

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

A61K 38/48

A61P 7/02

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 99813313.2

[43]公开日 2001 年 12 月 12 日

[11]公开号 CN 1326356A

[22]申请日 1999.11.15 [21]申请号 99813313.2

[30]优先权

[32]1998.11.20 [33]US [31]60/109,153

[86]国际申请 PCT/US99/27074 1999.11.15

[87]国际公布 WO00/30677 英 2000.6.2

[85]进入国家阶段日期 2001.5.15

[71]申请人 伊莱利利公司

地址 美国印第安纳州

[72]发明人 C·J·菲舍尔 殷秀慈

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 钟守期

权利要求书 1 页 说明书 10 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 治疗病毒性出血热的方法

[57]摘要

本发明提供用蛋白质 C 治疗病毒性出血热的方法。要求保的本发明对严重的和令人衰弱的疾病提供需要的治疗,同时避免目前常用的抗凝血药的并发症例如出血倾向、毒性和全身性副作用。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

权 利 要 求 书

1. 治疗患有病毒性出血热的患者的方法，该方法包括给予所述患者药理学上有效量的蛋白质 C。
- 5 2. 权利要求 1 的方法，其中所述蛋白质 C 为人蛋白质 C 酶原。
3. 权利要求 1 的方法，其中所述蛋白质 C 为人活化蛋白质 C。
4. 权利要求 3 的方法，其中所述人活化蛋白质 C 的量约为 $1 \mu\text{g/kg/hr}$ 至约 $96 \mu\text{g/kg/hr}$ 。
5. 权利要求 4 的方法，其中所述人活化蛋白质 C 通过持续输注
- 10 大约 1 至大约 240 小时给予。
6. 在需要此治疗的患者中治疗病毒性出血热的方法，该方法包括给予所述患者药理学上有效量的活化蛋白质 C，以使活化蛋白质 C 的血浆水平达到约 2 ng/ml 至约 300 ng/ml 。
7. 权利要求 6 的方法，其中所述活化蛋白质 C 以大剂量注射给
- 15 予。
8. 权利要求 6 的方法，其中所述活化蛋白质 C 通过持续输注大约 1 至大约 240 小时给予。
9. 权利要求 6 的方法，其中所述活化蛋白质 C 首先作为大剂量注射剂(bolus)给予，然后作为持续输注给予。
- 20 10. 权利要求 9 的方法，其中以大剂量注射形式给予所需活化蛋白质 C 的三分之一，以达到约 2 ng/ml 至约 300 ng/ml 范围内的活化蛋白质 C 血浆水平，随后通过持续输注给予剩余的三分之二的活化蛋白质 C。

说明书

治疗病毒性出血热的方法

5 该申请对 1998 年 11 月 20 日递交的临时申请序号 60/109,153 的优先权提出了权利要求。

本发明涉及医疗科学，特别是涉及用蛋白质 C 治疗病毒性出血热。

10 蛋白质 C 为维生素 K 依赖丝氨酸蛋白酶且为天然来源的抗凝血药，其通过使凝血级联代谢(cascade)中的因子 Va 和 VIIIa 失活而在调节止血中起作用。人蛋白质 C 作为一种 2-链酶原循环，但是通过限制使用与细胞表面膜蛋白凝血调节蛋白复合的凝血酶蛋白水解，在转移为活化蛋白质 C(aPC)后，在内皮素和血小板表面起作用。

15 与其它的蛋白质相结合，aPC 也许是作为导致抗血栓形成的保护的最重要的血液凝血的向下调节剂(down-regulator)发挥作用。除了它的抗凝聚功能以外，aPC 通过它抑制细胞因子(例如 TNF 和 IL-1)的生成而具有抗炎作用，并且也发挥有利于血块溶解的前纤维蛋白溶解性质。因此，蛋白质 C 酶系统代表抗凝血作用、抗炎作用和纤维蛋白溶解作用的主要生理机制。

20 病毒性出血热为一种与显著死亡率有关的临床综合征。毫无例外，出血热病毒为属于四种病毒科的有包膜的 RNA 病毒：沙粒病毒科[胡宁热、Machupo 热、拉塞热]、班亚病毒科[克里米亚-刚果出血热、裂谷热、汉坦及相关病毒]、纤丝病毒科[埃博拉、马伯格]和黄病毒科[登革热、黄热病、鄂木斯克出血热、夸塞纳森林病]。[Cosgriff, 25 T. M., Reviews of Infectious Diseases 11(4): S672-S688, 1989]。这些物质引起广泛的严重疾病，但是最极端的临床表现包括循环不稳定、增加的血管通透性和弥散性出血[Lacy, 等. Advances in Pediatric Infectious Diseases 12:21-53, 1997]。

在出血热中出血的基础机制是复杂的。可能的因素包括只有血小板减少，或与弥散性血管内凝血有关的血小板减少(DIC)。所述机制的主要方面可为内皮细胞功能障碍，该机制对血小板与凝血两者具有密切的联系。另一个可能的因素是由于增加的消耗或受损的合成的结果显示在血浆中的凝血因子水平降低。增加的消耗在 DIC 中发生，而受损的合成可能是肝损伤的结果。在病毒性出血热中，肝受累的情况普遍发生。例如，在黄热病、克里米亚-刚果出血热和裂谷热中，出血与严重肝功能障碍的短暂关联就是明显的。

病毒以两种一般方式改变出血。第一种是通过对细胞功能直接作用，第二种是通过免疫和炎症途径的活化。两种机制可导致不同程度的细胞损伤，包括细胞死亡。凝血途径的活化是免疫和炎症反应的重要部分并且解释了有时在这些反应中观察到的纤维蛋白沉积作用的原因。

血小板减少在病毒性出血热中普遍发生。例如，在登革出血热中，提示血小板减少和血小板消耗增加这两种变化已被测定。这也是伴有由汉坦及相关病毒引起的肾综合征(HFRS)的出血热中的情况。对在病毒感染中增加的血小板破坏的其它的机制包括血小板与病毒的直接相互作用、DIC、和内皮损伤。

在埃博拉和马伯格出血热中，在大多数器官中发现一般性出血。尤其是在肺、肝、肾和淋巴器官中，也可广泛观察到没有显著炎症的局灶性坏死。DIC 是常见的。

目前，尚未有治疗病毒性出血热的有效疗法。在缺乏病毒特异性化学治疗方法的情况下，控制是主要的支持疗法。因此，存在安全的、有效治疗患有病毒性出血热患者的方法的需求。

本发明首先描述用蛋白质 C 治疗病毒性出血热。具有抗凝血、抗炎和纤维蛋白溶解活性的蛋白质 C 对治疗在病毒性出血热患者中发生的血凝过快状态或蛋白质 C 缺乏是有用的。

本发明提供治疗患有病毒性出血热的患者的方法，方法包括给

予所述患者药理学上有效量的蛋白质 C。

本发明另外提供在需要此治疗的患者中治疗病毒性出血热的方法，方法包括给予所述患者药理学上有效量的活化蛋白质 C 以便得到大约 2 ng/ml 至大约 300 ng/ml 的活化蛋白质 C 血浆水平。

5 对本发明的目的，如在此公开和权利要求的那样，以下术语定义如下。

蛋白质 C 指具有抗凝血、抗炎和纤维蛋白溶解性质的维生素 K 依赖丝氨酸蛋白酶，其包括(但不局限于)血浆衍生的和重组生成的蛋白质 C。蛋白质 C 包括并优选为人蛋白质 C，尽管蛋白质 C 也可包
10 括其它的种类或具有蛋白质 C 的蛋白水解、酰胺水解、酯水解和生物(抗凝血、纤维蛋白原溶解性质和抗炎)活性的衍生物。Gerlitz, 等, U. S. 专利 5,453,373 号和 Foster 等, U. S. 专利 5,516,650 号描述蛋白质 C 衍生物的实例，其全部描述通过引用结合到本文中。

15 酶原-蛋白水解酶的酶无活性的前体。如在此使用的那样，蛋白质 C 的酶原指的是分泌的，无活性的形式，无论蛋白质 C 的一个链或两个链。

活化蛋白质 C 或 aPC 指的是已通过限制性蛋白水解转化为其活化形式的蛋白质 C 酶原。aPC 包括且优选为人蛋白质 C，尽管 aPC 也可包括其它的种类或具有蛋白质 C 的蛋白水解、酰胺水解、酯水
20 解和生物(抗凝血或纤维蛋白原溶解性质)活性的衍生物。在以上蛋白质 C 的描述中，提及蛋白质 C 衍生物的实例。

HPC-人蛋白质 C 酶原。

r-hPC-重组人蛋白质 C 酶原。

25 r-aPC-通过使 r-hPC 体外活化或从原核细胞、真核细胞、和转基因动物或植物中直接分泌的活化形式的蛋白质 C 而产生的重组人活化蛋白质 C，包括，例如作为酶原从人肾 293 细胞中分泌，然后经技术人员熟知的且在 Yan, U. S. 专利 4,981,952 号和 Cottingham, WO 97/20043 中公开的技术纯化或活化，其全部内容通过引用结合到本

文中。

血浆衍化的活化蛋白质 C-如在 Eibl, U. S. 专利 5,478,558 号中描述的那样, 经活化血浆 HPC 产生的活化蛋白质 C, 其全部内容通过引用结合到本文中。

5 持续输注-在特定时间内, 持续基本不间断地把溶液导入静脉中。

大剂量注射-在长达 120 分钟的时间内注射确定量(称作大剂量)的药物。

适宜用于给药-适宜作为治疗药物所给予的冻干制剂或溶液剂。

10 剂型-指的是适宜作为用于人体的单位剂量的生理分散单位, 每单位含有预定量的、经计算产生所需治疗作用的活性物质和适宜的药用赋形剂。

药有效量-表示能够抑制人脓毒症的本发明化合物的量。当然, 通过评价围绕该病例的具体环境, 主治医师将确定给予本发明化合物的具体剂量。

15 病毒性出血热-指的是由属于以下四种病毒科的有包膜的 RNA 病毒引起的出血热, 包括: 沙粒病毒科[胡宁热、Machupo 热、拉塞热]、班亚病毒科[克里米亚-刚果出血热、裂谷热、汉坦及相关病毒]、纤丝病毒科[埃博拉、马伯格]和黄病毒科[登革热、黄热病、鄂木斯克出血热、夸塞纳森林病]。这些物质引起广泛的严重疾病, 但是最极端的临床表现, 包括循环不稳定、增加的血管通透性和弥散性出血。

20 本发明提供用蛋白质 C 治疗病毒性出血热。具有抗凝血、抗炎和纤维蛋白溶解活性的蛋白质 C 在治疗中发生血凝过快状态和/或蛋白质 C 缺乏的病毒性出血热患者是有用的。

25 通过本领域已知的任何方法或者如在 U. S. 专利 4,981,952 号和 U. S. 专利 5,550,036 号中描述的那样, 可生成和/或分离本发明给予的蛋白质 C, 其通过引用结合到本文中。例如, 通过分泌全长的、可溶性蛋白质 C 或来自细胞的蛋白质 C 的生物活化多肽变体形式, 能够生成蛋白质 C, 它包括(a)构建包含 DNA 编码蛋白质 C 的载体; (b)用

载体转染细胞；和(c)在分泌全长的可溶性蛋白质 C 或蛋白质 C 的生物活化多肽变体形式的条件下，于培养基中培养这样转染的细胞。

另外，所述细胞为原核细胞，例如哺乳动物细胞如金黄仓鼠 AV12 细胞、人胚胎 293 细胞或幼仓鼠肾细胞。

- 5 按照已知方法，可配制用于治疗病毒性出血热的蛋白质 C 以制备药学上有用的组合物。例如，要求的制剂应为包含填充剂如蔗糖、盐如氯化钠、缓冲剂如枸橼酸钠和蛋白质 C 或 aPC 的，稳定高纯度产物的冷冻干燥制剂。

- 10 通过持续输注大约 1 小时至大约 240 小时注射适宜剂量，非肠道给予蛋白质 C 以确保它以有效形式传递进入血流。

- 如通过优良医学实践和个体患者的临床疾病所确定的那样，本领域技术人员能够易于优化用于包含蛋白质 C 的治疗组合物的药
15 学上有效剂量和给药方案。所给予蛋白质 C 的量一般为大约 5.0 μ g/kg/hr 至大约 250 μ g/kg/hr。用于治疗病毒性出血热的蛋白质 C 优选为活化蛋白质 C(aPC)。所给予 aPC 的量为大约 1.0 μ g/kg/hr 至大约 96 μ g/kg/hr。所给予 aPC 的量更优选为大约 1.0 μ g/kg/hr 至大约 50 μ g/kg/hr。而所给予 aPC 的量更优选为大约 1.0 μ g/kg/hr 至大约 35 μ g/kg/hr。所给予 aPC 的量甚至更优选为大约 5.0 μ g/kg/hr 至大约 30 μ g/kg/hr。所给予 aPC 的量还甚至更优选为大约 15 μ g/kg/hr
20 至大约 30 μ g/kg/hr。所给予 aPC 的量还甚至更优选为大约 20 μ g/kg/hr 至大约 30 μ g/kg/hr。所给予 aPC 的优选的量为大约 24 μ g/kg/hr。所给予 aPC 的最优选的量为大约 48 μ g/kg/hr。所给予 aPC 的适宜的剂量将导致减轻与病毒性出血热有关的血栓形成并发症。

- 从所给予 aPC 的量得到的血浆范围为大约 2 ng/ml 至大约 300
25 ng/ml。优选血浆范围为大约 2 ng/ml 至大约 200 ng/ml。血浆范围最优选为大约 30 ng/ml 至大约 150 ng/ml 且仍然更优选为大约 100 ng/ml。

 或者，通过作为大剂量注射剂每小时注射适宜剂量的三分之一，

随后作为持续输注每小时剂量的剩余的三分之二达 1 小时，随后持续输注适宜剂量 23 小时，这导致给予适当的剂量超过 24 小时来给予 aPC。另外，借助静脉袋滴注泵或注射泵，在 2 倍正常速度下给药 15 分钟，随后在 1.5 倍正常速度下给药 45 分钟来给予大剂量注射。
5 然后以正常速度，即每时间区段内给予适当剂量水平的治疗药物来确定的速度，持续达 240 小时。

使用本发明中提出的治疗病毒性出血热的蛋白质 C 将提供治疗严重的和令人衰弱的疾病所必需的疗法。使用蛋白质 C 是有效的并且可避免并发症例如出血倾向、毒性和目前使用的抗凝血药的其它的常见副作用。
10

提供以下实施例主要是进一步阐明本发明。本发明的范围并不仅仅由以下实施例构成。

制备 1

人蛋白质 C 的制备

15

通过技术人员熟知的技术例如在 Yan, U. S. 专利 4,981,952 号中阐明的那些技术，在人肾 293 细胞中制备重组人活化蛋白质 C(r-hPC)，其全部内容通过引用结合到本文中。在 Bang 等的 U. S. 专利 4,775,624 号中公开并对基因编码的人蛋白质提出了权利要求 C，其全部内容通过引用结合到本文中。用于在 293 细胞中表达人蛋白质 C 的质粒为其在 Bang 等, U. S. 专利 4,992,373 号中公开的质粒 pLPC，其全部内容通过引用结合到本文中。在欧洲专利申请 0 445 939 号中和在 Grinnell 等, 1987, Bio/Technology 5:1189-1192 中，也描述有质粒 pLPC 的构建，其内容也通过引用结合到本文中。简言之，在 293 细胞中
20 转染所述质粒，然后在无血清培养基中鉴定稳定的转化突变型，传代培养并生长。发酵后，经微量过滤，得到无细胞培养基。

通过采用 Yan, U. S. 专利 4,981,952 号的技术，将人蛋白质 C 与培养液分离。在它被吸附到阴离子交换树脂(Fast-Flow Q, Pharmacia)

上之前，制备 4 mM 的在 EDTA 中的澄清的培养基。在用 4 柱体积的 20 mM Tris、200 mM NaCl(pH 7.4)和 2 柱体积的 20 mM Tris、150 mM NaCl (pH 7.4)洗涤之后，用 20 mM Tris、150 mM NaCl、10 mM CaCl₂(pH 7.4)洗脱结合的重组人蛋白质 C 酶原。如同 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳判断的那样，洗脱之后所洗脱的蛋白质纯度大于 95%。

通过在 NaCl 中制备蛋白质 3 M 随后吸附在 20 mM Tris、3 M NaCl、10 mM CaCl₂(pH 7.4)中平衡的疏水性相互作用树脂(Toyopearl Phenyl 650 M, TosoHaas)上，可完成蛋白质的进一步纯化。在用 2 柱体积不含有 CaCl₂ 的平衡缓冲液洗涤后，用 20 mM Tris(pH 7.4)洗脱重组人蛋白质 C。

通过除去残留的钙，把洗脱的蛋白质制备用于活化。将重组人蛋白质 C 通过金属亲和柱(Chelex-100, Bio-Rad)以除去钙并再次结合到阴离子交换剂(Fast-Flow Q, Pharmacia)上。将这些柱两者按顺序排列并在 20 mM Tris、150 mM NaCl、5 mM EDTA(pH 7.4)中平衡。随后载荷蛋白质，在从所述系列中脱离结合前，用 1 柱体积的相同缓冲液洗涤 Chelex-100 柱。用 3 柱体积的平衡缓冲液洗涤阴离子交换柱，随后用 0.4 M NaCl、20 mM Tris-乙酸盐(pH 6.5)洗脱蛋白质。经 UV 280 消光 $E^{0.1\%} = 1.81$ 或 1.85，分别测量重组人蛋白质 C 和重组活化蛋白质 C 溶液的蛋白质浓度。

制备 2

重组人蛋白质 C 的活化

在 4℃ 下，在 50 mM HEPES(pH 7.5)存在下，把小牛凝血酶偶联于活化 CH-Sepharose 4B(Pharmacia)上。在树脂上进行偶联反应，该树脂已被填充到使用大约 5000 单位凝血酶/mL 树脂的柱上。通过柱使凝血酶溶液循环大约 3 小时，然后将 2-氨基-乙醇(MEA)加入到浓度 0.6 mL/L 的循环溶液中。使含有 MEA 的溶液循环另外 10-12 小时以确保完全阻断树脂上未反应的胺。阻断后，用 10 柱体积的 1 M

NaCl、20 mM Tris(pH 6.5)洗涤偶联有凝血酶的树脂以除去所有非特异性结合的蛋白质，并在活化缓冲液中平衡后将它用于活化反应。

在 EDTA(为螯合任何残留的钙)中将已纯化的 r-hPC 制备成 5 mM 并用 20 mM Tris(pH 7.4)或 20 mM Tris-乙酸盐(pH 6.5)稀释至 2 mg/mL 的浓度。在 37℃ 下，将该物料通过用 50 mM NaCl 和 20 mM Tris(pH 7.4)或 20 mM Tris-乙酸盐(pH 6.5)平衡的凝血酶柱。将流速调节使 r-hPC 和凝血酶树脂之间维持大约 20 分钟的接触时间。收集流出液并立即用于酰胺水解活性试验。如果与已建立的蛋白质 C 标准物相比较，所述物料不具有特异性活性(酰胺水解)，将其在凝血酶柱上循环以使 r-hPC 活化至完全。随后用以上 20 mM 缓冲液 1:1 稀释物料，缓冲液具有 7.4 或 6.5 的 pH 以保持当等待下一个加工步骤时蛋白质 C 处于较低浓度。

通过把蛋白质 C 结合于在含有 150 mM NaCl 的活化缓冲液(20 mM Tris, pH 7.4 或 20 mM Tris-乙酸盐, pH 6.5)中平衡的阴离子交换树脂(Fast-Flow Q, Pharmacia)上，实现从蛋白质 C 物料中除去沥滤了的凝血酶。凝血酶不与在这些条件下的阴离子交换树脂相互作用，但是通过柱进入到样品应用流出液中。一旦蛋白质 C 载荷于柱上，用 20 mM 平衡的缓冲液洗涤 2-6 柱体积，之后用在 5 mM Tris-乙酸盐(pH 6.5)或 20 mM Tris(pH 7.4)中的 0.4 M NaCl 洗脱液洗脱结合的蛋白质 C。更高体积的柱洗涤液便于更完全除出十二肽。从该柱洗脱的物料贮存于冷冻溶液(-20℃)中或作为冷冻干燥粉末贮存。

通过在活化的部分组织促凝血酶原激酶时间(APTT)凝固试验中测量凝固时间的延长作用，测定活化蛋白质 C 的抗凝血活性。当在这个浓度范围内在几次稀释作用下制备样品时，在 125-1000 ng/mL 的蛋白质 C 浓度范围的稀释缓冲液(1 mg/mL 放射免疫试验级小牛血清白蛋白、20 mM Tris(pH 7.4)、150 mM NaCl、0.02% NaN₃)中，制备标准曲线。对每一个样品池，加入 50 μL 冷的马血清和 50 μL 重构成活化部分组织促凝血酶原激酶时间试剂(APTT 试剂, Sigma)并

在 37℃ 下孵育 5 分钟。孵育后，将 50 μ L 适当的样品或标准物加入到每个池中。使用稀释的缓冲液替代样品或标准物以测定基础凝固时间。在把 50 μ L 的 37℃ 下 30 mM CaCl_2 加入到每一个样品或标准物中后，立即启动纤维计数器(fibrometer)(CoA 筛选出血分析仪，American Labor)的计时装置(timer)。从标准曲线的线性回归方程计算样品中活化蛋白质 C 的浓度。在这里所报道的凝固时间为最少三次重复试验的平均值，包括标准曲线样品。

以上描述使本领域适当技术的人员能够制备用于治疗病毒性出血热的蛋白质 C。

制备 3

活化蛋白质 C 的制剂

通过以下方法，制备活化蛋白质 C 的稳定的冷冻干燥制剂，方法包括把包含大约 2.5 mg/mL 活化蛋白质 C、大约 15 mg/mL 蔗糖、大约 20 mg/mL NaCl、和具有 pH 高于 5.5 但低于 6.5 的枸橼酸钠缓冲液的溶液冷冻干燥。另外，活化蛋白质 C 的稳定的冷冻干燥制剂包括把含有大约 5 mg/mL 活化蛋白质 C、大约 30 mg/mL 蔗糖、大约 38 mg/mL NaCl、和具有 pH 高于 5.5 但低于 6.5 的枸橼酸盐缓冲液的溶液冷冻干燥。

在配制适宜于冻干方法的制剂中，蛋白质 C:盐:填充剂(w:w:w)的比例是一个重要因素。依蛋白质 C 的浓度、盐的选择和浓度及填充剂的选择和浓度而定，所述比例可变化。特别是大约 1 份活化蛋白质 C:大约 7.6 份的盐:大约 6 份的填充剂为优选。

通过使活化蛋白质 C、NaCl、蔗糖和枸橼酸钠缓冲液混合，可制备适宜于经持续输注给药的活化蛋白质 C 的单位剂量制剂。混合后，将 4 mL 溶液转移至单位剂量收集器中并冷冻干燥。将含有大约 5 mg 至大约 20 mg 活化蛋白质 C(适宜于将大约 0.01 mg/kg/hr 至大约 0.05 mg/kg/hr 的剂量给予需要它们的患者)的单位剂量收集器密封并

贮存直至使用。

实施例 1

重组人活化蛋白质 C(r-aPC)在病毒性出血热患者中的安慰剂-对照双盲试验

病毒性出血热患者的研究已证实血小板幸存(survival)异常和聚集以及凝固因子的变化。在缺乏有效的抗病毒药的情况下，目前对患有病毒性出血热患者的治疗方法主要是支持方法。

该试验目的是显示输注 r-aPC 导致统计学上显著减少与病毒性出血热有关的死亡率。

内含标准包括患有病毒性出血热的患者。诊断后这些患者立即进入试验并进入医院。对满足用于病毒性出血热内含标准的患者给予标准支持护理。另外，患者接受安慰剂或 r-aPC 96 小时。在 24 μ g/kg/hr 剂量下，给予 r-aPC。

本研究的主要目标是：与安慰剂相比较 r-aPC 的安全性和有效性，及 r-aPC 治疗凝血病和影响死亡率的能力。