



(19) REPUBLIKA HRVATSKA
DRŽAVNI ZAVOD ZA
INTELEKTUALNO VLASNIŠTVO

(10) Identifikator
dokumenta:



HR P20030490 A2

HR P20030490 A2

(12) PRIJAVA PATENTA

(51) Int. Cl.⁷: A 61 K 31/35
A 61 K 31/425
G 01 N 33/94

(21) Broj prijave u HR: P20030490A
(22) Datum podnošenja prijave patenta u HR: 17.06.2003.
(43) Datum objave prijave patenta u HR: 30.06.2005.
(86) Broj međunarodne prijave: PCT/EP01/12968
Datum podnošenja međunarodne prijave 09.11.2001.
(87) Broj međunarodne objave: WO 02/041881
Datum međunarodne objave 30.05.2002.

(31) Broj prve prijave: 100 58 119.6 (32) Datum podnošenja prve prijave: 22.11.2000. (33) Država ili organizacija podnošenja prve prijave: DE

(71) Podnositelj prijave:

(72) Izumitelji:

Bayer HealthCare AG, 51368 Leverkusen, DE
Werner Kroll, 42 Scofield Ave. 1, Stamford, 06906 CT, US
Ferdinand Rombout, Termaar 5, 6343 CL Klimmen, NL
Horst Weber, In den Gärten 15, 53844 Troisdorf, DE
Maria-Luisa Rodriguez, Oberer Hang 15, 40699 Erkrath, DE
Bernd Sennhenn, Kleiststrasse 20, 67551 Worms, DE
Rudolf Schohe-Loop, Arndtstrasse 10a, 42327 Wuppertal, DE
CPZ - CENTAR ZA PATENTE d.d., ZAGREB, HR

(74) Punomoćnik:

(54) Naziv izuma: REPINOTAN KIT

(57) Sažetak: Izum se odnosi na garnituru koja obuhvaća farmaceutski pripravak koji sadrži repinotan ili fiziološki prihvatljivu sol repinotana, i sredstvo za određivanje koncentracije repinotana ili njegovog metabolita u tjelesnim tekućinama, i također na nove farmaceutske pripravke koji sadrže repinotan ili fiziološki prihvatljivu sol repinotana, i na postupke za njihovu proizvodnju.

HR P20030490 A2

OPIS IZUMA

Izum se odnosi na garnituru koja obuhvaća farmaceutski pripravak koji sadrži repinotan ili fiziološki prihvatljivu sol repinotana, i sredstvo za određivanje koncentracije repinotana ili njegovih metabolita u tjelesnim tekućinama, i također na nove farmaceutske pripravke koji sadrže repinotan ili fiziološki prihvatljivu sol repinotana, i na postupke za njihovu proizvodnju.

Za akutno liječenje neurodegenerativnih bolesti kao što je udar kapi i kraniocerebralna trauma, koje kod tih pacijenata često dovode do dugotrajnih neuroloških i funkcionalnih deficita, do sada nijedan način liječenja nije bio prihvaćen širom svijeta kao učinkovit. Osim upotrebe trombolitika (na primjer t-PA) u prva 3 sata nakon ishemijskog udara ili upotrebe nimodipina, za pacijente koji imaju imali traumatske suparahnoidno krvarenje, još uvijek nema medicinskog pristupa koji dovoljno uzima u obzir patofiziološku kaskadu.

EP-A-0 352 613 opisuje 2-[4-({(2R)-kroman-2-il}-metil)amino}butil]-1,2-benzizotiazol-3(2H)-on 1,1-di-oksidi (generički naziv: repinotan) i soli repinotana za liječenje bolesti središnjeg nervnog sistema, posebno udara kapi.

U DE-A-195 43 476 je opisana prikladnost repinotana i njegovih soli za liječenje kraniocerebralne traume.

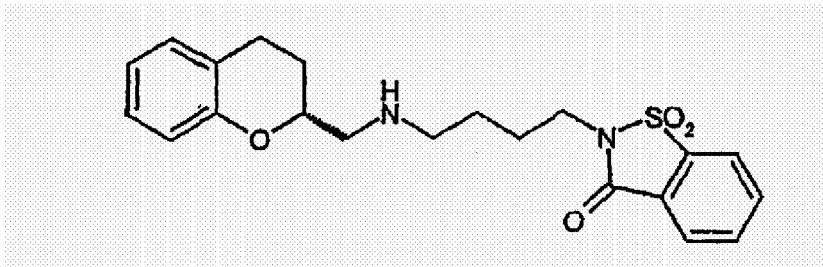
U brojnim kliničkim studijama, repinotan je pokazao svoju dobru podnošljivost u zdravim subjektima i pacijentima nakon udara kapi ili kraniocerebralne traume. Osim toga, postojeći klinički podaci pokazuju da je bilo moguće poboljšati neurološke i funkcionalne deficite (nakon 3 i 6 mjeseci, odnosno ovisno o indikaciji). U posebnom slučaju pacijenata koji su dosegli koncentracije u krvnoj plazmi u području od približno 5-20 µg/l, rezultat liječenja je bio značajno bolji nego kod pacijenata koji su primili placebo.

Posebno dobar rezultat liječenja može se dobiti upotrebom garniture prema izumu, koja obuhvaća farmaceutski pripravak koji sadrži repinotan ili fiziološki prihvatljivu sol repinotana i sredstvo za određivanje koncentracije repinotana ili njegovih metabolita u tjelesnim tekućinama.

Upotreba garniture prema izumu omogućuje lijek koji kao aktivan spoj sadrži repinotan u obliku slobodne baze ili kiselinske adicijske soli, koji se može aplicirati i u kratkom vremenu se može utvrditi stvarnu koncentraciju repinotana ili njegovih metabolita u tjelesnim tekućinama liječenog pacijenta. Tako je, bez vremenskog odgađanja i s malim troškovima što se tiče osoblja i uređaja, moguće izvršiti podešavanje doze koja je prema potrebi nužna za optimalnu terapiju. Garnitura prema izumu predstavlja stoga značajnu prednost u akutnoj terapiji neurodegenerativnih bolesti, posebno udara kapi i kraniocerebralne traume.

Farmaceutski pripravci sadržani u garnituri prema izumu mogu biti prisutni, na primjer, kao tablete, prevučene tablete, pilule, granule, aerosoli, sirupi, emulzije, suspenzije, otopine ili liofilizati koji se mogu prevesti u otopinu. Kao aktivan spoj, farmaceutski pripravci sadrže repinotan ili fiziološki prihvatljivu sol repinotana. Tu aktivan spoj treba biti prisutan koncentracijom od približno 0,05 do 95 mas. %, ponajprije od približno 0,5 do 90 mas. % od ukupne smjese, tj. količinama koje su dovoljne da se dobije navedeni raspon doziranja. Osim aktivnog spoja, farmaceutski pripravci mogu dodatno sadržavati inertna, netoksična, farmaceutski prikladna pomoćna sredstva.

Repinotan ima sljedeću strukturnu formulu:



Fiziološki prihvatljive soli repinotana mogu biti soli repinotana s mineralnim kiselinama, karboksilnim kiselinama ili sa sulfonskim kiselinama. Prednostne soli repinotana su soli s kiselinama iz niza koji čine solna kiselina, bromovodična kiselina, sumporna kiselina, fosforna kiselina, metansulfonska kiselina, etansulfonska kiselina, toluensulfonska kiselina, benzensulfonska kiselina, naftalendisulfonska kiselina, octena kiselina, propionska kiselina, mliječna kiselina, vinska kiselina, limunska kiselina, fumarna kiselina, maleinska kiselina ili benzojeva kiselina. Posebnu prednost daje se repinotan hidrokloridu.

Izbor pomoćnih sredstava ovisi o načinu formuliranja. Pomoćna sredstva koja se mogu spomenuti jesu, na primjer, voda, netoksična organska otapala, kao što su parafini (npr. naftne frakcije), biljna ulja (npr. kikirikijevo ulje, sezamovo ulje), alkoholi (npr. etil alkohol, glicerol), nosači, kao na primjer smrvljeni prirodni minerali (npr. kaolini, gline, talk,

kreda), smrvljeni sintetički minerali (npr. visoko disperzna silicijeva kiselina, silikati), šećeri (npr. saharoza, laktoza i dekstroza), emulgatori (npr. polioksietilen esteri masnih kiselina, polioksietilen esteri masnih alkohola), disperzna sredstva (npr. lignin, sulfatne otpadne tekućine, metil-celuloza, škrob i polivinilpirolidon) i lubrikanti (npr. magnezijev stearat, talk, stearinska kiselina i natrijev sulfat).

5

Garnitura prema izum obuhvaća kao farmaceutski pripravak ponajprije infuzijsku otopinu koji sadrži aktivan spoj ili kruti farmaceutski pripravak iz kojeg se tu infuzijsku otopinu može pripremiti dodatkom vode ili izotonične otopine elektrolita.

10 Prednosna farmaceutska formulacija je liofilizat, koji se dodatkom vode ili izotonične otopine elektrolita može prevesti, na primjer, u infuzijsku otopinu. U liofilizatu, aktivan spoj ima povećanu postojanost pri skladištenju, i iz liofilizata se pod sterilnim uvjetima može lako i brzo pripremiti otopinu bez čestica, koja je prikladna za izravnu primjenu u pacijentu, na primjer kao infuzijska otopina. Osim aktivnog spoja, liofilizat korisno sadrži i druga, farmaceutski prikladna, pomoćna sredstva, posebno sredstva koja oblikuju matricu.

15

Sredstva za tvorbu matrice, u opsegu izuma, jesu amino kiseline kao glicin, alanin ili aspartinska kiselina, peptidi kao želatina, kolagen ili albumin, monosaharidi kao glukoza ili laktoza, disaharidi kao maltoza, suharoza ili trehaloza, oligosaharidi kao ciklodekstrini ili malto-dekstrini, polisaharidi kao škrob i derivati škroba i celuloza i derivati celuloze, polimerna sredstva za tvorbu matrice kao polivinilpirolidon ili polietilen glikol, soli s natrijevim kloridom ili kalcijevim karbonatom, šećerni alkoholi kao manitol, sorbitol ili ksilitol. Posebnu prednost daje se manitolu, natrijevom kloridu, glicinu, saharozi, maltozi i laktozi. Vrlo posebnu prednost daje se manitolu.

20

Ako se iz liofilizata priprema infuzijsku otopinu, povoljno je da ona bude izotonična. To se može postići s liofilizatom koji već sadrži odgovarajuću količinu elektrolita, kao na primjer, natrijev klorid, manitol ili glukozu, ili s izotoničnom otopinom elektrolita koju se koristi za pripremu i za razrjeđivanje otopine.

25

Izotonične otopine elektrolita jesu, na primjer, vodena otopina natrijevog klorida koja sadrži 0,9 mas. % NaCl, ili otopina koja sadrži 5 mas. % glukoze.

30 Količina aktivnog spoja u infuzijskoj otopini treba biti približno 0,1 µg/ml do 1 mg/ml, ponajprije približno 0,5 do 5 µg/ml.

Priprema repinotana i soli repinotana je opisana u EP-A-0 352 613. Repinotan hidroklorid odgovara tamo primjeru 92H.

35 Soli prema izumu mogu se također dobiti reakcijom slobodne baze repinotana u prikladnim otapalima sa stehiometrijskim ili nadstehiometrijskim količinama kiselina na kojoj se temelji sol u temperaturnom području od 0°C pa sve do vrelišta otapala. Prikladna otapala su, na primjer, voda, alifatski alkoholi kao metanol, etanol ili 2-propanol, alifatski eteri otvorenog lanca ili ciklički eteri kao dietil eter, terc-butil metil eter, dioksan, tetrahidrofuran ili alifatski ketoni kao 2-propanon, 2-butanon, i također njihove mješavine. Soli se dobiju izravno iz te mješavine kao krutina, prema potrebi nakon djelomičnog ili potpunog odstranjivanja otapala destilacijom; one se mogu očistiti prekrizacijom ili ponovnim taloženjem, na primjer, u gore spomenutim otapalima ili u njihovim mješavinama.

40

Farmaceutski pripremači prema izumu u garnituri mogu također sadržavati i mješavine repinotana i njegovih soli ili razne soli repinotana.

45

Repinotan ili njegove fiziološki prihvatljive soli može (mogu) se preraditi na poznati način u uobičajene formulacije kao što su tablete, prevučene tablete/ pilule, granule, aerosoli, sirupi, emulzije, suspenzije i otopine, upotrebom inertnih, netoksičnih, farmaceutski prikladnih nosača ili otapala. Prednost se daje onim otopinama aktivnog spoja ili krutim farmaceutskim pripravcima koji se mogu prevesti u otopinu, kao što su, na primjer, liofilizati. Ovdje terapijski aktivan spoj u svakom slučaju može biti prisutan koncentracijom od približno 0,05 do 95 mas. %, ponajprije od približno 0,5 do 90 mas. % od ukupne smjese, tj. količinama koje su dovoljne da se dobije navedeno područje doziranja.

50

Formulacije se pripremaју, na primjer, miješanjem aktivnih spojeva s otapalima i/ili s pomoćnim sredstvima, upotrebom prema potrebi emulgatora i/ili sredstava za dispergiranje, pri čemu je, na primjer, u slučaju upotrebe vode kao sredstva za razrjeđivanje, moguća prema potrebi i upotreba organskih otapala kao pomoćnih otapala.

55

Osim toga, garnitura prema izum obuhvaća i sredstvo za određivanje koncentracije repinotana ili njegovih metabolita u tjelesnim tekućinama.

60 Ako analit, umjesto upotrijebljenog aktivnog spoja, korisno se može odrediti metabolit repinotana. Metaboliti repinotana su opisani.

Tjelesne tekućine u opsegu značenja ovog izuma jesu, na primjer, urin, krv i frakcije dobivene iz krvi, kao serum ili plazma. Prednost se daje krvi i frakcijama dobivenim iz krvi, posebno ponajprije krvnoj plazmi.

Koncentracija repinotana se određuje u krvi ili u frakcijama dobivenim iz krvi, ponajprije u krvnoj plazmi.

Prikladna sredstva za određivanje koncentracije jesu, na primjer, kromatografski uređaji kao tekućinska ili plinska kromatografija, koju se prema potrebi može povezati s masenim spektrometrom (LC-MS ili GC-MS). Također su prikladna sredstva koja rade u skladu s imunološkim metodama, kao na primjer, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays). Sredstva ovog tipa su poznata.

Posebno prikladna sredstva su ona koja se mogu upotrijebiti na mjestu liječenja (bedside ili point-of-care tests), jer se s njima može prema potrebi provesti podešavanje doze potrebne za optimalnu terapiju bez vremenskog odgađanja.

Prednosna sredstva u garnituri prema izumu su aparati za određivanje koncentracije analita koji su opisani u WO-A-99/46591. Ti aparati se mogu proizvesti i upotrijebiti u skladu s postupcima koji su tamo opisani i koji omogućuju da se bez vremenskog odgađanja i s malim troškovima što se tiče osoblja i uređaja izvrši određivanje doze koja je prema potrebi nužna za optimalnu terapiju.

Garnitura prema izumu je posebno prikladna za akutno liječenje neurodegenerativnih bolesti, u posebno udara kapi ili kraniocerebralne traume.

Farmaceutski pripravak prema izumu se daje na uobičajen način, ponajprije oralno ili parenteralno, posebno perlingvalno ili intravenski. U slučaju oralne aplikacije, neovisno o spomenutim pomoćnim sredstvima, tablete, naravno, mogu također sadržavati dodatke kao što je natrijev citrat, kalcijev karbonat i dikalcijev fosfat, zajedno s raznim dodatnim tvarima, kao što je škrob, ponajprije krumpirov škrob, želatina i slično. Lubrikanti, kao magnezijev stearat, natrijev lauril sulfat i talk se mogu dodatno upotrijebiti za tabletiranje. U slučaju vodenih suspenzija, neovisno o gore spomenutim pomoćnim tvarima, aktivni spojevi se mogu pomiješati s raznim sredstvima za pojačavanje okusa ili s bojilima. U slučaju parenteralne aplikacije, u otopinama aktivnih spojeva mogu se upotrijebiti i prikladni tekući noseći materijali.

Općenito, za postizanje učinkovitih rezultata kod intravenske aplikacije pokazalo se je povoljnim dati aktivan spoj količinom od približno 0,01 µg/kg/h do 10 µg/kg/h (µg ili mg po kg tjelesne težina na sat), ponajprije približno 0,05 µg/kg/h do 2 µg/kg/h. Aplikaciju se u svakom slučaju može provesti u obliku pojedinačnih doza.

U slučaju oralne aplikacije, dnevna doza aktivnog spoja je 0,001 do 0,2 mg/kg, ponajprije 10 do 100 µg/kg tjelesne težine.

Unatoč tome, ako je to prikladno, može biti potrebno odstupiti od spomenutih količina, naime ovisno o tjelesnoj težini ili o načinu aplikacije, o pojedinačnoj reakciji na lijek, o načinu njegovog formuliranja i o vremenu ili vremenskim razmacima u kojima se vrši aplikaciju. Tako u nekim slučajevima može biti korisno uzeti manje od gore spomenute minimalne količine, dok se u drugim slučajevima mora prekoračiti gornju navedenu granicu. U slučaju aplikacije relativno velikih količina, može biti preporučljivo podijeliti doze na nekoliko pojedinačnih doza tijekom dana.

Da bi se stabiliziralo pacijenta na terapijski najpovoljniju koncentraciju repinotana, pacijentu se najprije daje definiranu početnu dozu repinotana, koncentraciju repinotana se provjerava nakon fiksnog, prethodno određenog vremena upotrebom sredstva prema izumu i zatim se prema potrebi podešava daljnje doziranje.

Na primjer, pacijentu da daje infuziju s otopinom koja sadrži repinotan hidroklorid brzinom od 1,25 mg repinotana/dnevno. Nakon 6 sati, upotrebom sredstva prema izumu utvrdi se je li koncentracija repinotana u plazmi iznad ili ispod približno 17 µg/l. Ako je koncentracija repinotana u plazmi ispod navedene granične koncentracije, infuziju se nastavi navedenom brzinom. Međutim, ako je koncentracija repinotana u plazmi iznad navedene granične koncentracije, brzinu infuzije se smanji na 0,5 mg repinotana/dnevno. 12 sati nakon početka infuzije, ponovno se kontrolira koncentraciju repinotana u plazmi. Ponovno, brzinu infuzije se zadržava ako je koncentracija repinotana u plazmi približno 17 µg/l, a smanjuje se na 0,625 ili 0,25 mg repinotana/dnevno ako koncentracija repinotana plazmi prelazi približno 17 µg/l. Na taj način se u maksimalnom broju pacijenata može održati koncentraciju repinotana u plazmi u povoljnom terapijskom području doziranja od približno 5 do 20 µg/l.

U daljnjem aspektu, izum se odnosi na krute farmaceutske pripravke koji sadrže repinotan ili njegove fiziološki podnošljive soli, i fiziološki prihvatljivu kiselinu.

Iznenadujuće, izgleda da se dodatkom fiziološki prihvatljive kiseline povećava postojanost pri skladištenju krutih farmaceutskih pripravaka koji sadrže repinotan ili njegove fiziološki podnošljive soli.

Fiziološki prihvatljive kiseline u smisla izuma jesu, na primjer, jabučna kiselina, aspartinska kiselina, askorbinska kiselina, benzojeva kiselina, sukcinska kiselina, piruvinska kiselina, limunska kiselina, fumarna kiselina, glutaminska kiselina, glikolna kiselina, hipurinska kiselina, maleinska kiselina, mliječna kiselina, sumporna kiselina, sorbinska kiselina, vinska kiselina ili cimetna kiselina. Kiseline kojima se daje prednost su jabučna kiselina, piruvinska kiselina, limunska kiselina, fumarna kiselina, maleinska kiselina, mliječna kiselina i vinska kiselina. Posebnu prednost daje se limunskoj kiselini i vinskoj kiselini.

Djelovanje prema izumu postiže se posebno s krutim farmaceutskim pripravcima u kojima je aktivan spoj, tj. repinotan ili njegova fiziološki podnošljiva sol prisutna količinom do 0,01-15 mas. %, a fiziološki prihvatljiva kiselina je prisutna količinom do 0,5-15 mas. % od ukupne mase pripravka.

Ovdje se posebnu prednost daje krutim farmaceutskim pripravcima koji sadrže repinotan hidroklorid i limunsku kiselinu ili vinsku kiselinu.

Kruti farmaceutski pripravci prema izumu mogu se proizvesti uobičajenim postupcima.

Daljnji aspekt izuma odnosi se na liofilizate koji sadrži repinotan ili njegove fiziološki podnošljive soli, i fiziološki prihvatljivu kiselinu, pri čemu prednostan aktivan spoj je repinotan hidroklorid, a kiselina je mliječna kiselina, piruvinska kiselina, limunska kiselina, fumarna kiselina, maleinska kiselina, mliječna kiselina i vinska kiselina, posebno limunska kiselina i vinska kiselina. K tome, liofilizati mogu korisno sadržavati farmaceutske pomoćne tvari kao što su, na primjer, gore spomenuta sredstva za tvorbu matrice.

Za pripremu liofilizata, na primjer, gore navedene količine repinotana ili soli repinotana, fiziološki prihvatljive kiseline i prema potrebi daljnjih farmaceutskih pomoćnih tvari se otope u vodi i/ili drugim prikladnim otapalima, sterilizira se, puni u prikladne spremnike i osuši smrzavanjem.

Prikladna otapala u smislu izuma jesu, na primjer, ledena octena kiselina ili terc-butanol.

Otopinu se može pripremiti na uobičajen način pri temperaturi od 5 do 35°C, ponajprije pri 20 do 25°C.

Sterilizacije otopine u smislu izuma znači prevođenje otopine u sterilno stanje, na primjer sterilnom filtracijom kroz filtere s maksimalnom širinom pora od 0,2 µm izrađenim od prikladnog filterskog materijala kao što je, na primjer, polietar sulfon ili Nylon 6,6.

Prikladni spremnici za sušenje smrzavanjem jesu, na primjer, cjevaste staklene bočice ili staklene bočice proizvedene ekstruzijskim puhanjem. Volumen punjenja otopine je između 0,2 ml i 20 ml, ponajprije 0,5 ml do 5 ml, posebno povoljno 0,7 ml do 3,0 ml.

Otopinu se osuši smrzavanjem u spremnicima. U tu svrhu, spremnici s otopinom se stave na prethodno ohlađene ili na prethodno neohlađene postavne ploče i smrznju se. Naknadno, glavno sušenje se provodi u vakuumu u komori pod tlakom od 0,05 mbara do 1,8 mbara na postavnoj ploči pri temperaturi od -40°C do +60°C. Naknadno sušenje se provodi u komori pod tlakom od 1 µbara do 1,8 mbara na postavnoj ploči temperature od -20°C do +70°C.

Alternativno, sušenje smrzavanjem može se provesti postupkom koji je opisan u međunarodnoj patentnoj prijavi PCT/EPOO/07034. Liofilizat gore spomenutog sastava koji je postojan pri skladištenju dobije se sušenjem pomoću smrzavanja.

Izum se, osim toga, odnosi na infuzijske otopine koje sadrže repinotan ili fiziološki prihvatljivu sol repinotana, i jednu ili više kiselina odabranih iz skupine koju čine jabučna kiselina, piruvinska kiselina, limunska kiselina, fumarna kiselina, maleinska kiselina, mliječna kiselina i vinska kiselina, ponajprije limunska kiselina ili vinska kiselina.

Infuzijske otopine prema izumu pokazuju neočekivano visoku postojanost pri skladištenju.

Infuzijska otopine prema izumu je otopina koja sadrži uglavnom vodu kao otapalo i normalno ima osmolalnost u području od 250 do 500 mOsmol/kg, ponajprije 280 do 350 mOsmol/kg. Gore navedenu osmolalnost infuzijske otopine može se postići tako da je potrebna količina, na primjer, natrijevog klorida, manitola ili glukoze već prisutna kao dio krutog farmaceutskog pripravka i on se zatim rekonstituira i/ili razrijedi s vodom, ili tako da se potrebnu količinu tih tvari doda zajedno sa sredstvom za rekonstituciju ili razređivanje. Koncentracija repinotana u infuzijskoj otopini je obično 0,1 do 500 µg repinotana/ml otopine, ponajprije 0,5 do 5 µg/ml. Infuzijska otopina sadrži dovoljno kiseline tako da pri 20°C ona ima pH vrijednost 3,5 do 5, ponajprije približno 4.

Normalno, te otopine dodaju se pri sobnoj temperaturi.

Radni primjeri**Primjer 1**

Liofilizat pripravka koji sadrži repinotan hidroklorid

Mješavinu od 55 mg repinotan hidroklorida (odgovara 50 mg repinotana), 20 g manitola i 3,7 g limunske kiseline se nadopuni na 1000 ml s vodom. Tu vodenu otopinu se sterilno filtrira kroz filtere koji imaju maksimalnu širinu pora od 0,2 µm i izrađeni su iz polietar sulfona i otopinu se puni u cjevaste staklene bočice. Volumen punjenja otopine je 1 ml. Otopinu se osuši smrzavanjem u cjevastim staklenim bočicama. U tu svrhu, cjevaste staklene bočice koje sadrže otopinu pri sobnoj temperaturi stave se na postavne ploče uređaja za sušenje smrzavanjem i smrznu se pri -40°C. Zatim se glavno sušenje provodi u vakuumskoj komori pod tlakom od 0,2 mbara na postavnoj ploči temperature 0°C. Naknadno sušenje se provodi u komori pod tlakom od 10 µbara na postavnoj ploči temperature od 40°C. Krajnji proizvod koji je postojan pri skladištenju dobije se sušenjem pomoću smrzavanja.

Alternativno, sušenje smrzavanjem može se provesti postupkom opisanim u međunarodnoj patentnoj prijavi PCT/EP00/07034.

Analogno postupku opisanom u primjeru 1, proizvedeni su liofilizati koji sadrže 0,27 g, 0,681 g, 1,36 g i 2,73 g repinotan hidroklorida, što odgovara 0,25 g, 0,625 g, 1,25 g i 2,5 g repinotana s količinama manitola, limunske kiseline i vode upotrijebljenim u primjeru 1.

Primjer 2

Infuzijska otopina koja sadrži repinotan hidroklorid

Infuzijska otopina, koja je gotova za upotrebu, pripravljena je iz proizvoda osušenog smrzavanjem prema primjeru 1 rekonstitucijom liofilizata pomoću 0,9%-tne otopine NaCl i zatim razređivanjem te otopine na ukupni volumen od 500 ml. Otopina koja je gotova za upotrebu je kemijski postojana pri skladištenju najmanje 30 h pri sobnoj temperaturi, tj. otopina tada još uvijek sadrži najmanje 90% nepromijenjenog repinotana.

Primjer 3

Određivanje repinotana pomoću ELISA na mikrotitarskim pločicama

Ispitivanje je provedeno na osnovi kompetitivnog ELISA. Proteinski konjugat haptena analognog repinotanu reagira s konstantnom količinom monoklonskog ili poli-klonskog antitijela fragmenta Fab ili Fab2, specifično prema kemijskoj strukturi repinotana, i konstantnom volumenu repinotana sadržanog u uzorku. Zatim se iz omjera vezanog i slobodnog proteinskog konjugata može utvrditi koncentraciju repinotana u uzorku koji se ispituje pomoću baždarnog krivulje, koju se crta paralelno s upotrebom poznatih koncentracija repinotana.

Kozji IgG se kemijski veže na dolje spomenut analog repinotana u molarnom omjeru 1:7,5. Taj konjugat se inkubira 1 sat pri 37°C u puferu 0,1 M natrij evog karbonata, pH =9,6, u mikrotitarskoj pločici (npr. Dynex Immulon 2HB). On se zatim blokira 30 minuta pri sobnoj temperaturi upotrebom 1% otopine NaCl koja sadrži i koja je puferirana s fosfatom. Zatim se to ispere tri puta s Tween-om koji sadrži 0,05% fosfatno puferirane otopine soli.

Sada se, na tako pripremljenoj pločici, može provesti kompetitivno ispitivanje. U tu svrhu, 100 µl uzorka se stavi u jamice mikrotitarske pločice i pomiješa se sa 100 µl otopine antitijela (mišje anti-repinotan antitijelo 10 ng/ml u fosfatno puferiranoj otopini soli). Mješavinu se inkubira 1 sat pri sobnoj temperaturi. Zatim se ispere tri puta s puferom za ispiranje (vidi gore), i u slijedećoj, sekundarnoj reakciji se antitijelo, povezano na hrenovu peroksidazu (1:1; Zymed kozji-anti-mišji IgG; razrijeđen 1:1 000) pipetira u mikrotitarsku jamicu. Ono se veže na repinotan-specifično mišje antitijelo koje je povezano na repinotan-analog haptenskog konjugata. Količina na taj način povezanog repinotana-specifičnog mišjeg antitijela je indirektno proporcionalna količini slobodnog repinotana u uzorku. Ispere se tri puta, čime se ispere suvišak konjugata antitijelo-enzima i nakon dodatka enzimskog supstrata (TMB), zaostalu povezanu količinu se odredi fotometrijski kinetičkim mjerenjem. Upotrebom opisanog protokola mogu se, pomoću odgovarajućeg baždarenja, odrediti koncentracije repinotana između 1 i 100 ng/ml.

Primjer 4**Point-of-care ispitivanje repinotana**

Ovo ispitivanje repinotana je predviđeno za primjenu u području intenzivne njege i u drugim područjima u bolnici za određivanje koncentracija repinotana koje su ispod ili iznad definiranih graničnih koncentracija od približno 17 ng/ml u cjelovitoj krvi, serumu ili plazmu. To je jednokratno ispitivanje s očnim očitavanjem. Opis uređaja Ispitivanje se temelji na kompetitivnom imunološkom postupku za određivanje gore opisanih malih molekula. Kao mehanizam za očitavanje, umjesto postupka enzimске spektroskopije, koristi se signal reflektiran od koloidnih čestica zlata. Sve komponente potrebne za ispitivanje i mehaničke manipulacije koje su nužne za provedbu konvencionalnog imunosnog ispitivanja ugrađene su u plastičnu napravu. Ona sadrži mehanizam za odvajanje krvnih stanica od seruma i mehanizam za točno mjerenje određene količine tako odvojenog seruma. Spremnik pufera sadrži tekuću fazu potrebnu za reakciju koja omogućuje kapilarno pomicanje unutar sistema. Anti-repinotan antitijelo i konjugat haptent-kozji IgG-zlato se liofiliziraju u reakcijskoj čeliji plastične naprave. Sistem također obuhvaća komoru za miješanje na kraju kapilare i traku za imunokromatografsko ispitivanje. Na ispitne trake su nanese slijedeće stacionarne reakcijske zone: magareće anti-mišje antitijelo i zečje anti-kozje antitijelo.

U odsutnosti repinotana, magareće anti-mišje antitijelo hvata pretežno dio zlatnog konjugata i tvori crveno obojenu zonu. S rastućom koncentracijom repinotana u uzorku koji se ispituje, konjugat zlata premješten proporcionalno na anti-repinotan antitijelo, hvata se u reakciji zečjeg anti-kozjeg.

Na kraju imunokromatografske trake za pokus nalazi se apsorpcijska zona na čijem početku je nanešena boja topiva u vodi. Ta boja se pomiče naprijed s frontom tekućine i ide do kraja apsorpcijske zone. To pokazuje kraj reakcije ispitivanja.

Trajanje ispitivanja je približno 15 minuta od stavljanja uzorka do očitavanja rezultata. Ispitivanje se može provesti sa 100-150 µl cjelovite krvi, iz čega se dobije približno 15 µl seruma.

Za pripravu naprave za ispitivanje potrebne su slijedeće komponente reakcije:

- a) monoklonski anti-repinotan,
- b) konjugat zlato-repinotan analog-kozji IgG,
- c) koloidno zlato, 20 nm,
- d) nitrocelulozna membrana,
- e) magareći anti-mišji,
- f) zečji anti-kozji,
- g) standardni repinotan,
- h) 0,2%-tni Triton X 305 u fosfatno puferiranoj otopini soli za pokus,
- i) 0,4%-tni Nonidet P-40, 2% BSA, 2,5% sahoza, 1,25% trehaloza, u fosfatno puferiranoj liofiliziranoj otopini soli za pokus,
- j) 2,5 cm materijala za upijanje,
- k) plastična posuda, širine 5,3 cm i debljine 8 mil,
- l) humani serum.

Postupak ispitivanje

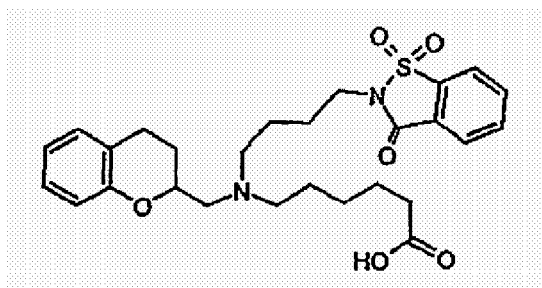
Otprilike 150 µl cjelovite krvi (5 kapi), seruma ili plazme stavi se na pločicu za uzorak. Napravu se stavi u vodoravni položaj na približno 3 minute. Zatim se ručicu klipa za doziranje zakrene za 90° da ga se poravna s dnom naprave. Zatim se napravu stavi pri sobnoj temperaturi u vodoravan položaj na 15 minuta. Kad se na oknu indikatora pokaže plava točka, ispitivanje je gotovo i rezultat se može očitati.

Osim stavljanja uzorka i aktiviranja klipa za doziranje, za cijelu provedbu ispitivanja nisu potrebni nikakvi daljnji zahvati na uzorku ili na napravi. Zbog toga ispitivanje može provesti i osoba bez tehničkog obrazovanja.

Interpretacija rezultata

Kako je opisano u WO-A-99/46591, usporedba intenziteta dviju traka u oknima A i B omogućuje jednostavno polukvantitativno određivanje koncentracije repinotana. Ako je signal u oknu A intenzivniji od signala u oknu B, koncentracija repinotana je iznad određene granične vrijednosti, a u obratnoj razdiobi intenziteta, ona je ispod određene granične vrijednosti. Graničnu vrijednost se može utvrditi pomoću omjera koncentracije anti-repinotan antitijela i koncentracije zlato-repinotan analog-kozjeg IgGs u liofilizatu.

Analog repinotana u konjugatu zlato-repinotan analog-kozjeg IgG je spoj formule:

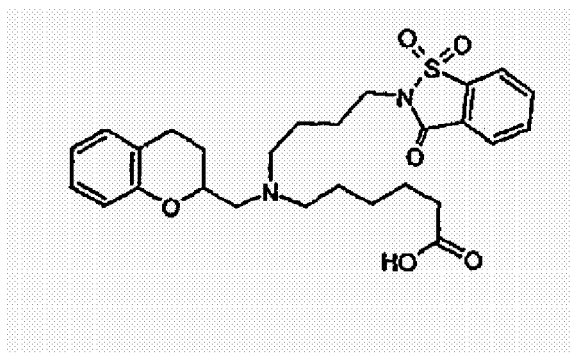


Ovaj spoj je nov i može se proizvesti postupkom opisanim u EP-A-0 352 613, na primjer reakcijom repinotana s terc-butil 6-brom-heksankarboksilatom u prisutnosti baze u prikladnim otapalima i zatim kiselim cijepanjem estera.

5

PATENTNI ZAHTEJEVI

1. Garnitura, **naznačena time**, da obuhvaća
 - a) farmaceutski pripravak koji sadrži repinotan i/ili fiziološki prihvatljivu sol repinotana, i
 - b) za određivanje koncentracije repinotana ili njegovih metabolita u tjelesnim tekućinama.
2. Garnitura prema zahtjevu 1, **naznačena time**, da farmaceutski pripravak sadrži repinotan hidroklorid.
3. Garnitura prema zahtjevu 1 ili 2, **naznačena time**, da ona obuhvaća sredstvo za određivanje koncentracije analita u krvi ili u frakcijama dobivenim iz krvi.
4. Garnitura prema zahtjevu 3, **naznačena time**, da ona obuhvaća sredstvo za određivanje koncentracije analita u krvnoj plazmi.
5. Garnitura prema bilo kojem zahtjevu 1 do 4, **naznačena time**, da to sredstvo djeluje u skladu s imunološkim procesom.
6. Garnitura prema bilo kojem zahtjevu 1 do 5, **naznačena time**, da se to sredstvo može upotrijebiti na mjestu liječenja.
7. Garnitura prema bilo kojem zahtjevu 1 do 6, **naznačena time**, da ona služi za akutno liječenje neurodegenerativnih bolesti.
8. Garnitura prema bilo kojem zahtjevu 1 do 6, **naznačena time**, da ona služi za akutno liječenje udara kapi ili kraniocerebralne traume.
9. Kruti farmaceutski pripravak, **naznačen time**, da on sadrži repinotan ili fiziološki prihvatljivu sol repinotana, i fiziološki prihvatljivu kiselinu.
10. Pripravak prema zahtjevu 9, **naznačen time**, da je maseni udio aktivnog spoja 0,01-15 mas. %, a maseni udio kiseline je 0,5-15 mas. %.
11. Pripravak prema zahtjevu 9 ili 10, **naznačen time**, da on kao aktivan spoj sadrži repinotan hidroklorid i limunsku kiselinu ili vinsku kiselinu kao kiselinu.
12. Postupak za proizvodnju pripravka prema bilo kojem zahtjevu 9 do 11, **naznačen time**, da se aktivan spoj, kiselina i druge farmaceutski pomoćne tvari otape u vodi i/ili u drugim prikladnim otapalima, otopinu se prema potrebi sterilizira i otopinu se zatim liofilizira.
13. Pripravak, **naznačen time**, da se on može dobiti postupkom prema zahtjevu 12.
14. Infuzijska otopina, **naznačena time**, da ona sadrži repinotan ili fiziološki prihvatljivu sol repinotana, i jednu ili više kiselina odabranih iz skupine koju čine jabučna kiselina, piruvinska kiselina, limunska kiselina, fumarna kiselina, maleinska kiselina, mliječna i vinska kiselina.
15. Infuzijska otopina prema zahtjevu 14, **naznačena time**, da kiselina je limunska kiselina ili vinska kiselina.
16. Postupak za pripremu infuzijske otopine koja sadrži repinotan ili fiziološki prihvatljivu sol repinotana, i jednu ili više kiselina odabranih iz skupine koju čine jabučna kiselina, piruvinska kiselina, limunska kiselina, fumarna kiselina, maleinska kiselina, mliječna i vinska kiselina, **naznačen time**, da se vodu ili izotoničnu otopinu elektrolita doda pripravku prema zahtjevu 13.
17. Infuzijska otopina, **naznačena time**, da se ona može dobiti postupkom prema zahtjevu 16.
18. Upotreba pripravka prema zahtjevu 13, **naznačena time**, da se on koristi za pripremu infuzijskih otopina.
19. Spoj, **naznačen time**, da on ima formulu



SAŽETAK

5

Izum se odnosi na garnituru koja obuhvaća farmaceutski pripravak koji sadrži repinotan ili fiziološki prihvatljivu sol repinotana, i sredstvo za određivanje koncentracije repinotana ili njegovog metabolita u tjelesnim tekućinama, i također na nove farmaceutske pripravke koji sadrže repinotan ili fiziološki prihvatljivu sol repinotana, i na postupke za njihovu proizvodnju.