



P03 3294

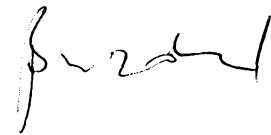
Repinotan készlet

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

K I V O N A T

A találmány egy, a repinotant vagy a repinotan fiziológiásan elfogadható sóját tartalmazó gyógyszerkészítményt és egy, a repinotan vagy metabolitjainak testfolyadékban lévő koncentrációjának meghatározására szolgáló eszközt magában foglaló készletre, továbbá repinotant vagy fiziológiásan elfogadható sóját tartalmazó új gyógyszerkészítményekre és ezek előállítására szolgáló eljárásokra vonatkozik.

Ellenőrző ábra: 





P05 3294

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

Repinotan készlet

A2

A találmány egy, a repinotant vagy a repinotan fiziológiásan elfogadható sóját tartalmazó gyógyszerkészítményt és egy, a repinotan vagy metabolitjainak testfolyadékokban lévő koncentrációjának meghatározására szolgáló eszközt magában foglaló készletre, továbbá a repinotant vagy fiziológiásan elfogadható sóját tartalmazó új gyógyszerkészítményekre és ezek előállítására szolgáló eljárásokra vonatkozik.

10 A neurodegeneratív betegségek, mint pl. stroke (szélhűtés) és kraniocerebrális trauma (a koponyához és az agyhoz tartozó trauma), amelyek ezekben a betegekben gyakran hosszú távú neurológiai és funkcionális rendellenességekhez vezetnek, akut kezelésére mostanáig egyetlen kezelési elvet
15 sem fogadtak el világszerte hatékonynak. A trombolitikumok (például t-PA) isémiás stroke utáni első 3 órában történő felhasználásán vagy a nimodipin traumás szubarachnoidális (pókhálóhártya alatti) haemorrhágiás (vérzéses) betegekben történő felhasználásán kívül még mindig nem állnak rendelkezésre olyan gyógyító megközelítések, amelyek kellőképpen
20 figyelembe vennék a patofiziológiai kaszkádot.

Az EP-A-0352613 számú irat a 2[4-(((2R)-kromán-2-il]-metil)-amino)-butil]-1,2-benzizotiazol-3-(2H)-on-1,1-dioxidot (generikus név: repinotan) és repinotan-sókat ismer-
25 tet a központi idegrendszer betegségeinek, különösen stroke kezelésére.

A DE-A-19543476 számú irat a repinotan és sói alkalmasságát ismerteti a kraniocerebrális trauma kezelésére.

A repinotan számos klinikai vizsgálatban jó tolerálhatóságot mutat egészséges alanyokban és stroke vagy kraniocerebrális trauma után lévő betegekben. Ezenkívül a rendelkezésre álló klinikai adatok azt mutatják, hogy lehetséges
30

volt a neurológiai és funkcionális hiányt javítani (3 és 6 hónap után külön-külön az indikációtól függően). Azon betegek esetében, akik 5-20 $\mu\text{g/l}$ vérplazma-koncentrációt értek el, a kezelés eredménye feltűnően jobb volt, mint a placebo kapó betegek esetében.

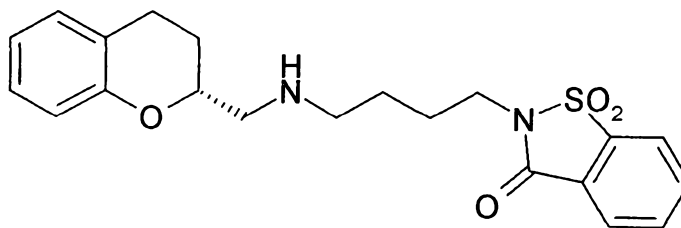
Különösen jó kezelési eredmény érhető el a találmány szerinti készlet felhasználásával, amely repinotant vagy fiziológiásan elfogadható sóját tartalmazó gyógyszerkészítményt tartalmaz és egy eszközt a repinotan vagy metabolitjainak testfolyadékokban lévő koncentrációjának meghatározásához.

A találmány szerinti készlet felhasználása lehetővé teszi, hogy egy gyógyszert, amely hatóanyagként repinotant tartalmaz szabad bázis vagy savaddíciós só formájában, beadjunk és röviddel a beadás után meghatározzuk a repinotan vagy metabolitjának aktuális koncentrációját a kezelt beteg testfolyadékában. Így késleltetés nélkül és a személyzet és felszerelés tekintetében alacsony költségekkel kivitelezhető annak a dózisnak a beállítása, amely adott esetben az optimális terápiához szükséges. A találmány szerinti készlet ezért a neurodegeneratív betegségek, különösen a stroke és a kraniocerebrális trauma akut terápiájában jelentős fejlődést képvisel.

A gyógyszerkészítmények, amelyeket a találmány szerinti készlet tartalmaz, például tabletták, bevont tabletták, pilulák, granulátumok, aeroszolok, szirupok, emulziók, szuszpenziók, oldatok vagy oldattá alakítható liofilizátumok formájában lehetnek jelen. A gyógyszerkészítmény hatóanyagként repinotant vagy egy fiziológiásan elfogadható sóját tartalmazza. A hatóanyag kb. 0,05-95 t%, előnyösen kb. 0,5-90 t% koncentrációban lehet jelen a teljes elegyhez viszonyítva, azaz olyan mennyiségekben, amelyek szükségesek a jelölt dózistartomány eléréséhez. A gyógyszerkészítmény a

hatóanyagon kívül továbbá inert, nem-toxikus, gyógyszerészetiileg alkalmas segédanyagokat tartalmaz.

A repinotan az alábbi szerkezeti képlettel rendelkezik:



5

A repinotan fiziológiásan elfogadható sói a repinotan ásványi savakkal, karbonsavakkal vagy szulfonsavakkal képzett sói lehetnek. A repinotan előnyös sói a sósavval, hidrogén-bromiddal, kénsavval, foszforsavval, metánszulfonsavval, etánszulfonsavval, toluolszulfonsavval, benzolszulfonsavval, naftalin-diszulfonsavval, ecetsavval, propionsavval, tejsavval, borkősavval, citromsavval, hangyasavval, almasavval vagy benzoesavval képzett sói. A repinotan-hidroklorid különösen előnyös.

15 A kötőanyag típusa a formulázás módjától függ. Kötőanyagként megemlíthető például a víz, nem-toxikus szerves oldószerek, mint paraffinok (pl. petróleum frakciók), növényi olajok (pl. földi mogyoró/szezám olaj), alkoholok (pl. etil-alkohol, glicerín), hordozóanyagok, mint például természetes földpátok (pl. kaolinok, agyagos föld, talkum, kréta), szintetikus földpátok (pl. nagy diszperzitású meta-

20 kovasav, szilikátok), cukrok (pl. szacharóz, laktóz és dextróz), emulgeálószeres (pl. poli(oxi-etilén)-zsírsav-észterek, poli(oxi-etilén)-zsíralkohol-éterek), diszpergálószeres (pl. lignin-szulfid ipari szennyvizek, metil-

25 cellulóz, keményítő és polivinil-pirrolidon) és lubrikánsok (pl. magnézium-sztearát, talkum, sztearinsav és nátrium-szulfát).

A találmány szerinti készlet gyógyszerkészítményként



előnyösen egy hatóanyag-tartalmú infúziós oldatot vagy egy szilárd gyógyszerkészítményt tartalmaz, amelyből ez az infúziós oldat víz vagy izotóniás elektrolit-oldat hozzáadásával elkészíthető.

5 Egy előnyös szilárd gyógyszerkészítmény a liofilizátum, amely víz vagy egy izotóniás elektrolit-oldat hozzáadásával például infúziós oldattá helyreállítható. A liofilizátumban a hatóanyag megnövelt tárolási stabilitással rendelkezik, és steril körülmények között a liofilizátumból
10 könnyen és gyorsan előállítható egy részecske-mentes oldat, amely közvetlenül alkalmas a betegben történő felhasználásra, például infúziós oldatként. A liofilizátum előnyösen a hatóanyagon kívül további gyógyszerészetileg alkalmas kötőanyagokat tartalmaz, különösen mátrix-képző szereket.

15 A találmány értelmében mátrix-képző szerek az aminosavak, mint pl. glicin, alanin vagy aszparaginsav, peptidek, mint pl. a zselatin, kollagén vagy albumin, monoszacharidok, mint pl. a glukóz vagy laktóz, diszacharidok, mint pl. a maltóz, szacharóz vagy trehalóz, oligoszacharidok,
20 mint pl. ciklodextrinek vagy maltodextrinek, poliszacharidok, mint pl. keményítő és keményítő-származékok vagy cellulóz és cellulóz-származékok, polimer mátrix-képző szerek, mint pl. polivinil-pirrolidon vagy polietilén-glikol, nátrium-kloriddal vagy kalcium-karbonáttal képzett sók, cukoralkoholok, mint pl. mannit, szorbit vagy xilit. Előnyösek a
25 mannit, nátrium-klorid, glicin, szacharóz, maltóz és laktóz. A mannit különösen előnyös.

Ha a liofilizátum helyreállításával infúziós oldatot kapunk, az előnyösen izotóniás. Ez elérhető úgy, hogy a
30 liofilizátum már megfelelő mennyiségű elektrolitot tartalmaz, mint például nátrium-klorid, mannit vagy glukóz vagy azáltal, hogy az oldat helyreállításához és hígításához egy izotóniás elektrolit-oldatot alkalmazunk.

Izotóniás elektrolit-oldatok például a vizes 0,9t% nátrium-klorid-oldatok vagy 5t% glukóz-oldatok.

A hatóanyag mennyisége az infúziós oldatban kb. 0,1 µg/ml-1 mg/ml, előnyösen kb. 0,5-5 µg/ml.

5 A repinotan és repinotan sók előállítását az EP-A-0352613 közrebocsátási iratban ismertetik. A repinotan-hidroklorid megfelel a 92H példának.

A találmány szerinti sók továbbá a szabad bázis repinotan alkalmas oldószerben, sztöchiometrikus vagy szuper-
10 sztöchiometrikus mennyiségű sóképző savval történő reagáltatásával állíthatók elő 0°C és az oldószer forráspontja közötti hőmérsékleten. Alkalmas oldószeres példák a víz, alifás alkoholok, mint pl. metanol, etanol vagy 2-propanol, alifás nyíltláncú vagy ciklusos éterek, mint pl. dietil-
15 éter, terc-butil-metil-éter, dioxán, tetrahidrofuran vagy alifás ketonok, mint pl. 2-propanon és ezek keverékei. A sókat közvetlenül ebből az elegyből szilárd anyag formájában nyerjük ki, adott esetben az oldószer részleges vagy teljes bepárlása után; a sókat a fent megadott oldószer-
20 ben vagy ezek elegyében történő átkristályosítással vagy újra kicsapással tisztíthatjuk.

A készlet találmány szerinti gyógyszerkészítményei a repinotannak és sóinak elegyét vagy a különböző repinotan-sók elegyét tartalmazhatják.

25 A repinotan és fiziológiásan elfogadható sói inert, nem-toxikus, gyógyszerészetileg elfogadható vivőanyagok vagy oldószeres felhasználásával, ismert módszerekkel megszokott készítményekké, mint pl. tabletták, bevont tabletták, pilulák, granulátumok, aeroszolok, szirupok, emulziók,
30 szuszpenziók és oldatok alakíthatók. Előnyös hatóanyag-oldatok vagy szilárd gyógyszerkészítmények azok, amelyek átalakíthatók egy oldattá, mint például a liofilizátumok. A terápiásan hatékony vegyület mindegyik esetben kb.

0,05-95 t%, előnyösen kb. 0,5-90 t% koncentrációban van jelen a teljes elegyhez viszonyítva, azaz olyan mennyiségben, amely elégséges a jelzett dózistartomány eléréséhez.

A készítmények például a hatóanyag oldószerrel és/vagy
5 kötőanyaggal történő növelésével, ha megfelelő, emulgeálószer és/vagy diszpergálószer felhasználásával állíthatók elő, ahol, amikor például hígítószerként vizet alkalmazunk, adott esetben segédoldószerként szerves oldószereket alkalmazhatunk.

10 A találmány szerinti készlet továbbá egy eszközt tartalmaz a repinotan vagy metabolitjainak testfolyadékban lévő koncentrációjának meghatározásához.

Vizsgálendő anyagként (analit) előnyös lehet az alkalmazott hatóanyag helyett a repinotan egy metabolitjának
15 meghatározása. A repinotan metabolitjait leírták.

A találmány értelmében a testfolyadékok például a vizelet, vér és vérből kapott frakciók, mint pl. szérum vagy plazma. Előnyösek a vér és a vérből kapott frakciók, különösen előnyös a vérplazma.

20 A repinotan koncentrációját a vérben vagy a vérből kapott frakciókban határozzuk meg, előnyösen a vérplazmában.

A koncentráció meghatározásához alkalmas szerek például a kromatográfiás készülékek, mint pl. folyadék- vagy gázkromatográfia, amely adott esetben tömegspektroszkópiával (LC-MS vagy GC-MS) párosítható. Immunológiai eljárások
25 szerint működő eszközök ugyancsak alkalmasak, mint például az ELISA (enzim-kapcsolt immunoszorbens assay). Ezen típusú eszközök ismertek.

Különösen alkalmas eszközök azok, amelyek a kezelés
30 helyén alkalmazhatók („bedside” vagy „point-of-care” tesztek), mivel ezekkel egy optimális terápiához adott esetben szükséges dózis-beállítás késleltetés nélkül kivitelezhető.

A találmány szerinti készletben lévő előnyös eszközök

a WO-A-99/46591 számú iratban ismertetett vizsgálandó minták koncentrációjának meghatározására szolgáló készülékek. Ezek a készülékek az ott leírt eljárások szerint előállíthatók és alkalmazhatók, és lehetővé teszik, hogy a dózis beállítása, amely adott esetben az optimális terápiához szükséges, késleltetés nélkül és a személyzet és felszerelés tekintetében alacsony költségekkel kivitelezhető legyen.

A találmány szerinti készlet különösen alkalmas a neurodegeneratív betegségek, különösen stroke vagy kranio-cerebrális trauma akut kezelésére.

A találmány szerinti gyógyszerkészítményt megszokott módon, előnyösen orálisan vagy parenterálisan, különösen nyelven keresztül vagy intravénásan adagoljuk. Orális beadás esetében, a megadott kötőanyagokon kívül a tabletták adalékanyagokat is tartalmazhatnak, mint pl. nátrium-citrát, kalcium-karbonát és dikalcium-foszfát különböző további anyagokkal együtt, mint pl. keményítő, előnyösen burgonyakeményítő, zselatin és hasonlók. Továbbá lubrikánsok, mint pl. magnézium-sztearát, nátrium-lauril-szulfát és talkum is alkalmazhatók a tablettázáshoz. A vizes szuszpenziók esetében, a fent megadott kötőanyagokon kívül, a hatóanyag különböző ízesítő vagy színezőanyagokkal kezelhető. A parenterális beadás esetében, a hatóanyagok oldatai alkalmas folyékony hordozóanyagokkal együtt alkalmazhatók.

Az intravénás adagolás esetén a hatékony eredmények eléréséhez előnyösnek bizonyult a hatóanyag kb. 0,01 µg/kg/óra - 10 µg/kg/óra (µg vagy mg/testtömeg kg/óra), előnyösen kb. 0,05 µg/kg/óra - 2 µg/kg/óra mennyiségben történő adagolása. Az adagolás minden esetben individuális dózisok formájában történhet.

Orális beadás esetén a hatóanyag napi dózisa 0,001-0,2 mg/kg, előnyösen 10-100 µg/testtömeg kg.

Ennek ellenére, ha helyénvaló, szükséges lehet a megadott mennyiségektől való eltérés, mégpedig a testtömegtől vagy a beadás módjától, az egyén gyógyszerrel szembeni viselkedésétől, a formulázás módjától és az adagolás idejétől vagy időszakától függően. Ezért néhány esetben a fent megadott minimum mennyiségnél kevesebb is elegendő lehet, míg más esetekben a fent megadott felső határt túl kell lépni. Viszonylag nagy mennyiségek beadása esetén, ajánlatos lehet annak néhány egyéni dózistra történő szétosztása a nap folyamán.

Ahhoz, hogy a beteget a repinotan terápiásan legkedvezőbb koncentrációjára beállítsuk, a repinotan egy meghatározott kezdeti dózisát adagoljuk a betegnek, a repinotan koncentrációját rögzített, előre meghatározott idő után ellenőrizzük a találmány szerinti szer felhasználásával és a további dózist ezt követően adott esetben beállítjuk.

Például a betegeknek repinotan-hidroklorid tartalmú oldatot adunk infúzióban 1,25 mg repinotan/nap mennyiségben. 6 óra elteltével a találmány szerinti reagens felhasználásával meghatározzuk, hogy a repinotan plazma koncentrációja kb. 17 $\mu\text{g/l}$ felett vagy alatt van-e. Ha a repinotan plazma koncentrációja a jelölt küszöb koncentráció alatt van, az infúzió adagolását a megadott mértékben folytatjuk. Azonban, ha a repinotan plazma koncentrációja meghaladja a jelölt küszöb koncentrációt, az infúzió mértékét 0,5 mg repinotan/nap értékre csökkentjük. 12 órával az infúzió megkezdése után a repinotan plazma koncentrációját tovább ellenőrizzük. Megismételve tehát, az infúzió sebességét fenntartjuk, ha a repinotan plazma koncentrációja kisebb, mint kb. 17 $\mu\text{g/l}$ és 0,625 vagy 0,25 mg repinotan/nap értékre csökkentjük, ha a repinotan plazma koncentrációja meghaladja a kb. 17 $\mu\text{g/l}$ -t. Ilyen módon maximális számú betegnél lehetséges a repinotan plazma koncentrációját a kb.

5-20 µg/l közötti legkedvezőbb terápiás dózistartományban tartani.

Egy további szempont szerint a találmány repinotant vagy fiziológiásan tolerálható sóját és egy fiziológiásan
5 elfogadható savat tartalmazó gyógyszerkészítményekre vonatkozik.

Meglepő módon úgy tűnik, hogy egy fiziológiásan elfogadható sav hozzáadásával a repinotant vagy fiziológiásan tolerálható sóját tartalmazó szilárd gyógyszerkészítmények
10 tárolási stabilitása nő.

A találmány oltalmi körébe tartozó fiziológiásan elfogadható savak például a almasav, aszkorbinsav, benzoesav, borostyánkősav, piroszőlősav, citromsav, hangyasav, glutaminsav, glikolsav, hippursav, maleinsav, tejsav, kénsav,
15 szorbinsav, borkősav vagy fahéjsav. Az almasav, piroszőlősav, citromsav, hangyasav, maleinsav, tejsav és borkősav előnyösek. A citromsav és borkősav különösen előnyösek.

A találmány szerinti hatás különösen szilárd gyógyszerkészítményekkel érhető el, amelyekben a hatóanyag, azaz a repinotan vagy fiziológiásan tolerálható
20 sói 0,01-15 t%-át és a fiziológiásan elfogadható sav 0,5-15 t%-át alkotja a készítmény össztömegének.

Szilárd gyógyszerkészítmények, amelyek repinotan-hidrokloridot és citromsavat vagy borkősavat tartalmaznak, különösen előnyösek.
25

A találmány szerinti szilárd gyógyszerkészítmények szokásos eljárások szerint előállíthatók.

A találmány egy további szempontja repinotant vagy fiziológiásan elfogadható sóit és egy fiziológiásan elfogadható savat tartalmazó liofilizátumokra vonatkozik, az előnyös hatóanyag a repinotan-hidroklorid és előnyös savak az almasav, piroszőlősav, citromsav, hangyasav, maleinsav, tejsav és borkősav, különösen a citromsav és borkősav. To-
30

vábbbá a liofilizátumok előnyösen gyógyszerészeti kötőanyagokat tartalmazhatnak, mint például a fent megadott mátrixképző szerek.

5 A liofilizátum előállításához például a repinotan vagy repinotan só, a fiziológiásan elfogadható sav és adott esetben további gyógyszerészeti kötőanyagok fent megadott mennyiségét vízben és/vagy más alkalmas oldószerben oldjuk, sterilizáljuk, alkalmas tartályokba töltjük, és fagyasztva szárítjuk.

10 A találmány ezen céljára alkalmas oldószeres példák a jégecet vagy terc-butanol.

Az oldat szokásos módon előállítható 5-35°C hőmérsékleten, előnyösen 20-25°C-on. A találmány értelmében az oldat sterilizálásának jelentése az oldat steril állapotba történő átalakítása, például steril szűréssel egy 0,2 µm maximális pórusmérettel rendelkező szűrőn keresztül, amely alkalmas szűrőanyagból, például poliéter-szulfon vagy Nylon 6.6, készül.

Alkalmas tartályok a fagyasztva szárításhoz például a 20 fűvott üvegek vagy csőalakú üvegpalackok. Az oldatot 0,2-20 ml, előnyösen 0,5-5 ml, különösen előnyösen 0,7-3,0 ml közötti térfogatokra osztjuk szét.

Az oldatot a tartályokban fagyasztva szárítjuk. Ehhez az oldatot tartalmazó edényeket előre-hűtött vagy előre nem 25 hűtött tálcákra tesszük és fagyasztjuk. Az ezt követő főszárítást vákuumban 0,05-1,8 mbar kamranyomáson -40°C - +60°C lemez hőmérsékleten kivitelezünk. Az utószárítást 1 µbar-1,8 mbar kamranyomáson -20°C - +70°C tálcák hőmérsékleten végezzük.

30 Vagyilagosan a fagyasztva szárító eljárást a PCT/EP00/07034 számú nemzetközi bejelentésben ismertetett eljárás szerint is kivitelezhetjük. A fent megadott készítmények tárolás-stabil liofilizátumait fagyasztva szárítás

útján formulázzuk.

A találmány továbbá infúziós oldatokra vonatkozik, amelyek repinotant vagy egy fiziológiásan elfogadható sóját és egy vagy több savat tartalmaznak, az almasav, piro-
5 szőlősav, citromsav, hangyasav, maleinsav, tejsav és borkő-
sav, előnyösen citromsav vagy borkősav közül kiválasztva.

A találmány szerinti infúziós oldatok előre nem várt nagy tárolási stabilitást mutatnak.

Az infúziós oldat a találmány értelmében egy olyan ol-
10 dat, amely oldószerként főként vizet tartalmaz és rendszerint 250-500 mOsmol/kg, előnyösen 280-350 mOsmol/kg ozmolalitású. Az infúziós oldat fent megadott ozmolalitása elérhető úgy, hogy például a szilárd gyógyszerkészítmény a nátrium-klorid, mannit vagy glukóz szükséges mennyiségét
15 már kiinduláskor tartalmazza és ez vízzel helyreállítható és/vagy hígítható, vagy úgy, hogy ezen anyagok szükséges mennyiségét a helyreállító/hígító közeggel adjuk a készítményhez. Az infúziós oldatban a repi-notan koncentrációja általában 0,1-500 μg repinotan/ml oldat, előnyösen
20 0,5-5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Az infúziós oldat elegendő savat tartalmaz akkor, ha 20°C-on a pH értéke 3,5-5, előnyösen kb. 4.

Ezeket az oldatokat normál esetben szobahőmérsékleten adagoljuk.

A találmány szerinti megoldást a következő példákkal
25 szemléltetjük, a korlátozás szándéka nélkül.

Példák:

1. példa: Repinotan-hidrokloridot tartalmazó készítmény liofilizálása

55 mg repinotan-hidroklorid (50 mg repinotannak megfelelő), 20 g mannit és 3,7 g citromsav elegyét vízzel
30 1000 ml-re hígítjuk. Ezt a vizes oldatot sterilre szűrjük poliéter-szulfonból készült 0,2 μm maximális pórusnagyságú szűrőn keresztül és csőalakú üveglombokba szétosztjuk. Az

oldat adagolási térfogata 1 ml.

Az oldatot a csőalakú üveglombikokban fagyasztva szárítjuk. Ehhez az oldatot tartalmazó csőalakú üveglombikokat szobahőmérsékleten a fagyasztva szárító tálcájára helyezzük és -40°C-on lefagyasztjuk. Az ezt követő főszárítást vákuumban 0,2 mbar kamranyomáson és 0°C tálca hőmérsékleten kivitelezzük. Az utószárítást 10 µbar kamranyomáson 40°C tálca hőmérsékleten végezzük. A tárolás-stabil végső termék fagyasztva szárítás segítségével keletkezik.

10 Vagylagosan a fagyasztva szárítás a PCT/EP00/07034 számú nemzetközi bejelentésben ismertetett eljárás szerint is kivitelezhető.

Az 1. példában leírt eljárással analóg módon 0,27 g, 0,681 g, 1,36 g és 2,73 g repinotan-hidrokloridot, amely külön-külön 0,25 g, 0,625 g, 1,25 g és 2,5 g repinotannak felel meg, tartalmazó liofilizátumokat állítottunk elő az 1. példában alkalmazott mannit, citromsav és víz mennyiséggel.

2. példa: Repinotan-hidrokloridot tartalmazó infúziós oldat

20 Az 1. példa szerinti liofilizált termékből egy felhasználásra kész infúziós oldatot állítunk elő úgy, hogy a liofilizátumot 0,9 t% NaCl-oldat hozzáadásával helyreállítjuk, majd ezt az oldatot 500 ml teljes térfogatra hígítjuk. A felhasználásra alkalmas oldat tárolás során szobahőmérsékleten, legalább 30 órán át kémiaiilag stabil, azaz az oldat még mindig legalább 90% változatlan repinotant tartalmaz.

3. példa: Repinotan meghatározása ELISA segítségével mikrotiter lemezekon

30 A tesztet egy kompetitív ELISA alapján kivitelezzük. Egy repinotan-analóg haptén fehérje-konjugátumát állandó mennyiségű, a repinotan szerkezetére specifikus monoklonális vagy poliklonális antitest Fab vagy Fab2 fragmenssel és

egy állandó térfogatú repinotan-tartalmú mintával reagáltatjuk. A kötött fehérje-konjugátumnak a szabad fehérje-konjugátumhoz viszonyított arányából ezután a repinotan-koncentráció meghatározható egy kalibrációs görbe segítségével, amelyet párhuzamosan, a vizsgált minta ismert repinotan-koncentrációinak felhasználásával szerkesztünk meg.

A kecske-IgG az alábbiakban megnevezett repinotan-analógokhoz kémiaailag 1:7,5 moláris arányban kötődik. Ezt a konjugátumot 0,1 mol/l nátrium-karbonát pufferben pH=9,6, 37°C-on, 1 órán át inkubáljuk egy mikrotiter lemezen (pl. Dynex Immulon 2HB). Szobahőmérsékleten 30 percig blokkoljuk egy foszfáttal pufferolt, kazein-tartalmú (1%) sóoldat felhasználásával. Ezt követően Tween-tartalmú (0,05%) foszfát-pufferolt sóoldattal háromszor átmoszuk.

A kompetitív teszt most már ezen az úton előállított lemezen kivitelezhető. Ehhez 100 µl mintát helyezünk egy mikrotiter lyukba és 100 µl antitest oldattal (egér anti-repinotan antitest 10 ng/ml foszfát-pufferolt sóoldatban) kezeljük. Az elegyet szobahőmérsékleten 1 órán át inkubáljuk. Mosó-pufferrel (lásd fent) háromszor kimossuk, majd egy további reakcióban egy második, torma-peroxidázhoz kapcsolt antitestet (1:1, Zymed kecske-anti-egér IgG; 1:1000 hígítva) pipetázunk a mikrotiter lyukba. Ez a repinotan-specifikus egér antitesthez kötődik, amely a repinotan-analóg haptén-konjugátumhoz kötött. Az ilyen módon kötődő repinotan-specifikus egér antitest mennyisége közvetetten arányos a mintában lévő szabad repinotan mennyiségével. Háromszori kimosás után a felesleges antitest-enzim konjugátum kimosódik és az enzim-szubsztrát (TMB) hozzáadása után a visszamaradó kötés mennyiségét fotometriásan, kinetikus mérés segítségével meghatározzuk. Az ismertetett protokoll alkalmazásával 1 és 100 ng/ml közötti repinotan-koncentráció megfelelő kalibrátorok felhasználásával meghatározható.

4. példa: „Point-of-care” repinotan teszt

Ez a repinotan teszt az intenzív ellátás és más kórházi területeken történő felhasználásra szolgál a repinotan egy adott kb. 17 ng/ml küszöb-koncentráció feletti és alatti koncentrációinak meghatározására a teljes vérben, szérumban vagy plazmában. Ez egy egyszeri teszt vizuális mérési eredménnyel.

A készülék ismertetése:

A teszt alapja egy kompetitív immunológiai eljárás
10 fent ismertetett kis molekulák meghatározására. Leolvasó mechanizmusként, egy enzimes spektroszkópiás eljárás helyett, a kolloidális aranyrészecskékről visszaverődő jelet alkalmazzuk. A hagyományos immunoassay kivitelezéséhez szükséges összes teszt vegyület és mechanikai művelet egy
15 műanyag eszközbe van beépítve. Ez magában foglalja a vörsejtek szérumtól történő elválasztásának mechanizmusát és az egzakt mérés mechanizmusát az ilyen módon elválasztott adott mennyiségű szérumból. Egy puffer tartály a reakcióhoz szükséges folyadék fázist tartalmazza, amely lehetővé teszi
20 a rendszeren belüli kapilláris mozgást. Az anti-repinotan antitest és haptén-kecske IgG-arany konjugátum a műanyag eszköz reakciós sejtjébe van liofilizálva. A kapilláris végénél egy keverő kamra és egy immunkromatográfiás tesztcsík teszi teljessé a rendszert. Stacionárius reakciózónákat
25 alkalmazunk a tesztcsíkokhoz: egy számár anti-egér antitestet és egy nyúl anti-kecske antitestet.

Repinotan hiányában a számár anti-egér antitest az arany konjugátum túlnyomó részét befogja és egy piros színű zónát képez. Növekvő repinotan-koncentrációval a meghatározandó mintában az anti-repinotan antitesttel arányosan ki-
30 szorított arany konjugátum a nyúl anti-kecske reakcióban kerül befogásra.

Az immunkromatográfiás tesztcsík végén egy abszorpciós

zóna van, amelynek az elején egy vízoldékony festéket alkalmazunk. Ez a festék a folyadék vonalával előremozdul az abszorpciós zóna végéig. Ez jelzi a tesztreakció végét.

A teszt ideje kb. 15 perc a minta alkalmazásától az eredmény leolvasásáig. A teszt 100-150 µl teljes vérrel kivitelezhető, amely a kb. 15 µl szérum létrehozását garantálja.

Az alábbi reakció-komponensek szükségesek a teszt eszköz előállításához:

- 10 a) monoklonális anti-repinotan
- b) arany-repinotan analóg-kecske IgG konjugátum
- c) kolloidális arany, 20 nm
- d) nitrocellulóz membrán
- e) kecske anti-egér
- 15 f) nyúl anti-egér
- g) repinotan standard
- h) 0,2 % Triton X 305 foszfát-pufferolt sóoldat teszt pufferben
- i) 0,4% Nonidet P-40, 2% BSA, 2,5% szacharóz, 1,25% trehalóz foszfát-pufferolt sóoldat liofilizált pufferben
- 20 j) 2,5 cm elnyelő (sink) anyag
- k) műanyag alátét/alap, 5,3 cm széles és 8 mm vastag
- l) humán szérum

25 Teszt eljárás:

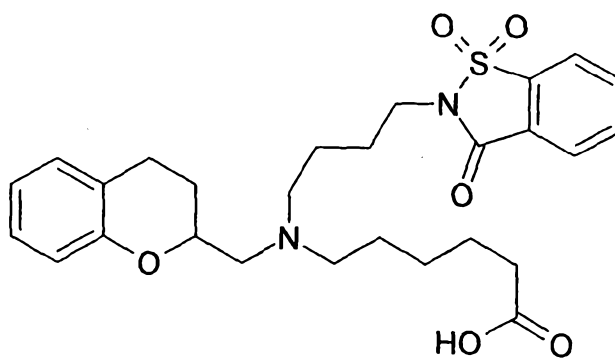
Körülbelül 150 µl teljes vért (5 csepp), szérumot vagy plazmát alkalmazunk a minta lemezhez. Az eszközt vízszintes helyzetben tartjuk kb. 3 percig. Ezután a dózizrozó lombik fogóját 90°-kal elforgatjuk, míg az az eszköz alján vízszintesen nem fekszik. Ezt követően az eszközt 15 percig szobahőmérsékleten vízszintes helyzetben tartjuk. Amikor az indikátor ablakban a kék pont megjelenik, a teszt a végéhez ért és az eredmények leolvashatók.

A minta alkalmazásán és a hozzáadott lombik működésén kívül a mintával vagy az eszközzel végrehajtott további művelet nem szükséges a teszt teljes kivitelezéséhez. A teszt ezért nem-technikai személyzettel is kivitelezhető.

5 Kiértékelés:

Amint a WO 99/46591 számú irat ismerteti, az A és B ablakban megjelenő két sáv intenzitásának összehasonlítása lehetővé teszi a repinotan-koncentráció egyszerű fél-kvantitatív meghatározását. Ha az A ablakban a jel intenzívebb, mint a B ablakban lévő, a repinotan-koncentráció egy bizonyos küszöbérték felett van, fordított intenzitás-megoszlás esetében a küszöbérték alatt van. A küszöbérték a liofilizátum anti-repinotan antitest koncentrációjának és az arany-repinotan analóg-kecske IgG-k koncentrációjának aránya segítségével állapítható meg.

A repinotan analóg az arany-repinotan analóg-kecske IgG konjugátumban egy alábbi képletű vegyület:



20

Ez a vegyület új, és az EP-A-0352613 számú közrebocsátási iratban ismertetett eljárás szerint előállítható, például repinotan és tercier-butyl-6-brom-hexán-karboxilát reagáltatásával egy bázis jelenlétében alkalmas oldószerekben és ezt követő savas észter-hasítással.

25

Szabadalmi igénypontok

1. Készlet, amely tartalmaz:

a) repinotant és/vagy a repinotan fiziológiásan elfogadható sóját tartalmazó gyógyszerkészítményt, és

5 b) a repinotan vagy metabolitja testfolyadékokban lévő koncentrációjának meghatározására szolgáló eszközt.

2. Az 1. igénypont szerinti készlet, amelyben a gyógyszer-készítmény repinotan-hidrokloridot tartalmaz.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti készlet, amely
10 egy, a vérben vagy vérből kapott frakciókban lévő analit koncentrációjának meghatározására szolgáló eszközt tartalmaz.

4. A 3. igénypont szerinti készlet, amely egy, a vérplazmában lévő analit koncentrációjának meghatározására
15 szolgáló eszközt tartalmaz.

5. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti készlet, amelyben az eszköz egy immunológiai folyamat szerint működik.

6. Az 1-5. igénypont valamelyike szerinti készlet,
20 amelyben az eszköz a kezelés helyén alkalmazható.

7. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti készlet neurodegeneratív betegségek akut kezelésére.

8. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti készlet stroke vagy kraniocerebrális trauma akut kezelésére.

25 9. Szilárd gyógyszerkészítmény, amely repinotant vagy a repinotan egy fiziológiásan elfogadható sóját és egy fiziológiásan elfogadható savat tartalmaz.

10. A 9. igénypont szerinti készítmény, amelyben a hatóanyag tömegaránya 0,01-15 t% és a sav tömegaránya
30 0,5-15 t%.

11. A 9. vagy 10. igénypont szerinti készítmény, amely hatóanyagként repinotan-hidrokloridot és savként citromsa-

vat vagy borkősavat tartalmaz.

12. Eljárás a 9-11. igénypontok bármelyike szerinti készítmény előállítására, azzal jellemezve, hogy a hatóanyagot, a savat és a további gyógyszerészeti kötőanyagokat
5 vízben és/vagy más alkalmas oldószerben oldjuk, az oldatot adott esetben sterilizáljuk, majd liofilizáljuk.

13. Készítmény, amely a 12. igénypont szerinti eljárással kapható.

14. Infúziós oldat, amely repinotant vagy a repinotan
10 egy fiziológiásan elfogadható sóját és egy vagy több savat tartalmaz az almasav, piroszőlősav, citromsav, hangyasav, maleinsav, tejsav és borkősav közül.

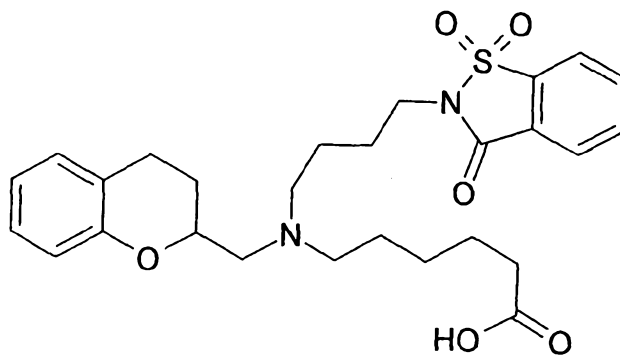
15. A 14. igénypont szerinti infúziós oldat, ahol a sav citromsav vagy borkősav.

16. Eljárás egy infúziós oldat előállítására, amely repinotant vagy a repinotan egy fiziológiásan elfogadható sóját és egy vagy több savat tartalmaz az almasav, piroszőlősav, citromsav, hangyasav, maleinsav, tejsav és borkősav közül kiválasztva, azzal jellemezve, hogy vizet vagy
20 izotóniás elektrolit-oldatot adunk egy 13. igénypont szerinti készítményhez.

17. Infúziós oldat, amely a 16. igénypont szerinti eljárással kapható.

18. A 13. igénypont szerinti készítmények alkalmazása
25 infúziós oldatok előállítására.

19. Az alábbi képletű vegyület



5

A meghatalmazott:

DANUBIA
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.
Dr. Gárdonyi Zoltánné
szabadalmi ügyvivő