

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 31/35

A61K 31/425 G01N 33/94



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01822144.0

[43] 公开日 2004 年 8 月 4 日

[11] 公开号 CN 1518446A

[22] 申请日 2001.11.9 [21] 申请号 01822144.0
[30] 优先权
[32] 2000.11.22 [33] DE [31] 10058119.6
[86] 国际申请 PCT/EP2001/012968 2001.11.9
[87] 国际公布 WO2002/041881 德 2002.5.30
[85] 进入国家阶段日期 2003.7.18
[71] 申请人 拜尔公司
地址 德国莱沃库森
[72] 发明人 W·克罗尔 F·罗姆布特
H·韦伯 M·-L·罗德里格茨
B·森亨 R·肖赫-罗普

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 谭明胜 马崇德

权利要求书 2 页 说明书 10 页

[54] 发明名称 瑞频诺坦试剂盒
[57] 摘要

本发明涉及一种试剂盒，包括一种含有瑞频诺坦或瑞频诺坦的生理上可接受的盐的药物组合物，和测定体液中瑞频诺坦或其代谢物的浓度的装置，并涉及新的含有瑞频诺坦或瑞频诺坦的生理上可接受盐的药物组合物及其制备方法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 试剂盒, 其包括
 - a) 药物组合物, 其含有瑞频诺坦和/或瑞频诺坦的生理上可接受的盐, 和
 - 5 b) 用于测定体液中瑞频诺坦或其代谢物的浓度的装置。
2. 按照权利要求 1 的试剂盒, 其中的药物组合物含有瑞频诺坦盐酸盐。
3. 按照权利要求 1 或 2 的试剂盒, 其中所述试剂盒包括用于测定血液或得自血液的级分中的被分析物的浓度的装置。
- 10 4. 按照权利要求 3 的试剂盒, 其中所述试剂盒包括用于测定血浆中的被分析物的浓度的装置。
5. 按照权利要求 1-4 任一项的试剂盒, 其中所述装置按照免疫学方法操作。
6. 按照权利要求 1-5 任一项的试剂盒, 其中的装置可以在治疗
- 15 地点使用。
7. 按照权利要求 1-6 任一项的试剂盒, 用于紧急治疗神经变性疾病。
8. 按照权利要求 1-6 任一项的试剂盒, 用于紧急治疗中风或颅脑外伤。
- 20 9. 固体药物组合物, 其含有瑞频诺坦或瑞频诺坦的生理上可接受的盐和生理上可接受的酸。
10. 按照权利要求 9 的组合物, 其中所述活性化合物的重量含量为 0.01-15 重量%和酸的重量含量为 0.5-15 重量%。
11. 按照权利要求 9 或 10 的组合物, 其中所述组合物含有瑞频诺
- 25 坦盐酸盐作为活性化合物和柠檬酸或酒石酸作为酸。
12. 制备按照权利要求 9-11 任一项的组合物的方法, 其中将所述活性化合物、酸和其它药物助剂溶于水和/或其它合适溶剂中, 任选将所述溶液灭菌, 然后将所述溶液冷冻干燥。
13. 按照权利要求 12 的方法得到的组合物。
- 30 14. 输注溶液, 其含有瑞频诺坦或瑞频诺坦的生理上可接受的盐和一种或多种选自下述的酸: 苹果酸、丙酮酸、柠檬酸、富马酸、马来酸、乳酸和酒石酸。

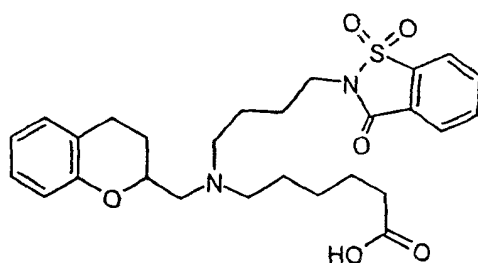
15. 按照权利要求 14 的输注溶液，其中所述酸是柠檬酸或酒石酸。

16. 用于制备含有瑞频诺坦或瑞频诺坦的生理上可接受的盐和一种或多种选自苹果酸、丙酮酸、柠檬酸、富马酸、马来酸、乳酸和酒石酸的酸的输注溶液的方法，其中向权利要求 13 的组合物中加入水或等渗的电解质溶液。

17. 按照权利要求 16 的方法得到的输注溶液。

18. 权利要求 13 的组合物用于制备输注溶液的用途。

19. 下式的化合物



10

瑞频诺坦试剂盒

本发明涉及一种试剂盒，其中包括一种含有瑞频诺坦(repinotan)
5 或瑞频诺坦生理上可接受的盐的药物组合物，和一种测定体液中瑞频诺坦或其代谢物的浓度的装置(Mittel)。本发明还涉及含有瑞频诺坦或瑞频诺坦生理上可接受的盐的新的药物组合物，以及其制备方法。

对于紧急治疗神经变性疾病，例如常常导致这些患者神经病学和功
10 能性长期缺损的中风和颅脑外伤，至今还没有治疗原则被全世界作为有效治疗而接受。除了在缺血性中风的3小时内应用溶栓药(例如t-PA)或给外伤性蛛网膜下出血的病人施用尼莫地平外，还没有充分考虑病生理级联的医学方法。

EP-A-0 352 613公开了2-[4-([(2R)-苯并二氢吡喃-2-基]甲基)
15 氨基)丁基]-1,2-苯并异噻唑-3(2H)-酮 1,1-二氧化物(通用名:瑞频诺坦)和瑞频诺坦盐用于治疗中枢神经系统疾病，尤其是中风。

DE-A-195 43 476 描述了瑞频诺坦及其盐用于治疗颅脑外伤的适用性。

在许多临床研究中，瑞频诺坦在健康个体和患中风或颅脑外伤的患
20 者中表现出良好的耐受性。此外，现有的临床数据表明神经病学或功能性缺损(取决于指征分别为3或6个月后)可得到改善。特别是在患者的血浆浓度达到约5-20 µg/l的情况下治疗的结果比获得安慰剂的患者明显的好。

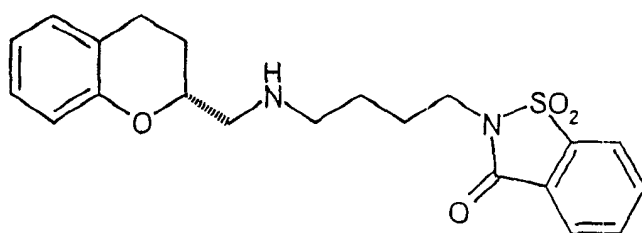
特别好的治疗结果可以应用本发明的试剂盒获得，所述试剂盒包括
25 一种含有瑞频诺坦或瑞频诺坦生理上可接受的盐的药物组合物和用于测定体液中瑞频诺坦或其代谢物的浓度的装置。

本发明试剂盒的应用容许施用含有以游离碱或其酸加成盐形式的瑞频诺坦的药物并且在短的时间内测定患者体液中的瑞频诺坦或其代谢物的实际浓度。这样可以不耽误时间并且用少的人工和设备花费进
30 行任选需要的剂量调节以进行最佳治疗。因此，本发明的试剂盒代表紧急治疗神经变性疾病，特别是中风和颅脑损伤的重要进展。

包含于本发明的试剂盒中的所述药物组合物可以例如片剂、包衣片

- 剂、丸剂、颗粒剂、气雾剂、糖浆剂、乳剂、悬浮剂、溶液剂或可重构成溶液的冷干物的形式存在。所述药物组合物含有瑞频诺坦或瑞频诺坦生理上可接受的盐作为活性组分。对此，所述活性化合物应以总混合物的约 0.05 - 95 重量%，优选约 0.5 - 90 重量%存在，即足以达到所示剂量范围的量存在。除了所述活性组分外，所述药物组合物还含有惰性、无毒的可药用赋型剂。

瑞频诺坦具有下述结构式：



- 瑞频诺坦生理上可接受的盐可以是瑞频诺坦与无机酸、羧酸或磺酸形成的盐。优选的是瑞频诺坦与盐酸、氢溴酸、硫酸、磷酸、甲磺酸、乙磺酸、甲苯磺酸、苯磺酸、萘二磺酸、乙酸、丙酸、乳酸、酒石酸、柠檬酸、富马酸、马来酸或苯甲酸的盐。瑞频诺坦盐酸盐是特别优选的，
- 赋型剂的选择取决于制剂类型。可提及的赋型剂例如是水、无毒有机溶剂，例如石蜡油(如石油级分)、植物油(如花生/芝麻油)、醇类(如乙醇、甘油)、载体物质，例如，天然石粉(如高岭土、粘土、滑石、白垩)、合成的石粉(如高分散的二氧化硅、硅酸盐)、糖类(如蔗糖、乳糖和葡萄糖)、乳化剂(如聚氧乙烯脂肪酸酯、聚氧乙烯脂肪醇醚)、分散剂(如木质素亚硫酸盐废液、甲基纤维素、淀粉和聚乙烯吡咯烷酮)和润滑剂(如硬脂酸镁、滑石、硬脂酸和硫酸钠)。

本发明的试剂盒优选包含含有活性物质的输注溶液或者固体药物组合物作为药物组合物，由所述固体药物组合物可通过加入水或等渗电解质溶液制备输注溶液。

- 优选的固体药物制剂是冷干物，通过向其中加入水或等渗电解质溶液可重构成例如输注溶液。在冷干物中，所述活性化合物具有高的储存稳定性，并且由冷干物可以在无菌条件下容易且快速地制备不含颗粒的溶液，该溶液适合直接用于患者，例如作为输注溶液。除了活性

化合物外，所述冷干物有利地含有其它可药用赋型剂，尤其是基质形成剂。

5 基质形成剂在本发明意义上是指氨基酸，例如甘氨酸、丙氨酸或天冬氨酸，肽类例如明胶、胶原或白蛋白，单糖例如葡萄糖或乳糖，双糖例如麦芽糖、蔗糖或海藻糖，寡糖例如环糊精或麦芽糊精，多糖例如淀粉和淀粉衍生物或纤维素和纤维素衍生物，聚合物基质形成剂例如聚乙烯吡咯烷酮或聚乙二醇，盐如氯化钠或碳酸钙，糖醇例如甘露醇、山梨醇或木糖醇。甘露醇、食盐、甘油、蔗糖、麦芽糖和乳糖是优选的。特别优选甘露醇。

10 如果将冷干物重构成输注溶液，有利的是该溶液是等渗的。这可以通过冷干物中已经含有足量的电解质而达到，所述电解质例如食盐、甘露醇或葡萄糖，或通过应用等渗的电解质溶液用于重构和稀释溶液达到。

15 等渗的电解质溶液是例如 0.9 重量%的食盐水溶液或 5 重量%的葡萄糖溶液。

活性化合物在输注溶液中的含量应为约 $0.1 \mu\text{g/ml} - 1 \text{ mg/ml}$ ，优选约 $0.5 - 5 \mu\text{g/ml}$ 。

瑞频诺坦和瑞频诺坦盐的制备描述于 EP-A-0 352 613 中。瑞频诺坦盐酸盐相应于其中的实施例 92H。

20 此外，本发明的盐可通过瑞频诺坦的游离碱在合适的溶剂中与化学计量的或超过化学计量的基于所述盐的酸在 0°C 至溶剂沸点的温度范围内反应得到。合适的溶剂例如是水、脂族醇，例如甲醇、乙醇或 2-丙醇，脂族开链或环醚，例如乙醚、叔丁基甲基醚、二噁烷、四氢呋喃或脂族酮，例如 2-丙酮、2-丁酮，和它们的混合物。所述盐可以直接
25 从这些混合物中，任选在部分或完全蒸出溶剂后作为固体得到；可以通过例如在上述溶剂或溶剂混合物中进行重结晶或重沉淀将它们纯化。

所述试剂盒中的按照本发明的药物组合物也可包含瑞频诺坦和其盐的混合物或各种不同的瑞频诺坦盐的混合物。

30 可按已知方法用惰性、无毒的可药用载体或溶剂将瑞频诺坦或生理上可接受的盐转化成常规制剂，例如片剂、包衣片剂、丸剂、颗粒剂、气雾剂、糖浆剂、乳剂、混悬剂、溶液剂。优选活性化合物的溶液或

可被转化成溶液的固体药物组合物，例如冷干物。对此在各种情况下治疗有效的活性化合物的浓度为总混合物的约 0.05 - 95 重量%，优选约 0.5 - 90 重量%，即足以达到所给剂量范围的量。

所述制剂可以例如通过用溶剂和/或赋型剂，任选应用乳化剂和/或分散剂，增量活性化合物，其中例如在用水作为稀释剂的情况下可任选应用有机溶剂作为助溶剂。

此外，本发明的试剂盒包括测定体液中瑞频诺坦或其代谢物的浓度的装置。

有利的是测定瑞频诺坦的代谢物，而不是所用的活性化合物作为被测试物。已描述了瑞频诺坦的代谢物。

本发明意义上的体液是例如尿、血和得自血的级分，例如血清或血浆。优选血和得自血的级分，特别优选血浆。

瑞频诺坦浓度的测定在血液或得自血液的级分中，优选在血浆中进行。

测定浓度的合适装置例如是色谱设备，例如液相或气相色谱，其可任选与质谱仪联用 (LC-MS 或 GC-MS)。同样适合的是来自免疫学的装置，例如 ELISAs (酶联免疫吸附测试)。这些类型的装置是已知的。

特别合适的是可以在治疗地点应用的装置 (bedside-或 point-of-care 测试)，因为应用这些装置可以不耽误时间，进行任选需要的计量调节，以达到最佳的治疗。

在本发明的试剂盒中优选的装置是 WO-A-99/46591 中公开的用于测定被分析物浓度的设备。这些设备可以按照其中描述的方法制造和应用，并可以不耽误时间和用少的人工和设备花费进行任选需要的剂量调节以进行最佳治疗。

本发明的试剂盒特别适合于紧急治疗神经变性疾病，特别是中风或颅脑外伤。

按照常规方法施用本发明的药物组合物，优选口服或非胃肠道施用，特别是舌下或静脉内施用。在口服施用的情况下，除了提到的赋型剂外，片剂当然还含有添加剂，例如柠檬酸钠、碳酸钙和磷酸二钙，与各种其它物质，例如淀粉，优选土豆淀粉、明胶等。此外，还可应用润滑剂，例如硬脂酸镁、月桂基硫酸钠和滑石用于压片。在水性悬液的情况下，除了上述赋型剂外，可向所述活性化合物中加入各种

矫味剂或着色剂。对于非胃肠道施用，可以在应用合适的液体载体的情况下应用活性化合物的溶液。

静脉施用，已证明在一般情况下活性化合物的有利用量是约 0.01 $\mu\text{g/kg/h}$ - 10 $\mu\text{g/kg/h}$ (每 kg 体重每小时 μg 或 mg)，优选约 0.05 $\mu\text{g/kg/h}$ - 2 $\mu\text{g/kg/h}$ 以达到有效的结果。在各种情况下可以单个剂量的形式施用。

在口服情况下，活性化合物的日剂量为 0.001 - 0.2 mg/kg ，优选 10 - 100 $\mu\text{g/kg}$ 体重。

尽管如此，若需要，可任选偏离所述的量，并且取决于体重或给药途径的类型、根据个体对所述药物的反应情况、其制剂的类型以及施用的时间或间隔。因此，在某些情况下，用少于上述最小量的量就足够了，而在其它一些情况下必须超过上述量的上限。在相对大量给药的情况下，建议将其分成一天中的数个单独剂量。

为了在患者中保持瑞频诺坦的最有效浓度，给患者施用一特定的瑞频诺坦初始剂量，在预先确定的固定时间后用本发明的装置监测瑞频诺坦的浓度并随后任选调整进一步的剂量。

例如，以 1.25 mg 瑞频诺坦/天的速率给患者输注含有瑞频诺坦酸盐的溶液。6 小时后利用本发明的装置测定瑞频诺坦的血浆浓度是否高于或低于约 17 $\mu\text{g/l}$ 。如果瑞频诺坦的血浆浓度低于所述浓度限制，则继续以所述速度输注。然而，如果瑞频诺坦的血浆浓度超过了所述浓度限制，则将输注速度降低到 0.5 mg 瑞频诺坦/天。开始输注 12 小时后再一次检测瑞频诺坦的血浆浓度。如果瑞频诺坦的血浆浓度低于约 17 $\mu\text{g/l}$ ，则再保持所述的输注速度，如果瑞频诺坦的血浆浓度超过约 17 $\mu\text{g/l}$ ，则将输注速度降低至 0.625 或 0.25 mg 瑞频诺坦/天。用这种方式可以在最多的患者中将瑞频诺坦的血浆浓度控制在约 5 - 20 $\mu\text{g/l}$ 的有利的治疗剂量范围内。

另一方面，本发明涉及含有瑞频诺坦或其生理上可接受的盐和生理上可接受的酸的固体药物组合物。

令人惊奇地表明，通过加入生理上可接受的酸，提高了含有瑞频诺坦或其生理上可接受的盐的固体药物组合物的储存稳定性。

生理上可接受的酸在本发明意义上是指，例如苹果酸、天冬氨酸、抗坏血酸、苯甲酸、琥珀酸、丙酮酸、柠檬酸、富马酸、谷氨酸、乙

醇酸、马尿酸、马来酸、乳酸、硫酸、山梨酸、酒石酸或肉桂酸。优选苹果酸、丙酮酸、柠檬酸、富马酸、马来酸、乳酸和酒石酸。特别优选柠檬酸和酒石酸。

5 本发明的作用特别是通过用固体药物组合物达到，其中活性化合物，即瑞频诺坦或其生理上可耐受的盐的量为组合物总重的 0.01-15 重量% 以及生理上可接受的酸的量为组合物总重的 0.5-15 重量%。

含有瑞频诺坦盐酸盐和柠檬酸或酒石酸的固体药物组合物是特别优选的。

本发明的固体药物组合物可按常规方法制备。

10 另一方面，本发明涉及含有瑞频诺坦或其生理上可耐受的盐和生理上可接受的酸的冷干物，其中优选的是瑞频诺坦盐酸盐作为活性化合物并且苹果酸、丙酮酸、柠檬酸、富马酸、马来酸、乳酸和酒石酸，特别是柠檬酸和酒石酸作为所述酸。此外，所述冷干物可有利地包含药物赋型剂，例如上述基质形成剂。

15 为了制备所述冷干物，例如将上述量的瑞频诺坦或瑞频诺坦盐、所述生理上可接受的酸和任选的其它药物赋型剂溶于水和/或其它合适的溶剂中，灭菌，装入合适的容器中并冷冻干燥。

在本发明意义上的合适溶剂是例如冰醋酸或叔丁醇。

20 所述溶液可常规地在 5 - 35℃，优选 20 - 25℃ 的温度下制备。在本发明意义上溶液的灭菌是指将所述溶液转变成无菌状态，例如用孔径最大为 0.2 μm 的由合适的过滤材料，例如聚醚砜或尼龙 6.6 制得的过滤器通过过滤灭菌。

25 用于冷冻干燥的合适容器是例如吹制的玻璃瓶或管式玻璃瓶。溶液的添装体积为 0.2 ml - 20 ml，优选 0.5 ml - 5 ml，特别优选 0.7 ml - 3.0 ml。

在所述容器中进行溶液的冷冻干燥。为此，将含有溶液的容器放置在预冷或未预冷的支架上并冷冻。然后在冷干室压力为 0.05 mbar - 1.8 mbar 和 -40℃ - +60℃ 的支架温度下进行主要干燥。后干燥在冷干室压力为 1 μbar - 1.8 mbar、支架温度为 -20℃ - +70℃ 下进行。

30 另外，可按照国际申请 PCT/EP00/07034 描述的冷冻干燥方法进行冷冻干燥。通过冷冻干燥形成上述组合物的储存稳定的冷干物。

此外，本发明涉及输注溶液，其中含有瑞频诺坦或瑞频诺坦生理上

可接受的盐和一种或多种选自下列的酸：苹果酸、丙酮酸、柠檬酸、富马酸、马来酸、乳酸和酒石酸，优选柠檬酸或酒石酸。

按照本发明的输注溶液具有意想不到的高储存稳定性。

在本发明意义上输注溶液是指一种溶液，其主要含有水作为溶剂和一般具有 250 - 500 mOsmol/kg，优选 280 - 350 mOsmol/kg 的渗透度(Osmolalität)。上述输注溶液的渗透度可以按照如下达到：必须量的例如食盐、甘露醇或葡萄糖是已有的固体组合物的组分并用水重构和/或稀释，或将必须量的这些物质与重构/稀释介质一起加入。输注溶液中瑞频诺坦的浓度一般为 0.1 - 500 µg 瑞频诺坦/ml 溶液，
10 优选 0.5 - 5 µg/ml。所述输注溶液含有足量的酸，使 20℃下的 pH 为 3.5 - 5，优选约 4。

一般地，所述溶液的加入在室温下进行。

实施例

15 实施例 1：含有瑞频诺坦盐酸盐的组合物的冷干物

向 55 mg 瑞频诺坦盐酸盐(相应于 50 mg 瑞频诺坦)、20 g 甘露醇和 3.7 g 柠檬酸的混合物中加水至 1000 ml，通过最大孔径为 0.2 µm 的聚醚砜过滤器将该水溶液过滤灭菌并装填到管式玻璃瓶中。溶液的装填体积为 1 ml。

20 将管式玻璃瓶中中的溶液冷冻干燥。为此，在室温下将含有所述溶液的管式玻璃瓶放置在冷冻干燥器的支架上并在-40℃冷冻。然后在冷干室压力为 0.2 mbar 和支架温度为 0℃下进行主要的冷冻干燥。后干燥在冷干室压力为 10 µbar 和支架温度为 40℃下进行。通过冷冻干燥制得储存稳定的终产物。

25 另外，可按照国际申请 PCT/EP00/07034 描述的冷冻干燥方法进行冷冻干燥。

类似于实施例 1 所述的方法，用在实施例 1 中所用的甘露醇、柠檬酸和水量制备含有 0.27 g、0.681 g、1.36 g 和 2.73 g 瑞频诺坦盐酸盐的冷干物，分别相应于 0.25 g、0.625 g、1.25 g 和 2.5 g
30 瑞频诺坦。

实施例 2：含有瑞频诺坦盐酸盐的输注溶液

即用型输注溶液是通过用 0.9 重量 % 的 NaCl 溶液重构按照实施例 1 得到的冷干物制备, 然后将该溶液稀释到总体积 500 ml。即用型溶液在室温贮存至少 30 小时是化学稳定的, 即该溶液仍含有至少 90% 未变化的瑞频诺坦。

5

实施例 3: 在微孔滴定板上通过 ELISA 测定瑞频诺坦

该试验是基于竞争性 ELISA 进行的。使类似于瑞频诺坦的半抗原蛋白缀合物与恒定量的特异性抗瑞频诺坦化学结构的单克隆或多克隆抗体 Fab 或 Fab2 片段, 和恒定体积的含有瑞频诺坦的样品反应。从结合的与游离的蛋白缀合物的比例, 可以通过用已知瑞频诺坦浓度的平行操作得到的标准曲线得到未知样品中瑞频诺坦的浓度。

将山羊 IgG 以摩尔比 1:7.5 化学连接到下述的瑞频诺坦类似物上。在微滴定板(如 Dynex Immulon 2HB)中, 于 37℃ 在 0.1 M 碳酸钠缓冲液 pH=9.6 中温育所述缀合物 1 h。然后在室温下用磷酸盐缓冲的含有酪蛋白 (1%) 的盐溶液封闭 30 分钟。然后, 用含有吐温 (0.05%) 的磷酸盐缓冲的盐水洗涤 3 次。

现在, 在如此准备好的板上进行竞争性试验。对此, 将 100 μ l 样品加到微滴定孔中并用 100 μ l 抗体溶液 (小鼠抗-瑞频诺坦抗体 10 ng/ml 于磷酸盐缓冲的盐水溶液中) 处理。在室温下温育该混合物 1 小时, 用洗涤缓冲液 (参见上面) 洗涤三次后, 在进一步的反应中用移液管向微滴定孔中加入偶联到 Horseradish 过氧化物酶的第二抗体 (1:1; Zymed 山羊抗小鼠 IgG; 1:1 000 稀释)。其结合到瑞频诺坦特异性小鼠抗体上, 所述小鼠抗体结合在与瑞频诺坦类似的半抗原缀合物上。以这种方式结合的瑞频诺坦特异性小鼠抗体的量间接地正比于样品中游离的瑞频诺坦的量。通过三次洗涤洗去过量的抗体-酶缀合物, 加入酶底物 (TMB) 后, 剩余的结合的量通过分光光度法进行动力学测定。用所示的方法, 用合适的校准器可测定 1 - 100 ng/ml 的瑞频诺坦浓度。

实施例 4: Point-of-care 瑞频诺坦试验

这一瑞频诺坦试验是用于在集中护理的区域和其它医院领域测定全血、血清或血浆中瑞频诺坦的浓度高于或低于规定的约 17 ng/ml 的

限度浓度。这是一种直观显示的一次性试验。

设备的描述:

该测试是基于上述用于测定小分子的竞争性免疫学方法。作为视觉显示机制,而不是酶光谱法,应用胶体金颗粒的反射信号。将用于实施常规免疫测试所有必需的测试组分和机械控制合并到一个塑料装置中。该装置包括一个分离血清和血细胞的装置和一个用于准确测量用这种方法分出的一定量血清的装置。缓冲液储库含有用于该反应必需的液相,它能使毛细管在该系统中运动。将抗瑞频诺坦抗体和半抗原-山羊 IgG-金缀合物在塑料装置的反应池中冷冻干燥。毛细管一端的混合室以及免疫色谱测试带完成该系统。在测试带是固定反应区:驴抗小鼠抗体和兔抗山羊抗体。

在不存在瑞频诺坦的情况下,驴抗小鼠抗体捕集大部分的金缀合物并形成红色区。随着待测样品中瑞频诺坦浓度的升高,正比于被抗瑞频诺坦抗体抑制的金缀合物被捕集在兔抗山羊反应中。

在免疫色谱测试带的一端是吸收区,在开始时加入水溶性染料。该染料随向前流动的液体向前移动并移动到吸收区的一端。这表示测试反应结束。

从加入样品到读出结果的测试持续时间约为 15 分钟。该测试可用 100-150 μ l 全血进行,这保证产生约 15 μ l 血清。

需要下述反应组分用于制备测试装置:

- a) 单克隆抗-瑞频诺坦
- b) 金-瑞频诺坦类似物-山羊 IgG 缀合物
- c) 胶体金, 20 nm
- d) 硝酸纤维素膜
- e) 山羊抗-小鼠
- f) 兔抗-山羊
- g) 瑞频诺坦标准品
- h) 0.2% Triton X 305 于磷酸盐缓冲的盐水测试缓冲液中
- i) 0.4% Nonidet P-40, 2% BSA, 2.5%蔗糖, 1.25% 海藻糖, 于磷酸盐缓冲的盐水冷冻干燥的缓冲液中
- j) 2.5 cm Sink 材料
- k) 塑料支撑, 5.3 cm 宽 8 mil. 厚

1) 人血清

测试步骤:

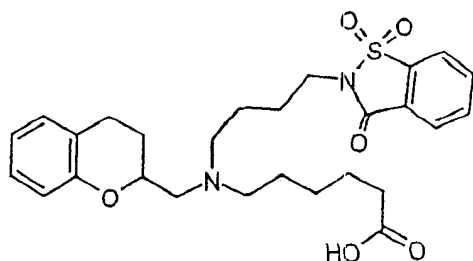
将约 150 μ l 全血 (5 滴)、血清或血浆加到样品盘中。水平保持该装置约 3 分钟, 然后将计量瓶的柄转 90 度直到它平放在该装置的底部, 然后在室温下水平放置该装置 15 分钟。当示窗显示蓝点时, 结束测试并读取结果。

除了添加样品和操作计量瓶外, 整个测试的进行不需要对样品和装置的其它操作。因此, 该测试也可以由非技术人员进行。

解释结果:

如 WO-A-99/46591 所述, 示窗 A 和 B 中的两谱带强度比较使半定量测定样品中瑞频诺坦的浓度简单化。如果示窗 A 中的信号比示窗 B 中的信号更强, 则瑞频诺坦的浓度高于特定限度值, 若强度分布相反, 则低于特定限度值。该限度值可通过冷干物中抗-瑞频诺坦抗体浓度与金-瑞频诺坦类似物-山羊-IgGs 浓度的比例确定。

金-瑞频诺坦类似物-山羊-IgG 缀合物中的瑞频诺坦类似物是下式的化合物:



该化合物是新化合物并可按照 EP-A-0 352 613 描述的方法制备, 例如通过瑞频诺坦与 6-溴-己酸叔丁基酯在碱存在下、在合适溶剂中反应, 然后酸性酯裂解得到。