



**Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein**  
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

**⑫ PATENTSCHRIFT A5**

⑪

**644 456**

⑯1 Gesuchsnummer: 417/78

⑯3 Inhaber:  
The Wellcome Foundation Limited, London NW1  
(GB)

⑯2 Anmeldungsdatum: 16.01.1978

⑯2 Erfinder:  
Solomon Halbert Snyder, Baltimore/MD (US)

⑯4 Patent erteilt: 31.07.1984

⑯5 Vertreter:  
Andrew Kerr, Arlesheim

⑯5 Patentschrift  
veröffentlicht: 31.07.1984

**⑯4 Verfahren zur Bestimmung von Neuroleptika.**

⑯5 Neuroleptika werden bestimmt indem man ein Dopaminrezeptormaterial, einen radioaktiven Dopaminrezeptorbinder und eine Probe menschlicher Körperflüssigkeit bebrütet. Anschliessend misst man die prozentuale Hemmung der Bindung der radioaktiven Verbindung an das Dopaminrezeptormaterial. Unter Verwendung der gemessenen prozentualen Hemmung bestimmt man die Konzentration an Neuroleptika in der Körperflüssigkeit. Die Zubereitung zur Durchführung dieses Verfahrens enthält einen radioaktiven Dopaminrezeptorbinder, ein Neuroleptikum, ein Dopaminrezeptormaterial und menschliche Körperflüssigkeit.

Durch das neue Verfahren können Neuroleptika in menschlichen Körperflüssigkeiten wie Blutserum und Blutplasma auf einfache Weise bestimmt werden, wodurch die Wahl der individuellen optimalen Dosierung der Neuroleptika für den einzelnen Patienten erleichtert wird.

## PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Bestimmung von Neuroleptika, dadurch gekennzeichnet, dass man

a) zusammen ein Dopaminrezeptormaterial, einen radioaktiven Dopaminrezeptorbinder und eine Probe menschlicher Körperflüssigkeit bebrütet;

b) die prozentuale Hemmung der Bindung der radioaktiven Verbindung an das Dopaminrezeptormaterial misst und

c) die Konzentration an Neuroleptika in der Körperflüssigkeit, unter Verwendung der gemessenen prozentualen Hemmung, bestimmt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man Dopaminrezeptormaterial aus Säugetierhirngewebe verwendet.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man Dopaminrezeptormaterial aus Nucleus caudatus vom Kalb verwendet.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass man einen radioaktiven Dopaminrezeptorbinder, welcher als Radionuklid Tritium enthält, verwendet.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass man einen radioaktiven Dopaminrezeptorbinder verwendet, der als Radionuklid ein Radioisotop von Jod enthält.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Radioisotop  $^{125}\text{J}$  oder  $^{131}\text{I}$  ist.

7. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Radioisotop  $^{125}\text{J}$  ist.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass man als radioaktiven Dopaminrezeptorbinder 4-[4-(p-Chlorphenyl)-4-hydroxypiperidino]-4'-fluorbutyrophonen, 1-[1-[3-(p-Fluorbenzoyl)propyl]-4-piperidyl]-2-benzimidazolinon, 1-[1-[4,4-Bis(p-fluorphenyl)-butyl]-4-piperidyl]-2-benzimidazolinon, 2-Chlor-10-(3-dimethylamino-propyl)phenothiazin, 4-[3-[2-(Trifluormethyl)thioxanthan-9-yliden]-propyl]-1-piperazinäthanol, 8-[3-(4-Fluorbenzoyl)-propyl]-1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4,5]-decan-4-on, 8-Chlor-11-(4-methyl-piperazinyl)-5H-dibenzo-[b,e]-1,4-diazepin, 10-[2-(1-Methyl-2-piperidyl)-äthyl]-2-(methylthio)-phenothiazin, 10-[3-(4-Methylpiperazin-1-yl)propyl]-2-trifluormethyl-phenothiazin, 8-[4,4-Bis(p-fluorphenyl)-butyl]-1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4,5]-decan-4-on, 4-[3-(2-Chlorthioxanthen-9-yliden)propyl]-1-piperazinäthanol, 2-Chlor-11-(4-methyl-1-piperazinyl)-dibenz[b,f]-1,4-oxazepin, 4-[3-(2-Chlorphenothiazin-10-yl)propyl]-1-piperazinäthanol, 4-(2-Aminoäthyl) pyrocatechol oder 3,4-Dihydroxyaporphin, welche mit einem Radionuklid markiert sind, verwendet.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass man als radioaktives Dopaminrezeptorbinder  $^3\text{H}$ -1-[1-[p-Fluorbenzoyl]propyl]-4-piperidyl]-2-benzimidazolinon,  $^3\text{H}$ -4-[4-(p-Chlorphenyl)-4-hydroxypiperidino]-4'-fluorbutyrophonen oder  $^3\text{H}$ -8-[3-(4-Fluorbenzoyl)propyl]-1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4,5]-decan-4-on verwendet.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass man als menschliche Körperflüssigkeit Blutserum, Blutplasma, Urin oder Cerebrospinal-Flüssigkeit verwendet.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass man als menschliche Körperflüssigkeit Blutserum oder Blutplasma verwendet.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass im Schritt a) das Volumen der menschlichen Körperflüssigkeit nicht mehr als 15% des Gesamtvoluems aller Bestandteile ausmacht.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, da-

durch gekennzeichnet, dass das Volumen der menschlichen Körperflüssigkeit 10% oder weniger des Gesamtvoluems aller Bestandteile ausmacht.

14. Mittel zur Durchführung des Verfahrens gemäß Anspruch 1, enthaltend

- i) einen radioaktiven Dopaminrezeptorbinder;
- ii) ein Neuroleptikum;
- iii) ein Dopaminrezeptormaterial und
- iv) menschliche Körperflüssigkeit.

15. Mittel nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass es als Dopaminrezeptormaterial ein solches aus Säugetierhirngewebe enthält.

16. Mittel nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass es als Dopaminrezeptormaterial ein solches aus Nucleus audatus-Gewebe vom Kalb enthält.

17. Mittel nach einem der Ansprüche 14 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass der radioaktive Dopaminrezeptorbinder Tritium als Radionuklid enthält.

18. Mittel nach einem der Ansprüche 14 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass der radioaktive Dopaminrezeptorbinder  $^{125}\text{J}$  oder  $^{131}\text{I}$  als Radionuklid enthält.

19. Mittel nach einem der Ansprüche 14 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass es als radioaktiven Dopaminrezeptorbinder 4-[4-(p-Chlorphenyl)-4-hydroxypiperidino]-4'-fluorbutyrophonen, 1-[1-[3-(p-Fluorbenzoyl)propyl]-4-piperidyl]-2-benzimidazolinon, 1-[1-[4,4-Bis(p-fluorphenyl)-butyl]-4-piperidyl]-2-benzimidazolinon, 2-Chlor-10-(3-dimethylamino-propyl)phenothiazin, 4-[3-[2-(Trifluormethyl)thioxanthan-9-yliden]-propyl]-1-piperazinäthanol, 8-[3-(4-Fluorbenzoyl)-butyl]-1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4,5]-decan-4-on, 8-Chlor-11-(4-methyl-piperazinyl)-5H-dibenzo-[b,e]-1,4-diazepin, 10-[2-(1-Methyl-2-piperidyl)-äthyl]-2-(methylthio)-phenothiazin, 10-[3-(4-Methylpiperazin-1-yl)propyl]-2-trifluormethyl-phenothiazin, 8-[4,4-Bis(p-fluorphenyl)-butyl]-1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4,5]-decan-4-on, 4-[3-(2-Chlorthioxanthen-9-yliden)propyl]-1-piperazinäthanol, 2-Chlor-11-(4-methyl-1-piperazinyl)-dibenz[b,f]-1,4-oxazepin, 4-[3-(2-Chlorphenothiazin-10-yl)propyl]-1-piperazinäthanol, 4-(2-Aminoäthyl) pyrocatechol oder 3,4-Dihydroxyaporphin, welche mit einem Radionuklid markiert sind, enthält.

20. Mittel nach einem der Ansprüche 14 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass es als radioaktiven Dopaminrezeptorbinder  $^3\text{H}$ -1-[1-[3-(p-Fluorbenzoyl)-propyl]-4-piperidyl]-2-benzimidazolinon,  $^3\text{H}$ -4-[4-(p-Chlorphenyl)-4-hydroxypiperidino]-4'-fluorbutyrophonen oder  $^3\text{H}$ -8-[3-(4-Fluorbenzoyl)-propyl]-1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4,5]-decan-4-on-enthält.

21. Mittel nach einem der Ansprüche 14 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass es als menschliche Körperflüssigkeit Blutserum oder Blutplasma enthält.

22. Mittel nach einem der Ansprüche 14 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass es als Neuroleptikum 4-[4-(p-Chlorphenyl)-4-hydroxypiperidino]-4'-fluorbutyrophonen, 1-[1-[4,4-Bis(p-fluorphenyl)-butyl]-4-piperidyl]-2-benzimidazolinon, 2-Chlor-10-(3-dimethylaminopropyl)phenothiazin, 4-[3-[2-(Trifluormethyl)-phenotiazin-10-yl]propyl]-1-piperazinäthanol, 4-[3-[2-(Trifluormethyl)thioxanthan-9-yliden]-propyl]-1-piperazinäthanol, 8-[3-(4-Fluorbenzoyl)-propyl]-1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4,5]-decan-4-on, 8-Chlor-11-(4-methyl-piperazinyl)-5H-dibenzo-[b,e]-1,4-diazepin, 10-[2-(1-Methyl-2-piperidyl)-äthyl]-2-(methylthio)-phenothiazin, 10-[3-(4-Methylpiperazin-1-yl)propyl]-2-trifluormethyl-phenothiazin, 8-[4,4-Bis(p-fluorphenyl)-butyl]-1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4,5]-decan-4-on, 4-[3-(2-Chlorthioxanthen-9-yliden)propyl]-1-piperazinäthanol oder 2-Chlor-11-(4-methyl-1-piperazinyl)-dibenz[b,f]-1,4-oxazepin enthält.

23. Mittel zur Durchführung des Verfahrens gemäß Anspruch 1, bestehend aus

- a) einem ersten verschlossenen Gefäss mit dem Dopaminrezeptormaterial,
- b) einem zweiten verschlossenen Gefäss mit einem radioaktiven Dopaminrezeptorbinder, gegebenenfalls
- c) einem dritten verschlossenen Gefäss mit einer Standardlösung eines Neurolepticums und gegebenenfalls
- d) einem vierten verschlossenen Gefäss mit einer Pufferlösung.

24. Mittel nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass der Inhalt beider Gefässe a) und b) lyophilisiert ist.

25. Mittel nach Anspruch 23 oder 24, dadurch gekennzeichnet, dass das Dopaminrezeptormaterial aus Säugetierz Hirngewebe stammt.

26. Mittel nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass das Dopaminrezeptormaterial aus Nucleus caudatus Ge-  
webe vom Kalb stammt.

27. Mittel nach einem der Ansprüche 23 bis 26, dadurch gekennzeichnet, dass der radioaktive Dopaminrezeptorbinder Tritium als Radionuklid enthält.

28. Mittel nach einem der Ansprüche 23 bis 26, dadurch gekennzeichnet, dass der radioaktive Dopaminrezeptorbinder <sup>125</sup>I oder <sup>131</sup>I als Radionuklid enthält.

29. Mittel nach einem der Ansprüche 23 bis 28, dadurch gekennzeichnet, dass es als radioaktiven Dopaminrezeptorbinder 4-[4-(p-Chlorphenyl)-4-hydroxypiperidino]-4'-fluorbutyrophonen, 1-[1-[3-(p-Fluorbenzoyl)propyl]-4-piperidyl]-2-benzimidazolinon, 1-[1-[4,4-Bis(p-fluorophenyl)-butyl]-4-piperidyl]-2-benzimidazolinon, 2-Chlor-10-(3-dimethylaminopropyl)-phenothiazin, 4-[3-[2-(Trifluormethyl)-thioxanthan-9-yilden]-propyl]-1-piperazinäthanol, 8-[3-(4-Fluorbenzoyl)-propyl]-1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4,5]-decan-4-on, 8-Chlor-11-(4-methyl-piperazinyl)-5H-dibenzo-[b,e]-1,4-diazepin, 10-[2-(Methyl-2-piperidyl)-äthyl]-2-(methylthio)-phenothiazin 10-[3-(4-Methylpiperazin-1-yl)propyl]-2-trifluormethyl-phenothiazin, 8-[4,4-Bis(p-fluorophenyl)-butyl]-1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4,5]-decan-4-on, 4-[3-(2-Chlorthioxanthen-9-yilden)propyl]-1-piperazinäthanol, 2-Chlor-11-(4-methyl-1-piperazinyl)dibenz[b,f]-1,4-oxazepin, 4-[3-(2-Chlorphenothiazin-10-yl)propyl]-1-piperazinäthanol, 4-(2-Aminoäthyl)pyrocatechol oder 3,4-Dihydroxyaporpin, welche mit einem Radionuklid markiert sind, enthält.

30. Mittel nach einem der Ansprüche 23 bis 26, dadurch gekennzeichnet, dass es als radioaktiven Dopaminrezeptorbinder <sup>3</sup>H-1-[1-[3-(p-Fluorbenzoyl)-propyl]-4-piperidyl]-2-benzimidazolinon, <sup>3</sup>H-4-[4-(p-Chlorphenyl)-4-hydroxypiperidino]-4'-fluorbutyrophonen oder <sup>3</sup>H-8-[3-(4-Fluorbenzoyl)-propyl]-1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4,5]decan-4-on enthält.

---

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung von Neuroleptika, sowie Mittel zur Durchführung des Verfahrens.

Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung die Bestimmung von Neuroleptika in menschlichen Körperflüssigkeiten, beispielsweise in Blutserum, Blutplasma, Urin, Speichel oder Cerebrospinal-Flüssigkeit.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher ein Verfahren zur Bestimmung von Neuroleptika, das dadurch gekennzeichnet ist, dass man

a) zusammen ein Dopaminrezeptormaterial, einen radioaktiven Dopaminrezeptorbinder und eine Probe menschlicher Körperflüssigkeit brütet;

b) die prozentuale Hemmung der Bindung der radioaktiven Verbindung an das Dopaminrezeptormaterial misst und  
c) die Konzentration an Neuroleptika in der Körperflüs-

sigkeit, unter Verwendung der gemessenen prozentualen Hemmung, bestimmt.

Neuroleptika, welche einen grossen Bereich an psychotropen Mitteln darstellen, werden manchmal auch als Major Tranquillizer bezeichnet. Die üblichsten Unterklassen der Neuroleptika sind a) die Phenothiazine und b) die Butyrophenone. Diese Mittel werden auf der ganzen Welt in grossem Masse zur Behandlung von Schizophrenie, gegen bestimmte Formen der Depression und als Antiemetika verschrieben.  
10 Die erforderliche Dosierung dieser Mittel kann für verschiedene Patienten stark variieren, was zum Teil auf die beachtlichen Unterschiede in der Aufnahme dieser Mittel bei verschiedenen Individuen zurückzuführen ist.

Es wurde seit langem angenommen, dass ein einfaches und empfindliches Verfahren zur Bestimmung von Neuroleptika im Blut oder anderen Körperteilen die Wahl einer optimalen Dosierung eines bestimmten Mittels, für individuelle Patienten, stark erleichtern würde. Dabei ist wichtig, sicherzustellen, dass a) die Patienten einen für die therapeutische 15 Wirksamkeit genügend hohen Gehalt des Mittels im Blut und im Gehirn aufweisen und b) der Patient keine höhere Dosis des Mittels erhält, als zur Behandlung der Symptome notwendig ist.

Langzeitbehandlungen mit hohen Dosierungen dieser 20 Mittel werden manchmal von abnormalen motorischen Bewegungen, welche als tardive Dyskinesie bezeichnet werden, begleitet. Diese entstellende und oft bleibende Nebenwirkung wird beispielsweise in The Pharmacological Basis of Therapeutics von Goodman, L.S. and Gilman, A. eds., Macmillian Publishing Co., Inc., New York, 5. Auflage (1975), Seite 169 beschrieben.

Ein Bestimmungsverfahren für Neuroleptika in Körperflüssigkeiten sollte im Idealfall für alle Neuroleptika anwendbar sein. Da Metabolite verwandter Mittel oft auch therapeutische Wirksamkeit zeigen, sollte ein ideales Verfahren die pharmakologisch wirksamen Metabolite, jedoch nicht jene, die pharmakologisch unwirksam sind, zusätzlich zum 25 ursprünglichen Mittel bestimmen können.

Die gegenwärtig bekannten Techniken, wie Gas-Flüssigchromatographie, können in klinischen Laboratorien nicht routinemässig angewendet werden, da sie ziemlich kostspielig und sehr zeitraubend sind. Außerdem können diese Techniken nur für einzelne Mittel, jedoch nicht für die ganze Klasse der Neuroleptika angewendet werden. Weiterhin können mit solchen bekannten Verfahren aktive Metabolite nicht spezifisch nachgewiesen werden.

Seit 1962 hat eine Anzahl von indirekten Hinweisen die Vermutung nahegelegt, dass die therapeutische Wirksamkeit von Neuroleptika bei schizophrenen Patienten u.a. auf die 30 Blockierung der Rezeptorstellen für Dopamin im Hirn beruht. In keiner dieser Untersuchungen konnten die Forscher den Dopaminrezeptor direkt messen.

Unlängst gelang einer Gruppe von Forschern unter Verwendung von <sup>3</sup>H-4-[4-(p-Chlorphenyl)-4-hydroxypiperidino]-4'-fluorbutyrophonen oder <sup>3</sup>H-4-(2-Aminoäthyl)pyrocatechol den Dopaminrezeptor so zu markieren, dass er direkt gemessen werden konnte, siehe Snyder et al., Psychopharmacology Communications, 1 (6), 663 bis 673 (1975); Enna et al., Nature, 263, 23. September 1976, 338 bis 344 und Seeman et al.,

Nature, 261, 24. Juni 1976, 717 bis 719. In den gleichen Untersuchungen und in den gleichen Publikationen wurde gezeigt, dass die Neuroleptika im Verhältnis zu ihrer klinischen 55 Wirksamkeit mit <sup>3</sup>H-4-(2-Aminoäthyl)pyrocatechol und <sup>3</sup>H-4-[4-(p-Chlorphenyl)-4-hydroxypiperidino]-4'-fluorbutyrophonen um die Bindung an die Rezeptorstellen konkurrieren, wodurch nachgewiesen wurde, dass die therapeutische Wirksamkeit dieser Mittel mit der Blockierung der Dopaminrezeptoren einhergeht.

Keine dieser Veröffentlichungen über den Dopaminrezeptor enthielt mehr als die Tatsache, dass der Dopaminrezeptor mit <sup>3</sup>H-4-[4-(p-Chlorphenyl)-4-hydroxypiperidino]-4'-fluorbutyphenon und <sup>3</sup>H-4-(2-Aminoäthyl)pyrocatechol gemessen werden kann und das Neuroleptika die Bindung von <sup>3</sup>H-Agenzien an den Rezeptor verhindern. Die in den oben genannten Publikationen enthaltene Information ergibt kein Mittel zur quantitativen Bestimmung von Neuroleptika in Körperflüssigkeiten von Menschen, da noch eine Anzahl von Elementen für eine erfolgreiche Bestimmung des Gehaltes an Neuroleptika notwendig war.

Für die erfolgreiche Bestimmung des Gehaltes an Neuroleptika war es notwendig, die nichtspezifische Wirkung von Körperflüssigkeiten auf die Bindungseigenschaften von Dopaminrezeptoren und Mittel zu deren Verminderung oder Aufhebung zu entdecken. Es war auch notwendig, zu entdecken, dass Neuroleptika, welchen Körperflüssigkeiten zugegeben wurden, in einer Form wiedergewonnen werden können, welche noch immer mit dem Dopaminrezeptor reagieren können. Ausserdem war es notwendig, zu zeigen, dass in Gegenwart von Körperflüssigkeiten höhere Gehalte an Neuroleptika in einer vorbestimmbaren Art progressiv stärkere Blockierung des Dopaminrezeptors bewirken würden. Nur nachdem eine grössere Anzahl von den genannten Entdeckungen gemacht wurden, wodurch die nichtspezifischen Wirkungen der Körperflüssigkeiten auf den Dopaminrezeptor vermindert wurden, konnten die zugegebenen Neuroleptika zurückgewonnen werden. Dadurch wurde eine reproduzierbare Erhöhung der Rezeptorblockierung mit erhöhten Mengen an Neuroleptika in Körperflüssigkeiten erzielt und die Messung der Neuroleptika in Körperflüssigkeiten gemäss der vorliegenden Erfahrung ermöglicht.

Die Untersuchung von Enna and Snyder, J. Neurochem., 26 (1976), 221 bis 224 erscheint auf den ersten Blick für die vorliegende Erfindung von Bedeutung. Diese Veröffentlichung beschreibt die Verwendung eines GABA-Rezeptors als Mittel für die Bestimmung von GABA ( $\gamma$ -Aminobuttersäure) im Hirngewebe. Dieses Verfahren kann jedoch nur für GABA angewendet werden, da Neuroleptika kaum an den GABA-Rezeptor gebunden werden. Bei der Bindung an den GABA-Rezeptor zeigen die Major Tranquillizer weniger als 1/1000 der Aktivität von GABA, so dass ein Gehalt an Neuroleptika, wie er in Körperflüssigkeiten von Patienten, denen sie verabreicht wurden, vorkommen, gar nicht nachgewiesen werden kann. Infolge der begrenzten Empfindlichkeit der radiologischen GABA-Rezeptormethode konnte nicht erwartet werden, dass mit einem anderen Rezeptor so niedrige Mengen an Neuroleptika, wie sie in den Körperflüssigkeiten von Patienten vorkommen, nachgewiesen werden können. Ausserdem ist in eigentlicher klinischer Praxis die für die Bestimmung von Arzneimitteln wichtigste Körperflüssigkeit Blut. Plasmaproteine im Blut verhindern die Bindung von GABA an seinen Rezeptor, so dass aufgrund der GABA-Bestimmung man nicht erwarten kann, GABA oder Neuroleptika im Blut mit dem GABA-Rezeptor oder einem anderen Rezeptor bestimmen zu können.

Gemäss der vorliegenden Erfahrung ist es nunmehr möglich, Neuroleptika in Blutplasma oder anderen Körperflüssigkeiten mit einer tausendmal grösseren Empfindlichkeit als mit der GABA-Methode zu bestimmen. Der GABA-Rezeptor zeigt keine genügende Affinität zu bekannten Neuroleptika, um diese im Patienten zu bestimmen. Somit ist die GABA-Methode eingeschränkt auf die Bestimmung von GABA, einer neurohumuralen Mittlersubstanz im Hirn und kann nicht zur Messung von klinisch verwendeten Neuroleptika angewendet werden.

Es wird auch vermutet, dass Arzneimittel, welche keine

Neuroleptika darstellen, die Dopaminrezeptorstellen nicht binden.

Die vorliegende Erfindung betrifft ein neues Verfahren, welches eine schnelle Bestimmung der Konzentration von Neuroleptika in Körperflüssigkeiten der Patienten erlaubt. Diese Bestimmung ist bekanntlich sehr wichtig, da bei den meisten Patienten eine gewisse vorbestimmte Konzentration des Mittels notwendig ist, um die gewünschte medizinische Wirkung zu erzielen. Obwohl die gewünschte Konzentration an Neuroleptika im Blut des Patienten bekannt ist, wurde gefunden, dass die Aufnahme der Neuroleptika bei den meisten Patienten recht verschieden ist, wodurch der behandelnde Arzt keine Sicherheit hat, dass eine bestimmte, dem Patienten verabreichte Dosis an Neuroleptika die gewünschte Konzentration im Blut bewirken wird oder nicht. Wie bereits oben erwähnt, sind die bekannten Verfahren zur Konzentrationsbestimmung von Neuroleptika zeitraubend und kostspielig, weshalb ein Bedarf für ein neues verbessertes Verfahren, welches leicht und schnell angewendet werden kann, bestand.

Durch dieses Verfahren sollte es möglich werden, dem einzelnen Patienten die richtige Dosierung zur Erreichung eines heilsamen Effektes, ohne Nebenwirkungen, zu verabreichen.

Die vorliegende Erfindung liefert ein solches Verfahren und basiert teilweise auf der Entdeckung, dass Neuroleptika in Körperflüssigkeiten, beispielsweise im Blut des Patienten (Menschen), sich beim Binden an die Dopaminrezeptorstellen des Dopaminrezeptormaterials, neben radioaktiven Dopaminrezeptorbündeln, so erfolgreich behaupten kann, dass eine genaue Bestimmung der Neuroleptikakonzentration ermöglicht wird.

Die Erfindung beruht teilweise auch auf der Entdeckung, dass, wenn der Binder und das Arzneimittel während der gewünschten Zeit auf den Dopaminrezeptor eingewirkt haben und das Dopaminrezeptormaterial an das Arzneimittel gebunden wurde, das Arzneimittel und der Binder erfolgreich vom ungebundenen Arzneimittel und Binder und den Körperflüssigkeiten abgetrennt werden kann, ohne dass die Genauigkeit der Konzentrationsmessung beeinträchtigt wird.

Nach der Trennung kann der Gehalt an radioaktivem Dopaminrezeptorbinder in einer üblichen Vorrichtung zur Messung der Radioaktivität, wie beispielsweise einem  $\gamma$ -Zähler oder Szintillationszähler, je nach Art des Radionuklids des radioaktiven Dopaminrezeptorbinders festgestellt werden und die Konzentration an Neuroleptika in der Körperflüssigkeit des Patienten anhand von Vergleichen mit Eichkurven bestimmt werden.

Die Erfindung liefert somit ein Verfahren zur Bestimmung des Neuroleptikagehaltes in Körperflüssigkeiten von Patienten, basierend auf der Fähigkeit von Neuroleptika mit radioaktiven Bindern (Liganden) einschliesslich Dopaminagonisten und -antagonisten beim Binden an Dopaminrezeptorstellen von Dopaminrezeptormaterial zu konkurrieren.

In diesem Verfahren vermindern höhere Mengen von Neuroleptika und deren pharmakologisch wirksamen Metaboliten die Bindung von radioaktivem Binder an das Dopaminrezeptormaterial.

Die Bestimmung in der Körperflüssigkeit kann ohne vorherige Abtrennung des Neuroleptikums erfolgen, d.h. Blutplasma oder Blutserum kann direkt zur Bestimmung des darin enthaltenen Gehaltes an Neuroleptika verwendet werden.

Das Dopaminrezeptormaterial kann z.B. aus tierischem Gewebe, welches eine hohe Konzentration an Dopaminrezeptoren aufweist, gewonnen werden, beispielsweise aus Nucleus caudatus und Putamen, Nieren und den oberen Cervicalganglien und kann von Vögeln oder Säugetieren stammen, beispielsweise von Rindern, Schweinen, Schafen, Nagetieren oder Menschen. Hirngewebe von Säugetieren wird bevorzugt

und aus praktischen Gründen ist eine der geeignetsten Quellen für Dopaminrezeptormaterial Kalbshirn, welche leicht von Schlachthäusern erhalten werden kann.

Das Dopaminrezeptormaterial kann als solches eingesetzt werden oder es kann nach bekannten Methoden zur Anreicherung von synaptischen Membranen fraktioniert und gegebenenfalls gewaschen werden.

Dopaminrezeptormaterial kann vorzugsweise als nach den bekannten Verfahren gefriergetrocknete (lyophilisierte) Zubereitung in einem Reagenzglas in den Handel gebracht werden. Es kann an das Innere des Reagenzglases gebunden werden, so dass der Binder und das Arzneimittel leicht zugegeben werden können.

Als radioaktive Dopaminrezeptorbinder können radioaktiv markierte Verbindungen, wie z.B. Haloperidol (Kurzbezeichnung für 4-[4-(p-Chlorphenyl)-4-hydroxypiperidino]-4'-fluorbutyrophenen); Benperidol (Kurzbezeichnung für 1-[1-[3-(p-Fluorbenzoyl)propyl]-4-piperidyl]-2-benzimidazolinon); Pimozid (Kurzbezeichnung für 1-[1-[4,4-Bis(p-fluorophenyl)-butyl]-4-piperidyl]-2-benzimidazolinon); Chlorpromazin (Kurzbezeichnung für 2-Chlor-10-(3-dimethylamino-propyl)-phenothiazin; Flupenthixol (Kurzbezeichnung für 4-[3-[2-(Trifluormethyl)thioxanthan-9-ylden]propyl]-1-piperazinäthanol); Spiroperidol (Kurzbezeichnung für 8-[3-(4-Fluorbenzoyl)-propyl]-1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4,5]decan-4-on); Clozapin (Kurzbezeichnung für 8-Chlor-11-(4-methylpiperazinyl)-5H-dibenzo-[b,e]-1,4-diazepin); Thioridazin (Kurzbezeichnung für 10-[2-(1-Methyl-2-piperidyl)äthyl]-2-(methylthio)phenothiazin); Trifluoperazin (Kurzbezeichnung für 10-[3-(4-Methylpiperazin-1-yl)propyl]-2-trifluormethylphenothiazin); Fluspirilen (Kurzbezeichnung für 8-[4,4-Bis-(p-fluorophenyl)-butyl]-1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4,5]-decan-4-on); Clopenthixol (Kurzbezeichnung für 4-[3-(2-Chlorthioxanthan-9-ylden)propyl]-1-piperazinäthanol); Loxapin Kurzbezeichnung für 2-Chlor-11-(4-methyl-1-piperazinyl)-dibenz[b,f]-1,4-oxazepin); Perphenazin (Kurzbezeichnung für 4-[3-(2-Chlorphenothiazin-10-yl)-propyl]-1-piperazinäthanol); Dopamin (Kurzbezeichnung für 4-(2-Aminoäthyl)pyrocatechol); Apomorphin (Kurzbezeichnung für 3,4-Dihydroxyaporphin); Dopaminanaloge und andere Dopaminrezeptorbinde-eigenschaften aufweisende Verbindungen eingesetzt werden.

Im Prinzip werden diese Verbindungen nach üblichen Methoden mit einem Radionuklid markiert. Eine Liste der gegenwärtig üblicherweise in Reagenzien verwendeten Radionuklide, die auch erfundungsgemäß eingesetzt werden können, ist im 1975-Katalog of New England Nuclear Corporation, Boston, Massachusetts, USA im Index of Radionuclides auf Seite 80 enthalten. Unter den Radionukliden, welche für die vorliegende Erfindung bevorzugt werden, können die nachfolgenden genannt werden:  $^3\text{H}$ (Tritium) und die Jodisotopen  $^{123}\text{J}$ ,  $^{124}\text{J}$ ,  $^{125}\text{J}$ ,  $^{126}\text{J}$ ,  $^{128}\text{J}$ ,  $^{129}\text{J}$ ,  $^{130}\text{J}$ ,  $^{131}\text{J}$ ,  $^{132}\text{J}$ ), wobei  $^{125}\text{J}$  und  $^{131}\text{J}$  bevorzugt werden, insbesondere  $^{125}\text{J}$  aus Gründen der Verfügbarkeit, der Halbwertszeit und der spezifischen Aktivität sowie weil radioaktive Jodverbindungen mit einem üblichen  $\gamma$ -Zähler, welcher in den Spitälern im allgemeinen bereits vorhanden ist und von Packard Instruments oder anderen Firmen in den Handel gebracht wird, bestimmt werden kann.

Die Membranen (Dopaminrezeptormaterial) können bei verschiedenen Temperaturen während verschiedenen Zeiträumen mit einem geeigneten Liganden (Dopaminrezeptorbinden) bebrütet werden. Nach einer typischen bevorzugten Ausführungsform wird  $^3\text{H}$ -Benperidol mit hoher spezifischer Radioaktivität (New England Nuclear, Boston, Mass.) mit Nucleus caudatus- Membranen vom Kalb in einer Pufferlösung, vorzugsweise im pH-Bereich von 6 bis 9, insbesondere von 7,1 bis 7,9 und optimal von 7,4 bis 7,7, bei 37 °C während 10 Minuten bebrütet und das Gemisch unter Vakuum durch

Whatman GF/B-Filter filtriert und 2-mal mit 5 ml kalter Pufferlösung gewaschen. Die Filter können in einem Flüssigkeitsszintillationszähler, wie Packard Instruments Auto  $\gamma$ -szintillationsspektrometer Modell 5260, ausgezählt werden.  
5 Die spezifische Bindung an den Dopaminrezeptor kann als der Überschuss über Blindmessungen in Gegenwart von 1  $\mu\text{M}$  Dopamin oder 10  $\mu\text{M}$  (+)-Butaclamol bestimmt werden, obwohl Blindwerte auch mit einer Anzahl von anderen Substanzen, welche an den Dopaminrezeptor gebunden werden, erhalten werden können. Der Ligand kann ein radioaktiver Dopaminagonist oder -antagonist oder ein Gemisch aus Agonist/Antagonist sein.

Proben von Körperflüssigkeiten, beispielsweise von Urin, Speichel, Cerebrospinal-Flüssigkeit, Blutplasma oder Blutserum, von denen angenommen wird, dass sie Neuroleptika enthalten, werden den Versuchsstoffen zugegeben. Die flüssigen Proben können ohne vorherige Reinigung eingesetzt werden. Die Neuroleptika können jedoch gewünschtenfalls am Anfang gereinigt oder nach einem der zahlreichen chemischen Verfahren einschließlich Extraktion mit Lösungsmittel, Säulenchromatographie, Adsorption auf besonders behandelten Fasern oder anderen chemischen Substanzen oder nach anderen chemischen Verfahren, welche zur Reinigung des Neuroleptikums oder zu dessen Konzentrierung geeignet sind, behandelt werden. Der Gehalt an Neuroleptika der Probe wird durch das Ausmass, durch welches die Bindung des Dopaminrezeptors an den markierten Liganden abnimmt, bestimmt. Die Werte können in geeigneten Einheiten angegeben werden. Das Inkubationsgemisch für die Rezeptorbindung kann eine Anzahl verschiedener Additive zu Erleichterung der Bindung oder zum Schutz der Arzneimittel oder der markierten Liganden enthalten. Die Bebrütungstemperatur und -dauer kann variieren und die Bebrütung kann während einer geeigneten Dauer fortgesetzt werden obwohl im allgemeinen die Bebrütung bis zum Erreichen eines Gleichgewichtszustandes fortgeführt wird. Eine geeignete Bebrütungsdauer kann z.B. irgendwo zwischen 2 Minuten und 4 Stunden liegen. An den Rezeptor gebundene Liganden können durch Filtrieren, Zentrifugieren oder nach einer anderen bekannten Methode von nicht gebundenem Liganden getrennt werden. Selbstverständlich können auch andere geeignete Filtermaterialien als die zuvor genannten verwendet werden, vorausgesetzt, dass sie das grobkörnige Dopaminrezeptormaterial, welches radioaktiven Binder und Neuroleptika gebunden enthält, zurückhalten können und die Abtrennung von ungebundenem radioaktivem Binder (Ligand) und freiem Neuroleptikum erlaubt. Beispiele für solche andere geeignete Filtermaterialien sind Milliporfilter verschiedener Grösse, beispielsweise jene mit 0,6 Mikron Poren Durchmesser.

Das Dopaminrezeptormaterial wird während des Bebrütens vorzugsweise mit einer Pufferlösung, wie z.B. Tris-HCl-Puffer (Sigma Labs., St. Louis, Mo.), mit einem pH-Wert von 7,7 gepuffert. Andere geeignete Pufferlösungen sind beispielsweise Natriumphosphatpuffer, Glyzinpuffer und HEPES-Puffer und andere, welche im Bebrütungsgemisch einen bevorzugten pH-Wert von 6 bis 9 bewirken, wodurch eine schnelle Bindung des radioaktiven Dopaminrezeptorbinders und des Neuroleptikums an das Dopaminrezeptormaterial ermöglichen.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit ein neues und verbessertes Verfahren für die Bestimmung von Neuroleptika wie Haloperidol, Pimozid, Chlorpromazin, Fluphenanzin, Flupenthixol, Spiroperidol, Clozapin, Thioridazin, Trifluoperazin, Fluspirilen, Clopenthixol, Loxapin und anderen, welche als Dopaminkonkurrenten bekannt sind, in den Körperflüssigkeiten von Menschen.  
65

Das erfundungsgemäße Verfahren kann beispielsweise

leicht ausgeführt werden, indem man ein Gemisch aus radioaktivem Dopaminrezeptorbinder, Körperflüssigkeit, beispielsweise Blutserum, Blutplasma oder Urin und Dopaminrezeptormaterial herstellt, die Radioaktivität des an das Dopaminrezeptormaterial gebundenen Binders misst und die Konzentration der Neuroleptika mit Hilfe der Eichkurve bestimmt. Die Eichkurve gibt die Konzentration des Neuroleptikums in Abhängigkeit der Bindungshindernis des radioaktiven Dopaminrezeptorbinders an das Dopaminrezeptormaterial, die durch das Neuroleptikum in der Körperflüssigkeit verursacht wurde, an.

Es wurde gefunden, dass die Konzentration der Körperflüssigkeiten, wie Blutplasma oder Blutserum in der Regel nicht mehr als 15% des Gesamtvolumens aller Bestandteile des Versuches im Reagenzglas ausmachen sollten. Plasma- oder Serumkonzentrationen über 15% hemmen die Bindung der  $^3\text{H}$ -Liganden an den Dopaminrezeptor, auch wenn kein Neuroleptikum vorhanden ist, weshalb die Konzentration an Plasma oder Serum vorzugsweise 10 Volumen-% oder weniger betragen sollte. Konzentrationen über 15 Volumen-% könnten die Gültigkeit der Resultate mindern. Der Ausdruck «Gesamtvolume aller Bestandteile des Versuches» steht für die Summe der Bestandteile im Reagenzglas oder in einem ähnlichen Gefäß vor dem Waschen und Zugabe der Szintillationsflüssigkeit.

Vorzugsweise wird für den Test mehr als 1 Mikroliter Körperflüssigkeit wie Blutplasma und Blutserum, eingesetzt. Diese Menge ist jedoch nicht kritisch und kann bei verbesserter Instrumentierung oder bei Weiterentwicklung der Labortechnik geändert werden.

Eine erfundengemäße Testpackung zur Durchführung der Bestimmung besteht aus

- einem ersten verschlossenen Gefäß mit dem Dopaminrezeptormaterial und
- einem zweiten verschlossenen Gefäß mit dem radioaktiven Dopaminrezeptorbinder, wobei der Inhalt der beiden Gefäße vorzugsweise lyophilisiert ist.

Das Dopaminrezeptormaterial und der radioaktive Dopaminrezeptorbinder können aus den oben genannten Stoffen ausgewählt werden. Insbesondere soll eine Testpackung erwähnt werden, welche eine Dopaminrezeptormaterial aus Kalbshirn, beispielsweise Nucleus caudatus vom Kalb, und als radioaktiven Dopaminrezeptorbinder  $^3\text{H}$ -Spiroperidol (erhältlich beispielsweise von The Radiochemical Centre Limited, Amersham, Grossbritannien) enthält.

Vorzugsweise enthält eine solche Testpackung ein drittes verschlossenes Gefäß c), welches eine Standardlösung eines Neuroleptikums der weiter oben genannten Gruppe, beispielsweise Haloperidol und gegebenenfalls ein vierthes verschlossenes Gefäß d) mit einer Pufferlösung enthält.

Die vorliegende Erfindung betrifft deshalb auch eine Zubereitung, enthaltend

- einen radioaktiven Dopaminrezeptorbinder;
- ein Neuroleptikum;
- ein Dopaminrezeptormaterial und
- menschliche Körperflüssigkeit, beispielsweise Blutserum, Blutplasma, Urin, Speichel oder Cerebrospinal-Flüssigkeit, vorzugsweise Blutplasma oder Blutserum.

Die nachfolgenden Beispiele veranschaulichen die Erfindung.

#### *Beispiel 1*

Zu jeder dreifachen Gruppe von 9 Reagenzgläsern wurden 1,8 ml Dopaminrezeptormaterial (Gewebepräparation), enthaltend Striatum von Ratten, hergestellt nach dem Verfahren von Creese et al., Life Sciences, 17 Seiten 993 bis 1002 und 10 000 c.p.m.  $^3\text{H}$ -Haloperidol der spezifischen Aktivität 8,302 Ci/mMol (New England Nuclear Corporation, Boston,

Mass, Mass., USA) und 100  $\mu\text{l}$  von verschiedenen Proben in nummerierten Reagenzgläsern wie nachfolgend aufgeführt zugegeben:

#### *Reagenzglas Nr.*

- 100  $\mu\text{l}$  Tris-HCl-Puffer (pH 7,7 bei 25 °C, wie von Creese et al., Life Sciences, 17 Seiten 993 bis 1002 beschrieben) mit  $10^{-5}$  Mol Haloperidol.
- 100  $\mu\text{l}$  menschliches Blutserum (K-N Enterprises, 7346 10 N. Montecello Avenue, Skokie, Illinois, USA).
- 10-fache Verdünnung des genannten menschlichen Serums unter Verwendung des genannten Tris-HCl-Puffers.
- 10-fache Verdünnung des Inhaltes von Reagenzgals Nr. 3 im oben genannten Tris-HCl-Puffer.
- 10-fache Verdünnung des Inhaltes von Reagenzglas Nr. 4 im genannten Tris-HCl-Puffer.
- 10<sup>-5</sup> Mol Haloperidol in 100  $\mu\text{l}$  von menschlichem Serum wie oben angegeben.
- 10-fache Verdünnung des Inhaltes von Reagenzglas Nr. 20 6.
- 10-fache Verdünnung des Inhaltes von Reagenzglas Nr. 7.
- 10-fache Verdünnung des Inhaltes von Reagenzglas Nr. 8.
- Alle Proben wurden durch Zugabe von Tris-HCl-Puffer auf ein Volumen von 1ml verdünnt.

Alle Reagenzgläser wurden nun im Wasserbad bei 37 °C während 10 Minuten bebrütet, um die Bindung von Haloperidol und radioaktivem Haloperidol an das Rattengewebe zu bewirken. Nach den 10 Minuten wurde der Inhalt jedes Reagenzglases unter Vakuum durch einen Whatman GF/B-Glasfaserfilter, wie bei Creese et al., Life Sciences, 17, Seiten 993 bis 1002 beschrieben, filtriert. Die Filter wurden zweimal mit 5 ml eiskaltem Tris-HCl-Puffer (pH 7,7 Sigma Labs.) gewaschen. Die Filter wurden dann zusammen mit 1 ml 1%iger Natriumdodecylsulfatlösung in Szintillationsfläschchen gegeben und während 3 Stunden bei Raumtemperatur (20 °C) belassen, dann wurden 10 ml «Bray's Scintillant» (New England Nuclear) in jedes Fläschchen gegeben und Tritium durch

40 Szintillationsmessung unter Verwendung eines Packard Instrumentes Modell 5260 Szintillations-Counter bestimmt.

Figur 1 zeigt die Hemmung der Bindung von  $^3\text{H}$ -Haloperidol an das Rattenhirnpräparat dieses Beispieles durch menschliches Blutserum, bezogen auf  $\mu\text{l}$  menschliches

45 Blutserum.

Figur 2 zeigt die Hemmung der Bindung von  $^3\text{H}$ -Haloperidol bei verschiedenen Konzentrationen von menschlichem Blutserum und Haloperidol.

Um die Konzentration an Neuroleptikum (beispielsweise 50 Haloperidol) im Serum des Patienten (Menschen) zu bestimmen, werden 100  $\mu\text{l}$  Serum, welches nach üblichen Verfahren aus dem Blut des Patienten abgetrennt wurde, durch das nachfolgende Verfahren nachgewiesen.

Die 100  $\mu\text{l}$  Serum werden mit 20  $\mu\text{l}$   $^3\text{H}$ -Haloperidol 55 (10 000 c.p.m.) und 1,8 ml Striatumpräparation der Ratte vermischt und während 10 Minuten bei 37 °C bebrütet. Danach wird der Inhalt des Reagenzglases unter Vakuum durch einen Whatman GF/B-Glasfaserfilter filtriert und zweimal mit 5 ml eiskaltem Tris-HCl-Puffer (pH 7,7) gewaschen. Danach wird die prozentuale Hemmung der Bindung von  $^3\text{H}$ -Haloperidol durch Einbringen des gewaschenen Filters in ein Szintillationsfläschchen mit 1 ml 1%iger Natriumdodecylsulfatlösung unter Stehenlassen bei Raumtemperatur (20 °C) während 3 Stunden bestimmt. Danach werden 10 ml «Bray's 65 Scintillant» zugegeben und Tritium mit einem Szintillationszähler, wie oben angegeben, bestimmt.

Die Konzentration von Haloperidol im Serum wird dann mit Hilfe der Eichkurve in Figur 2 bestimmt. Beispielsweise

wurden ohne Serum des Patienten 10. 000 c.p.m. an das Dopaminrezeptormaterial gebundenes  $^3\text{H}$ -Haloperidol gemessen und in Gegenwart von Serum vom Patienten 2 000 c.p.m.. Dies bedeutet eine 80%ige Hemmung durch das Haloperidol aus dem Serum des Patienten.

Die Konzentration des Arzneimittels kann dann direkt aus der Eichkurve in Figur 2 abgelesen werden. In diesem Falle beträgt die Konzentration an Haloperidol im Serum annähernd  $6 \times 10^{-9}$  Mol. Dieser Wert wird erhalten, indem man auf der Ordinate den Eichwert von 20% (80%ige Hemmung) aufträgt, wie durch die gestrichelte Linie gezeigt, und dann die Haloperidolkonzentration abliest, indem man den Schnittpunkt der gestrichelten Linie mit der Eichkurve auf die Abszisse in Figur 2 projiziert.

Durch Verwendung solcher Information wird der Arzt feststellen können, ob der Medikamentenspiegel im Patienten innerhalb des gewünschten therapeutisch wirksamen Bereiches liegt. Wenn die Konzentration einer der oben genannten Neuroleptika bestimmt werden muss, kann eine Eichkurve wie Figur 2 nach dem Verfahren dieses Beispieles durch Kombinieren des anderen Arzneimittels, beispielsweise Pimoziid mit  $^3\text{H}$ -Peridol, Serum und Dopaminrezeptormaterial, beispielsweise Striatum von Ratten, erhalten werden. Die Resultate können als Pimoziidäquivalente, Haloperidoläquivalente, Dopaminblockierungskapazität oder in einer dem Benutzer geeignet erscheinenden Weise definiert werden.

Es ist zu beachten, dass ein einziger radioaktiver Dopaminrezeptorbinder, beispielsweise  $^3\text{H}$ -Haloperidol, zur Herstellung aller Eichkurven verwendet werden kann.

#### *Bestimmung von Neuroleptika im Plasmaextrakt*

##### *A) Verfahren zur Extraktion der Neuroleptika aus Plasma*

Es werden 2 ml Blutplasma, enthaltend Neuroleptika, zu 8 ml Heptan mit 5% Isoamylalkohol in 15 ml fassenden konsischen Glasextraktionsröhren gegeben und während 10 Sekunden verwirbelt.

0,1 ml 10 N-Natriumhydroxid werden zugegeben, dann werden die Röhren in Eis gepackt und während 1 Stunde auf einem mechanischen Schüttelapparat bei mässiger Geschwindigkeit geschüttelt und 10 Minuten bei 1000 g zentrifugiert.

6 ml der organischen Phase werden entfernt und in ein Reagenzglas, welches 1,5 ml frisch hergestellte 0,1%ige Askorbinsäure enthält, gegeben. Dann wird mit einer mechanischen Schüttelapparatur während 1 Stunde geschüttelt und während 10 Minuten bei 1000 g zentrifugiert.

Die organische Schicht wird ganz entfernt. Die Askorbinsäure wird unverdünnt und mit Verdünnungen von 1: 3 und 1 : 10 bestimmt. Zwischen Askorbinsäure und Heptan bildet sich oft eine Emulsionsschicht, was durch Einbringen des Extraktionsgefäßes in warmes Wasser für eine kürzere Zeit verhindert werden kann.

Um die tatsächlich durch die Extraktion gewonnene Menge des einzelnen Arzneimittels zu bestimmen, werden 20  $\mu\text{l}$  einer  $10^{-5}$  Mol Arzneimittellösung zu 2 ml arzneimittelfreiem Blutplasma gegeben, wodurch eine tatsächliche Plasmakonzentration von  $10^{-7}$  Mol resultiert. Das Plasma wird dann während 10 Minuten bei 37 °C bebrütet, wonach 8 ml Heptan mit 5% Isoamylalkohol zugegeben werden und wie oben extrahiert wird.

Jede Bestimmung wird mit einer Eichkurve für das bestimmte Neuroleptikum ausgewertet. Bestimmte Konzentrationen (beispielsweise  $3 \times 10^{-10}$ ,  $10^{-9}$ ,  $3 \times 10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ) von Neuroleptika werden anstelle der Askorbinsäureextrakte in Analysenröhren gegeben und wie nachfolgend angegeben behandelt.

##### *B) Bestimmung der Rezeptorbindung der Plasmaextrakte*

1.  $100 \mu\text{l} ^3\text{H}$ -Haloperidol (ca. 8000 c.p.m./ $100 \mu\text{l}$ ) werden in die Analysenröhren gegeben.

2.  $100 \mu\text{l}$  der Standardarzneimittellösung werden zugegeben.
3.  $100 \mu\text{l}$  der Plasmaextrakte (unverdünnt, 1:3, 1:10 oder 1:30 Verdünnung) werden zugegeben.
4. Striatumgewebe von Ratten werden in 100 Volumen von 0,05 Mol Tris-HCl-Puffer pH 7,7, homogenisiert und während 10 Minuten bei 15 000 g zentrifugiert.
5. Die überstehende Flüssigkeit wird verworfen. Das verdichtete Sediment kann durch Beschallung in 100 Volumen von 0,05 Mol Tris-HCl-Puffer, pH 7,7, resuspendieren; dann wird während 10 Minuten wieder zentrifugiert.
6. Die überstehende Flüssigkeit wird verworfen. Das verdichtete Sediment wird durch Beschallung in 0,05 Mol Tris-HCl-Puffer, enthaltend 0,1% Askorbinsäure, 10  $\mu\text{Mol}$  Pargylin (Kurzbezeichnung für N-Methyl-N-(2-propinyl)-benzylamin), 120 mMol Natriumchlorid, 5 mMol Kaliumchlorid, 2 mMol Kalziumchlorid und 1 mMol Magnesiumchlorid mit dem End-pH 7,1 bei 27 °C resuspendiert, wodurch eine Gewebekonzentration von 8 mg/ml erhalten wird.
7. 0,8 ml dieses Homogenates werden in Reagenzgläser gegeben und während 10 Minuten bei 37 °C bebrütet.
8. Die bebrüteten Proben werden unter Vakuum durch Whatman GF/B-Filter filtriert und 3-mal mit eiskaltem Tris-HCl-Puffer gewaschen.
9. Der Filter wird dann in Szintillationsfläschchen aus Kunststoff, enthaltend 9,0 ml von «Formula 947» (New England Nuclear) Szintillationsmischung gegeben.
10. Jedes Fläschchen wird während 2 Minuten ausgezählt.
11. Die Auswertung erfolgt anhand der Eichkurve in Figur 3.

#### *Beispiel 2*

Aliquote Mengen (30 ml) von Plasmaproben von 6 Patienten, welche mit Haloperidol behandelt worden waren, nachdem sie bei 20 °C eingefroren worden waren, einer Radiorezeptoruntersuchung, entsprechend der in Beispiel 1 beschriebenen, unter Verwendung von  $^3\text{H}$ -Haloperidol als Liganden, unterworfen.

Mit bekannten Mengen von Haloperidol in Gegenwart von Kontrollplasma wurde eine Eichkurve der Verdrängung von  $^3\text{H}$ -Haloperidol hergestellt. Frisches Striatum von Ratten wurde in 100 Volumenteilen 50 mMol Tris-Puffer (pH 7,7 bei 25 °C) mit einem «Sonifier» auf Stufe 4 während 30 Sekunden beschallt. Das Homogenat wurde 2-mal während 10 Minuten mit 50 000 g (Sorvall RC2-B) zentrifugiert und das zwischenzeitlich gebildete Sediment in frischem Puffer wieder homogenisiert. Der zum Schluss erhaltene Rückstand wurde in 125 Volumenteilen frisch zubereitetem 50 mMol Tris-Puffer, enthaltend 0,1% Askorbinsäure, 10  $\mu\text{Mol}$  Pargylin, 120 mMol Natriumchlorid, 5 mMol Kaliumchlorid, 2 mMol Kalziumchlorid und 1 mMol Magnesiumchlorid mit einem pH-Wert von 7,1 bei 27 °C resuspendiert. Die Gewebesuspension wurde während 10 Minuten bei 37 °C vorbebrütet und für die Verwendung im Versuch wieder in Eis gekühlt.  $^3\text{H}$ -Haloperidol (15 Ci/mMol, New England Nuclear) wurde in frischer 0,1%iger Askorbinsäure auf 1 nMol verdünnt. In 12 × 75 mm Glasinkubationsröhren wurden nacheinander 15  $\mu\text{l}$  Plasma, 100  $\mu\text{l} ^3\text{H}$ -Ligand, 100  $\mu\text{l}$  Neuroleptikum für die Eichkurve oder die entsprechende Menge Dopamin für Blindversuche oder das Lösungsmittel für das Neuroleptikum in 0,1%iger Askorbinsäure gegeben und mit der Gewebesuspension auf 1 ml aufgefüllt. Die Röhren wurden während 10 Minuten bei 37 °C bebrütet und schnell unter Vakuum durch Whatman GF/B-Filter filtriert, 3-mal mit 5 ml eiskaltem 50 mMol Tris-Puffer vom pH 7,7 bei 25 °C gespült. Der auf dem Filter zurückgehaltene  $^3\text{H}$ -Ligand wurde nach einer Lagerung über Nacht in Szintillationsfläschchen, enthaltend NEN «Formula 947» (New England Nuclear, Boston) oder Hydro-

mixfluor (Yorktown Laboratories) durch Flüssigszintillationsspektrometrie ausgezählt. Die Eichkurve für die Verdrängung für ein bestimmtes Neuroleptikum wurde in Gegenwart von gleichen Volumenteilen Kontrollplasma mit Endkonzentrationen an Neuroleptikum von 1/3, 3-fach oder gleich wie der vorher bestimmte Ci-Wert. Durch logarithmische Probition wurde die Verdrängungskurve in eine gerade Linie übergeführt und die prozentuale Hemmung der Bindung des  $^3\text{H}$ -Liganden in die molare Konzentration des Neuroleptikums umgerechnet.

Die Resultate sind in Tabelle 1 aufgeführt.

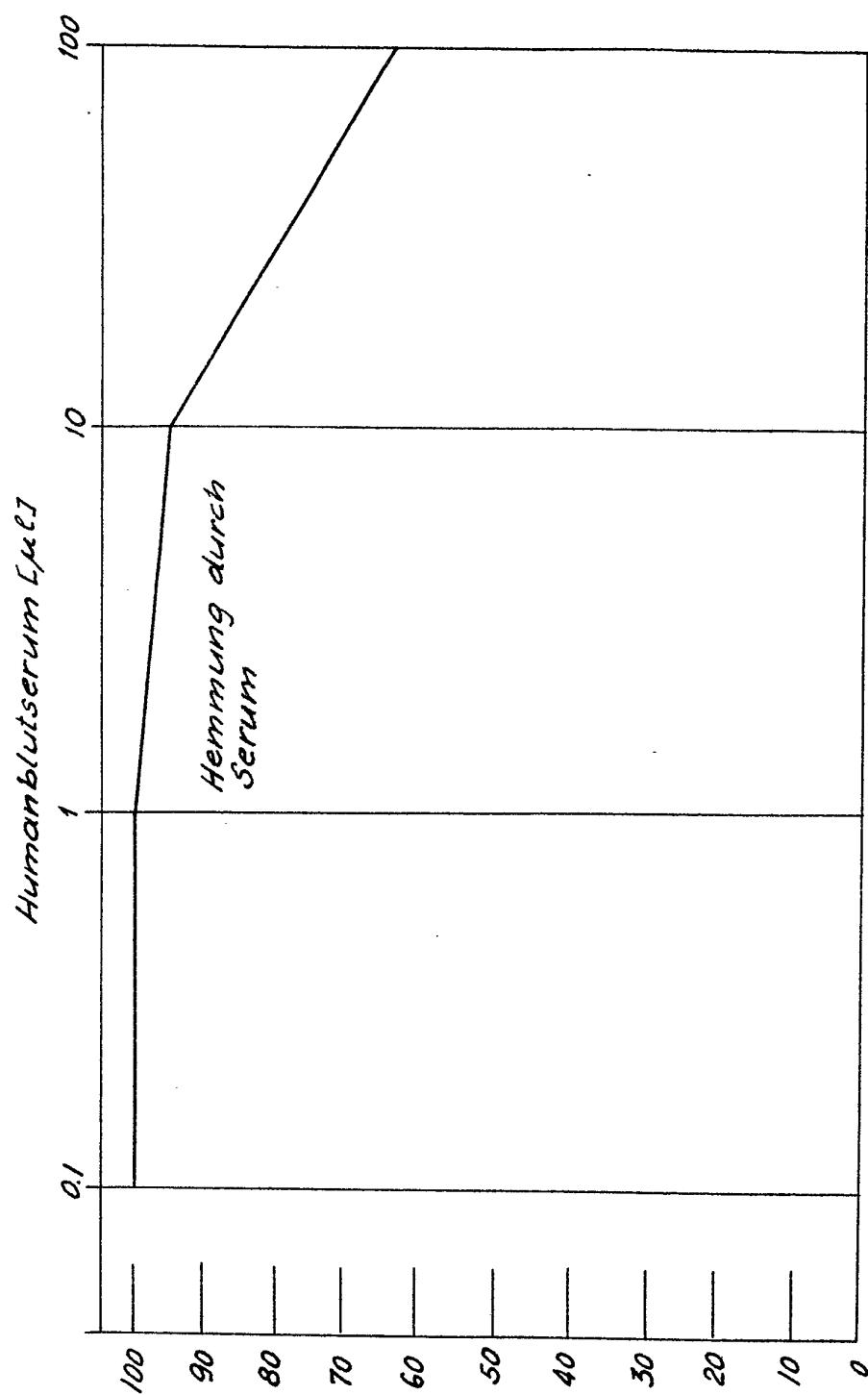
**Tabelle 1**  
Radiorezeptorversuchswerte für haloperidolhaltige Plasma (Beispiel 3)

Patient Nr.	Dosis Haloperidol (mg/Tag)	Haloperidolgehalt im Plasma(ng/ml)
1	20	27
2	20	29
3	10	21
4	20	31
5	10	22
6	20	29

### Beispiel 3

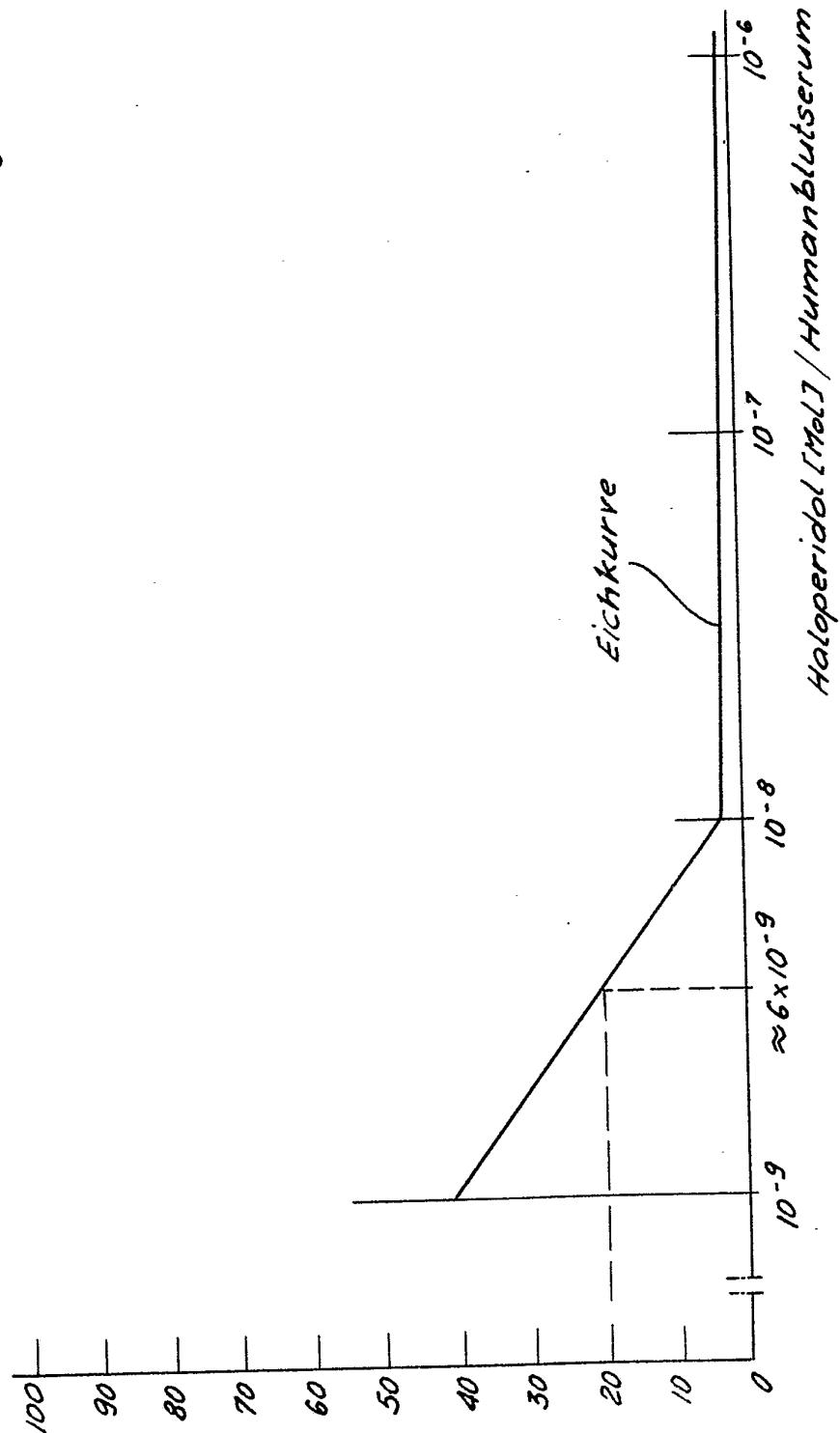
Fünf Neuroleptika wurden während 10 Minuten bei 37 °C vorbebrütet um die für die Bindung an Serumproteine benötigte Zeit zur Verfügung zu stellen, wonach der Gehalt an 5 Neuroleptika bestimmt wurde. Haloperidol (0,1 µMol), Fluphenazin (0,1 µMol), Trifluoperazin (0,1 µMol), Chlorpromazin (1 µMol) und Thioridazin (1 µMol) wurden bei der radiologischen Analyse vollständig zurückgewonnen, mit den entsprechenden Werten  $0,11 \pm 0,02 \mu\text{Mol}$  ( $n = 6$ ),  $0,12 \pm 10 0,01 \mu\text{Mol}$  ( $n = 10$ ),  $0,16 \pm 0,2 \mu\text{Mol}$  ( $n = 6$ ),  $1,0 \pm 0,1 \mu\text{Mol}$  ( $n = 9$ ) und  $1,1 \pm 0,2 \mu\text{Mol}$  ( $n = 6$ ). Um die Rückgewinnung der Neuroleptika aus dem Blut der in vivo behandelten Patienten zu untersuchen, wurde der Neuroleptikaspiegel im Blut von vier Patienten, welche orale Dosen von Haloperidol erhielten, 15 sowohl nach der Extraktion mit organischem Lösungsmittel (Heptan/5% Isoamylalkohol zurückextrahiert in 0,1%iger Askorbinsäure), wodurch alle an Serumprotein gebundenen Neuroleptika entfernt werden sollten, und durch direkte Zuge 20 gabe des Serums im Bindungsversuch, wie im oben beschriebenen Verfahren, gemessen. Der Neuroleptikaspiegel im Plasma betrug 10 bis 350 nMol und ergab eine Übereinstimmung in der Größenordnung von 10%, unabhängig davon, ob die Bestimmungen mit oder ohne Extraktion ausgeführt wurde. Dies zeigt, dass die Neuroleptika unerwarteterweise 25 nur lose an Plasmaprotein gebunden sind, so dass sie mit dem Dopaminrezeptormaterial reagieren können, wie das für die erfundungsgemäße Bestimmung notwendig ist.

Fig. 1

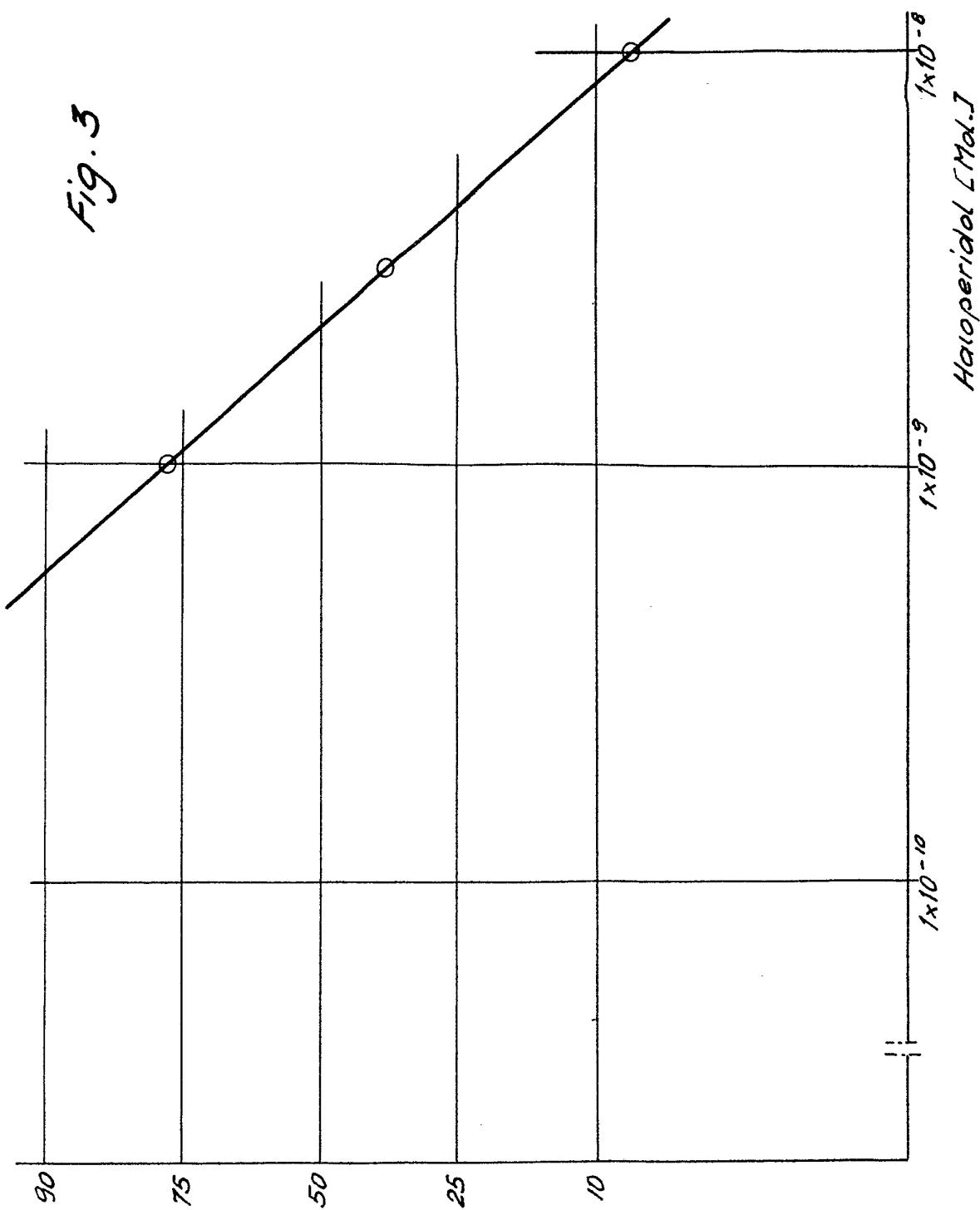


Hemmung der Bindung von  $^3\text{H}$ -Haloferidol [%]

Fig. 2



Hemmung der Bindung von  ${}^3\text{H}$ -Holoperidol [%]



Spezifische Bindung von  $^3\text{H}$ -Holoperiodol [%]