

(19)



(10) **LT 4959 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

- (11) Patent numeris: **4959** (51) Int. Cl. ⁷: **A61K 38/16**
A61K 47/02
A61K 47/12
- (21) Paraiškos numeris: **2001 041**
- (22) Paraiškos padavimo data: **2001 04 10**
- (41) Paraiškos paskelbimo data: **2002 06 25**
- (45) Patent paskelbimo data: **2002 10 25**
- (62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —
- (86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/US99/20912**
- (86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **1999 09 09**
- (85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: **2001 04 10**
- (30) Prioritetas: **60/099, 870, 1998 09 11, US**
- (72) Išradėjas:
Elizabeth MOYER, US
Pamela HIRTZER, US
- (73) Patent savininkas:
ELAN PHARMACEUTICALS, Inc., 800 Gateway Boulevard, South San Francisco, CA 94080, US
- (74) Patentinis patikėtinis:
Rita LAURINAVIČIŪTĖ, UAB "Metida", Gedimino pr. 45-6, 2600 Vilnius, LT

- (54) Pavadinimas:
Stabilios skystos botulino toksino kompozicijos

- (57) Referatas:

Šis išradimas apima skystas botulino toksino kompozicijas, kurios yra stabilios laikant skystoje formoje standartinio šaldytuvo temperatūrose mažiausiai 1-2 metus, o laikant aukštesnėse temperatūrose - mažiausiai 6 mėnesius. Išradimas taip ar apima tokių kompozicijų panaudojimą vaistų įvairiems terapiniams ir kosmetiniams tikslams gamyboje.

Išradimo sritis

Šis išradimas yra susijęs su botulino toksino kompozicijomis, kurios yra stabilios laikant skystoje formoje 0-10 °C temperatūroje mažiausiai nuo vienerių iki dviejų metų.

Išradimo kilmė

Botulino toksinas yra anaerobinės bakterijos *Clostridium botulinum* polipeptidinis produktas, paminėtas tokiuose literatūros šaltiniuose, kaip:

Consky, E.S., Lang, A.E. (1994) In: *Therapy with Botulinum Toxin*, Jankovic and Hallet M, eds. Marcel Dekker, Inc. New York;

Frankel, A.S., and Kamer, F.M. (1998) Chemical browlift. *Arch. Otolaryngol. Surg.* 124(3): 321-323;

Gartlan, M.G., and Hoffman, H.T. (1992) Crystalline preparation of botulinum toxin type A (Botox): Degradation in potency with storage. *Otolaryngology – Head and Neck Surgery* 102(2): 135-140;

Hambleton, P., Capel, B., Bailey, N., Heron, N.I., Crooks, A., Melling, J. (1981) Production, purification and toxoing of *Clostridium botulinum* type A toxin. *Biomedical Aspects of Botulism*, Academic Press, NY;

Hardman, J.G. and Limbird, L.E., Exec. Eds. (1996) *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9th Ed. McGraw-Hill, New York;

Hoffman, H.T., and Gartlan, M.G. (1993) Stability of botulinum toxin in clinical use. *Botulinum and Tetanus Neurotoxins* (B.R. DasGupta, Ed.), Plenum Press, NY;

Johnson, E.A., Goodnough, M.C., Borodic, G.E., (1997) U.S. Patent 5,696,077;

Lachman, K., Lieberman, H.A., Kanig, J.L. (1986) *The Theory and Practice of Industrial Pharmacy* (3rd Ed), Lea & Febiger, Philadelphia;

Melling, J., Hambleton, P., and Shone, C.C. (1988) Clostridium botulinum toxins: nature and preparation for clinical use. *Eye* 2: 16-23;

Physician's Desk Reference, 51th Edition, 1997. ("PDR") Medical Economics Company, Inc, Montvale, NJ;

Schantz, D.J. and Kautter, D.A. (1978) Standardized assay for clostridium botulinum toxins, *J Assoc. Off. Anal. Chem* 61:1;

Simpson, L.L. (1993) The action of clostridial toxins on storage and release of neurotransmitters. *Natural and Synthetic Neurotoxins*, A.L. Harvey, Ed., Academic Press Ltd., San Diego, pp. 277-317;

Tsui, J.K.C. (1986), *Lancet* 2: 245-247.

Žinduoliams šis toksinas sukelia raumenų paralyžių, blokuodamas neuroperdaviklio acetilcholino presinapsinį išlaisvinimą prie neurono-raumens sujungimo. Nors šis toksinas ilgą laiką buvo siejamas su mirtinu botulizmu, pastaraisiais metais jis buvo panaudotas terapijoje tam tikrų nevalingų raumenų judesių sutrikimų, įskaitant židines distonijas (tokias kaip žvairumas, vokų mėšlungis ir pusės veido spazmos), segmentines distonijas (tokias kaip kreivakaklystė, burnos ir apatinio žandikaulio distonija ir spazminė disfonija) bei mėšlungį, gydymui. Šis toksinas taip pat rado pritaikymą įvairiose kosmetinėse indikacijose, tokiose kaip nechirurginis veido raukšlių sumažinimas, bei gydant hiperhidrozę (gausus prakaitavimas).

Dabartiniu metu yra du botulino toksino (A tipo) preparatai, kurie yra priimti naudoti žmonių terapijoje – "BOTOX®" (Oculinum®; Allergan Inc., Irvine, CA) ir "DYSPOORT®" (Spexwood Pharmaceuticals, Ltd.; U.K.). Abi šios kompozicijos yra pateikiamos kliniciams liofilizuotoje (išdžiovintoje šaldant) formoje, kurią reikia prieš vartojimą ištirpinti.

Dėl pacientų skirtingumo, atskirų pacientų naudojamos dozės gali labai smarkiai skirtis. Be to, tam tikrų indikacijų atveju, klinicistas gali skirti tik mažą dalį pagaminto buteliuko turinio per ilgesnį laiką, kuris gali būti keletas valandų. Nors viename publikuotame tyrime buvo pažymėta, kad skystos botulino kompozicijos gali būti vėl užšaldytos ir atšildytos išsilaikant jų aktyvumui (Schantz and Kautter, 1978), vėlesni tyrimai, kuriuose buvo nustatomas ištirpinto toksino aktyvumas, parodė, kad "BOTOX®" praranda

mažiausiai 44 % jo veiksmingumo, kai jis ištirpinamas ir laikomas standartiniame šaldytuve (maždaug 4 °C temperatūroje) 12 valandų. Be to, kai ištirpinta kompozicija laikoma žematemperatūriniame šaldiklyje –70 °C temperatūroje, po dviejų savaičių jis praranda maždaug 70 % veiksmingumo (Gartlan and Hoffman, 1993). Dėl šių priežasčių rekomenduojama, kad tokios kompozicijos nebūtų naudojamos praėjus 4 val. po ištirpinimo. Tai gali sukelti bereikalingą vaisto eikvojimą ir papildomas išlaidas pacientui.

Todėl yra reikalinga gatava botulino toksino kompozicija, kuri gali būti patogiai transportuojama, laikoma ir naudojama tada, kai to reikia gydytoji-praktikui. Šiame išradime pateikiama tokia kompozicija.

Išradimo santrauka

Šis išradimas yra skirtas stabiliai botulino toksino skystai kompozicijai, skirtai panaudoti farmaciniuose preparatuose. Šio išradimo kompozicija turi privalumą, kad, skirtingai nuo dabartinių kompozicijų, ji yra stabili skystoje formoje laikant pakankamai ilgą laiką (1 metus arba ilgiau) standartinio šaldytuvo temperatūrose (maždaug 4 ± 2 °C, arba apie 2-8 °C, arba paprastai apie 0-10 °C). Panašiu būdu, kompozicijos yra stabilios skystoje formoje, laikant "kambario temperatūroje" (apie 25°, arba paprastai 10-30 °C temperatūroje) mažiausiai šešis mėnesius. Tokios kompozicijos yra ypatingai tinkamos atveju būklių, kuriose pagerėjimą duoda cholinerginio nervo indėlio į tam tikrą vietą, konkrečiai į raumenį arba raumenų grupę, liauką arba organą, sumažinimas arba inhibavimas. Čia yra aprašyti tokių būklių pavyzdžiai.

Vienu aspektu šis išradimas apima stabilią skystą farmacinę kompoziciją, susidedančią iš botulino toksino ir buferio, kuris gali duoti buferinį pH intervalą tarp maždaug pH 5 ir pH 6. Pagal šį bendrą įgyvendinimo variantą toksinas yra sumaišomas su skystu buferiu, gaunant skystą kompoziciją, kurios pH yra tarp 5 ir 6, konkrečiau tarp maždaug pH 5,4 ir pH 5,8, geriau apie 5,5-5,6. Kaip aprašyta aukščiau, gauta kompozicija yra stabili mažiausiai vienerius metus ir iki maždaug dviejų metų, kai temperatūros yra maždaug 0-10 °C ribose, arba mažiausiai 6 mėnesius aukštesnėse temperatūrose. Bendru atveju, pagal šį išradimą, bet kuris iš žinomų botulino toksino serotipų (pvz. A, B, C₁, C₂, D, E, F arba G serotipai) arba kiti serotipai,

turintys ekvivalentinį biologinį aktyvumą, gali būti įterpiami į šio išradimo kompozicijas. Tinkamiausiuose įgyvendinimo variantuose kompozicijoje naudojamas botulino toksinas yra A arba B serotipo botulino toksinas, išskirtas iš *Clostridium botulinum*.

Tinkamiausiuose įgyvendinimo variantuose kompozicijoje B tipo botulino toksinas yra 700 kilodaltonų molekulinės masės kompleksas, kurio koncentracija yra apie 100-20000 U/ml, ypatingai maždaug 1000-5000 U/ml. Kai naudojamas A tipas, jo koncentracija paprastai yra apie 20-2000 U/ml, ypatingai apie 100-1000 U/ml. Jeigu kompozicijoje yra naudojami įvairių serotipų mišiniai, jų tinkamas dozės arba koncentracijų intervalus galima nustatyti proporcingai šiuose pavyzdžiuose pateiktoms dozėms ir koncentracijoms, atsižvelgiant į jų santykinius biologinius aktyvumus.

Buferiai, kurie gali būti naudojami kompozicijoje, yra fiziologiniai buferiai, kurie yra laikomi tinkamais leisti į žinduolio, ypatingai žmogaus, audinius. Pavyzdiniais buferiais yra, bet jais neapsiribojama, fosfatinio, fosfatinio-citratinio, sukcinatinio, acetatinio, citratinio, akonitatinio, malatinio ir karbonatinio buferių sistemos. Pageidautina, kad kompozicijoje taip pat būtų ir pagalbinis baltymas, toks kaip žmogaus serumo albuminas arba želatina. Suprantama, kad specialistai gali surasti ir panaudoti paminėtų pavyzdinių buferių ir pagalbinių baltymų ekvivalentus. Šio išradimo toksinų kompozicijos gali būti supakuojamos į bet kokią iš įvairiausių žinomų konteinerių ar buteliukų, išsilaikant jų veiksmingumui.

Giminingu aspektu, išradimas apima paciento, kuriam reikalinga inhibuoti cholinerginę transmisiją, tokią kaip cholinerginė transmisija į pasirinktą raumenį arba raumenų grupę arba į konkrečią liaukos sritį, tokią kaip prakaito liaukos, arba į konkretų inervaciją turintį organą, gydymo būdą. Išradimas taip pat apima šio išradimo kompozicijos panaudojimą vaisto, skirto tokioms indikacijoms gydyti, gamyboje.

Terapinių ir kosmetinių indikacijų, kurias galima gydyti naudojant botulino toksino kompozicijas, pavyzdžiais yra (bet jais neapsiribojama) vokų mėšlungis, žvairumas, pusės veido spazmos, vidinės ausies uždegimas, spazminis kolitas, anizmas, šlapimo išleidimo sfinkterio sinergijos sutrikimas, žandikaulių suspaudimas, stuburo iškreipimas, spazmos, tokios kaip spazmos dėl vienos arba daugiau priežasčių, paimtų iš grupės, susidedančios iš

paralyžiaus, stuburo smegenų pažeidimo, uždarnos galvos traumos, cerebrinio paralyžiaus, išsėtinės sklerozės ir Parkinsono ligos, ir distonijos (pvz., spazminė kreivakaklystė (kaklo distonija), spazminė disfonija, galūnės distonija, gerklų distonija, burnos ir apatinio žandikaulio (Meig'o) distonija). Šios kompozicijos taip pat gali būti taikomos tarpvietai (tarpvietės raumenims), kai pacientė gimdo vaiką, norint iššaukti šių raumenų atsipalaidavimą. Kompozicijos kosmetinių indikacijų pavyzdžiais yra jos taikymas raumenims, kurie duoda raukšles arba surauktus antakius. Kitos šios kompozicijos indikacijos apima miofascitinį skausmą, galvos skausmą susijusį su migrena, gyslų pažeidimus, neuralgiją, neuropatiją, artritinių skausmą, nugaros skausmą, hiperhidrozę, rinorėją, astmą, gausų seilių išsiskyrimą ir gausią skrandžio rūgšties sekreciją.

Ypatingai pažymėtini šio išradimo kompozicijų vartojimo būdai apima intraraumeninį, poodinį arba jontoforezinį vartojimo būdą. Pavyzdžiui, tyrimuose, atliktuose šiam išradimui paremti, buvo rasta, kad B tipo botulino toksinas efektyviai kontroliuoja kaklo distoniją, kai jis vartojamas intraraumeniniu būdu padalintomis dozėmis arba kaip vienkartinė dienos dozė, turinti 5000-10000 vienetų.

Pagal kitą giminingą aspektą, išradimas apima pacientų, kurie išvystė imunitetą arba atsparumą konkrečiam botulino serotipui, gydymo būdą stabilia skysta kompozicija, į kurią įeina kitas serotipas. Pavyzdžiui, pacientas, kuris yra rezistentiškas A serotipo botulino toksinui, gali būti gydomas stabilia skysta kompozicija, kurioje yra bet kurio iš B, C₁, C₂, D, E, F arba G serotipų botulino, arba pacientas, kuris yra rezistentiškas B serotipo botulino toksinui, gali būti gydomas stabilia skysta kompozicija, kurioje yra bet kurio iš A, C₁, C₂, D, E, F arba G serotipų botulino, gaunant atnaujintą efektyvumą.

Šie ir kiti tikslai ir ypatybės pasidarys visiškai aiškūs, kai bus perskaitytas smulkus išradimo aprašymas kartu su pridedamais brėžiniais.

Smulkus išradimo aprašymas

Šis išradimas yra susijęs su stabiliomis botulino toksino skystomis kompozicijomis ir su jų panaudojimu. Dabartiniu metu, kai botulino toksino preparatai yra pramonėje ir prekyboje įvairiems terapiniams ir kosmetiniams

tikslams, dėl veikliojo ingrediento labilumo tirpale kompozicijos turi būti paruošiamos iš liofilizuotų ingredientų, ir jos turi griežtus laikymo reikalavimus. Pavyzdžiui, "BOTOX®" yra pateikiamas kaip liofilizuoti milteliai, kurie turi būti transportuojami ir laikomi šaldiklyje arba žemiau -5°C ir prieš vartojimą ištirpinami pridedant išmatuotą kiekį fiziologinio tirpalo. Po ištirpinimo rekomenduojama, kad kompoziciją suvartotų pacientas per 4 valandas, ir kad bet kuris ištirpintas produktas šį laiką būtų laikomas šaldytuve (PDR, 1997); ištirpinto produkto užšaldymas ir atitirpdymas nerekomenduojamas (Hoffman, 1993).

Šiame išradime yra pateikiama stabili skysta kompozicija, kurioje yra botulino toksino ir kuri yra stabili skystame pavidale mažiausiai vienerius metus standartinio šaldytuvo temperatūroje ir mažiausiai šešis mėnesius - kambario temperatūroje. Ši kompozicija turi privalumų, nes ji nereikalauja neįprastų laikymo arba transportavimo sąlygų, bei ji sumažina klaidų padarymo praskiedžiant toksiną galimybę, kurios gali sukelti perdozavimą.

I. Apibrėžimai

Čia naudojamas terminas "stabilus" reiškia biologiškai aktyvios medžiagos, ypač botulino toksino, biologinio aktyvumo arba veiksmingumo išlaikymą tam tikrą apibrėžtą arba neapibrėžtą laiko tarpą.

Terminas "botulino toksinas" reiškia biologiškai aktyvų baltymą arba baltymo kompleksą, paprastai išskiriamą iš *Clostridium botulinum* bakterijų. Šis terminas reiškia bet kurį iš mažiausiai aštuonių žinomų serologiškai skirtingų toksinų (A, B, C₁, C₂, D, E, F ir G), o taip pat ir bet kurį iš papildomų botulino toksinų, turinčių tą patį bendrą sugebėjimą inhibuoti cholinerginę neurotransmisiją, kas sudaro veikliąją molekulę. Šis terminas taip pat gali apimti baltymą-nešiklį, kuris taip pat yra gautas iš *C. botulinum*, kuris kompleksuojasi su veikliąja molekule, kaip aprašoma IIA skyrelyje. Kaip aptariama žemiau, botulino toksino serotipai yra giminingi farmakologiškai, bet skirtingi imunologiškai. Bendru atveju, veiklioji toksino molekulė turi maždaug 145-170 kilodaltonų (kD) dydžio molekulę. Šio išradimo kontekste suprantama, kad toksino baltymas apima toksinus ir baltymus-nešiklius, kurie yra gaunami rekombinantiniu būdu pagal specialistams žinomus metodus. Be to, terminas "botulino toksinas" apima baltymus, turinčius aminorūgščių sekas,

kuriuose yra konservatyviųjų aminorūgščių pakaitalų, įskaitant delecijas, lyginant su žinomomis botulino toksino sekomis, kaip aprašyta žemiau.

Botulino toksino "biologinis aktyvumas" reiškia jo sugebėjimą blokuoti neurotransmisiją sinapsėse, turinčiose acetilcholino receptorius, blokuojant acetilcholino išsiskyrimą iš nervų galų. Šis terminas čia yra naudojamas pakaitomis su terminais "cholinerginės transmisijos inhibavimas", "cholinerginės įvesties inhibavimas", "cholinerginės įvesties sumažinimas" ir jų variacijomis. Toksino biologinio aktyvumo įvertinimas *in vitro* apima čia aprašomą pelių LD₅₀ testą. Aktyvumo "vienetas" šiame teste yra apibūdinamas kiekiu toksino baltymo, kurio reikia, kad esant šiai dozei nugaištų 50 % pelių. Funkcinis šio termino apibūdinimas yra pateiktas 2 pavyzdyje.

Įprastos aminorūgštys čia yra žymimos sutrumpinimais iš vienos arba trijų raidžių: alaninas (A, Ala), cisteinas (C, Cys), asparto rūgštis (D, Asp), glutamo rūgštis (E, Glu), fenilalaninas (F, Phe), glicinas (G, Gly), histidinas (H, His), izoleucinas (I, Ile), lizinas (K, Lys), leucinas (L, Leu), metioninas (M, Met), asparaginas (N, Asn), prolinas (P, Pro), glutaminas (Q, Gln), argininas (R, Arg), serinas (S, Ser), treoninas (T, Thr), valinas (V, Val), triptofanas (W, Trp), tirozinas (Y, Tyr).

Terminas "skysta farmacinė kompozicija" reiškia farmaciškai arba biologiškai aktyvų vaistinį preparatą, kuris gali būti laikomas skystoje farmacinėje pagalbinėje medžiagoje, tokioje kaip buferintas druskos tirpalas arba fiziologinis buferis, ilgą laiko tarpą. Kompozicijos gali būti koncentruotos kompozicijos, kurios prieš vartojimą yra praskiedžiamos tokiu pačiu arba skirtingu skysčiu.

Terminas "buferis" reiškia junginį, paprastai druską, kuri, ištirpinus ją vandeninėje terpėje, palaiko tirpalo laisvų vandenilio jonų koncentraciją tam tikro pH intervale, kai į tirpalą pridedama vandenilio jonų, arba kai jie pašalinami. Sakoma, kad druska arba tirpalas, kai jie atlieka šią funkciją, turi "buferinę talpą" arba "buferina" tirpalą šiame intervale. Bendru atveju, buferis turės pakankamą buferinę talpą intervale, kuris yra jo $pK \pm 1$ pH vienetas. "Fiziologinis buferis" yra buferis, kuris yra netoksiškas žinduoliams, ypačiai žmonėms, kai jis yra vartojamas kaip farmacinio preparato dalis. Čia yra duodami atitinkančių šio išradimo kontekstą buferių pavyzdžiai.

“Farmaciškai priimtinas skystis” yra skystis, kuris yra laikomas nekenksmingu vartoti arba suleisti į žinduolio, ypač žmogaus, organizmą.

Čia naudojamas terminas “pagalbinis baltymas” reiškia baltymą, kuris yra įdėtas į farmaciškai veiklų preparatą, bet jis nesuteikia šiam preparatui jokio kito pastebimo biologinio aktyvumo. Pagalbinių baltymų pavyzdžiais yra, bet jais neapsiribojama, serumo albuminas, ypač žmogaus serumo albuminas, ir želatina. Pageidautina, kad tokie pagalbiniai baltymai būtų santykinai neimunogeniniai žinduoliams, kuriems yra skiriamos šios farmacinės kompozicijos.

Laikoma, kad šio išradimo kontekste ir ypač apibrėžtyje naudojamas terminas “apimantis” turi prasmę kaip “talpinantis”, “turintis (savyje)”, arba “besiskiriantis tuo”. Kompozicija arba būdas, kuris “apima” A, B ir C elementus, apart A, B ir C, gali turėti savyje ir kitus nepažymėtus elementus, kaip antai X arba Y.

Šio išradimo kontekste ir ypač apibrėžties kontekste naudojamas terminas “maždaug” reiškia “apytikriai” arba “apie”. Skaitmeninių reikšmių kontekste, neįsipareigojant dėl kokios nors tikslios skaitmeninės reikšmės, terminas gali būti aiškinamas kaip skaitmeninis dydis, kuris sudaro nurodyto dydžio arba intervalo $\pm 10\%$.

Visi kiti čia naudojami terminai turi būti suprantami kaip turintys jų įprastas specialistams žinomas reikšmes, arba kaip yra duoti standartiniame mediciniame arba moksliniame žodyne.

II. Botulino toksinas

Kaip jau buvo minėta, botulino toksinas yra polipeptidinis produktas, kurį gamina įvairūs *Clostridium botulinum* kamienai. Šie kamienai gamina mažiausiai aštuonis žinomus serologiškai skirtingus toksinus (A, B, C₁, C₂, D, E, F ir G). *C. barati* ir *C. butyricum* gamina atskirą serotipą, kuris yra panašus atitinkamai į E ir F serotipus (Simpson, 1993). Bendrai paėmus, toksino molekulė yra maždaug 145-170 kilodaltonų (kD) dydžio molekulė. Kai kuriais atvejais aktyvioji toksino molekulė susideda iš dviejų disulfidiniu ryšiu sujungtų grandinių, susidariusių iš polipeptidinio pirmtako. Pavyzdžiui, B tipo botulino toksinas yra gaunamas iš atskiro 150 kD polipeptidinio pirmtako, kuris yra įkriptas, kad susidarytų du disulfidiniu ryšiu sujungti fragmentai – 100 kD

sunkioji grandinė (H-grandinė) ir 50 kD lengvoji grandinė (L-grandinė), gaunant maksimalų aktyvumą. Gamtoje atsirandantis toksinas rišasi nekovalentiškai su netoksiškais baltymais-nešikliais, kuriuos taip pat gamina *C. botulinum*. Šie baltymai-nešikliai išsiskiria kartu su toksinu ir optimaliu atveju sudaro dalį čia aprašytos kompozicijos.

[vairūs botulino toksino serotipai ląstelėse turi skirtingus surišimo specifiškumus. Pavyzdžiui, pasirodo, kad A ir E tipo toksinai rišasi prie tos pačios sinapsosomalinės susirišimo vietos, o B tipo toksinas rišasi prie skirtingos vietos ir nekonkuruoja dėl susirišimo su A/E tipo susirišimo vieta (Melling, 1988). Nors ir nenorima prisirišti prie konkrečios teorijos arba veikimo mechanizmo, vis tik yra manoma, kad toksino H-grandinė turi poveikį į neuronų ląstelių surišimą ir įsiskverbimą į ląstelę, o L-grandinė inhibuoja acetilcholino išsiskyrimą sinapsėje. Be to, manoma, kad A ir B tipų botulino toksinas naudoja šiek tiek skirtingus mechanizmus acetilcholino išsiskyrimui inhibuoti: A tipas skaldo su sinapse susijusį baltymą-25 (SNAP-25), o B tipas skaldo susijusį su pūslelėmis membranių baltymą (VAMP, arba sinaptobreviną); abu šie baltymai yra sinapsinio pūslelinio išsiskyrimo iš sinapsių komponentai.

Visi *C. botulinum* toksino serotipai duoda bendrą fiziologinį rezultatą žinduoliuose. Visi jie inhibuoja arba blokuoja cholinerginį sinapsės aktyvumą, kuris, priklausomai nuo įvedimo vietos, pasireiškia daliniu arba visišku raumenų paralyžiumi arba blokada, arba organo arba liaukos funkcijos inhibavimu. Tokiu būdu, šio išradimo kompozicijos gali būti naudojamos, esant bet kuriems botulino toksino serotipams, gautiems iš *C. botulinum*, kuriems yra būdingas aukščiau aprašytas biologinis aktyvumas. Daugumos iš dabar žinomų serotipų aminorūgščių sekos taip pat yra žinomos arba gali būti nustatytos žinomais metodais. Turėtų būti suprantama, kad šio išradimo kontekste botulino toksino kompozicijos turi apimti ir rekombinantiniu būdu pagamintą botulino toksiną, kuris, lyginant su tokiomis žinomomis sekomis, turi konservatyviųjų aminorūgščių pakeitimus. Bendru atveju tokie pakeitimai turėtų būti padaryti išeinant iš standartinių gamtinių aminorūgščių pakeitimo klasių. Pavyzdžiui, standartinės pakeitimo klasės gali būti šešios klasės, paremtos bendromis šoninės grandinės savybėmis, o didžiausią pakeitimo dažnį gamtiniuose homologiniuose baltymuose galima nustatyti, pavyzdžiui,

pagal specialistams žinomą standartinę pakeitimo dažnio matricą, tokią kaip Dayhoff pakeitimo dažnio matrica. Pagal Dayhoff matricą, pavyzdžiui, tokios klasės yra I klasė: Cys; II klasė: Ser, Thr, Pro, Hyp, Ala ir Gly, atstovaujanti mažas alifatinės šoninės grandinės ir OH grupes turinčias šoninės grandinės; III klasė: Asn, Asp, Glu ir Gln, atstovaujanti neutralias ir neigiamai įkrautas šoninės grandinės, galinčias sudaryti vandenilinius ryšius; IV klasė: His, Arg ir Lys, atstovaujanti bazinės polines šoninės grandinės; V klasė: Ile, Val ir Leu, atstovaujanti šakotas alifatinės šoninės grandinės, ir Met; ir VI klasė: Phe, Tyr ir Trp, atstovaujanti aromatinės šoninės grandinės. Be to, kiekvienoje grupėje gali būti giminingų aminorūgščių analogai, tokie kaip ornitinas, homoargininas, N-metilizinas, dimetilizinas arba trimetilizinas IV klasėje, ir halogenintas tirozinas VI grupėje. Be to, klasės gali apimti ir L, ir D stereoizomerus, nors pakeitimui yra tinkamesnės L-aminorūgštys. Pavyzdžiui, Asp pakeitimas kita III klasės liekana, tokia kaip Asn, Gln arba Glu, yra konservatyvusis pakeitimas.

Nors botulino toksino aktyvumas gali būti išmatuotas naudojant elektrofiziologinius testus, tokius kaip specialistams žinomi testai, bendru atveju aktyvumas yra matuojamas suleidžiant toksiną mažiems gyvuliukams, kaip antai pelėms, ir nustatant toksino dozę, kurios reikia, kad žūtų vidutiniškai 50 % tirtų gyvuliukų. Ši dozė vadinama "letaline doze-50" arba LD₅₀ ir yra laikoma biologinio aktyvumo vienetu. Patogumo dėlei dozės terapiniam panaudojimui standartizuojamos pagal tokius vienetus. Kaip smulkiau aptariama tolimesniame IIIB skyriuje, įvairūs serotipai gali turėti skirtingą terapinį veiksmingumą žmonėms, kaip išmatuota pagal LD₅₀ vienetus. Terapinės dozės gali būti nustatytos iš šios informacijos žinomais būdais.

III. Botulino toksino gavimas

Šiame skyriuje aprašomi botulino toksino, kurį galima naudoti šio išradimo kompozicijoje, gavimo būdai.

A. Botulino toksino išskyrimas iš C. Botulinum

Šiame skyriuje pateikiami bendrieji išgryninto botulino toksino gavimo iš išaugintų *C. botulinum* būdai, pademonstruojant B tipo botulino toksino

pavyzdžiu. Apart čia konkrečiai pacituotų būdų, specialistams yra žinomi kiti A ir B tipų, bei kitų žinomų serotipų botulino toksinų gavimo būdai.

Kaip jau buvo minėta, šio išradimo kompozicijų veiklusis ingredientas yra *C. botulinum* ekstraktų baltyminis komponentas, žinomas kaip botulino toksinas, kurio veiklusis komponentas turi maždaug 145-170 kD molekulinę masę ir kuris paprastai yra gamtiniame baltymų komplekse, turinčiame daug didesnę molekulinę masę. Šiame skyrelyje pateikiami įvairių botulino toksinų išskyrimo pavyzdžiai, sutelkiant dėmesį į A ir B serotipų botulino toksinus. Turėtų būti suprantama, kad bendroje mokslinėje literatūroje yra pateikiami nurodymai alternatyviems toksinų išskyrimo būdams, ir šios srities specialistai galės surasti tokius būdus ir pritaikyti juos konkrečiam toksinui, kurį norima panaudoti kompozicijose, pagamintose pagal šį išradimą.

Bendrai imant, B tipo botulino toksinas yra išskiriamas kaip kompleksas iš *C. botulinum* didelio fermentacijos titro kultūrų gerai žinomais metodais. Pradinės kultūros gali būti gaunamos Jungtinėse Valstijose iš institucijų, turinčių licenziją iš Ligų Kontrolės Centro (CDC), o kitur - pagal nacionalines taisykles apie organizmų platinimą. B tipo botulino toksino išskyrimui tinkamos pradinės medžiagos yra *C. botulinum* Okra arba Bean B. Užšaldytos pradinės kultūros pasėjamos į mėgintuvėlius, kuriuose yra auginimo terpė, tokia kaip tioglikoliato terpė arba triptikazės peptono terpė, ir kultūros auginamos ir apdorojamos žemiau aprašytais būdais, detalizuotais U.S. Patent 5,696,077, kuris duodamas kaip literatūros šaltinis.

Trumpai tariant, kultūros padauginamos žinomais būdais, gaunant pakankamą kiekį bakterinės pradinės medžiagos, kuri duotų norimą toksino išeigą. Paprastai, norint gauti 0,5 g toksino, reikia turėti maždaug 20 litrų bakterinės kultūros. Kultūra atvėsinama iki kambario temperatūros ir sulfato arba kita tinkama rūgštimi sureguliuojamas kultūros pH iki 3,5. Leidžiama nusėsti susidariusioms nuosėdoms, o skaidrus nuopilas nupilamas. Tada į nuosėdas maišant pridedama kalcio chlorido, ir dejonizuotu vandeniu padidinamas tūris, kad galutinė CaCl_2 koncentracija būtų apie 150 mM. pH padidinamas iki maždaug neutralios terpės (pH 6,5) ir toksino tirpalas nuskaidrinamas centrifuguojant. Toksinas vėl nusodinamas, sumažinant pH iki 3,7. Susidariusioms nuosėdoms leidžiama nusėsti, toksiškos nuosėdos nucentrifuguojamos, po to vėl ištirpinamos buferyje (pH 5,5) ir dializuojamos

per naktį prieš tą patį buferį. Dializuotas toksinas centrifuguojamas, o gautas nuopilas chromatografuojamas per anijonitinę kolonėlę (DEAE). Surenkama nesurišta frakcija ir nustatomas baltymo kiekis. Iš šios frakcijos nusodinami toksino kompleksai pridedant amonio sulfato iki maždaug 60 % įsisotinimo. Suspaustos nuosėdos ištirpinamos fosfatiniame buferyje ir dializuojama prieš tą patį buferį (pH 7,9). Šis išgrynintas toksino preparatas gali būti naudojamas kompozicijai gaminti.

A tipo botulino toksino gavimo būdai taip pat yra gerai žinomi. Pavyzdžiui, Hambleton, et al (1981) ir Melling, et al (1988) (abu duoti kaip literatūros šaltiniai) aprašo A tipo botulino toksino gavimą ir išskyrimą iš A tipo *Clostridium botulinum* NCTC 2916. Bakterijų kultūros auginamos iš patikrinto pradinio pasėlio ir inokuliuojamos į 30 litrų fermentavimo įtaisą, dirbantį anaerobinėse sąlygose, pagal specialistams žinomas standartines sąlygas. Pastoviai kontroliuojama toksino išeiga (pavyzdžiui, nustatant LD₅₀), ir kai gaunama maksimali išeiga (maždaug 2x10⁶ pelės LD₅₀/ml), kultūra parūgštinama (3N H₂SO₄ iki pH 3,5) ir toksinas surenkamas centrifuguojant. Šis nusodintas negrynas toksinas vėl ištirpinamas ir ekstrahuojamas 0,2 M fosfatinio buferiu (pH 6,0), po to apdorojamas ribonukleaze (100 µg/ml, 34 °C temperatūroje) ir nusodinamas naudojant NH₄SO₄ (60 % nuo prisotinto 25 °C temperatūroje). Po to nuosėdos resuspenduojamos ir leidžiamos į DEAE-Sephacel jonų mainų chromatografiją, esant pH 5,5 (partija prieš adsorbiciją). Kontroliuojamas frakcijų aktyvumas, ir aktyviosios frakcijos vėl nusodinamos NH₄SO₄ (60 % nuo prisotinto 25 °C temperatūroje). Šios nuosėdos gali būti laikomos ir ištirpinamos pagaminat šio išradimo kompoziciją, kaip aprašyta žemiau.

Geriau, kai į šio išradimo kompozicijas įeina toksiną rišantis kompleksas, toks kaip pagamintas pagal aprašytus A ir B tipų botulino toksinų gavimo būdus, arba naudojamos kitos ekvivalentinės C₁, C₂, D, E, F arba G tipų botulino toksino formos, pagamintos žinomais būdais. Toksino titras yra nustatomas panaudojant sumaišyto su pagalbiniu baltymu, kaip antai žmogaus serumo albuminu, toksiną rišančio komplekso praskiedimų seriją, vengiant burbuliukų ir intensyvaus maišymo, pavyzdžiui, maišikliu. Pagal susitarimą, titras yra nustatomas iš pelių nugaišimo testo, tokio kaip 2

pavyzdyje aprašytas pelių LD₅₀ testas. Darbinis pradinis tirpalas yra praskiedžiamas, padalinamas alikvotinėmis dalimis ir liofilizuojamas laikymui. Šis pradinis tirpalas yra tiriamas, nustatant baltymo koncentraciją, LD₅₀, grynumą ir tinkamumą farmacijoje specialistams žinomais metodais, kas yra parodyta 2 pavyzdyje.

IV. Stabilios botulino toksino kompozicijos

Šiame išradime buvo atrasta, kad botulino toksinas gali būti pagaminamas ir laikomas stabiliose skystose kompozicijose, kurios išlaiko jo veiksmingumą ilgesnį laiko tarpą, pvz., mažiausiai 1-2 metus, "šaldytuvo" temperatūrose (t.y. apie 5 ± 3 °C, arba tiksliau - apie 4 ± 2 , arba bendriau – 0-10 °C) arba mažiausiai 6 mėnesius "kambario temperatūroje" (t.y. apie 25 °C, arba bendriau – 10-30 °C temperatūroje). Tokios kompozicijos gali būti patogiai išdalijamos žmonėms arba kitiems žinduoliams kaip vaistai be papildomo praskiedimo, kurį turėtų atlikti gydytojas. Kompozicijos yra apibūdinamos pH, kuris yra apie pH 5-6, geriau apie pH 5,5-5,6, kurį palaiko tinkamos buferavimo sąlygos. Kompozicijoje taip pat gali būti vienas arba daugiau pagalbinių baltymų.

1 pavyzdyje yra pateikiamos botulino toksino (B tipo) kompozicijos, turinčios 5000 U/ml koncentraciją, pagaminimo detalės. Turėtų būti suprantama, kad tokios kompozicijos sąlygos gali būti taikomos ir kitiems botulino toksino serotipams, tokiems kaip A tipo botulino toksinas, padarant tokiems serotipams reikalingas koncentracijas, kad būtų gautos stabilios vaisto formos patogiuose dozuotuose įpakavimuose.

Trumpai tariant, koncentruotas botulino toksino preparatas, toks kaip aukščiau aprašyti A ir B tipų išgryninto toksino preparatai, yra sumaišomas su skiedikliu, tokiu kaip sukcinato buferis, turintis pH tarp pH 5 ir pH 6, geriau apie pH 5,6. B tipo botulino toksino atveju, kaip buvo nustatyta iš pelių LD₅₀ testo, pageidautinos yra maždaug 5000 U/ml koncentracijos, tačiau, priklausomai nuo duodamos dozės, gali būti reikalingos arba pageidautinos ir maždaug 100-20000 U/ml ribose esančios arba netgi didesnės koncentracijos. A tipo botulino toksino atveju gali būti patogios 20-2000, geriau 100-1000 U/ml, ribose esančios koncentracijos. Farmacijos pramonės tikslams yra imami kompozicijų mėginiai ir tiriamas jų užteršimas mikrobais

(bioapkrova), kompozicijos steriliai nufiltruojamos į stiklines arba polipropilenines ampules, paruošiant jas naudoti žmonėms. Galutinis produktas gali būti laikomas skystame pavidale mažiausiai vienerius metus, geriau daugiau nei du metus, 0-10 °C temperatūroje žymiai neprarandant jo biologinio veiksmingumo, ką rodo <20 % veiksmingumo sumažėjimas pelių LD₅₀ teste (2 pavyzdys).

Aukščiau minėtu skiedikliu gali būti bet koks farmaciškai priimtinas skystis, kuris nemažina komplekso stabilumo ir kuris palaiko stabilų pH intervalą tarp maždaug pH 5 ir pH 6. Ypatingai tinkamų buferių pavyzdžiais yra sukcinatinis ir fosfatinis buferiai, tačiau specialistai supras, kad šio išradimo kompozicijos nėra apribotos konkrečiu buferiu, jeigu buferis duoda priimtina stabilumo laipsnį arba "buferininį talpumą" nurodytame intervale. Bendru atveju, buferis turi pakankamą buferinį talpumą maždaug 1 pH vieneto nuo jo pK ribose (Lachman, *et al.*, 1986). Šio išradimo kontekste tai apima buferius, turinčius pK maždaug 4,5-6,5 ribose. Buferio tinkamumas gali būti įvertintas remiantis publikuotose lentelėse duotomis pK reikšmėmis arba gali būti nustatytas žinomais būdais. Apart aukščiau paminėtų sukcinatinio ir fosfatinio buferių, kitais farmaciškai tinkamais buferiais yra acetatinis, citratinis, akonitatinis, malatinis ir karbonatinis buferiai (Lachman). Tirpalo pH gali būti sureguliuotas iki norimos galutinės reikšmės šio intervalo ribose naudojant bet kokią farmaciškai priimtina rūgštį, pavyzdžiui, hidrochlorido rūgštį arba sulfato rūgštį, arba bazę, pavyzdžiui, natrio hidroksidą.

Į kompoziciją pridedamu pagalbiniu baltymu gali būti bet kuris iš daugybės farmaciškai priimtinių baltymų arba peptidų. Geriau, kai pagalbinis baltymas yra pasirinktas toks, kad jis gali būti skiriamas žinduoliui, nesukeliant imuninio atsako. Pavyzdžiui, žmogaus serumo albuminas yra labai tinkamas baltymas naudoti žmonėms skiriamose farmacinėse kompozicijose; atvirkščiai, jaučio serumo albuminas gali būti pasirinktas naudoti galvijams. Šiam tikslui taip pat gali būti naudojami ir kiti pagalbiniai baltymai, tokie kaip, pavyzdžiui, želatina. Šios pagalbinės medžiagos koncentracija kompozicijoje turi būti pakankama, kad būtų galima išvengti toksino baltyminio komplekso adsorbcijos ant indo arba buteliuko, kuriuose jis yra laikomas, sienelių. Pagalbinės medžiagos koncentracija keisis priklausomai nuo pagalbinės

medžiagos prigimties ir toksino komplekso koncentracijos kompozicijoje. Pavyzdžiui, tyrimuose, atliktuose šiam išradimui paremti, buvo nustatyta, kad 0,5 mg/ml žmogaus serumo albumino koncentracija yra pakankama kompozicijos, kurioje yra 5000 U/ml B tipo botulino toksino, tikslams, daugumai žmonių nesukeliant pastebimos imunologinės arba alerginės reakcijos; bendru atveju, pakankamą apsaugą turėtų suteikti maždaug 0,05-1 mg koncentracijos 1000-čiui botulino B vienetų.

Taip pat buvo aprašytos tinkamos pagalbinės medžiagos koncentracijos A tipo botulino toksinui stabilizuoti. Pavyzdžiui, "BOTOX®" yra stabilizuojamas pridėdant 0,5 mg albumino 100-ui toksino aktyvumo vienetų (PDR).

V. Panaudojimo galimybės

A. Botulino toksino kompozicijų terapinis ir kosmetinis panaudojimas

Šio išradimo farmacinės kompozicijos gali būti naudojamos daugelio indikacijų atveju, kuriuose yra pageidautinas cholinerginės neutotransmisijos inhibavimas arba blokavimas, ypač (bet neapsiribojant) cholinerginės transmisijos, kuri yra susijusi su lygiųjų arba skeletinių raumenų kontrole. Šiame skyriuje yra pateikiami pavyzdžiai sutrikimų, kurių terapijoje gali būti naudojamos šio išradimo kompozicijos; tačiau čia pateikti pavyzdžiai neturi būti laikomi apribojančiais išradimą. Pavyzdinės dozės ir vartojimo būdai kai kurioms iš šių indikacijų yra aprašyti tolimesnėje B dalyje.

Buvo parodyta, kad botulino toksinas, ypač A tipo botulino toksinas, yra efektyvus gydant spazminius raumenų sutrikimus. Vienas gydymo kursas, į kurį gali įeiti daug intraraumeninių injekcijų, gali duoti nekontroliuojamų raumenų spazmų palengvinimą net keletui mėnesių. Pavyzdžiui, "BOTOX®" (A tipo botulino toksinas) yra patvirtintas JAV Maisto ir Vaistų Administracijos lokalizuotoms injekcijoms į akiduobę vokų mėšlungiui gydyti. Kitos indikacijos apima kitas židininės distonijas, tokias kaip gerklų distonija, Meige'o sindromas (burnos ir apatinio žandikaulio distonija, burnos ir veido judesių sutrikimas), spazminė kreivakaklystė (Hargman, *et al.*, 1996), galūnės distonija, anizmas, šlapimo išleidimo sfinkterio sinergijos sutrikimas, vokų mėšlungis, žvairumas, pusės veido spazmos, o taip pat rinorėja, vidinis

otitas, gausus seilių išsiskyrimas, astma, spazminis kolitas, gausi skrandžio rūgšties sekrecija (žr. pavyzdžiui, U.S. Patent 5,766,005), su migrena susijęs galvos skausmas, gyslų pažeidimai, neuralgija arba neuropatija (U.S. Patent 5,714,468; WO 953041), artritinis skausmas (WO 9517904), virškinimo trakto sutrikimai, susiję su skersaruožiu arba lygiuoju raumeniu (U.S. Patent 5,674,205), tarpvietės raumens atpalaidavimas gimdant vaiką (U.S. Patent 5,562,899) arba žandikaulių suspaudimo atpalaidavimas (U.S. Patent 5,298,019). A tipo botulino toksinas taip pat buvo leidžiamas lokaliai, norint pasiekti kosmetinį raumens tonuso, kuris sukelia veido "raukšles", sumažinimą ir pasiekti "antakių pakėlimą" (Frankel, 1998) ir buvo rasta, kad jis tinka leisti į odą židininės hiperhidrozės gydymui (gausaus prakaitavimo; WO 9528171; U.S. Patent 5,766,605) bei jaunatvinio stuburo iškrypimo gydymui (U.S. Patent 5,053,005), suaugusių ir paauglių cerebrinio paralyžiaus (U.S. Patent 5,298,019; WO 9305800) ir cerebrinio paralyžiaus, išsėtinės sklerozės arba Parkinsono ligos sukeltų spazmų ir nevalingų kontrakcijų gydymui (U.S. Patent 5,183,462). Visi aukščiau pacituoti literatūros šaltiniai yra pridedami ištiesai.

Eksperimentuose, atliktuose šiam išradimui patvirtinti, buvo išbandytos stabilios skystos kompozicijos, turinčios B tipo botulino toksino, ir buvo rasta, kad jos yra efektyvios kaklo distonijos, taip pat žinomos kaip kreivakaklystė (būklė, kurioje individas patiria nevalingas spazmas ir galvos, kaklo ir stuburo raumenų susitraukimą, kuris sukelia galvos sukiojimą arba kilnojimą) atveju. Šią būklę dažnai lydi tremoras ir skeletinių raumenų skausmas. Bendrai imant, šio sutrikimo etiologija yra nežinoma; tačiau manoma, kad tai yra centrinės nervų sistemos sutrikimo rezultatas, sukeliantis susietos muskulatūros hiperaktyvumą. Dabartiniai gydymo režimai, įskaitant priešcholinerginius, dopaminerginius, raumenis atpalaiduojančius, priešspazminius ir prieškonvulsinius vaistus, neduoda ilgalaikio pagerėjimo. B tipo botulino toksinas yra efektyvus gydant šią būklę, sukeldamas lokalinį paralyžių arba parezę, kurių tipiškas pasireišimo laikas yra apie 1 savaitę po injekcijos ir atsakas trunka nuo maždaug 1 iki 4 mėnesių.

Kitų botulino toksino serotipų kompozicijos tinka bet kurios iš anksčiau aprašytų A tipo toksino gydomų būklių pirminiam gydymui. Be to, kaip jau buvo minėta, B-G tipų botulino toksinas taip pat tinka gydyti pacientams, kurie

pasidarė rezistentiškai gydymui A tipo botulino toksinu dėl imuninio atsako į šį toksiną. Priešingai, A serotipas gali būti naudojamas pacientams, kurie pasidarė rezistentiškai B arba bet kuriam iš kitų toksino serotipų. Gali būti pagaminamos vieno arba daugiau botulino toksino serotipų kompozicijos ir naudojamos pagal šį išradimą.

Bendrai imant, reikėtų suprasti, kad dėl panašių biologinių poveikių įvairūs botulino toksino tipai gali būti keičiami vieni kitais gydant įvairius sutrikimus, ypač susijusius su raumenų spazmomis. Vis dėlto, kaip aprašyta žemiau A ir B tipų atveju, įvairių serotipų efektyvios dozės (išreikštos LD₅₀ dydžiais arba biologiniais vienetais) gali būti labai skirtingos. Ekvivalentinės dozės gali būti nustatytos remiantis žinomomis dozėmis, aprašytais kurio nors iš ištirtų toksinų atžvilgiu.

B. Dozės ir vartojimo būdai

Botulino toksinas yra žinomas kaip veiksmingas ir kartais mirtinas toksinas gyvūnams. Vis dėlto, kaip aprašyta žemiau, jeigu imamasi pakankamo atsargumo pritaikant dozes ir vartojimo būdą, žmonės šį vaistą gali vartoti saugiai.

Įvairių botulino toksino formų dozės gali kisti priklausomai nuo naudojamo toksino serotipo. Pavyzdžiui, eksperimentuose, atliktuose šiam išradimui paremti, buvo rasta, kad lyginant pelių LD₅₀ vienetus, A tipo botulino toksinas ("BOTOX®") yra apie 4-6 kartus veiksmingesnis nei B tipo botulino toksinas paralyžiui indukuoti bandyme su beždžionėmis, kaip nustatyta panaudojant pasirinktų skeletinių raumenų elektrofiziologinius matavimus. Šis pastebėjimas sutampa su eksperimentiniais rezultatais bandyme su žiurkėmis, kuris rodo, kad kiekiai, reikalingi žiurkių galūnių paralyžiui sukelti, yra labai skirtingi abiem toksinams (Sellin; Jackson). Pagal šiuos pastebėjimus patyręs praktikas gali įvertinti arba nustatyti empiriškai tinkamas ekvivalentines dozes.

Rekomenduojamų dozių variacijos taip pat gali kisti priklausomai nuo paciento istorijos. Pacientai, gavę pakartotas A tipo botulino toksino dozes, pavyzdžiui, yra laikomi pasidariusias "rezistentiškais" tolimesniam gydymui, ir jiems reikalingos didesnės dozės ekvivalentiniam efektui pasiekti laikui bėgant. Nesusirišant su koku nors konkrečiu veikimo mechanizmu, manoma,

kad šis reiškinys yra susijęs su serotipui specifinio imuninio atsako atsiradimu paciento organizme. Pranešimai apie antikūnų atsiradimą pacientų, kurie yra pakartotinai gydomi A tipo toksinu, organizme yra nuo maždaug 3 % iki 57 %. Tokiu būdu, rekomenduojama, kad kai klinicistas sugalvoja keisti serotipus gydymo režimo metu, naujojo serotipo dozė turi būti skaičiuojama kaip paprastam pacientui, o ne pagal paciento dozių istoriją.

Tinkami vartojimo būdai apima tokius, kurie įgalina įvesti veikliąjį toksininį ingredientą į dominantį audinį, pacientui nesukeliant rimtų šalutinių poveikių. Tokiais būdais yra, be apribojimų, intraraumeninės (i.m.) injekcijos, vietinis, poodinis, perineurinis vartojimas, įvedimas elektroforezės būdu ir pan. Specialistams yra gerai žinomos specifinės botulino toksinų įvedimo procedūros, įskaitant manevrus veikliųjų junginių sisteminiam pasiskirstymui apriboti. Specifinių raumenų grupių identifikavimui ir tikslesnės jų vietos nustatymui gali būti panaudota elektromiografija, ypač gydytą raumenį, kuriuos sunku identifikuoti, tokius kaip raumenys akiduobėje, gerklų ir pterigijaus plote, bei nutukusių subjektų raumenis.

Distonijos paprastai gydomos, įvedant toksiną greta paveikto raumens inervacijos zonos dažniausiai intraraumeninių injekcijų būdu, naudojant hipoderminę adatą. Paprastai sukeltas lokalinis paralyžius pacientui gali duoti palengvėjimą iki 3 ar 4 mėnesių. Pacientui išbandyti gali būti duodamos mažesnės dozės ir, norint pasiekti pakankamą neuroraumeninę blokadą funkcijos sutrikimui sukoreguoti, nesukeliant atviro paralyžiaus, individualiai nustatoma optimali dozė. Dozių pakeitimai gali būti naudingi, jeigu pacientas pasidaro rezistentiškas toksinui. Šio išradimo privalumas yra tas, kad jis įveikia bendrą dozavimo problemą, susijusią su toksino medžiagos nestabilumu tirpale, kuris gali duoti papildomus dozavimo neaiškumus.

Buvo nustatytos A tipo botulino toksino rekomenduojamos dozės eilei indikacijų ir jos yra žinomos specialistams. Pavyzdžiui, gydytą žvairumą, yra rekomenduojama įvesti 1,25-2,5 U A tipo botulino toksino dozę į vertikaliuosius raumenis mažesniame nei 22 dioptrijos horizontaliajam žvairumui; didesniame nei 20 prizminių dioptrijų horizontaliajam žvairumui rekomenduojama 2,5-5 U (*Physician's Desk Reference, 51st Edition*).

A tipo botulino toksinas yra taip pat naudojamas vokų mėšlungiui gydyti, suleidžiant 1,25-2,5 U dozes 27-30 dydžio adata į viršutinio voko

vidurinį ir šoninį prieštarzalinį orbicularis okuli ir į apatinio voko šoninį prieštarsalinį orbicularis okuli. Numatoma, kad gydymas tęsis apie 3 mėnesius; pakartotino gydymo atveju, priklausomai nuo paciento atsako, dozės galima padidinti iki dviejų kartų. Rekomenduojama, kad A tipo botulino toksino kumuliatyvinė dozė per 30 dienų laikotarpį būtų ne daugiau nei 200 U (*Physician's Desk Reference, 51st Edition*).

3 pavyzdyje yra pateikiami dozių ribų nustatymo pavyzdžiai gydant B tipo botulino toksinu kaklo distoniją (kreivakaklystę), naudojant šio išradimo kompoziciją. Šiuose tyrimuose, kurie taip pat yra aprašyti žemiau, klinikiniam vartojimui buvo pateikta skysta B tipo botulino toksino kompozicija pagal šį išradimą su nurodymais laikyti šią kompoziciją klinikiame šaldytuve, kontroliuojant temperatūrą tarp 2-8 °C. Paprastai kompozicija tiekama iš partijų, pagamintų ir laikytų rekomenduojamoje temperatūroje 6-12 mėnesių. Klinikistai gavo maždaug 6 mėnesius išlaikytas kompozicijas.

Trumpai tariant, pacientams buvo duotos įvairios toksino dozės, suleidžiant (i.m.) į 2-4 paviršinių kaklo ir/arba peties raumenų grupes, nustatytas pagal gydytojo įvertinimą, kad jos yra susiję su sutrikimu. Viename tyrime buvo duotos atskiros padalintos dozės 100-1200 U ribose, kumuliatyvinėms dozėms esant 270-2280 U per laikotarpį, trunkantį iki 398 dienų. Visi pacientai pajuto pagerėjimą tyrimo metu ir tyrimo eigoje kompozicijos veiksmingumo sumažėjimo pastebėta nebuvo.

Kiti tyrimai, atlikti norint patvirtinti šį išradimą, parodė, kad pacientai, kurie pasidarė rezistentiški A tipo botulino toksinui, gali būti gydomi B tipo botulino toksinu. Čia pacientai, kurie dalyvavo tyrime, parodė sumažintą atsaką į A tipo botulino toksiną ir buvo laikomi sėkmingai gydomais, jeigu po gydymo jie rodė bent 25 % bendro balų, nustatomų pagal Toronto Western'o spazminės kreivakaklystės įvertinimo skalę (TWSTRS; Consky, 1994), skaičiaus sumažėjimą (sumažėjimas = pagerėjimas), lyginant su bazinės linijos balais. Buvo skiriamos 150-1430 U B tipo botulino toksino individualios dozės, kumuliatyvinei dozei esant 300-12000 vienetų per laikotarpį, trunkantį iki 117 dienų, kaip aprašyta 3 pavyzdyje. Bendrai imant, šiame tyrime pacientai pajuto pagerėjimą, ypač esant didesnėms dozėms, ir nebuvo duomenų apie B tipo botulino blokuojančių antikūnų atsiradimą, o taip pat ir apie kompozicijos veiksmingumo sumažėjimą. Tolimesniame tyrime

periodiškai, net iki 203 dienų buvo skiriamos 0, 400, 1200 ir 2400 U B tipo botulino toksino kompozicijos dozės ir, kaip aprašyta aukščiau, kreivakaklystė buvo sėkmingai gydoma.

Toliau duodami pavyzdžiai iliustruoja, bet jokių būdu neriboja šio išradimo.

PAVYZDŽIAI

Medžiagos

Jeigu nenurodyta kitaip, visi čia aprašyti reagentai gali būti gauti iš vertų pasitikėjimo prekybininkų, kurie parduoda reagentus naudoti atitinkamai chemijos, biochemijos, biotechnologijos arba farmacijos pramonėje.

1 pavyzdys: Stabilios botulino toksino kompozicijos pagaminimas

A. Sukcinatinio buferio pagaminimas

3 l apimties partijomis buvo pagamintas sukcinatinis buferis, turintis 2,7 mg/ml dinatrio sukcinato ir 5,8 mg/ml natrio chlorido su 0,5 mg/ml žmogaus serumo albumino (Michigan Biological Products Institute) priedu. Buferio pH sumažinti iki pH 5,6 buvo naudojama koncentruota hidrochlorido rūgštis. Šis buferis buvo nufiltruotas per 0,2 μ m filtrą į autoklavuotą hermetišką konteinerį. Prieš naudojimą buvo paimtas buferio mėginys, išmatuotas jo pH, nustatytas bakterinis endotoksinas ir bioapkrova.

B. Botulino toksino kompozicijos pagaminimas

Koncentruota B tipo botulino toksino alikvota buvo praskiesta apytikriai 1000 kartų sukcinatiniu buferiu (pH 5,6), gaunant 5000 ± 1000 U/ml veiksmingumą. Praskiestas toksinas buvo laikomas 2 l talpos hermetiškame stikliniame konteineryje ir vadinamas "masiniu tirpalu". Jis laikomas 5 ± 3 °C temperatūroje, kol medžiaga nuvežama išpilstymui.

Prieš išpilstymą paimami masinio tirpalo mėginiai ir specialistams žinomais standartinius metodais tiriama, ar nėra mikrobinio užteršimo

(bioapkrovos). Po to peristaltiniu siurbliu, pumpuojant per medicininį vamzdelį ir steriliai nufiltruojant (0,2 μm), jis perpilamas į pagrindinį rezervuarą, esantį išpilstymo kameros viduje. Gautas sterilus nufiltruotas masinis tirpalas išpilstomas į 3,5 cm^3 stiklines ampules po 0,5 ml (2500 U), 1 ml (5000 U) arba 2 ml (10000 U).

Paskutiniame konteineryje esančio produkto sudėtis yra parodyta 1 lentelėje.

1 lentelė

B botulino kompozicijos sudėtis

Veiklusis ingredientas	Neveiklus ingredientas	Koncentracija
B tipo botulino toksinas	--	5000 $\pm$ 1000 LD ₅₀ U/ml
--	Sukcinatas, USP	10 mM
--	Natrio chloridas, USP	100 mM
--	Žmogaus albuminas, be FDA	0,5 mg/ml
--	Hidrochlorido rūgštis, NF	pH sureguliuvimui

2 pavyzdys: Botulino toksino kompozicijos stabilumo tyrimas

A. Stabilumo rezultatai

Buvo pagamintas B tipo botulino toksinas, praskiestas kaip aprašyta aukščiau iki 2500 vienetų/ml ir laikytas kaip 1 ml alikvotos 5 ml stiklinėse ampulėse 5 °C temperatūroje iki 30 mėnesių ir įskaitant 30-tą mėnesį. Praėjus 0, 1, 3, 6, 9, 12, 15, 24 ir 30 mėnesių, buvo atsitiktinai pasirinktos alikvotos ir tirtas jų veiksmingumas pelių LD₅₀ teste. Taip pat buvo apžiūrėta tirpalo išvaizda ir nustatytas pH standartiniais metodais.

2 lentelė rodo įvairiais laiko momentais paimtų alikvotų tyrimo rezultatus. Šie rezultatai rodo, kad pagal šį išradimą pagamintos kompozicijos yra stabilios (sprendžiant pagal veiksmingumą, kuris yra veiksmingumų, nustatytų nuliniame taške, ribose) mažiausiai 30 mėnesių, laikant 5 °C temperatūroje.

2 lentelė

Kompozicijos stabilumas 5 °C temperatūroje

Laikymo laikas (mėnesiai)	Veiksmingumas (vidurkis; U/ml)	pH	Išvaizda ^a
0	1750-3250	5,5	Tinkama
1	1941	NN ^b	NN
3	2541	5,6	NN
6	2020	5,6	Tinkama
9	23357	5,6	Tinkama
12	2064	5,6	Tinkama
18	2318	5,4	Tinkama
24	1799	5,6	Tinkama
30	2101	5,6	Tinkama

^a Tinkama = skaidri, nuo bespalvės iki gelsvos spalvos; beveik neturi matomų dalelių.

^b Netirta.

3 lentelė rodo B tipo botulino toksino kompozicijos, pagamintos ir padalintos į alikvotas kaip aprašyta aukščiau, tik laikytos 25 °C temperatūroje, tyrimo rezultatus. Šie rezultatai rodo, kad kompozicija yra stabili mažiausiai 6 mėnesius 25 °C temperatūroje (sprendžiant pagal vidutinį veiksmingumą, kuris išsilaiko bent apie 90 %, geriau bent apie 95 %, palaikius 6 mėnesius, ir bent apie 75 % - po 9 mėnesių laikymo 25 °C temperatūroje.

3 lentelė

Kompozicijos stabilumas 25 °C temperatūroje

Laikymo laikas (mėnesiai)	Veiksmingumas (vidurkis; U/ml)	pH	Išvaizda ^a
0	1941	5,5	Tinkama
1	2297	5,6	NN ^b
2	1935	5,6	NN
3	2017	5,6	NN
6	1909	NN	Tinkama
9	1579	5,6	Tinkama

^a Tinkama = skaidri, nuo bespalvės iki gelsvos spalvos; beveik neturi matomų dalelių.

^b Netirta.

B. Stabilumo testai

1. Botulino toksino kompozicijų pH nustatymas

B tipo botulino toksino kompozicijų pH buvo matuojamas naudojant Fisher Scientific Accumet 50 modelio pH-metrą su automatinio mėginio temperatūros kompensacija. Elektrodas buvo Orion Ross kombinuotas elektrodas su KCl lyginamuoju elektrodu. pH buvo nustatomas pagal įprastą dviejų taškų standartizaciją (pH 4,0, pH 7,0) pagal gamintojo nurodymus. Kiekvienas mėginys matuotas 3 kartus. pH reikšmės nustatytas dviejų reikšminių skaičių tikslumu ir paimtas jų vidurkis.

2. Pelių LD₅₀ veiksmingumo testas

LD₅₀ nustatyti buvo naudotos sveikos, nenaudotos bet kurios lyties CFW arba CD-1 pelės, sveriančios po 18-22 g. Kiekvienas išpilstytas produktas buvo tiriamas pelių teste imant 5 B tipo botulino toksino kompozicijos dozės. Kiekvienas bandymas kartojamas 5 kartus.

Iš tiriamojo mėginio buvo pagaminti du pradiniai tirpalai. Pradinis A tirpalas buvo gautas praskiedžiant tiriamąjį mėginį iki įvertinto 750 U/ml veiksmingumo želatininiu fosfatinu buferiu, pH 6,2. Pradinis B tirpalas buvo gautas praskiedžiant A tirpalą 10 kartų iki 75 U/ml. Pradinis B tirpalas praskiestas testavimui tokiu būdu: 1:7,5, 1:10, 1:13,5, 1:18 ir 1:24,3.

Pelėms buvo suleidžiama į pilvą po 0,2 ml atitinkamai praskiesto junginio. Po injekcijos pelės buvo laikomos 4 dienas, kasdien apžiūrint. Nugaišusių pelių neužregistruota. Stebėjimas po 4 dienų buvo nutrauktas.

Kumuliatyvinis mirtingumas (CD) esant skirtingiems praskiedimams buvo apskaičiuotass, pridedant mirties atvejų skaičių nuo maksimalaus praskiedimo didyn. Kumuliatyvinis išgyvenimas (CS) buvo skaičiuojamas pridedant išgyvenimo atvejų skaičių nuo minimalaus praskiedimo mažyn. %CD buvo apskaičiuotas kaip $CD/(CD+CS) \times 100$ % kiekvienam praskiedimui. Praskiedimas, atitinkantis LD₅₀, buvo nustytas pagal Reed ir Muench proporcinio atstumo (PD) metodą, naudojant praskiedimus, duodančius %CD reikšmes, kurios apriboja 50 % kumuliatyvinį mirtingumą.

$$\text{Proporcinis atstumas (PD)} = \frac{(\%CD > 50\%) - 50\%}{(\%CD > 50\%) - (\%CD < 50\%)}$$

Gauta PD reikšmė buvo padauginta iš skirtumo tarp praskiedimo lygių, kurie apriboja 50 % CD, logaritmo. Ši reikšmė buvo pridėta prie praskiedimo, duodančio didesnį už 50 mirtingumą (CD), logaritmo, gaunant LD₅₀ atitinkantį praskiedimą. Buvo apskaičiuotas šio praskiedimo antilogaritmas, gaunant toksino LD₅₀ vienetų skaičių injekcijos tūryje (0,2 ml). Tada šis skaičius buvo padaugintas iš 5, gaunant toksino LD₅₀ vienetų skaičių pradinio B tirpalo mililitre.

LD₅₀ vienetų skaičius pradinio B tirpalo mililitre buvo padaugintas iš jo praskiedimo daugiklio (t.y. praskiedimo, kurio reikia 75 U/ml įvertintam veiksmingumui gauti) ir gaunamas mėginio veiksmingumas. Iš 5 reikšminių testų buvo išskaičiuotas LD₅₀ vienetų mililitre aritmetinis vidurkis ir standartinis nukrypimas.

3. Kompozicijos išvaizda

Išvaizda buvo įvertinta vizualiai apžiūrint prieš juodą ir baltą foną ryškioje šviesoje, atsargiai pasukant. Buvo įvertinta spalva, skaidrumas ir matomų kietų dalelių buvimas.

3 pavyzdys: Kaklo distonijos (CD) gydymas

A. Vaisto praskiedimas, apskaičiavimas, suleidimas ir dozavimas

1. Vaisto paruošimas

Buvo užpildytos vaisto ampulės, kad būtų galima patiekti 2,0 ml (10000 U), 1,0 ml (5000 U) arba 0,5 ml (2500 U) nepraskiesto tiriamojo vaisto. Visose paruošimo stadijose buvo vengiama intensyvaus maišymo arba burbuliukų susidarymo, kadangi botulino toksinas gali denatūruotis šiomis sąlygomis. Kompozicijos buvo išimamos iš ampulės 1 ml talpos tuberkulino švirkštu, užtikrinant, kad yra paimtas tikslus tūris.

2. Vaisto apskaičiavimas

B tipo botulino toksinas buvo skiriamas kaklo distoniją (CD) turintiems pacientams, įvedant atitinkamos ampulės turinį, kad būtų gauta žemiau nurodyta dozė. Pelės vienetai (U) dozavimui apskaičiuojami taip, kad 1U yra dozėje esančio toksino kiekis, kuris atitinka 2 pavyzdyje aprašytu būdu nustatytą LD₅₀ bandyme su pelėmis.

Kievieno dozavimo metu B tipo botulino toksinas buvo įvedamas pagal standartines metodikas, kaip smulkiai aprašyta toliau. Junginio injekcijas darė gydytojas-neurologas, turintis botulino vartojimo patirtį CD sergantiems pacientams. Pacientai buvo prašomi kiek galima daugiau atsipalaiduoti, kad būtų palengvinamas galvos ir kaklo padėties stebėjimas ramybės metu. Buvo nustatyti raumenys, susiję su CD atsiradimu, ir patvirtinti paveiktų raumenų apčiupinėjimu. Raumenys, kuriuos nuspręsta gydyti pagal šią metodiką, buvo mentės keltukas, vidurinis ir priešakinis laiptinis raumuo, semispinalis pusketerinis galvinis raumuo, diržinis raumuo, galvos sukamasis ir trapecinis raumuo. Į kiekviemą iš šių raumenų 1-5 vietose buvo daromos injekcijos. Bendras injekcijos tūris vienai vietai buvo mažesnis arba lygus 1,0 ml, norint išvengti lokalinio raumenų iškraipymo, bet ne mažiau nei 0,1 ml, kad būtų lengviau paimti tikslų tūrį standartiniu 1 ml švirkštu. Iš pradžių pacientai gavo bendrą 5000 U dozę ir po to kitas dozes iki maždaug 15000 vienetų paskesnių apsilankymų klinikoje metu.

C. Kaklo distonijos (CD) klinikiniai tyrimai

1 tyrimas

Aštuoni pacientai (3 vyrai ir 5 moterys), kurių vidutinis amžius yra 43,9 metų ir individualios klinikinės diagnozės - idiopatinė CD, dalyvavo tyrime, kuriame B tipo botulino toksino kompozicija buvo leidžiama į 2-4 paviršinių kaklo ir/arba peties raumenų grupes. Pacientams vaistai buvo leidžiami kas 4 savaitės, jeigu nebuvo rimtų šalutinių poveikių arba pastovaus klinikinio pagerėjimo gydymo metu. Pacientai dalyvavo 1-5 dozavimo etapuose. Atskirų etapų dozės buvo nuo 100 U iki 1200 U, o kumuliatyvinės dozės buvo nuo 270 U iki 2280 U aukščiau aprašytos B tipo botulino toksino kompozicijos. Efektyvumas buvo vertinamas naudojant Tsui kreivakaklystės skalę (Tsui, J.K.C. (1986), *Lancet* 2: 245-247). Šiame tyrime pacientai dalyvavo 127-398 dienas, vidutinis laikas šiame tyrime buvo 244,8 dienos. Kreivakaklystės balų

skaičius buvo panašus bazinėje linijoje, ir visiems pacientams buvo stebimas nedidelis balų skaičiaus mažėjimas (mažėjimas = pagerėjimas) šiek tiek priklausomas nuo dozės, kai buvo lyginamos bendros dozės. Bendrai paėmus, pacientai patyrė kreivakaklystės būklės pagerėjimą. Šiame tyrime nebuvo pastebėta blokuojančių antikūnų atsiradimo.

2. 2 tyrimas

Šiame tyrime dalyvaujantys pacientai turėjo idiopatinės CD (kreivakaklystės) diagnozę ir jiems buvo atsiradęs rezistentiškumas A tipo botulino toksinui. Pacientai gavo šio išradimo B tipo botulino toksino kompozicijos intraraumenines injekcijas į 2-4 paviršinius kaklo ir peties raumenis.

Tyrimą pradėjo ir baigė 12 pacientų (amžiaus vidurkis 52,3 metai). Pacientai dalyvavo tyrime nuo 37 iki 127 dienų, o vidutinis laikas buvo 65 dienos. Pacientai buvo gydomi 1-3 tiriamojo vaisto dozėmis. Kumuliatyvinės dozės buvo 940-2100 U intervale, o atskiros dozės turėjo nuo 150 iki 1430 U B tipo botulino toksino. Vidutinis laiko tarpas tarp dozavimo etapų buvo 22,3 dienos pacientams, gaunantiems mažiausias dozes (iš viso 100-899 U), ir 48,5 dienos pacientams, gaunantiems didžiausias dozes (900-1500 U).

Klinikinė nauda buvo apibrėžta kaip mažiausiai 25 % balų skaičiaus pagal Toronto Western'o spazminės kreivakaklystės įvertinimo skalę (TWSTRS)-sunkumo skalę (Consky, E.S., Lang, A.E. (1994) In: *Therapy with Botulinum Toxin*, Jankovic, J. and Hallet M., eds. Marcel Dekker, Inc., New York) sumažėjimas, lyginant su bazine linija (sumažėjimas = pagerėjimas). Vidutinis balų skaičius bazinėje linijoje buvo panašus visiems pacientams. Balų skaičius pagal TWSTRS-sunkumo skalę sumažėjo 56 % didesnę dozę gavusių pacientų, lyginant su 7 % pacientų, buvusių mažesnių dozių grupėje. Abiejose grupėse buvo stebimas nedidelis pagerėjimas pagal TWSTRS-skausmo balų skaičių, ypač ankstyvose tyrimo fazėse. Šiems pacientams nebuvo nustatytas blokuojančių antikūnų B tipo botulino toksinui atsiradimas.

3. 3 tyrimas

Dvidešimt aštuoni pacientai (amžiaus vidurkis 50,9 metų) su patvirtinta kaklo distonijos diagnoze gavo B tipo botulino toksino kompozicijos injekcijas į

2-4 paviršinius kaklo ir peties raumenis vis didėjančiomis dozėmis (iki 1,5 karto sekančiame etape) laikui bėgant. Klinikinė nauda buvo įvertinta naudojant aukščiau aprašytą TWSTRS-sunkumo testą, kuriame 25 % balų skaičiaus sumažėjimas yra laikomas pagerėjimu.

Pacientai dalyvavo tyrime nuo 28 iki 177 dienų, o vidutinis tyrimo laikas buvo 71,9 dienos. Pacientai buvo gydomi 1-3 kompozicijos dozėmis. Kumuliatyvinės dozės buvo nuo 1430 U iki 12000 U, o atskiros - nuo 300 U iki 12000 U. Klinikinio įvertinimo tikslams buvo paimtos 4 dozių grupės: 100-800 U (A grupė), 900-2399 U (B grupė), 2400-5999 U (C grupė) ir 6000-12000 U (D grupė). Laiko tarpas tarp dozavimo etapų buvo toks: A grupėje 13-101 diena, vid. 35,7 dienos; B grupėje 14-113 dienų, vid. 48,8 dienos; C grupėje 29-177 dienos, vid. 62,2 dienos; D grupėje 28-177 dienos, vid. 55,1 dienos.

Vidutiniai bazinės linijos balai buvo panašūs visiems pacientams visose gydymo grupėse, ir visose 4 grupėse tyrimo metu buvo vidutinis balų skaičiaus sumažėjimas (pagerėjimas). Bendrai imant, tyrimo metu vidutinis procentinis pagerėjimas, lyginant su bazine linija, ir atsako santykio vidurkis pagal sunkumo balų skaičių buvo didesnis C ir D grupėse. Maksimalaus pagerėjimo vidurkio, maksimalaus procentinio pagerėjimo vidurkio ir maksimalaus atsako santykio vidurkio nustatyti dydžiai buvo didesni didesnių dozių grupėse, lyginant su mažesnių dozių grupėmis (8,1 ir 6,8, lyginant su 2,1 ir 3,6, maksimaliam pagerėjimui; 43,9 % ir 35,5 %, lyginant su 10 % ir 16,1 %, maksimalaus pagerėjimo vidurkiui; 0,32 ir 0,23, lyginant su 0,05 ir 0,09, maksimalaus atsako santykio vidurkiui). Pacientų, reaguojančių į gydymą, procentai buvo didesni abiejose didesnių dozių grupėse (C 80 % ir D 78 %) nei abiejų mažesnių dozių grupėse (A 0 % ir B 27 %). Vidutinė atsako trukmė buvo didesnė abiejose didesnių dozių grupėse (C 47,6 dienos; D 38,1 dienos) nei abiejose mažesnių dozių grupėse (A 0 dienų; B 31 diena). Šie duomenys rodo dozės-atsako priklausomybę šio išradimo B tipo botulino toksino kompozicijų atveju.

4. 4 tyrimas

B tipo botulino toksino kompozicijos trys dozės buvo tiriamos, lyginant su placebo eksperimente, kuris apėmė 85 pacientus, dalyvaujančius atsitiktiniame, dvigubai aklame, vienos dozės, 4 šakų, lygiagrečios grupės,

daugiacentriame tyrime. Pacientų amžius buvo nuo 18 iki 80 metų. Dozės buvo 400, 1200 arba 2400 U B tipo botulino toksino, leidžiamo į 2-4 paviršinių kaklo ir/arba peties raumenų grupes. Pacientai buvo įvertinami, naudojant TWSTRS balų skalę, atskaitant nuo bazinės linijos, praėjus 2 ir 4 savaitėms nuo gydymo pradžios. Pacientai, kurie po 4 savaičių neparodė 3 arba didesnio taškų skaičiaus pagerėjimo (≥ 20 %) TWSTRS-sunkumo skalėje, buvo pašalinti iš tyrimo kaip neduodantys atsako. Respondentai grįždavo įvertinimui kas 4 savaites, kol jų atsakas nukrito daugiau nei 50 %.

Visi TWSTRS balai rodė pagerėjimą didėjant B tipo botulino toksino kompozicijos dozei. Ketvirtą savaitę statistiškai patikimas pagerėjimas buvo pacientams 2400 U dozės grupėje, lyginant su placebo gydytais pacientais ir pagal TWSTRS-skausmo, ir pagal TWSTRS-bendrajį įvertinimus; pagerėjimą rodančių pacientų procentai buvo didesni 2400 U grupėje. Pacientų bendrojo įvertinimo vidurkis buvo daug didesnis 2400 U grupėje 2, 4 ir 8 savaitę, lyginant su bet kuria kita iš gydomų grupių; 4 savaičių duomenų variacinėje analizėje buvo statistiškai reikšmingas skirtumas ($p=0,0286$) tarp grupių. Reikšmingas skirtumas taip pat buvo tarp placebo ir 2400 U dozės grupės ($p = 0,0050$) bei dozės-atsako analizėje ($p = 0,0028$). Ketvirtos savaitės duomenų variacinėje analizėje buvo statistiškai reikšmingas ($p = 0,0073$) skirtumas tarp gydymo grupių, taip pat buvo reikšmingi skirtumai tarp placebo ir 2400 U dozės grupės ($p = 0,0015$) ir dozės-atsako analizėje ($p = 0,0008$).

Pacientai dalyvavo šiame tyrime nuo 25 iki 203 dienų; didesnis vidutinis dienų skaičius buvo 2400 U dozės grupėje (61 diena).

5. 5 tyrimas

Šis tyrimas taip pat buvo atsitiktinis, dvigubai aklas, kontroliuojamas pagal placebo, vienos dozės, 4 šakų, lygiagrečios grupės, daugiacentris ambulatorinis tyrimas, kuriame nagrinėjamas vienkartinės placebo dozės (A grupė) arba vienos iš trijų B tipo botulino toksino kompozicijos dozių (2400 U – B grupė; 5000 U – C grupė; 10000 U – D grupė), suleistų į 2-4 paviršinių kaklo ir/arba peties raumenų grupes pacientams, kuriems patvirtinta CD diagnozė, poveikis. Pacientai buvo įvertinami, atėjus jiems po 2 ir 4 savaičių nuo gydymo pradžios. Tie, kurie po 4 savaičių turėjo geresnį nei 20 %

pagerėjimą, lyginant su bazine linija (TWSTRS-bendrasis įvertinimas balais), buvo laikomi "respondentais" ir buvo prašomi ateiti įvertinimui kas 4 savaitės mažiausiai 4 mėnesius arba tol, kol jų atsako balų skaičius nukris daugiau nei 50 %.

Tyrime dalyvavo 122 pacientai, kurių amžius buvo 19-81 metai. Laikas, iki kol pacientai dalyvavo tyrime, atspindėjo laiką, kurį jie davė atsaką į tiriamąjį vaistą. Gydomo grupės buvo panašios pagal minimalų ir maksimalų skaičių dienų, per kurias pacientai dalyvavo tyrime. Tyrimo laiko vidurkis didėjo, didėjant dozei, nuo 45 dienų placebo A grupėje iki 61 dienos (B), 67 dienų (C) ir 75 dienų (D).

Pagal visus TWSTRS balus visose tyrimo grupėse 4 savaitę stebėtas pagerėjimas, lyginant su bazine linija. Ketvirtos savaitės TWSTRS-bendrujų balų skaičiaus kovariantinėje analizėje bendras skirtumas tarp gydymo grupių buvo statistiškai reikšmingas ($p = 0,0001$). Be to, dozės-atsako analizė buvo reikšminga ($p = 0,0001$) ir visi trys placebo palyginimai su aktyviomis grupėmis buvo reikšmingi ($p = 0,0016$ placebo lyginant su 2500 U; $p = 0,0005$ placebo lyginant su 5000 U; $p = 0,0001$ placebo lyginant su 10000 U). Pacientų, 4 savaitę davusių atsaką į gydymą, procentai buvo didesni D grupėje (10000 U), nei bet kurioje kitoje grupėje pagal TWSTRS-bendrajį, - negalios ir -skausmo balų skaičių. Dozė-atsakas buvo reikšmingas kiekvienam iš keturių TWSTRS balų skaičiavimų (bendrajam $p < 0,001$; sunkumo $p = 0,035$; negalios $p = 0,002$; skausmo $p = 0,001$). Skausmo duomenys pagerėjo visose gydytose grupėse 4 savaitę iki 67,5, 70,2 ir 75,1 atitinkamai B, C ir D grupėse. Bendri skirtumai tarp gydytų grupių buvo statistiškai reikšmingi ($p = 0,0049$), dozės-atsako analizė buvo statistiškai reikšminga ($p = 0,0017$) ir placebo palyginimai su visomis trimis aktyvaus gydymo grupėmis buvo reikšminga ($p = 0,0149$, $0,0084$ ir $0,0007$ atitinkamai B, C ir D grupėms, lyginant su placebo).

4 pavyzdys: Fiziologinis atsakas į B tipo botulino toksino kompoziciją bandyme su žmonėmis

Aštuoniolika sveikų subjektų buvo tiriami nustatant piršto trumpojo tiesiamojo raumens (EDB) M-bangos amplitudės atsaką į B tipo botulino

toksina, naudojant specialistams žinomus standartinius elektrofiziologinius metodus. Subjektų amžius buvo 18-22 metai. Elektrofiziologiniai tyrimai buvo atlikti 2, 4, 6, 9, 11, 13 ir 14 dieną po injekcijos, kurios dozės buvo nuo 1,25 U iki 480 U (i.m.) B tipo botulino toksino kompozicijos. Duomenų analizės rezultatai parodė nuo dozės priklausomą EDB M-bangos amplitudės ir ploto sumažėjimą didėjant dozei. Maksimalus efektas buvo 75 % M-bangos amplitudės sumažėjimas pagal bazinę liniją, esant 480 U dozei.

Atskirame tyrime dešimčiai subjektų atsitiktinai buvo suleista B tipo botulino toksino "B" kompozicijos dozė į vieną EDB ir "BOTOX®" (A tipo botulino toksino, "A") dozė į kitą EDB, naudojant vieną iš penkių skirtingų dozavimo schemų: 1,25 U A / 20 U B; 2,5 U A / 80 U B; 5 U A / 160 U B; 7,5 U A / 320 U B; 10 U A / 480 U B (po 2 subjektus kiekvienam dozių santykiui). Vienas kontrolinis subjektas gavo fiziologinio tirpalo injekciją į kiekvieną EDB raumenį. M-bangos amplitudės ir ploto mažėjimo greitis buvo panašus abiem raumenims, o maksimalus efektas pasirodė praėjus maždaug 6 dienoms po injekcijos. Abu serotipai rodė nuo dozės priklausantį M-bangos amplitudės sumažėjimą. Palengvėjimas po pratimų buvo didžiausias 9 dieną abiejų naudotų toksino tipų atveju.

Nors šis išradimas buvo aprašytas remiantis konkrečiais metodais ir įgyvendinimo variantais, turėtų būti suprantama, kad gali būti padarytos įvairios modifikacijos ir pakeitimai, nenukrypstant nuo išradimo.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Stabili skysta farmacinė botulino toksino kompozicija, besiskirianti tuo, kad į ją įeina farmaciškai priimtinas buferis, galintis duoti buferinį pH intervalą tarp pH 5 ir pH 6, ir

išskirtas botulino toksinas;

ši kompozicija yra stabili skystoje formoje mažiausiai vienerius metus 0-10 °C temperatūroje.

2. Kompozicija pagal 1 punktą, besiskirianti tuo, kad minėta temperatūra yra 5 ± 3 °C.

3. Kompozicija pagal 1 punktą, besiskirianti tuo, kad minėta temperatūra yra 4 ± 2 °C.

4. Kompozicija pagal bet kurį iš 1-3 punktų, besiskirianti tuo, kad minėtas buferis turi pK 4,5-6,5 pH vienetų intervale.

5. Kompozicija pagal bet kurį iš 1-4 punktų, besiskirianti tuo, kad minėta toksino kompozicija yra stabili skystoje formoje mažiausiai dvejus metus.

6. Kompozicija pagal bet kurį iš 1-5 punktų, besiskirianti tuo, kad minėtas buferinis pH intervalas yra pH $5,6 \pm 0,2$.

7. Kompozicija pagal bet kurį iš 1-6 punktų, besiskirianti tuo, kad minėtą buferį pasirenka iš grupės, susidedančios iš fosfatinio buferio, fosfatinio-citratinio buferio ir sukcinatinio buferio.

8. Kompozicija pagal bet kurį iš 1-7 punktų, besiskirianti tuo, kad botulino toksinas yra botulino toksino serotipas, pasirinktas iš grupės, susidedančios iš A, B, C₁, C₂, D, E, F ir G serotipų.

9. Kompozicija pagal 8 punktą, besiskirianti tuo, kad botulino toksinas yra B tipo botulino toksinas, kurio koncentracija yra 100-20000 U/ml ribose.

10. Kompozicija pagal 9 punktą, besiskirianti tuo, kad minėto B tipo botulino toksino koncentracija yra 1000-5000 U/ml ribose.

11. Kompozicija pagal 9 arba 10 punktą, besiskirianti tuo, kad minėtas B tipo botulino toksinas yra maždaug 700 kilodaltonų (kD) didelės molekulinės masės komplekse.

12. Kompozicija pagal 8 punktą, besiskirianti tuo, kad botulino toksinas yra A tipo botulino toksinas, kurio koncentracija yra 20-2000 U/ml ribose.

13. Kompozicija pagal 12 punktą, besiskirianti tuo, kad minėto A tipo botulino toksino koncentracija yra 100-1000 U/ml ribose.

14. Kompozicija pagal bet kurį iš 1-13 punktų, besiskirianti tuo, kad į ją įeina dar ir pagalbinis baltymas.

15. Kompozicija pagal 14 punktą, besiskirianti tuo, kad minėtą pagalbinį baltymą pasirenka iš grupės, susidedančios iš serumo albumino, rekombinantinio žmogaus serumo albumino ir želatinos.

16. Stabili skysta farmacinė botulino toksino kompozicija, besiskirianti tuo, kad į ją įeina farmaciškai priimtinas skystas buferis, galintis duoti buferinį pH intervalą tarp pH 5 ir pH 6, ir

išskirtas botulino toksinas;

ši toksino kompozicija yra stabili skystoje formoje mažiausiai 6 mėnesius 10-30 °C temperatūroje.

17. Kompozicija pagal 16 punktą, besiskirianti tuo, kad minėta temperatūra yra apie 25 °C.

18. Kompozicija pagal bet kurį iš 16-17 punktų, besiskirianti tuo, kad minėtas buferis turi pK 4,5-6,5 pH vienetų intervale.

19. Kompozicija pagal bet kurį iš 16-18 punktų, besiskirianti tuo, kad minėtą buferį pasirenka iš grupės, susidedančios iš fosfatinio buferio, fosfatinio-citratinio buferio ir sukcinatinio buferio.

20. Kompozicija pagal bet kurį iš 16-19 punktų, besiskirianti tuo, kad minėtas buferinis pH intervalas yra pH 5,6±0,2.

21. Kompozicija pagal bet kurį iš 16-20 punktų, besiskirianti tuo, kad botulino toksinas yra botulino toksino serotipas, pasirinktas iš grupės, susidedančios iš A, B, C₁, C₂, D, E, F ir G serotipų.

22. Kompozicija pagal 21 punktą, besiskirianti tuo, kad botulino toksinas yra B tipo botulino toksinas, kurio koncentracija yra 100-20000 U/ml.

23. Kompozicija pagal 22 punktą, besiskirianti tuo, kad minėto B tipo botulino toksino koncentracija yra 1000-5000 U/ml ribose.

24. Kompozicija pagal 22 arba 23 punktą, besiskirianti tuo, kad minėtas B tipo botulino toksinas yra maždaug 700 kD didelės molekulinės masės komplekse.

25. Kompozicija pagal 21 punktą, besiskirianti tuo, kad botulino toksinas yra A tipo botulino toksinas, kurio koncentracija yra 20-2000 U/ml ribose.

26. Kompozicija pagal 25 punktą, besiskirianti tuo, kad minėto A tipo botulino toksino koncentracija yra 100-1000 U/ml ribose.

27. Kompozicija pagal bet kurį iš 16-26 punktų, besiskirianti tuo, kad į ją įeina dar ir pagalbinis baltymas.

28. Kompozicija pagal 27 punktą, besiskirianti tuo, kad minėtą baltymą pasirenka iš grupės, susidedančios iš serumo albumino, žmogaus serumo albumino ir želatinos.

29. Stabilios skystos botulino toksino kompozicijos pagal bet kurį iš 1-28 punktų panaudojimas vaisto, skirto gydyti pacientui, kuriam reikia inhibuoti cholinerginę transmisiją į pasirinktą raumenį, raumenų grupę, liauką arba organą, gamyboje.

30. Panaudojimas pagal 29 punktą, besiskiriantis tuo, kad minėtas pacientas kenčia nuo sutrikimo, pasirinkto iš grupės, susidedančios iš spazmų, vokų mėšlungio, žvairumo, pusės veido spazmos, distonijos, vidinio ausies uždegimo, spazminio kolito, anizmo, šlapimo išleidimo sfinkterio sinergijos sutrikimo, žandikaulių suspaudimo ir stuburo iškreipimo.

31. Panaudojimas pagal 30 punktą, besiskiriantis tuo, kad minėtas pacientas kenčia nuo spazmų, atsiradusių dėl vienos arba daugiau priežasčių iš grupės, susidedančios iš paralyžiaus, stuburo smegenų pažeidimo, uždaros galvos traumos, cerebrinio paralyžiaus, išsėtinės sklerozės ir Parkinsono ligos.

32. Panaudojimas pagal 30 punktą, besiskiriantis tuo, kad minėtas pacientas kenčia nuo distonijos, pasirinktos iš grupės, susidedančios iš spazminės kreivakaklystės (kaklo distonijos), spazminės disfonijos, galūnės distonijos, gerklų distonijos ir burnos ir apatinio žandikaulio (Meig'o) distonijos.

33. Panaudojimas pagal 29 punktą, besiskiriantis tuo, kad minėtas pasirinktas raumuo arba raumenų grupė sukelia raukšles arba surauktus antakius.

34. Panaudojimas pagal 29 punktą, besiskiriantis tuo, kad minėtas pasirinktas raumuo yra tarpvietės raumuo, o minėta pacientė gimdo vaiką.

35. Panaudojimas pagal 29 punktą, besiskiriantis tuo, kad minėtas pacientas kenčia nuo būklės, pasirinktos iš grupės, susidedančios iš miofascitinio skausmo, su migrena susijusio galvos skausmo, gyslų pakenkimų, neuralgijos, neuropatijos, artritinio skausmo, nugaros skausmo, hiperhidrozės, rinorėjos, astmos, gausaus seilių išsiskyrimo ir gausios skrandžio rūgšties sekrecijos.

36. Panaudojimas pagal bet kurį iš 29-35 punktų, besiskiriantis tuo, kad minėtas pacientas yra rezistentiškas A tipo botulino toksinui, o minėtas botulino toksinas minėtoje kompozicijoje yra pasirinktas iš grupės, susidedančios iš botulino toksino B, C₁, C₂, D, E, F ir G serotipų.

37. Panaudojimas pagal 36 punktą, besiskiriantis tuo, kad minėtas botulino toksinas minėtoje kompozicijoje yra B tipo botulino toksinas.

38. Panaudojimas pagal bet kurį iš 29-35 punktų, besiskiriantis tuo, kad minėtas pacientas yra rezistentiškas B tipo botulino toksinui, o minėtas botulino toksinas minėtoje kompozicijoje yra pasirinktas iš grupės, susidedančios iš botulino toksino A, C₁, C₂, D, E, F ir G serotipų.

39. Panaudojimas pagal 38 punktą, besiskiriantis tuo, kad minėtas botulino toksinas minėtoje kompozicijoje yra A tipo botulino toksinas.