

(19)



REPUBLIK
ÖSTERREICH
Patentamt

(10) Nummer: **AT 407 704 B**

(12)

PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 1193/94
(22) Anmeldetag: 15.06.1994
(42) Beginn der Patentdauer: 15.10.2000
(45) Ausgabetag: 25.05.2001

(51) Int. Cl.⁷: **A61K 38/36**

(30) Priorität:
18.06.1993 DE 4320294 beansprucht.
(56) Entgegenhaltungen:
EP 0191606A2 EP 0443875A2 JP 1-1006219A

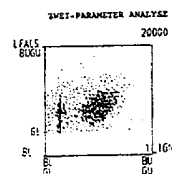
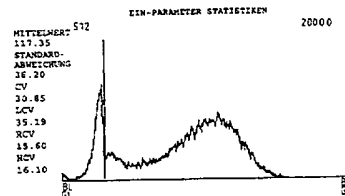
(73) Patentinhaber:
IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT
A-1221 WIEN (AT).
(72) Erfinder:
EIBL JOHANN DR.
WIEN (AT).
SCHWARZ HANS-PETER
WIEN (AT).
LOZANO-MOLERO MIGUEL DDR.
BARCELONA (ES).

(54) VERWENDUNG VON HUMANEM PROTEIN C ZUR VERHINDERUNG UND BEHANDLUNG VON THROMBOZYTENABLAGERUNGEN

AT 407 704 B

(57) Es wird die Verwendung von humanem Protein C zur Verhinderung und Behandlung der Ablagerung bzw. Aggregation von Thrombozyten, Thrombozytenmikropartikeln und Leukozyten beschrieben. Außerdem wird ein verbessertes Verfahren zur extrakorporalen Behandlung von Körperflüssigkeiten offenbart.

Fig.1



Die Erfindung betrifft einen neuen Anwendungsbereich von humanem Protein C bzw. eine pharmazeutische Präparation zur Behandlung von thromboembolischen Krankheitszuständen.

Protein C ist ein Vitamin K-abhängiges Protein, das in der Leber synthetisiert wird und in einer Konzentration von 4 mg/l als inaktives Zymogen zirkuliert. Es wird an der Gefäßwandoberfläche (Endothel) durch den Thrombin-Thrombomodulinkomplex in die aktive Serinprotease (aktiviertes Protein C) übergeführt. Es ist bekannt, daß aktiviertes Protein C profibrinolytische Eigenschaften hat. Es wirkt auch antikoagulatorisch, weil es den Faktor Va, den Kofaktor für die Faktor Xa-induzierte Prothrombinaktivierung (Thrombinbildung) und den Faktor VIIIa, den Kofaktor für die Faktor IXa-induzierte Faktor X-Aktivierung, durch Proteolyse abbaut.

Die Aktivierung von Protein C in vivo stellt eine negative Feedback-Reaktion der Thrombogene-
nerierung dar. Um optimale biologische Aktivität zu entfalten, ist ein Kofaktor (Protein S) notwen-
dig.

In der europäischen Patentanmeldung EP 0 406 216 ist eine pharmazeutische Präparation be-
schrieben, die Protein S gegebenenfalls in Kombination mit aktiviertem Protein C enthält und zur
Behandlung bzw. Verhinderung von Thrombosen und thromboembolischen Komplikationen einge-
setzt werden kann.

Gemäß der EP 0 519 900 ist die Verwendung eines Protein C-hältigen pharmazeutischen Prä-
parates gemeinsam mit einer thrombolytisch wirkenden Substanz zur Behandlung von Thrombo-
sen und zur Verhinderung der Reocclusion möglich. Es wurde gefunden, daß während der Throm-
bolysetherapie ein Mangel an Protein C auftritt, weshalb die Substitution mit Protein C angebracht
ist.

Die Wirkung des inaktiven Zymogens Protein C unterscheidet sich grundsätzlich von der des
aktiven Enzyms, aktiviertes Protein C.

Aktiviertes Protein C ermöglicht die Verhinderung arterieller Thrombose oder Stenose, vor-
zugsweise in Kombination mit einem thrombolytisch wirksamen Agens (Gewebplasminogenakti-
vator, tPA), siehe dazu EP 0 318 201.

Ebenso ist bekannt, daß in Blutplättchen-angereichertem Plasma (PRP) aktiviertes Protein C
die Plättchenaggregation, welche durch Thrombinaktivierung induziert ist, unterdrückt. Allerdings
führt eine höhere Konzentration an aktiviertem Protein C zu einem gegenteiligen Effekt, nämlich
zur Aggregation der Blutplättchen (E.N.Santander et al., Acta Physiologica Latino-Americana 33
(2), 1983).

Aktivierte bzw. stimulierte Blutplättchen verfügen über den Glykoprotein IIb-IIIa Komplex, der
als Rezeptor für verschiedene Adhäsionsmoleküle fungiert. Zu den Adhäsionsproteinen, die an
GP IIb-IIIa von stimulierten Blutplättchen binden, zählen Fibrinogen, von Willebrand Faktor und
Fibronectin. Es wird vermutet, daß eine Tripeptidsequenz, nämlich Arg-Gly-Asp (RGD), der Adhe-
sionsproteine an den Rezeptor bindet. Zu den Proteinen mit einer RGD-Sequenz zählen auch
humanes Protein C und aktiviertes Protein C. Jedoch ist die Wechselwirkung von Protein C oder
aktiviertem Protein C mit Blutplättchen ungewiß. Es wurde beispielsweise gefunden, daß aktivier-
tes Protein C an nicht stimulierte Blutplättchen in Gegenwart von Protein S bindet, und so die
Inaktivierung von Faktor Va potenziert wird. Protein C bindet jedoch nicht an die Blutplättchen
(J.Biol.Chem., 260 (4), 2007-10, 1985).

Mit Hilfe der "Flow Cytometry" für Thrombozyten können Thrombozytenoberflächen untersucht
werden. Die "Flow Cytometry" erlaubt die schnelle und sensitive Analyse von Rezeptorproteinen
auf einer einzelnen Zelle. Bei den Untersuchungen wird eine Flußrate von 400 - 1000 Thrombozy-
ten pro Sekunde eingesetzt. Die Größe der Thrombozyten wird durch die Lichtstreuung (light scat-
tering) ausgedrückt. Durch den Einsatz von mit Fluorescein-Isothiocyanat gekoppelten Antikörpern
kann die Bindung von Liganden (Adhäsionsproteinen) an einem Thrombozyten gemessen werden
(Beschreibung der Methode in Blood, 86(1), 173-179, 1986).

Die Bindung von Fibrinogen an stimulierten Thrombozyten führt letztlich zur Aggregation bzw.
Ablagerung dieser an verletztem Endothel und damit zum Wundverschluß. Thromboembolische
Komplikationen bzw. Stenosis sind ebenso auf die Bindung von Fibrinogen an stimulierten Throm-
bozyten zurückzuführen. Nach erfolgter Ballonangioplastie kommt es beispielsweise zu einer Ver-
letzung des Endothels und damit zu einer Prädisposition für arterielle Restenose.

Die Erfindung stellt sich zur Aufgabe, den Anwendungsbereich von humanem Protein C zu
erweitern und ein Präparat zur Verfügung zu stellen, das zur Verhinderung und Behandlung von

Ablagerung und/oder Aggregation von Thrombozyten verabreicht werden kann.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß durch eine neue Verwendung von humanem Protein C zur Herstellung einer pharmazeutischen Präparation gelöst, welche zur Verhinderung und Behandlung der Ablagerung bzw. Aggregation von Thrombozyten, Thrombozytenmikropartikeln (dust) und Leukozyten mit prokoagulatorischer Aktivität geeignet ist. Protein C verhindert die Ablagerung an Gefäßoberflächen bzw. Gefäßstenosen, insbesondere an verletztem, virusinfiziertem oder geschädigtem Endothel bzw. an exponiertem Subendothel oder künstlichen Gefäßoberflächen bzw. Gefäßprothesen mit oder ohne Endothel. Es wurde gefunden, daß die Bindung von Fibrinogen an stimulierten Blutplättchen durch den Zusatz von humanem Protein C in dosisabhängiger Weise unterbunden werden kann. PRP wurde durch Zusatz von Adenosindiphosphat (ADP) stimuliert und die Fibrinogenbindung gemessen. Der Zusatz eines Fluorescein-Isothiocyanat gekoppelten Antikörpers gegen Fibrinogen ermöglichte den Nachweis des im PRP befindlichen Fibrinogens, gebunden an Thrombozyten, durch Messung am "Flow Cytometer". Die Verhinderung der Fibrinogenbindung an stimulierten Thrombozyten war umso überraschender, da aktiviertes Protein C keinen Einfluß auf die Fibrinogenbindung hatte. Es ist also wahrscheinlich, daß die RGD-Sequenz in einem Protein nicht allein für die Verhinderung der Fibrinogenbindung verantwortlich gemacht werden kann.

Versuche mit monoklonalen Antikörpern (z.B. PAC-1, ein IgM Antikörper, der nur die aktivierte Form des IIb-IIIa Komplexes erkennt; S.J.Shattil, J.Biol.Chem. 260, 11107, 1985) machten deutlich, daß der durch Aktivierung von Thrombozyten freigemachte GP IIb-IIIa Komplex in Gegenwart von Protein C nicht gebunden wird. Es wird daher eine kompetitive Bindung von Protein C an GP IIb-IIIa vermutet. Anstelle des PAC-1 ist aber auch die Verwendung anderer monoklonaler Antikörper gegen Thrombozytenaktivierung abhängige Epitope möglich, z.B. PADGEM (J.Clin.Invest., 78, 130, 1986), GMP (J.Biol.Chem., 264, 1816, 1989) und 2.28 (Blood 70, 838, 1987). Daher ist die Bindungsstelle von Fibrinogen blockiert. Im Gegensatz zu den anderen Adhäsionsproteinen wird dadurch die Aggregation der Thrombozyten nicht gefördert, sondern verhindert. Versuche mit einer Perfusionskammer zeigten, daß Protein C die Adhäsion von Thrombozyten in einer Kaninchen-aorta, die mit Blut gespült wird, verhindert. Das Endothel wird also in Gegenwart von Protein C stabilisiert, wodurch die Adhäsion von stimulierten Thrombozyten unterbunden wird.

Protein C kann als natives Protein, als dessen Derivat oder Mutante mit einer RGD-Sequenz, erfindungsgemäß angewandt werden. Protein C ist in seiner inaktiven Form als Zymogen anwendbar. Dies hat den Vorteil, daß das Protein nicht aktiviert werden muß, um die Fibrinogenbindung oder von Willebrand Faktor-Bindung an stimulierte Blutplättchen zu unterbinden. Daher kann Protein C auch in bestimmten Krankheitszuständen wie Homocysteinurie, Diabetes oder Urämie, in denen die endogene Aktivierung von Protein C gehemmt ist, erfindungsgemäß angewandt werden. Das Zymogen Protein C hat auch nicht den Nachteil des aktivierten Protein C, nämlich daß es in hohen Konzentrationen zu einer Aggregation der Thrombozyten führt.

Die Untersuchungen mit Hilfe der "Flow Cytometry" bestätigen, daß humanes Protein C vor allem zur Verhinderung der arteriellen Restenose geeignet ist. Protein C kann daher erfindungsgemäß bei allen Interventionen der Angioplastie aber auch bei Verwendung eines Katheters angewandt werden, um negative Wechselwirkungen mit stimulierten Thrombozyten untereinander, mit Leukozyten und mit dem Endothel zu unterbinden.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Verhinderung der Ablagerung bzw. Aggregation von Thrombozyten in vitro durch Zusatz einer wirksamen Menge an humanem Protein C.

Aufgrund des gefundenen Wirkungsmechanismus von Protein C ist erfindungsgemäß ein Verfahren zur extrakorporalen Behandlung von Körperflüssigkeiten, wie Blut oder Aszites, möglich, bei dem in einer Zirkulationsvorrichtung die Ablagerung bzw. Aggregation von Thrombozyten verhindert werden soll. Dieses Verfahren findet beispielsweise Anwendung für eine Dialysevorrichtung bzw. eine künstliche Niere.

Durch die folgenden Beispiele wird die Erfindung näher beschrieben.

Fibrinogenbindung an aktiviertem PRP

10 ml Blut wurden abgenommen in Citrat. PRP wurde durch übliche Zentrifugation gewonnen. Die Zugabe von ADP bewirkte die Stimulierung der Thrombozyten. Anschließend wurde ein Fluor-

escein-Isothiocyanat gekoppelter Antikörper gegen Fibrinogen zugesetzt und das Fibrinogen, gebunden an Thrombozyten, durch Messung am "Flow Cytometer" (FACScan®, Becton, Dickinson) bestimmt. Die Fibrinogenbindung wurde durch die "Green Fluorescence Intensity" (one parameter statistics, X-Achse "Log-Green-Fluorescence" (gebundenes Antifibrinogen), Y-Achse "Number of Cells") sowie durch die "light scattering" (two parameter analysis, X-Achse "Log-Green Fluorescence", Y-Achse "Log-Light Scatter" (Größe der Thrombozyten)) bestimmt.

Fig. 1 - 3 zeigen die Intensität der Fluoreszenz, d.h. die Fibrinogenbindung an stimulierten Thrombozyten sowie die Größe der Thrombozyten. Abbildung 1 zeigt die Fibrinogenbindung im PRP nach ADP-Stimulation. Der Einsatz des Agonisten führt zu einer Fibrinogenbindung an der Zelloberfläche, aber auch zu einer Veränderung der Thrombozytengröße. Im Vergleich dazu zeigt Abbildung 2 die Fibrinogenbindung nach ADP-Stimulation in Gegenwart von Protein C in einer Konzentration, die der 4-fachen Plasmakonzentration entspricht. Eine signifikante Reduktion der Fibrinogenbindung ist erkennbar. Im Gegensatz dazu führt aktiviertes Protein C in diesem Testgemisch zu keiner Abnahme der Fibrinogenbindung an Thrombozyten.

Bindung von PAC-1 an aktivierten Thrombozyten

Der monoklonale Antikörper PAC-1 reagiert mit dem Glykoprotein IIb-IIIa Komplex an der Thrombozytenoberfläche nach Aktivierung der Thrombozyten mit ADP.

Die Blutabnahme erfolgte in EDTA/Trasylo. Danach wurde mit Plättchen angereichertes Blutplasma (PRP) und Plasma, in dem Blutplättchen abgereichert wurden (PPP) durch konventionelle Zentrifugation hergestellt. PRP wurde 1:40 in PPP verdünnt. Danach wurde PAC-1 mit ADP und gegebenenfalls Protein C oder aktiviertes Protein C zugesetzt und 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zusatz eines Anti-Maus-Antikörpers (fluorescence conjugated, FITC von Sigma Chemical Co.) und einer weiteren Inkubationszeit von 20 min. wurde die Bindung des PAC-1 an Thrombozyten durch Flow cytometrische Untersuchung detektiert.

Fig. 4

Bindung des PAC-1 an PRP /ADP

Fig. 5

Die PAC-1 Bindung an Thrombozyten ist in Gegenwart von Protein C unterbunden.

Fig. 6

Aktiviertes Protein C führt zu keiner Beeinflussung der PAC-1 Bindung an ADP stimulierten Thrombozyten.

Blutplättchenablagerung am Subendothel im Perfusionsversuch

Venöses Blut wurde antikoaguliert mit Citrat-Phosphat-Dextrose (19 mM). Protein C (Immuno AG) wurde rekonstituiert und zu 20 ml des antikoagulierten Blut vor der Perfusion zugegeben. Perfusionsen wurden bei 37°C in einer Perfusionskammer durchgeführt (Versuchsbeschreibung in Thromb.Haemost., 37, 1-16, 1977). Enzymatisch behandelte Aortastücke von Kaninchen wurden in eine Perfusionskammer eingebracht. Mittels einer Hämodialyse-Blutpumpe (Renal Systems, Minneapolis, Minn., USA) wurde eine angemessene Flußrate eingestellt. Nach 5 Minuten Perfusion wurden die Aortastücke mit Puffer gespült und fixiert (Glutaraldehyd:Formaldehyd= 2%:3% (v/v)). Danach wurden diese in JB4 (Polyscience, Warrington, USA) eingebettet, mit Toluidinblau angefärbt und morphometrisch untersucht. Mit Hilfe eines Computer-Programms (beschrieben in Haemostasis, 16, 8-14, 1986) wurden die Blutplättchen folgendermaßen klassifiziert: Adhäsion (Blutplättchenschicht < 5µm), Thromben (Aggregationen ≥ 5µm), beides ausgedrückt in % der Gesamtlänge des Blutgefäßes. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 angeführt. Bei Konzentrationen von weniger als 16 µg/ml zeigte Protein C im Vergleich zur Kontrolle keine Wirkung auf die Adhäsion der Blutplättchen. Bei Konzentrationen von 16 und 32 µg/ml wurde die bedeckte Fläche signifikant reduziert.

Tabelle 1

Blutplättchenablagerung an Subendothel im Perfusionsversuch mit Citrat-antikoagulierte Blut in Abhängigkeit von der Protein C-Konzentration (n=3, $\bar{x} \pm SD$) (Flußrate = 800 s⁻¹)

	beschichtete Oberfläche	Adhäsion	Thromben
KONTROLLE	18,1 ± 5,3	9,3 ± 4,5	8,8 ± 1,9
Protein C 16 µg/ml	13,1 ± 3,5	4,8 ± 0,9	8,3 ± 2,9
Protein C 32 µg/ml	9,6 ± 5,7	4 ± 2,5	5,6 ± 3,4

PATENTANSPRÜCHE:

1. Verwendung von humanem Protein C zur Herstellung einer pharmazeutischen Präparation zur Verhinderung und Behandlung der Ablagerung bzw. Aggregation von Thrombozyten, Thrombozytenmikropartikeln (dust) und Leukozyten mit prokoagulatorischer Aktivität an Gefäßoberflächen bzw. Gefäßstenosen, insbesondere an verletztem, virusinfiziertem oder geschädigtem Endothel bzw. an exponiertem Subendothel oder künstlichen Gefäßoberflächen bzw. Gefäßprothesen mit oder ohne Endothel.
2. Verwendung nach Anspruch 1, mit der Maßgabe, daß Protein C als natives Protein, als dessen Derivat oder Mutante mit einer R-G-D- Sequenz verwendet wird.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, mit der Maßgabe, daß das Präparat zur Verhinderung der arteriellen Restenose geeignet ist.
4. Verfahren zur Verhinderung der Ablagerung bzw. Aggregation von Thrombozyten in vitro durch Zusatz einer wirksamen Menge an humanem Protein C.
5. Verfahren zur Verhinderung der Ablagerung bzw. Aggregation von Thrombozyten in einer Zirkulationsvorrichtung zur extrakorporalen Behandlung von Körperflüssigkeiten, dadurch gekennzeichnet, daß eine geeignete Konzentration von Protein C der extrakorporal behandelten Körperflüssigkeit zugegeben wird.

HIEZU 6 BLATT ZEICHNUNGEN

Fig.1

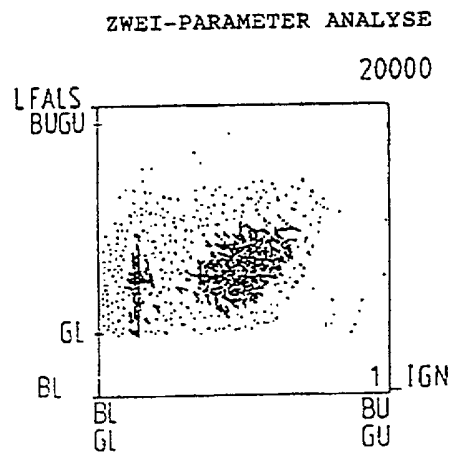
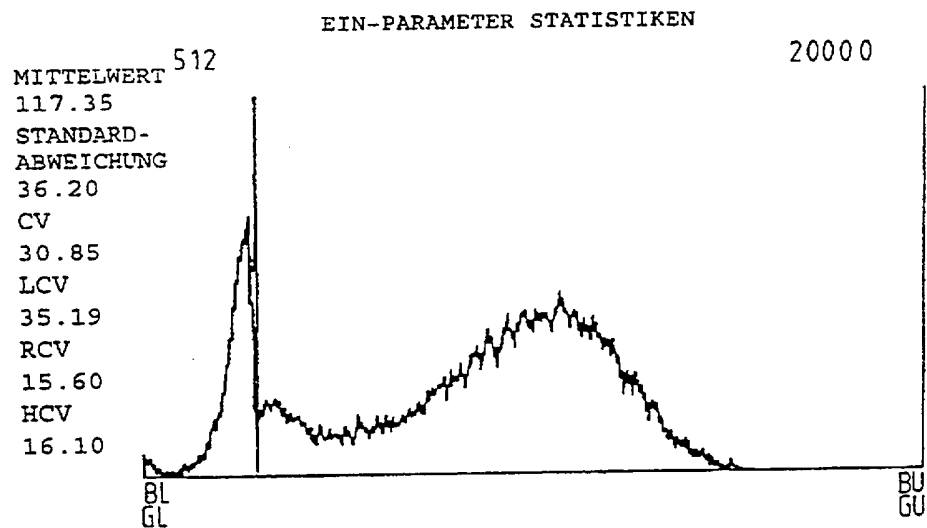


Fig. 2

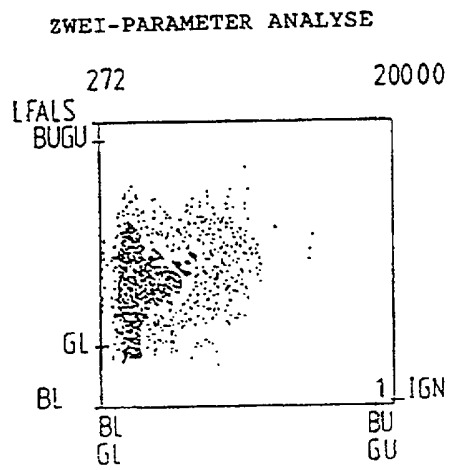
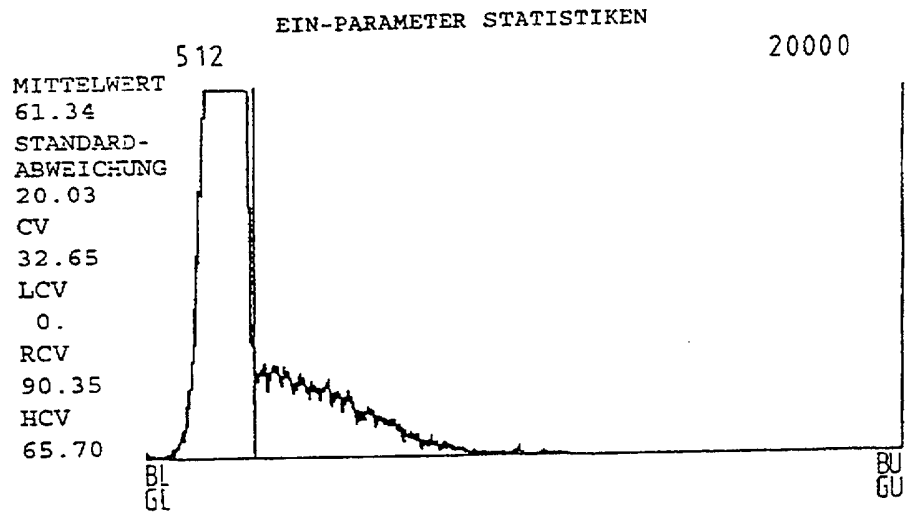


Fig. 3

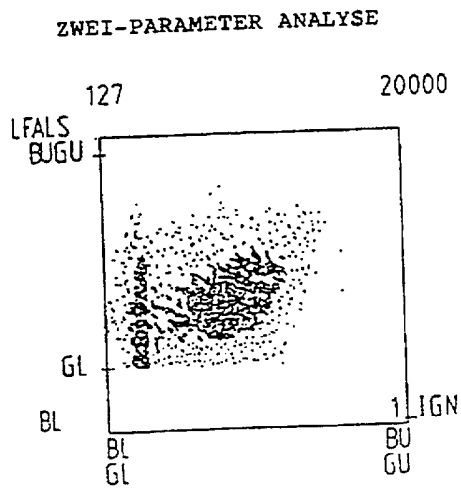
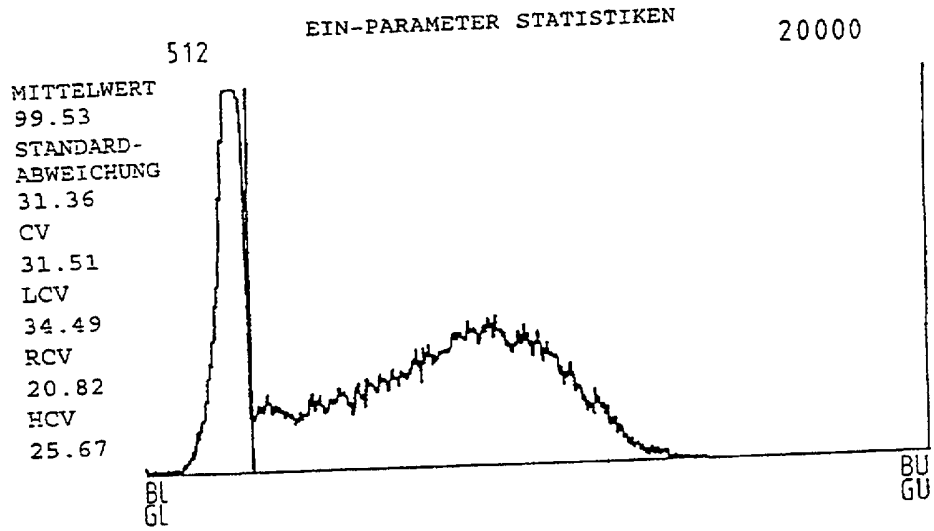


Fig. 4

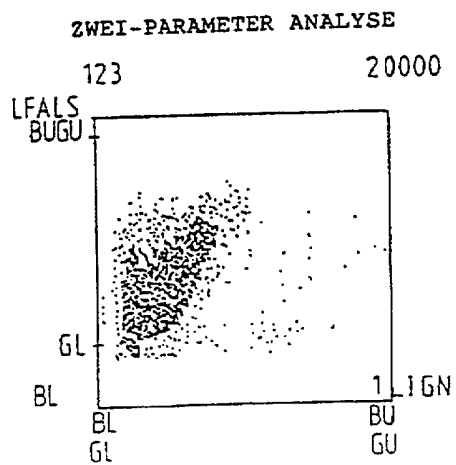
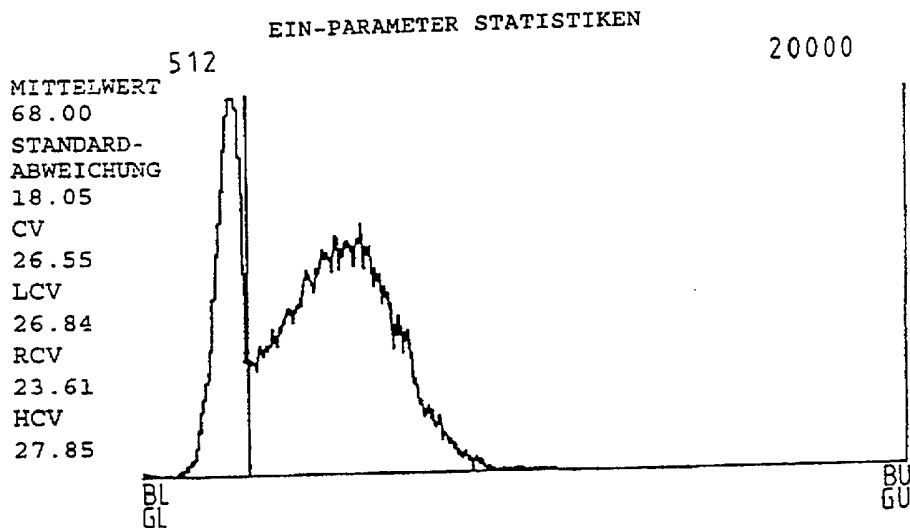


Fig. 5

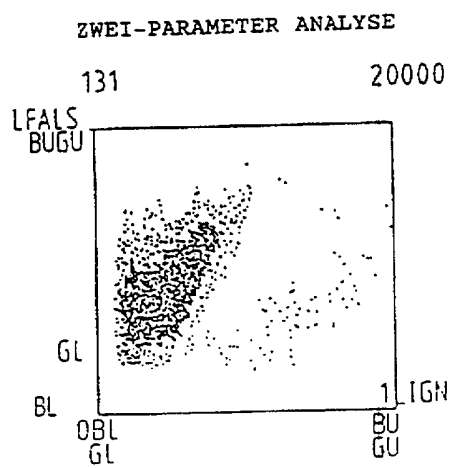
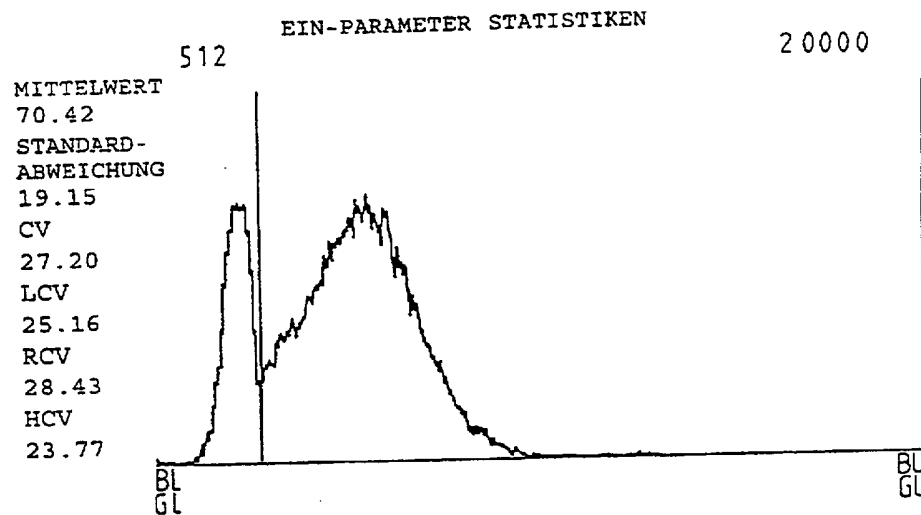


Fig. 6

