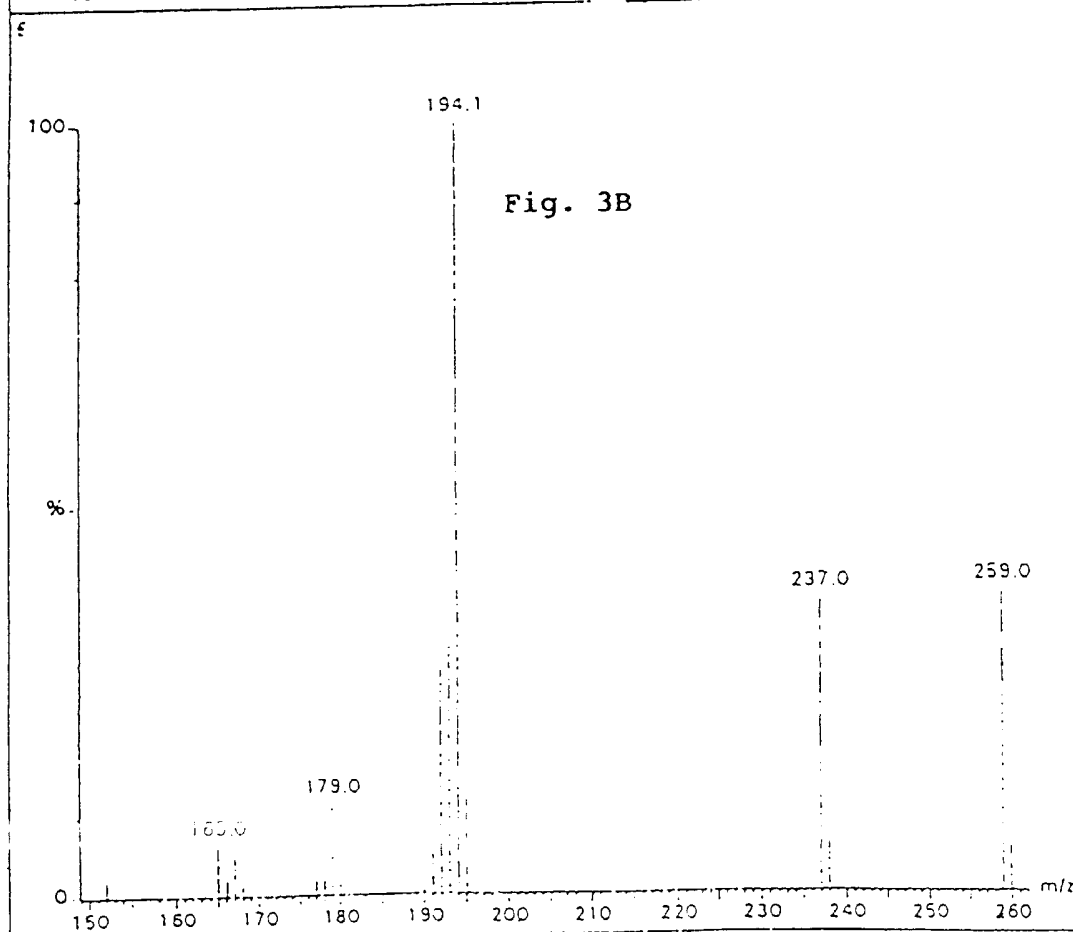
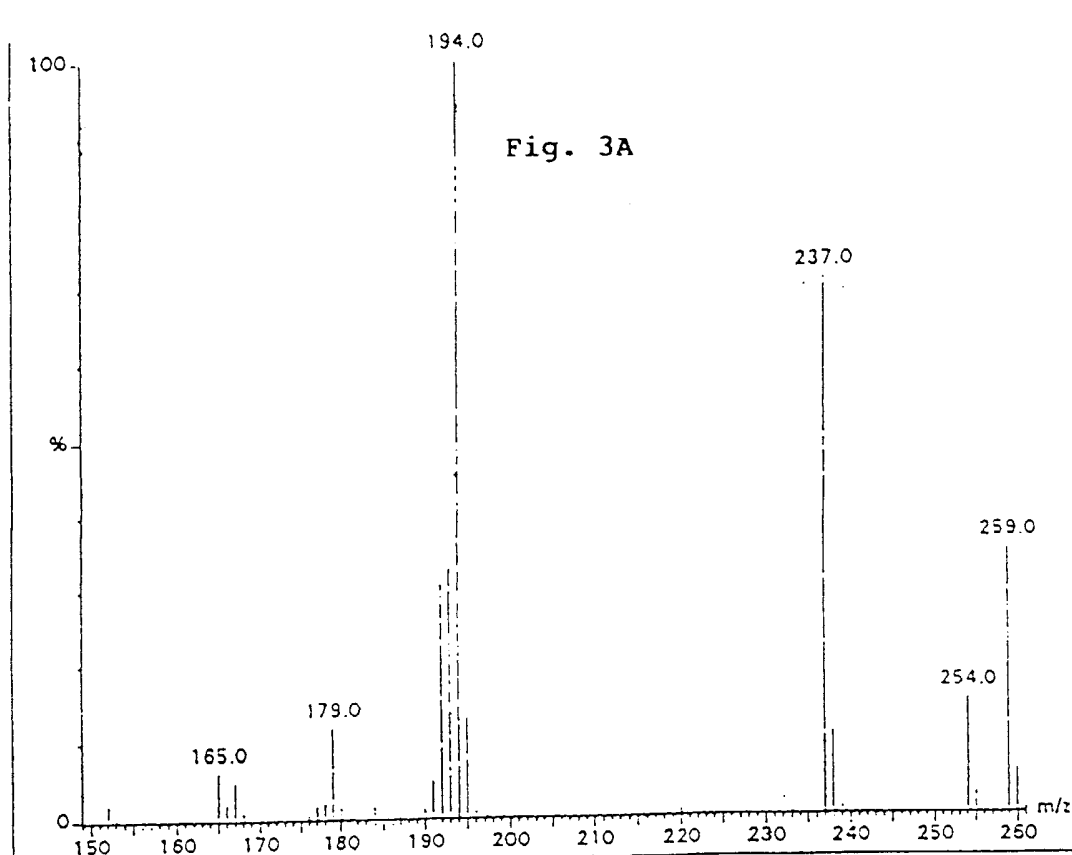


Fig. 2C

4/14



5/14

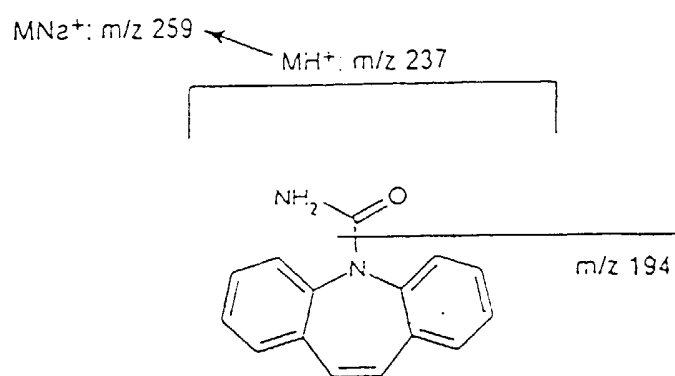
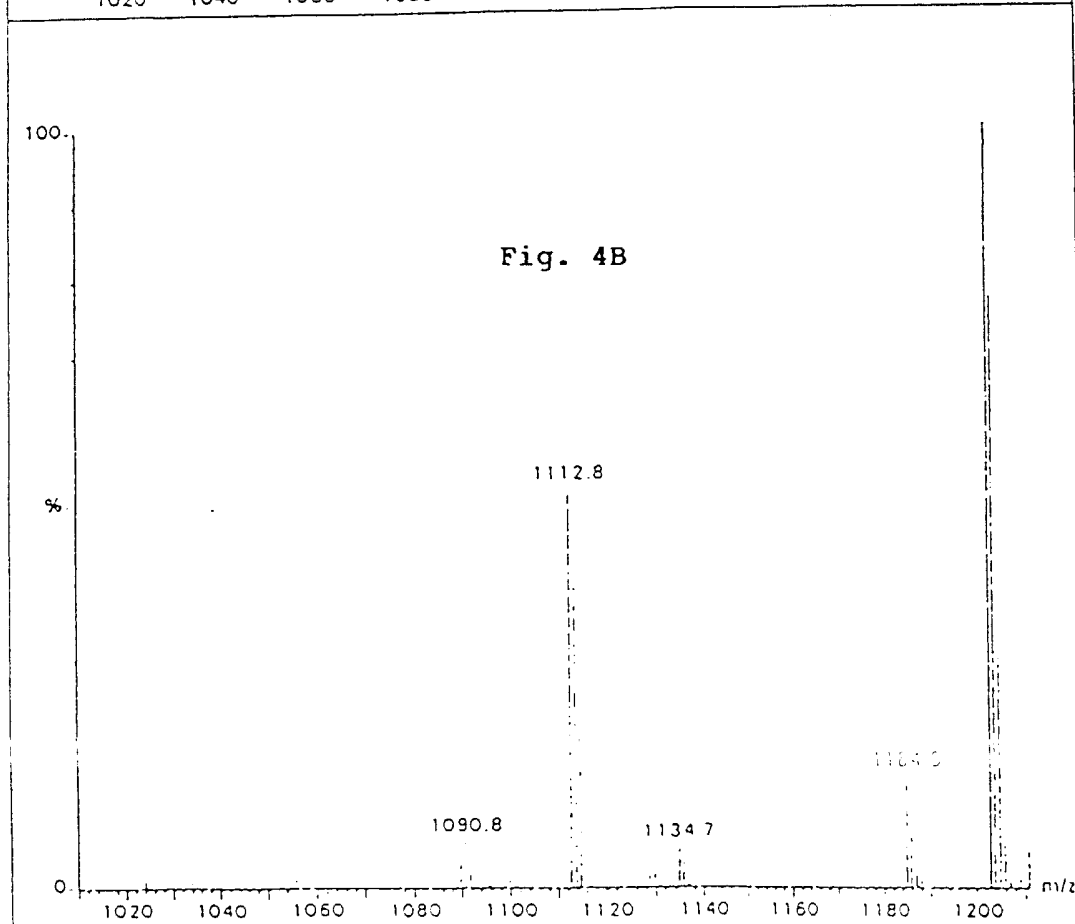
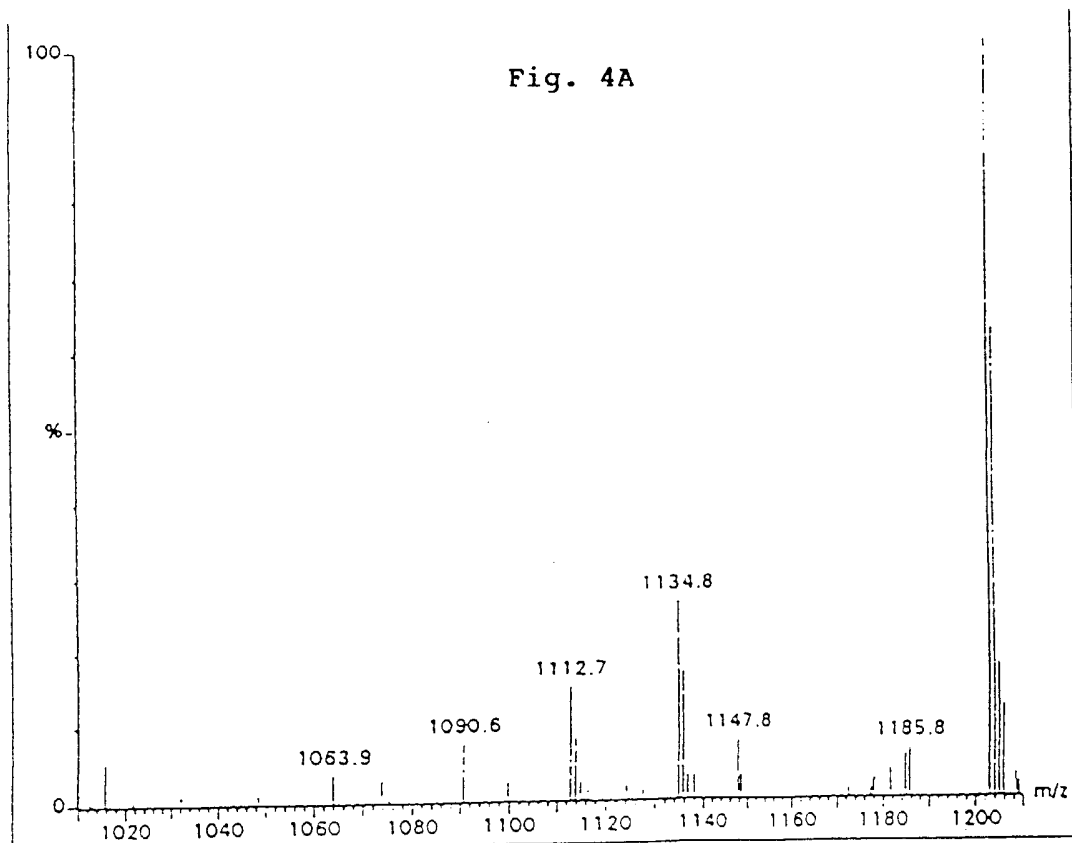


Fig. 3C

6/14



7/14

M serijos

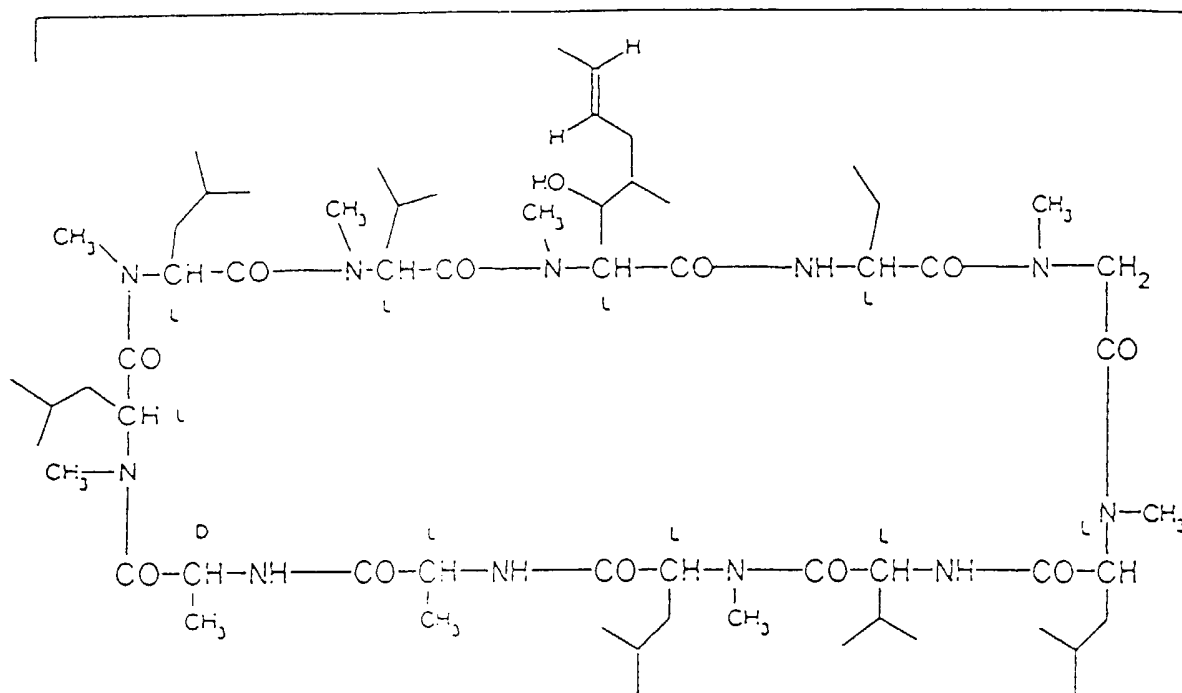
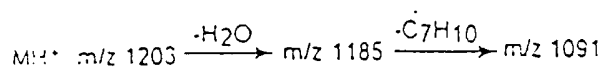
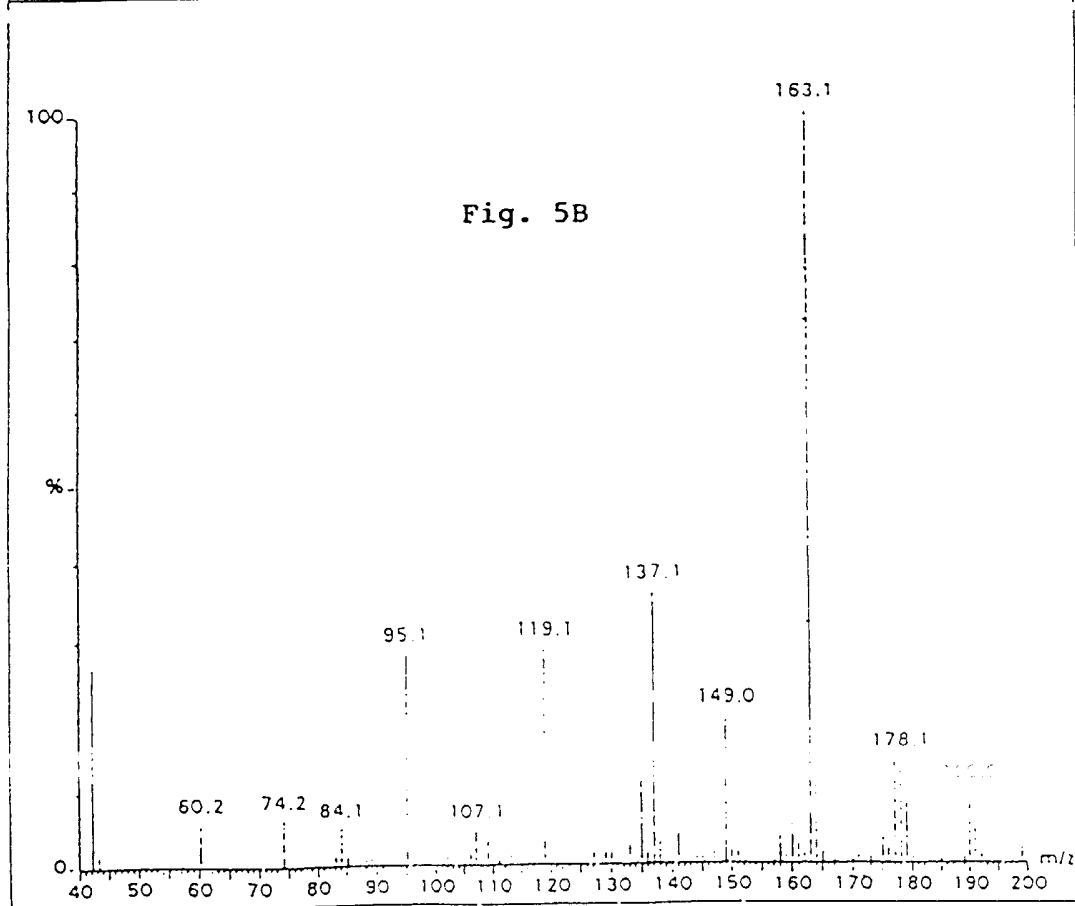
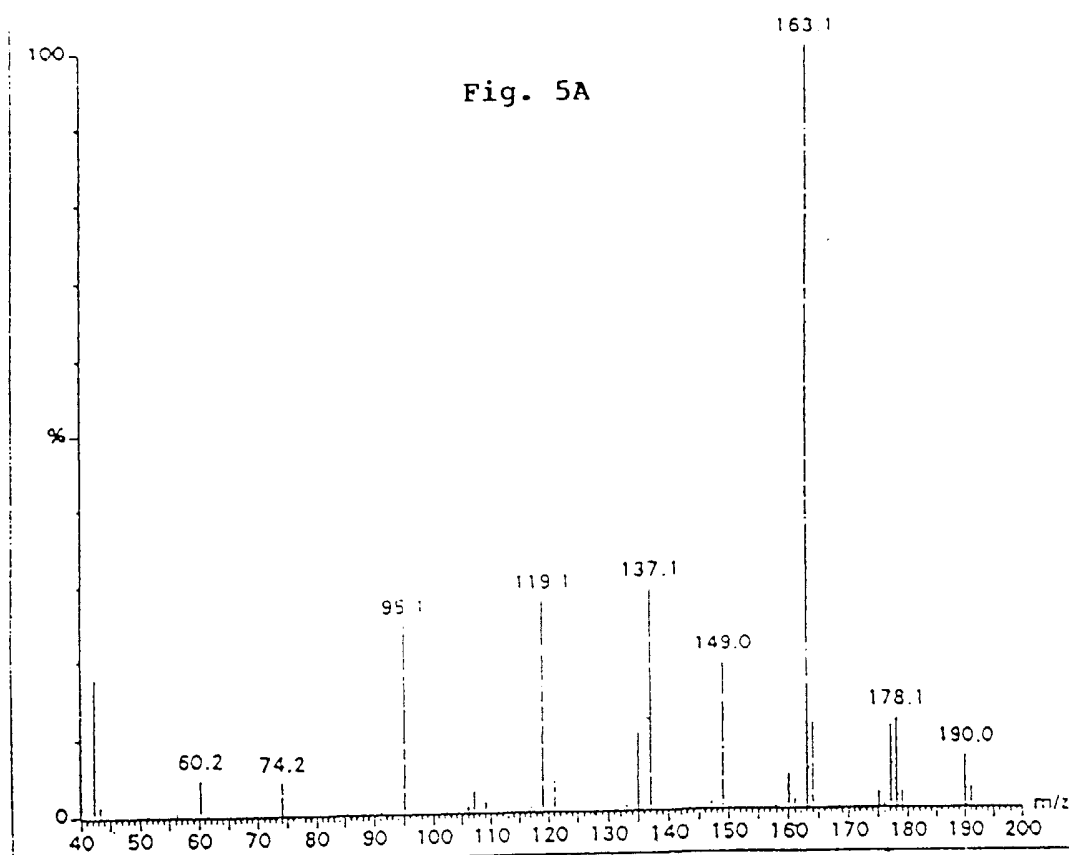


Fig. 4C

8/14



9/14

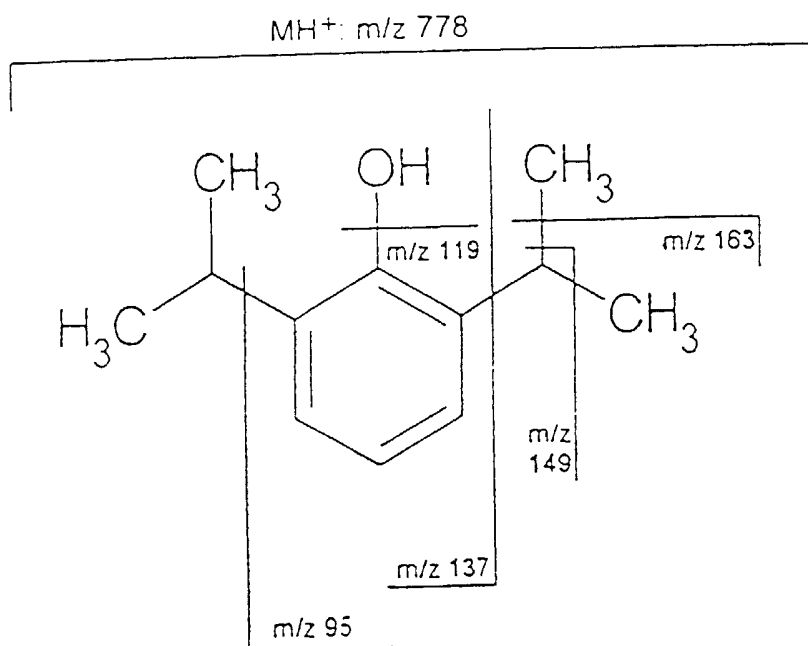
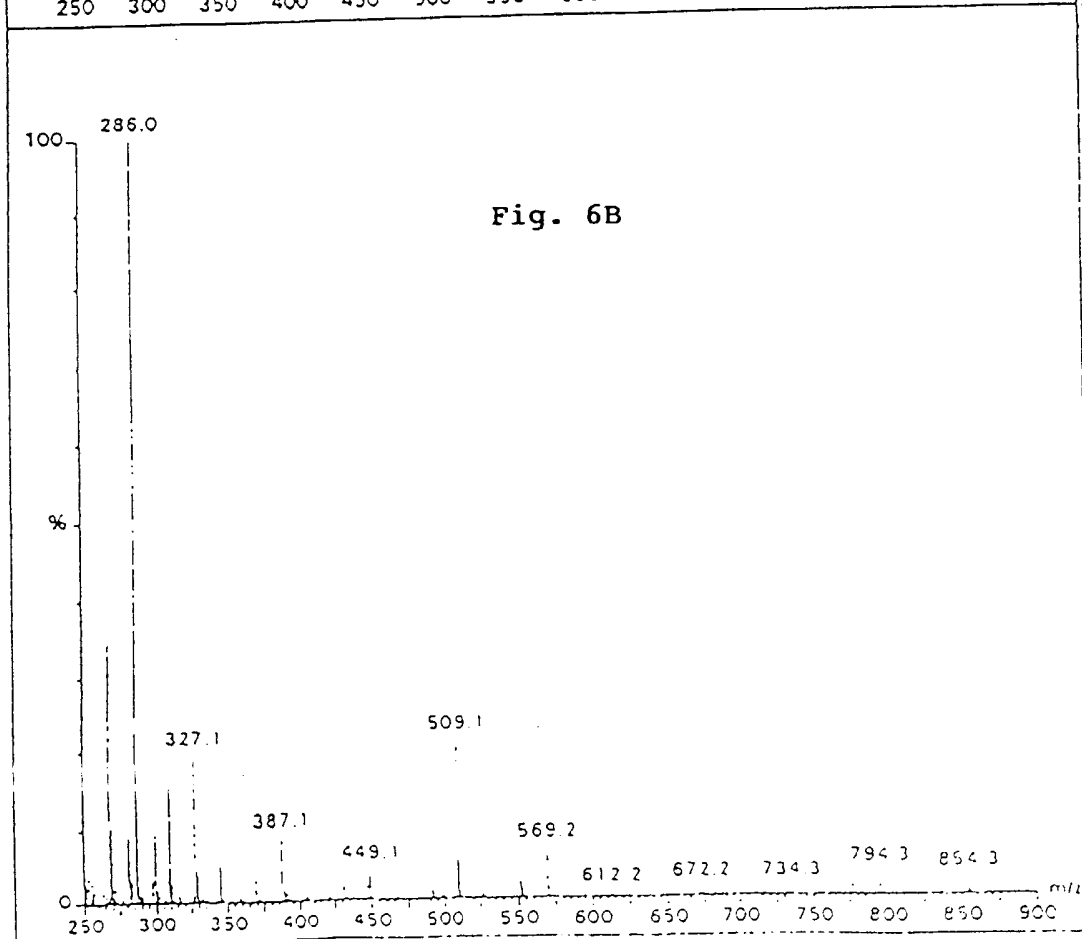
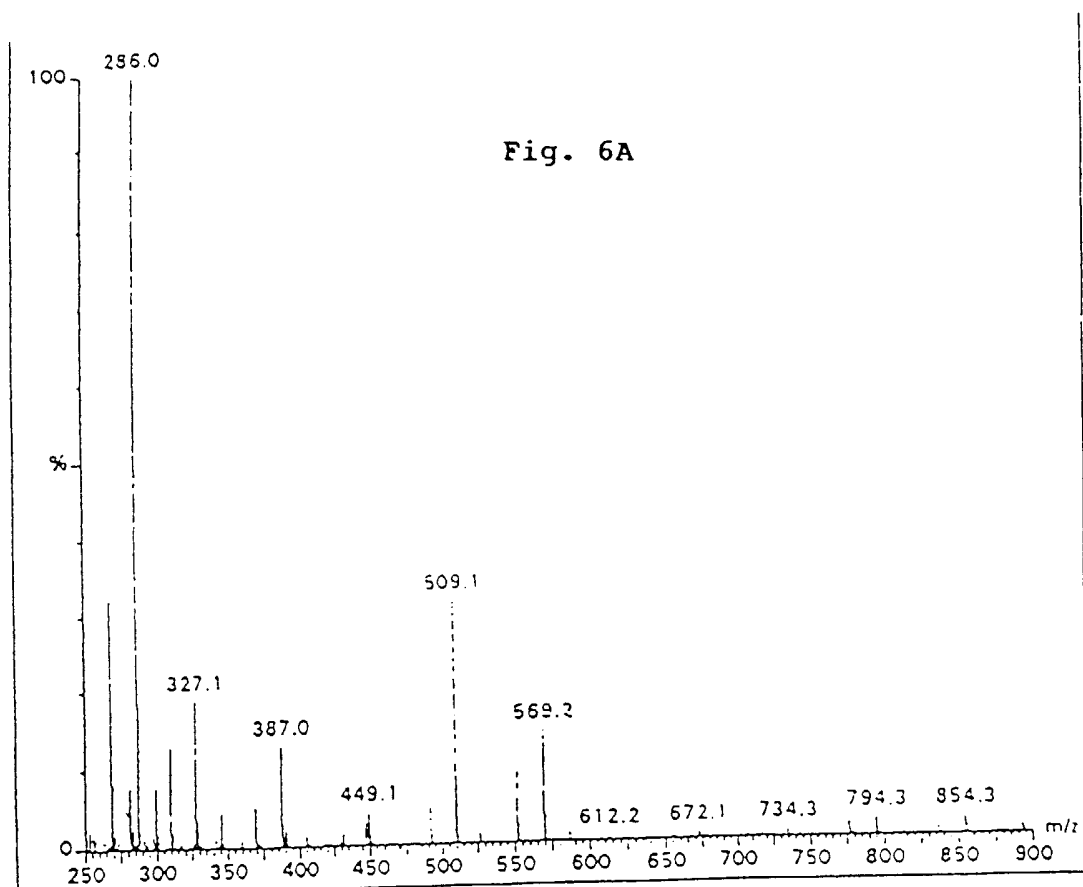


Fig. 5C

10/14



11/14

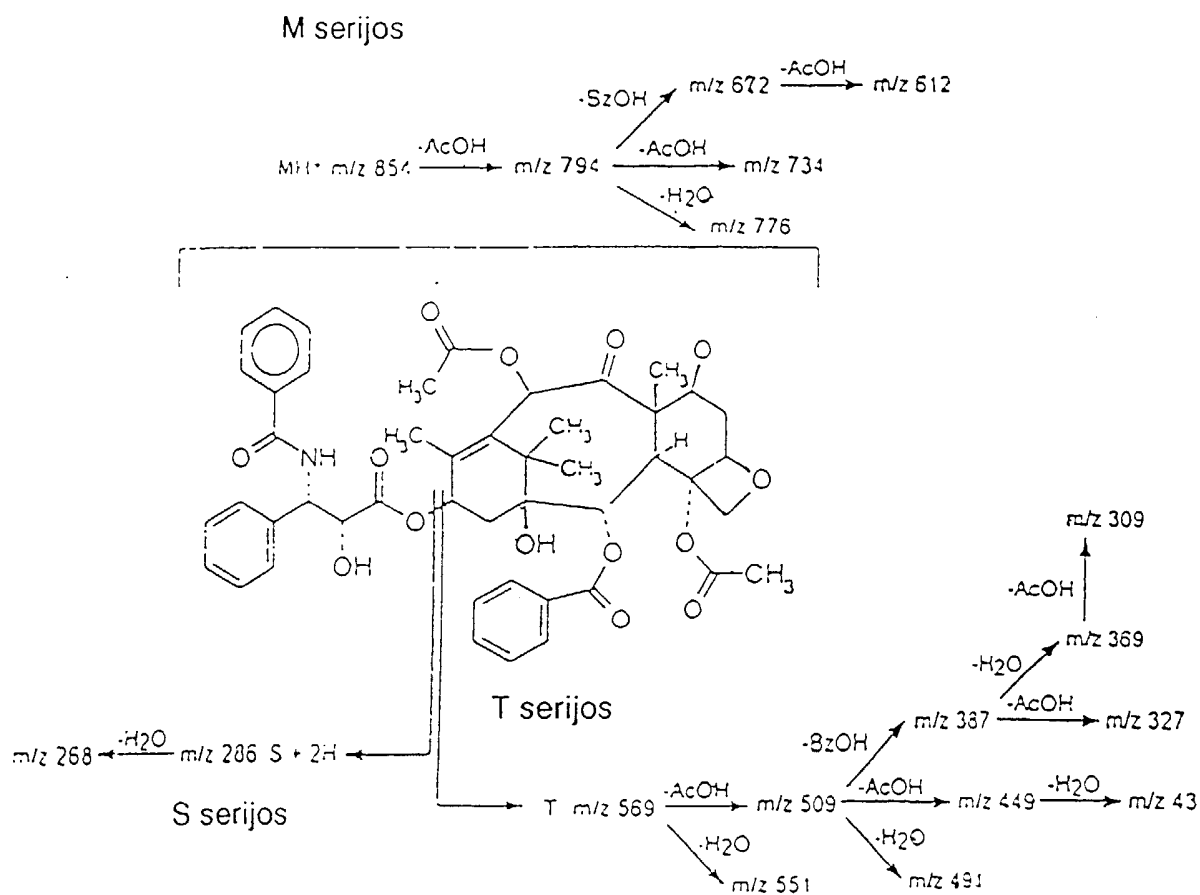


Fig. 6C

12/14

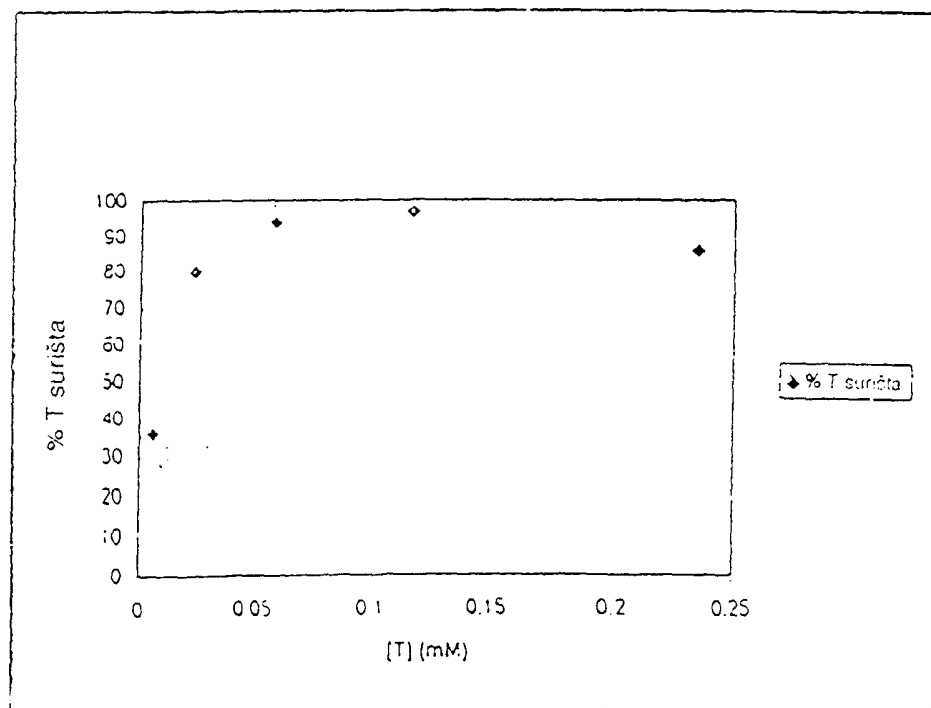
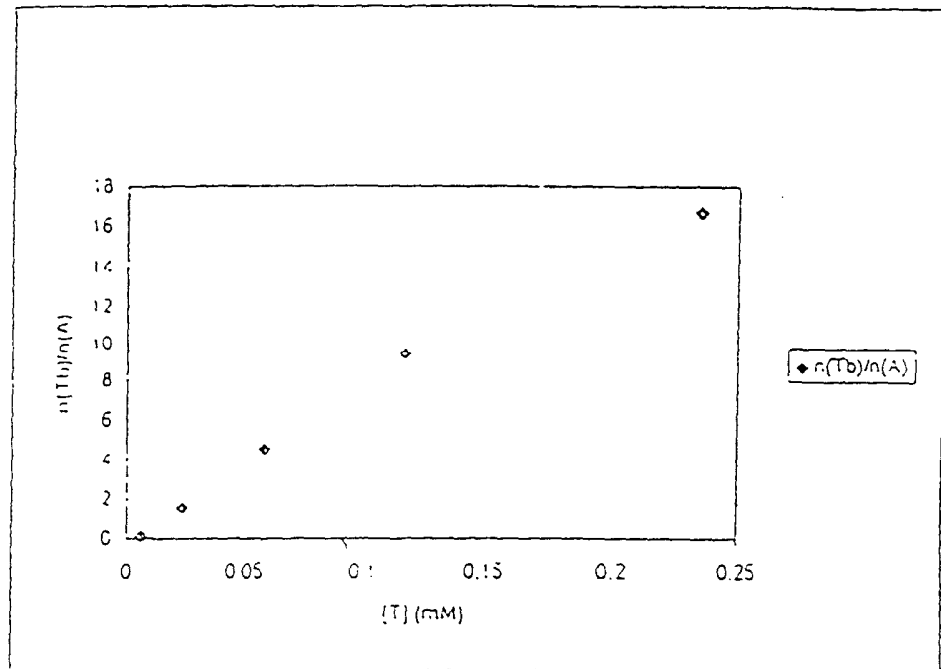


Fig. 7

13/14

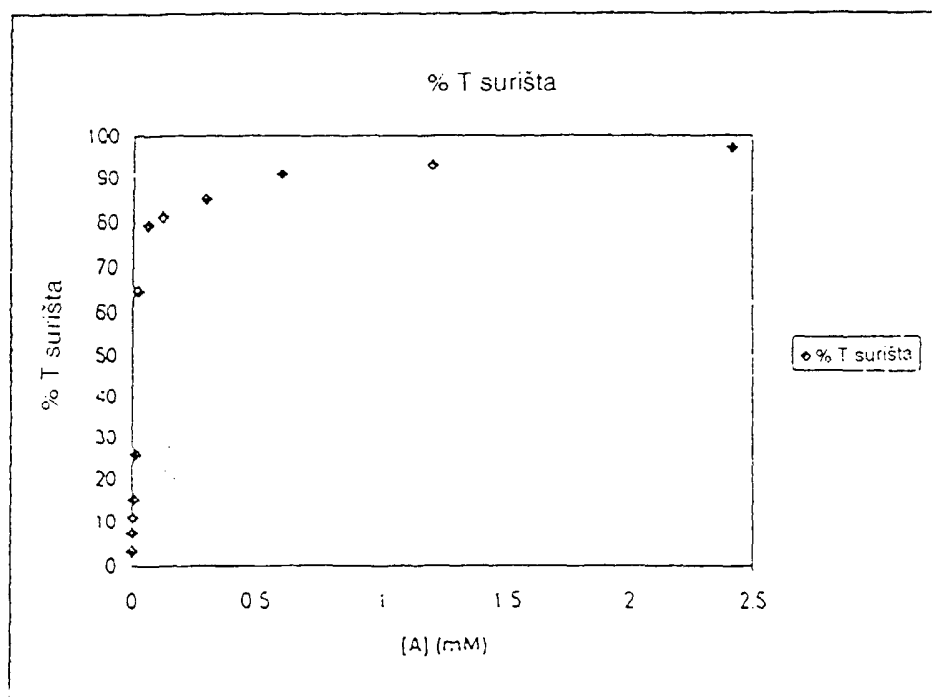
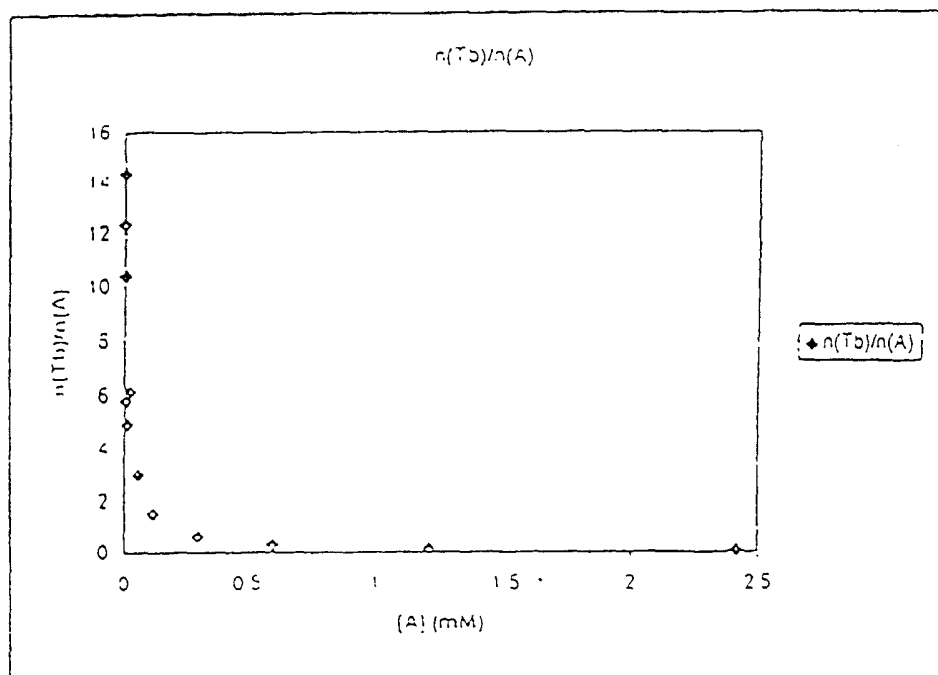


Fig. 8

14/14

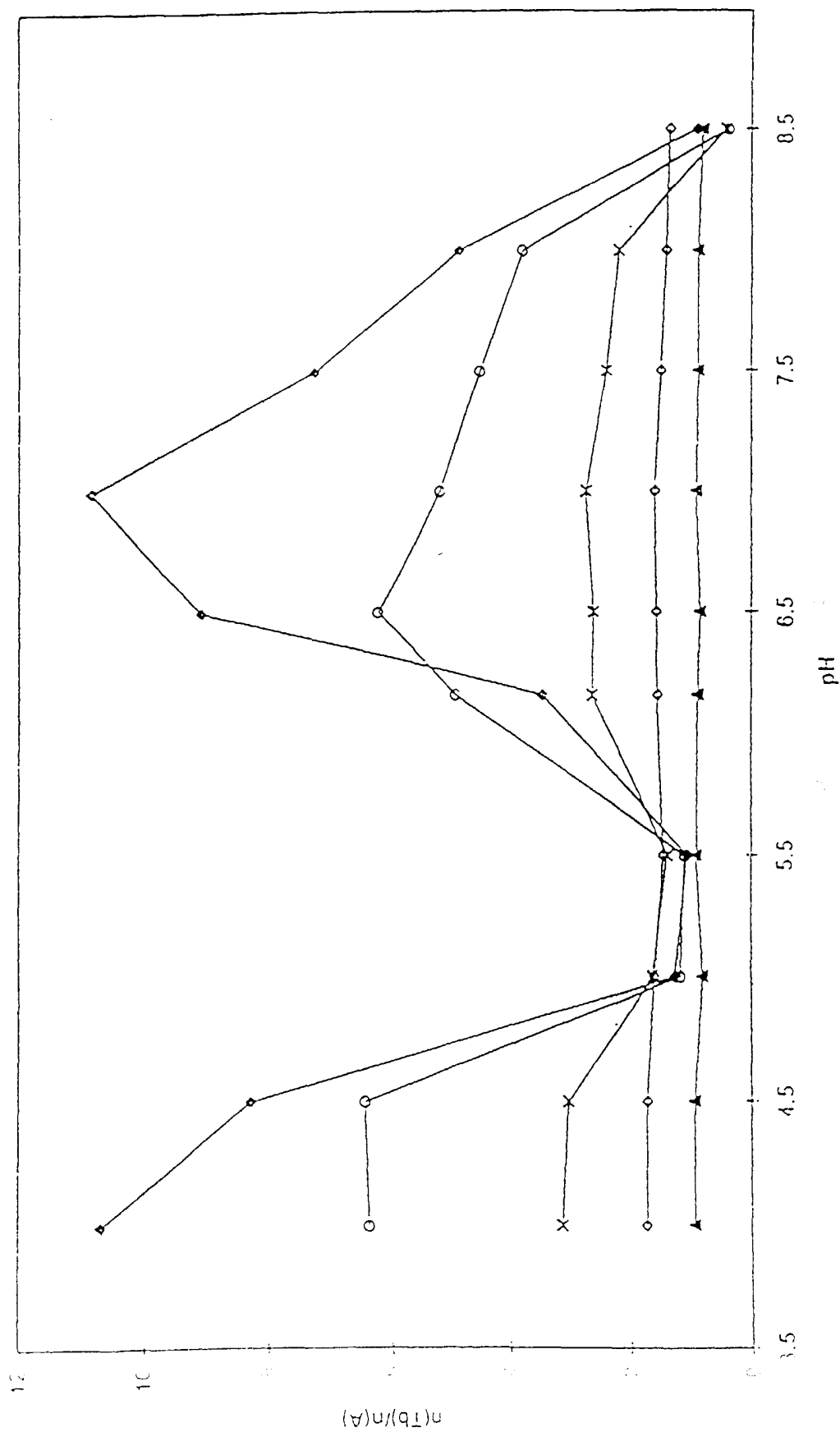


Fig. 9