

ÖZET**BOTULİNUM NÖROTOKSİN İÇEREN FARMASÖTİK BİLEŞİMLER**

Buluş, botulinum nörotoksin kompleksi (tip A, B, C, D, E, F veya G) veya yüksek saflıkta botulinum nörotoksini (tip A, B, C, D, E, F veya G) ve bir sürfaktan içeren katı veya sıvı bir farmasötik bileşim ile ilgilidir. Buluş özellik ile, bir kristalin ajan içeren katı veya sıvı bir farmasötik bileşim ile ilgilidir.

İSTEMLER

1. Bir sıvı farmasötik bileşim aşağıdakileri içerir:

- a) botulinum nörotoksin kompleksi (tip A, B, C, D, E, F veya G) veya yüksek saflıkta botulinum nörotoksin (tip A, B, C, D, E, F veya G),
- b) stabilize edici bir ajan olarak iyonik olmayan bir sürfaktan,
- c) pH 'ın 5.5 ila 7.5 arasında korunduğu bir tampon madde, ve
- d) su,

içerisindeki söz konusu farmasötik bileşimin albümin içermez.

2. İstem 1 'e uygun sıvı bir farmasötik bileşim olup, içerisindeki tampon madde 5.8 ila 7.0 arasında pH derecesinde korunur.

3. İstem 1 veya 2 'ye uygun bir sıvı farmasötik bileşim olup, ayrıca bir kristalin ajan içerir.

4. İstem 3 'e uygun sıvı bir farmasötik bileşim olup, içerisindeki kristalin ajan sodyum klorürdür.

5. İstem 1 ila 4 'ten herhangi birine uygun sıvı bir farmasötik bileşim olup, ayrıca bir disakkarit içerir.

6. İstem 5 'e uygun sıvı bir farmasötik bileşim olup, içerisindeki disakkarit sükroz, trehaloz, laktoz ve manitol içeren grup içerisinde seçilir.

7. İstem 1 ila 6 'dan herhangi birine uygun sıvı bir farmasötik bileşim olup, botulinum nörotoksin kompleksi tip A içerir.

8. İstem 1 ila 6 'dan herhangi birine uygun sıvı bir farmasötik bileşim olup, yüksek saflıkta botulinum nörotoksin tip A içerir.

9. İstem 1 ila 8 'den herhangi birine uygun sıvı bir farmasötik bileşim olup, burada söz konusu iyonik olmayan sürfaktan polisorbattar ve bloke kopolimerlerden seçilir.

10. İstem 9 'a uygun sıvı bir farmasötik bileşim olup, burada söz konusu iyonik olmayan sürfaktan bir polisorbit 80 veya bir poloksamerdir.

11. İstem 1 ila 10 'dan herhangi birine uygun sıvı bir farmasötik bileşim olup, tampon maddesinin konsantrasyonunun 1 ila 50 mM, daha tercihli bir şekilde, 5 ila 20 mM, belirgin şekilde, yaklaşık 10 mM 'dir,

12. İstem 1 ila 11 'den herhangi birine uygun sıvı bir farmasötik bileşim olup, tedavide kullanım içindir.

13. İstem 12 'ye uygun olarak kullanım için sıvı bir farmasötik bileşim olup, burada söz konusu kullanım, oftalmolojik bozuklukların, hareket bozuklukların, otorinolaringolojik bozuklukları, gastrointestinal bozukluklar, ürojenital bozukluklar, dermatolojik bozuklukların, ağrı rahatsızlıkların, enflamatuvar bozuklukların, salgılama bozuklukların, solunum rahatsızlıkların, hipertrofik bozuklukların, eklem hastalıkların, endokrin bozuklukların, otoimmün hastalıkların, proliferatif hastalıkların ve travmatik yaralanmaların tedavisi içindir.

14. İstem 1 ila 11 'den herhangi birine uygun sıvı bir farmasötik bileşimin, kozmetik bir tedavide kullanılmasıdır.

15. İstem 1 ila 11 'den herhangi birine uygun sıvı bir farmasötik bileşim olup, veterinerlik amaçlı kullanım içindir.

5

10

15

20

25

30

TARİFNAME

BOTULİNUM NÖROTOKSİN İÇEREN FARMASÖTİK BİLEŞİMLER

Buluş, botulinum nörotoksin ihtiva eden bir farmasötik bileşim ile ilgilidir.

Günümüzde en çok kullanılan botulinum nörotoksin, botulinum nörotoksin tip A 'dır. Bu nörotoksin, Clostridium botulinum türlerinin varlığındaki fermentasyon esnasında üretilir. Botulinum nörotoksin tip A kompleksleri (ki, bunlar botulinum nörotoksin tip A 'yı ve en azından toksik olmayan diğer bir proteini içerirler), modern tıpta yaygın olarak kullanılan etkin ilkelerdir. Bu gibi bir kompleks temeline dayalı bir farmasötik bileşime bir örnek, başvuru sahibi şirket tarafından şu anda satılmakta olan Dysport® ürünüdür. Bir botulinum nörotoksin tip A kompleksi için kullanılabilecek olan en yaygın tıbbi endikasyonları arasında, migren gibi diğer rahatsızlıkların yanı sıra, bir dizi kas rahatsızlıklarının (örneğin, blefarospazm, hemifasyal spazm, tortikollis, spastisite, stres kaynaklı baş ağrısı, sırt ağrısı veya kırışıklıklar gibi) tedavisinde birinden bahsedilebilir. Alternatif olarak, yüksek saflıktaki botulinum toksin (yani, kendini kompleks yapan, toksik olmayan proteinleri içermeyen botulinum nörotoksin), PCT başvuruları WO 96/11699 veya WO 97/35604 patent yayın belgelerinde açıklandığı gibi, ilgili botulinum toksin kompleksi ile yer değiştirebilir.

Şu anda, piyasada bulunan botulinum nörotoksin bileşimleri, insan serumu albümini içerir. Bunun ile birlikte, albümine dair bazı endişeler ifade edilmiştir (örneğin, PCT başvurusu WO 01/58472 patent yayın belgesine bakınız). Bu neden ile, ilaç sanayi, şu anda farmasötik bileşimler içerisindeki diğer stabilize edici ajanlar tarafından albümine karşı alternatif stabilize edici ajanlar bulunmasını göz önünde bulundurmaktadır.

Olası bir çözüm, WO 01/58472 sayılı PCT patent başvurusunda açıklanmıştır. Bu dokümanda, albümin, bir polisakkarit ile yani, botulinum nörotoksin bileşimi içerisinde stabilizör rolü oynayan, ikiden daha fazla sayıda sakkarit molekülü monomerlerinden oluşan bir polimer ile yer değiştirilmiştir.

Alternatif bir çözüm, WO 97/35604 sayılı PCT patent başvurusunda veya ABD patentleri No. 5,512,547 ve 5,756,468 yayın belgelerinde tarif edilmiş olandır. Bu dokümanlarda, saf botulinum nörotoksin (yani, kendini kompleks yapan, toksik olmayan proteinleri içermeyen botulinum nörotoksin) trehaloz tarafından stabilize edilebileceği açıklanmaktadır.

ABD patent başvurusu 2003/224020, fosfatidil kolin lipomozomları, laktoz, sodyum klorür ve tip A botulinum nörotoksinin liyofilize edilmiş bir formülasyonundan hazırlanan stabil farmasötik preparatlar açıklanmaktadır. ABD patent başvurusu 2003/138437 'de, stabilize edici ajan heta nişasta veya bir amino asit veya bunların bir bileşiminin belirgin şekilde

kullanıldığı, tercihli bir şekilde albümin içermeyen, stabil liyofilize edilmiş botulinum nörotoksin farmasötik bileşimleri önerilmektedir.

Başvuru sahibi, beklenmedik şekilde, botulinum nörotoksin bileşimleri içerisinde, albümini, PCT patent başvurusu WO01/58472 'deki polisakkariti veya PCT başvurusu WO 97/35604 'teki trehalozun yer değiştirilmesinde, bir sürfaktanın (yüzey aktif madde) yeterli stabilize edici etkilere sahip olduğunu keşfetmiştir.

Bu neden ile buluş, aktif madde olarak bir botulinum toksin içeren bir sıvı farmasötik bileşimin stabilize edilmesi için bir sürfaktanın kullanılması ile ilgilidir.

Botulinum toksin ile, doğal olarak ortaya çıkan botulinum toksin ya da rekombinant olarak üretilmiş herhangi bir botulinum toksin anlaşılmalıdır.

Doğal olarak ortaya çıkan botulinum toksin ile, ya Clostridium spp 'den türetilmiş yüksek saflıkta bir botulinum nörotoksin ya da Clostridium spp 'den türetilmiş bir botulinum nörotoksin kompleksi anlaşılmalıdır.

Mevcut başvuru ile yüksek saflıkta botulinum nörotoksin (tip A, B, C, D, E, F veya G) ile, en az bir protein içeren, komplekslerin dışında olan botulinum nörotoksin (tip A, B, C, D, E, F veya G) kastedilmektedir. Başka bir deyiş ile, yüksek saflıkta bir botulinum nörotoksin (tip A, B, C, D, E, F veya G), botulinum nörotoksinde (tip A, B, C, D, E, F veya G) başka, türetilmiş herhangi bir diğer Clostridium spp 'nin önemli denilebilecek miktarını içermez.

Mevcut buluşa göre, tercihli bir şekilde, botulinum nörotoksin kompleksleri ve yüksek saflıkta botulinum nörotoksinleri, botulinum nörotoksin kompleksi ve A tipi yüksek saflıkta botulinum nörotoksin, botulinum nörotoksin ve B tipi yüksek saflıkta botulinum nörotoksin ve botulinum nörotoksin ve F tipi yüksek saflıkta botulinum nörotoksin içeren grup içerisinde seçilir. Daha tercihli bir şekilde, botulinum nörotoksin kompleksleri ve yüksek saflıkta botulinum nörotoksinleri, botulinum nörotoksin kompleksi ve A tipi yüksek saflıkta botulinum nörotoksin ve botulinum nörotoksin ile F tipi yüksek saflıkta botulinum nörotoksin içeren grup içerisinde seçilir. Daha özel olarak, botulinum nörotoksin kompleksleri ve yüksek saflıkta botulinum nörotoksinleri, botulinum nörotoksin kompleksleri ve A tipi yüksek saflıkta botulinum nörotoksinleri olacaktır.

A tipi botulinum nörotoksin ile, A tipi herhangi bir botulinum toksini ve belirgin şekilde, A1, A2 veya A3 tipi botulinum nörotoksinler anlaşılmalıdır. Aynı durum, gerekli değişiklikler yapılarak, diğer serotip toksinlere de uygulanır.

Buluşa uygun olarak kullanılan veya yukarıda tarif edilmiş olan farmasötik bileşimler içerisinde bulunan yüksek saflıkta botulinum nörotoksin (tip A, B, C, D, E, F veya G), örneğin, Microbiology and Immunology 'de (1995), 195. sayı, sayfa 151-154, Güncel Konular

bahsinde izah edildiği gibi, ilgili botulinum nörotoksin kompleksinden kolaylık ile elde edilebilir. Yüksek saflıkta Clostridium botulinum toksin (tip A, B, C, D, E, F veya G), (örneğin, Clostridium Botulinum içeren ve fermantasyona bırakılan, zenginleştirilmiş et ortamı suyu - bu su ortamı, örneğin, Microbiology and Immunology (1995) Güncel Konular, 195, sayfa 150, 5 “Mikrobiyal gıda toksikantları. Clostridium botulinum toksinleri. Biyolojik menşeli olup gıdalardan gelen hastalıklar CRC el kitabı”, CRC Boca Raton, sayfa 25 - 26 'da tarif edilmiş olanlardan biri olabilir) yeterli bir fermantasyon ortamının saflaştırılması yolu ile elde edilir. Mevcut buluşa uygun olarak, bir bileşim içerisinde yüksek saflıkta botulinum nörotoksini içerildiğinde, toksinin saflık derecesi, tercihli bir şekilde % 80 'den daha yüksek, daha tercihli 10 bir şekilde % 90 veya 95 'ten daha yüksek ve daha da tercih edilen bir durumda ise, % 98 veya % 99 'dan daha yüksek olmalıdır. Örneğin, mevcut başvuruda tarif edilen saflık testi kullanılarak değerlendirme yapılabilir.

Şu andaki buluş, içerisindeki, söz konusu farmasötik bileşimin albümin içermediği:

- (a) bir botulinum nörotoksin kompleksini (tip A,B, C, D, E, F veya G) veya yüksek saflıkta 15 botulinum nörotoksini (tip A, B, C, D, E, F veya G),
- (b) stabilize edici ajan olarak bir iyonik olmayan sürfaktanı,
- (c) pH 'ın 5.5 ila 7.5 arasında korunduğu bir tampon maddesi, ve
- (d) suyu, içeren sıvı bir farmasötik bileşim ile ilgilidir.

buluşun diğer bir özel çeşidine uygun olarak, sıvı farmasötik bileşim, esas itibarı ile, 20 içerisindeki söz konusu farmasötik bileşimin albümin içermediği:

- (a) bir botulinum nörotoksin kompleksi (tip A, B, C, D, E, F veya G) veya yüksek saflıkta botulinum nörotoksinden (tip A, B, C, D, E, F veya G),
- (b) stabilize edici bir ajan olarak iyonik olmayan bir sürfaktandan,
- (c) 5.5 ila 7.5 arasında pH 'ın korunduğu bir tampon maddesinden, ve 25
- (d) sudan oluşur.

Yukarıda söz konusu bileşimler içerisinde, sürfaktanlar botulinum toksini stabilize eder şekilde olacaktır.

Katı bir farmasötik bileşim, daha önce bahsedildiği gibi, (a) 'dan (c) 'ye kadar olan bileşenleri içeren bir steril su çözeltisinin liyofilize edilmesi vasıtası ile elde edilebilir. Buluşa göre sıvı bir 30 farmasötik bileşim, (a) 'dan (c) 'ye kadar olan bileşenlerin steril su ile katı (yani liyofilize edilmiş) karışımının karıştırılması yolu ile elde edilir.

Liyofilize olacak çözelti içerisindeki, (a) 'dan (c) 'ye kadar olan söz konusu bileşenlerin konsantrasyonları veya sıvı farmasötik bileşim, tercihli bir şekilde aşağıdaki gibi olacaktır:

çözelti, botulinum nörotoksin kompleksinin (tip A, B, C, D, E, F veya G) veya yüksek saflıktaki botulinum nörotoksinin (tip A, B, C, D, E, F veya G) çözeltinin beher litresi başına 50 ila 10,000 LD50 ünite içerecektir, tercihli bir şekilde, botulinum nörotoksin kompleksinin (tip A, B, C, D, E, F veya G) veya yüksek saflıkta botulinum nörotoksinin (tip A, B, C, D, E, F veya G) çözelti beher ml başına 50 ila 3,000 LD50 ünite içerecektir, daha tercihli bir şekilde, botulinum nörotoksin kompleksinin (tip A, B, C, D, E, F, veya G) veya yüksek saflıkta botulinum nörotoksinin (tip A, B, C, D, E, F veya G) çözelti beher ml başına 100 ila 2,500 LD50 ünite, ve en çok tercihli bir şekilde, botulinum nörotoksin kompleksinin (tip A, B, C, D, E, F veya G) veya yüksek saflıkta botulinum nörotoksinin (tip A, B, C, D, E, F veya G) çözeltinin beher ml başına 100 ila 2,000 LD50 ünitesi içerir;

sürfaktanın konsantrasyonu, h/h (hacim/hacim) olarak kritik miseller konsantrasyonunun üzerinden % 1 'lik bir konsantrasyona ve belirgin şekilde, 80 polisorbit olması durumunda h/h olarak % 0.005 ila % 0.02 civarında olacaktır. Sürfaktan, iyonik olmayan bir sürfaktan olacaktır. İyonik olmayan sürfaktanlar, arasında özellik ile polikarbonatları ve poloksamerler (örneğin, polietilen veya propilen glikolün kopolimerleri) gibi blok kopolimerleri içerir. Buluşun tercih edilen bir çeşitlemesine uygun olarak, sürfaktan, bir polisorbit olacaktır. Daha tercihli bir şekilde, şu andaki buluşa uygun olarak bir bileşim içerisinde yer alan bir polisorbit, 20 ila 100 monomer ünitesi (tercihli bir şekilde yaklaşık 80) ortalama bir polimerizasyon değerine sahip olacaktır ve örneğin polisorbit 80 olabilir. Tercihli bir şekilde, polisorbit aynı zamanda, bitkisel türevli olmalıdır;

tampon maddenin konsantrasyonu 1 ila 50 mM, daha tercihli bir şekilde, 5 ila 20 mM, belirgin şekilde 10 mM dolayına olacaktır. Tampon madde, yeterli pH 'ın korunmasını sağlayabilecek herhangi bir tampon madde olabilir. Buluşa uygun olarak, bileşimler için tampon madde, tercihli bir şekilde, suksinat ve amino asit benzeri histidinden oluşan bir grup içerisinde seçilecektir. Tampon madde, özellik ile histidin olacaktır. Tercihli bir şekilde, pH, en azından 5.5 veya 5.8 'e eşit olacak ve en çok tercihli bir şekilde ise en azından 6.0 veya 6.5 'e eşit olacaktır. Keza, tercihli bir şekilde pH, 7.5 veya 7.0 'a eşit veya daha az olacak, daha tercihli bir şekilde ise 6.8 'e eşit veya daha az olacaktır.

Tercih edilen bir uygulama moduna uygun olarak, katı veya sıvı farmasötik bileşim, aynı zamanda bir kristalin ajanı da içerecektir.

Kristalin ajan vasıtası ile, diğerlerinin yanı sıra, bir liyofilize olmuş botulinum nörotoksin kompleksine (tip A, B, C, D, E, F veya G) ya da yüksek saflıkta bir botulinum nörotoksine (tip

A, B, C, D, E, F veya G) mekanik olarak güçlü bir pasta / hamur yapısı sağlayan bir ajan kastedilmektedir. Kristalin ajanlar göz çarpar biçimde sodyum klorür içerirler. Önceki teknikte öğretmenin aksine (bakınız, örneğin, Goodnough, M.C. ve Johnson, E.A., Applied and Environmental Microbiology (1992), 58(10), 3426 - 3428), bu tür bileşimler için sodyum klorürün kullanılması ayrıca, botulinum toksin bileşiminin stabilliğini de geliştirir.

Katı veya sıvı farmasötik bileşim tercihli bir şekilde bir disakkarit içerebilir.

Buluşa göre bileşimlerin içerisinde kullanılan disakkarit, tercihli bir şekilde sukroz, trehaloz, manitol ve laktozdan oluşan grup içerisinden seçilebilir. Buluşa göre bileşimlerin içerisinde kullanılan disakkarit, daha tercihli bir şekilde sukroz ve trehalozdan oluşan grup içerisinden seçilebilir. Buluşa göre bileşimler içerisinde kullanılan disakkarit, özellik ile, sukroz olacaktır. Disakkarit, tercihli bir şekilde şu andaki farmasötik bileşimleri içerisinde tercihli bir şekilde var olacaktır.

Mevcut buluş, dolayısı ile, içerisinde söz konusu farmasötik bileşimin albümin içermediği:

(a) botulinum nörotoksin kompleksi (tip A, B, C, D, E, F veya G) veya yüksek saflıkta botulinum nörotoksin (tip A, B, C, D, E, F veya G),

(b) stabilize edici ajan olarak iyonik olmayan bir sürfaktan,

(c) bir kristalin ajan,

(d) pH 'ın 5.5 ila 7.5 arasında tutulduğu bir tampon madde, ve

(e) su,

içeren bir sıvı farmasötik bileşim ile özellik ile ilgili olabilir.

Mevcut buluşa göre, farmasötik bileşimler içerisine tercihli bir şekilde bir de disakkarit dâhil edilecektir.

Bu çeşitlemeye göre, katı bir farmasötik bileşim, daha önce bahsedildiği gibi, (a) 'dan (d) 'ye kadar olan bileşenleri içeren bir steril su çözeltisinin liyofilize edilmesi vasıtası ile elde edilebilir. Buluşa göre, bir sıvı farmasötik bileşim, (a) 'dan (d) 'ye kadar olan söz konusu bileşenlerin steril su ile katı (yani liyofilize edilmiş) karışımının karıştırılması yolu ile elde edilecektir.

Liyofilize edilecek çözelti veya sıvı farmasötik bileşim içerisindeki (a) 'dan (d) 'ye kadar olan söz konusu bileşenlerin konsantrasyonu tercihli bir şekilde aşağıdaki gibi olacaktır:

çözelti, botulinum nörotoksin kompleksinin (tip A, B, C, D, E, F veya G) veya yüksek saflıkta botulinum nörotoksinin (tip A, B, C, D, E, F veya G), çözeltinin beher ml 'si başına 50 ila 10,000 LD50 ünite içerecektir; tercihli bir şekilde botulinum nörotoksin kompleksinin (tip A, B, C, D, E, F veya G) veya yüksek saflıkta botulinum nörotoksinin

(tip A, B, C, D, E, F veya G), çözeltinin beher ml 'si başına 50 ila 3,000 LD50 ünite, daha tercihli bir şekilde, botulinum nörotoksin kompleksinin (tip A, B, C, D, E, F veya G) veya yüksek saflıkta botulinum nörotoksinin (tip A, B, C, D, E, F veya G), çözeltinin beher ml 'si başına 100 ila 2,500 LD50 ünite ve en çok tercihli bir şekilde ise, botulinum nörotoksin kompleksinin (tip A, B, C, D, E, F veya G) veya yüksek saflıkta botulinum nörotoksinin (tip A, B, C, D, E, F veya G), çözeltinin beher ml 'si başına 100 ila 2,000 LD50 ünite [çözelti içerecektir];

sürfaktanın konsantrasyonu, h/h olarak kritik misel konsantrasyonunun üzerinden % 1 'lik bir konsantrasyona ve belirgin şekilde, 80 polisorbata olması durumunda h/h olarak yaklaşık % 0.005 ila % 0.02 olacaktır.

kristalin ajan konsantrasyonu, 0.1 ila 0.5 M 'e kadar, daha tercihli bir şekilde, 0.1 'den 0.4 M 'e kadar, daha belirgin şekilde yaklaşık 0.15 ila 0.3 M olacaktır ve

tampon madde konsantrasyonu, 1 'den 50 mM 'e kadar, daha tercihli bir şekilde 5 'ten 20 mM 'e, daha belirgin bir şekilde yaklaşık 10 mM olacaktır.

Daha öncede bahsedildiği gibi, buluşa göre farmasötik formülasyon, bir disakkarit içerebilir. Öyle bir durumda, liyofilize edilecek çözelti, sıvı farmasötik bileşim içerisindeki disakkaritin konsantrasyonu, örneğin, 5 'ten 50 mM 'e kadar, tercihli bir şekilde, 5 'ten 25 mM 'e kadar, daha tercihli bir şekilde 10 'dan 20 mM 'e kadar ve daha belirgin bir şekilde yaklaşık 11.7 mM olacaktır.

Farmasötik bileşimin farklı bileşenlerinin karışımı (yani, botulinum nörotoksin kompleksi (tip A, B, C, D, E, F veya G) veya yüksek saflıkta botulinum nörotoksin (tip A, B, C, D, E, F veya G), sürfaktan, tampon madde ve isteğe bağlı (kristalin ajan veya disakkarit gibi) ara maddeler liyofilize edilebilir. Bu şekilde elde edilmiş olan katı bileşimler, tercihli bir şekilde en azından 12 ay için, daha tercihli bir şekilde en azından 18 ay ve özellik ile daha tercih edilen durumda, en azından 24 ay veya hatta 36 ay içerisinde stabil olmalıdır.

Buluşa göre bir bileşim, eğer başlangıçtaki toksisitesinin en azından % 70 'i, farelerde LD50 değerlendirmesi ile veya LD50 fare deneyine ilişkin olarak doğrulanmış herhangi bir yöntem ile (yani, kendi sonuçlarının LD50 ünitelerine dönüştürülmesine imkân veren bir yöntem ile), belirli bir zaman süresi boyunca, söz konusu bu zaman süresinin bitiminde (LD50 fare deneyine ilişkin "fare toksisitesi deneyi" başlıklı kısım), bu değeri koruyor ise, stabil olarak göz önüne alınır. Buluşa göre farmasötik bileşimler, aşağıdakiler arasından seçilen bir hastalığın / durumun / sendromun tedavi edilmesi maksatlı ilaçların hazırlanmasında kullanılabilir:

- blefarospazm (göz / göz kapağı seğirmesi), strabismus (şaşıklık) (kısıtlayıcı ve miyojenik şaşılık dâhil), ambliyopi (görme yitimi), osilopsi (dalgalı görme), koruyucu

pitoz, kornea koruması maksatlı törapötik pitoz, nistagmus (gözün sağa sola titremesi), estropi, diplopi, entropion (göz kapağının içe kıvrıklığı), göz kapağı çekilmesi, orbital miyopati, heterofori, aynı anda birden fazla düzensizlik, aynı anda olmayan birden fazla düzensizlik, primer veya sekonder ezotropi veya ekzotropi, inter nükleer oftalmopleji, skew deviation (asimetri), Duane sendromu ve üst göz kapağının geri çekilmesini içeren grup içinden seçilmiş oftalmolojik rahatsızlıklar;

- hemifasiyal spazm, tortikolis (boyun çarpıklığı), çocuklarda veya yetişkinlerde spastiklik (yani, serebral palsy, inme sonrası), multipl skleroz (MS), travmatik beyin hasarı veya spinal kord hasarlı hastalar), idiyoPATİK fokal (odaklanma) distonisi, kas sertliği, parmak krampı, el distonisi, VI kraniyel sinir felci, oromandibular distoni, kafa tremoru, tardiv (yavaş gelişen) diskinezi, tardiv distoni (yavaş gelişen gevşeklik), mesleki kramplar (müziSYEN krampları dâhil), fasiyal sinir felci, çene kapatma spazmı, fasiyal spazm, sinkinezi, tremor, primer yazma tremoru, miyoklonus (kas seğirmesi), kasılmış insan sendromu, ayak distonisi, fasiyal felç, ağırlı kol ve hareket eden parmak sendromu, tik rahatsızlıkları, distonik tikler, Tourette sendromu, nöromiyotoni, çene titremesi, lateral rektus palsy, distonik ayak dönmesi, çene distonisi, Rabbit sendromu, serebellar tremor, III kraniyel sinir felci, damak miyoklonu, akatezi (akasthesia), kas krampları, IV sinir felci, yürüyüşte donukluk ekstensor trunkal distoni, post fasiyal sinir felci, sinkinezi, sekonder distoni, Parkinson hastalığı, Huntington korası, epilepsi (sara), dönemsel olmayan distoni, sefalik tetanoz, miyokimi ve iyi huylu kramp fasikülasyon sendromu dâhil hareket bozuklukları;

- spazmodik disfoni, hipersalivasyon, sialore (aşırı tükürük ifrazatı), otik (kulak ile ilgili) rahatsızlıklar, işitme bozukluğu, kulak tıkanması, kulak çınlaması (tinitus), vertigo, Meniere hastalığı, koklear sinir disfonksiyonu, kekemelik, krikofarenjiyal disfaji, dış gıcırdatma (bruksizm), kronik solunumda larenks kapanması, ses teli granülomu, ventriküler distoni, ventriküler disfoni, mutasyonel disfoni, trismus (çene kilitlenmesi), horlama, seste tremor, aspirasyon, dil çıkartma distonisi, damak tremoru, derin dudak ısırması ve larenjial distoni dâhil, kulak burun boğaz (KBB) rahatsızlıkları;

- akalazyayı içeren gastrointestinal bozukluklar, anal fisür, kabızlık, temperomantibüler eklem disfonksiyonu, oddi sfinkster disfonksiyonu, bastırılmış oddi sfinkster hipertansiyonu, instestinal kas rahatsızlıkları, puborektalis sendromu, anismus, pilorik spazm, safra kesesi işlevi bozukluğu, gastrointestinal veya ozofajiyal motilite disfonksiyonu, difüze özofajiyal spazm ve gastroparezi dâhil gastrointestinal rahatsızlıklar;

- destrüSÖR sfinkster dissinerjisi, detrusor hiperrefleksi, nörojenik idrar kesesi disfonksiyonu (yani, Parkinson hastalığındaki, spinal kord "omurilik" hasarı, inmeli

veya mltipl skleroz “MS” hastaları), idrar kesesi spazmları, üriner inkontinans (idrar kaçırma), üriner retansiyon, hipertrofilidrar kesesi boynu, işeme fonksiyonu bozukluğu, interstisyel sistit, vajinismus, endometriosis, pelvik ağrı, prostat bezi büyümesi (Benin Prostat Hiperplasisi), prostatodinia, prostat kanseri ve priapizm dâhil ürojenital rahatsızlıklar;

- hiperhidroz (aşırı terleme) (aksiller hiperhidroz, palmar hiperhidroz ve Frey sendromu dâhil), bromhidroz, kütanöz hücre proliferatif rahatsızlıklar (sedef hastalığı dâhil), deri yaraları ve akne dâhil dermatolojik rahatsızlıklar,

- sırt ağrısı (st sırt ağrısı, alt sırt ağrısı), miyofasiyal ağrı, stres kaynaklı baş ağrısı, fibromiyalji, ağrılı sendromlar, miyalji, migren, boyun incinmesi, eklem ağrısı, ameliyat sonrası ağrı, kas spazmı ile ilişkilendirilmeyen ağrı, düz kas düzensizlikleri ile ilişkilendirilen ağrı dâhil ağrı düzensizlikleri;

- pankreatit, nörojenik inflamatuvar bozukluklar (gut, tendonit “kiriş yangısı”, bursit “bursan iltihaplanması”, dermatomiyosit ve ankilozan spondilit dâhil) dâhil enflamatuvar bozukluklar;

- bezlerin aşırı salgılamaları, mukoza hiper sekresyonu, holokrin işlev bozukluğu gibi salgılama rahatsızlıkları,

- rinit (alerjik rinit dâhil), KOAH, astım ve tüberküloz dâhil solunum bozuklukları;

- kas büyümesi, masseter kas hipertrofisi, akromegali (kemik irileşmesi) ve miyaljili nörojenik tibialis anterior hipertrofisi dâhil hipertrofik bozukluklar; tenisçi dirseği (veya dirseğin epikondiliti), eklem iltihabı, koksartroz (kalça kemiği iltihaplanması), kalça osteoartriti, omzun döndürücü kas tavanı / “cap” patolojisi, rmatoid artrit ve karpal tünel sendromu dâhil eklem bozuklukları;

- tip 2 diyabet, hiperglkagonizm, hiperinsülinizm, hipoinslinizm, hiperkalsemi, hipokalsemi, tiroid bozuklukları (Grav hastalığı, tiroiditis, Haşimoto tiroidi, hipertiroid ve hipotiroid dâhil), paratiroid bozuklukları (hiperparatiroid ve hipoparatiroid dâhil), Cushing sendromu ve obezite benzeri endokrin bozuklukları;

- sistemik lupus eritemotoz (SLE) hastalığı gibi otoimmün hastalıkları;

- paragangliyoma tümörleri, prostat kanseri ve kemik tümörleri dâhil proliferatif hastalıklar;

- spor yaralanmaları, kas yaralanmaları, tendon yaraları ve kemik kırıkları dâhil travmatik yaralanmalar; ve

- veterinerlik amaçlı kullanımlar, (rneğin, memelilerin hareket ettirilmemesi, ekin kolik, hayvan akalazyası veya hayvan kas spazmları).

Buluşa göre farmasötik bileşimler, keza, aşağıdaki kozmetik bozuklukların kozmetik tedavileri dâhil kozmetik tedaviler için de kullanılabilir:

- deri kusurları;
- fasiyal asimetri;
- 5 • grabella (kaş çatma) çizgileri ve yüzdeki kırışıklıklar dâhil kırışıklıklar;
- aşağı doğru kıvrılmış dudak;
- saç dökülmesi; ve
- vücut kokuları.

10 Tercihli bir şekilde, buluşa göre farmasötik bileşimler, aşağıdakiler arasından seçilmiş bir hastalığı / bir durumu / bir sendromu tedavi etmeye yönelik ilaçların hazırlanmasında kullanılır:

- blefarospazm, strabismus (kısıtlayıcı veya miyojenik strabismus dâhil), ambliyopi, koruyucu ptoz, korneanın korunması için terapötik ptoz ve üst göz kapağı geri çekilmesinden oluşan grup içerisinde seçilmiş oftalmolojik bozukluklar;
- 15 • hemifasiyal spazm, tortikolis (boyun eğriliği), çocuklarda serebral palsi spastisitesi, yetişkinlerde inme sonrası spastisite, multipl skleroz (MS), travmatik beyin hasarı veya omurilik hasarlı hastalar, idiyopatik fokal distoni, kas sertliği, el krampı, el distonisi, VI sinir (kraniyel sinir) palsisi, oromandibular distoni, kafa tremoru, tardiv (gecikmeli) distoni, mesleki kramplar (müzisyen krampı dâhil), fasiyal sinir palsi, çene
- 20 kapatma spazmı, fasiyal spazm, sinkinezi, tremor, primer yazma tremoru, miyoklonus, katı insan sendromu, ayak distonisi, fasiyal paraliz, kolun ve parmakların ağırlı hareket ettirilmesi sendromu, tik bozuklukları, distonik tikler, Tourette sendromu, nöromiyotoni, çene titremesi, lateral rektus palsi, distonik ayak dönmesi, çene distonisi, Rabbit sendromu, serebellar tremor, III sinir (kraniyel sinir) palsi, damak
- 25 miyoklonusu, akastezi, kas krampları, IV (kraniyel) sinir palsi, yürüyüşte donukluk, ekstensor trunkal distoni, post fasiyal sinir pasli sinkinezisi, sekonder distoni, tekrarlı olmayan tür distoni, sefalik tetanoz, miyokimi ve iyi huylu kramp fasikülasyon sendromunu içeren grup içerisinde seçilmiş hareket bozuklukları;
- spazmodik disfoni, hipersalivasyon, sialorhe (aşırı tükürük ifrazatı), kulakta tıkanıklığı,
- 30 kulak çınlaması (tinitus), vertigo, Meniere hastalığı, koklear siniri işlev bozukluğu, kekelemelik, krikofarenjiyal disfaji, bruksizm (diş gıcırdatma), solunumda kronik larenks kapanması, ses teli granülomasi, ventriküler disfoni, mutasyonel disfoni, trismus (çene kilitlenmesi), horlama, seste tremor, dilin dışarıya çıkartılması distonisi, damak tremoru ve larenjial distoniye içeren grup içerisinde seçilmiş KBB
- 35 (otorinolarenjolojik) bozuklukları;

- akalazya, anal fisür, kabızlık, temperomandibüler eklem işlevi bozukluğu, Oddi sfinkster işlev bozukluğu, bastırılmış Oddi hipertansiyon sfinksteri, intestinal kas bozuklukları, puborektalis sendromu, anismus, pilorik spazm, safra kesesi işlevi bozukluğu, gastrointestinal veya özofajiyal motilite / hareket işlev bozukluğu, diffüze özofajiyal spazm, özofajiyal divertiküloz ve gastropareziyi içeren grup içerisinde seçilmiş gastrointestinal bozukluklar;
- detrusor sfinkter disenerjisi, detrusor hiperrefleksi, Parkinson hastalığındaki nörojenik idrar kesesi işlev bozukluğu, spinal kord (omurilik) hasarı, inmeli veya multipl skleroz (MS) hastaları, idrar kesesi spazmları, üriner inkontinans (idrar kaçırma), üriner retansiyon, hipertrofi idrar kesesi boynu, işeme fonksiyonu bozukluğu, interstisyel sistit, vajinismus, endometriosis, pelvik ağrı, prostat bezi büyümesi (Benin Prostat Hiperplazisi), prostatodini, prostat kanseri ve priapizm içeren grup içerisinde seçilmiş ürojenital bozukluklar;
- aksiller hiperhidroz, koltuk altı aşırı terlemesi (hiperhidroz), avuç içi hiperhidrozu, Frey sendromu, bromhidroz, psoriasis, deri yaraları ve akneyi de içeren grup içerisinde seçilmiş dermatolojik bozukluklar;
- üst sırt ağrısı, alt sırt ağrısı, miyofasiyal ağrı, stres kaynaklı baş ağrısı, fibromiyalji, miyalji, ağrılı sendromlar, miyalji, migren, boyun incinmesi, eklem ağrısı, ameliyat sonrası ağrı, düz kas düzensizlikleri ile ilişkilendirilen ağrıyı içeren grup içerisinde seçilmiş ağrı rahatsızlıkları;
- pankreatit, gut hastalığı, tendonit, kesecik iltihabı (bürsit), dermatomiyosit ve ankilozan spondiliti içeren grup içerisinde seçilmiş enflamatuvar rahatsızlıklar;
- bezlerin (güddelerin) aşırı salgılamaları, mukoz hiper sekresyonu ve hiper lakrimasyonu, güddelerin holokrin işlevinin oluşturduğu grup içerisinde seçilmiş sekretuar (salgılama) bozuklukları;
- alerjik olmayan rinit (burun iltihabı), alerjik, KOAH, astım içeren grup içinde seçilmiş solunum bozuklukları;
- kas büyümesi, masseterik hipertrofi, akromegali ve miyaljili nörojenik tibialis anterior hipertrofisi dâhil hipertrofik bozukluklar;
- tenisçi dirseği (veya dirseğin epikondiliti), eklemlerde iltihaplanma, koksartroz, kalça kemiği iltihaplanması, kalça osteoartriti, omuzun döndürücü kas tavanı patolojisi, romatoid artrit ve karpal tünel sendromunu içeren grup içerisinde seçilmiş eklem bozuklukları;
- tip 2 diyabet, hiperkalsemi, hipokalsemi, tiroid bozuklukları Cushing sendromu ve obeziteyi içeren grup içerisinde seçilmiş endokrin bozuklukları;

- prostat kanseri; ve
- spor yaralanmaları, kas incinmeleri, tendon yaraları ve kemik kırıklarını içeren grup içerisinde seçilmiş travmatik hasarlar;

ya da tedavi edilecek olan, aşağıdakilerden oluşan grup içerisinde seçilecek kozmetik tedavilerinin gerçekleştirilmesi için kullanılır:

- deri kusurları;
- fasiyal asimetri;
- grabella (kaş çatma) çizgileri ve yüzdeki kırışıklıklar dâhil kırışıklıklar;
- aşağı doğru kıvrılmış dudak; ve
- saç dökülmesi.

Daha tercihli bir şekilde, buluşa göre farmasötik bileşimler, aşağıdakiler arasından seçilmiş bir hastalığı / bir durumu / bir sendromu tedavi etmek üzere ilaçların hazırlanmasında kullanılır:

- blefarospazm ve strabismus içeren grup içerisinde seçilmiş oftalmolojik bozukluklar;
- hemifasiyal spazm, tortikolis (boyun eğriliği), çocuklarda serebral palsi spastisitesi, yetişkinlerde inme sonrası kol ve bacak spastisitesi, multipl skleroz (MS), travmatik beyin hasarı veya omurilik hasarlı hastalar içeren grup içerisinde seçilmiş hareket bozuklukları;
- spazmodik disfoni, hipersalivasyon, sialore (aşırı tükürük ifrazatı), krikofarenliyal disfaji, bruksizm (diş gıcırdatma), solunumda kronik larenks kapanması, ventriküler distoni, ventriküler disfoni, mutasyonal disfoni, trismus (çene kilitlenmesi), horlama, seste tremor, dilin dışarıya çıkartılması distonisi, damak tremoru, ve larenjial distoniyi içeren grup içerisinde seçilmiş KBB (otorinolarenjolojik) bozuklukları;
- akalazya, anal fisür, kabızlık, temperomandibüler eklem işlevi bozukluğu, Oddi sfinkster işlev bozukluğu, bastırılmış Oddi hipertansiyon sfinksteri, intestinal kas bozuklukları, anismus, pilorik spazm, safra kesesi işlevi bozukluğu, gastrointestinal veya özofajyal hareket işlev bozuklukları ve gastroparezi içeren grup içerisinde seçilmiş gastrointestinal bozukluklar;
- destrüktör sfinkster dissinerjisi, detrusor hiperrefleksi, Parkinson hastalığındaki nörojenik idrar kesesi işlev bozukluğu, spinal kord (omurilik) hasarı, inmeli veya multipl skleroz (MS) hastaları, idrar kesesi spazmları, üriner inkontinans (idrar kaçırma), üriner retansiyon, hipertrofi idrar kesesi boynu, işeme fonksiyonu bozukluğu, interstisyel sistit, vajinismus, endometriosis, pelvik ağrı, prostat bezi büyümesi (Benin Prostat Hiperplasisi), prostatodini, prostat kanseri ve priapizm içeren grup içerisinde seçilmiş ürojenital bozukluklar;

- koltuk altı aşırı terlemesi, avuç içi aşırı terlemesi, Frey sendromu, bromhidroz, psoriasis, deri yaraları ve akneyi de içeren grup içerisinde seçilmiş dermatolojik bozukluklar;
- 5 • üst sırt ağrısı, alt sırt ağrısı, miyofasiyal ağrı, stres kaynaklı baş ağrısı, fibromiyalji, miyalji, ağrılı sendromlar, miyalji, migren, boyun incinmesi, eklem ağrısı, ameliyat sonrası ağrı, düz kas düzensizlikleri ile ilişkilendirilen ağrıyı içeren grup içerisinde seçilmiş ağrı rahatsızlıkları;
- pankreatit ve gut hastalığını içeren grup içerisinde seçilmiş enflamatuvar bozukluklar;
- hiperlakrimasyon;
- 10 • alerjik olmayan rinit (burun iltihabı), alerjik rinit, KOAH, astım içeren grup içinden seçilmiş solunum bozuklukları;
- masterik hiperstrofi;
- tenisçi dirseği (veya dirseğin epikondiliti), eklemlerde iltihaplanma, koksartroz, kalça kemiği iltihaplanması, kalça osteoartriti, omuzun döndürücü kas tavanı patolojisi,
- 15 • römatooid artrit ve karpal tünel sendromunu içeren grup içerisinde seçilmiş eklem bozuklukları;
- obezite;
- kas yaralanmaları, tendon yaraları ve kemik kırıklarını içeren grup içerisinde seçilmiş travmatik yaralanmalar;
- 20 ya da tedavi edilecek olan, aşağıdakilerden oluşan grup içerisinde seçilecek kozmetik tedavilerinin gerçekleştirilmesi için kullanılır:
 - deri kusurları;
 - fasiyal asimetri;
 - grabella (kaş çatma) çizgileri ve yüzdeki kırışıklıklar dâhil kırışıklıklar;
 - 25 • aşağı doğru kıvrılmış dudak; ve
 - saç dökülmesi.

Özellik ile tercih edilen bir durumda, buluşa göre farmasötik bileşimler, aşağıdakiler arasından seçilmiş bir hastalığı / bir durumu / bir sendromu tedavi etmek üzere ilaçların hazırlanmasında kullanılır: blefarospazm, hemifasiyal spazm, tortikolis, inme sonrasında

30 çocuklarda serebral palsy spastisitesi ve yetişkinlerde kol veya bacak spastisitesi, multipl skleroz, travmatik beyin hasarı veya omurilik zedelenmeli hastalar, koltuk altı aşırı terlemesi, avuç içi aşırı terlemesi, Frey sendromu, deri yaraları, akne, üst sırt ağrısı, alt sırt ağrısı, miyofasiyal ağrı, migren, stres kaynaklı baş ağrısı, eklem ağrısı, tenisçi dirseği (veya dirseğin

epikondiliti), eklemlerde iltihaplanma, koksatröz, kalça osteoartriti, omuzun döndürücü kas tavanı "muscle cap" patolojisi, kas yaralanmaları, tendon yaraları ve kemik kırıkları veya aşağıdakileri içerir grup içinden tedavi için seçilecek kozmetik bozuklukların olduğu durumlardaki kozmetik tedavilerin gerçekleştirilmesinde:

- 5 • deri kusurları;
- fasiyal asimetri; ve
- grabellar (kaş çatma) çizgileri ve yüzdeki kırışıklıklar dâhil kırışıklıklar;

Yukarıda bahsedilen hastalıklar / bozuklukların tedavi edilmesi için ihtiyaç duyulan botulinum nörotoksin kompleksi (tip A, B, C, D, E, F veya G) veya yüksek saflıkta botulinum nörotoksinin (tip A, B, C, D, E, F veya G) dozu, tedavi edilecek hastalığa, bozukluğa, verilme biçimine, tedavi edilecek hastanın yaş, beden ağırlığına ve söz konusu kişinin sağlık durumuna bağlı olarak farklılık gösterir ve neticede kararı verecek olan hekim veya veteriner hekimdir. Tedaviyi yapan hekim veya veteriner hekim tarafından belirlenmiş olan böyle bir miktara, burada "tedavi edici etkinlikteki miktar" denilecektir.

15 Botulinum nörotoksin kompleksi (tip A, B, C, D, E, F veya G) veya yüksek saflıkta botulinum nörotoksin (tip A, B, C, D, E, F veya G) açısından, tedavi edici etkinlikteki bu miktar sıklık ile karşılık gelen LD₅₀ 'nin bir işlevi olarak ifade edilir. Mevcut başvuruda, LD₅₀ ile botulinum nörotoksin kompleksi (tip A, B, C, D, E, F veya G) veya yüksek saflıkta botulinum nörotoksin (tip A, B, C, D, E, F veya G) enjekte edilmiş farelerdeki söz konusu farelerin 96 saat

20 içerisinde yarısının ölümüne sebep olan medyan intraperitoneal (karından enjekte edilen) doz anlaşılmalıdır.

"Yaklaşık" terimi ile göz önüne alınan değer etrafındaki bir aralık kastedilmektedir. Bu patent başvurusunda kullanıldığı şekilde, "yaklaşık X", X eksi X 'in % 10 'undan X artı X 'in % 10 'una kadar olan bir aralık ve tercihli bir şekilde X eksi X 'in % 5 'inden X artı X 'in X 'in % 5 'ine

25 kadar olan bir aralığa atıfta bulunmaktadır.

Farklı olarak tarif edilmedikçe, burada kullanılan tüm teknik ve bilimsel terimler, bu buluşun ait olduğu alandaki sıradan bir uzman tarafından genel olarak anlaşılanlar ile aynı anlama sahiptir.

Aşağıdaki örnekler açıklama amacı ile sunulmuş olup, hiçbir şekilde, buluşun kapsamını sınırlamış oldukları düşünülmemelidir.

30

ÖRNEKLER

Örnek 1: Aşağıdaki bileşenleri içeren bir sıvı farmasötik bileşim hazırlanır:

<i>Clostridium botulinum</i> tip A1 nörotoksin kompleksi	2, 000 LD ₅₀ ünite/ml
Sükroz	11.7 mM
Histidin	10 mM
Sodyum Klorür	0.3 M
Polisorbat 80	% 0.01 h/h
pH	6.5

Beher ml başına nominal olarak 2,000 LD₅₀ ünite botulinum toksin içeren karışım sterilize küçük bir şişede liyofilize edilir ve sonra sızdırmaz şekilde kapatılır. Elde edilen katı bileşim, 2 ila 8 °C arası bir sıcaklıkta saklandığında en azından 18 ay, 23 ila 27 °C arasında en azından 6 ay stabildir.

5 **Örnek 2: Aşağıdaki bileşenleri içeren bir sıvı farmasötik bileşim hazırlanır:**

<i>Clostridium botulinum</i> tip A1 nörotoksin kompleksi	500 LD ₅₀ ünite/ml
Sükroz	11.7 mM
Histidin	10 mM
Sodyum Klorür	0.3 M
Polisorbat 80	% 0.01 h/h
pH	6.5

Bu şekilde hazırlanmış olan sıvı bileşim, sıvı / gaz ile ilişkisi olmayan bir ara yüz ile bir şırınga türü aygıt içerisinde sızdırmaz hale getirilir. Bu koşullarda, 23 ila 27 °C 'de, saklandığında en az altı ay, 2 - 8 °C 'de en az on iki ay stabildir.

10 **Örnek 3: Aşağıdaki bileşenleri içeren bir sıvı farmasötik bileşim hazırlanır:**

<i>Clostridium botulinum</i> tip A1 nörotoksin kompleksi	500 LD ₅₀ ünite/ml
Sükroz	11.7 mM
Histidin	10 mM
Sodyum Klorür	0.15 M
Polisorbat 80	% 0.01 h/h
pH	6.5

Bu şekilde hazırlanmış olan sıvı bileşim, sıvı/gaz ile ilişkisi olmayan bir ara yüz ile bir şırınga türü aygıt içerisinde sızdırmaz hale getirilir. Bu koşullarda, 23 ila 27 °C 'de, saklandığında en az altı ay, 2 - 8 °C 'de en az on iki ay stabildir.

ANALİTİK YÖNTEMLER

15 **Fare toksisite denemesi**

Bir fare toksisite denemesi, botulinum nörotoksin kompleksinin (tip A, B, C, D, E, F veya G) veya yüksek saflıkta botulinum nörotoksinin (tip A, B, C, D, E, F veya G) toksisitesinin

ölçümü için kullanılabilir. Testte, tahmini LD₅₀ değerinde veya yaklaşık olarak bir seyreltme aralığında hazırlama için standart bir seyreltici kullanılabilir. Seyreltmelerin aralığı veya ölçeği, doğru bir LD₅₀ değeri oluşturacak şekilde düzenlenir.

5 Farelere, bilinen ve standart hale getirilmiş seyreltilmiş toksin hacmi karından (interperitonal) olarak enjekte edilir. 96 saat sonra, her bir seyreltilme grubundaki ölümleri ve hayatta kalmaların sayısı kaydedilir. LD₅₀ değeri, 96 saat içerisinde enjekte edilen hayvanların yarısını öldüren medyan dozdur.

10 Buluşa göre bir bileşim, eğer ki, hazırlanan bir referansa ilişkin olarak söz konusu zaman döneminin bitiminde başlangıçtaki toksisitesinin en azından % 70 'ini koruyor ise, o belirli zaman dönemi içerisinde stabil olduğu şeklinde düşünülür.