(19) LIETUVOS RESPUBLIKA
VALSTYBINIS PATENTŲ BIURAS

(10) **LT 4501 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patento numeris: **4501**

(51) Int. Cl.[6]: **A01N 37/18**
A61K 31/16

(21) Paraiškos numeris: **98-090**

(22) Paraiškos padavimo data: **1998 07 08**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1999 02 25**

(45) Patento paskelbimo data: **1999 05 25**

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/US96/19697**

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **1996 12 13**

(85) Nacionalinės procedūros pradžia: **1998 07 08**

(31, 32, 33) Prioritetas: **95/10674, 1995 12 15, ZA**
96/5755, 1996 07 05, ZA

(72) Išradėjas:

Michelle Olga Patricia Giesteira Visser, ZA

(73) Patento savininkas:

CRYOPRESERVATION TECHNOLOGIES CC,
607 21st. Avenue, Rietfontein, Pretoria, ZA

(74) Patentinis patikėtinis:

Marija Vanda Antanaitienė, 43, a/d 3197, 2022 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Kompozicijos, skirtos kriogeniškai konservuoti organus ir gydyti virusines ir bakterines infekcijas

(57) Referatas:

Išradimas apima kompoziciją arba substanciją, turinčią aktyvų agentą, parinktą iš grupės, sudarytos iš amidų, kurių pagrindinė formulė R_3-CO-NR_1R_2, kurioje:
R_1 ir R_2 yra nepriklausomai parinkti iš grupės, turinčios H, Me, halogenmetilą, prisotintas ir neprisotintas C_2-C_3 alkilo grupes, prisotintas ir neprisotintas C_2-C_3 halogenalkilo grupes, hidroksialkilo grupes; arba
R_1 ir R_2 yra kartu parinkti iš $(CH_2)_n$, kur n=4 arba 5, arba $(CH_2)_20(CH_2)_2$; ir R_3 yra parinktas iš H, Me, ir prisotintų arba neprisotintų C_2-C_3 alkilo grupių, ir jos panaudojimą organų kriokonservavimui ir virusinių bei bakterinių infekcijų gydymui.

Išradimas apima medžiagą, ypač substanciją arba kompoziciją, skirtą kriogeniškai konservuoti organus ir gydyti virusines ir/arba mikrobines infekcijas, substanciją arba kompoziją, skirtą kriogeniškai konservuoti organus, substancijos arba kompozijos panaudojimą virusinių ir/arba mikrobinių infekcijų gydymui, kriogeninio agento, naudojamo organų kriokonservavimui, gamybos būdą, vaisto arba preparato, naudojamo virusinių ir/arba mikrobinių infekcijų gydymui, gamybos būdą, kriogeninio agento panaudojimą organų kriokonservavimui, vaisto arba preparato panaudojimą virusinių ir/arba mikrobinių infekcijų gydymui, krioapsaugančio agento panaudojimą kriokonservuojančio agento gamyboje, substancijos arba kompozicijos panaudojimą vaisto arba preparato, skirto gydyti virusines ir/arba mikrobines infekcijas, gamyboje, organo kriokonservavime, organo atšildyme, virusinės ir/arba mikrobinės infekcijos gydyme, dozuotą vaisto formą.

Fahy ir Khirabadi (American National Red Cross, 21 January 1993) aprašė kompiuteriu valdomą aparatą ir būdą, skirtą atlikti krioapsaugančią perfuziją. Šis aparatas ir būdas yra naudojami biologinių organų, pavyzdžiui, širdies, inkstų, kepenų ir pan., perfuzavimui. Perfuzija atliekama naudojant mikstūrą, turinčią dimetilsulfoksido, formamido arba 1,2 – propanedolo. Sremulli ir Dexter (Journal of Clinical Oncology 2(3), of March 1984) aprašo poliarinių tirpiklių, tokių kurie sukelia brendimo rezultatus pelių ir žmogaus vėžio ląstelėse, panaudojimą. Autoriai daro išvadą, kad vaistų, tokių kaip monometilformamidas, kuris labiau linkęs paversti neoplastines ląsteles į nepiktybines ląsteles, o ne žudyti auglio ląteles, panaudojimas yra svarbus nukrypimas nuo įprastos citotoksinės chemoterapijos. Tačiau, autoriai neaprašo virusinių infekcijų gydymo.

Pagal vieną išradimo aspektą yra gauta substancija arba kompozicija, skirta organų kriokonservavimui ir virusinių ir/arba bakterinių infekcijų gydymui, substancija arba kompozicija, turinti aktyvų agentą, parinktą iš grupės, sudarytos iš amidų, kurių bendra formulė R_3-CO-NR_1R_2, kurioje:

R_1 ir R_2 yra nepriklausomai parinkti iš grupės, turinčios H, Me, halogenmetilą, prisotintas ir neprisotintas C_2-C_3 alkilo grupes, prisotintas ir neprisotintas C_2-C_3 halogenalkilo grupes, hidroksialkilo grupes; arba

R_1 ir R_2 yra kartu parinkti iš $(CH_2)n$, kur n = 4 arba 5, arba $(CH_2)_2O(CH_2)_2$; ir

R_3 yra parinktas iš H, Me ir prisotintų arba neprisotintų C_2-C_3 alkilo grupių.

Mažiausiai vienas iš R_1 ir R_2 gali būti metilo grupė.

Arba mažiausiai vienas iš R_1 ir R_2 gali būti C_1-C_3 fluoralkilo grupė.

Aktyvusis agentas gali būti parinktas iš grupės, turinčios formamidą, metilformamidą, dimetilformamidą, acetamidą, dimetilacetamidą, dietilacetamidą, izopropilacetamidą, diizopropilacetamidą, N-acetilpiperidiną, N-(β - hidroksietil) acetamidą, N, N-di (β - hidroksietil) acetamidą, N-acetilmorfoliną, akrilamidą, propionamidą, N-fluorometil-N-metil-formamidą ir mišinių iš dviejų ar daugiau paminėtų medžiagų.

Atskiram variante aktyvusis agentas gali būti dimetilformamidas C_3H_7NO (DMF). Kitame atskirame variante aktyvusis agentas gali būti N-fluorometil-N-metil-formamidas $HCON(CH_3)(CH_2F)$.

DMF pagrindinai yra naudojamas kaip polinis tirpiklis ir yra lengvai absorbuojamas per odą, per plaučius arba per burną. Skysto DMF absorbcijos lygis per odą siekia iki 9.4 mg/cm^2 per valandą. DMF greitai metabolizuojamas, pagrindinė biotransformacijos vieta yra kepenys, o išskyrimas daugiausia yra per šlapimą. Pagrindiniai metabolitai žiurkėje, pelėje, žiurkėne ir žmoguje yra N-(hidroksimetil)-N-metilformamidas (HMMF), N-(hidroksimetil)-formamidas (HMF) ir N-acetil-S-(N-metil-karbamoil) cisteinas (AMCC). Nepakeistas DMF pašalinamas su šlapimu kaip maža dozės dalelė. Riboti duomenys šiuo klausimu

nurodo, kad žymi dalis dozės lieka nepašalinta ir/arba pašalinama nenustatytų mišinių pagalba.

DMF yra mažiau toksiškas odos, burnos ir kvėpavimo organų atžvilgiu. Jis laikomas švelniu vidutinės odos ir akies dirgikliu ir lengvai prasiskverbia pro odą. Nėra jokios indikacijos odos atžvilgiu.

NOAEL (No-Adverse-Observed-Effect-Level)* nenustatytas per 90 bandymo dienų. 28- je bandymo dienoje su šunimis, kai inhaliacijos kiekis siekė 63 mg/m^3, jokio efekto nebuvo pastebėta. Kitame bandyme su šunimis, grįžtamieji širdies-kraujagyslių pakitimai buvo pastebėti, esant kiekiui 60 mg/m^3.

DMF yra teratogeninis ir tikriausiai embrioletalinis faktorius. NOAEL efektui stebėti buvo daromi bandymai su triušiais, naudojant šios medžiagos kiekį 44 mg/kg svorio peroraliai ir 150 mg/ m^3 kiekį inhaliacija.

Pagrindinis šio išradimo ypatumas yra tai, kad DMF toksiškumas kriogeninių procedūrų metu yra realiai sumažinamas arba iš esmės eliminuojamas preliminariai organą užšaldant, prieš apdorojant jį DMF. Pagal pavyzdį, baltymas yra denaturuojamas vandeniniame 30 % DMF tirpale arba fiziologiniame tirpale kambario temperatūroje. Tačiau 8°C temperatūroje (pagal išradime pateiktą būdą, organas iš esmės lieka nepakitęs, kai DMF koncentracijos lygis yra 30 % ir temperatūra žemesnė nei 0°C) organas lieka nepakitęs, kai DMF koncentracija yra 40 %.

Kaip yra aprašyta pavyzdyje žemiau, organas per kriogenines procedūras pagrindinai lieka nepakitęs, jei yra naudojamas 10 % DMF tirpalas 8 – 4°C temperatūros ribose ir jei 25 % - 30 % DMF tirpalas yra naudojamas, kai organo ir tirpalo temperatūra žemesnė nei 4°C.

Kriokonservavimo procedūrų metu išradimo substancija arba kompozicija funkcionuoja ne tik kaip kriokonservavimo agentas, bet ir kartu kaip virostatinis

* Stebimo-nepalankaus-poveikio-lygis

ir/arba bakteriostatinis elementas. Tokiu būdu, jei organas užkrėstas viruso arba bakterijos, organo kriokonservavimas sunaikins ir virusinę ir/arba mikrobinę infekciją.

Šiame išradimo aprašyme žodis "organas" suprantamas plačiau, nes į šią reikšmę įtraukta širdis, kepenys, oda, audinys, ragena, kaulas, liaukos ir širdies vožtuvai.

Išradimo tikslas yra pateikti kriogeniškai apsaugantį agentą (CPA) ir būdą, pagal kurį, pavyzdžiui, žinduolio arba kitų oda, organai arba ištisi kūnai gali būti veikiami CPA gydant, užšaldant ir saugant iš esmės neribotą laiką ir atšildomi kada reikia. Paprastai, neužšaldyti donoro organai išlieka gyvybiški maždaug 4 valandas, po kurių prasideda ląstelių pakitimai, ir donoro organų transplantacija tampa sudėtinga arba neįmanoma. Procedūra, aprašyta išradime, kaip bus matyti vėliau, nėra sudėtinga ir organas lengvai išlaiko šaldymą -10°C/sekundę panardinus skystame azote po CPA poveikio. Tokiu būdu tampa įmanomas transkontinentinis donoro organų transportavimas ir donoro organų bankų įrengimas medicininiam naudojimui.

Tokiu būdu, pagal kitą išradimo aspektą yra pateikta substancija arba kompozicija organų kriokonservavimui, substancija arba kompozicija, turinti kriogeninį agentą, parinktą iš grupės, susidedančios iš amidų, kurių bendra formulė R_3-CO-NR_1R_2, kurioje:

R_1 ir R_2 yra nepriklausomai parinkti iš grupės, turinčios H, Me, halogenmetilą, prisotintas ir neprisotintas C_2-C_3 alkilo grupes, prisotintas ir neprisotintas C_2-C_3 halogenalkilo grupes, hidroksialkilo grupes; arba

R_1 ir R_2 yra kartu parinkti iš $(CH_2)n$, kur n = 4 arba 5, arba $(CH_2)_2O(CH_2)_2$; ir

R_3 yra parinktas iš H, Me ir prisotintų arba neprisotintų C_2-C_3 alkilo grupių.

Mažiausiai vienas iš R_1 ir R_2 gali būti metilo grupė.

Vietoje to, mažiausiai vienas iš R_1 ir R_2 gali būti C_2-C_3 fluoralkilo grupė.

Amidas gali būti toks, kaip buvo anksčiau aprašyta.

Pagrindiniame išradimo variante kriogeninis agentas gali būti dimetilformamidas. Kitame svarbiame išradimo variante kriogeninis agentas gali būti N-fluormetil-N-metil-formamidas.

Kriogeninis agentas gali būti sujungtas su fiziologiniu tirpalu, turinčiu komponentą, parinktą iš grupės, susidedančios iš natrio chlorido, dinatrio-EDTA, natrio bikarbonato, kalio chlorido, kalio dihidrogenfosfato, magnio chlorido, magnio sulfato, kalcio chlorido, gliukozės, Hespes-natrio hidroksido ir mišinių iš dviejų ar daugiau čia paminėtų medžiagų.

Ypač tinka Tyrode fiziologinis tirpalas (vėliau minimas kaip Tyrode), Viskonsono universiteto tirpalas (ViaSpan), Krebs Henseleit arba bet kuris kitas tinkamas fiziologinis tirpalas.

Išradimas apima ir substanciją arba kompoziciją, skirtą gydyti virusines ir/arba mikrobines infekcijas, substanciją arba kompoziciją, turinčią aktyvų terapinį agentą, parinktą iš grupės, susidedančios iš amidų, kurių bendra formulė R_3-CO-NR_1R_2, kurioje:

R_1 ir R_2 yra nepriklausomai parinkti iš grupės, turinčios H, Me, halogenmetilą, prisotintas ir neprisotintas C_2-C_3 alkilo grupes, prisotintas ir neprisotintas C_2-C_3 halogenalkilo grupes, hidroksialkilo grupes; arba

R_1 ir R_2 yra kartu parinkti iš $(CH_2)n$, kur n = 4 arba 5, arba $(CH_2)_2O(CH_2)_2$; ir

R_3 yra parinktas iš H, Me ir prisotintų arba neprisotintų C_2-C_3 alkilo grupių.

R_1, R_2 ir R_3 gali būti parinkti, kaip čia buvo anksčiau aprašyta.

Amidas gali būti toks, kaip čia buvo anksčiau aprašyta.

Dar viename pagrindiniame išradimo variante, amidas gali būti dimetil-formamidas. Dar kitame pagrindiniame išradimo variante amidas gali būti N-fluormetil-N-metil-formamidas.

Virusinė infekcija gali būti degeneruojanti virusinė infekcija, pavyzdžiui, žmogaus imunodeficitinė (ŽIV-1) virusinė infekcija. Išradimo junginys, substancija arba kompozicija gali būti skirta gydyti ir kitas virusines ir/arba mikrobines infekcijas, tokias kaip vokiški tymai, odos spuogai ir oportunistinės infekcijos, susijusios su imuninės sistemos ligomis, tokiomis kaip HIV-1. Ypač išradimo substancija arba kompozicija tinka naudoti gydant virusines infekcijas, kurių virusas turi kapsulinį apsaugantį paviršių.

Tokiu būdu, virusinė infekcija gali būti pasirinkta iš žmogaus imunodeficitinio viruso infekcijų (ŽIV-1).

Kompozicija gali turėti mažiausiai vieną fiziologiškai priimtiną užpildą arba nešiklį. Užpildu arba nešikliu gali būti koloidinis silikono dioksidas.

Pagal sekantį išradimo variantą yra aprašomas agento, naudojamo organų kriokonservavimui, gamybos būdas, apimantis sujungimo stadiją krioapsaugančio agento, parinkto iš grupės, turinčios amidų, kurių bendra formulė R_3-CO-NR_1R_2, kurioje:

R_1 ir R_2 yra nepriklausomai parinkti iš grupės, turinčios H, Me, halogenmetilą, prisotintas ir neprisotintas C_2-C_3 alkilo grupes, prisotintas ir neprisotintas C_2-C_3 halogenalkilo grupes, hidroksialkilo grupes; arba

R_1 ir R_2 yra kartu parinkti iš $(CH_2)n$, kur n = 4 arba 5, arba $(CH_2)_2O(CH_2)_2$; ir

R_3 yra parinktas iš H, Me ir prisotintų arba neprisotintų C_2-C_3 alkilo grupių

su fiziologiniu tirpalu.

Fiziologinis tirpalas gali būti toks, kaip buvo aprašyta anksčiau.

R_1, R_2 ir R_3 gali būti tokie, kaip buvo aprašyta anksčiau.

Amidas gali būti toks, kaip čia buvo aprašyta anksčiau.

Pagal dar vieną išradimo variantą yra aprašytas vaisto arba preparato, skirto virusinių ir/arba mikrobinių infekcijų gydymui, gamybos būdas, apimantis sujungimo stadiją aktyvaus terapinio agento, parinkto iš grupės, turinčios amidų, kurių bendra formulė R_3-CO-NR, R_2, kurioje:

R_1 ir R_2 yra nepriklausomai parinkti iš grupės, turinčios H, Me, halogenmetilą, prisotintas ir neprisotintas C_2-C_3 alkilo grupes, prisotintas ir neprisotintas C_2-C_3 halogenalkilo grupes, hidroksialkilo grupes; arba

R_1 ir R_2 yra kartu parinkti iš $(CH_2)n$, kur n = 4 arba 5, arba $(CH_2)_2O(CH_2)_2$; ir

R_3 yra parinktas iš H, Me ir prisotintų arba neprisotintų C_2-C_3 alkilo grupių,

su mažiausiai vienu fiziologiškai priimtinu užpildu arba nešikliu.

R_1, R_2 ir R_3 gali būti tokie, kaip čia buvo aprašyta anksčiau.

Amidas gali būti toks, kaip čia buvo aprašyta anksčiau.

Išradimas apima ir krioapsaugančio agento naudojimą organų kriokonservavime, kai krioapsaugantis agentas turi krioapsaugantį komponentą, parinktą iš grupės, turinčios amidų, kurių bendra formulė R_3-CO-NR_1R_2, kurioje:

R_1 ir R_2 yra nepriklausomai parinkti iš grupės, turinčios H, Me, halogenmetilą, prisotintas ir neprisotintas C_2-C_3 alkilo grupes, prisotintas ir neprisotintas C_2-C_3 halogenalkilo grupes, hidroksialkilo grupes; arba

R_1 ir R_2 yra kartu parinkti iš $(CH_2)n$, kur n = 4 arba 5, arba $(CH_2)_2O(CH_2)_2$; ir

R_3 yra parinktas iš H, Me ir prisotintų arba neprisotintų C_2-C_3 alkilo grupių.

Krioapsaugantis agentas gali susidėti iš krioapsaugančio komponento ir fiziologinio tirpalo.

R_1, R_2 ir R_3 gali būti tokie, kaip čia buvo aprašyta anksčiau.

Amidas gali būti toks, kaip čia buvo aprašyta anksčiau.

Išradimas apima ir panaudojimą virusinių ir/arba mikrobinių infekcijų gydymui vaisto arba preparato, susidedančio iš aktyvaus terapinio agento, parinkto iš grupės, turinčios amidų, kurių bendra formulė R_3-CO-NR_1R_2, kurioje:

R_1 ir R_2 yra nepriklausomai parinkti iš grupės, turinčios H, Me, halogenmetilą, prisotintas ir neprisotintas C_2-C_3 alkilo grupes, prisotintas ir neprisotintas C_2-C_3 halogenalkilo grupes, hidroksialkilo grupes; arba

R_1 ir R_2 yra kartu parinkti iš $(CH_2)n$, kur n = 4 arba 5, arba $(CH_2)_2O(CH_2)_2$; ir

R_3 yra parinktas iš H, Me ir prisotintų arba neprisotintų C_2-C_3 alkilo grupių.

R_1, R_2 ir R_3 gali būti tokie, kaip čia buvo aprašyta anksčiau.

Amidas gali būti toks, kaip čia buvo aprašyta anksčiau.

Vaistas arba preparatas gali turėti mažiausiai vieną fiziologiškai priimtiną užpildą arba nešiklį.

Fiziologiškai priimtinas užpildas arba nešiklis gali būti koloidinis silikono dioksidas.

Išradimas apima ir panaudojimą kriogeniškai apsaugančio agento gamyboje kriogeniškai apsaugančio komponento, kai komponentas yra parenkamas iš grupės, susidedančios iš amidų, kurių bendra formulė R_3-CO-NR_1R_2, kurioje:

R_1 ir R_2 yra nepriklausomai parinkti iš grupės, turinčios H, Me, halogenmetilą, prisotintas ir neprisotintas C_2-C_3 alkilo grupes, prisotintas ir neprisotintas C_2-C_3 halogenalkilo grupes, hidroksialkilo grupes; arba

R_1 ir R_2 yra kartu parinkti iš $(CH_2)n$, kur n = 4 arba 5, arba $(CH_2)_2O(CH_2)_2$; ir

R_3 yra parinktas iš H, Me ir prisotintų arba neprisotintų C_2-C_3 alkilo grupių.

R_1, R_2 ir R_3 gali būti tokie, kaip čia buvo aprašyta anksčiau.

Amidas gali būti toks, kaip čia buvo aprašyta anksčiau.

Išradimas toliau apima substancijos arba kompozicijos panaudojimą gamyboje medikamento arba preparato, naudojamo virusinių ir/arba mikrobinių infekcijų gydymui, substanciją arba kompoziciją, turinčią aktyvų terapinį agentą, parinktą iš grupės, turinčios amidų, kurių bendra formulė R_3-CO-NR_1R_2, kurioje:

R_1 ir R_2 yra nepriklausomai parinkti iš grupės, turinčios H, Me, halogenmetilą, prisotintas ir neprisotintas C_2-C_3 alkilo grupes, prisotintas ir neprisotintas C_2-C_3 halogenalkilo grupes, hidroksialkilo grupes; arba

R_1 ir R_2 yra kartu parinkti iš $(CH_2)n$, kur n = 4 arba 5, arba $(CH_2)_2O(CH_2)_2$; ir

R_3 yra parinktas iš H, Me ir prisotintų arba neprisotintų C_2-C_3 alkilo grupių.

R_1, R_2 ir R_3 gali būti tokie, kaip čia buvo aprašyta anksčiau.

Amidas gali būti toks, kaip čia buvo aprašyta anksčiau.

Išradimas toliau apima organų kriokonservavimo būdą, apimantį organų perfuzijos stadijas panaudojant krioapsaugantį agentą, turintį krioapsaugantį komponentą, parinktą iš grupės, turinčios amidų, kurių bendra formulė R_3-CO-NR_1R_2, kurioje:

R_1 ir R_2 yra nepriklausomai parinkti iš grupės, turinčios H, Me, halogenmetilą, prisotintas ir neprisotintas C_2-C_3 alkilo grupes, prisotintas ir neprisotintas C_2-C_3 halogenalkilo grupes, hidroksialkilo grupes; arba

R_1 ir R_2 yra kartu parinkti iš $(CH_2)n$, kur n = 4 arba 5, arba $(CH_2)_2O(CH_2)_2$; ir

R_3 yra parinktas iš H, Me ir prisotintų arba neprisotintų C_2-C_3 alkilo grupių ir

mažinant perfuzuojamo organo temperatūrą iki konservavimo temperatūros, kurioje organas mažiausiai laikinai bus konservuojamas.

R_1, R_2 ir R_3 gali būti tokie, kaip čia buvo aprašyta anksčiau.

Amidas gali būti toks, kaip čia buvo aprašyta anksčiau.

Tipiškai, būdas apims pradinį organo perfuzavimą fiziologiniu tirpalu, tokiu kaip Tyrode [prekės ženklas] ir tuomet, palaipsniui arba nenutrūkstamu būdu, organo perfuziją fiziologiniu tirpalu, turinčiu progresyviai aukštesnės koncentracijos krioapsaugančio agento, tuo pat metu mažinant organo temperatūrą.

Temperatūros mažinimas gali būti pradinis organo šaldymas ir tada greitas organo užšaldymas azoto skystyje ir organo saugojimas skysto azoto temperatūroje; organo užšaldymas skystame azote ir saugojimas šaldytuve; planinis užšaldymas ir saugojimas skystame azote; arba planinis užšaldymas ir saugojimas šaldytuve.

Tokiu būdu, būdas apima ankstesnę organo perfuzavimo stadiją fiziologiniu tirpalu ir organo šaldymą iki temperatūros ribose tarp 8 iki 5°C ir po to organo perfuzavimą krioapsaugančiu agentu, tuo pat metu progresyviai didinant krioapsaugančio agento koncentraciją krioapsaugančiame komponente ir organo šaldymą iki kriokonservavimo temperatūros.

Krioapsaugančio komponento koncentracija gali būti progresyviai didinama nuo 10 % iki 40 %.

Konservavimo temperatūra bus tipinė subnulinė temperatūra, svyruojanti nuo maždaug -50°C iki -196°C (skysto azoto temperatūra).

Ypač konservavimo temperatūra gali būti tarp -80°C ir -196°C. Tai gali būti pasiekta naudojant skystą CFC (chlorofluoroanglis) arba šaldantį skystą azotą.

Išradimas toliau apima būdą atšildyti organą, kuris buvo perfuzuotas krioapsaugančiu agentu ir atšaldytas iki konservavimo temperatūros, apimantį organo poveikį krioapsaugančiu agentu, kuris turi krioapsaugantį komponentą, parinktą iš grupės, turinčios amidų, kurių bendra formulė R_3-CO-NR_1R_2, kurioje:

R_1 ir R_2 yra nepriklausomai parinkti iš grupės, turinčios H, Me, halometilą, prisotintas ir neprisotintas C_2-C_3 alkilo grupes, prisotintas ir neprisotintas C_2-C_3 halogenalkilo grupes, hidroksialkilo grupes; arba

R_1 ir R_2 yra kartu parinkti iš $(CH_2)n$, kur n = 4 arba 5, arba $(CH_2)_2O(CH_2)_2$; ir

R_3 yra parinktas iš H, Me ir prisotintų arba neprisotintų C_2-C_3 alkilo grupių,

iki kol organas pasieks iš anksto nustatytą temperatūrą, aukštesnę už konservavimo temperatūrą;

organo perfuzavimą krioapsaugančiu agentu, turinčiu krioapsaugantį komponentą tuo pat metu palaipsniui mažinant krioapsaugančio komponento koncentraciją krioapsaugančiame agente ir aukštinant organo temperatūrą ir

organo perfuzavimą fiziologiniu skysčiu.

Iš anksto nustatyta temperatūra gali būti apie nuo -4°C iki 4°C.

R_1, R_2 ir R_3 gali būti tokie, kaip čia buvo aprašyta anksčiau.

Išradimas išsiplečia vis toliau, iki medikamento arba preparato paskyrimo pakopos pacientui, turinčiam virusinę ir/arba mikrobinę infekciją, kai medikamentas arba preparatas turi fiziologiškai efektyvią dozę aktyvaus terapinio agento, parinkto iš grupės amidų, kurių bendra formulė R_3-CO-NR_1R_2, kurioje:

R_1 ir R_2 yra nepriklausomai parinkti iš grupės, turinčios H, Me, halometilą, prisotintas ir neprisotintas C_2-C_3 alkilo grupes, prisotintas ir neprisotintas C_2-C_3 halogenalkilo grupes, hidroksialkilo grupes; arba

R_1 ir R_2 yra kartu parinkti iš $(CH_2)n$, kur n = 4 arba 5, arba $(CH_2)_2O(CH_2)_2$; ir

R_3 yra parinktas iš H, Me ir prisotintų arba neprisotintų C_2-C_3 alkilo grupių.

Medikamentas arba preparatas gali apimti mažiausiai vieną fiziologiškai priimtiną užpildą arba nešiklį, kaip čia buvo aprašyta anksčiau.

R_1, R_2 ir R_3 gali būti tokie, kaip čia buvo aprašyta anksčiau.

Amidas gali būti toks, kaip čia buvo aprašyta anksčiau.

Dozė gali būti parinkta tokia, kad aktyvaus terapinio agento koncentracija gydomo subjekto kraujyje siektų iki maždaug 2-200 m.d., geriausiai maždaug iki 50-200 m.d. DMF plazmos piko koncentracija iki 50-100 m.d. buvo rasta paciento su ŽIV-

1 ląstelių CD4-T skaičiui padidėjus nuo 312 iki daugiau kaip 1000/ml, per 3 savaites nuo gydymo pradžios.

Dozė gali būti paskirta per odą, t.y. aktyvaus terapinio agento perdavimo per odą būdu, pritaikant odos arba medvilnės lopinėlį, impregnuotą aktyviu terapiniu agentu arba kompozicija, turinčia aktyvų terapinį agentą. Aktyvaus terapinio agento koncentracija kompozicijoje, skirtoje impregnuoti odos arba medvilnės lopinėlį, yra 10-100 %.

Vietoje to, dozė gali būti paskirta peroraliai, inhaliacija, intraveniškai arba kombinacijomis iš dviejų ar daugiau aprašytų būdų. Intravenine doze bus tipiškai kontroliuojama norma ir laikas.

Išradimas tokiu būdu išsiplečia iki dozuotų vaisto formų virusinių ir/arba mikrobinių infekcijų gydymui, susidedančių iš vietinių panaudojimo priemonių, tokių kaip odos arba medvilnės lopinėlis, ant kurių adsorbuotas arba absorbuotas naudingas kiekis aktyvaus terapinio agento, kaip anksčiau čia buvo aprašyta.

Vietinio panaudojimo priemonė gali būti sudaryta iš sintetinės polimerinės medžiagos, tokios kaip TEFLON (prekės ženklas), ant kurios adsorbuotas arba absorbuotas aktyvus terapinis agentas. Tipiškai, dozuota forma apims DMF, sumaišytą su koloidiniu silikono dioksidu, kad suformuotų gelį, kuriuo lopinėlis yra impregnuotas. Lopinėlis gali būti Virodeno P058 lopinėlis.

Išradimas išsiplečia iki vakcinos, paruoštos iš antikūnų, paimtų iš žmogaus kūno po to, kai žmogus buvo užkrestas virusu ir gydomas, naudojant išradimą.

Virusas gali būti degeneruojantis virusas, toks kaip ŽIV-1.

Išradimas yra iliustruojamas figūromis ir pavyzdžiais, kur

Figūra 1 rodo temperatūros pokyčius aortos kateteryje, panardinant žiurkės širdį į skystą azotą;

Figūra 2 yra schematinė diagrama, rodanti kateterizacijos procedūrą ir termoporų poziciją širdyje;

Figūra 3 rodo ŽIV-1 viruso kiekį (polimerinės grandinės sintezė (PCR)) kaip laiko funkciją AIDS pacientui, gydomam su Virodeno P058 (DMF) skiautėmis;

Figūra 4 rodo temperatūrą kaip laiko funkciją visai žiurkės širdies perfuzijai, kriokonservavimui, užšaldymui, atšildymui ir naujai perfuzijai pagal išradimą;

Figūra 5 rodo temperatūrą kaip laiko funkciją termoporos kalibravimui ir trumpalaikiam atsakymui;

Figūra 6 rodo plazmos DMF koncentracijos kaip laiko funkciją per pirmą žmogaus toksiškumo bandymų seriją;

Figūra 7 rodo plazmos DMF koncentracijas kaip laiko funkciją per antrą žmogaus toksiškumo bandymų seriją;

Figūra 8 yra 22500 kartų padidintas širdies raumens mikrografinis vaizdas iš užšaldytos/atšildytos žiurkės širdies po kriogeninio proceso pagal išradimo būdą;

Figūra 9 yra 36250 kartų padidintas širdies raumens mikrografinis vaizdas iš užšaldytos/atšildytos žiurkės širdies po kriogeninio proceso pagal išradimo būdą; ir

Figūra 10 yra 28500 kartų padidintas širdies raumens mikrografinis vaizdas iš užšaldytos/atšildytos žiurkės širdies po kriogeninio proceso pagal išradimo būdą.

1 pavyzdys

KRIOKONSERVAVIMAS

MEDŽIAGOS IR BŪDAI

Modelis: izoliuota perfuzuota žiurkės širdis

Dvylika BD9 žiurkių, kiekviena sverianti 250-350 g. Žiurkės buvo anestezuotos natrio pentabarbitonu pagal priimtą protokolą.

Langendorfo aparatas

Buvo panaudotos dvi standartinės Langendorfo sistemos, prijungtos prie dviejų vandens vonių, viena buvo žemos temperatūros, kad atšaldytų organą iki 4-5°C, o kitoje palaikoma 37°C temperatūra. Šalta Langendorfo sistema (minima kaip LD2) buvo panaudota širdies perfuzavimui Tyrode-DMF-tirpalu, ir šilta Langendorfo sistema (minima kaip LD1) buvo panaudota širdies perfuzavimui nesant DMF, t.y. grynu Tyrode.

Perfuzavimo kompozicija vienam litrui tirpalo (Tyrode)

NaCl	137.6 mM
KCl	5.4 mM
$MgCl_2$	1.0 mM
$CaCl_2$	1.8 mM
Gliukozė	5.0 mM
Hespes-NaOH	11.6 mM
Tirpalo pH	7.45

DMF savybės (BASF pramoniniai chemikalai, dimetilformamido techninis aprašymas M5351e, Spalis, 1989)

N, N-Dimetilformamidas (DMF) yra ląstelės diferenciatorius su tokiomis savybėmis

Empirinė formulė:	C_3H_7ON
Santykinė molekulinė masė:	73,095 g/mol
Stingimo temperatūra:	- 61°C

DMF yra bespalvis, aukšto virimo taško, lakus, poliarinis, higroskopinis skystis, turintis silpną charakteringą kvapą. Kaip aprotoninis tirpiklis su aukšta dielektrine konstanta, DMF yra puikus tirpiklis, yra tirpus tiek vandenyje, tiek riebaluose ir turi žemą garų slėgį 23°C temperatūroje. DMF kontakte su stipriais oksidatoriais, alkilaliuminiu ir halogeniniais junginiais gali užsidegti arba sprogti.

DMF buvo laikomas hermetiškame konteineryje žemiau -5°C. Perfuzatoriai / CPA (OV) tirpalai buvo sumaišyti tik tam naudojimui, nepaliekant atsargai.

Temperatūros matavimas

Temperatūra nuolatos buvo matuojama mažo diametro (0,5 mm) T-pavidalo termopora, įstatyta į kaniulę aortos viduje, kaip schematiškai parodyta Figūroje 2. Ši pozicija buvo parinkta kaip geriausias kompromisinis variantas tarp atstumo iki širdies ir minimalaus įsiterpimo į širdį. Termopora galėjo tiksliai sekti temperatūros pokyčius daugiau kaip 45°C/s dažniu. Temperatūra buvo modeliuota kartą per sekundę viso eksperimento metu, naudojant PC-30 12 bitų A/D kortelę (Eagle Electronics) su įprastai įrengtu stiprintuvu įskaitant ir šalto taško temperatūros kompensaciją. Temperatūros matavimo sistema buvo kalibruota pagal komercinį Fluke 52 K tipo termoporinį termometrą. Matavimai virš nuo -100°C iki +100°C lygio buvo tikslinami iki 2 % tikros temperatūros. Staigaus atšaldymo fazės metu širdis į skystą azotą buvo panardinta tik iki aortos viršaus (žr. Figūrą 2). Temperatūros matavimai per kriokonservavimo

eksperimentus buvo atliekami viduje kairiojo skilvelio, lygiai taip pat, kaip ir aortos kaniulėje. -196°C temperatūra širdies viduje buvo pasiekta per 20 s mirkant širdį skystame azote tuo pat metu, kai aortos kaniulės viršuje buvo -75°C temperatūra. Staigaus atšaldymo fazėje šaldymo dažnis buvo maždaug 10°C/s kairiajame skilvelyje ir 7,5°C/s aortos viršuje.

Naudoti perfuzatoriaus / CPA (OV) mišiniai:

Tyrode 90 % ir DMF 10 % kaip (OV1) mišinys
Tyrode 80 % ir DMF 20 % kaip (OV2) mišinys
Tyrode 75 % ir DMF 25 % kaip (OV25) mišinys
Tyrode 70 % ir DMF 30 % kaip (OV3) mišinys
Visi procentiniai santykiai nurodyti kaip tūrio/tūrio (v/v) procentiniai santykiai.

Metodika

Šilta/šalta (37°C/5°C) LD1 ir šalta (5°C) LD2 Langendorfo sistema buvo paruošta, kaip aprašyta anksčiau. LD1 sistemoje buvo naudojamas tik grynas Tyrode tirpalas ir sistema buvo naudojama šaldyti visas perfuzuotas žiurkių širdis. LD2 sistemoje buvo naudojamas grynas Tyrode ir krioapsaugantys OV mišiniai tik šaltoje (5°C) temperatūroje.

DMF buvo laikomas šaltai, -5°C temperatūroje, hermetiniame konteineryje. 10 %, 20 %, 25 % ir 30 % DMF tirpalai Tyrode tirpale buvo paruošti prieš pat naudojimą.

Pirmoje eksperimentų serijoje, žiurkės buvo anestezuotos ir širdis pašalinta, palaikyta šaltame Tyrode tirpale, įvesta kaniulė per aortą ir prijungta prie šiltos/šaltos Langendorfo sistemos (LD1), turinčios gryną Tyrode 37°C tirpalą ir perfuzuota aštuonias minutes, norint stabilizuoti susitraukimus (Figūra4 – atžyma a), po to sistemos temperatūra buvo sumažinta iki 5°C ir palaikyta šioje temperatūroje 10 minučių (Figūra 4 – atžymos b-c).

Širdies pašalinimas buvo atliktas pjaunant pilvą skersai vos žemiau apatinio šonkaulio, atidengiant diafragmą ir ją iškerpant pagal (aplink) ventralinę ir lateralinę ribas ir atidengiant širdį ir plaučius. Nuo šio momento plaučiai daugiau nefunkcionuoja ir pradeda eiti ischemijos laikrodis. Tuomet tarpsienis tarp širdies ir šonkaulio ertmės buvo išpjautas, širdis atsargiai iškelta ir išpjauta su iris žirklėmis. Po to širdis buvo įmesta į menzūrą su šaltu Tyrode, kad ją stabilizuotų. Tuomet širdis buvo pakelta už išpjautų aortos kraštų ir aorta, įvedus kaniulę, buvo uždaryta medvilninio siūlo pagalba ir sutvarkyti susiuvimo galai.

Po to širdis buvo atjungta nuo LD1 sistemos ir pajungta prie LD2 sistemos (Figūra 4 – atžymos c-d), širdies perfuzija LD2 sistema buvo pradėta grynu Tyrode 5°C temperatūroje ir perfuzijos tirpalas buvo pakeistas į 50 ml OV1 tirpalą (LD2). (Figūra 4 – atžyma d). Širdis buvo perfuzuojama 10 minučių iki kol buvo išeikvotas OV1 tirpalas. Tuomet sistema LD2 buvo pripildyta 30 ml OV2 tirpalo ir perfuzija buvo tęsiama aštuonias minutes. Tuomet sistema LD2 buvo pripildyta 30 ml OV3 tirpalo ir po aštuonių minučių perfuzavimo, vos prieš tai, kai OV3 buvo išeikvotas, perfuzija buvo sustabdyta. Tuomet širdis buvo padengta plonu vatos sluoksniu, išmirkytu OV3 tirpale prie 0°C. Tada širdis visa buvo panardinta į nitrogeno skystį, kol temperatūra kairiajame skilvelyje pasiekė -196°C. Tai truko maždaug 20 sekundžių, esant šaldymo greičiui -10°C/sekundę. Prieš atšildant širdis buvo palaikoma -196°C temperatūroje periodais, besikeičiančiais nuo 10 sekundžių iki 45 minučių.

Širdis tuomet buvo patalpinta į 100 ml stiklinę menzūrą su 70 ml OV3 tirpalo 0°C ir palikta atšildyti 12 minučių (Figūra 4 – atžymos g-i). Praėjus šiam laikui kairiojo skilvelio temperatūra buvo tarp +4°C ir -4°C. Perfuzija buvo pakartota iš naujo šalta (5°C) vis dar prijungta LD2 sistema 2 minutes naudojant 20 ml OV3 tirpalo. Tuomet LD2 sistema buvo pripildyta 20 ml OV2 tirpalo ir perfuzija buvo tęsiama 2 minutes, tuomet pripilta 30 ml OV1 tirpalo ir perfuzija buvo tęsiama keturias minutes, ir tuomet 100 ml gryno Tyrode ir perfuzija buvo tęsiama dvylika minučių. Tuomet širdis buvo perkelta ir iš naujo prijungta prie šaltos/šiltos Langendorfo sistemos LD1 (Figūra 4 – atžymos j-k) ir perfuzuota su grynu Tyrode tirpalu, pradedant nuo 5°C temperatūros (Figūra 4 – atžyma k) ir sistema tada buvo iš

naujo įkaitinta iki 37°C temperatūros (Figūra 4 – atžymos k-m), kol kairiojo skilvelio temperatūra tapo 37°C. Širdis susitraukinėjo nuo 3 iki 6 minučių, pasiekdama temperatūrą tarp 14 - 30°C. Pulsuojanti širdis buvo laikoma šiltoje Langendorfo sistemoje 30 minučių, po to eksperimentas buvo baigtas.

Antroje bandymų serijoje buvo naudojami OV1 ir OV25 tirpalai. Šioje bandymų serijoje OV25 yra pakeistas OV2 ir OV3.

Jei šaldymas skystame azote pradėtas aukštesnėje nei 8°C temperatūroje pasirodo širdies įplyšimai. Įvyniojimas į vatą sulėtina temperatūros kritimą, nes apie širdį yra suformuojama izoliuojanti kapsulė.

Visi tirpalai buvo oksiduoti, įpučiant į juos 95 % deguonies / 5 % CO_2 dujų mišinį. DMF difuzija į ląsteles buvo pakankamai greita, kad osmotinis išbrinkimas nebūtų pastebimas. Perfuzate, įeinančiame į širdį, neturi būti burbulų, kadangi jie yra infarktų dėl ischemijos priežastis ir sutrukdo papildyti ir perkelti CPA. Dideli burbulai yra mirtini. Perfuzato hidrostatinis slėgis buvo maždaug 90-100 cm. Hidrostatinis slėgis maždaug 37,5 cm pasireiškė nepakankama perfuzija.

Baigiant eksperimentą buvo atlikta visų širdžių sub-endokardialinių ir sub-epikardialinių sluoksnių elektroninė mikroskopija (žiūrėti Figūras 8 – 10).

Aprašyti anksčiau eksperimentai buvo pakartoti su daugiau nei 100 žiurkių širdžių.

Rezultatai

Greitas atšaldymas buvo pasiektas šaldymo greičiais -75°C/s, kaip matyti Figūroje 1 – atžymoje b. Temperatūra aortinės kaniulės viršūnėlėje stabilizavosi -75°C, panardinus širdį į nitrogeno skystį. Tai koreliuojasi su intrakardialine -196°C temperatūra. Atšildymas iki -7°C, po to, kai širdis buvo išimta iš skysto azoto, buvo taip pat staigus (žiūrėti Figūrą 1 – pozicija c).

Šioje eksperimentų serijoje širdys susitraukinėjo nuo trijų iki šešių minučių miokardialinėse temperatūrose, kintančiose nuo 14 -30°C, po to, kai šilta perfuzija ant Langendorfo sistemos buvo pradėta iš naujo. Aktyvi, ritmiškai plakanti širdis buvo stebima mažiausiai 30 minučių. Koronarinis tekėjimas sugrįžo į greitį prieš užšaldymą ir širdies tempas atsigavo iki dydžių prieš užšaldymą. Mikroskopo pagalba nebuvo įmanoma pamatyti jokių pažeidimų. Elektroninė mokroskopija neparodė pastebimos žalos tarpląstelinėms struktūroms, padidinus jas 222500 kartų, 28500 kartų ir 36250 kartų (žiūrėti Figūras 8-10).

Kepenų kriokonservavimo atveju yra labai svarbu sustabdyti kepenų funkcijas prieš įvedant CPA, kadangi funkcionuojančios kepenys pakeis DMF į toksinius komponentus (AMCC). DMF yra hepatotoksinis. Kepenys nustoja funkcionuoti maždaug 8°C temperatūroje ir jos turi būti atšaldytos mažiausiai iki 4°C, kai bus įvedamas DMF tirpalas. Įvedant DMF tirpalus į visą kūną, jis turi būti laikomas žemesnėje arba 4°C temperatūroje. Užšaldant visą kūną, jis yra patalpinamas ant širdies – plaučio mašinos, kraujas yra pakeičiamas grynu fiziologiniu tirpalu ir šaldomas iki 4°C. CPA (OV tirpalai) yra įvedami ir cirkuliuoja per visą kūną, kol visos ląstelės prisotinamos CPA. Kūnas tuomet įvyniojamas į medžiagą, sumirkytą CPA tirpalu ir užšaldomas skystame azote. Atšildant kūną, turi būti palaikoma minimali 4°C temperatūra, kol bus išplautas visas CPA tirpalas iš ląstelių. Tuomet kūnas vėl pašildomas fiziologiniu tirpalu iki 11°C, po to į kūną atgal įvedamas kraujas.

Diskusija

Ankstesnės pastangos konservuoti ištisus organus užšaldant temperatūrose iki -196°C ir išsaugant organų funkcijas, buvo nesėkmingos (Wang T, Banker MC, Clayden N, Hicks GL Jr, Layne JR Jr, Freezing preservation of the mammalian cardiac explant VI. Effect of thawing rate on functional recovery (Eksplantuotų žinduolių širdžių konservavimas šaldymu VI. Šildymo tempo įtaka funkcijų atgavimui), Cryobiology 29, (470 – 477), 1992; Wang T, Connery CP, Batty PR, Freezing preservation of adult mammalian heart at high sub zero temperatures

(Suaugusių žinduolių širdžių konservavimas šaldymu super žemose nulinėse temperatūrose), Cryobiology, 29 (171 –176), 1991; Wicomb WN, Hill DJ, Collins GM, Twenty four hour ice storage of rabbit heart, Journal of Heart and Lung Transplantation (Triušio širdies išsaugojimas lede 24 val.), 13:5, (891 –894), 1994). Kiek žino pareiškėjas, nebuvo sėkmingų eksperimentų, kurių metu ištisi organai buvo užšaldomi žemesnėse negu -80°C temperatūrose ir vėliau, tiriant makroskopiškai arba mikroskopiškai, nebūtų pastebėta žalos organui.

Intraląstelinę žalą sukelia kristalizacija, toksinis ir osmosinis stresas. Šios problemos gerai atsispindi kriožurnaluose. Aprašyti anksčiau sėkmingi bandymai buvo tik kriokonservuojant atskiras ląsteles ir spermą. Šie procesai iš esmės naudojo lėtą arba užplanuotą šaldymą ir absoliuti struktūros masė buvo labai maža (Rall WF, Fahy GM, Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification (Pelės embrionų kriokonservavimas be ledo –196°C temperatūroje paverčiant stiklo materija), Nature, 313, (573 –575), 1985). Yra numanoma, kad pavienėse ląstelėse dideli šaldymo temperatūrų greičiai ir užšaldymas daro mažesnį pažeidžiantį poveikį, negu ištisiems organams.

25 % DMF ir Tyrode tirpalas nesukėlė masės padidėjimo, kaip tai padarė elektrolitinis vandens tirpalas, kada buvo sumirkyta skystu azotu. Todėl išradėjas naudojo šią koncentraciją kai kuriose bandymuose su žiurkės širdimi.

Šaldymo temperatūrų greičiai, su kuriais buvo susidurta bandymų su žiurkės širdimi metu, neturėjo jokio žalingo poveikio ir taip pat nebuvo pastebėta jokia intraląstelinė žala.

Sėkmingam ištisų organų kriokonservavimui yra reikalinga terpė ir procesas, turintys šias savybes:

1. Terpė turi greitai pakeisti intraląstelinį vandenį;
2. Terpė turi pasiekti visas organo ląsteles vienu metu (Burrows FA, Bissonette B, Cerebral Blood Flow Velocity Patterns During Cardiac Surgery Utilising Profound Hypothermia With Low Flow Cardiopumonary Bypass or

Circulatory Arrest in Neonates and Infants (Kraujo tekėjimo greičio pavyzdžiai galvos smegenyse širdies chirurgijos metu, kai naudojama nuodugni hipotermija, dirbtinai palaikant lėtą širdies – plaučių kraujotaką arba cirkuliacijos sulaikymas naujagimiuose ir kūdikiuose), Can Anaesth, 40:4, (298 – 307), 1993);

3. Terpė turi pakeisti mišinio "vanduo plius terpė" savybes taip, kad neįvyktų jokio mažiausio masės pasikeitimo šaldant;
4. Terpė neturi būti toksiška ląstelėms ir audiniui;
5. Terpės charakteristikos turi likti tos pačios kintant temperatūrai plačiame diapazone;
6. Terpė šaldymo temperatūrose turi būti mažo klampumo, tipiškai artimo vandens klampumui;
7. Žemesnėse nei nulinė temperatūrose terpė turi išlikti skysčio būvyje.

Kad patenkintų daugiausia anksčiau išvardintų sąlygų, išradėjas pritaikė dimetilformamidą (DMF).

Žiurkės širdis buvo naudojama kaip modelis, kadangi ji lengvai pasiduoda eksperimentams, metodas, kurio pagalba buvo tiriamos žiurkių širdys eksperimentiniuose modeliuose, yra gerai įsisavintas ir tokiu būdu yra galima lyginamoji informacija. Dėmesys, pirmiausiai, buvo sutelktas į širdies funkciją po to, kai ji buvo paveikta kriokonservavimo technika. Tačiau visais atvejais buvo naudojama audinio elektroninė mikroskopija, kad galima būtų ištirti ultrastruktūrinius pasikeitimus.

Nežiūrint kruopštaus tyrimo, elektroninė mikroskopija neparodė jokios pastebimos žalos intraląstelinėms struktūroms.

Bandymuose širdys atgydavo pastebimai gerai po to, kai būdavo paveiktos kraštutiniais šaldymo temperatūrų tempais, lygiai kaip ir žemomis temperatūromis. Makroskopiškai nebuvo matoma jokia žala, funkcionavimas, kaip rodė širdies susitraukimų judesys, buvo nuostabus.

Išradimas atveria plačias galimybes potencialiai ilgą laiką išsaugoti ištisus organus ir audinių struktūras ir įrengti organų bankus.

2 pavyzdys

ŽIV GYDYMAS

Toksiškumo tyrimai toliau buvo tęsiami su žmonėmis, atliekant tris klinikinius bandymus su pacientais teigiamais ŽIV-1 atžvilgiu ir naudojant Virodeno P058 odos lopinėlius.

Pacientas, infekuotas ŽIV-1, buvo gydomas dimetilformamidu (Virodenas P058), panaudojant odos lopinėlius, impregnuotus dimetilformamido geliu, uždėjus juos ant paciento kūno. Du odos lopinėliai buvo uždėti atskirai ant paciento kūno dalies, pvz. dilbio. Kiekvienas odos lopinėlis turėjo maždaug 7,064 g gelio, turinčio DMF (92,5 % m/m) ir koloidinio silikono dioksido (7,5 % m/m). Gelis buvo naudojamas sustabdyti skysčio DMF prasisunkimą pro lopinėlius. Lopinėliai buvo paruošti daugiausia 12 valandų prieš naudojimą, kadangi DMF greitai garuoja. Numatytas DMF lygis paciento kraujyje yra 100 m.d. Pacientui, sveriančiam apie 60 kg, 14 g kiekis DMF lygį 100 m.d. pagamina per 12 val. N-acetil-cistein-glutaminas ir/arba pagrindiniai fosfolipidai į pacientą buvo įvesti (orališkai arba į veną) doze nuo 250 mg iki 300 mg kasdien kaip kepenų palaikytojas. Vietoje to arba papildomai kaip kepenų palaikytojas gali būti įvestas į pacientą glutaminas. Remiantis Marz ir Nohova tyrimais, paviršiaus plotas, reikalingas tokiam kiekiui absorbuoti, yra maždaug 127,2 cm^2. Pasiekti 100 m.d. lygį kraujyje reikia absorbuoti maždaug 1,272 g DMF per valandą, tokiu būdu, kiekvienam lipdukui, turinčiam paviršiaus plotą 6,36 cm^2 reikia 7,064 g DMF kiekio. Teoriškai toks gydymas duos 125 – 135 m.d. lygį, bet, įvertinant garavimą, pasiekiamas 100 m.d. lygis. Absorbcijos galimybės kinta priklausomai nuo pacientų, t.y. tokių faktorių kaip odos tipas ir storis. Norint pasiekti norimus DMF lygius pacientuose, plazmos DMF koncentracijos buvo stebimos kiekviename paciente ir gydymas koreguojamas, priklausomai nuo kiekvieno paciento DMF lygio (žiūrėti pavyzdžius įvairiems

plazmos DMF koncentracijos lygiams vienodai gydytuose pacientuose Figūrose 6 ir 7).

Lipdukai buvo pripildyti maždaug 7,064 g DMF gelio ir silikono dioksido. Kiekvienas lopinėlis buvo naudojamas 12 valandų, vieną kartą per savaitę per 12 savaičių periodą, arba du kartus per savaitę per 6 savaičių periodą.

Kai kurių pacientų kraujo testai parodė CD4 T-ląstelių skaičiaus padidėjimą nuo 350 iki 1000 ir greitą sumažėjimą PCR (Polimerų grandinės reakcija) (virusinis pakrovimas) nuo 12000 iki 500/ml per tris savaites (žiūrėti Figūrą 3) panaudojus mažiausiai tris gydymus. PCR testai atlikti vadojaujantis Roche ŽIV padidinimo monitoriumi. Virusinė pakrova < 500/ml plazmos yra laikoma nesusekama.

Kai kurie pacientai prieš gydymą turėjo sunkią aknę (spuogas) arba vokiečių tymų simptomus. Gydant DMF taip, kad DMF lygis paciento kraujyje buvo 50 – 100 m.d., sunki aknė išsivalė ir Vokiečių tymų simptomai išnyko per 7 dienas.

Teikiant prioritetą gydymui dimetilformamidu, buvo atliktas išsamus paciento kraujotakos klinikinis ir fiziologinis įvertinimas. Įvertinimas suteikė kraujotakos biocheminius ir hematologinius duomenis apie pacientą. Taip pat buvo atliktas detalus virusologinės serologijos (ŽIV-1) testas, kad galima būtų nustatyti viruso kiekį visame paciento kūne ir šie testai atlikti per savaitę arba gydymo metu.

DMF koncentracija paciento kraujyje buvo nustatoma kas valandą per gydymo periodą. Kiekvieną rytą iš intraveninės linijos, laikomos pastoviai prijungtos prie fiziologinio skysčio, paduodamo 20 ml/val. greičiu, buvo imami kraujo pavyzdžiai ir kasdien tikrinami metabolitai AMCC (pavyzdžiui, imant kas 4 valandas šlapimo pavyzdžius) kilę iš DMF. Vėlesni DMF vartojimai buvo pakoreguoti pagal DMF lygio pasikeitimus kraujyje, pasireiškiančius absorbcijos pakitimais, ir buvo atlikti kasdieniniai hematologiniai ir biocheminiai kepenų tyrimai, nustatant bet kokius pakitimus kepenų funkcionavime. Buvo atlikti taip pat kasdieniniai pilni klinikiniai ir fiziologiniai tyrimai.

Buvo atliktas kasdieninis virusologinis serologinis tyrimas, su tikslu nustatyti virusų skaičių visame kūne ir stebėti paciento imunines būsenas (CD4 – ląstelės padejėjos) ir taip pat buvo nustatyti prognozuojami faktoriai. Serologinis tyrimas rėmėsi p24 antigenais ir kiekybiniu PCR arba, pasirinktinai, kitais metodais. Buvo taip pat atliktas savaitinis CD4 kiekių ir Beta-2 makroglobulino nustatymas ypač skirtas stebėti paciento imuninės būklės pagerėjimus ir prognozėms. Visi klinikiniai ir laboratoriniai duomenys buvo įvesti į centralizuotą duomenų apdorojimo sistemą, kad būtų galima greitai reaguoti į bet kokį neigiamą pasikeitimą, tuo būdu sutrumpinant gydymą, padidinant klinikinį efektą ir sumažinant potencialius pašalinius efektus.

Tyrimai apėmė:

a) Serumas:- S-Na, S-K, S-Cl, S-CO_2, S-Karbamidas, Surate, S-Creat, S-Ca, S-Ca, S-Mg, S-Phos, Serumas Visas, S-Conjd;
b) Hemoglobinas:- HB Det, raudonieji kūneliai, Hematokritas, MCV, MCH, MCHC, RDW;
c) Proteino elektroforezė: ST-Proteinas, S-albuminas, S- visas globulinas, S-Alfa 1 globulinas, S-Alfa 2 globulinas, S-Beta globulinas, S-Gama globulinas;
d) Baltųjų kūnelių diferencialinis skaičiavimas:- Baltųjų kūnelių skaičius, Neutro absoliutas, Lypho absoliutas, Mono absoliutas, Eosino absoliutas, Baso absoliutas;
e) Kepenų enzimai:- S-Alk. Phos, S-Gama GT, S-Alt (SGPT), S-AST (SGOT), S-LD;
f) Virusologija:- Ląstelių žymekliai, PCR, Beta 2 mikroglobulinas, P24 antigenas, C-reaktyvus proteinas, ir CK-MB koncentracija;
g) Kraujo analizė DMF lygiui nustatyti;
h) Šlapimo analizė AMCC lygiams nustatyti.

Pasirodo, kad DMF veikia kaip mažiausiai vienas iš atvirkštinės transkripcijos inhibitorius ir proteazės inhibitorius. Buvo atlikti in *vitro testai*, kuriais nustatyta,

kad DMF tirpinančios savybės tirpina viruso daleles, pavyzdžiui kapsidus (viriono baltyminis apvalkalėlis).

Išradimo apibrėžtis

1. Substancija arba kompozicija, skirta kriogeniškai konservuoti organus ir gydyti virusines ir/arba mikrobines infekcijas, kai substancija arba kompozicija, turi aktyvų agentą, parinktą iš grupės, sudarytos iš amidų, kurių bendra formulė R_3-CO-NR_1R_2, kurioje:

R_1 ir R_2 yra nepriklausomai parinkti iš grupės, turinčios H, Me, halogenmetilą, prisotintas ir neprisotintas C_2-C_3 alkilo grupes, prisotintas ir neprisotintas C_2-C_3 halogenalkilo grupes, hidroksialkilo grupes; arba

R_1 ir R_2 yra kartu parinkti iš $(CH_2)n$, kur n = 4 arba 5, arba $(CH_2)_2O(CH_2)_2$; ir

R_3 yra parinktas iš H, Me ir prisotintų arba neprisotintų C_2-C_3 alkilo grupių.

2. Substancija arba kompozicija pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad mažiausiai vienas iš R_1 ir R_2 yra metilo grupė.

3. Substancija arba kompozicija pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad mažiausiai vienas iš R_1 ir R_2 yra C_1-C_3 fluoralkilo grupė.

4. Substancija arba kompozicija pagal 3 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad aktyvusis agentas yra N-fluormetil-N-metil-formamidas.

5. Substancija arba kompozicija pagal 1 arba 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad aktyvusis agentas yra dimetilformamidas.

6. Substancija arba kompozicija, skirta kriogeniškai konservuoti organus, kai substancija arba kompozicija turi aktyvų kriogeninį agentą, parinktą iš grupės, sudarytos iš amidų, kurių bendra formulė R_3-CO-NR_1R_2, kurioje:

R_1 ir R_2 yra nepriklausomai parinkti iš grupės, turinčios H, Me, halogenmetilą, prisotintas ir neprisotintas C_2-C_3 alkilo grupes, prisotintas ir neprisotintas C_2-C_3 halogenalkilo grupes, hidroksialkilo grupes; arba

R_1 ir R_2 yra kartu parinkti iš $(CH_2)n$, kur n = 4 arba 5, arba $(CH_2)_2O(CH_2)_2$; ir

R_3 yra parinktas iš H, Me ir prisotintų arba neprisotintų C_2-C_3 alkilo grupių.

7. Substancija arba kompozicija pagal 6 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad mažiausiai vienas iš R_1 ir R_2 yra metilo grupė.

8. Substancija arba kompozicija pagal 6 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad mažiausiai vienas iš R_1 ir R_2 yra C_1-C_3 fluoralkilo grupė.

9. Substancija arba kompozicija pagal 8 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad aktyvusis kriogeninis agentas yra N-fluormetil-N-metil-formamidas.

10. Substancija arba kompozicija pagal 6 arba 7 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad aktyvusis kriogeninis agentas yra dimetilformamidas.

11. Substancija arba kompozicija pagal bet kurį iš 5 ÷ 10 punktų, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad kriogeninis agentas yra sumaišytas su fiziologiniu tirpalu, turinčiu komponentą, parinktą iš grupės, turinčios natrio chlorido, dinatrio – EDTA, natrio bikarbonato, kalio chlorido, kalio dihidrogenfosfato, magnio chlorido, magnio sulfato, kalcio chlorido, gliukozės ir Hespes – natrio hidroksido ir mišinio iš bet kurių dviejų ar daugiau paminėtų elementų.

12. Substancija arba kompozicija, skirta gydyti virusines ir/arba mikrobines infekcijas, kai substancija arba kompozicija turi aktyvų terapinį agentą, parinktą iš grupės, sudarytos iš amidų, kurių bendra formulė R_3-CO-NR_1R_2, kurioje:

R_1 ir R_2 yra nepriklausomai parinkti iš grupės, turinčios H, Me, halogenmetilą, prisotintas ir neprisotintas C_2-C_3 alkilo grupes, prisotintas ir neprisotintas C_2-C_3 halogenalkilo grupes, hidroksialkilo grupes; arba

R_1 ir R_2 yra kartu parinkti iš $(CH_2)n$, kur n = 4 arba 5, arba $(CH_2)_2O(CH_2)_2$; ir

R_3 yra parinktas iš H, Me ir prisotintų arba neprisotintų C_2-C_3 alkilo grupių.

13. Substancija arba kompozicija pagal 12 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad virusinė infekcija yra parinkta iš įgytų žmogaus imunodeficitinio viruso (HIV-1) infekcijų.

14. Substancija arba kompozicija pagal 12 arba 13 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad mažiausiai vienas iš R_1 ir R_2 yra C_1-C_3 metilo grupė.

15. Substancija arba kompozicija pagal 12 arba 13 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad mažiausiai vienas iš R_1 ir R_2 yra C_1-C_3 fluoralkilo grupė.

16. Substancija arba kompozicija pagal 15 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad aktyvusis terapinis agentas yra N-fluormetil-N-metil-formamidas.

17. Substancija arba kompozicija pagal bet kurį iš 12 ÷ 14 punktų, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad aktyvusis terapinis agentas yra dimetilformamidas.

18. Kompozicija pagal bet kurį iš 12 ÷ 17 punktų imtinai, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad apima mažiausiai vieną fiziologiškai priimtiną užpildą arba nešiklį.

19. Kompozicija pagal 18 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad fiziologiškai priimtinas užpildas arba nešiklis yra koloidinis silikono dioksidas.

20. Krioapsaugančio agento, naudojamo organų kriokonservavimui, gavimo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad apima krioapsaugančio komponento, parinkto iš grupės, sudarytos iš amidų, kurių bendra formulė R_3-CO-NR_1R_2, kurioje:

R_1 ir R_2 yra nepriklausomai parinkti iš grupės, turinčios H, Me, halogenmetilą, prisotintas ir neprisotintas C_2-C_3 alkilo grupes, prisotintas ir neprisotintas C_2-C_3 halogenalkilo grupes, hidroksialkilo grupes; arba

R_1 ir R_2 yra kartu parinkti iš $(CH_2)n$, kur n = 4 arba 5, arba $(CH_2)_2O(CH_2)_2$; ir

R_3 yra parinktas iš H, Me ir prisotintų arba neprisotintų C_2-C_3 alkilo grupių sujungimo stadiją

su fiziologiniu tirpalu.

21. Vaisto arba preparato, skirto gydyti virusines ir/arba mikrobines infekcijas, gamybos būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad apima aktyvaus terapinio agento, parinkto iš grupės, sudarytos iš amidų, kurių bendra formulė R_3-CO-NR_1R_2, kurioje:

R_1 ir R_2 yra nepriklausomai parinkti iš grupės, turinčios H, Me, halogenmetilą, prisotintas ir neprisotintas C_2-C_3 alkilo grupes, prisotintas ir neprisotintas C_2-C_3 halogenalkilo grupes, hidroksialkilo grupes; arba

R_1 ir R_2 yra kartu parinkti iš $(CH_2)n$, kur n = 4 arba 5, arba $(CH_2)_2O(CH_2)_2$; ir

R_3 yra parinktas iš H, Me ir prisotintų arba neprisotintų C_2-C_3 alkilo grupių sujungimo stadiją

su mažiausiai vienu fiziologiškai priimtinu užpildu arba nešikliu.

22. Krioapsaugančio elemento, turinčio krioapsaugantį komponentą, parinktą iš grupės, turinčios amidų, kurių bendra formulė R_3-CO-NR_1R_2, kurioje:

R_1 ir R_2 yra nepriklausomai parinkti iš grupės, turinčios H, Me, halogenmetilą, prisotintas ir neprisotintas C_2-C_3 alkilo grupes, prisotintas ir neprisotintas C_2-C_3 halogenalkilo grupes, hidroksialkilo grupes; arba

R_1 ir R_2 yra kartu parinkti iš $(CH_2)n$, kur n = 4 arba 5, arba $(CH_2)_2O(CH_2)_2$; ir

R_3 yra parinktas iš H, Me ir prisotintų arba neprisotintų C_2-C_3 alkilo grupių, panaudojimas organų kriokonservavime.

23. Vaistas arba preparatas, turintis aktyvų terapinį agentą, parinktą iš grupės, turinčios amidų, kurių bendra formulė R_3-CO-NR_1R_2, kurioje:

R_1 ir R_2 yra nepriklausomai parinkti iš grupės, turinčios H, Me, halogenmetilą, prisotintas ir neprisotintas C_2-C_3 alkilo grupes, prisotintas ir neprisotintas C_2-C_3 halogenalkilo grupes, hidroksialkilo grupes; arba

R_1 ir R_2 yra kartu parinkti iš $(CH_2)n$, kur n = 4 arba 5, arba $(CH_2)_2O(CH_2)_2$; ir

R_3 yra parinktas iš H, Me ir prisotintų arba neprisotintų C_2-C_3 alkilo grupių, skirtas virusinių ir/arba mikrobinių infekcijų gydymui.

24. Krioapsaugančio komponento, parinkto iš grupės, turinčios amidų, kurių bendra formulė R_3-CO-NR_1R_2, kurioje:

R_1 ir R_2 yra nepriklausomai parinkti iš grupės, turinčios H, Me, halogenmetilą, prisotintas ir neprisotintas C_2-C_3 alkilo grupes, prisotintas ir neprisotintas C_2-C_3 halogenalkilo grupes, hidroksialkilo grupes; arba

R_1 ir R_2 yra kartu parinkti iš $(CH_2)n$, kur n = 4 arba 5, arba $(CH_2)_2O(CH_2)_2$; ir

R_3 yra parinktas iš H, Me ir prisotintų arba neprisotintų C_2-C_3 alkilo grupių, panaudojimas krioapsaugančio agento gamyboje.

25. Substancijos arba kompozicijos panaudojimas medikamento arba preparato, skirto gydyti virusinę ir/arba mikrobinę infekciją, gamyboje, kai substancija arba kompozicija turi aktyvų terapinį elementą, parinktą iš grupės, turinčios amidų, kurių bendra formulė R_3-CO-NR_1R_2, kurioje:

R_1 ir R_2 yra nepriklausomai parinkti iš grupės, turinčios H, Me, halogenmetilą, prisotintas ir neprisotintas C_2-C_3 alkilo grupes, prisotintas ir neprisotintas C_2-C_3 halogenalkilo grupes, hidroksialkilo grupes; arba

R_1 ir R_2 yra kartu parinkti iš $(CH_2)n$, kur n = 4 arba 5, arba $(CH_2)_2O(CH_2)_2$; ir

R_3 yra parinktas iš H, Me ir prisotintų arba neprisotintų C_2-C_3 alkilo grupių.

26. Organo kriokonservavimo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad apima organo perfuzavimo stadiją krioapsaugančiu agentu, turinčiu krioapsaugantį komponentą, parinktą iš grupės, turinčios amidų, kurių bendra formulė R_3-CO-NR_1R_2, kurioje:

R_1 ir R_2 yra nepriklausomai parinkti iš grupės, turinčios H, Me, halogenmetilą, prisotintas ir neprisotintas C_2-C_3 alkilo grupes, prisotintas ir neprisotintas C_2-C_3 halogenalkilo grupes, hidroksialkilo grupes; arba

R_1 ir R_2 yra kartu parinkti iš $(CH_2)n$, kur n = 4 arba 5, arba $(CH_2)_2O(CH_2)_2$; ir

R_3 yra parinktas iš H, Me ir prisotintų arba neprisotintų C_2-C_3 alkilo grupių

mažinant perfuzuojamo organo temperatūrą iki konservavimo temperatūros, kurioje organas bent jau laikinai bus saugomas.

27. Būdas pagal 26 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad apima ankstesnę organo perfuzavimo stadiją fiziologiniu tirpalu ir organo šaldymą temperatūrose nuo 5 iki 8°C, ir po to organo perfuzavimą krioapsaugančiu agentu tuo pat metu progresyviai didinant krioapsaugančio komponento koncentraciją krioapsaugančiame agente ir šaldant organą iki konservavimo temperatūros.

28. Būdas pagal 27 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jame krioapsaugančio komponento koncentracija yra progresyviai auganti nuo 25 % iki 40 %.

29. Būdas pagal 27 arba 28 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jame kriokonservavimo temperatūra yra tarp –4 ir -196°C.

30. Organo, perfuzuoto krioapsaugančiu agentu ir atšaldyto iki konservavimo temperatūros, atšildymo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad apima organo paveikimą krioapsaugančiu agentu, turinčiu krioapsaugantį komponentą, parinktą iš grupės, turinčios amidų, kurių bendra formulė R_3-CO-NR_1R_2, kurioje:

R_1 ir R_2 yra nepriklausomai parinkti iš grupės, turinčios H, Me, halogenmetilą, prisotintas ir neprisotintas C_2-C_3 alkilo grupes, prisotintas ir neprisotintas C_2-C_3 halogenalkilo grupes, hidroksialkilo grupes; arba

R_1 ir R_2 yra kartu parinkti iš $(CH_2)n$, kur n = 4 arba 5, arba $(CH_2)_2O(CH_2)_2$; ir

R_3 yra parinktas iš H, Me ir prisotintų arba neprisotintų C_2-C_3 alkilo grupių,

kol organas pasiekia iš anksto nurodytą temperatūrą, aukštesnę, nei konservavimo temperatūra;

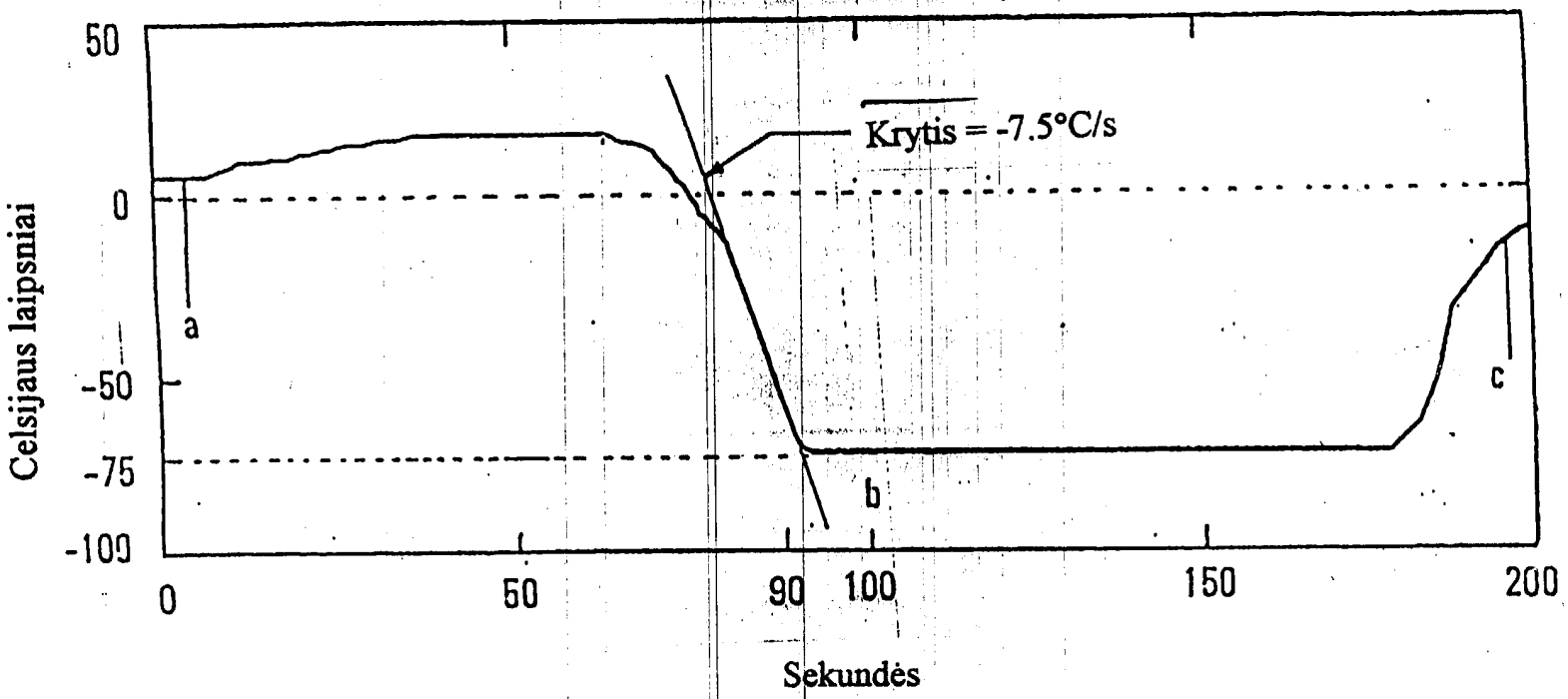
organo perfuziją krioapsaugančiu agentu, turinčiu krioapsaugantį komponentą tuo pat metu progresyviai mažinant krioapsaugančio komponento koncentraciją krioapsaugančiame agente ir didinant organo temperatūrą.

31. Dozuota vaisto forma, skirta virusinių ir/arba mikrobinių infekcijų gydymui, turinti vietines pritaikymo priemones, ant kurių absorbuotas arba adsorbuotas naudingas kiekis terapinio agento, parinkto iš grupės, sudarytos iš amidų, kurių bendra formulė R_3-CO-NR_1R_2, kurioje:

R_1 ir R_2 yra nepriklausomai parinkti iš grupės, turinčios H, Me, halogenmetilą, prisotintas ir neprisotintas C_2-C_3 alkilo grupes, prisotintas ir neprisotintas C_2-C_3 halogenalkilo grupes, hidroksialkilo grupes; arba

R_1 ir R_2 yra kartu parinkti iš $(CH_2)n$, kur n = 4 arba 5, arba $(CH_2)_2O(CH_2)_2$; ir

R_3 yra parinktas iš H, Me ir prisotintų arba neprisotintų C_2-C_3 alkilo grupių.



Temperatūros pokyčiai aortos kaniulėje mirkant žiurkės širdį nitrogeno skystyje.

FIG 1

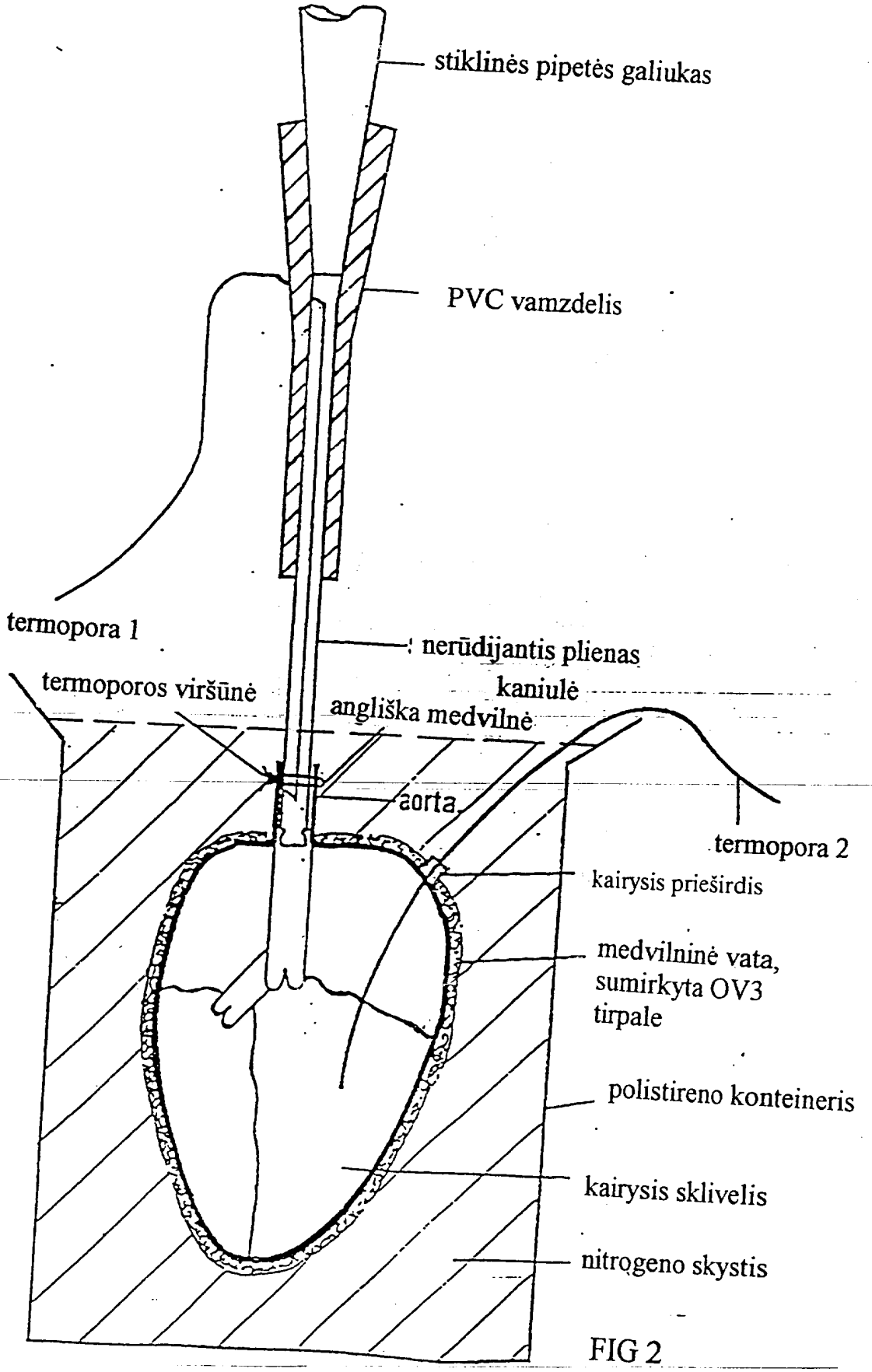

stiklinės pipetės galiukas
PVC vamzdelis
termopora 1
nerūdijantis plienas
termoporos viršūnė
kaniulė
angliška medvilnė
aorta
termopora 2
kairysis prieširdis
medvilninė vata, sumirkyta OV3 tirpale
polistireno konteineris
kairysis sklivelis
nitrogeno skystis

FIG 2

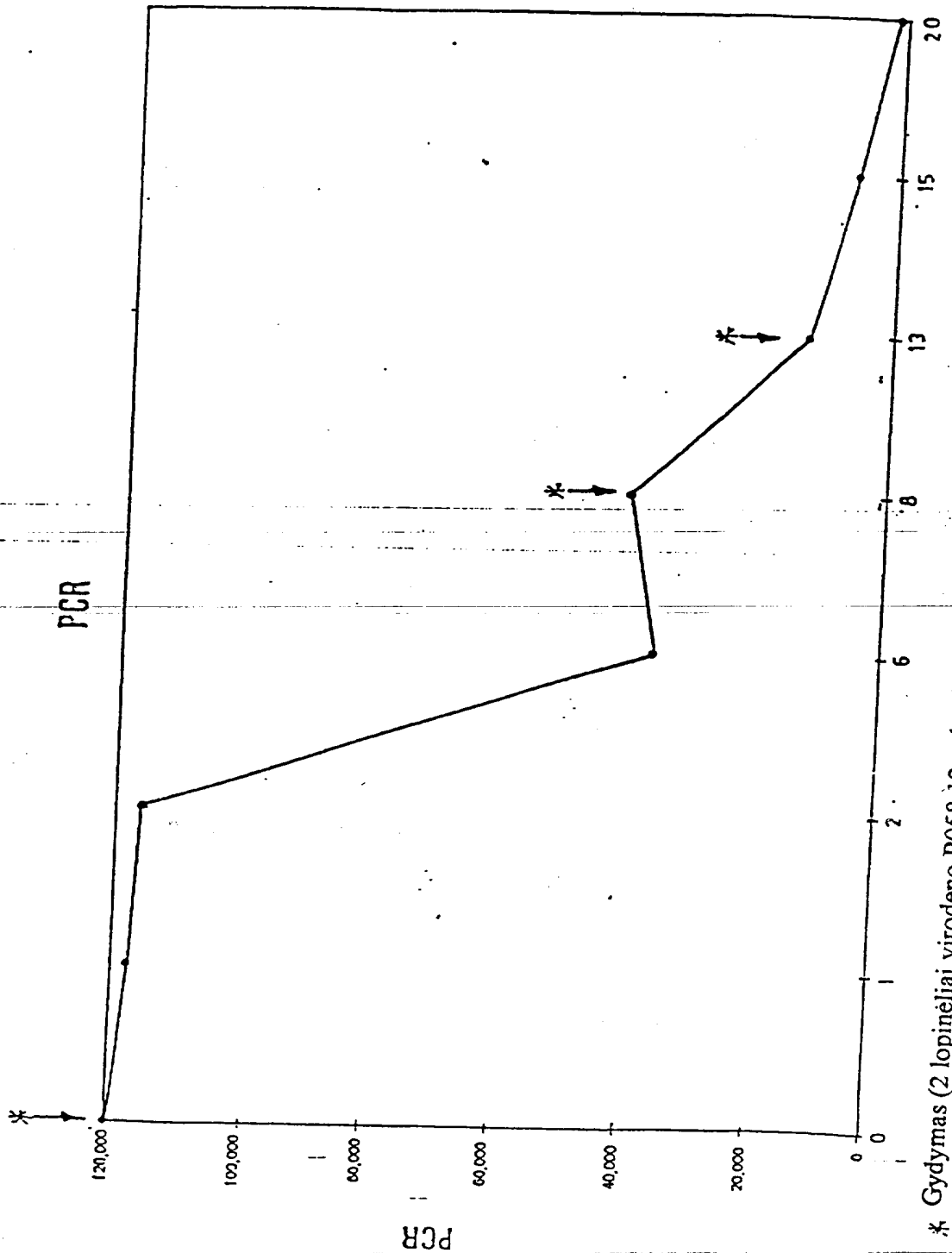

PCR
120,000
100,000
80,000
60,000
40,000
20,000
0
PCR
0
1
2
6
7
8
13
15
20
DIENOS
* Gydymas (2 lopinėliai virodeno P058 12 valandų)

FIG 3

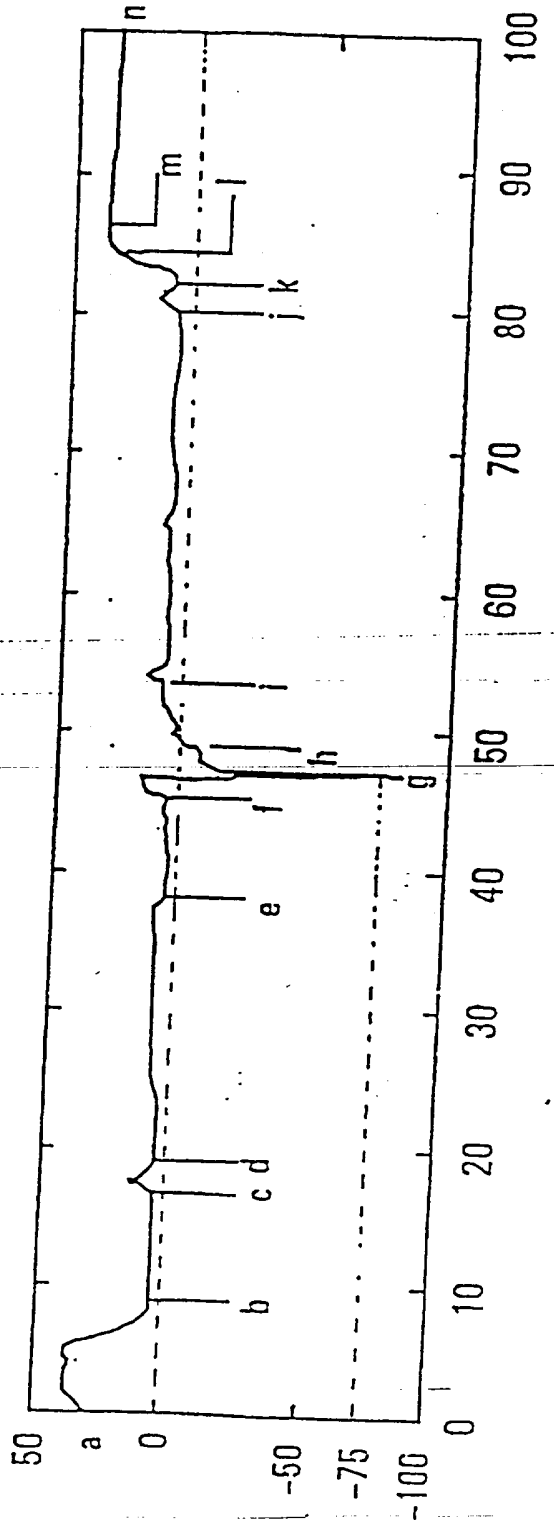

n
m
l
j k
i
h
g
f
e
d c
b
a
50
0
-50
-75
-100
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
Minutes

FIG 4

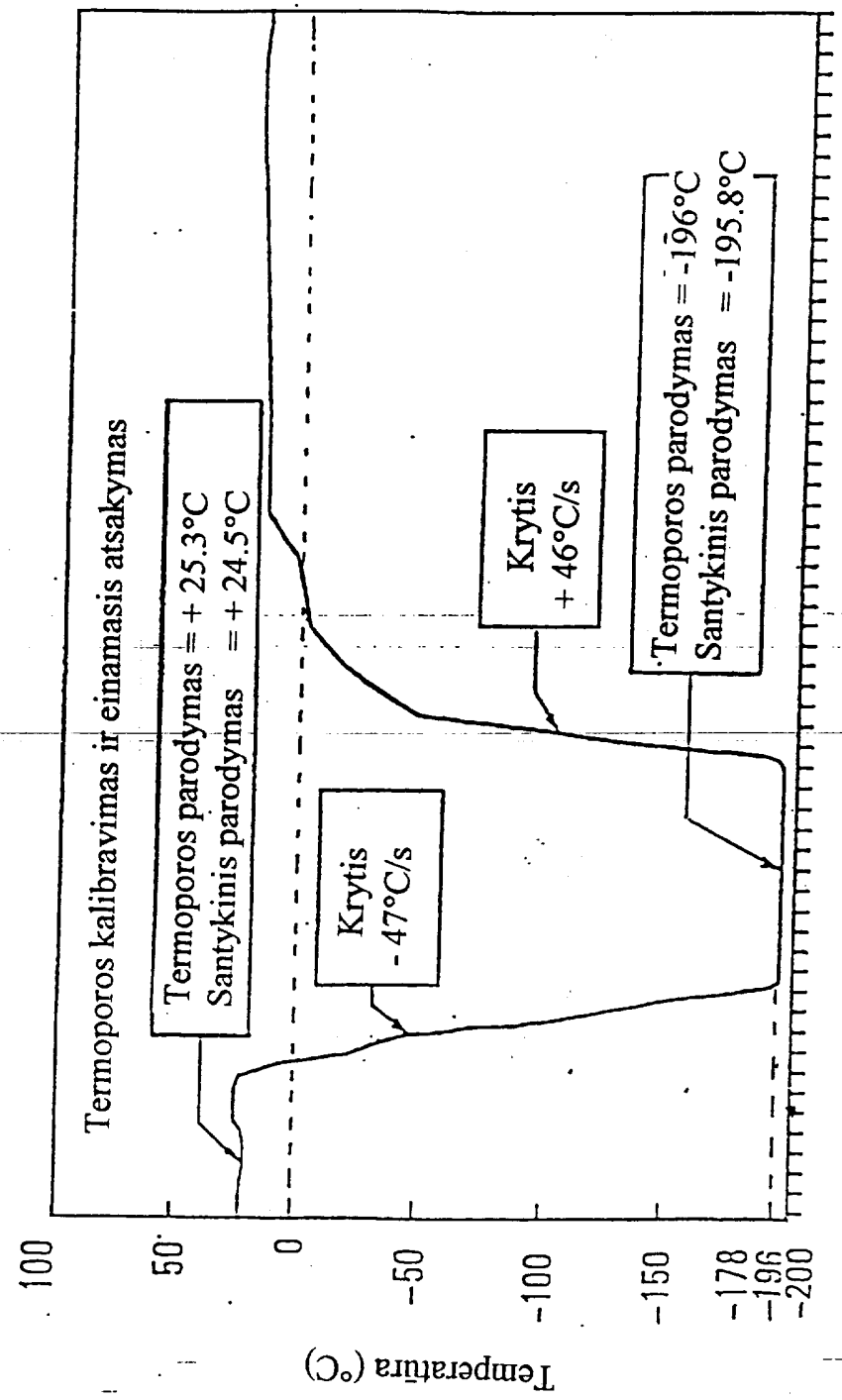

Termoporos kalibravimas ir einamasis atsakymas
Termoporos parodymas = + 25.3°C
Santykinis parodymas = + 24.5°C
Krytis
- 47°C/s
Krytis
+ 46°C/s
Termoporos parodymas = -196°C
Santykinis parodymas = -195.8°C
100
50
0
-50
-100
-150
-178
-196
-200
Temperatūra (°C)
Laikas (sekundės)

FIG 5

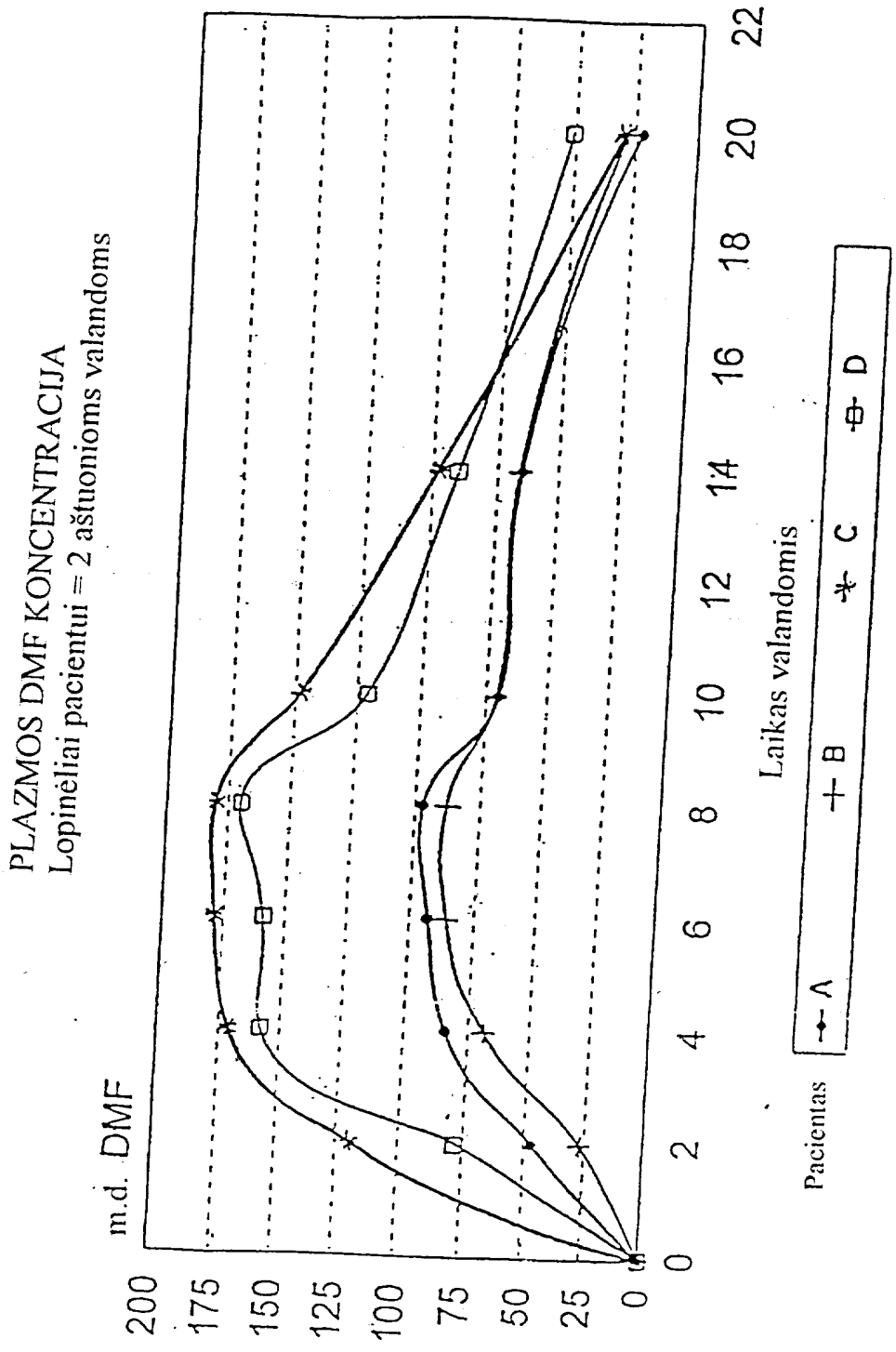

PLAZMOS DMF KONCENTRACIJA
Lopinėliai pacientui = 2 aštuonioms valandoms
m.d. DMF
200
175
150
125
100
75
50
25
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
Laikas valandomis
Pacientas
A
B
C
D

FIG 6

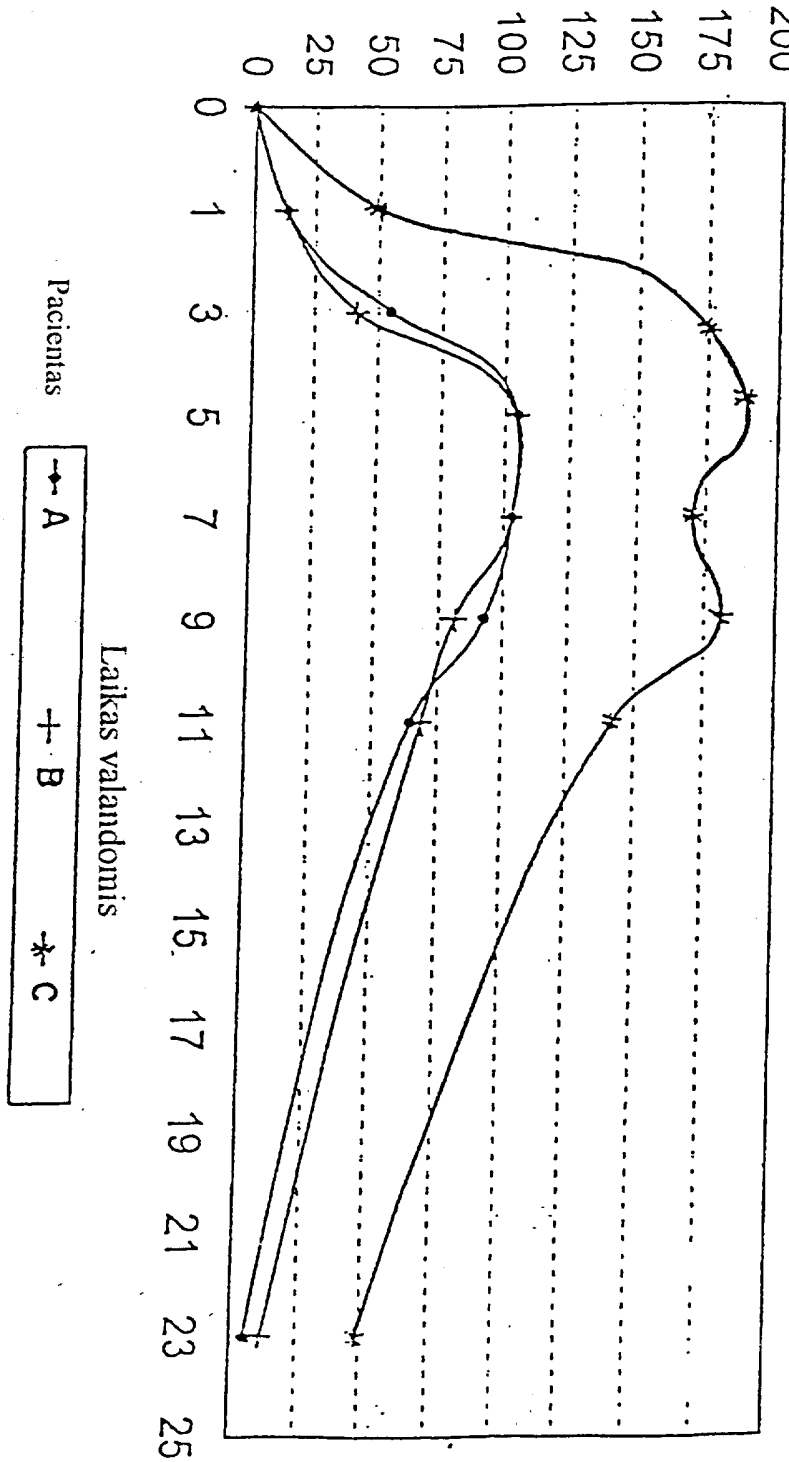

PLAZMOS DMF KONCENTRACIJOS
Lopinėliai pacientui = 2 šešioms valandoms
m.d. DMF
200
175
150
125
100
75
50
25
0
0 1 3 5 7 9 11 13 15 17 19 21 23 25
Laikas valandomis
Pacientas
A
B
C

FIG 7

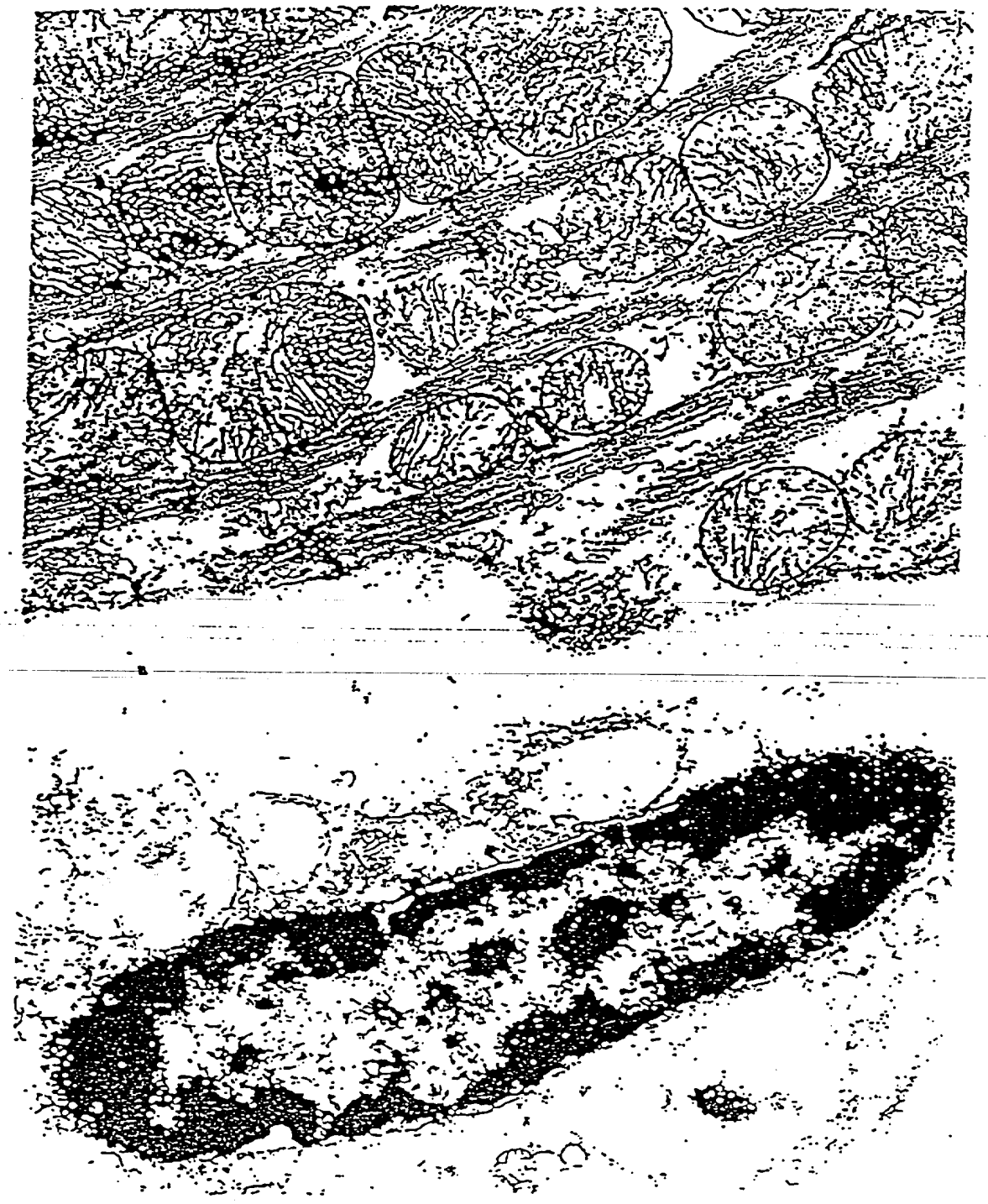


FIG 8

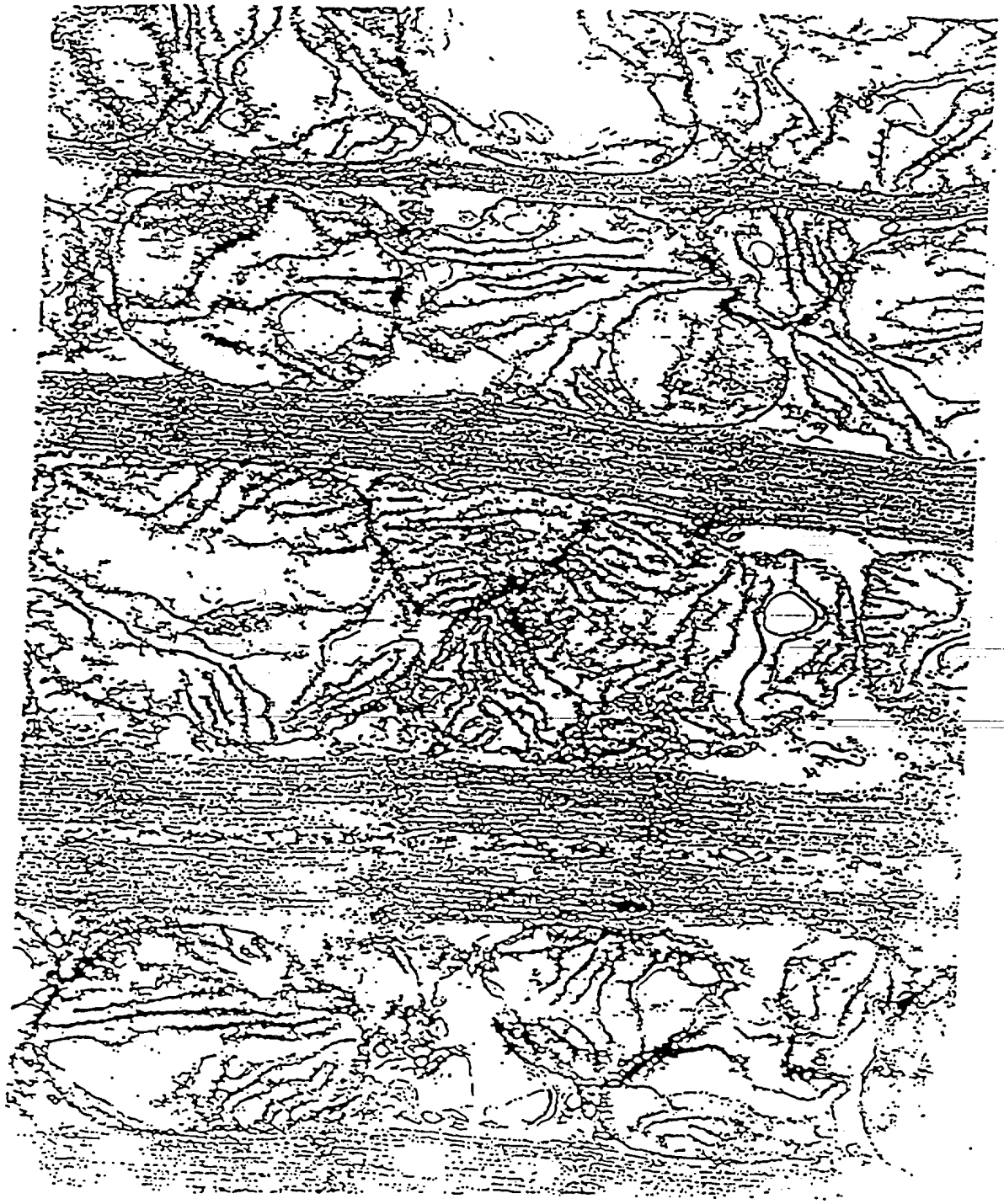


FIG 9



FIG 10