

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **09.11.2001**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **22.11.2000**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **2000/0058119**
(33) Země priority: **DE**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15.10.2003**
(Věstník č. 10/2003)
(86) PCT číslo: **PCT/EP01/12968**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO02/041881**

(21) Číslo dokumentu:

2003 - 1401

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 31/425

A 61 P 25/28

A 61 P 25/00

(71) Přihlašovatel:
BAYER AKTIENGESELLSCHAFT, Leverkusen, DE;

(72) Původce:
Kroll Werner, Solingen, DE;
Rombout Ferdinand, Klimmen, NL;
Weber Horst, Troisdorf, DE;
Rodriguez Maria Luisa, Erkrath, DE;
Sennhenn Bernd, Leverkusen, DE;
Schohe-Loop Rudolf, Wuppertal, DE;

(74) Zástupce:
Všetečka Miloš JUDr., Hálkova 2, Praha 2, 12000;

(54) Název přihlášky vynálezu:
Repinotanová souprava

(57) Anotace:
Řešení se týká soupravy zahrnující farmaceutickou kompozici obsahující repinotan nebo fyziologicky přijatelnou sůl repinotanu a prostředek pro stanovení koncentrace repinotanu nebo jeho metabolitů v tělních tekutinách, jakož i nových farmaceutických kompozic obsahujících repinotan nebo fyziologicky přijatelnou sůl repinotanu a způsobu jejich přípravy.

16 86077

Repinotanová souprava

Oblast techniky

Vynález se týká soupravy obsahující farmaceutickou kompozici obsahující repinotan nebo fyziologicky přijatelnou sůl repinotanu a prostředek pro stanovení koncentrace repinotanu nebo jeho metabolitů v tělních tekutinách, jakož i nových farmaceutických kompozic obsahujících repinotan nebo fyziologicky přijatelnou sůl repinotanu a způsobu jejich výroby.

Dosavadní stav techniky

Pro akutní léčení neurodegenerativních onemocnění, mezi která patří záchvat mrtvice a poranění lebky a mozku, která u pacientů často vedou k dlouhodobým neurologickým a funkčním deficitům, až dosud nebyl ve světě přijat jako účinný žádný léčebný princip. Kromě nasazení thrombolytik (například t-PA) v prvních třech hodinách po ischemickém záchvatu mrtvice, popřípadě použití nimodipinu u pacientů s traumatickým subarachnoidálním krvácením ještě neexistují žádné medikamentózní přístupy, které by v patologické kaskádě poskytovaly dostatečný záchranný mechanismus.

Patentový dokument EP-A-0 352 613 popisuje použití 2-[4-({[(2R)-chroman-2-yl]methyl}amino)butyl]-1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxidu (generické jméno: repinotan) a

repinotanových solí pro léčení nemocí centrální nervové soustavy, zejména záchvatu mrtvice.

V patentovém dokumentu DE-A-195 43 476 je popsána vhodnost repinotanu a jeho solí pro léčení mozko-lebečních poranění.

Repinotan prokázal při četných klinických studiích velmi dobrou snášenlivost zdravými probandy a pacienty po záchvatu mrtvice nebo po mozko-lebečním poranění. Kromě toho je ze získaných klinických údajů patrné, že neurologické a funkční deficity mohou být zlepšeny (po 3, popřípadě 6 měsících, podle indikace). Zejména u pacientů s dosaženými koncentracemi v krevní plazmě v rozmezí od asi 5 do 20 mikrogramů na litr byl výsledek výrazně lepší než u pacientů, kterým bylo podáno placebo.

Podstata vynálezu

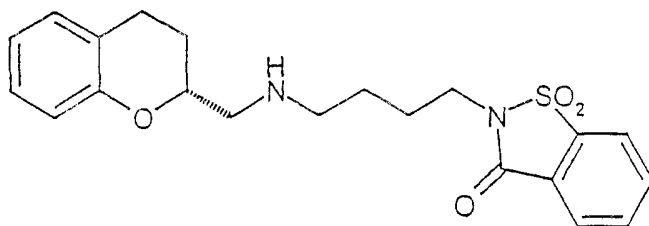
Obzvláště dobrého výsledku léčení je možné dosáhnout použitím soupravy podle vynálezu, která zahrnuje farmaceutickou kompozici obsahující repinotan nebo fyziologicky přijatelnou sůl repinotanu a prostředek pro stanovení koncentrace repinotanu nebo jeho metabolitů v krevních tekutinách.

Použití soupravy podle vynálezu umožňuje aplikovat léčivo, které obsahuje jako účinnou látku repinotan ve formě volné báze nebo ve formě adiční soli s kyselinou, a v krátké době stanovit skutečné koncentrace repinotanu nebo jeho metabolitů v tělních tekutinách léčeného pacienta. V

důsledku toho je možné bez ztráty času a při nepatrných nárocích na personál a zařízení přizpůsobit dávky podávané účinné látky tak, aby bylo dosaženo optimální terapie. Souprava podle vynálezu takto představuje výrazný pokrok v akutní terapii neurodegenerativních onemocnění, zejména záchvatu mrtvice a mozkolebečního poranění.

Farmaceutické kompozice obsažené v soupravě podle vynálezu mohou být například ve formě tablet, dražé, pilulek, granulátů, aerosolů, sirupů, emulzí, suspenzí, roztoků nebo lyofilizátů, které mohou být rekonstituovány do formy roztoku. Tyto farmaceutické kompozice obsahují jako účinnou látku repinotan nebo fyziologicky přijatelnou sůl repinotanu. V této kompozici by měla být uvedena účinná látka obsažena v koncentraci asi 0,05 až 95 % hmotnosti, výhodně v koncentraci asi 0,5 až 90 % hmotnosti, vztaženo na celkovou hmotnost směsi, tj. v množstvích, která jsou dostatečná k tomu, aby bylo dosaženo uvedeného dávkovacího rozmezí. Vedle účinné látky obsahují farmaceutické kompozice ještě inertní, netoxické, farmaceuticky vhodné pomocné látky.

Repinotan má následující strukturní vzorec:



Fyziologicky přijatelné soli repinotanu mohou být tvořeny solemi repinotanu s minerálními kyselinami, karboxylovými kyselinami nebo sulfonovými kyselinami. Výhodné jsou soli repinotanu s kyselinou chlorovodíkovou, kyselinou bromovodíkovou, kyselinou sírovou, kyselinou

fosforečnou, kyselinou methansulfonovou, kyselinou ethansulfonovou, kyselinou toluensulfonovou, kyselinou benzensulfonovou, kyselinou naftalendisulfonovou, kyselinou octovou, kyselinou propionovou, kyselinou mléčnou, kyselinou vinnou, kyselinou citronovou, kyselinou fumarovou, kyselinou maleinovou nebo kyselinou benzoovou. Výhodnou solí repinotanu je repinotan hydrochlorid.

Volba pomocných látek je závislá na typu formulace. Jako pomocné látky lze uvést například vodu, netoxická organická rozpouštědla, jako parafiny (například ropné frakce), rostlinné oleje (například podzemnicový olej/sezamový olej), alkoholy (například ethylalkohol, glycerin), nosičové látky, jako například přírodní horninové moučky (například kaoliny, hlínky, talek, křídly), syntetické horninové hlínky (například vysoce disperzní kyselina křemičitá, křemičitany, cukry (například třtinový, mléčný a hroznový cukr), emulgační činidla (například estery polyoxyethylenu a mastných kyselin, ethery polyoxyethylenu a mastných alkoholů), dispergační činidla (například lignin, sulfitové louhy, methylcelulóza, škroby a polyvinylpyrrolidon) a maziva (například stearat hořečnatý, talek, kyselina stearová a síran sodný).

Výhodně souprava podle vynálezu obsahuje jako farmaceutickou kompozici infuzní roztok obsahující účinnou látku nebo pevnou farmaceutickou kompozici, ze které může být získán infuzní roztok přidáním vody nebo isotonického roztoku elektrolytu.

Obzvláště výhodnou pevnou farmaceutickou formulací je lyofilizát, který může být přidáním vody nebo isotonického roztoku elektrolytu rekonstituován například na infuzní

roztok. V lyofilizátu má účinná látka zvýšenou skladovací stabilitu, přičemž z lyofilizátu může být snadno a rychle za sterilních podmínek získán roztok prostý pevných částic, který může být přímo použit při léčení nemocných, například ve formě infuzního roztoku. Kromě účinné látky výhodně lyofilizát obsahuje další farmaceuticky vhodné pomocné látky, zejména strukturotvorná činidla.

Strukturotvornými činidly v rámci vynálezu jsou aminokyseliny, jako například glycin, alanin nebo kyselina asparagová, peptidy, jako želatina, kolagen nebo albumin, monosacharidy, jako glukóza nebo laktóza, disacharidy, jako maltóza, sacharóza nebo trehalóza, oligosacharidy, jako cyklodextriny nebo maltodextriny, polysacharidy, jako škroby a deriváty škrobu nebo celulóza a deriváty celulózy, polymerní strukturotvorná činidla, jako polyvinylpyrrolidon nebo polyethylenglykol, soli, jako chlorid sodný nebo uhličitán vápenatý, alkoholické cukry, jako mannit, sorbit nebo xylit. Výhodnými strukturotvornými činidly jsou mannit, kuchyňská sůl, glycin, sacharóza, maltóza nebo laktóza. Obzvláště výnosným strukturotvorným činidlem je mannit.

V případě, že se lyofilizát rekonstituuje na infuzní roztok, je takto získaný roztok výhodně isotonickým roztokem. Toho může být dosaženo tím, že již lyofilizát obsahuje dostatečné množství elektrolytu, jakým je například kuchyňská sůl, mannit nebo glukóza, nebo tím, že se k rekonstituci a zředění roztoku použije isotonický roztok elektrolytu.

Isotonickými roztoky elektrolytů jsou například vodné 0,9% (hmotn.) roztoky kuchyňské soli nebo 5% (hmotn.) roztoky glukózy.

Podíl účinné látky v infuzním roztoku by měl činit asi 0,1 mikrogramu/ml až 1 miligram/ml, výhodně asi 0,5 až 5 mikrogramů/ml.

Výroba repinotanu a solí repinotanu je popsána v patentovém dokumentu EP-A-0 352 613. Repinotan hydrochlorid v tomto dokumentu odpovídá příkladu 92H.

Soli podle vynálezu mohou být kromě toho získány tak, že se repinotan ve formě volné báze uvede v reakci ve vhodném rozpouštědle se stechiometrickým nebo nadstechiometrickým množstvím příslušné kyseliny při teplotě 0° C až teplotě varu rozpouštědla. Vhodnými rozpouštědly jsou například voda, alifatické alkoholy, jako methanol, ethanol nebo 2-propanol, alifatické ethery s otevřeným řetězcem nebo alifatické cyklické ethery, jako diethylether, terc.butyl-methylether, dioxan, tetrahydrofuran nebo alifatické ketony, jako 2-propanon, 2-butanon, jakož i jejich směsi. Uvedené soli se získají přímo z reakční směsi, případně po částečném nebo úplném oddestilování rozpouštědla, ve formě pevné látky; získané soli mohou být přečistěny rekrytalizací nebo přesrážením, například za použití výše uvedených rozpouštědel nebo jejich směsí.

Farmaceutické kompozice podle vynálezu obsažené v soupravě mohou být získány jako směsi repinotanu a jeho solí nebo jako směsi různých solí repinotanu.

Repinotan nebo jeho fyziologicky přijatelné soli mohou být převedeny o sobě známým způsobem na obvyklé formulace, jakými jsou například tablety, dražé, pilulky, granule, aerosoly, sirupy, emulze, suspenze a roztoky, a to za použití inertních, netoxických, farmaceuticky vhodných nosičů nebo rozpouštědel. Výhodné jsou roztoky účinné látky nebo pevné farmaceutické kompozice, které mohou být převedeny do roztoku a kterými jsou například lyofilizáty. Přitom bude terapeuticky účinná látka vždy k dispozici v koncentraci asi 0,05 až 95 % hmotnosti, výhodně asi 0,5 až 90 % hmotnosti, vztaženo na celkovou hmotnost směsi, tj. v množství, které je dostatečné k tomu, aby bylo dosaženo uvedeného dávkovacího rozmezí.

Uvedené formulace budou například vyrobeny nastavením účinných látek rozpouštědly nebo/a nosiči, případně za použití emulgačních činidel nebo/a dospergačních činidel, přičemž například v případě použití vody jako ředidla mohou být případně jako pomocná solubilizační činidla použita organická rozpouštědla.

Kromě toho souprava podle vynálezu obsahuje prostředek pro stanovení koncentrace repinotanu nebo jeho metabolitů v tělesných tekutinách.

Může být výhodné stanovit jako analyt namísto použité účinné látky metabolit repinotanu. Metabolity repinotanu jsou popsány v literatuře.

Tělními tekutinami jsou v rámci vynálezu například moč, krev a z krve získané frakce, jako sérum a plazma. Výhodné

jsou krev a z krve získané frakce, obzvláště výhodně krevní plazma.

Stanovení koncentrace repinotanu se provádí v krvi nebo ve frakcích získaných z krve, výhodně v krevní plazmě.

Jako prostředky pro stanovení koncentrace repinotanu jsou vhodné například chromatografické postupy, jakými jsou kapalinová nebo plynová chromatografie a k tomu potřebná zařízení, která mohou být případně spojena s hmotovým spektrometrem (LC-MS nebo GS-MS). Rovněž jsou k tomu vhodné prostředky, které pracují na bázi imunologických metod, jako například stanovení ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assays). Prostředky tohoto typu jsou známy.

Obzvláště výhodné jsou prostředky, které mohou být použity přímo v místě, kde probíhá léčení (bedside- nebo point-of care-tests), protože v tomto případě může být bez časového zpoždění určeno dávkování, které je přizpůsobené k dosažení optimální terapie.

Výhodně se v soupravě podle vynálezu použijí prostředky pro stanovení koncentrace analytů popsané v patentovém dokumentu WO-A-99/46591. Tato zařízení mohou být vyrobena a použita způsobem rovněž popsaným v uvedeném dokumentu a umožňují bez časového zpoždění a při malých nárocích na personál a zařízení přizpůsobit potřebné dávkování účinné látky požadavkům optimální terapie.

Obzvláště vhodná je souprava podle vynálezu pro akutní léčení neurodegenerativních onemocnění, zejména záchvatu mrtvice nebo mozkolebečního poranění.

Podání kompozice podle vynálezu se provádí obvyklým způsobem, například orálně nebo parenterálně, zejména perlingválně nebo intravenózně. V případě použití orálního podání mohou samozřejmě tablety vedle jmenovaných nosičových látek obsahovat také přísady, jakými jsou citran sodný, uhličitan vápenatý a hydrogenfosforečnan vápenatý společně s dalšími různými přísadami, jakými jsou škroby, například bramborový škrob, želatina a podobné látky. Dále zde mohou být při tabletizaci současně použita maziva, jako například stearát hořečnatý, laurylsulfát sodný a talek. V případě vodných suspenzí mohou být k účinným látkám kromě již výše uvedených pomocných látek přidány také různé přísady zlepšující chuť nebo barviva. V případě parenterálního podání mohou roztoky účinné látky obsahovat vhodné kapalně nosičové materiály.

Obecně se jako výhodné při intravenózním podání ukázalo podat za účelem dosažení účinných výsledků účinnou látku v množství od asi 0,01 $\mu\text{g/kg/h}$ do 10 $\mu\text{g/kg/h}$ (μg nebo mg na kilogram tělesné hmotnosti za hodinu), výhodně asi 0,05 $\mu\text{g/kg/h}$ až 2 $\mu\text{g/kg/h}$.

Při orálním podání činí denní dávka účinné látky 0,001 až 0,2 mg/kg tělesné hmotnosti, výhodně 10 až 100 $\mu\text{g/kg}$ tělesné hmotnosti.

Přesto může být někdy žádoucí odchýlit se od uvedených množství a sice v závislosti na tělesné hmotnosti,

popřípadě typu způsobu podání, individuálním snášením léčiva, způsobu jeho formulování a době, popřípadě intervalu, ve kterém se podání provádí. Tak může být v některých případech dostatečné vycházet z množství, která jsou menší než výše uvedená nejnižší množství, zatímco v jiných případech musí být překročena výše uvedená horní hranice. V případě podání větších množství lze doporučit rozdělit taková množství do několika dílčích menších dávek podaných v průběhu dne.

Aby byla u pacientů nastavena terapeuticky příznivá koncentrace repinotanu, podá se pacientům definovaná výchozí dávka repinotanu a po uplynutí určité předem určené doby se zkontroluje pomocí prostředků podle vynálezu koncentrace repinotanu a potom se případně dávkování upraví na základě takto stanovené koncentrace repinotanu.

Pacienti se například podrobí infuzi roztokem, který obsahuje repinotan hydrochlorid, přičemž se infuze provádí takovou rychlostí, že pacienti přijmou 1,25 mg repinotanu za den. Po šesti hodinách se pomocí prostředků podle vynálezu stanoví, zda koncentrace repinotanu v plazmě leží nad nebo pod asi 17 $\mu\text{g/l}$. V případě, že koncentrace repinotanu v krevní plazmě leží pod uvedenou hraniční koncentrací, provádí se další infuze zvýšenou rychlostí. Jestliže naopak přestoupí koncentrace repinotanu v krevní plazmě uvedenou hraniční koncentraci sníží se rychlost difuze tak, aby poskytovala 0,5 mg repinotanu za den. 12 hodin od počátku infuze se koncentrace repinotanu v krevní plazmě stanoví znovu, přičemž se zachová infuzní rychlost v případě, že koncentrace repinotanu v krevní plazmě leží pod 17 $\mu\text{g/l}$, a tato rychlost se naopak zvýší na 0,625, popřípadě 0,25 mg repinotanu za den v případě, že koncentrace repinotanu v krevní plazmě překročí uvedenou

hraniční hodnotu asi 17 $\mu\text{g/l}$. Tímto způsobem se u maximálního počtu pacientů podaří udržet koncentraci repinotanu v krevní plazmě v příznivém terapeutickém dávkovém rozmezí, které se pohybuje od asi 5 do 20 $\mu\text{g/l}$.

V rámci dalšího předmětu vynálezu se vynález týká pevné farmaceutické kompozice obsahující repinotan nebo jeho fyziologicky přijatelnou sůl a fyziologicky přijatelnou kyselinu.

S překvapením se ukazuje, že přídavek fyziologicky přijatelné kyseliny zvyšuje skladovací stabilitu pevných farmaceutických kompozic obsahujících repinotan nebo jeho fyziologicky přijatelné soli.

Fyziologicky přijatelnými solemi jsou v rámci vynálezu například kyselina jablečná, kyselina asparagová, kyselina askorbová, kyselina benzoová, kyselina jantarová, kyselina pyrohroznová, kyselina citronová, kyselina fumarová, kyselina glutamová, kyselina glykolová, kyselina hippurová, kyselina maleinová, kyselina mléčná, kyselina sírová, kyselina sorbová, kyselina vinná nebo kyselina skořicová. Výhodnými fyziologicky přijatelnými kyselinami jsou kyselina jablečná, kyselina pyrohroznová, kyselina citronová, kyselina fumarová, kyselina maleinová, kyselina mléčná a kyselina vinná. Obzvláště výhodnými fyziologicky přijatelnými kyselinami jsou kyselina citronová a kyselina vinná.

Účinku podle vynálezu se zejména dosáhne u pevných farmaceutických kompozic, u kterých obsah účinné látky, t.j. repinotanu nebo jeho fyziologicky přijatelných solí

činí 0,01 až 15 % hmotnosti a obsah fyziologicky přijatelné kyseliny činí 0,5 až 15 % hmotnosti, vztaženo na celkovou hmotnost kompozice.

Obzvláště výhodné jsou přitom pevné farmaceutické kompozice obsahující repinotan hydrochlorid a kyselinu citronovou nebo kyselinu vinnou.

Pevné farmaceutické kompozice mohou být připraveny obvyklými způsoby.

Další předmět vynálezu se týká lyofilizátů obsahujících repinotan nebo jeho fyziologicky přijatelné soli a fyziologicky přijatelnou kyselinu, přičemž jako účinnou látku tento lyofilizát obsahuje repinotan hydrochlorid a jako fyziologicky přijatelnou kyselinu tento lyofilizát obsahuje kyselinu jablečnou, kyselinu pyrohroznovou, kyselinu citronovou, kyselinu fumarovou, kyselinu maleinovou, kyselinu mléčnou a kyselinu vinnou, přičemž obzvláště výhodnými fyziologicky přijatelnými kyselinami jsou v daném případě kyselina citronová a kyselina vinná. Dodatečně mohou tyto lyofilizáty výhodně obsahovat farmaceutické pomocné látky, jakými jsou například výše uvedená strukturotvorná činidla.

Při přípravě lyofilizátu se například výše uvedená množství repinotanu nebo solí repinotanu, fyziologicky přijatelné kyseliny a případně dalších farmaceutických pomocných látek rozpustí ve vodě nebo/a dalších vhodných rozpouštědlech, získaný roztok se sterilizuje, potom se naplní do vhodných nádobek, ve kterých se potom lyofilizuje.

Vhodnými rozpouštědly v rámci vynálezu jsou například kyselina octová nebo terc-butanol.

Uvedený roztok může být obvykle připraven při teplotách 5 až 35 °C, výhodně při teplotě 20 až 25 °C. Sterilizace roztoku v rámci vynálezu znamená převedení roztoku do sterilního stavu, například sterilizující filtrací skrze filter mající největší šířku pórů 0,2 µg a zhotovený z vhodných materiálů, mezi které například patří polyethersulfon nebo nylon 6.6.

Vhodnými nádobkami pro lyofilizaci jsou například láhvičky z hutního skla nebo trubkového skla. Plnicí objem roztoku se pohybuje mezi 0,2 ml a 20 ml, výhodně mezi 0,5 ml až 5 ml a obzvláště výhodně mezi 0,7 ml a 3,0 ml.

Roztok se v nádobkách lyofilizuje. Za tím účelem se nádoby s roztokem uloží do předem vychlazených nebo předem nevychlazených stojanů a zmrazí. Následná lyofilizace se provádí při tlaku ve vakuové komoře 0,005 a 0,18 kPa a teplotě -40 až 60 °C. Dále se lyofilizace provádí při tlaku ve vakuové komoře 0,1 Pa až 0,18 kPa a teplotě -20 až 70 °C.

Alternativně může být lyofilizační proces proveden způsobem popsáním v mezinárodní přihlášce PCT/EP00/07034. Lyofilizací se získá stabilní skladovatelný lyofilizát výše uvedené kompozice.

Kromě toho se vynález týká infuzního roztoku obsahujícího repinotan nebo fyziologicky přijatelnou sůl

repinotanu a jednu nebo více kyselin zvolených z množiny zahrnující kyselinu jablečnou, kyselinu pyrohroznovou, kyselinu citronovou, kyselinu fumarovou, kyselinu maleinovou, kyselinu mléčnou a kyselinu vinnou, výhodně kyselinu citronovou nebo kyselinu vinnou.

Infuzní roztoky podle vynálezu mají neočekávaně vysokou skladovací stabilitu.

Infuzním roztokem je v rámci vynálezu roztok, který obsahuje jako rozpouštědlo převážně vodu a normálně má osmolalitu v rozmezí 250 až 500 mOsmol/kg, výhodně 280 až 350 mOsmol/kg. Výše uvedené osmolality může být docíleno tím, že složku pevné farmaceutické kompozice již tvoří potřebné množství například kuchyňské soli, mannitu nebo glukózy a že se potom tato pevná farmaceutická kompozice rekostituuje vodou nebo/a zředí vodou, nebo tím, že se potřebné množství uvedených látek přidá společně s rekonstitučním nebo zředovacím médiem. Koncentrace repinotanu v uvedeném infuzním roztoku činí obvykle 0,1 až 500 μg repinotanu v ml roztoku, přičemž tato koncentrace výhodně činí 0,5 až 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ infuzního roztoku. Uvedený roztok obsahuje takové množství kyseliny, že jeho hodnota pH při teplotě 20 °C činí 3,5 až 5, výhodně asi 4.

Normálně se děje přidavek těchto roztoku při teplotě místnosti.

V následující části popisu bude vynález blíže objasněn pomocí konkrétních příkladů jeho provedení, přičemž tyto příklady mají pouze ilustrační charakter a nikterak

neomezují rozsah vynálezu, který je jednoznačně vymezen definicí patentových nároků a obsahem popisné části.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Lyofilizát kompozice obsahující repinotan hydrochlorid

Směs 55 mg repinotan hydrochloridu (odpovídá 50 mg repinotanu), 20 mg mannitu a 3,7 kyseliny citronové se doplní vodou na objem 1000 ml. Získaný roztok se sterilizačně zfiltruje přes filtr s maximální šířkou pórů 0,2 μm zhotovený z polyethersulfonu a naplní do lahviček z trubkového skla. Každá lahvička obsahuje 1 ml roztoku.

Roztok se v uvedených lahvičkách lyofilizuje. Za tím účelem se lahvičky s roztokem při teplotě místnosti uloží do stojanu lyofilizačního zařízení a zmrazí při teplotě -40°C . Následná mrazová sublimace se provádí při tlaku v lyofilizační komoře 0,02 kPa a teplotě stojannového bloku 0°C . Další mrazová sublimace se provádí při tlaku v lyofilizační komoře 1 Pa a teplotě stojannového bloku 40°C . Takto provedenou lyofilizací se získá stabilní skladovatelný lyofilizát.

Alternativně může být lyofilizace provedena způsobem, který je popsán v mezinárodní přihlášce PCT/EP00/07034.

Analogicky jako v příkladu 1 se za použití potřebných množství mannitolu, kyseliny citronové a vody připraví lyofilizáty s obsahem 0,26 g, 0,681 g, 1,36 g a 2,73 g repinotan hydrochloridu, což odpovídá 0,25 g, 0,625 g, 1,25 g, resp. 2,5 g repinotanu.

Příklad 2

Infuzní roztok obsahující repinotan hydrochlorid

Z lyofilizovaného produktu získaného v příkladu 1 se připraví infuzní roztok schopný okamžitého použití tak, že se uvedený lyofilizát rekonstituuje pomocí 0,9% (hmotn.) roztoku chloridu sodného, načež se tento roztok zředí na celkový objem 500 ml. Získaný roztok schopný okamžitého použití je chemicky stabilní při skladování po dobu 30 hodin při teplotě místnosti, což znamená, že tento roztok po skladování za uvedených podmínek obsahuje ještě alespoň 90 % nerozloženého repinotanu.

Příklad 3

Stanovení repinotanu pomocí testu ELISA na mikrotiotrační plotně

Tento test se provádí na bázi konkurečního stanovení ELISA. Proteinový konjugát haptenu, který je analogický s repinotaniem se v konstatním množství přivede do reakce s konstatním množstvím monoklonální nebo polyklonální protilátky fragmentu Fab nebo Fab2, který je specifický k

chemické struktury repinotanu, a konstantním objemem vzorku obsahujícího repinotan. Z poměru vazaného a volného proteinového konjugátu může být potom stanovena na základě paralely s kalibrační křivkou získanou při stanovení známých koncentrací repinotanu koncentrace repinotanu ve zkoumaném vzorku.

Kozí IgG byl chemicky navázán k dále uvedenému repinotanovému analogu v molárním poměru 1:7,5. Tento konjugát byl inkubován v 0,1 molárním natriumkarbonátovém pufru s $\text{pH}=9,6$ po dobu jedné hodiny při teplotě 37°C na mikrotitrační plotně (například na plotně Dynex Immulon 2HB). Potom byl blokován po dobu 30 minut při teplotě místnosti pomocí fyziologického roztoku, který byl pufován fosfátem a obsahoval kasein (1%). konjugát byl potom třikrát promyt fosfátem pufovaným fyziologickým roztokem s obsahem tweenu (0,05 %).

Na takto připravené plotně byl nyní proveden konkureční test. Za tím účelem bylo do každé jamky mikrotitrační plotny předloženo 100 μl vzorku, ke kterému bylo přidáno 100 μl roztoku protilátky (myší anti-repinotanová protilátka, 10 ng/ml ve fosfátem pufovaném fyziologickém roztoku). Obsah jamek byl potom inkubován při teplotě místnosti po dobu jedné hodiny. Po trojnásobném promytí promývacím puftrem (viz výše) se do jamek mikrotitrační plotny v rámci další reakce odpipetuje sekundární protilátka kopulovaná s horseradisch-peroxidázou (1:1; Zymed kozí-anti-myší IgG; zředěno 1:1000). Tato se váže na myší protilátku specifickou pro repinotan, která je vázána na repinotan-analogický hapténový konjugát. Množství takto vázané repinotan-specifické myší protilátky je nepřímo úměrné množství volného repinotanu ve vzorku. Po trojím promytí se vymyje nadbytečný konjugát protilátka-enzym a po

přidání enzymového substrátu (TMB) se zbývajícím vázané množství fotometricky stanoví kinetickým měřením. Za použití tohoto protokolu je možné stanovit za použití odpovídajících kalibračních křivek koncentrace repinotanu v rozmezí 1 a 100 ng/ml.

Příklad 4

Repinotanový test Point-of-Care

Tento repinotanový test je určen k použití v oblasti intenzivní péče a dalších oblastech nemocnic pro stanovení koncentrací repinotanu nad a pod definovanou hraniční koncentrací 17 ng/ml v celé krvi, krevním séru a v krevní plazmě. Přitom se jedná o jednorázový test s vizuálním odečítáním.

Popis zařízení

Test je prováděn na bázi výše popsaného konkurečního imunologického procesu pro stanovení menší molekuly. Jako odečítací mechanismus se namísto enzymatického spektroskopického postupu použije odrazový signál koloidních zlatých částic. Všechny potřebné komponenty testu a mechanické manipulační složky, které jsou potřebné pro provádění konvenčního imunologického stanovení, jsou uloženy v plastovém zařízení. Toto zařízení obsahuje mechanismus pro oddělení krevních buněk od séra a mechanismus pro přesné odměření určitého množství takto odděleného séra. Zásobník pufru obsahuje pro reakci potřebnou kapalnou fázi, která umožňuje kapilární pohyb

uvnitř systému. Anti-repinotan-protilátka a haptén-kozí IgG-Au-konjugát se lyofilizují v reakční komůrce plastového zařízení. Směšovací komora na konci kapiláry, jakož i imunochromatografický testovací proužek doplňují systém. Na testovacím proužku jsou nanášeny stacionární reakční zóny: oslí-anti-myší protilátka a králičí-anti-kozí protilátka.

Při nepřítomnosti repinotanu zachytí oslí-anti-myší protilátka převážný podíl zlatého konjugátu a vytvoří červenou barevnou zónu. Se stoupající koncentrací repinotanu ve zkoumaném vzorku se úměrně tomu anti-repinotan-protilátkou vytěsněný zlatý konjugát zachytí reakcí s králičí-anti-kozí protilátkou.

Na konci imunochromatografického testovacího proužku se nachází absorpční zóna, na jejímž počátku je nanášeno ve vodě rozpustné barvivo. Toto barvivo se pohybuje dopředu společně s čelem kapaliny až ke konci absorpční zóny. To ukazuje konec testovací reakce.

Doba testu činí asi 15 minut a to od aplikace vzorku až do odečtení výsledku. Test může být proveden za použití 100 až 150 μ l celé krve, což poskytuje asi 15 μ l krevního séra.

Pro výrobu testovacího zařízení jsou potřebné následující reakční složky:

- a) monoklonální anti-repinotanová protilátka,
- b) Au-repinotanový analog-kozí IgG-konjugát,
- c) koloidní zlato, 20 nm,
- d) nitrocelulózová membrána,

- e) oslí-anti-myší protilátka,
- f) králičí-anti-kozí protilátka,
- g) repinotanový standard,
- h) 0,2 % Triton x 305 ve fosfátem pufrovaném fyziologickém roztoku,
- i) 0,4 % Nonodetu P-40, 2 % BSA, 2,5 % sacharózy, 1,25 % trehalózy ve fosfátem pufrovaném fyziologickém roztoku
- j) 2,5 cm sestupný materiál,
- k) plastová základní destička široká 5,3 cm a silná 0,2 mm,
- l) lidské sérum.

Provedení testu

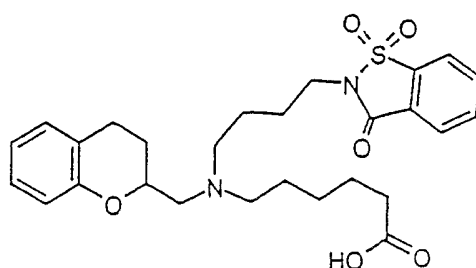
Asi 150 μ l celé krve (5 kapek), krevního séra nebo krevní plazmy se nanese na zkušební miskou testovacího zařízení. Testovací zařízení se ponechá asi 3 minuty v horizontální poloze. Potom se úchyt dávkovacího pístu otočí o 90° až na plocho dosedne na dno testovacího zařízení. Zařízení se potom ponechá po dobu 15 minut při teplotě místnosti v horizontální poloze. Když se v okénku ukazatele objeví modré znamení, je test ukončen a lze přistoupit k odečtení výsledku.

Kromě nanesení vzorku a uvedení v činnost dávkovacího pístu není zapotřebí v průběhu celého testu provádět žádné manipulace se vzorkem nebo se zařízením. Tento test může být proto prováděn i netechnickým personálem.

Interpretace výsledků

Jak je to popsáno v mezinárodní patentové přihlášce WO-A-99/46591, lze srovnáním intenzit obou pásů v okénkách A a B provést jednoduché hemikvantitativní stanovení koncentrace repinotanu. Je-li signál v okénku A intenzivnější než signál v okénku B, leží koncentrace repinotanu nad uvedenou hraniční hodnotou a obráceně je-li signál v okénku B intenzivnější než v okénku A, potom koncentrace repinotanu leží pod uvedenou hraniční hodnotou. Uvedená hraniční hodnota může být určena z poměru koncentrace anti-repinotan-protilátky a koncentrace Au-repinotanový analog-koží IgG v lyofilizátu.

Repinotanový analog v Au-(repinotanový analog)-koží IgG-konjugátu je tvořen sloučeninou vzorce:



Tato sloučenina je novou sloučeninou, která může být připravena způsobem popsaným v patentovém dokumentu EP-A-0 352 613, například reakcí repinotanu s terc-butylesterem kyseliny 6-bromhexankarboxylové v přítomnosti báze ve vhodných rozpouštědlech a následným kyselým štěpením esteru.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Souprava, v y z n a č e n á t í m, že obsahuje
 - a) farmaceutickou kompozici obsahující repinotan nebo/a fyziologicky přijatelnou sůl repinotanu
a
 - b) prostředek pro stanovení koncentrace repinotanu nebo jeho metabolitů v tělních tekutinách.
2. Souprava podle nároku 1, v y z n a č e n á t í m, že farmaceutická kompozice obsahuje repinotan hydrochlorid.
3. Souprava podle nároku 1 nebo 2, v y z n a č e n á t í m, že obsahuje prostředek pro stanovení koncentrace analytů v krvi nebo ve frakcích získaných z krve.
4. Souprava podle nároku 3, v y z n a č e n á t í m, že obsahuje prostředek pro stanovení koncentrace analytů v krevní plazmě.
5. Souprava podle některého z nároků 1 až 4, v y z n a -
č e n á t í m, že uvedený prostředek pracuje imunologickým způsobem.
6. Souprava podle některého z nároků 1 až 5, v y z n a -
č e n á t í m, že uvedený prostředek může být použit v místě léčení.

7. Souprava podle některého z nároků 1 až 6, v y z n a -
č e n á t í m, že je určena pro akutní léčení
neurodegenerativních onemocnění.

8. Souprava podle některého z nároků 1 až 6, v y z n a -
č e n á t í m, že je určena pro akutní léčení záchvatu
mrtvice nebo mozkolebečního poranění.

9. Pevná farmaceutická kompozice, v y z n a č e n á
t í m, že obsahuje repinotan nebo fyziologicky přijatelnou
sůl repinotanu a fyziologicky přijatelnou kyselinu.

10. Pevná kompozice podle nároku 9, v y z n a č e n á
t í m, že hmotnostní podíl účinné látky činí 0,01 až 15 %
hmotnosti a hmotnostní podíl kyseliny činí 0,5 až 15 %
hmotnosti.

11. Kompozice podle nároku 9 nebo 10, v y z n a č e n á
t í m, že jako účinnou látku obsahuje repinotan
hydrochlorid a jako fyziologicky přijatelnou kyselinu
obsahuje kyselinu citronovou nebo kyselinu vinnou.

12. Způsob výroby pevné farmaceutické kompozice podle
některého z nároků 9 až 11, v y z n a č e n ý t í m, že
se účinná látka, fyziologicky přijatelná kyselina a další
farmaceutické pomocné látky rozpustí ve vodě nebo/a jiných
vhodných rozpouštědlech, získaný roztok se případně
sterilizuje a potom lyofilizuje.

13. Pevná farmaceutická kompozice, v y z n a č e n á t í m, že je připravitelná způsobem podle nároku 12.

14. Infuzní roztok, v y z n a č e n ý t í m, že obsahuje repinotan nebo fyziologicky přijatelnou sůl repinotanu a jednu nebo více kyselin zvolených z množiny zahrnující kyselinu jablečnou, kyselinu pyrohroznovou, kyselinu citronovou, kyselinu fumarovou, kyselinu maleinovou, kyselinu mléčnou a kyselinu vinnou.

15. Infuzní roztok podle nároku 14, v y z n a č e n ý t í m, že jako kyselinu obsahuje kyselinu citronovou nebo kyselinu vinnou.

16. Způsob výroby infuzního roztoku obsahujícího repinotan nebo fyziologicky přijatelnou sůl repinotanu a jednu nebo více kyselin zvolených z množiny zahrnující kyselinu jablečnou, kyselinu pyrohroznovou, kyselinu citronovou, kyselinu fumarovou, kyselinu maleinovou, kyselinu mléčnou a kyselinu vinnou, v y z n a č e n ý t í m, že se ke kompozici podle nároku 13 přidá voda nebo isotonický roztok elektrolytu.

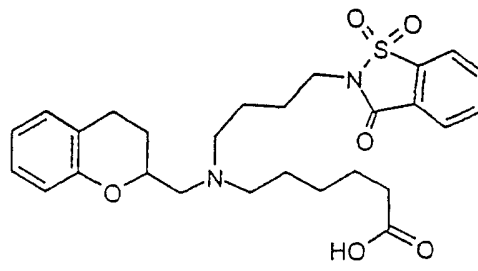
17. Infuzní roztok, v y z n a č e n ý t í m, že je připravitelný podle nároku 16.

18. Použití kompozic kompozic podle nároku 13 pro výrobu infuzních roztoků.

19. Sloučenina vzorce

22.07.03

25



~~Zastupuje:~~