



## (12) BREVET D'INVENTION

(11) N° de publication : **MA 26059 A1** (51) Cl. internationale : **G01N 33/94; A61K 31/35**

(43) Date de publication :  
**01.04.2004**

---

(21) N° Dépôt :  
**27170**

(22) Date de Dépôt :  
**22.05.2003**

(30) Données de Priorité :  
**22.11.2000 DE 100 58 119.6**

(86) Données relatives à la demande internationale selon le PCT:  
**PCT/EP01/12968 09.11.2001**

(71) Demandeur(s) :  
**BAYER AKTIENGESELLSCHAFT, 51368 LEVERKUSEN (DE)**

(72) Inventeur(s) :  
**KROLL, WERNER ; RODRIGUEZ, MARIA-LUISA ; ROMBOUT, FERDINAND ; WEBER, HORST ; SENNHENN, BERND ; SCHOHE-LOOP, RUDOLF**

(74) Mandataire :  
**SABA & CO**

---

(54) Titre : **KIT REPINOTAN**

(57) Abrégé : Les éléments suivants sont nouveaux: (A) Le kit comprend: (i) une composition pharmaceutique contenant du repinotan (RPT) et / ou son sel; et (ii) une composition pour déterminer la concentration de RPT ou de ses métabolites dans les fluides corporels; (B) des compositions pharmaceutiques solides contenant du RPT ou son sel et un acide; (C) des solutions pour perfusion contenant du RPT ou son sel et de l'acide malique, pyruvique, citrique, fumarique, maléique, lactique et / ou tartrique; et (D) le composé 2- (4- (N- (5-carboxyhexyl) -N- (chroman-2-ylméthyl) -amino) -butyl) -1,2-benz isothiazol-3 (2H) -one-1. , 1-dioxyde (I). Des revendications indépendantes sont incluses pour: (1) la préparation des compositions (B), en dissolvant l'agent actif, l'acide et d'autres auxiliaires dans l'eau et / ou d'autres solvants, éventuellement stériliser la solution et lyophiliser; et (2) Préparation de solutions (C) en traitant les compositions (B) avec de l'eau ou une solution d'électrolyte isotonique.

Mémoire descriptif

Joint à l'appui de la demande de brevet d'invention

et avant pour titre : KIT REPINOTAN

Déposée par : -----  
: BAYER AKTIENGESELLSCHAFT  
51368 Leverkusen  
Allemagne

*W...*  
26059DE  
01 AVR 2004

## KIT REPINOTAN

## RESUME

L'invention concerne une trousse comprenant une composition pharmaceutique contenant du repinotan ou un sel de repinotan acceptable du point de vue physiologique, et un moyen permettant de déterminer la concentration du repinotan ou de ses métabolites dans les liquides organiques, et également de nouvelles compositions pharmaceutiques contenant du repinotan ou un sel de repinotan acceptable du point de vue physiologique, et des procédés pour leur préparation.

## KIT REPINOTAN

La présente invention concerne une trousse comprenant une composition pharmaceutique contenant du repinotan ou un sel de repinotan acceptable du point de vue physiologique, et un moyen destiné à déterminer la concentration  
5 du repinotan ou de ses métabolites dans les liquides organiques, et également de nouvelles compositions pharmaceutiques contenant du repinotan ou un sel de repinotan acceptable du point de vue physiologique, et des procédés pour leur préparation.

A ce jour, aucun principe thérapeutique n'a encore été accepté au niveau  
10 mondial comme étant efficace dans le traitement en phase aiguë de maladies neurodégénératives telles que l'ictus et le trauma crânio-cérébral, qui conduisent fréquemment à des déficits neurologiques et fonctionnels à long terme chez ces patients. Hormis l'utilisation de thrombolytiques (par exemple, le t-PA) dans les 3 premières heures qui suivent un accident ischémique ou  
15 l'utilisation de nimodipine chez des patients présentant une hémorragie sous-arachnoïdienne d'origine traumatique, il n'existe encore aucune méthode

médicinale qui tienne compte de manière satisfaisante de la cascade physiopathologique.

Le document EP-A-0 352 613 décrit un 1,1-dioxyde de 2-[4-(((2R)-chroman-2-yl)méthyl)amino)butyl]-1,2-benzisothiazol-3(2H)-one (dénomination générique :  
5 repinotan) et des sels de repinotan destinés au traitement de maladies du système nerveux central, en particulier l'ictus.

Le document DE-A-195 43 476 décrit l'efficacité du repinotan et de ses sels dans le traitement du trauma crânio-cérébral.

Dans de nombreuses études cliniques, le repinotan s'est avéré bien toléré par  
10 les sujets sains et les patients ayant subi un ictus ou un trauma crânio-cérébral. De plus, les données cliniques existantes indiquent qu'il était possible d'améliorer les déficits neurologiques et fonctionnels (après 3 et 6 mois respectivement, selon l'indication). En particulier dans le cas de patients qui  
15 avaient atteint des concentrations plasmatiques de repinotan situées dans l'intervalle d'environ 5 à 20 µg/l, le résultat du traitement était notablement meilleur que chez les patients qui avaient reçu le placebo.

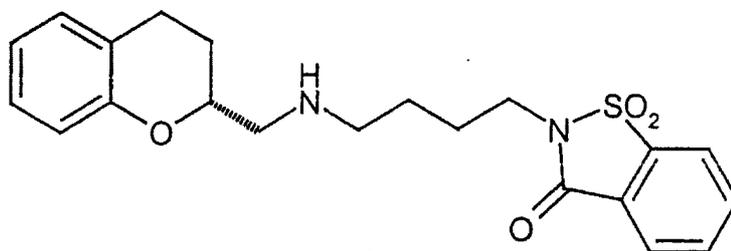
Un résultat thérapeutique particulièrement bon peut être obtenu en utilisant la  
trousse de la présente invention, qui comprend une composition pharmaceutique contenant du repinotan ou un sel de repinotan acceptable du  
20 point de vue physiologique et un moyen permettant de déterminer la concentration du repinotan ou de ses métabolites dans les liquides organiques.

L'utilisation de la trousse de la présente invention permet d'administrer un  
médicament qui, en tant que composé actif, contient du repinotan sous la forme de la base libre ou de l'un de ses sels d'addition d'acide, et de déterminer,  
25 après un bref laps de temps, les concentrations effectives du repinotan ou de ses métabolites dans les liquides organiques du patient traité. Il est ainsi possible de réaliser les ajustements posologiques qui sont éventuellement nécessaires pour un traitement optimal sans retard et avec une dépense  
minime en termes de main d'œuvre et d'appareillage. La trousse de la présente  
30 invention représente donc une avancée significative dans le traitement des

maladies neuro-dégénératives en phase aiguë, en particulier l'ictus et le trauma crânio-cérébral.

Les compositions pharmaceutiques contenues dans la trousse de la présente invention peuvent se présenter, par exemple, sous la forme de comprimés, de comprimés dragéifiés, de pilules, de granules, d'aérosols, de sirops, d'émulsions, de suspensions, de solutions ou de lyophilisats qui peuvent être reconstitués dans une solution définie. En tant qu'un composé actif, les compositions pharmaceutiques contiennent du repinotan ou un sel de repinotan acceptable du point de vue physiologique. Le composé actif devrait être présent dans ces compositions à une concentration d'environ 0,05 à 95 % en poids, de préférence d'environ 0,5 à 90 % en poids du mélange total, à savoir dans des quantités qui sont suffisantes pour atteindre l'intervalle posologique indiqué. Outre le composé actif, les compositions pharmaceutiques contiennent également des excipients inertes, non toxiques, acceptables du point de vue pharmaceutique.

La formule développée du repinotan est la suivante :



Les sels de repinotan acceptables du point de vue physiologique peuvent être des sels de repinotan formés avec des acides minéraux, des acides carboxyliques ou des acides sulfoniques. Les sels de repinotan préférés sont ceux qui sont formés avec l'acide chlorhydrique, l'acide bromhydrique, l'acide sulfurique, l'acide phosphorique, l'acide méthane-sulfonique, l'acide éthane-sulfonique, l'acide toluène-sulfonique, l'acide benzène-sulfonique, l'acide naphthalène-disulfonique, l'acide acétique, l'acide propionique, l'acide lactique, l'acide

tartrique, l'acide citrique, l'acide fumarique, l'acide maléique ou l'acide benzoïque. Le chlorhydrate de repinotan est particulièrement préféré.

Le choix des excipients dépend du mode de formulation. Les excipients qui peuvent être mentionnées à titre d'exemple sont l'eau, des solvants organiques non toxiques tels que les paraffines (par exemple, les fractions de pétrole), les huiles végétales (par exemple, l'huile d'arachide, l'huile de sésame), les alcools (par exemple, l'éthanol, le glycérol), des véhicules tels que, par exemple, les minéraux naturels broyés (par exemple, les kaolins, les terres argileuses, le talc, la craie), les minéraux synthétiques broyés (par exemple, l'acide silicique hautement dispersé, les silicates), des sucres (par exemple, le saccharose, le lactose et le dextrose), des agents émulsionnants (par exemple, les esters d'acides gras et de polyoxyéthylène, les éthers d'acides gras et de polyoxyéthylène), des agents dispersants (par exemple, les solutions résiduelles de sulfite de lignine, la méthylcellulose, l'amidon et la polyvinylpyrrolidone) et des lubrifiants (par exemple, le stéarate de magnésium, le talc, l'acide stéarique et le sulfate de sodium).

La trousse de la présente invention comprend de préférence en tant que composition pharmaceutique une solution injectable contenant le composé actif ou une composition pharmaceutique solide à partir de laquelle il est possible de préparer cette solution injectable par addition d'eau ou d'une solution isotonique d'électrolytes.

Une formulation pharmaceutique solide préférée est le lyophilisat, lequel peut être reconstitué par addition d'eau ou d'une solution isotonique d'électrolytes de manière à obtenir, par exemple, une solution injectable. Dans le lyophilisat, le composé actif a une stabilité en stockage améliorée et, à partir du lyophilisat, il est possible de préparer rapidement et aisément, dans des conditions stériles, une solution dépourvue de particules qui convient pour être directement utilisée chez le patient, par exemple sous la forme d'une solution injectable. Outre le composé actif, le lyophilisat contient avantageusement d'autres excipients appropriés du point de vue pharmaceutique, en particulier des agents formant matrice.

Au sens de la présente invention, les agents formant matrice sont des acides aminés tels que la glycine, l'alanine ou l'acide aspartique, des peptides tels que la gélatine, le collagène ou l'albumine, des monosaccharides tels que le glucose ou le lactose, des disaccharides tels que le maltose, le saccharose ou le tréhalose, des oligosaccharides tels que les cyclodextrines ou les maltodextrines, des polysaccharides tels que l'amidon et les dérivés d'amidon ou la cellulose et les dérivés de cellulose, des agents polymères formant matrice tels que la polyvinylpyrrolidone ou le polyéthylène glycol, des sels avec le chlorure de sodium ou le carbonate de calcium, des alcools de sucre tels que le mannitol, le sorbitol ou le xylitol. Le mannitol, le chlorure de sodium, la glycine, le saccharose, le maltose et le lactose sont préférés. Le mannitol est particulièrement préféré.

Si le lyophilisat est reconstitué en vue de donner une solution injectable, celle-ci est avantageusement isotonique. L'isotonicité peut être obtenue dans le cas où le lyophilisat contient déjà les quantités adéquates d'électrolytes tels que, par exemple, le chlorure de sodium, le mannitol ou le glucose, ou en utilisant une solution isotonique d'électrolytes pour la reconstitution et la dilution de la solution.

Les solutions isotoniques d'électrolytes sont, par exemple, une solution aqueuse de chlorure de sodium à 0,9 % en poids ou une solution aqueuse de glucose à 5 % en poids.

La quantité du composé actif dans la solution injectable devrait être d'environ 0,1 µg/ml à 1 mg/ml, de préférence d'environ 0,5 µg/ml à 5 µg/ml.

La préparation du repinotan et des sels de repinotan est décrite dans le document EP-A-0 352 613. Le chlorhydrate de repinotan correspond à l'exemple 92H qui y est décrit.

Les sels de la présente invention peuvent en outre être obtenus en mettant en réaction le repinotan sous sa forme de base libre dans des solvants appropriés avec des quantités stœchiométriques ou supra stœchiométriques de l'acide qui donnera le sel, dans un intervalle de températures allant de 0° C jusqu'au point

d'ébullition du solvant. Les solvants appropriés sont, par exemple, l'eau, les alcools aliphatiques tels que le méthanol, l'éthanol ou le 2-propanol, les éthers aliphatiques à chaîne ouverte ou cyclique tels que le diéthyle éther, le tert-butyle méthyle éther, le dioxane et le tétrahydrofurane ou les cétones aliphatiques telles que la 2-propanone, la 2-butanone, et également leurs mélanges. Les sels sont obtenus directement à partir de ce mélange sous la forme d'un solide, facultativement après élimination partielle ou complète du solvant par distillation ; ils peuvent également être purifiés par recristallisation ou réprécipitation dans, par exemple, les solvants ou les mélanges de solvants mentionnés ci-dessus.

Les compositions pharmaceutiques de la trousse de la présente invention peuvent également contenir des mélanges de repinotan et d'un ou plusieurs sels de repinotan.

Le repinotan ou ses sels acceptables du point de vue physiologique peuvent être convertis selon des méthodes connues en les formulations usuelles telles que des comprimés, des comprimés dragéifiés, des pilules, des granules, des aérosols, des sirops, des émulsions, des suspensions et des solutions en utilisant des véhicules ou des solvants inertes, non toxiques, acceptables du point de vue pharmaceutique. Les solutions du composé actif ou les compositions pharmaceutiques solides préférées sont celles qui peuvent être converties en une solution telles que, par exemple, des lyophilisats. Le composé actif du point de vue thérapeutique devrait ici être présent dans chaque cas à une concentration d'environ 0,05 à 95 % en poids, de préférence d'environ 0,5 à 90 % en poids du mélange total, à savoir dans des quantités qui sont suffisantes pour atteindre la posologie indiquée.

Les formulations sont préparées, par exemple, en allongeant les composés actifs avec des solvants et/ou des excipients, si nécessaire en utilisant des agents émulsionnants et/ou des agents dispersants, par exemple, il est facultativement possible d'utiliser des solvants organiques en tant que solvants auxiliaires lorsque l'on utilise de l'eau en tant qu'un diluant.

Le trousse de la présente invention comprend en outre un moyen destiné à déterminer la concentration du repinotan ou de ses métabolites dans les liquides organiques.

5 En tant qu'analyte, il peut s'avérer avantageux, au lieu du composé actif employé, de déterminer un métabolite du repinotan. Les métabolites du repinotan sont décrits.

10 Au sens de la présente invention, les liquides organiques sont, par exemple, l'urine, le sang et les fractions du sang telles que le sérum ou le plasma. Le sang et les fractions du sang sont préférées, le plasma sanguin étant particulièrement préféré.

La concentration du repinotan est déterminée dans le sang ou dans les fractions du sang, de préférence dans le plasma sanguin.

15 Les agents qui conviennent pour la détermination de la concentration sont, par exemple, des appareils chromatographiques tels qu'un chromatographe en phase liquide ou gazeuse, lesquels peuvent être facultativement couplés à un spectromètre de masse (CL-SM ou CG-SM). Les moyens qui fonctionnent suivant des méthodes immunologiques, telles que, par exemple les tests ELISA (dosage par immunosorbant lié à une enzyme) sont également appropriés. Les moyens de ce type sont connus dans la technique.

20 Des moyens particulièrement appropriés sont ceux qui peuvent être employés au site du traitement (tests au chevet du patient ou au centre de soins), étant donné que les ajustements posologiques éventuellement nécessaires pour un traitement optimal peuvent ainsi être effectués sans retard.

25 Dans la trousse de la présente invention, les moyens préférés sont les appareils destinés à déterminer la concentration d'analytes décrits dans le document WO-A-99/46591. Ces appareils peuvent être produits et utilisés selon les procédés qui y sont décrits et permettent, sans retard et avec un investissement limité en termes de personnel et d'appareillage, d'effectuer les

ajustements de la dose qui peuvent s'avérer nécessaires, le cas échéant, pour un traitement optimal.

La trousse de la présente invention est particulièrement appropriée pour le traitement de maladies neurodégénératives en phase aiguë, en particulier l'ictus et le trauma crânio-cérébral.

La composition pharmaceutique de la présente invention est administrée selon un mode habituel, de préférence par voie orale ou parentérale, en particulier par voie perlinguale ou intraveineuse. Dans le cas de l'administration par voie orale, hormis les excipients mentionnés, les comprimés peuvent bien sûr contenir des additifs tels que le citrate de sodium, le carbonate de calcium et le phosphate dicalcique ainsi que diverses substances complémentaires telles que l'amidon, de préférence l'amidon de pomme de terre, la gélatine et similaires. Des lubrifiants tels que le stéarate de magnésium, le sodium lauryle sulfate et le talc peuvent également être utilisés dans la fabrication des comprimés. Dans le cas des suspensions aqueuses, hormis les excipients mentionnés plus haut, les composés actifs peuvent être traités par divers agents aromatisants ou colorants. Dans le cas de l'administration par voie parentérale, les solutions des composés actifs peuvent être employées en utilisant des véhicules liquides appropriés.

De manière générale, dans le cas de l'administration par voie intraveineuse, il s'est avéré avantageux d'administrer le composé actif dans des quantités d'environ 0,01 µg/kg/hre à 10 µg/kg/hre (µg ou mg par kg de poids corporel par heure), de préférence d'environ 0,05 µg/kg/hre à 2 µg/kg/hre en vue d'atteindre des résultats efficaces. L'administration peut dans chaque cas être réalisée sous la forme de doses individuelles.

Dans le cas de l'administration par voie orale, la dose journalière du composé actif est de 0,001 à 0,2 mg/kg, de préférence de 10 à 10 µg/kg de poids corporel.

En dépit de ce qui précède, il peut s'avérer nécessaire, le cas échéant, de s'écarter des quantités mentionnées, notamment en fonction du poids corporel

ou de la voie d'administration, ou du comportement individuel vis-à-vis du médicament, de la formulation de celui-ci et du moment de l'administration ou de l'intervalle entre les administrations. En conséquence, dans certains cas, il peut s'avérer suffisant d'administrer moins que la quantité minimum susmentionnée, alors que dans d'autres cas la limite supérieure mentionnée doit être dépassée. Dans le cas de l'administration de quantités relativement grandes, il est conseillé de diviser celles-ci en un certain nombre de doses individuelles au cours de la journée.

Afin de stabiliser le patient à la concentration de repinotan la plus favorable du point de vue thérapeutique, une dose initiale définie de repinotan est administrée au patient, la concentration du repinotan est vérifiée après des laps de temps fixés, préalablement déterminées, en utilisant l'agent de la présente invention et la dose suivante est ensuite facultativement ajustée.

Par exemple, des patients reçoivent par perfusion une solution qui contient du chlorhydrate de repinotan à un débit de 1,25 mg de repinotan/jour. Après 6 heures, en utilisant l'agent de la présente invention, l'on détermine si la concentration plasmatique du repinotan est supérieure ou inférieure à environ 17 µg/l. Si la concentration plasmatique du repinotan est inférieure à la concentration-seuil indiquée, la perfusion est poursuivie au débit indiqué. En revanche, si la concentration plasmatique du repinotan dépasse la concentration-seuil indiquée, le débit de perfusion est réduit à 0,5 mg de repinotan/jour. Douze heures après le début de la perfusion, la concentration plasmatique du repinotan est vérifiée une seconde fois. Encore une fois, le débit de perfusion est maintenu si la concentration plasmatique du repinotan est inférieure à 17 µg/l environ, et réduit à 0,625 ou 0,25 mg de repinotan/jour si la concentration plasmatique du repinotan dépasse 17 µg/l environ. De cette façon, il est possible de maintenir la concentration plasmatique du repinotan dans l'intervalle thérapeutique favorable d'environ 5 à 20 µg/l chez un maximum de patients.

Dans un autre aspect, l'invention concerne des compositions pharmaceutiques solides contenant du repinotan ou ses sels tolérables du point de vue physiologique, et un acide acceptable du point de vue physiologique.

5 De manière surprenante, il est apparu que l'addition d'un acide acceptable du point de vue physiologique augmente la stabilité en stockage des compositions pharmaceutiques solides contenant du repinotan ou ses sels tolérables du point de vue physiologique.

10 Au sens de la présente invention, les acides acceptables du point de vue physiologique sont, par exemple, l'acide malique, l'acide aspartique, l'acide ascorbique, l'acide benzoïque, l'acide succinique, l'acide pyruvique, l'acide citrique, l'acide fumarique, l'acide glutamique, l'acide glycolique, l'acide hippurique, l'acide maléique, l'acide lactique, l'acide sulfurique, l'acide sorbique, l'acide tartrique ou l'acide cinnamique.

15 Plus spécifiquement, l'action de la présente invention est atteinte avec des compositions pharmaceutiques solides dans lesquelles le composé actif, à savoir le repinotan ou ses sels tolérables du point de vue physiologique, représentent de 0,01 à 15 % en poids et l'acide acceptable du point de vue physiologique représente de 0,5 à 15 % en poids de la composition totale.

20 A cet égard, les compositions pharmaceutiques solides contenant du chlorhydrate de repinotan et de l'acide citrique ou de l'acide tartrique sont particulièrement préférées.

25 Un autre aspect de la présente invention concerne des lyophilisats contenant du repinotan ou ses sels tolérables du point de vue physiologique, et un acide acceptable du point de vue physiologique, le composé actif préféré étant le chlorhydrate de repinotan et les acides préférés étant l'acide malique, l'acide pyruvique, l'acide citrique, l'acide fumarique, l'acide maléique, l'acide lactique et l'acide tartrique, en particulier l'acide citrique et l'acide tartrique. Par ailleurs, les lyophilisats peuvent avantageusement contenir des excipients pharmaceutiques tels que, par exemple, les agents formant matrice mentionnés plus haut.

En vue de la préparation du lyophilisat, par exemple, les quantités susmentionnées du repinotan ou du sel de repinotan, de l'acide acceptable du point de vue physiologique et des autres excipients pharmaceutiques facultatifs sont dissoutes dans l'eau et/ou dans d'autres solvants appropriés, et la solution ainsi obtenue est stérilisée, distribuée dans des récipients appropriés et lyophilisée.

Au sens de la présente invention, les solvants appropriés sont, par exemple, l'acide acétique glacial ou le *tert*-butanol.

La solution peut habituellement être préparée à des températures de 5 à 35° C, de préférence de 20 à 25° C. Au sens de la présente invention, la stérilisation de la solution désigne le fait de convertir la solution à l'état stérile, par exemple grâce à une stérilisation par filtration sur des filtres ayant une porosité maximale de 0,2 µm et constitués de matériaux filtrants appropriés tels que, par exemple, le polyéther sulfone ou le Nylon 66.

Les récipients appropriés pour la lyophilisation sont, par exemple, les flacons en verre soufflé ou les flacons en verre tubulaire. Le volume de la solution dispensée dans les récipients est compris entre 0,2 ml et 20 ml, de préférence entre 0,5 ml et 5 ml, et plus préférablement encore entre 0,7 ml et 3,0 ml.

La solution est lyophilisée dans les récipients. A cette fin, les récipients contenant la solution sont placés sur des rayonnages pré-refroidis ou non pré-refroidis, puis congelés. Le séchage principal subséquent est réalisé dans le vide à des pressions internes de 0,05 mbar à 1,8 mbar, à des températures des rayonnages de -40° C à +60° C. L'après-séchage est réalisé à des pressions internes de 1 µbar à 1,8 mbar, à des températures des rayonnages de -20° C à +70° C.

Selon une autre possibilité, la lyophilisation peut être conduite suivant le procédé décrit dans la demande de brevet international PCT/EP00/07034. Le lyophilisat stable en stockage des compositions mentionnées plus haut est ainsi formé par lyophilisation.

L'invention concerne en outre des solutions injectables contenant du repinotan ou un sel de repinotan acceptable du point de vue pharmaceutique, et un ou plusieurs acides choisis dans le groupe consistant en acide malique, acide pyruvique, acide citrique, acide fumarique, acide maléique, acide lactique, et  
5 acide tartrique, de préférence l'acide citrique ou l'acide tartrique.

Les solutions injectables de la présente invention présentent une stabilité en stockage étonnamment grande.

Au sens de la présente invention, une solution injectable est une solution qui contient principalement de l'eau en tant que solvant et présente une osmolalité  
10 comprise dans l'intervalle de 250 à 500 mOsmol/kg, de préférence de 280 à 350 mOsmol/kg. Il est possible d'obtenir l'osmolalité susmentionnée de la solution injectable lorsque les quantités nécessaires, par exemple, de chlorure de sodium, de mannitol ou de glucose, font déjà partie de la composition pharmaceutique solide et qu'elle elle est reconstituée et/ou diluée dans l'eau, ou  
15 lorsque les quantités nécessaires de ces substances sont ajoutées avec le milieu de reconstitution/dilution. La concentration du repinotan dans la solution injectable est généralement de 0,1 à 500 µg de repinotan/ml de solution, de préférence de 0,5 à 5 µg/ml. La solution injectable contient suffisamment  
20 d'acide pour qu'à 20° C, le pH soit compris entre 3,5 et 5, et soit de préférence d'environ 4.

Normalement, ces solutions sont ajoutées à la température ambiante.

## EXEMPLES DE TRAVAIL

Exemple 1 : Lyophilisat d'une composition contenant du chlorhydrate de repinotan

5 L'on prépare un mélange de 55 mg de chlorhydrate de repinotan (correspondant à 50 mg de repinotan), 20 g de mannitol et 3,7 g d'acide citrique dans 1 000 ml d'eau. Cette solution aqueuse est stérilisée par filtration sur des filtres en polyéther sulfone d'une porosité maximale de 0,2  $\mu\text{m}$  et distribuée dans des flacons en verre tubulaire. Le volume de solution distribué est de 1 ml.

10 La solution est lyophilisée dans les flacons en verre tubulaire. A cette fin, les flacons en verre tubulaire contenant la solution à la température ambiante sont placés sur les rayonnages d'une chambre de séchage par congélation et congelés à  $-40^{\circ}\text{C}$ . Le séchage principal subséquent est réalisé dans le vide sous une pression interne de 0,2 mbar et à une température des rayonnages de  $0^{\circ}\text{C}$ . L'après-séchage est réalisé sous une pression interne de 10  $\mu\text{bar}$  et à une  
15 température des rayonnages de  $40^{\circ}\text{C}$ . Cette lyophilisation donne le produit final stable en stockage.

Selon une autre possibilité, la lyophilisation est réalisée suivant le procédé décrit dans la demande de brevet international PCT/EP00/07034.

20 De manière analogue au procédé décrit dans l'exemple 1, des lyophilisats contenant 0,27 g, 0,681 g, 1,36 g et 2,73 g de chlorhydrate de repinotan, correspondant respectivement à 0,25 g, 0,625 g, 1,25 g et 2,5 g de repinotan, sont préparés avec les quantités de mannitol, d'acide citrique et d'eau utilisées dans l'exemple 1.

Exemple 2 : Solution injectable de chlorhydrate de repinotan prête à l'emploi

Une solution injectable prête à l'emploi est préparée à partir du produit lyophilisé de l'exemple 1 en reconstituant le lyophilisat dans une solution de NaCl à 0,9 % en poids et en diluant cette solution à un volume total de 500 ml.

5 La solution prête à l'emploi est chimiquement stable en stockage pendant au moins 30 heures à la température ambiante, à savoir la solution contient alors encore au moins 90 % de repinotan inchangé.

Exemple 3 : Détermination du repinotan sur des plaques de microtitration selon la méthode ELISA

10 Le test consiste en un dosage compétitif faisant appel à la méthode ELISA. Le conjugué protéique d'un haptène analogue du repinotan est mis à réagir avec une quantité constante de fragment Fab ou Fab2 d'un anticorps monoclonal ou d'anticorps polyclonaux, spécifiquement dirigés contre la structure chimique du repinotan, et un volume constant d'échantillon contenant du repinotan. Il est possible de déterminer la concentration du repinotan d'après le rapport du conjugué protéique lié sur le conjugué protéique libre au moyen d'une courbe d'étalonnage établie en parallèle grâce à des échantillons de référence contenant des concentrations connues de repinotan.

20 De l'IgG de chèvre est chimiquement lié aux analogues du repinotan mentionnés ci-dessus dans un rapport molaire de 1/7,5. Ce conjugué est incubé dans une solution tampon carbonate de sodium 0,1 M, pH = 9,6, pendant 1 heure à 37° C sur une plaque de microtitration (par exemple, Dynex Immulon 2HB). Il est ensuite bloqué pendant 30 minutes à la température ambiante en utilisant une solution saline de tampon phosphate contenant de la caséine (1 %). Ensuite, il est lavé à trois reprises dans une solution saline de tampon phosphate contenant du Tween (0,05 %).

25 L'essai compétitif peut alors être réalisé sur la plaque ainsi préparée. A cette fin, 100 µl d'échantillon sont déposés dans un puits de microtitration et traités par 100 µl d'une solution d'anticorps (anticorps anti-repinotan de souris, 10 ng/ml dans une solution saline de tampon phosphate). Le mélange est incubé à la

30

température ambiante pendant 1 heure. Après lavage à trois reprises avec du tampon de lavage (voir ci-dessus), dans une autre réaction, un second anticorps, couplé à la peroxydase du raifort (1/1, IgG anti-souris de chèvre, Zymed ; dilué 1000 x), est transféré à la pipette dans le puits de microtitration.

5 Celui-ci lie l'anticorps de souris spécifique du repinotan qui est lié au conjugué d'haptène analogue du repinotan. La quantité de l'anticorps de souris spécifique du repinotan liée de cette façon est indirectement proportionnelle à la quantité de repinotan libre dans l'échantillon. L'excès de conjugué anticorps-enzyme est éliminé par lavage à trois reprises et, après addition du substrat enzymatique

10 (TMB), la quantité d'anticorps lié restant est déterminée par une mesure photométrique dans des conditions cinétiques. L'utilisation du protocole illustré permet de mesurer les concentrations de repinotan comprises dans l'intervalle de 1 à 100 ng/ml, en utilisant les solutions de référence appropriées.

Exemple 4 : Essai du repinotan au centre de soins

15 Ce test du repinotan est destiné à être utilisé dans le domaine des soins intensifs et d'autres domaines hospitaliers en vue de déterminer les concentrations de repinotan supérieures et inférieures à une concentration-seuil définie d'environ 17 ng/ml dans le sang entier, le sérum ou le plasma. Il s'agit d'un test à usage unique permettant une lecture visuelle du résultat.

20 Description de l'appareillage :

Le test est basé sur un processus immunologique compétitif destiné à la détermination de petites molécules tel que décrit plus haut. En tant que mécanisme de lecture, au lieu d'un procédé spectroscopique enzymatique, l'on utilise le signal réfléchi par des particules d'or colloïdal. Tous les éléments

25 nécessaires à l'essai, ainsi que toutes les manipulations mécaniques qui sont nécessaires pour réaliser des dosages immunologiques classiques, sont incorporés dans un dispositif en plastique. Celui-ci contient un mécanisme apte à séparer les cellules sanguines du sérum et un mécanisme permettant de mesurer avec précision une certaine quantité du sérum ainsi séparé. Un

30 réservoir de tampon contient la phase liquide nécessaire à la réaction, qui permet le mouvement capillaire dans le système. L'anticorps anti-repinotan et le

conjugué haptène-IgG de chèvre-particules d'or sont présents à l'état lyophilisé dans une cellule réactionnelle du dispositif en plastique. Une chambre de mélange située à l'extrémité d'un capillaire et une bandelette d'essai immunochromatographique complètent le système. Des zones réactionnelles stationnaires sont appliquées sur les bandelettes d'essai : un anticorps d'âne anti-souris et un anticorps de lapin anti-chèvre.

En l'absence de repinotan, l'anticorps d'âne anti-souris piège la majeure partie du conjugué d'or et forme une zone colorée en rouge. Au fur et à mesure que la concentration de repinotan augmente dans l'échantillon à tester, le conjugué d'or est déplacé de manière proportionnelle à la quantité d'anticorps anti-repinotan ayant réagi avec l'anticorps de lapin anti-chèvre.

A la fin de la bandelette d'essai immunochromatographique se trouve une zone d'absorption au début de laquelle est appliqué un colorant hydrosoluble. Ce colorant avance avec le front de liquide jusqu'à la fin de la zone d'absorption. La coloration de cette zone indique la fin de la réaction de dosage.

Depuis l'application de l'échantillon jusqu'à la lecture du résultat, la réalisation du test prend environ 15 minutes. Le test peut être réalisé avec 100 à 150 µl de sang entier, ce qui garantit la production d'environ 15 µl de sérum.

Les éléments réactionnels suivants sont nécessaires à la préparation du dispositif d'essai :

- a) anticorps monoclonal anti-repinotan
- b) conjugué or-analogue du repinotan-IgG de chèvre
- c) or colloïdal, 20 nm
- d) membrane de nitrocellulose
- e) anticorps de chèvre anti-souris
- f) anticorps de lapin anti-chèvre
- g) solution de repinotan de référence
- h) solution saline de tampon phosphate, 0,2 % de Triton X 305
- i) solution saline de tampon phosphate, 0,4 % de Nonidet P-40, 2 % de SAB, 2,5 % de saccharose, 1,25 % de tréhalose (lyophilisée)

- j) matériau formant puits de 2,5 cm
- k) support en plastique, 5,3 cm de large et 8 mm d'épaisseur
- l) sérum humain

Protocole d'essai :

- 5 Environ 150 µl de sang entier (5 gouttes), de sérum ou de plasma sont appliqués sur la plaque échantillon. Le dispositif est maintenu en position horizontale pendant 3 minutes environ. La poignée du flacon d'addition est ensuite tournée à 90° jusqu'à ce qu'elle affleure sur le fond du dispositif. Le
- 10 dispositif est ensuite conservé à la température ambiante, en position horizontale, pendant 15 minutes. Lorsqu'un point bleu apparaît dans la fenêtre témoin, le test est terminé et le résultat peut être lu.

Hormis l'application de l'échantillon et la manipulation du flacon d'addition, aucune autre manipulation de l'échantillon ou du dispositif n'est nécessaire à la réalisation du test. Le test peut donc être réalisé par un personnel non

15 technique.

Interprétation du résultat :

Comme décrit dans le brevet WO-A-99/46591, la comparaison de l'intensité des deux bandes dans les fenêtres A et B permet la détermination semi-quantitative simple de la concentration de repinotan. Si le signal dans la fenêtre A est plus

20 intense que celui de la fenêtre B, la concentration du repinotan est supérieure à une certaine valeur-seuil définie, et dans le cas contraire la concentration du repinotan est inférieure à cette valeur-seuil. La valeur-seuil peut être définie en ajustant le rapport de la concentration de l'anticorps anti-repinotan sur la concentration du conjugué or-analogue du repinotan-IgG de chèvre dans le

25 lyophilisat.

L'analogue du repinotan dans le conjugué or-analogue du repinotan-IgG de chèvre est un composé de formule :



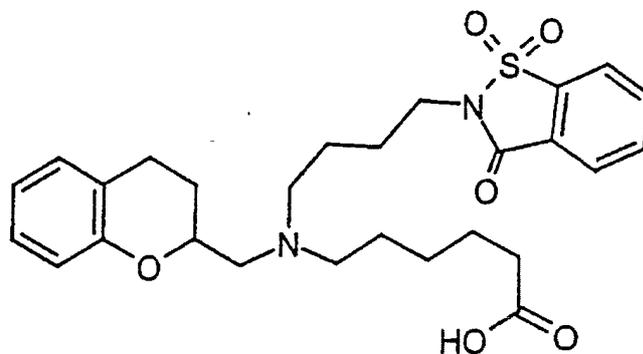
## REVENDICATIONS

1. Trousse comprenant :
  - a) une composition pharmaceutique contenant du repinotan et/ou un sel de repinotan acceptable du point de vue physiologique, et
  - 5 b) un agent destiné à déterminer la concentration du repinotan ou de ses métabolites dans les liquides organiques.
2. Trousse selon la revendication 1, dans laquelle la composition pharmaceutique contient du chlorhydrate de repinotan.
3. Trousse selon la revendication 1 ou 2, ladite trousse comprenant un  
10 agent destiné à déterminer la concentration de l'analyte dans le sang ou dans des fractions du sang.
4. Trousse selon la revendication 3, ladite trousse comprenant un agent destiné à déterminer la concentration de l'analyte dans le plasma sanguin.
5. Trousse selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans laquelle  
15 l'agent opère suivant un processus immunologique.
6. Trousse selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, dans laquelle l'agent peut être employé au site du traitement.
7. Trousse selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 destinée au traitement de maladies neurodégénératives en phase aiguë.
8. Trousse selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 destinée au  
20 traitement de l'ictus ou du trauma crânio-cérébral en phase aiguë.
9. Composition pharmaceutique solide contenant du repinotan ou un sel de repinotan acceptable du point de vue physiologique, et un acide acceptable du point de vue physiologique.

10. Composition selon la revendication 9, dans laquelle la proportion en poids du composé actif est de 0,01 à 15 % en poids et la proportion en poids de l'acide est de 0,5 à 15 % en poids.
- 5 11. Composition selon la revendication 9 ou 10, ladite composition contenant du chlorhydrate de repinotan en tant que le composé actif et de l'acide citrique ou de l'acide tartrique en tant que l'acide.
- 10 12. Procédé de préparation d'une composition selon l'une quelconque des revendications 9 à 11, dans lequel le composé actif, l'acide et d'autres excipients pharmaceutiques sont dissous dans l'eau et/ou dans d'autres solvants appropriés, la solution est facultativement stérilisée et la solution est ensuite lyophilisée.
13. Composition pouvant être obtenue suivant le procédé de la revendication 12.
- 15 14. Solution injectable contenant du repinotan ou un sel de repinotan acceptable du point de vue physiologique, et un ou plusieurs acides choisis parmi l'acide malique, l'acide pyruvique, l'acide citrique, l'acide fumarique, l'acide maléique, l'acide lactique et l'acide tartrique.
- 15 15. Solution injectable selon la revendication 14, dans laquelle l'acide est l'acide citrique ou l'acide tartrique.
- 20 16. Procédé de préparation d'une solution injectable contenant du repinotan ou un sel de repinotan acceptable du point de vue physiologique, et un ou plusieurs acides choisis parmi l'acide malique, l'acide pyruvique, l'acide citrique, l'acide fumarique, l'acide maléique, l'acide lactique et l'acide tartrique, dans lequel de l'eau ou une solution d'électrolytes isotonique est ajoutée à une  
25 composition selon la revendication 13.
17. Solution injectable pouvant être obtenue en suivant le procédé de la revendication 16.

18. Utilisation des compositions selon la revendication 13 en vue de la préparation de solutions injectables.

19. Composé de formule :



(Cinq Cent Cinquante Trois Lignes)  
(Vingt et Une pages)

BAYER AG.  
P.P. SABA & CO., Casablanca