



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2273975 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
A61K 9/08 (2006.01)
A61K 31/4015 (2006.01)

Patentstyret

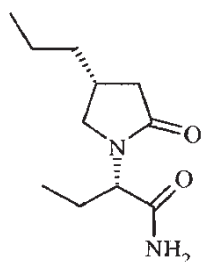
(21)	Oversettelse publisert	2014.09.08
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2014.04.09
(86)	Europeisk søknadsnr	09716304.2
(86)	Europeisk innleveringsdag	2009.03.02
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2011.01.19
(30)	Prioritet	2008.03.03, EP, 08003915
(84)	Utpekte stater	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
	Utpekte samarbeidende stater	BA RS
(73)	Innehaver	UCB Pharma, S.A., 60, allée de la Recherche, 1170 Brussels, BE-Belgia
(72)	Oppfinner	SCHENKEL, Eric, c/o UCB PHARMA S.A.60 Allée de la Recherche, 1070 Brussels, BE-Belgia POULAIN, Claire, c/o UCB PHARMA S.A.60 Allée de la Recherche, 1070 Brussels, BE-Belgia DODELET, Bertrand, c/o UCB PHARMA S.A.60 Allée de la Recherche, 1070 Brussels, BE-Belgia FANARA, Domenico, c/o UCB PHARMA S.A.60 Allée de la Recherche, 1070 Brussels, BE-Belgia
(74)	Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	FARMASØYTISKE LØSNINGE, PROSESSER FOR FREMSTILLING OG TERAPEUTISKE ANVENDELSER
(56)	Anførte publikasjoner	EP-A- 1 731 149 WO-A-01/62726 WO-A-2005/121082 THEUER HAGEN ET AL: "Stabilitätsuntersuchungen von Piracetam-Infusionslösungen" PHARMAZEUTISCHE ZEITUNG, FRANKFURT, DE, vol. 132, no. 17, 1 January 1987 (1987-01-01), pages 1024-1029, XP002171959 ISSN: 0031-7136

Beskrivelse

[0001] Den foreliggende oppfinnelsen vedrører stabile væskeformuleringer for brivaracetam, en prosess for fremstillingen derav og terapeutiske anvendelser derav.

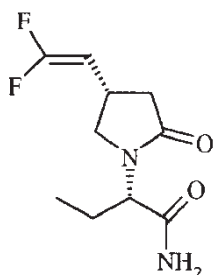
[0002] Internasjonal patentsøknad med publikasjonsnummer WO 01/62726 beskriver 2-okso-1-pyrrolidinderivater og fremgangsmåter for deres fremstilling. Den beskriver særlig forbindelse (2S)-2-[(4R)-2-okso-4-propyl-pyrrolidin-1-yl] butanamid kjent under det internasjonale ikke-proprietære navnet brivaracetam.



Brivaracetam

[0003] EP1731149 beskriver anvendelsen av brivaracetam for forbyggingen eller behandlingen av progressiv myoklonisk epilepsi. En rekke farmasøytiske sammensetninger er foreslått, inkludert løsninger.

[0004] Internasjonal patentsøknad med publikasjonsnummer WO 2005/121082 beskriver en prosess for fremstilling av 2-okso-1-pyrrolidinderivater og omtaler særlig en prosess for fremstilling av (2S)-2-[(4S)-4-(2,2-difluorvinyl)-2-okso-pyrrolidin-1-yl]butanamid kjent under det internasjonale ikke-proprietære navnet seletracetam.



Seletracetam

[0005] 2-okso-1-pyrrolidinderivater er derfor særlig nyttige i den farmasøytiske industrien.

[0006] Brivaracetam er effektiv i behandlingen av epilepsi. Brivaracetam er også effektiv i behandlingen av pasienter med refraktære partielle inntrådte anfall, med eller uten sekundær generalisering. I den terapeutisk bekreftende fase III studien, er effekten og sikkerheten for brivaracetam testet ved doser fra 5 til 100 mg per dag i den attributive behandlingen av voksne pasienter (16-65 år). Brivaracetam har også en indikasjon i behandlingen av progressiv myoklonisk epilepsi og av symptomatisk myoklonus.

[0006] Seletracetam er effektiv i behandlingen av epilepsi.

[0008] Inntil nå har brivaracetam og seletracetam blitt formulert i faste sammen-setninger (filmbelagte tabletter, granula).

5 **[0009]** En oral løsning ville imidlertid være særlig ønsket for administrasjon hos barn og også hos noen voksne pasienter. En injiserbar løsning kunne være fordelaktig anvendt i tilfelle epilepsikriser.

[0010] Dessuten er administrasjon av en oral doseringsform den foretrukne administrasjonsveien for mange legemidler fordi det tilrettelegger for enkel, rimelig administrasjon. Enkelte pasienter slik som barn eller eldre mennesker kan imidlertid ha
10 problemer når de blir bedt om å svelge en fast formulering slik som en tablett eller en kapsel. Følgelig er utviklingen av en flytende oral formulering derfor ønsket siden den gir forbedret pasientcompliance.

[0011] Stabilitetstester ved lagring har imidlertid vist at vandige løsninger av 2-okso-
1-pyrrolidinderivater var delvis ustabile. Under disse tester blir nedbrytingsprodukter i
15 løsning dannet ved basisk eller sur hydrolyse, faktisk oppstod en epimerisering og/eller amidhydrolyse, men også oksidasjon, med påvisning av hydroksyamid og hydroksy-syreurenheter.

[0012] Det har nå overraskende blitt funnet at disse nedbrytingsproduktene ikke blir
dannet ved pH-verdier mellom 4.5 og 6.5. Faktisk er kinetikken for nedbryting den
20 sakteste ved normale tilstander (romtemperatur) der legemiddelløsningen har en pH-verdi på mellom 4.5 og 6.5.

[0013] Oppfinnelsen vedrører en stabil løsning av en farmasøytisk forbindelse som er
(2S)-2-{(4R)-2-okso-4-propylpyrrolidin-1-yl}} butanamid, karakterisert ved at den har
en pH-verdi på mellom 4.5 og 6.5.

25 **[0014]** Fortrinnsvis har løsningen med oppfinnelsen en pH-verdi mellom 5.0 og 6.0. De beste resultatene blir oppnådd med en pH-verdi på ca. 5.5.

[0015] Med "stabil" mener vi optimal stabilitet i normal oppbevaringstilstand (romtemperatur).

[0016] Særlig vedrører oppfinnelsen en injiserbar løsning eller en oral løsning. Når
30 den er en injiserbar løsning, har løsningen foretrukket en pH-verdi på $5,5 \pm 0,2$. Når den er en oral løsning, har løsningen foretrukket en pH-verdi på $5,5 \pm 0,2$.

[0017] Vekten av den farmasøytiske forbindelsen i en injiserbar løsning er generelt i området fra 0,01 mg per ml til 200 mg per ml; og foretrukket fra 0,1 mg til 50 mg per ml; og mer foretrukket fra 1 mg til 30 mg per ml.

35 **[0017]** Vekten av den farmasøytiske forbindelsen i en oral løsning er generelt i området fra 0,01 mg per ml til 100 mg per ml; foretrukket fra 0,1 mg til 50 mg per ml; og mer foretrukket fra 1 mg til 20 mg per ml.

[0019] Vanligvis er løsningen vandig eller alkoholisk. I en foretrukket utførelsesform med oppfinnelsen er løsningen en vandig løsning; vann blir anvendt som løsnings-

middel, foretrukket rensset vann for en oral vandig løsning og injeksjonsvann og pyrogenfritt for den injiserbare formen.

[0020] Løsningen kan bli administrert direkte intravenøst, intramuskulært eller parenteralt, eller utformet som infusjonsløsninger eller konsentrater som tilskudd til infusjoner.

[0021] Substanser for justering av pH-verdien er fysiologiske buffere. pH for sammensetningene blir opprettholdt av et buffersystem. Buffersystemer omfatter blandinger av egnede mengder av en syre slik som fosforsyre, ravsyre, vinsyre, melkesyre eller sitronsyre, og en base, særlig natriumhydroksid eller dinatriumhydrogenfosfat. Ideelt har bufferen tilstrekkelig kapasitet til å forbli i tiltenkt pH-område ved fortynning med en nøytral, en svakt sur eller en svakt basisk drikk.

[0022] Eksempler på buffere er eddiksyre, fosfat og sitronsyre. De beste resultatene blir oppnådd med eddiksyre og sitronsyre.

[0023] Farmasøytisk godkjente eksipienser kan bli tilsatt løsningen, slik som konserveringsmidler og formuleringsmidler. Konserveringsmidler er inkludert i fremstillingen for å drepe eller hemme veksten av mikroorganismer feilaktig introdusert under fremstilling eller anvendelse og er derfor essensielle ingredienser. Valget av et egnet konserveringsmiddel for en fremstilling avhenger av pH, kompatibilitet med andre ingredienser, administrasjonsvei, dose og administrasjonshyppighet for fremstillingen, oppdelingskoeffisienter med ingredienser og beholdere eller lukkere, grad og type av kontaminasjon, påkrevet konsentrasjon og frekvens for antimikrobiell effekt.

[0024] Den foreliggende oppfinnelsen vedrører også en prosess for produksjonen av en stabil løsning hvori en løsning av den farmasøytiske forbindelsen blir justert til en pH-verdi på mellom 4.5 og 6.5.

[0025] Ifølge oppfinnelsen, kan også løsningen inneholde natriumklorid eller natriumacetat for den injiserbare formen og søtningsmidler, smaker, konsistensmidler for de orale formene. Videre ble den generelle oppfattelsen av sødme og smak forbedret.

[0026] De farmasøytisk godkjente søtningsmidlene omfatter fortrinnsvis minst et intenst søtningsmiddel slik som sakkarin, natrium- eller kalsiumsakkarin, aspartam, acesulfam-kalium, natriumcyklamat, alitam, et dihydrochalkon søtningsmiddel, monellin, steviosid eller sukralose (4,1',6'-triklor-4,1',6'-trideoksygalaktosukrose), fortrinnsvis sakkarin, natrium eller kalsiumsakkarin og eventuelt et bulksøtningsmiddel slik som sorbitol, mannitol, fruktose, sukrose, maltose, isomalt, glukose, hydrogenert glukosesirup, xylitol, karamell eller honning.

[0027] Det intense søtningsmidlet er hensiktsmessig anvendt i lave konsentrasjoner. F.eks. i tilfellet med natriumsakkarin, kan konsentrasjonen ligge fra 0,01 % til 0,1 %

(vekt/volum) basert på det totale volum av sluttformuleringen, og foretrukket er ca. 0,05 % (vekt/volum).

[0028] Bulksøtningsmidlet, slik som sorbitol, kan effektivt bli anvendt i større mengder som ligger fra ca. 10 % til ca. 35 % (vekt/volum), foretrukket fra ca. 15 % til 30 % (vekt/volum), mer foretrukket ca. 25 % (vekt/volum).

[0029] Når sorbitol blir anvendt som bulksøtningsmiddel er den foretrukket anvendt som en vandig løsning som inneholder 70 % (vekt/vekt) av sorbitol.

[0030] De farmasøytisk godkjente smakene som kan maskere de bitre smaksingrediensene i lavdoseformuleringer er foretrukket fruktsmaker slik som kirsebær, bringebær, solbær, jordbærsmak, karamellsjokoladesmak, mintkjølningssmak, fantasismak og de lignende farmasøytisk godkjente sterke smakene. Hver smak kan være tilstede i sluttsammensetningen i en konsentrasjon som ligger fra 0,05 % til 1 % (vekt/volum).

[0031] Kombinasjoner av nevnte sterke smaker blir fordelaktig anvendt. Fortrinnsvis blir en smak anvendt som ikke gjennomgår noen endringer eller tap av smak og farge under de sure tilstandene av formuleringen.

[0032] Fortrinnsvis; den injiserbare løsningen inneholder natriumklorid.

[0033] For å fremstille løsningene blir 80 % av de nødvendige mengdene av vann klargjort og farmasøytisk forbindelse og de andre eksipientene blir oppløst ved røring. Når oppløsningen er fullført, blir pH verifisert og, om nødvendig, justert til den ønskede pH, fortrinnsvis ca. 5,5 (+/- 0,5). Denne løsningen blir gjort ferdig med det resterende volumet av vann.

[0034] For den injiserbare formen, blir løsningen oppnådd på denne måten sterilisert ved filtrasjon gjennom konvensjonelle patogensikre filtre og så fordelt i egnede beholdere for injiserbare preparasjoner (ampuller eller hetteglass) og ettersterilisert.

Vannet som brukes i prosessen for fremstillingen er sterilt og uten pyrogen.

[0035] De orale løsningene blir filtrert på egnede filtre og fordelt i egnede beholdere for oral administrasjon.

[0036] Den foreliggende oppfinnelsen vedrører også en anvendelse av en stabil løsning for produksjon av et legemiddel for en terapeutisk applikasjon.

[0036] Den foreliggende oppfinnelsen vedrører også en anvendelse av en stabil løsning for behandlingen av sykdom.

[0038] Den foreliggende oppfinnelsen vedrører også en fremgangsmåte for å behandle en pasient omfattende administrering til en slik pasient en terapeutisk effektiv mengde av en stabil løsning.

[0039] Den foreliggende oppfinnelsen vedrører også en farmasøytisk sammensetning omfattende en stabil løsning med en pH-verdi på mellom 4,5 og 6,5.

[0040] Den foreliggende oppfinnelsen vedrører også en flytende farmasøytisk fremstilling omfattende en stabil brivaracetamløsning med en pH-verdi på mellom 4,5

og 6,5, denne fremstillingen inneholdende mindre enn 0,2 vektprosent av urenheter (urenheter inkludert nedbrytingsprodukter).

[0041] Den orale løsningen med oppfinnelsen er særlig nyttig for administrasjon hos barn eller hos voksne pasienter for hvilke administrasjon med tabletter ikke er mulig.

[0042] En annen fordel med oppfinnelsen ligger i det faktum at den injiserbare løsningen tillater raske intervensjoner i nødstilfeller eller kriser, eller for de pasientene for hvilke administrasjon med noen formulering gjennom oralt inntak ikke er mulig. Disse karakteristikker av brivaracetam gjør den ideell for administrasjon i væskeformer, i motsetning til de fleste andre legemidler, med de samme indikasjoner, som er svært lite løselige i vann.

[0043] Følgende eksempler viser oppfinnelsen uten imidlertid å begrense dens omfang.

[0044] Eksempel 1. Brivaracetamløsninger - 20 mg/ml - 1 ml løsning i 1,5 ml forseglede hetteglass.

[0045] Løsninger ved forskjellig pH blir fremstilt (naturlig pH (ikke bufret) og pH 4.5, 5.0, 5.5, 6.0. pH blir kontrollert ved hjelp av en adekvat buffer for å oppnå den ønskede pH (i eksemplet med 50 mM citrat).

[0046] Løsningen blir fordelt i 1,5 ml forseglede hetteglass.

[0047] En stabilitetstest blir utført ved 25 °C, 40 °C, 60 °C og 80 °C.

[0048] pH for de forskjellige løsningene blir målt ved starten av testen og etter 2 uker, 4 uker og 10 uker. Mengdene av nedbrytingsprodukter i brivaracetamløsningene blir dosert i de forskjellige løsningene.

[0049] Resultatene er oppsummert i tabellene 1, 2 og 3 som følger.

Tabell 1: sum av alle nedbrytingsprodukter påvist (% relative områder) etter 2 ukers stabilitet ved 25 °C, 40 °C, 60 °C og 80 °C

Opprinnelig pH	ved 25 °C	ved 40 °C	ved 60 °C	ved 80 °C
4,6	0,0	0,0	0,3	2,0
5,1	0,0	0,0	0,1	0,7
5,6	0,0	0,0	0,0	0,5
6,1	0,0	0,0	0,0	1,4

Tabell 2: sum av alle nedbrytingsprodukter påvist (% relative områder) etter 4 ukers stabilitet ved 25 °C, 40 °C, 60 °C og 80 °C

Opprinnelig pH	ved 25 °C	ved 40 °C	ved 60 °C	ved 80 °C
4,7	0,0	0,1	0,8	4,3
5,2	0,0	0,0	0,2	1,4
5,7	0,0	0,0	0,1	1,1

Opprinnelig pH	ved 25 °C	ved 40 °C	ved 60 °C	ved 80 °C
6,2	0,0	0,0	0,1	2,9

Tabell 3: sum av alle nedbrytingsprodukter påvist (% relative områder) etter 10 ukers stabilitet ved 25 °C, 40 °C, 60 °C og 80 °C

Opprinnelig pH	ved 25 °C	ved 40 °C	ved 60 °C	ved 80 °C
4,7	0,0	0,1	1,7	10,7
5,2	0,0	0,0	0,5	3,7
5,7	0,0	0,0	0,1	2,7
6,1	0,0	0,0	0,2	7,6

- 5 **[0050]** Disse resultatene viser at brivaracetamløsning er stabil i området for pH på 4.5 og 6.5. Disse resultatene demonstrerer klart at nedbrytingshastigheten er den laveste for en løsning som har et pH-område på 5.0 og 6.0.

10 **Eksempel 2 (ikke ifølge oppfinnelsen) Seletracetamløsninger - 10 mg/ml - 1 ml løsning i 1,5 ml forseglede hetteglass.**

[0051] Løsninger ved forskjellig pH blir fremstilt (naturlig pH (ikke bufret) og pH 4.5, 5.0, 5.5, 6.0. pH blir kontrollert ved hjelp av en adekvat buffer for å oppnå den ønskede pH (i eksemplet: 50 mM acetat).

- 15 **[0052]** Løsningen blir fordelt i 1,5 ml forseglede hetteglass.

[0053] En stabilitetstest blir utført ved 25 °C, 40 °C, 60 °C og 80 °C.

[0054] pH for de forskjellige løsningene blir målt ved starten av testen og etter 2 uker, 4 uker og 10 uker. Mengdene av nedbrytingsprodukter i seletracetamløsningene blir dosert i de forskjellige løsningene.

- 20 **[0055]** Resultatene er oppsummert i følgende tabeller.

Tabell 4: sum av alle nedbrytingsprodukter påvist (% relative områder) etter 2 ukers stabilitet ved 25 °C, 40 °C, 60 °C og 80 °C

Opprinnelig pH	ved 25 °C	ved 40 °C	ved 60 °C	ved 80 °C
4.6	0,0	0,0	0,0	1,0
5.1	0,0	0,0	0,0	0,3
5.7	0,0	0,0	0,0	0,5
6.1	0,0	0,0	0,0	1,4

- 25 **Tabell 2: sum av alle nedbrytingsprodukter påvist (% relative områder) etter 4 ukers stabilitet ved 25 °C, 40 °C, 60 °C og 80 °C**

Opprinnelig pH	ved 25 °C	ved 40 °C	ved 60 °C	ved 80 °C
4.7	0,0	0,0	0,1	1,7
5.2	0,0	0,0	0,1	0,9
5.7	0,0	0,0	0,0	1,0
6.2	0,0	0,0	0,0	2,7

Tabell 3: sum av alle nedbrytingsprodukter påvist (% relative områder) etter 10 ukers stabilitet ved 25 °C, 40 °C, 60 °C og 80 °C

Opprinnelig pH	ved 25 °C	ved 40 °C	ved 60 °C	ved 80 °C
4.7	0,0	0,1	1,0	5,8
5.2	0,0	0,0	0,3	3,4
5.7	0,0	0,0	0,4	3,0
6.1	0,0	0,0	0,4	7,8

- 5 **[0056]** Disse resultatene viser at seletracetamløsning er stabil i området for pH på 4,5 og 6,5. Disse resultatene demonstrerer klart at nedbrytingshastigheten er den laveste for en løsning som har et pH-område på 5,0 og 6,0.

Eksempel 3: Injiserbar løsning av brivaracetam - 50 mg/ml - hetteglass

10

[0057] Sammensetningen av løsningen er som følger:

Brivaracetam		50 mg
Natriumacetat		13,5 mg
Iseddiksyre		q.s. for pH = 5.5
Natriumklorid		45 mg
Vann for injeksjon	q.s. for	5 ml

Brivaracetam, natriumklorid og natriumacetat blir oppløst i 80 % av mengden av vann for injeksjon.

pH blir justert til 5.5 ved hjelp av en 0,1 N eddiksyreløsning. Det nødvendige volumet blir fullført med vann for injeksjon.

Løsningen blir filtrert på et 0,22 µm filter som kommer foran et forfilter. Hetteglass 6 ml blir fylt.

Forseglede ampuller eller lukkede hetteglass blir sterilisert ved dampsterilisering (autoklave 20 minutter, 121 °C).

Den injiserbare løsningen med brivaracetam er svært enkel å fremstille og inneholder ingen urimelig eksipiens.

Eksempel 4. Oral løsning 1 mg/ml - Brivaracetam**[0058]** Sammensetningen av løsningen er som følger:

Forbindelser		mg
Brivaracetam		5,00
Renset vann		3000,00
Metylparaben		5,00
Sitronsyre		4,475
Natriumcitratdihydrat		14,70
Natriumkarboksymetylcellulose		25,00
Sukralose		20,00
Sorbitolløsning		1199,00
Glyserol		760,00
smak		28,00
Renset vann	ad	5,00 ml

I en rustfri tank blir 90 % av glyserolen overført og metylparaben blir tilsatt. Oppløsning blir oppnådd ved varming og rask røring.

I en annen tank blir renset vann overført og natriumcitrat, sitronsyre blir oppløst. Brivaracetam blir tilsatt under røring til fullstendig oppløsning er nådd.

Begge løsninger blir blandet.

Vann blir tilsatt til sluttvolumet og fremstillingen blir homogenisert.

pH blir kontrollert ($\text{pH} = 5.6 \pm 0.3$) med et pHmeter.

Fremstillingen blir filtrert på et 40 μm kasettfilter.

5

Eksempel 5 (ikke ifølge oppfinnelsen) Intravenøs løsning av seletracetam - 100 mg/ml – hetteglass**[0059]** Sammensetningen av løsningen er som følger.

Seletracetam	100 mg
Natriumacetat	2,7 mg
Natriumklorid	9 mg
Iseddiksyre	q.s. for pH = 5.5
Vann for injeksjon	q.s. for 1 ml

Seletracetam, natriumklorid og natriumacetat blir oppløst i 80 % av mengden av vann for injeksjon.

pH blir justert til 5.5 ved hjelp av en 0,1 N eddiksyre for injeksjon.

Det nødvendige volumet blir fullført med vann for injeksjon.

Forseglede ampuller eller lukkede hetteglass blir sterilisert ved dampsterilisering

(autoklave 30 minutter, 121 °C).

Eksempel 6. Brivaracetam oral løsning 10 mg/ml

[0060] Sammensetningen av løsningen er som følger.

Komponenter	mg/ml
Metylparaben	1
Sitronsyre	0,895
Natriumcitratdihydrat	2,94
Natriumkarboksymetylcellulose (Blanose®)	5
Brivaracetam	10
Sukralose	40
Sorbitolløsning	239,8
Glyserin,	152
Smak, kunstig (bringeber)	5,6
Renset vann	Qs
Den orale løsningen blir fremstilt som beskrevet i eksempel 4. pH blir kontrollert ($\text{pH} = 5,4 \pm 0,2$) med et pHmeter. Den orale løsningen er stabil. Videre er det en organoleptisk godkjent oral vandig løsning.	

5

Eksempel 7. Brivaracetam oral løsning 1 mg/ml

[0061] Sammensetningen av løsningen er som følger.

Komponenter	mg/ml
Metylparaben,	1
Sitronsyre	0,895
Natriumcitratdihydrat,	2,94
Natriumkarboksymetylcellulose (Blanose®)	5
Brivaracetam	1
Sukralose	4
Sorbitolløsning	239,8
Glyserin,	152
Smak, kunstig (bringeber)	5,6
Renset vann	Qs
Den orale løsningen blir fremstilt som beskrevet i eksempel 4. pH blir kontrollert ($\text{pH} = 5,5 \pm 0,2$) med et pHmeter.	

Komponenter	mg/ml
Den orale løsningen er stabil.	

Eksempel 8: LBS bindingsanalyse

[0062] [LBS står for Levetiracetam Binding Site cf. M. Noyer et al., Eur. J.

Pharmacol., 286 (1995) 137-146.]

[0063] Hemmingskonstanten (K_i) for en forbindelse blir bestemt i kompetitive bindingseksperimenter ved å måle bindingen av en enkelt konsentrasjon for en radioaktiv ligand ved likevekt med forskjellige konsentrasjoner av den umerkede testsubstansen. Konsentrasjonen av testsubstansen som hemmer 50 % av den spesifikke bindingen av radioliganden blir kalt IC_{50} .

Likevektsdissosiasjonskonstant K_i er proporsjonal med IC_{50} og blir beregnet anvendende ligning av Cheng og Prusoff (Cheng Y. et al., Biochem. Pharmacol. 1972, 22, 3099-3108).

[0064] Konsentrasjonsområdet omfatter vanligvis 6 log enheter med variable trinn (0,3 til 0,5 log). Analyser blir utført i mono- eller duplikat, hver K_i bestemmelse blir utført på to forskjellige prøver testsubstans.

[0065] Cerebral hjernebark fra 200-250g Sprague-Dawley-rotter av hannkjønn blir homogenisert anvendende en Potter S homogenisator (10 trinn ved 1000 opm; Braun, Tyskland) i 20 mmol/l Tris-HCl (pH 7.4), 250 mmol/l sukrose (buffer A); alle operasjoner blir utført ved 4 °C. Homogenatet blir sentrifugert ved 30 000g i 15 min. Råmembranpelletten oppnådd blir resuspendert i 50 mmol/l Tris-HCl (pH 7.4), (buffer B) og inkubert 15 min ved 37 °C, sentrifugert ved 30 000xg i 15 min og vasket to ganger med den samme bufferen. Sluttpelletten blir resuspendert i buffer A ved en proteinkonsentrasjon i området fra 15 til 25 mg/ml og lagret i flytende nitrogen.

[0066] Membraner (150-200 µg protein/analyse) blir inkubert ved 4 °C i 120 min i 0,5 ml av en 50 mmol/l Tris-HCl buffer (pH 7.4) inneholdende 2 mmol/l $MgCl_2$, 1 til $2 \cdot 10^{-9}$ mol/l av [3H]-2-[4-(3-azidofenyl)-2-okso-1-pyrrolidinyl]butanamid og økende konsentrasjoner av testsubstansen. Den ikke-spesifikke bindingen (NSB) er definert som den residuale bindingen observert i nærværet av en konsentrasjon av referanse-substans (f.eks. 10^{-3} mol/l levetiracetam) som binder vesentlig alle reseptorene. Membranbundene og frie radioligander blir separert ved rask filtrasjon gjennom glassfiberfiltre (tilsvarende Whatman GF/C eller GF/B; VEL, Belgia) fordypet i 0,1 % polyetylenimin og 10^{-3} mol/l levetiracetam for å redusere ikke spesifikk binding. Prøver og filtre blir rensert av minst 6 ml av 50 mmol/l Tris-HCl (pH 7.4) buffer. Hele filtrasjonsprosedyren overskrider ikke 10 sekunder per prøve. Radioaktiviteten fanget på filtrene blir talt ved væskescintillasjon i en β -teller (Tri-Carb 1900 eller TopCount 9206, Camberra Packard, Belgia, eller enhver annen tilsvarende teller). Dataanalyser

blir utført med en ikke-linear kurvetilpasset datametode anvendende et sett av ligninger som beskriver flere bindingsmodeller som antar populasjoner av uavhengige ikke-innbyrdes reseptorer som følger masselovene.

[0067] Forbindelser ifølge oppfinnelsen, og særlig brivaracetam og seletracetam, viste pKi verdier på 6,0 og høyere.

EKSEMPEL 9 : Dyremodeller for lydfølsomme mus

[0068] Formålet med denne testen er å evaluere antikonvulsasjonsstyrken for en forbindelse i lydfølsomme mus, en genetisk dyremodell med refleksanfall. I denne modellen av primær generalisert epilepsi, blir anfall fremkalt uten elektrisk eller kjemisk stimulering og anfallstypene blir, minst delvis, lik i deres kliniske fenomenologi med anfall som oppstår hos mennesker (Löscher W. & Schmidt D., Epilepsy Res. (1998), 2, 145-181; Buchhalter J.R., Epilepsia (1993), 34, S31-S41).

[0069] Genetisk lydsensitive mus av hann- eller hunnkjønn (14-28 g; N=10), avledet fra en DBA-stamme opprinnelig valgt av Dr. Lehmann ved laboratoriet for akustisk fysiologi (Paris) og alt opp i UCB Pharma Sector husholdsenhet siden 1978, blir anvendt. Den eksperimentelle utformingen bestod av flere grupper, en gruppe som mottok vehikkelkontroll og de andre gruppene forskjellige doser av testforbindelsen. Forbindelsene blir administrert intraperitonealt 60 minutter før induksjonen av lydutløste anfall. Området av de administrerte dosene hadde en logaritmisk progresjon, vanligvis mellom $1,0 \times 10^{-5}$ mol/kg og $1,0 \times 10^{-3}$ mol/kg, men lavere eller høyere doser blir om nødvendig testet.

[0070] For testing blir dyrene plassert i små bur, en mus per bur, i et lydisolert rom. Etter en periode med orientering på 30 sekunder, blir det akustiske stimulus (90dB, 10-20 kHz) avlevert i 30 sekunder via høyttalere plassert over hvert bur. Under denne tiden, blir musene observert og nærværet av de 3 fasene av anfallsaktivitet nemlig vilt løpende, kloniske og toniske konvulsjoner blir registrert. Forholdet for mus beskyttet mot henholdsvis vilt løpende, kloniske og toniske konvulsjoner blir beregnet.

[0071] For aktive forbindelser ble en ED50-verdi, dvs. dosen som frembringer 50 % beskyttelse i forhold til kontrollgruppen, sammen med 95 % konfidensgrenser, beregnet anvendende en Probit Analysis (SAS/STAT® programvare, versjon 6.09, PROBIT prosedyre) av andelen av beskyttede mus for hver av de 3 fasene av anfallsaktiviteten.

[0072] Forbindelser ifølge oppfinnelsen, og særlig brivaracetam og seletracetam, viste ED50-verdier på $1,0 \times 10^{-4}$ eller lavere.

Eksempel 10: Biotilgjengelighet og sikkerhet for en intravenøs formulering av brivaracetam

[0073] Brivaracetam er et antiepileptisk legemiddel med høy affinitet mot det synaptiske vesikkelprotein SV2A.

[0074] Et første trinn i en studie utført i en 3-veis crossover hos 24 friske personer (12 kvinner, 12 menn) sammenligner enkeltdose biotilgjengelighet av brivaracetam 10 mg orale tabletter mot brivaracetam 10 mg administrert som en 15 minutters intravenøs infusjon og som en IV-bolus. I et andre trinn ble en enkeltdoseopptrappingsstudie (25 mg, 50 mg, 100 mg og 150 mg) utført i 4 etterfølgende grupper på 6 personer (3 kvinner, 3 menn) for å øke informasjonen og som en rask IV-bolus, å vurdere farmakokinetikkene for brivaracetam ved disse doseringsregimene og å utforske doseproporsjonalitet.

[0075] Brivaracetam 10 mg administrert enten via en 15-minutters IV-infusjon eller via en IV-bolus er bioekvivalent til en enkel dose med brivaracetam 10 mg oral tablett (90 % konfidensintervaller av geometriske forhold av både C_{max} og AUC ble fullt oppfylt innen bioekvivalensområdet på 80-125 %).

[0076] Brivaracetam (fra 25 mg til 150 mg) administrert som IV-infusjon eller IV-bolus er sikker og lett tolerert. Farmakokinetiske parametere for brivaracetam etter IV-infusjon og IV-bolus var like. Forlengelser av eksponering er proporsjonal med den administrerte dosen i doseområdet (25-150 mg).

P a t e n t k r a v

1. En stabil løsning av en farmasøytisk forbindelse som er (2S)-2-{(4R)-2-okso-4-propylpyrrolidin-1-yl}} butanamid, **karakterisert ved at** den har en pH-verdi på
5 mellom 4,5 og 6,5.

2. Løsningen ifølge krav 1, **karakterisert ved at** pH-verdiene er mellom 5,0 og 6,0.

3. Løsningen ifølge krav 1, **karakterisert ved at** den er en injiserbar løsning,
10 mengden av den farmasøytiske forbindelsen er i området fra 0,01 mg per ml til 200 mg per ml.

4. Løsningen ifølge krav 1, **karakterisert ved at** den er en oral løsning, mengden av den farmasøytiske forbindelsen er i området fra 0,01 mg per ml til 100 mg per ml.

15 5. Løsningen ifølge krav 1, **karakterisert ved at** det er en injiserbar løsning som har en pH-verdi på $5,5 \pm 0,2$.

20 6. Løsningen ifølge krav 1, **karakterisert ved at** det er en oral løsning som har en pH-verdi på $5,5 \pm 0,2$.