

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGESESSKRIFT

(11) 163639 B

Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 4058/87

(51) Int.Cl.5

A 61 K 37/54
/(A 61 K 37/54,
A 61 K 31:557)

(22) Indleveringsdag: 04 aug 1987

(41) Alm. tilgængelig: 06 feb 1988

(44) Fremlagt: 23 mar 1992

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 05 aug 1986 GB 8619098

(71) Ansøger: The *Wellcome Foundation Limited; 183-193 Euston Road; London NW1 2BP, GB

(72) Opfinder: Brendan Joseph Richard *Whittle; GB

(74) Fuldmægtig: Internationalt Patent-Bureau

(54) Synergistisk farmaceutisk blanding af vævsplasminogenaktivator og et prostaglandin, farmaceutisk præparat indeholdende blandingen samt anvendelse af blandingen til fremstilling af et lægemiddel mod blodpropper

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammen drag

4058-87

Kombination af t-PA (vævplasminogenaktivator) og et prostaglandin. Kombinationen er aktiv ved fjernelse eller inhibering af blodproddannelse i pattedyr.

Den foreliggende opfindelse angår en synergistisk farmaceutisk blanding af vævsplasminogenaktivator og et prostaglandin, farmaceutiske præparater indeholdende disse, og deres anvendelse til fremstilling af et læge-
5 middel mod blodpropper hos pattedyr.

Der eksisterer en dynamisk ligevægt mellem det enzymsystem, der er i stand til at danne blodstørkninger, koagulationssystemet, og det enzymsystem, der er i stand til at opløse blodstørkninger, det fibrinolytiske system, der opretholder et intakt tydeligt
10 vasculært lag. For at begrænse blodtab fra skader dannes blodstørkninger i det beskadigede kar. Efter naturlig heling af skaden bliver overskud af blodstørkninger opløst ved det fibrinolytiske systems
15 indvirkning. Undertiden dannes blodpropper uden traumatisk skade, og disse kan sætte sig fast i store blodkar resulterende i partiel eller endog total blodstrømningsobstruktion. Når dette sker i hjerte, lunge eller hjerne, kan resultatet blive en myocardial
20 infarkt, pulmonær emboli eller slagtilfælde. Disse tilstande kombineret er den fremherskende årsag til sygelighed og dødelighed i de industrialiserede nationer.

Blodstørkninger består af et fibernetværk, der
25 kan opløses af det proteolytiske enzym plasmin. Enzymet er afledt af det inaktive proenzym, plasminogen, en komponent i blodplasma, ved indvirkning af en plasminogenaktivator. Der er to immunologisk forskellige pattedyrplasminogenaktivatorer. Intern plasminogenaktivator, også kendt som urokinase, er et en-
30 zym, der produceres af nyrerne og kan isoleres fra urin. Det kan også fremstilles ud fra en række vævskulturkilder. Ekstern plasminogenaktivator, også kendt som vasculær plasminogenaktivator og som væv-
35 plasminogenaktivator (t-PA), kan isoleres fra mange vævshomogenater (navnlig human uterus), den vasculære cellevæg og fra cellekulturer. Foruden disse to typer plasminogenaktivator findes også et bakterielt produkt, streptokinase, fremstillet af beta-hæmolytiske strep-

tococci. En væsentlig ulempe ved både urokinase og streptokinase er, at de er aktive i hele kredsløbet og ikke blot på stedet for en blodstørkning. De kan for eksempel ødelægge andre blodproteiner, såsom fibrinogen, prothrombin, faktor V og faktor VIII, og således nedsætte blodstørkningsevnen og forøge risikoen for hæmoragi. I modsætning hertil er den biologiske aktivitet af t-PA afhængig af tilstedeværelsen af fibrin, hvortil den binder, og hvor den aktiveres. Maksimal aktivitet udvikles således kun på stedet for en blodstørkning, dvs. i nærværelse af fibrin-netværket, der skal opløses, og herved undgås i høj grad risikoen for hæmoragi.

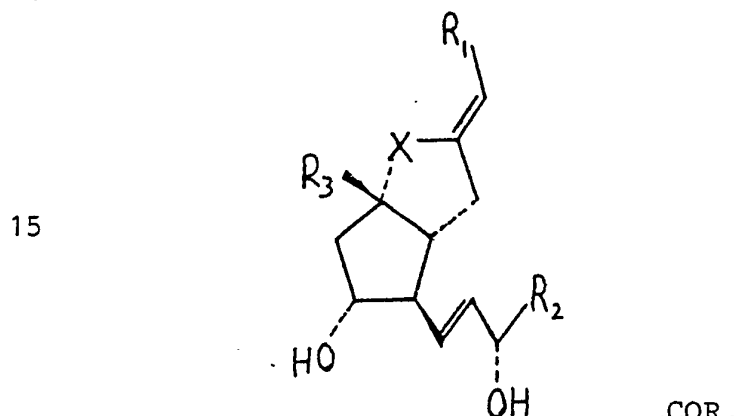
Prostaglandin E_1 (3-hydroxy-2-(3-hydroxy-1-octenyl)-5-oxocyclopentan-heptansyre) er et naturligt forekommende prostaglandin og var et af de første, der blev isoleret og karakteriseret. Det er kommercielt tilgængeligt til behandling af perifer vasculær sygdom.

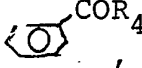
Prostacyclin (også kendt som epoprostenol og PGI_2) er også et naturligt prostaglandin, der forekommer inden i arterievæggen hos pattedyr. Det har kraftige vasodilator- og antiblodplade-egenskaber og er kommercielt tilgængeligt som dets natriumsalt, natrium-epoprostenol, til anvendelse i ekstracorporale kredsløb under cardiopulmonært omløb, nyredialyse og trækul-hæmoperfusion. En række nyere publikationer inden for litteraturen lader formode, at prostacyclin også kan have fibrinolytisk aktivitet (J.Pharmac.Exp. Therap. 1982, 222(3), 544 til 549, og Thrombos-Res., 1983, 29, 655 til 660). Lignende rapporter er også forekommet for den prostacyclin-analoge iloprost (Brit.J.Pharmac., 1985, 86, 8138, og Thromb.Haemost., 1983, 50, 893). Det er også foreslået, at prostacyclin forøger den thrombolytiske aktivitet af streptokinase (J.Cardiovasc.Pharmac., 1985, 7, 739 til 746).

En række prostacyclin-analoge er også blevet syntetiseret og vurderet som antithrombotiske eller antiblodplade-midler (Circulation, 1985, 72(6), 1219 til

1225, og Progress in Medicinal Chemistry, 1984, 21,
237 til 279).

Det har nu vist sig, at en blanding af t-PA
og et prostaglandin har thrombolytisk aktivitet, og
at niveauet for denne aktivitet er potenseret signifi-
5 kant sammenlignet med aktiviteten af t-PA eller prosta-
glandinet per se. Den synergistiske farmaceutiske blan-
ding ifølge opfindelsen er følgelig ejendommelig ved,
at den udgøres af t-PA og et prostaglandin, der er PGE₁,
eller et farmaceutisk acceptabelt salt deraf, eller
10 en forbindelse med formlen I:



20 hvor R₁ er -(CH₂)₃COR₄ eller , hvor R₄ er
hydroxy, (C₁-C₄)alkoxy, amino, (C₁-C₄)alkylamino eller
di(C₁-C₄)alkylamino, R₂ er n-pentyl, cyclopentyl,
cyclohexyl eller 1-methyl-3-pentynyl, R₃ er hydrogen
eller methyl, og X er oxygen eller methylen, eller
25 et farmaceutisk acceptabelt salt deraf.

Blandingen ifølge opfindelsen kan anvendes til
at fjerne en blodstørkning og også til at forebygge
dannelse af en blodprop i en patient, hvor den er til-
bøjelig til at forekomme, for eksempel efter rekanali-
30 sering af et blodkar hos en patient. Selvom blandingen
ifølge opfindelsen kan anvendes til at fjerne eller
forebygge dannelse af en blodprop i et hvilket som
helst blodkar, er den særligt anvendelig til at fjerne
eller forebygge dannelsen af en coronar blodprop.

35 Det t-PA, der anvendes i forbindelse med den
foreliggende opfindelse, kan være et hvilket som helst
bioaktivt protein, der i væsentlige svarer til patte-

dyr—t-PA, og navnlig humant t-PA, og omfatter former med eller uden glycosylering. Det kan være énkæde- eller tokæde-t-PA eller en blanding deraf, som beskrevet i europæisk patentpublikation EP-A-112 122, og har, i tilfælde af fuldt glycosyleret humant t-PA, en tilsyneladende molekylvægt på polyacrylamidgel på ca. 70.000 og et isoelektrisk punkt på mellem 7,5 og 8,0. t-PA'en har fortrinsvis en specifik aktivitet på ca. 500.000 IU/mg (internationale enheder/mg, idet den internationale enhed er en aktivitetsenhed defineret af WHO, National Institute for Biological Standards and Control, Holly Hill, Hampstead, London, NW3 6RB, U.K.).

Aminosyresekvensen af t-PA svarer fortrinsvis i det væsentlige til sekvensen vist i Fig.1. Sekvensen er således identisk med sekvensen i Fig.1 eller viser én eller flere aminosyre-deletioner, -substitutioner, -insertioner, -inversioner eller-additioner af allelisk oprindelse eller anden, idet den resulterende sekvens har mindst 80%, og fortrinsvis 90%, homologi med sekvensen i Fig.1 og bevarer essentielt de samme biologiske og immunologiske egenskaber som proteinet. Navnlig er sekvensen identisk med den i Fig. 1 eller er den samme sekvens, men idet aminosyren i position 245 fra serin-N-terminus'en er valin i stedet for methionin, hvorhos begge sekvenser eventuelt er uden en hvilken som helst af de første tre aminosyrer eller eventuelt har en yderligere N-terminal polypeptid-præsekvens af Gly-Ala-Arg.

Aminosyresekvensen vist i Fig.1 har 35 cystein-grupper og har således potentialet for dannelse af 17 disulfidbroer. Baseret på analogi med andre proteiner, hvis struktur er blevet bestemt mere detaljeret, er den postulerede struktur for sekvensen (stammende fra disulfidbindingsdannelse) mellem aminosyren i position 90 og prolin-C-terminus'en vist i Fig.2. Strukturen af den N-terminale region er mindre sikker, omend nogle forslag er fremsat (Progress in Fibrinolysis, 1983, 6,

269-273; og Proc.Natl.Acad.Sci., 1984, 81, 5355-5359).

De vigtigste træk ved strukturen af t-PA er de to kringleregioner (mellem aminosyrerne ved positionerne 92 og 173 og mellem aminosyrerne ved positionerne 180-
 5 261), der er ansvarlige for proteinets binding til fibrin, og serinprotease-regionen, der omfatter hovedparten af B-kæden, og som er ansvarlig for aktiveringen af plasminogen. Aminosyrerne af speciel betydning i serin-proteaser er den katalytiske triade, His/Asp/Ser.
 10 I t-PA forekommer disse ved positionerne 322, 371 og 463. Disulfidbroen mellem cysteinaminosyregrupperne ved positionerne 264 og 395 er også vigtig ved, at den holder A- og B-kæderne i tokædeformen af t-PA sammen.

I Fig.1 og 2 er anvendt de konventionelle

15 én- og tre-bogstavskoder for aminosyregrupperne, som nedenfor angivet:

Asp	D	Asparaginsyre	Cys	C	Cystein	Arg	R	Arginin
Thr	T	Threonin	Val	V	Valin	Lys	K	Lysin
Ser	S	Serin	Ile	I	Isoleucin	Trp	W	Tryptophan
20 Glu	E	Glutaminsyre	Leu	L	Leucin	Gln	Q	Glutamin
Pro	P	Prolin	Tyr	Y	Tyrosin	Met	M	Methionin
Gly	G	Glycin	Phe	F	Phenylalanin	Asn	N	Asparagin
Ala	A	Alanin	His	H	Histidin			

25 t-PA'et kan vindes ved en hvilken som helst af de tidligere beskrevne eller kendte fremgangsmåder. For eksempel kan den vindes fra en normal eller neoplastisk cellelinie af typen beskrevet i Biochimica et Biophysica Acta, 1979, 580, 140-153, EP-A-41 766
 30 eller EP-A-113 319. Det foretrækkes imidlertid, at t-PA vindes ud fra en dyrket transformeret eller transficeret cellelinie, der er vundet ved anvendelse af rekombinant DNA-teknologi, som beskrevet i for eksempel EP-A-93 619, EP-A-117 059, EP-A-117 060,
 35 EP-A-173 552, EP-A-174 835, EP-A-178 105, EP-A-225 177, EP-A-225 286, WO 86/01538, WO 86/05514 eller WO 86/05807. Det er særligt foretrukket, at anvende kinesisk hamster-ovarier(CHO)-celler til fremstillingen af t-PA, og at

disse er vundet på måden beskrevet i Molecular and Cellular Biology, 1985, 5(7), 1750-1759. På denne måde bliver det klonede gen sammen med genet, der koder for dihydrofolat-reduktase (dhfr), cotransficeret ind i
 5 dhfr⁻ CHO-celler. Transformanter, der eksprimerer dhfr, udvælges på medier, der mangler nucleosider, og udsættes for stigende koncentrationer af methotrexat. dhfr- og t-PA-generne bliver således co-forstærkede, hvilket fører til en stabil cellelinie, der er i stand
 10 til at eksprimere høje niveauer af t-PA.

t-PA'et renses fortrinsvis ved anvendelse af en hvilken som helst fremgangsmåde, der er tidligere beskrevet eller kendt, såsom fremgangsmåden beskrevet i Biochimica et Biophysica Acta, 1979, 580, 140-153;
 15 J.Biol.Chem., 1979, 254(6), 1998-2003; ibid, 1981, 256(13), 7035-7041; Eur.J.Biochem., 1983, 132, 681-686; EP-A-41 766; EP-A-113 319 eller GB-A-2 122 219.

En foretrukket underklasse af prostaglandiner til anvendelse i forbindelse med den foreliggende
 20 opfindelse omfatter PGE₁, eller et farmaceutisk acceptabelt salt deraf, eller en forbindelse med formlen I, hvor R₁, R₂, R₃ og X er som ovenfor defineret, og R₄ er hydroxy, eller et farmaceutisk acceptabelt salt deraf.

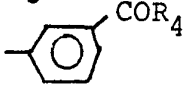
Eksempler på et farmaceutisk acceptabelt salt
 25 omfatter alkalimetals- og jordalkalimetalsalte. Det mest foretrukne eksempel er natriumsaltet.

Specifikke eksempler på særligt foretrukne prostaglandiner til anvendelse i forbindelse med den foreliggende opfindelse omfatter PGE₁, eller et farma-
 30 ceutisk acceptabelt salt deraf, eller en af de følgende forbindelser med formlen I, hvor:

1. R₁ er -(CH₂)₃COR₄, hvor R₄ er hydroxy, R₂ er n-pentyl, R₃ er hydrogen, og X er oxygen (prostacyclin),
2. R₁ er -(CH₂)₃COR₄, hvor R₄ er hydroxy, R₂ er n-pentyl, R₃ er hydrogen, og X er methylen (carbacyclin),
 35
3. R₁ er -(CH₂)₃COR₄, hvor R₄ er hydroxy, R₂ er n-pentyl, R₃ er methyl, og X er methylen (9-β-methylcarbacyclin),

4. R_1 er $-(CH_2)_3COR_4$, hvor R_4 er hydroxy, R_2 er 1-methyl-3-pentynyl, R_3 er hydrogen, og X er methylen (iloprost),

5. R_1 er $-(CH_2)_3COR_4$, hvor R_4 er hydroxy, R_2 er cyclopentyl, R_3 er hydrogen, og X er methylen, eller

6. R_1 er , hvor R_4 er hydroxy, R_2 er cyclohexyl, R_3 er hydrogen, og X er methylen, eller et farmaceutisk acceptabelt salt deraf.

10 Prostaglandinet til anvendelse i forbindelse med den foreliggende opfindelse kan fremstilles og renses ved en hvilken som helst egnet, tidligere beskrevet eller kendt fremgangsmåde, for eksempel J.Am. Chem.Soc., 1969, 91, 535, britisk patentskrift 1 583 961, 15 GB-A 2 012 265, GB-A 2 013 661, GB-A 2 017 699, GB-A 2 070 596, US patentskrift 4 238 414, EP-A 105 651, EP-A 134 153, EP-A 153 822, WO 86/00808, US patentskrift 4 510 323, US patentskrift 4 349 689 og US patentskrift 4 420 632.

20 Ved anvendelse af t-PA og et prostaglandin på måden ifølge den foreliggende opfindelse foretrækkes det at anvende dem i form af en farmaceutisk komposition. De aktive bestanddele kan anvendes i separate kompositioner eller i en enkelt kombineret komposition, 25 men i sidstnævnte komposition skal begge aktive bestanddele naturligvis være stabile og gensidigt kompatible i den særligt anvendte komposition. Den foreliggende opfindelse tilvejebringer derfor også en farmaceutisk komposition, der indeholder t-PA og et prostaglandin, 30 som ovenfor defineret, og en farmaceutisk acceptabel bærer.

t-PA og prostaglandinet vil i almindelighed blive anvendt ad den intravasculære vej, enten ved infusion eller ved bolus-injektion, og der kræves således en 35 parenteral komposition. Det foretrækkes at levere en lyofiliseret komposition til lægen eller dyrlægen, på grund af denne kompositions store transport- og lagringsfordele. Lægen eller dyrlægen kan derefter rekonstituere

den lyofiliserede kompostion i en passende mængde opløsningsmiddel, som og når nødvendigt.

Parenterale og lyofiliserede farmaceutiske kompositioner indeholdende t-PA kendes. Eksempler herpå er
5 EP-A-41 766, EP-A-93 619, EP-A-112 122, EP-A-113 319,
EP-A-123 304, EP-A-143 081, EP-A-156 169, EP-A-211 592,
EP-A-217 379, EP-A-218 112, WO86/01104, japansk
patentpublikation 57-120523 (ansøgning 56-6936) og
japansk patentpublikation 58-65218 (ansøgning 56-
10 163145) . Yderligere eksempler omfatter GB-A-2 176 702,
GB-A-2 176 703 og GB-A-2 184 354.

Parenterale og lyofiliserede kompositioner indeholdende et prostaglandin, som ovenfor defineret, er også kendt. Eksempler herpå omfatter de ovennævnte
15 britiske patentpublikationer og også EP-A-5 768.

Parenterale og lyofiliserede kompositioner indeholdende t-PA og prostaglandinet sammen i en enkelt, kombineret komposition kan fremstilles på en måde svarende til fremstillingen af kompositioner egnede til
20 t-PA eller prostaglandinet per se. Som ovenfor nævnt vil imidlertid stabiliteten og den gensidige kompatibilitet af de aktive bestanddele i en vis komposition kræve at blive taget i betragtning, og kompositionen skal indrettes derefter.

25 Intravasculære infusioner gennemføres normalt med den parenterale opløsning indeholdt i en infusionsbeholder eller -flaske eller i en elektrisk fungerende infusionssprøjte. Opløsningen kan leveres fra infusionsbeholderen eller -flasken til patienten ved tyngdekraftens hjælp eller ved anvendelse af en infusionspumpe. Anvendelse af ved tyngdekraftens hjælp fungerende
30 infusionssystemer giver ikke tilstrækkelig kontrol med tilførselshastigheden for den parenterale opløsning, og anvendelse af en infusionspumpe foretrækkes derfor
35 navnlig til opløsninger indeholdende relativt høje koncentrationer af aktive bestanddele. Særligt foretrukket er imidlertid anvendelse af en elektrisk fungerende infusionssprøjte, der giver bedre kontrol med anvendelseshastigheden.

Blandingen ifølge opfindelsen kan anvendes ved en fremgangsmåde til fjernelse eller inhibering af dannelsen af en blodprop i pattedyr, hvilken fremgangsmåde indebærer anvendelse til pattedyret af en 5 effektiv mængde af t-PA og et prostaglandin, som ovenfor defineret. Ifølge et alternativ tilvejebringer den foreliggende opfindelse en kombination af t-PA og et prostaglandin, som ovenfor defineret, til anvendelse inden for human og veterinær medicin, navnlig til 10 anvendelse ved fjernelse eller inhibering af dannelsen af en blodprop i et pattedyr.

Ved anvendelse af t-PA og et prostaglandin som ovenfor nævnt: kan de aktive bestanddele anvendes samtidigt eller i rækkefølge som separate blandinger 15 eller som en enkelt kombineret blanding. Hvis der benyttes sekventiel anvendelse, skal pausen før anvendelse af den anden af de aktive bestanddele ikke være så stor, at fordelene ved en synergistisk thrombolytisk eller anti-thrombotisk effekt hos kombinationen af de aktive 20 bestanddele går tabt.

En effektiv mængde af t-PA og et prostaglandin i henseende til at fjerne eller inhibere dannelsen af en blodprop i et pattedyr vil afhænge af en række faktorer omfattende for eksempel pattedyrets alder og 25 vægt, den præcise tilstand, der kræver behandling, og tilstandens alvor, anvendelsesvejen, den særlige form af t-PA og prostaglandin, der anvendes, og deres styrke, og anvendelsesmængden vil blive fastlagt af lægen eller dyrlægen. Det er imidlertid sandsynlig, at en effektiv 30 mængde, i tilfælde af t-PA, vil ligge fra 14.000 til 400.000 IU pr. kg pr. time, og i tilfælde af prostaglandin vil ligge fra 30 til 30.000 ng pr. kg. pr. time. For eksempel vil i tilfælde af prostacyclin en effektiv mængde sandsynligvis ligge fra 120 til 960 ng 35 pr.kg.pr.time. Til et voksent menneske på 70 kg vil en effektiv mængde pr. time således i almindelighed, i tilfælde af t-PA, ligge fra 1.000.000 til 25.000.000 IU og, i tilfælde af prostaglandinet, ligge fra 2100 til 2.100.000 ng.

Opfindelsen beskrives nærmere gennem følgende eksempler.

EKSEMPEL 1

5:

Den thrombolytiske effektivitet af t-PA, prostaglandin og en kombination deraf blev vurderet på en in vivo-model af jugularvene-thrombosis.

Metodik

- 10 Anæstesi blev induceret i en kanin ved en intravenøs injektion af natriumpentobarbiton (30 mg/kg). Et konstant anæstesiniveau blev under forsøgets varighed opretholdt ved intravenøs infusion, som behøvet, af en fortyndet natriumpentobarbitonopløsning (1 mg/ml).
- 15 Et 10 cm ventralt midtlinie-indsnit i den cervicale region blev foretaget for at blotlægge trachea og den venstre eksterne jugularvene. Et trachealrør blev indført, og dyret blev ventileret kunstigt (40 bpm, 18 ml lungevolumen) med en gnaver-respirator for at opretholde
- 20 konstant respiration. Femoralvenen og -arterien blev isoleret og kanyleret.

- Kauterisation anvendtes til at isolere et segment af den eksterne jugularvene 2 cm i retning af hovedet fra forgreningen af facialvenen og 4 cm i nedad-
- 25 gående retning (omtrentlige afstande). Alle venøse bistrømme blev ligeret eller kauteriseret på langs ad den blotlagte vene. Facialvenen blev kanyleret med PE₅₀-rør. Den blodlagte jugularvene blev forsynet med klemmer distalt og proximalt til bifurkationen for at isolere en sektion. En suturtråd
- 30 (2-0 bpc, Davis og Geck, Gosport, England) blev indført longitudinalt i lumen af det isolerede segment ved anvendelse af en rund suturnål (gauge 4, Ethicon Ltd., Edinburgh, Skotland). Blodstrømning blev derefter genetableret. Da blødning ophørte fra nålepunkturne,
- 35 blev jugularvenesegmentet re-isoleret og tømt for alt blod via facialvenekanylen. Thrombus'en blev derefter dannet ved følgende metode. Humant thrombin (500 enheder/ml, 10 µl) blev indført i venesegmentet. Et volumen blod ækvivalent med den isolerede segmentka-

pacitet blev udtaget fra femoralarterien og sat til et 12x75 mm testrør indeholdende 10 μ l (-1.900.000 dpm) af ^{125}I -mærket humant fibrinogen (Amersham International p.l.c., England). Blodet blev aspireret ind i en 1 ml sprøjte med henblik på efterfølgende injektion gennem

5 facialvenekateteret ind i det isolerede venesegment. Ethvert tilbageværende blod i facialvenekateteret blev skyllet ned med saltopløsning. Okkluderende størkninger dannedes hurtigt og fik lov at ældes i 30 minutter. På dette tidspunkt blev blodstrømmen genetableret gennem

10 venesegmentet ved fjernelse af klemmerne. Thyroidal optagning af radioiodid blev blokeret med en 1 ml intra-venøs injektion af en 2% (vægt/vol.) natriumiodid (Mallinkrodt, Paris, KY)-opløsning forud for thrombusdannelse.

15 t-PA'et vandtes fra en dyrket transficeret CHO-celleline, der var afledt ved anvendelse af metoden ifølge Molecular and Cellular Biology 1985, 5(7), 1750-1759, rensat og oparbejdet som en vandig saltopløsning ved pH 3, som beskrevet i britisk patentpublikation GB-A-2176703. Denne opløsning blev infuseret

20 (24 ml) via en femoralvene i løbet af en 2 timers periode, der fulgte efter en "loading bolus" i en dosis på 1 ml i løbet af det første minut.

Prostacyclin blev fremstillet som natriumsaltet

25 ved anvendelse af metoden fra britisk patentskrift nr. 1.583.961, opløst i 1M Tris-puffer (pH 9,6 ved 4°C) og fortyndet med isotonisk natriumbicarbonatopløsning (1,25% vægt/vol., pH 8,6, 4°C). Denne opløsning, der er beskrevet i europæisk patentpublikation EP-A-5 768, blev

30 infuseret intravenøst, enten via femoralvenen eller lokalt i ørevenen, over 2 timers perioden.

Resultater

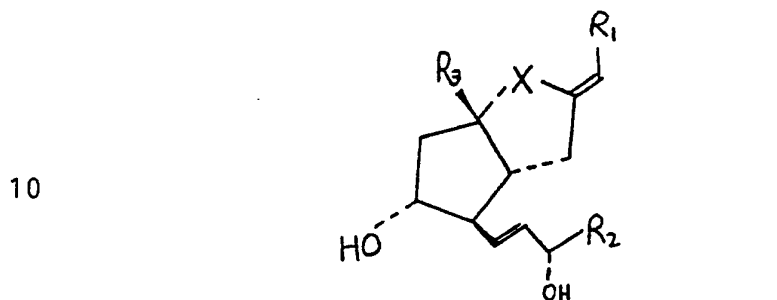
Intravenøs infusion af t-PA forårsagede en dosis-relateret thrombolyse i denne model. Intravenøs

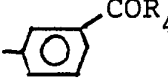
35 infusion af prostacyclin (0,1-0,4 $\mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$) inducerede ikke, hverken systemisk eller lokalt, en signifikant grad af thrombolyse. Imidlertid potenserede

lokal intravenøs infusion af prostacyclin ($0,4 \mu\text{g kg}^{-1} \text{min}^{-1}$) signifikant ($p < 0,001$) den thrombolytiske virkning af en submaksimal dosis af t-PA ($5 \times 10^5 \text{ IU kg}^{-1}$). Ligeledes medførte systemisk intravenøs infusion af prostacyclin $0,1-4,0 \mu\text{g kg}^{-1} \text{min}^{-1}$ en dosis-relateret stigning i thrombolyse induceret af t-PA ($5 \times 10^5 \text{ IU kg}^{-1}$), idet den højeste dosis af prostacyclin inducerede signifikant ($p < 0,01$) potensering af denne respons. Resultaterne er vist billedligt i Fig. 3

P A T E N T K R A V

Synergistisk farmaceutisk blanding, k e n d e -
 t e g n e t ved, at den udgøres af t-PA (vævsplasmino-
 genaktivator) og et prostaglandin, der er PGE₁,
 eller et farmaceutisk acceptabelt salt deraf, eller
 5 en forbindelse med formlen I:



hvor R_1 er $-(CH_2)_3COR_4$ eller , hvor R_4 er
 15 hydroxy, (C_1-C_4) alkoxy, amino, (C_1-C_4) alkylamino eller
 $di(C_1-C_4)$ alkylamino, R_2 er n-pentyl, cyclopentyl,
 cyclohexyl eller 1-methyl-3-pentynyl, R_3 er hydrogen
 eller methyl, og X er oxygen eller methylen, eller et
 farmaceutisk acceptabelt salt deraf.

20 2. Blanding ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t
 ved, at t-PA'et er i én-kæde-formen.

3. Blanding ifølge krav 1, k e n d e t e g -
 n e t ved, at t-PA'et er i tokæde-formen.

4. Blanding ifølge et hvilket som helst af
 25 kravene 1-3, k e n d e t e g n e t ved, at t-PA'et
 har den i Fig. 1 viste aminosyresekvens eller har samme
 aminosyresekvens, men hvor aminosyren i position 245
 fra serin-N-terminus'en er valin i stedet for methionin,
 hvorhos hver sekvens eventuelt er uden en hvilken som
 30 helst af de første tre aminosyrer eller eventuelt har
 en yderligere N-terminal polypeptid-præsekvens af
 Gly-Ala-Arg.

5. Blanding ifølge et hvilket som helst af
 kravene 1-4, k e n d e t e g n e t ved, at prosta-
 35 glandinet er PGE₁, eller et farmaceutisk acceptabelt
 salt deraf, eller en forbindelse med formlen I, hvor
 R_4 er hydroxy, eller et farmaceutisk acceptabelt salt
 deraf.

6. Blanding ifølge krav 5, k e n d e t e g -
n e t ved, at prostaglandinet er prostacyclin, eller
et farmaceutisk acceptabelt salt deraf.

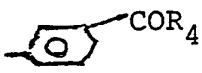
7. Blanding ifølge krav 5, k e n d e t e g -
n e t ved, at prostaglandinet er carbacyclin, eller
5 et farmaceutisk acceptabelt salt deraf.

8. Blanding ifølge krav 5, k e n d e t e g -
n e t ved, at prostaglandinet er 9- β -methylcarbacyclin,
eller et farmaceutisk acceptabelt salt deraf.

9. Blanding ifølge krav 5, k e n d e t e g -
10 n e t ved, at prostaglandinet er iloprost, eller et
farmaceutisk acceptabelt salt deraf.

10. Blanding ifølge krav 5, k e n d e t e g -
n e t ved, at prostaglandinet er en forbindelse med
formlen I, eller et farmaceutisk acceptabelt salt deraf,
15 hvor R_1 er $-(CH_2)_3COR_4$, hvor R_4 er hydroxy, R_2 er cyclo-
lopentyl, R_3 er hydrogen, og X er methylen.

11. Blanding ifølge krav 5, k e n d e t e g -
n e t ved, at prostaglandinet er en forbindelse med
formlen I, eller et farmaceutisk acceptabelt salt deraf,

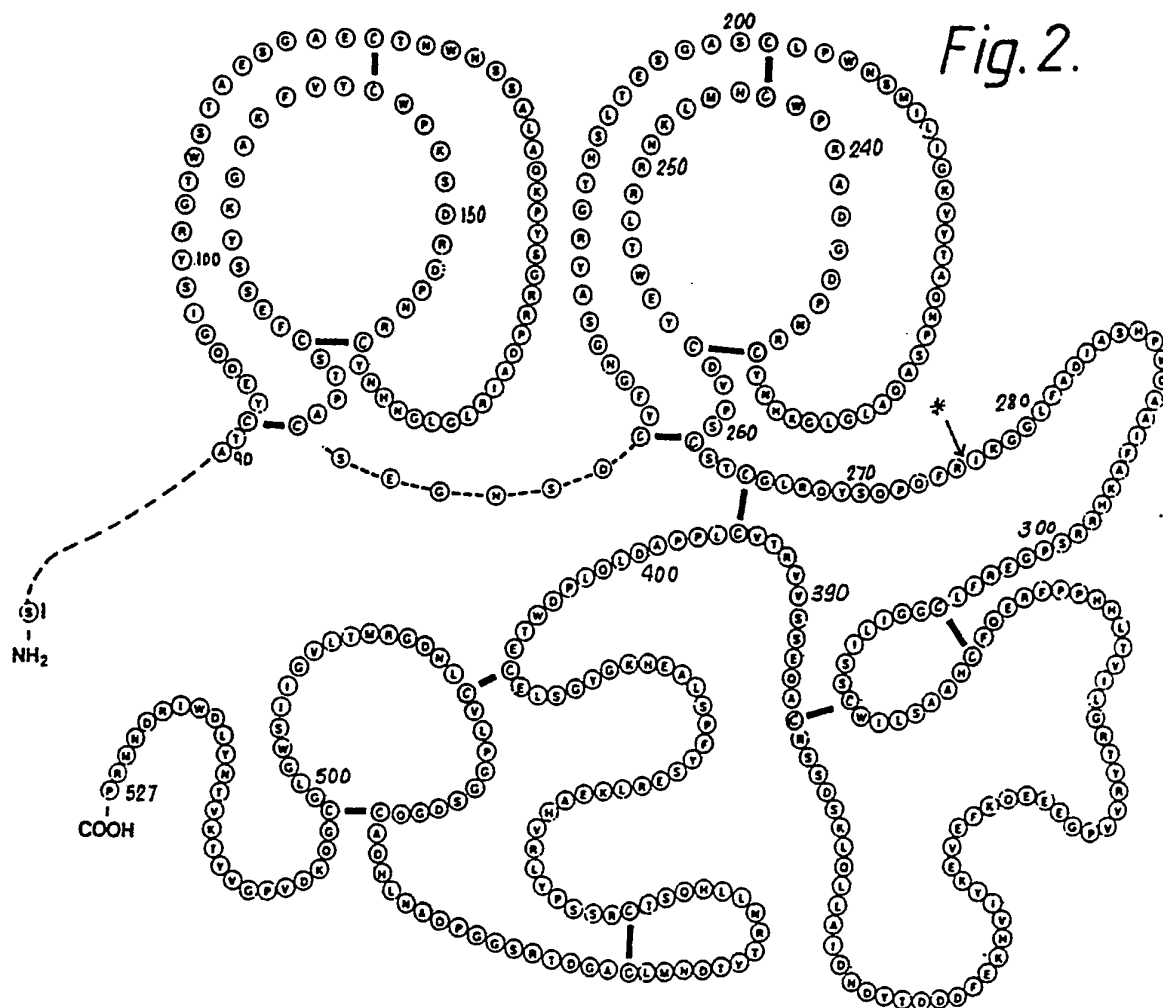
20 hvor R_1 er , hvor R_4 er hydroxy, R_2 er cyclo-
hyxyl, R_3 er hydrogen, og X er methylen.

12. Farmaceutisk præparat , k e n d e t e g -
n e t ved, at den indeholder en blanding . ifølge et
25 hvilket som helst af kravene 1-11 og en farmaceutisk
acceptabel bærer.

13. Anvendelse af en blanding . ifølge et hvil-
ket som helst af kravene 1-11 ved fremstilling af et
lægemiddel til fjernelse eller inhibering af dannelsen
30 af en blodprop i et pattedyr.

Fig. 1.

Ser Tyr Gln Val Ile Cys Arg Asp Glu Lys Thr Gln Met Ile Tyr Gln Gln His Gln Ser
 1
 Trp Leu Arg Pro Val Leu Arg Ser Asn Arg Val Glu Tyr Cys Trp Cys Asn Ser Gly
 Arg Ala Gln Cys His Ser Val Pro Val Lys Ser Cys Ser Glu Pro Arg Cys Phe Asn
 50
 Gly Gly Thr Cys Gln Gln Ala Leu Tyr Phe Ser Asp Phe Val Cys Gln Cys Pro Glu
 Gly Phe Ala Gly Lys Cys Cys Glu Ile Asp Thr Arg Ala Thr Cys Tyr Glu Asp Gln
 Gly Ile Ser Tyr Arg Gly Thr Trp Ser Thr Ala Glu Ser Gly Ala Glu Cys Thr Asn Trp
 100
 Asn Ser Ser Ala Leu Ala Gln Lys Pro Tyr Ser Gly Arg Arg Pro Asp Ala Ile Arg
 Leu Gly Leu Gly Asn His Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Asp Ser Lys Pro Trp
 150
 Cys Tyr Val Phe Lys Ala Gly Lys Tyr Ser Ser Glu Phe Cys Ser Thr Pro Ala Cys
 Ser Glu Gly Asn Ser Asp Cys Tyr Phe Gly Asn Gly Ser Ala Tyr Arg Gly Thr His
 Ser Leu Thr Glu Ser Gly Ala Ser Cys Leu Pro Trp Asn Ser Met Ile Leu Ile Gly Lys
 200
 Val Tyr Thr Ala Gln Asn Pro Ser Ala Gln Ala Leu Gly Leu Gly Lys His Asn Tyr
 Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Ala Lys Pro Trp Cys His Met Leu Lys Asn Arg Arg
 250
 Leu Thr Trp Glu Tyr Cys Asp Val Pro Ser Cys Ser Thr Cys Gly Leu Arg Gln Tyr
 Ser Gln Pro Gln Phe Arg Ile Lys Gly Gly Leu Phe Ala Asp Ile Ala Ser His Pro Trp
 Gln Ala Ala Ile Phe Ala Lys His Arg Arg Ser Pro Gly Glu Arg Phe Leu Cys Gly
 300
 Gly Ile Leu Ile Ser Ser Cys Trp Ile Leu Ser Ala Ala His Cys Phe Gln Glu Arg Phe
 Pro Pro His His Leu Thr Val Ile Leu Gly Arg Thr Tyr Arg Val Val Pro Gly Glu Glu
 Glu Gln Lys Phe Glu Val Glu Lys Tyr Ile Val His Lys Glu Phe Asp Asp Asp Thr
 350
 Tyr Asp Asn Asp Ile Ala Leu Leu Gln Leu Lys Ser Asp Ser Ser Arg Cys Ala Gln
 Glu Ser Ser Val Val Arg Thr Val Cys Leu Pro Pro Ala Asp Leu Gln Leu Pro Asp
 400
 Trp Thr Glu Cys Glu Leu Ser Gly Tyr Gly Lys His Glu Ala Leu Ser Pro Phe Tyr
 Ser Glu Arg Leu Lys Glu Ala His Val Arg Leu Tyr Pro Ser Ser Arg Cys Thr Ser
 Gln His Leu Leu Asn Arg Thr Val Thr Asp Asn Met Leu Cys Ala Gly Asp Thr Arg
 450
 Ser Gly Gly Pro Gln Ala Asn Leu His Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
 Leu Val Cys Leu Asn Asp Gly Arg Met Thr Leu Val Gly Ile Ile Ser Trp Gly Leu
 500
 Gly Cys Gly Gln Lys Asp Val Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val Thr Asn Tyr Leu Asp
 Trp Ile Arg Asp Asn Met Arg Pro



- * Kløvningssted i énkæde-t-PA til dannelse af tokæde-t-PA, hvori A-kæden indeholder de to kringleregioner, og B-kæden indeholder serinproteaseregionen.

Fig. 3.

