(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 694 34 414 T2** 2006.05.18

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 721 501 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **694 34 414.1**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/NL94/00189**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **94 927 860.0**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 95/005456**
(86) PCT-Anmeldetag: **10.08.1994**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **23.02.1995**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **17.07.1996**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **29.06.2005**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **18.05.2006**

(51) Int Cl.[8]: ***C12N 9/16*** (2006.01)
A61K 38/46 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
9300171 13.08.1993 NL

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
PharmAAware IP B.V., Bunnik, NL

(74) Vertreter:
TER MEER STEINMEISTER & Partner GbR Patentanwälte, 81679 München

(72) Erfinder:
POELSTRA, Klaas, NL-9732 JB Groningen, NL; HARDONK, Machiel Josephus, NL-9722 JG Groningen, NL; BAKKER, Winston Willem, NL-9795 PC Woltersum, NL; MEIJER, Dirk Klaas Fokke, NL-9724 AN Groningen, NL

(54) Bezeichnung: **PHOSPHATASE ODER EIN ENTSPRECHENDES DERIVAT ENTHALTENE PHARMAZEUTISCHE ZUSAMMENSETZUNG**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

[0001] Die Erfindung betrifft pharmazeutische Zusammensetzungen, die zur Behandlung oder Heilung von klinischen Komplikationen, welche durch Infektionen mit Gramnegativen Bakterien verursacht werden, einschließlich Blutvergiftung, geeignet sind. Insbesondere betrifft die Erfindung systemisch anwendbare Zusammensetzungen. Die Zusammensetzungen enthalten Komponenten, die zur Entgiftung von Lipopolysacchariden, welche der Bakterienzellwand entstammen (auch bekannt als Endotoxine), geeignet sind, was diese Produkte für Säuger wie Menschen, insbesondere für Patienten mit einer Blutvergiftung, wahlweise in Verbindung mit einer verminderten Abwehrkraft des Wirtes, d.h. nach Organtransplantationen, während einer Leukopenie (Ref. 1) in Verbindung mit Krebs oder der chemotherapeutischen Behandlung von Krebs oder während AIDS oder mit AIDS in Beziehung stehenden Erkrankungen (Ref. 2), weniger giftig macht.

Hintergrundinformation

[0002] Endotoxin ist ein negativ geladenes Lipopolysaccharid, das in der Kapsel von Gram-negativen Bakterien vorhanden ist (Ref. 3). Endotoxine sind Komplexe aus einem Phospholipid (Lipid A) und einem Polysaccharid. Die durch verschiedene Bakterien produzierten Endotoxine unterscheiden sich bezüglich ihrer Antigenität, aber sie weisen alle dieselben biologischen Wirkungen auf, welche vorwiegend auf Lipid A zurückzuführen sind. Für die Zwecke dieser Beschreibung umfaßt der Begriff Endotoxin auch Enterotoxine. Zusätzlich zu den negativ geladenen Zuckereinheiten enthält ein Endotoxin zwei Phosphatgruppen, welche für seine Toxizität wesentlich sind (Ref. 3, 4).

[0003] Obwohl es sich um ein allgegenwärtiges Molekül in der äußeren Umgebung sowie im Magen-Darm-Trakt vieler Spezies handelt, kann ein Endotoxin für diese Spezies außerordentlich giftig sein, sobald es den Magen-Darm-Trakt verläßt, wobei es z.B. eine Blutvergiftung und eine Entzündung hervorruft, wie in einem Abszeß, selbst in Mengen von so wenig wie 10 Picogramm. Bis jetzt ist noch kein bedeutsamer Mechanismus zur Entgiftung von Endotoxin in vivo identifiziert worden (Ref. 5).

[0004] Es ist bekannt, daß Endotoxin schwerwiegende, sogar letale Komplikationen hervorruft (Ref. 5 und 6). In der Tat, trotz der Verwendung von Antibiotika, stellt dieses bakterielle Produkt die Haupttodesursache auf Intensivstationen in westlichen Gesellschaften dar.

[0005] Es gibt zahlreiche verschiedene Endotoxine, die durch unterschiedliche Mikroorganismen produziert werden, und folglich sind die Wirkungen von Endotoxin in vivo zahlreich, wie auch die Wege, über die es in den Organismus eindringen kann. Die mit einer Infektion durch Gram-negative Bakterien verbundenen Symptome variieren daher auch bei den Patienten sehr (Ref. 7). Diese Symptome können durch einen septischen Schock weiter kompliziert werden, dessen primäre Kennzeichen eine Hypotonie, eine periphere Gefäßerweiterung und eine diffuse intravaskuläre Koagulation sind (Ref. 8). Später können Organe wie das Herz (akutes Herzversagen), die Lungen (Atemnotsyndrom bei Erwachsenen), die Niere (akute Tubulusnekrose) und das Gehirn in Mitleidenschaft gezogen werden (Ref. 8). Der durch ein Endotoxin verursachte pathologische Zustand umfaßt auch das Syndrom eines multiplen Organversagens und irgendein anderes Syndrom, von dem im Allgemeinen auf dem Fachgebiet angenommen wird, daß es direkt oder indirekt durch ein Endotoxin hervorgerufen wird.

[0006] Bis heute sind Antikörper, welche gegen Endotoxin gerichtet sind, die einzigen Endotoxin entgiftenden Proteine, welche bekanntermaßen die Toxizität irreversibel verringern, aber der klinische Nutzen dieser Antikörper muß noch bewiesen werden. Andere Substanzen, welche fähig sind, ein Endotoxin zu binden, wie das Lipopolysaccharid bindende Protein und Lipoproteine hoher Dichte (HDL) (Ref. 9), weisen den bedeutenden Nachteil auf, daß sie in vivo reversible Komplexe bilden. Bei der Dissoziation dieser Komplexe wird wieder das native (toxische) Molekül gebildet. Ferner, obwohl vor einiger Zeit die entgiftende Aktivität von Plasma beobachtet worden ist (Ref. 10), sind Bemühungen, die Substanz oder Substanzen, welche für diese Aktivität verantwortlich sind, zu isolieren oder zu charakterisieren, nicht erfolgreich gewesen. Andere experimentelle Ansätze für die Behandlung einer Blutvergiftung schließen die Anwendung von Präparaten ein, die den Aktivitäten von Cytokinen (z.B. TNF-α) entgegenwirken, welche wichtige Mediatoren eines durch Endotoxin verursachten Schocks sind, der die Wirkungen von Endotoxin in vivo verschlimmert. Ein bedeutender Nachteil dieses Ansatzes ist, daß diese Präparate das auslösende Agens nicht entgiften, sondern vielmehr eine der Reaktionen des Körpers auf dieses Toxin blockieren. Außerdem kann die gegen natürlich vorkommende Cytokine gerichtete Wirkung vielfältige Nebenwirkungen hervorrufen.

[0007] Alkalische Phosphatase (EC 3.1.3.1) ist ein verbreitetes Enzym, das in vielen Spezies, einschließlich des Menschen, vorhanden ist und eingehend untersucht worden ist. Die DNA-Sequenz, welche alkalische Phosphatase codiert, ist sogar erhalten worden, aber bisher ist keine kommerzielle Verwertung davon erfolgt. Obwohl das Enzym routinemäßig als Antikörpermarker oder als ein Marker für die Leber- und Neutrophilenfunktion verwendet wird, ist seine biologische Bedeutung immer noch unbekannt. Rekombinante alkalische Phosphataseenzyme mit einer verbesserten spezifischen Aktivität, welche als Indikatorreagenzien verwendet werden, sind z.B. in EP-A-0 441 252 offenbart. Jedoch erwähnt diese Patentanmeldung nichts bezüglich einer anti-Endotoxin-Aktivität oder der Knochenbildung im Hinblick auf alkalische Phosphatase. Die erwähnte Europäische Patentanmeldung beschreibt eine Reihe von Derivaten, in denen sich eine Aminosäure von dem Wildtyp unterscheidet. Die Substituenten schließen den Austausch von Thr 100 durch Val oder Ile, den Austausch von Lys 328 durch Arg, den Austausch von Val 99 durch Ala, den Austausch von Thr 107 durch Val, den Austausch von Asp 101 durch Ser, den Austausch von Val 377 durch Ala und den Austausch von Ser 115 durch Gly sowie den Austausch von Ala 103 durch Asp ein. Andere Derivate, die in der erwähnten Patentanmeldung beschrieben werden, sind Derivate mit einem m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimidester für das Ausführen eines Sandwich-EIA und eine thiolierte Mutante von alkalischer Phosphatase, welche durch Verwendung von Succinimidyl-4-N-maleimidomethyl-1-thicapramid-cyclohexancarboxylat abgeleitet werden kann. Bei allen diesen Derivaten erfolgt keine Erwähnung der durch das alkalische Phosphatase-Derivat getragenen Ladung. Es wird darauf hingewiesen, daß für sämtliche der erwähnten Derivate, mit Ausnahme des Austausches von Ala 103 durch Asp, durch die hierin genannten Erfinder berechnet worden sind, daß sie eine positivere Nettoladung oder eine gleiche Nettoladung im Vergleich zu der korrespondierenden nativen alkalischen Phosphatase aufweisen.

[0008] Die alkalische Phosphatase ist ein membrangebundenes Ektoenzym, welches bekanntermaßen extrazelluläre Moleküle dephosphoryliert. Das Enzym ist in vielen Organen einschließlich Darm, Niere, Osteoblasten und Neutrophilen vorhanden (Ref. 11, 12 und 13). Es zeigt in vitro ein pH-Optimum von etwa 10,5 (Ref. 12). Dieses außerordentlich hohe pH-Optimum hat das Erkennen seiner biologischen Relevanz behindert (Ref. 12–14), da angenommen wurde, daß dieser pH-Wert nicht in biologischen Geweben des intakten Organismus auftritt.

[0009] In einer Reihe von Veröffentlichungen wird ein Derivat von alkalischer Phosphatase und Kollagen, insbesondere fibrillärem Kollagen, beschrieben. Es wird nichts über die negative Nettoladung eines solchen Derivats erwähnt, jedoch haben die hierin genannten Erfinder berechnet, daß die Nettoladung im Vergleich zu einer nicht-derivatisierten alkalischen Phosphatase positiv ist.

[0010] In US 4 409 332 (1983) wird beschrieben, daß Kollagen-Nähte, die mit alkalischer Phosphatase derivatisiert sind, die entzündlichen Eigenschaften von Kollagen verringern. Die durch Kollagen verursachte Entzündung ist keine auf Endotoxine zurückzuführende Entzündungsreaktion, sondern eine Entzündung, die im Allgemeinen durch eine Gewebeschädigung verursacht wird, welche auf die Tatsache zurückzuführen ist, daß Kollagen ein heterologes Protein ist, das für den Körper fremd ist, und auf die Tatsache, daß Kollagen in immer eine Koagulation in vivo verursacht, die nachfolgend Entzündungszellen auf vielfältige Weise aktivieren kann. Eine Entzündung aufgrund von Infektionen der Wunde ist unwahrscheinlich, da die Autoren selbst oft angeben, daß sie unter Verwendung von sterilen Lösungen in einer sterilen Umgebung arbeiteten. Ein Fachmann kann aus dieser angeführten Patentveröffentlichung nicht ableiten, wie eine an Kollagen gekoppelte alkalische Phosphatase die Entzündung, welche üblicherweise durch Kollagen verursacht wird, inhibieren kann. Jedoch kann eine Reihe von Wegen angenommen werden, wie zum Beispiel durch den Schutz von Antigenen für Zellen der spezifischen Immunantwort, wodurch die Erkennung verhindert wird, oder durch die Bindung von positiv geladenen Mediatoren der unspezifischen Immunantwort, da alkalische Phosphatase negativ geladene Zuckergruppen enthält. Eine andere Möglichkeit ist die Inhibierung der Gerinnungskaskade durch das Maskieren von Kollagen oder die Dephosphorylierung von Mediatoren wie ATP, ADP und dem Thrombocyten-aktivierenden Faktor oder durch Bindung von positiv geladenen Mediatoren und Cofaktoren.

[0011] In dem angeführten Dokument wird angegeben, daß, wenn gleich die Hydrolysefunktionen der beschriebenen Phosphatase während mehr als 50 Jahren intensiv untersucht worden sind, sich kein klares Bild hinsichtlich des Nutzens des Enzyms für den Organismus ergeben hat. Zusammenfassend ist die in vivo-Aktivität von alkalischer Phosphatase unklar. In dem erwähnten Dokument wird keine Verbindung zwischen alkalischer Phosphatase und der Knochenbildung oder einer anti-Endotoxin-Aktivität hergestellt. Es wird kein theoretischer Hintergrund für die entzündungshemmende Aktivität der Kopplung von alkalischer Phosphatase an Kollagen angegeben. Es ist in der Tat fraglich, ob ein Fachmann die entzündungshemmende Aktivität auf die Anwesenheit von alkalischer Phosphatase selbst zurückführen würde oder auf die Tatsache, daß spezifische Gruppen von Kollagen durch die Anwesenheit eines zufälligen Derivats geschützt werden, wodurch die ent-

zündungshemmende Wirkung vorgesehen wird. Dies kann aus dem Tatbestand abgeleitet werden, daß beschrieben wird, daß die Verwendung eines Vernetzungsmittels wie Glutaraldehyd oder eines anderen Vernetzungshilfsmittels offensichtlich die entzündungshemmenden Eigenschaften des Materials verbessert.

Beschreibung der Erfindung

[0012] Der Gegenstand der vorliegenden Erfindung basiert auf der Erkenntnis der Erfinder, daß alkalische Phosphatase als solche mit einer Phosphataseaktivität ausgestattet ist, die bestimmte Vitalfunktionen des Körpers reguliert, selbst bei physiologischen pH-Werten, d.h. in vivo, ohne daß sie derivatisiert werden muß.

[0013] Die Grundlage für diesen Einblick wurde durch die Idee bereitgestellt, daß auf der molekularen Ebene in vivo eine alkalische Mikroumgebung vorhanden sein könnte, welche sich selbst von wäßrigen Lösungen in vitro unterscheidet. In vivo können negativ geladene Moleküle aufgrund ihrer Fähigkeit, H^+ zu binden, als schwache Basen fungieren. Folglich rufen diese Anionen eine lokale Erhöhung des pH-Wertes hervor, wodurch eine Mikroumgebung mit einem pH-Wert vorgesehen wird, der ausreichend ist, damit die alkalische Phosphatase als Phosphatase wirksam ist.

[0014] Die Addition von negativen Ladungen kann in vivo auf drei verschiedenen Wegen vorgesehen werden: die Addition von Substraten mit einer negativen Nettoladung an das Enzym, zweitens durch das Bereitstellen der Phosphatase mit einem Membranträger mit negativen Ladungen und drittens durch das Verändern der Ionisation von geladenen Gruppen in dem Protein selbst und/oder das Einführen von negativ geladenen Einheiten in das Proteingrundgerüst oder das Entfernen von möglicherweise positiv geladenen Gruppen in dem Protein.

[0015] Diese unterschiedlichen Mechanismen, entweder allein oder in Kombination miteinander, können das ungewöhnlich hohe pH-Optimum des Enzyms in vitro erklären.

[0016] Ähnliche Überlegungen können für andere Phosphatase-Typen zutreffend sein.

[0017] Ein anderer Aspekt der vorliegenden Erfindung basiert auf der noch spezifischeren Feststellung, daß alkalische Phosphatase als solche ebenfalls mit einer Endotoxin entgiftenden Aktivität ausgestattet ist, selbst bei physiologischen pH-Werten.

[0018] Das Endotoxin mit seinen negativ geladenen Einheiten kann folglich zum Beispiel negativ geladene Reste bereitstellen, die in der Mikroumgebung der alkalischen Phosphatase notwendig sind. Auf diese Weise kann dieses allgegenwärtige Enzym in vivo einen Schutz gegen Endotoxin, das allgegenwärtige Produkt von Gram-negativen Bakterien, vorsehen.

[0019] Die Verwendung von Enzymzubereitungen zum Entgiften von Endotoxin selbst hat den Vorteil, daß eine Behandlung der Erkrankung im frühen Stadium möglich ist, und den weiteren Vorteil, daß die Toxizität des Endotoxins irreversibel vermindert wird. Außerdem, da die Aktivität von Enzymen substratspezifisch ist, sind die Nebenwirkungen der Verwendung eines Enzyms wie der alkalischen Phosphatase begrenzt.

[0020] Die Phosphatgruppen in der Lipid A-Einheit von Endotoxin bestimmen die Toxizität dieser bakteriellen Komponente. Obwohl dephosphorylierte Lipid A-Moleküle einige ihrer immunstimulatorischen Aktivitäten beibehalten, wird es somit möglich, einen Impfstoff herzustellen.

[0021] Ein Impfstoff zur Verhinderung eines pathologischen Zustandes, welcher durch Endotoxine von Gram-negativen Bakterien verursacht wird, wobei der Impfstoff eine Phosphatase als solche oder ein Derivat einer Phosphatase, wobei das Derivat eine Phosphataseaktivität besitzt, als aktive Komponente und irgendein Adjuvans, welches gewöhnlich in einem Impfstoff verwendet wird, umfaßt, stellt eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung dar. Jeder Derivat-Typ, welcher im Allgemeinen auf dem Gebiet der Impfstoffe annehmbar ist, kann verwendet werden.

[0022] Um die Hypothese zu überprüfen, daß alkalische Phosphatase aufgrund ihrer Fähigkeit, Lipopolysaccharide zu entgiften, ein protektives Enzym des Abwehrsystems des Wirtes ist, untersuchten die Erfinder, ob alkalische Phosphatase in der Lage ist, das Endotoxin von Escherichia coli bei physiologischen pH-Werten zu dephosphorylieren. Die alkalische Phosphataseaktivität wurde auf in 4% Formalin fixierten Kryostatschnitten (4 µm) von Darm, Niere und Milz gemäß üblicher histochemischer Methoden bei alkalischen (Ref. 20) und physiologischen pH-Werten (Ref. 21) unter Verwendung von entweder dem herkömmlichen Substrat β-Glycero-

phosphat (6,0 mg/ml) oder dem Endotoxin aus Escherichia coli (0,55 mg/ml; Serotyp 0,55:B5, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) untersucht. Bei einem alkalischen pH-Wert wurde die histochemische Methode von Gomori (Ref. 20) angewendet, während die Methode von Wachstein und Meisel (Ref. 21) bei dem niedrigeren pH-Wert angewendet wurde. Die Schnitte wurden mit dem Substrat für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Bei pH 7,4 und 9,0 wurden Phosphatpräzipitate, welche eine Enzymaktivität anzeigen, in Darm- und Nierenschnitten nachgewiesen, wenn Endotoxin als Substrat verwendet wurde (**Fig.** 1). In der Milz wurden stark positive Zellen identifiziert, welche in der roten Pulpa verstreut waren. Die Verteilung des Reaktionsprodukts war für beide Substrate identisch. Alle Schnitte, die ohne Substrat inkubiert wurden, waren von dem Reaktionsprodukt völlig frei. Außerdem inhibierte der selektive alkalische Phosphatase-Inhibitor Levamisol (1,0 mM) (Ref. 20) die Phosphatfreisetzung aus dem Endotoxin in den Nierenschnitten vollständig, während in Darmschnitten diese Aktivität durch den hinreichend bekannten Inhibitor der intestinalen alkalischen Phosphatase, L-Phenylalanin (5 mM) (Ref. 22), aber nicht durch das Stereoisomer D-Phenylalanin (5 mM) abgeschwächt wurde. Sowohl die Verteilung der Enzymaktivität in verschiedenen Organen als auch die Ergebnisse, welche mit selektiven Inhibitoren erhalten wurden, zeigen folglich, daß das Endotoxin durch alkalische Phosphatase bei physiologischen pH-Werten dephosphoryliert wird.

[0023] Das pH-Optimum der alkalischen Phosphataseaktivität wurde unter Verwendung von Tubulus-Bürstensaumfragmenten der Rattenniere in einer quantitativeren Weise untersucht. Diese besondere Enzymzubereitung weist den Vorteil auf, daß sie in Assoziation mit der Plasmamembran untersucht werden kann. Außerdem kann sie durch Levamisol vollständig inhibiert werden. Zubereitungen von Tubulus-Bürstensaumfragmenten (isoliert aus der Rinde von PVG-Ratten-Nieren unter Verwendung eines Siebes von 180 Mesh und gespült in 0,9%iger Salzlösung), welche 12 µg Protein (spezifische Phosphataseaktivität: 86 U/mg, abgeschätzt bei pH 9,8) enthielten, wurden zu 250 µl 2-Amino-2-methyl-1,3-propandiol-Puffer mit verschiedenen pH-Werten zugegeben. Der Puffer enthielt entweder Endotoxin aus E. coli (1,25 mg/ml) oder para-Nitrophenolphosphat (0,5 mg/ml; pNPP). Kurz vor dem Beginn des Inkubationszeitraums wurden 2 mM $MgCl_2$ zugegeben. Nach einer Inkubation für eine Stunde bei 37°C wurden die Konzentrationen des anorganischen Phosphats gemäß der Methode von Chandrarajan (Ref. 23) abgeschätzt. Mit dem herkömmlichen Substrat pNPP wurde eine stetige Erhöhung der Phosphatfreisetzung zusammen mit dem pH-Wert beobachtet (**Fig. 2**, obere linke Ecke); wenn jedoch Endotoxin als Substrat verwendet wurde, ereichte die Enzymaktivität bei pH 8,8 ein Maximum und blieb bei diesem Wert stabil. Die Dephosphorylierung von Endotoxin als auch pNPP wurde durch den alkalische Phosphatase-Inhibitor Levamisol (0,2 mM) inhibiert. Die Aktivität bei hohen pH-Werten wurde durch die Deacetylierung von Fettacylketten von Endotoxin, welche unter alkalischen Bedingungen erfolgt (Ref. 24), nicht beeinträchtigt, da die einstündige Vorinkubation von Endotoxin bei pH 9,8 die Dephosphorylierung bei pH 7,4 nicht inhibierte, wie histochemisch untersucht wurde. Folglich, im Gegensatz zu dem hohen pH-Optimum, das mit dem Substrat pNPP festgestellt wurde, erreicht die alkalische Phosphatase eine maximale Aktivität bei einem weniger extremen pH-Wert, wenn Endotoxin als Substrat verwendet wird. Es kann angenommen werden, daß das pH-Optimum noch niedriger ist, wenn das Enzym in vivo innerhalb seiner geeigneten Mikroumgebung untersucht wird, welche die notwendigen zusätzlichen negativen Ladungen umfaßt, um das alkalische pH-Optimum nachzuahmen, welches in vitro beobachtet wurde.

[0024] Um die Wirkung von alkalischer Phosphatase auf die Endotoxintoxizität zu untersuchen, wurden Limulus-Tests durchgeführt. Der Limulus-Test ist das Standardverfahren, um Endotoxin-Konzentrationen basierend auf der Toxizität des Moleküls gegenüber dem Pfeilschwanzkrebs Limulus polyphemus in vitro abzuschätzen (Ref. 25). Endotoxin (2,0 ng/ml) wurde zusammen mit Tubulusfragmenten (0,8 µg Protein/ml; spezifische Phosphataseaktivität 86 U/mg) für eine Stunde bei 37°C in RPMI-1640-Puffer (pH 7,6) inkubiert. Die Kontrollproben enthielten entweder kein Endotoxin oder keine Tubulus-Bürstensaumfragmente. Anschließend wurde der Limulus-Test durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen eine signifikante Verringerung der Endotoxin-Konzentrationen, wie durch dieses Verfahren in Suspensionen, enthaltend Endotoxin und eine alkalische Phosphataseaktivität, meßbar ist, verglichen mit Suspensionen, welche gleiche Mengen an Endotoxin, aber kein Enzym enthalten (Tabelle 1). Daraus kann gefolgert werden, daß alkalische Phosphatase in der Lage ist, die Toxizität von Endotoxinmolekülen bei physiologischen pH-Werten abzuschwächen, wie in vitro beurteilt wurde.

[0025] Ein weiteres Verfahren, wobei die Erfindung ein Verfahren ist, um eine Substanz frei von den toxischen Wirkungen von Endotoxin zu machen, umfaßt das Aussetzen des Produkts der Phosphataseaktivität von Phosphatase, z.B. alkalischer Phosphatase oder einem Derivat von Phosphatase mit Phosphataseaktivität. Ein solches Derivat kann zum Beispiel ein Derivat nach irgendeinem der Ansprüche 1–12 sein. Die Substanz, welche entgiftet werden soll, muß der Gegenwart der alkalischen Phosphataseaktivität während eines ausreichenden Zeitraums ausgesetzt werden, um irgendein vorhandenes Endotoxin zu entgiften. Ein Fachmann ist in der Lage, ohne unnötiges Experimentieren zu ermitteln, welcher Zeitraum dafür geeignet sein kann.

Tabelle 1: Endotoxin-Konzentrationen, gemessen durch den Limulus-Test, mit und ohne Vorbehandlung mit alkalischer Phosphatase

Probe	[Endotoxin] pg/ml
Endotoxin	34,0 ± 13,0
Endotoxin + alkalische Phosphatase	< 0,05 ± 0
Puffer	11,3 ± 9,8

[0026] Die Toxizität von Endotoxin, behandelt mit alkalischer Phosphatase, wurde auch in vivo untersucht, wobei aus der Tatsache Nutzen gezogen wurde, daß eine lokale Entzündung, welche auf zwei aufeinanderfolgende Endotoxin-Injektionen folgt (die lokale Shwartzman-Reaktion (Ref. 26)), ohne weiteres quantifiziert werden kann. Falls die Entgiftungs-Hypothese gültig ist, sollte diese Entzündungsreaktion nach Verabreichung von Endotoxin-Zubereitungen, welche mit alkalischer Phosphatase vorbehandelt wurden, vermindert werden. Daher lösten die Erfinder eine lokale, intradermale Shwartzman-Reaktion aus und behandelten die zweite Endotoxin-Dosis mit Tubulus-Bürstensaumfragmenten bei einem physiologischen pH. Die Einwanderung von Zellen, welche freie Sauerstoffradikale erzeugen, ein wichtiges Merkmal der Shwartzman-Reaktion, wurde anschließend histochemisch untersucht. Auf diese Weise wurde die Shwartzman-Reaktion durch zwei aufeinanderfolgende Injektionen von Endotoxin (aus E. coli 055:B5) in einem Abstand von 20 Stunden in weiblichen PVG-Ratten (200 g) ausgelöst. Die erste Endotoxin-Injektion (1 mg/kg, b.w.) wurde intravenös verabreicht, während die zweite Injektion aus einer intradermalen Verabreichung einer Mischung von 70 µl RPMI-1640-Medium (pH 7,6), supplementiert mit 2 mM $MgSO_4$ und 40 µg Endotoxin (E) oder $MgSO_4$ allein (C), bestand. Vor der Injektion wurden die Medien mit 6 µg Tubulus-Bürstensaumfragmenten, enthaltend 86 U/mg alkalische Phosphataseaktivität (A), mit oder ohne dem alkalische Phosphatase-Inhibitor Levamisol (L; Endkonzentration 1,0 mM), inkubiert (1 Stunde, 37°C). Kontrollmedien wurden mit Salzlösung (S) supplementiert und enthielten entweder kein Endotoxin oder keine alkalische Phosphatase oder beides. Zwei Stunden nach den intradermalen Injektionen wurden die Hautstellen auf die Einwanderung von Zellen untersucht, welche freie Sauerstoffradikale erzeugen, was histochemisch mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) auf der Lichtmikroskop-Ebene gezeigt wurde (Ref. 27). Eine signifikante Einwanderung von Zellen, welche freie Sauerstoffradikale erzeugen, verglichen mit den Kontrollen, wurde an Hautstellen beobachtet, in die unbehandeltes Endotoxin injiziert wurde (E/S gegenüber C/S, $p < 0,01$, Wilcoxon; **Fig. 4**). Diese Entzündungsreaktion war an Hautstellen abgeschwächt, in die Endotoxin injiziert wurde, welches mit Tubulus-Bürstensaumfragmenten vorbehandelt wurde (E/S gegenüber E/A, $p < 0,05$, Wilcoxon), während das mit Tubulusfragmenten plus Levamisol vorbehandelte Endotoxin eine erhöhte Pro-Entzündungsaktivität verglichen mit Endotoxin zeigte, welches mit Tubulusfragmenten allein vorbehandelt wurde (E/A gegenüber E/A/L, $p < 0,025$, Wilcoxon). Jeder Test wurde in doppelter Ausfertigung auf derselben Ratte durchgeführt, und die Ergebnisse sind als das arithmetrische Mittel (+/– SD) von 6 Ratten ausgedrückt. Diese Daten zeigen, daß Endotoxin, behandelt mit alkalischer Phosphatase, eine verminderte Toxizität in vivo zeigt, und daß alkalischer Phosphatase in der Lage sein kann, Endotoxin in vivo zu entgiften.

[0027] Um den Beitrag einer endogenen alkalischen Phosphataseaktivität bei der Endotoxin-Entgiftung in vivo zu untersuchen, beurteilten die Erfinder den Effekt von Levamisol auf die Endotoxin-Empfindlichkeit in Ratten, einer Spezies, welche gegen Lipopolysaccharide aus Gram-negativen Bakterien relativ resistent ist. Sechs Monate alte, weibliche PVG-Ratten erhielten bei t = –24 Stunden und t = –1 Stunde eine Injektion mit dem alkalische Phosphatase-Inhibitor Levamisol (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) intraperitoneal (10 mg/kg, b.w.) oder mit Salzlösung. Bei t = 0 erhielten die Ratten eine i.v.-Exposition von 0,5 mg Endotoxin, und unmittelbar vor und bei t = 3, 6, 24 und 48 Stunden nach dieser Injektion wurde Blut entnommen.

[0028] Die Serum-Glutamat-Pyruvat-Transaminaseaktivität, welche auf eine Leberschädigung hinweist (ein wichtiger pathogener Faktor bei einem durch Endotoxin verursachten Todesfall), wurde in diesen Proben gemäß der Methode von Wroblewski und LaDue abgeschätzt. Die Ergebnisse zeigten keine Veränderung der Serum-Transaminaseaktivität nach der Behandlung mit Levamisol alleine, verglichen mit Ratten, die mit Salzlösung behandelt wurden, während nach der Endotoxin-Exposition eine Erhöhung beobachtet wurde (**Fig. 5**). Im Vergleich zu der geringfügigen Erhöhung, die bei Ratten beobachtet wurde, welche nur Endotoxin erhielten, zeigten Ratten, die mit Levamisol vorbehandelt wurden, jedoch einen sehr starken Anstieg der Serum-Transaminaseaktivität ($p < 0,001$), was auf die Beteiligung einer endogenen alkalischen Phosphataseaktivität bei der Endotoxin entgiftenden Aktivität von Ratten in vivo hinweist.

[0029] Die entgiftende Aktivität von alkalischer Phosphatase wurde auch in einem experimentellen Modell ei-

nes septischen Schocks in Ratten und Mäusen untersucht. So erhielten Ratten eine intraperitoneale Injektion von $1,0 \times 10^{10}$ Kolonie-bildenden Einheiten (CFU) eines hinreichend charakterisierten Stamms von Escherichia coli-Bakterien (ATCC 25922), während Mäuse $0,2 \times 10^{10}$ CFU erhielten. Die Impfung mit dieser Dosis resultiert innerhalb von etwa 6 Stunden in dem vollständig ausgebildeten Syndrom eines septischen Schocks, welches durch eine Thrombocytopenie, Leukopenie, beeinträchtigte Leberfunktion und erniedrigte (rektale) Körpertemperatur gekennzeichnet ist.

[0030] Die meisten Ratten, welche relativ resistent gegen Endotoxin sind, überlebten die Injektion von E. coli-Bakterien (Fig. 7A). Jedoch, in Kombination mit dem alkalische Phosphatase-Inhibitor Levamisol (50 mg/kg, b.w.; verabreicht subkutan, 2 Stunden vor den Bakterien), war die Impfung mit Gram-negativen Bakterien letal. Neun von zehn Ratten starben mit klinischen Symptomen eines Schocks. Die Serumspiegel der alkalischen Phosphataseaktivität in Ratten, die mit Levamisol behandelt wurden, waren sechs Stunden nach der Injektion um 50% verringert. Levamisol beeinflußte das Überleben von Ratten nicht, welche eine subletale Dosis von Gram-positiven Bakterien erhielten. Ratten, die 50 mg/kg, b.w., Levamisol zwei Stunden vor der Verabreichung von $1,0 \times 10^{10}$ CFU Staphylococcus aureus erhielten, überlebten nahezu alle (8 Ratten pro Gruppe, Fig. 7B). Dies zeigt, daß eine endogene alkalische Phosphataseaktivität in Ratten an der Resistenz gegen Endotoxin von Gram-negativen Bakterien beteiligt ist.

[0031] Im Gegensatz zu den Ratten, starben neun von zehn Mäusen an einer Dosis von $0,2 \times 10^{10}$ CFU E. coli (Fig. 8). Jedoch überlebten alle Tiere, die 2 Stunden vor der Verabreichung der Bakterien eine einzige intraperitoneale Injektion von 0,15 U gereinigter menschlicher plazentaler alkalischer Phosphatase erhielten, die Impfung mit dieser letalen Dosis (n = 10). Die alkalische Phosphatase wurde mit Butanol (50%, Vol./Nol.) aus einer menschlichen Plazenta extrahiert und unter Verwendung einer Diethylaminoethylcellulose-Säule und einer Affinitätssäule (eine CNBr-Sepharose^{4B}-Säule mit daran gekoppelten Kaninchen-anti-Mensch-plazentale alkalische Phosphatase-Antikörpern) gereinigt. Folglich scheint alkalische Phosphatase fähig zu sein, Endotoxin in vivo entgiften zu können und für die Behandlung eines Endotoxin-Schocks verwendbar zu sein.

[0032] Die Blutkreislauf-Halbwertszeit von plazentaler alkalischer Phosphatase beträgt im menschlichen Blut etwa 7 Tage (Ref. 31). In Ratten ist menschliche plazentale alkalische Phosphatase während etwa drei Tagen im Blut nachweisbar (persönliche Beobachtungen), im Gegensatz zu intestinaler alkalischer Phosphatase, die eine Blutkreislauf-Halbwertszeit von 71/2 Minuten aufweist (Ref. 28). Basierend auf diesen Daten und auf den Ergebnissen von Studien an Mäusen (vgl. oben) kann gefolgert werden, daß plazentale alkalische Phosphatase besonders dafür geeignet ist, als eine aktive Komponente in einer pharmazeutischen Zusammensetzung, insbesondere einer systemisch verwendbaren Zusammensetzung, wie zur Verhinderung einer Blutvergiftung, zu dienen.

[0033] Die anti-Endotoxin-Aktivität, welche auf die durch alkalische Phosphatase gezeigte dephosphorylierende Aktivität zurückzuführen ist, kann natürlich nicht für andere Phosphatasen, insbesondere Phosphatasen mit einem pH-Optimum in vitro bei einem alkalischen pH oder Derivaten von Phosphatasen mit einer Phosphataseaktivität, ausgeschlossen werden. Die vorliegende Erfindung betrifft daher die Verwendung einer Phosphatase als solche oder eines Derivats davon mit Phosphataseaktivität als aktive Komponente für die Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Prophylaxe oder Therapie eines pathologischen Zustandes, welcher durch Endotoxin oder durch ein Derivat von Endotoxin mit Endotoxinaktivität verursacht wird. Eine pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend mindestens eine Phosphatase als solche oder ein Derivat davon mit Phosphataseaktivität, welche für die systemische Anwendung geeignet ist, oder umfassend ein Vehikel, welches in der Lage ist, eine Phosphatase als solche oder ein Derivat von Phosphatase mit Phosphataseaktivität, welche für die systemische Anwendung als aktive Komponente geeignet ist, zu erzeugen, wobei die Phosphatase oder das Derivat eine entgiftende Aktivität für ein Endotoxin oder für ein Derivat von Endotoxin mit Endotoxinaktivität besitzt, und weiterhin umfassend einen pharmazeutisch annehmbaren Träger, ist im Schutzumfang der Erfindung eingeschlossen. Insbesondere stellt eine pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend eine alkalische Phosphatase als solche oder ein Derivat davon mit Phosphataseaktivität, oder ein Vehikel, welches in der Lage ist, eine alkalische Phosphatase als solche zu erzeugen, eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung dar. Zur Verwendung in einer pharmazeutischen Zusammensetzung muß die Phosphatase in einer im Wesentlichen reinen Form erhältlich sein. Im Allgemeinen können DNA-Rekombinationstechniken eine Phosphatase bereitstellen, welche zur Verwendung in einer erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung geeignet ist.

[0034] Bis heute sind vier Isozyme beschrieben worden, die durch vier verschiedene Gene codiert werden. Diese schließen die intestinale Form, den Leber/Knochen/Nieren-Typ (auch in Neutrophilen vorhanden), den Plazenta-Typ und das Plazenta-ähnliche Isozym (vorhanden in Keimzellen) ein. Sowohl die intestinale Form

als auch die alkalische Phosphatase vom Leber/Knochen/Nieren-Typ zeigen eine Endotoxin entgiftende Aktivität, obwohl es keine Gründe dafür gibt, anzunehmen, daß die anderen Isozyme der alkalischen Phosphatase nicht in der Lage sind, Endotoxin abzubauen. Daher umfaßt die vorliegende Erfindung eine pharmazeutische Zusammensetzung, welche irgendein solches Isozym umfaßt. Insbesondere ist eine alkalische Phosphatase vom Plazenta-Typ aufgrund der langen Halbwertszeit davon in vivo geeignet.

[0035] Die folgende Krankengeschichte veranschaulicht die gesundheitsschädlichen Folgen einer verminderten alkalischen Phosphataseaktivität in einem Säuger wie einem Menschen. Ein 1 Jahr altes Mädchen litt an einer rezidivierenden Endotoxämie. Diese Perioden wurden von lebensbedrohenden Symptomen eines Schocks begleitet. Nach der Behandlung wurde eine Besserung erreicht, jedoch häufig gefolgt durch einen Rückfall innerhalb weniger Wochen, wenn die Endotoxämie wieder auftrat. Innerhalb eines Zeitraums von 10 Monaten traten 12 Rückfälle auf, und schließlich starb das Kind im Alter von einem Jahr. Als Todesursache wurde ein septischer Schock diagnostiziert, der durch Gram-negative Bakterien hervorgerufen wurde. Die Ursache der rezidivierenden Endotoxämie selbst war unbekannt. Neuere Untersuchungen der Erfinder zeigten, daß die alkalische Phosphatase in der Leber und der Milz anscheinend normal war, aber die Enzymaktivität im Ileum, einem Organ, welches normalerweise die höchste Enzymaktivität des menschlichen Körpers exprimiert, nahezu fehlte. Im Hinblick auf die Feststellung der Erfinder könnte eine verminderte alkalische Phosphataseaktivität in einem solchen wichtigen Organ die Todesursache erklären. In Anbetracht des hohen Gehalts an E. coli-Bakterien im Darmlumen ist es weiteres möglich, daß das Fehlen eines endogenen entgiftenden Mechanismus im Darm in einer rezidivierenden Endotoxämie resultiert. Ein solcher Mangel könnte im Einklang mit der vorliegenden Erfindung angemessen behandelt werden.

[0036] Rückwirkende Untersuchungen an Patienten, die an einer rezidivierenden Endotoxämie leiden (ohne zugrundeliegende Komplikationen wie Malignitäten oder Lebererkrankungen), zeigten, daß die Aktivität von alkalischer Phosphatase oder eines Derivats davon im Serum mit dem klinischen Zustand korreliert. Folglich, wenn eine Blutvergiftung auftrat, konnte ausnahmslos eine starke Verringerung der Aktivität von alkalischer Phosphatase oder einem Derivat davon im Serum gemessen werden, ein Phänomen, das auch in Ratten beobachtet wurde, gefolgt durch eine Erhöhung der Aktivität von alkalischer Phosphatase oder einem Derivat davon im Serum innerhalb weniger Tage. In einem besonderen Fall wurde das entzündliche Gewebe während einer Periode einer schweren Erkrankung entfernt (partielle Ileumresektion). Dies rief eine unmittelbare Erhöhung der Aktivität von alkalischer Phosphatase oder einem Derivat davon im Serum auf normale Werte hervor. Diese Beobachtungen deuten auf einen erhöhten Umsatz des Enzyms während Infektionen mit Gram-negativen Bakterien hin und bestätigen die Annahme, daß die Verabreichung von alkalischer Phosphatase oder einem Derivat davon an Patienten mit einer Blutvergiftung hilfreich sein kann.

[0037] Ein Verfahren zur Therapie oder Prophylaxe eines pathologischen Zustandes, der durch Endotoxin oder durch ein Derivat von Endotoxin mit Endotoxinaktivität verursacht wird, umfassend das Verabreichen einer therapeutischen Menge einer Phosphatase oder eines Derivats von Phosphatase mit Phosphataseaktivität an ein Individuum, ist ebenfalls im Schutzumfang der Erfindung eingeschlossen. Derivate mit einer optimalen Aktivität um den in vivo-pH herum werden bevorzugt. Die Verwendung von Phosphatase-Derivaten in einem Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Prophylaxe oder Therapie eines pathologischen Zustandes, welcher durch Endotoxin oder ein Derivat von Endotoxin verursacht wird, ist natürlicherweise daher ebenfalls im Schutzumfang der Erfindung eingeschlossen. Systemisch verwendbare Derivate werden besonders bevorzugt, da solche Derivate in den Blutstrom des zu behandelnden Individuums appliziert werden können, wie bereits für Phosphatase als solche erläutert wurde. Für eine Wirksamkeit gegen Infektionen mit Gram-negativen Bakterien muß die aktive Komponente vorzugsweise jede Stelle erreichen, wo sich ein Gram-negatives Bakterium oder das Endotoxin davon befinden kann.

[0038] Ein anderer Aspekt der Erfindung beruht auf der Erkenntnis, daß Polyanionen gemäß der Brönsted-Lowry-Klassifikation von Säuren und Basen als schwache Basen fungieren können, da sie in der Lage sind, H^+ zu binden. Unter Bezugnahme auf die Tatsache, daß die optimale Funktion von Proteinen oder Polypeptiden oft pH-abhängig ist, und daß insbesondere in vitro gezeigt worden ist, daß das Inkubationsmedium für eine optimale Aktivität der Proteine oder Polypeptide alkalisch sein muß, insbesondere für alkalische Phosphatase, folgerten die Erfinder, daß in vivo polyanionische Stellen, zum Beispiel negativ geladene Sialoglycoproteine, die mit Zellmembranen assoziiert sind, die pH-Anforderungen eines solchen Enzyms oder Polypeptids erfüllen können.

[0039] Alkalische Phosphatase kommt vorwiegend in Assoziation mit Plasmamembranen vor. Beispielsweise präsentieren Neutrophile das Enzym gegen den Hintergrund ihrer negativ geladenen Zellmembran, anstatt es in die Mikroumgebung einer Entzündung freizusetzen. Aus diesem Grund nimmt man an, daß polyanionische

Substrate weiterhin dazu beitragen könnten, anionische Bedingungen in vivo für die Phosphataseaktivität von Phosphatasen und Derivaten davon, welche normalerweise ein Optimum bei einem alkalischen pH aufweisen, insbesondere für die Phosphataseaktivität von alkalischer Phosphatase, zu günstigen.

[0040] Falls negativ geladene Zuckereinheiten von Endotoxin das pH-Optimum dieser Enzymaktivität beeinflussen, wäre zu erwarten, daß Polykationen diese Reaktion stören. Daher behandelten die Erfinder die Substrate mit den Kationen Polyethylenimin (PEI) oder Poly-L-lysin (Lys). Die Substrate wurden für 30 Minuten mit entweder 0,5% PEI, 0,75% Poly-L-lysin oder destilliertem Wasser (C) vorinkubiert. Anschließend wurden die Inkubationen ausgeführt, wie oben beschrieben, und die Phosphatfreisetzung wurde abgeschätzt. Beide Kationen beeinflußten die Dephosphorylierung von Endotoxin durch das Neutralisieren der negativen Ladungen sehr stark, während keines von ihnen den pNPP-Abbau wesentlich beeinflußte (**Fig.** 3). Der große Effekt von PEI auf den Endotoxin-Abbau kann durch die Neutralisation von negativen Ladungen hervorgerufen werden, obwohl eine sterische Hemmung auch zu diesem Effekt beitragen kann. Interessanterweise rief Poly-L-lysin eine Verschiebung des pH-Optimums zu einem höheren Wert hervor, was die Annahme bestätigt, daß negativ geladene Reste in der Mikroumgebung das pH-Optimum bestimmen.

[0041] Eine weitere Bestätigung für die Annahme, daß negativ geladene Moleküle in der Mikroumgebung das pH-Optimum von alkalischer Phosphatase beeinflussen, wurde auch durch Experimente mit intestinalen Enzymen erhalten. Die histochemische Abschätzung des pH-Optimums von alkalischer Phosphatase in Kryostatschnitten (4 µm) des Rattendarms unter Anwendung der Methode von Gomori mit dem Substrat pNPP zeigte keine wesentliche Änderung der Färbungsintensität auf, wenn der pH-Wert des Inkubationsmediums innerhalb von 7,8 bis 9,8 variiert wurde. Jedoch zeigt die alkalische Phosphataseaktivität im Serum, für die gezeigt wurde, daß sie intestinalen Ursprungs ist, ein pH-Optimum von 9,8 oder höher. Ein wichtiger Unterschied zwischen intestinaler alkalischer Phosphatase in situ und im Serum ist der Sialoglycoproteingehalt. Während die intestinalen Enzyme in sialisierten Plasmamembranen eingebettet sind, ist die alkalische Phosphatase im Serum nicht von diesen Polyanionen umgeben.

[0042] Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch ein Derivat einer Phosphatase, welches eine Phosphataseaktivität besitzt und einen höheren Nettogehalt an negativ geladenen Einheiten als die korrespondierende native Phosphatase umfaßt. Insbesondere betrifft die Erfindung ein solches Derivat, welches aus einer Phosphatase mit einem Optimum bei einem alkalischen pH, wie eine alkalische Phosphatase, abgeleitet ist.

[0043] Ein Derivat einer erfindungsgemäßen Phosphatase, das einen höheren Gehalt an negativ geladenen Einheiten umfaßt, kann einen höheren Gehalt an derivatisierten alkalischen Aminoeinheiten als die korrespondierende native Phosphatase umfassen. Dies kann zum Beispiel dadurch erreicht werden, daß das Derivat einen höheren Gehalt an negativ geladenen N-Acetylneuraminsäuregruppen (= Sialinsäuregruppen) als die korrespondierende native Phosphatase umfaßt. Eine andere Möglichkeit ist, daß das Derivat einen höheren Gehalt an negativ geladenen Säuregruppen und/oder eine verminderte Anzahl an basischen Einheiten als die korrespondierende native Phosphatase als solche oder in Kombination mit der oben erwähnten Ausführungsform umfaßt. In einer noch anderen Ausführungsform der Erfindung kann das Derivat von Phosphatase eine Phosphataseeinheit umfassen, welche mit einem negativ geladenen Protein oder Polypeptid verknüpft ist. Ein geeignetes Beispiel für ein solches negativ geladenes Protein ist ein modifiziertes, negativ geladenes Albumin, z.B. ein succinyliertes Albumin. Es wird nochmals darauf hingewiesen, daß die offenbarten Derivate von Phosphatase von WO 93/00935, US 4394370, US 4409332 und EP-A-0441252 keine Derivate mit einer erhöhten negativen Nettoladung sind. Das einzige stärker negativ geladene Derivat, welches in der Literatur offenbart wird, ist die rekombinante alkalische Phosphatase aus E. coli mit einer Substitution von Ala 103 durch Asp. Außerdem ist keines der offenbarten Derivate systemisch verwendbar. Einem Fachmann ist bekannt, welche Typen von Derivaten mit dem Begriff systemisch verwendbar gemeint sind. Von besonderem Interesse sind Derivate, welche in oralen Dosierungsformen oder intravenösen Lösungen oder irgendeiner medizinischen Dosierungsform, so daß die aktiven Komponenten in den Blutstrom eintreten können, verwendet werden können. Toxische Derivate wie Kollagenderivate sind nicht annehmbar.

[0044] Gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung kann ein Derivat von Phosphatase mindestens eine Modifikation umfassen, um die Halbwertszeit des Derivats in vivo zu erhöhen; z.B. durch Verhinderung der Bindung an Galactose-Rezeptoren, wobei die Modifikation z.B. am terminalen Galactoserest einer Phosphatase wie alkalische Phosphatase erfolgt. Es war bereits bekannt, daß die Entfernung von z.B. alkalischer Phosphatase aus dem Serum durch Galactose-Rezeptoren in der Leber vermittelt wird (Ref. 28), aber es ist nicht über Bemühungen berichtet oder zuvor vorgeschlagen worden, ein Substrat eines solchen Rezeptors zu modifizieren. Die Modifikation kann z.B. das Ergebnis einer Oxidation oder Reduktion sein.

[0045] Die Erfindung deckt nicht nur Derivate ab, wie die in den oben beschriebenen verschiedenen Ausführungsformen, sondern umfaßt auch Kombinationen der verschiedenen Aspekte solcher Ausführungsformen.

[0046] Im Hinblick auf die verschiedenen Ausführungsformen, welche für ein Derivat von Phosphatase möglich sind, führt WO 92/15316 Beispiele an, wie Proteine und Polypeptide modifiziert werden, um modifizierte Substanzen mit einer zusätzlichen negativen Nettoladung durch Derivatisierung ihrer Aminogruppen und/oder anderen basischen funktionellen Gruppen mit einem Reagens, das die Protonierung von basischen Aminogruppen und/oder anderen basischen funktionellen Gruppen verhindert oder diese basischen Gruppen durch eine oder mehrere funktionelle Gruppen mit einer negativen Ladung ersetzt, vorzusehen. Die zu derivatisierenden Gruppen können Histidin- und/oder Lysinreste sein. Das Reagens kann aus Aldehyden, Anhydriden, Säurechloriden und Isothiocyanaten ausgewählt sein. Ein geeignetes Reagens für Serumalbumin ist cis-Aconitatanhydrid. Ein anderes geeignetes Protein, das modifiziert und an Phosphatase gebunden werden kann, um ein erfindungsgemäßes Derivat zu bilden, ist α-saures Glycoprotein.

[0047] Es ist auch möglich, ein Derivat von alkalischer Phosphatase mit einer optimalen Phosphataseaktivität bei einem physiologischen pH zu erzeugen, wobei das Derivat daher zur Verwendung in vivo geeignet ist, und ein solches Derivat ebenfalls im Schutzumfang der Erfindung eingeschlossen ist.

[0048] Die vorliegende Erfindung deckt nicht nur die Derivate ab, welche vorstehend in den verschiedenen Ausführungsformen beschrieben werden, sondern auch eine pharmazeutische Zusammensetzung, welche mindestens ein solches Derivat von Phosphatase mit Phosphataseaktivität oder ein Vehikel, welches in der Lage ist, ein solches Derivat von Phosphatase mit Phosphataseaktivität zu erzeugen, als aktive Komponente umfaßt, und welche weiterhin einen pharmazeutisch annehmbaren Träger umfaßt.

[0049] Insbesondere ist eine pharmazeutische Zusammensetzung, worin die aktive Komponente, so wie hierin beschrieben, d.h. die Phosphatase als solche, das Derivat von Phosphatase, welches systemisch anwendbar ist und/oder eine negative Nettoladung umfaßt, die größer ist als diejenige der korrespondierenden nativen Phosphatase, oder ein Vehikel, welches in der Lage ist, die Phosphatase oder das Derivat davon mit Phosphataseaktivität zu erzeugen, in die Lipiddoppelschicht eines Liposoms eingebettet ist, vorzugsweise in Kombination mit negativ geladenen Membranbestandteilen, eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung. In einer solchen Zusammensetzung ist die Phosphatase eine Phosphatase mit Phosphataseaktivität, welche eine entgiftende Aktivität für ein Endotoxin oder ein Derivat davon besitzt.

[0050] Die Verwendung eines Phosphatase-Derivats in irgendeiner der oben beschriebenen Ausführungsformen als aktive Komponente zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Prophylaxe oder Therapie eines pathologischen Zustandes, welcher durch Endotoxin oder durch ein Derivat von Endotoxin mit Endotoxinaktivität verursacht wird, ist daher ebenfalls durch die vorliegende Erfindung abgedeckt. Insbesondere ist eine pharmazeutische Zusammensetzung, die ein negativ geladenes und/oder systemisch anwendbares Derivat von alkalischer Phosphatase oder ein Vehikel, welches in der Lage ist, die alkalische Phosphatase des Derivats in irgendeiner der beschriebenen Ausführungsformen abzugeben und/oder die Synthese davon zu induzieren, umfaßt, eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung dar. Eine systemisch anwendbare pharmazeutische Zusammensetzung wird bevorzugt.

[0051] Ein Verfahren zur Therapie oder Prophylaxe eines pathologischen Zustandes, der durch Endotoxin oder durch ein Derivat davon mit Endotoxinaktivität verursacht wird, welches das Verabreichen einer therapeutischen Menge einer solchen pharmazeutischen Zusammensetzung oder irgendeines Derivats einer Phosphatase mit Phosphataseaktivität und eines pharmazeutisch annehmbaren Trägers umfaßt, ist ebenfalls im Schutzumfang der Erfindung eingeschlossen. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Verfahren zur Verhinderung des Auftretens eines pathologischen Zustandes, welcher durch Endotoxin oder ein Derivat davon mit Endotoxinaktivität verursacht wird, nach einer Transplantation oder Transfusion, wobei das Verfahren das Unterziehen des zu transplantierenden oder zu transfundierenden Materials einer Behandlung vor und/oder während und/oder nach der Transplantation oder Transfusion mit einer der folgenden Komponenten umfaßt:

– einer Phosphatase als solche, welche eine entgiftende Aktivität für ein Endotoxin oder für ein Derivat von Endotoxin mit Endotoxinaktivität aufweist, wobei die Phosphatase vorzugsweise eine alkalische Phosphatase und mehr bevorzugt eine menschliche alkalische Phosphatase ist;
– einem Derivat einer Phosphatase mit Phosphataseaktivität gemäß mindestens einer der Ausführungsformen der Erfindung, wie oben beschrieben;
– einem Vehikel, welches in der Lage ist, die Phosphataseaktivität der Phosphatase oder das Phosphatase-Derivat mit einer entgiftenden Aktivität für ein Endotoxin oder für ein Derivat von Endotoxin mit Endoto-

xinaktivität abzugeben und/oder die Synthese davon zu induzieren, wobei die Phosphatase vorzugsweise eine alkalische Phosphatase ist;
– einem Vehikel, welches in der Lage ist, die Phosphataseaktivität eines erfindungsgemäßen Derivats von Phosphatase, wie oben beschrieben, abzugeben und/oder die Synthese davon zu induzieren, entweder als solches oder als aktive Komponente einer pharmazeutischen Zusammensetzung. Vorzugsweise liegt die pharmazeutische Zusammensetzung in einer Form vor, welche die aktive Komponente in die Lage versetzt, in den Blutstrom einzutreten.

[0052] Um zu untersuchen, ob der Endotoxin entgiftende Mechanismus in Gegenwart dieses bakteriellen Produkts hochreguliert ist, wurden menschliche Neutrophile isoliert, mit Endotoxin vorinkubiert und auf eine alkalische Phosphataseaktivität getestet. So wurden Neutrophile mittels Standardverfahren aus normalen menschlichen Spendern isoliert und in sterilem Medium gesammelt. Die Neutrophilen wurden während des Isolierungsprozesses nicht aktiviert, wie durch Messungen der Superoxidanion-Produktion durch diese Zellen beurteilt wurde. Anschließend wurden die Zellen ($0{,}9 \times 10^7$ Zellen/ml) bei 37°C in Puffer, supplementiert mit Endotoxin (20 pg/ml) oder Salzlösung, inkubiert. Nach 30 Minuten wurde die alkalische Phosphataseaktivität in diesen Proben mittels Standardverfahren mit pNPP als Substrat bei pH 9,8 gemessen. Die Phosphataseaktivität wurde mit und ohne Levamisol (1 mM) gemessen, welches zu dem Medium zugesetzt wurde. Die Ergebnisse zeigen eine 335%ige Erhöhung bezüglich der durch Endotoxin induzierten neutrophilen alkalischen Phosphataseaktivität (**Fig. 6**), welche mit der angenommenen Funktion dieses Enzyms im Einklang steht.

[0053] Ein Verfahren zur Verhinderung des Auftretens eines pathologischen Zustandes, welcher durch Endotoxin oder ein Derivat davon mit Endotoxinaktivität verursacht wird, wobei das Verfahren die Stimulierung der Phosphataseaktivität, insbesondere durch Erhöhung der endogenen alkalischen Phosphataseaktivität, zum Beispiel durch Erhöhung der Produktion davon, in einem Individuum durch Verabreichen von mindestens einer der oben erwähnten Komponenten als solche oder als aktive Komponente einer pharmazeutischen Zusammensetzung an das Individuum umfaßt, ist auch im Schutzumfang der Erfindung eingeschlossen. Ebenfalls eingeschlossen ist ein Verfahren zur Verhinderung des Auftretens eines pathologischen Zustandes, welcher durch Endotoxin oder ein Derivat davon mit Endotoxinaktivität verursacht wird, nach einer Transplantation oder Transfusion, umfassend das Unterziehen des zu transplantierenden oder zu transpundierenden Materials einer Behandlung zur Stimulation der Phosphataseaktivität, insbesondere durch Erhöhung der Aktivität der endogenen alkalischen Phosphatase, zum Beispiel durch Erhöhung der Produktion dieser Substanz, durch Verabreichung von mindestens einer der folgenden Komponenten:
– einer Substanz zur Stimulierung der Phosphataseaktivität, insbesondere durch Erhöhung der Aktivität von endogener Phosphatase oder einem Derivat davon mit einer entgiftenden Aktivität für ein Endotoxin oder für ein Derivat eines Endotoxins mit Endotoxinaktivität;
– einem Vehikel, welches in der Lage ist, die Substanz zur Stimulierung der Phosphataseaktivität als solche oder als aktive Komponente einer pharmazeutischen Zusammensetzung an das Individuum abzugeben und/oder die Synthese davon zu induzieren. Eine geeignete Ausführungsform dieses Aspekts der Erfindung ist ein Verfahren zur Erhöhung des Vorkommens von alkalischer Phosphatase, vorzugsweise endogener alkalischer Phosphatase, in dem Körper, dem Gewebe oder der Körperflüssigkeit eines Tieres oder Menschen, umfassend die Applikation von mindestens einer der oben erwähnten Komponenten zur Stimulierung der Phosphataseaktivität als solche oder als aktive Komponente einer Zusammensetzung.

[0054] Zusammenfassend kann aus den oben beschriebenen Experimenten gefolgert werden, daß Enzymzubereitungen, die auf einer alkalischen Phosphataseaktivität basieren, in der Lage sind, Endotoxin zu dephosphorylieren, wodurch die Toxizität dieses Moleküls in vitro und in vivo vermindert wird. Die physiologische Aktivität dieses Enzyms ist besonders groß, wenn es mit negativ geladenen Resten assoziiert ist, welche die geeigneten Bedingungen einer Mikroumgebung vorsehen. Außerdem kann die alkalische Phosphataseaktivität in Zellen des Abwehrsystems des Wirtes hochreguliert sein, wodurch eine natürliche Schranke gegen Endotoxin vorgesehen wird.

Erklärung der Zeichnungen

Fig. 1

[0055] Alkalische Phosphataseaktivität in Kryostatschnitten von Darm (A) und Niere (B) einer Ratte, dargestellt bei pH 9,0 mit dem Substrat β-Glycerophosphat. Die Figuren C und D zeigen die Phosphataseaktivität in Schnitten von Darm (C) und Niere (D), dargestellt mit Endotoxin als Substrat bei pH 7,4. Eine signifikante Dephosphorylierung von Endotoxin ist entlang der Darmkrypten (Fig. C) und in den Tubulus-Bürstensäumen der Niere (Fig. D) zu beobachten, was der Lokalisierung der alkalischen Phosphataseaktivität entspricht (Fig. A &

B). Außerdem wird diese Aktivität in Darmschnitten durch Zugabe von L-Phenylalanin vermindert (Fig. E), während die Endotoxin-Dephosphorylierung in Nierenschnitten durch Levamisol vollständig inhibiert wird (Fig. F). Abkürzung: m = Medulla. Vergrößerung: 35 × (A, B), 140 × (C, E) und 56 × (D, F).

Fig. 2

[0056] Phosphataseaktivität, ausgedrückt als Freisetzung von anorganischem Phosphat (Pi) pro Stunde, in Suspensionen von Tubulus-Bürstensäumen bei verschiedenen pH-Werten mit Endotoxin als Substrat. Die Phosphataseaktivität mit dem Substrat para-Nitrophenolphosphat (pNPP) ist in der oberen linken Ecke gezeigt. Die Tubulus-Bürstensaumfragmente wurden aus der Rinde von PVG-Ratten-Nieren isoliert und zu 250 µl 2-Amino-2-methyl-1,3-propandiol-Puffer, enthaltend E. coli-Endotoxin (1,25 mg/ml) oder pNPP (0,5 mg/ml), bei verschiedenen pH-Werten zugegeben. Unmittelbar vor der Inkubation wurden 2 mM $MgCl_2$ zugesetzt. Die gestrichelten Linien geben die Phosphataseaktivität in Gegenwart von Levamisol (0,2 mM) an. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurden die Konzentrationen an anorganischem Phosphat abgeschätzt, wie bereits beschrieben wurde (Ref. 29). Die Ergebnisse sind als arithmetisches Mittel (± SD) von 6 Tests ausgedrückt, wobei jeder Test in doppelter Ausfertigung durchgeführt wurde. Die Ergebnisse zeigen, daß eine maximale Dephosphorylierung von Endotoxin bei pH 8,8 erfolgt, während bei der Dephosphorylierung von pNPP eine stetige Erhöhung bis pH 9,8 zu beobachten ist.

Fig. 3

[0057] Phosphataseaktivität, ausgedrückt als Freisetzung von Phosphat (Pi) pro Stunde, in Suspensionen von Tubulus-Bürstensäumen bei verschiedenen pH-Werten mit Endotoxin (Fig. A) oder pNPP (Fig. B) als Substrat. Die Substrate wurden für 30 Minuten mit entweder 0,5% Polyethylenimin (PEI), 0,75% Poly-L-lysin (Lys) oder destilliertem Wasser (C) vorinkubiert. Anschließend wurden die Inkubationen ausgeführt, wie in Fig. 2 beschrieben ist. Die Ergebnisse sind als das arithmetische Mittel von 4 Tests ausgedrückt, wobei jeder Test in doppelter Ausfertigung durchgeführt wurde (± SD).

Fig. 4

[0058] Zur Abschätzung der Endotoxintoxizität in vivo wurde eine lokalisierte Shwartzman-Reaktion (Ref. 16) in der Haut von PVG-Ratten an verschiedenen Stellen auf dem Rücken ausgelöst. Vor der Injektion wurden alle Medien mit 6 µg Tubulus-Bürstensaumfragmenten, enthaltend eine alkalische Phosphataseaktivität (A), oder mit 0,9%iger Salzlösung (S) inkubiert (1 Stunde, 37°C). Falls angegeben, wurde der alkalische Phosphatase-Inhibitor Levamisol (L) zugegeben (Endkonzentration 1,0 mM). Zwei Stunden nach den intradermalen Injektionen wurden die Hautstellen auf eine Einwanderung von Zellen untersucht, welche freie Sauerstoffradikale erzeugen, wobei der Nachweis histochemisch mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) auf der Lichtmikroskop-Ebene[17] erfolgte. Jeder Test wurde in doppelter Ausfertigung auf derselben Ratte durchgeführt, und die Ergebnisse sind als das arithmetische Mittel (± SD) von 6 Ratten ausgedrückt.

Fig. 5

[0059] Effekt von Endotoxin auf die Serumspiegel der Aktivität von Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT), welche auf die Schädigung von Leberzellen hinweist, in PVG-Ratten. Ein Teil der Tiere wurde mit Levamisol (L; 10 mg/kg, b.w.) bei t = –24 h und –1 h vorbehandelt. Bei t = 0 erhielten die Ratten intravenös entweder 0,5 mg Endotoxin aus E. coli (E) oder 0,5 ml Salzlösung. Die Ergebnisse sind als arithmetisches Mittel (± SD von 4 Ratten) pro Gruppe ausgedrückt.

Fig. 6

[0060] Effekt von Endotoxin auf die Aktivität von alkalischer Phosphatase (AP) in menschlichen Neutrophilen. Die Neutrophilen wurden mittels Standardverfahren aus Vollblut isoliert und in 0,9%iger Salzlösung mit oder ohne Endotoxin aus E. coli (20 pg/ml) für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Phosphataseaktivität dieser Zellen unter Verwendung von para-Nitrophenolphosphat als Substrat bei pH 9,8 gemessen. Levamisol (1 mM) wurde zugegeben, um die Beteilung der alkalischen Phosphatase an der Phosphatfreisetzung zu bestätigen.

[0061] Fig. 7A veranschaulicht den Prozentsatz des Überlebens von Ratten nach einer Injektion von E. coli (durchgezogene Linie), Levamisol (Le) (gestrichelte Linie mit Dreiecken) oder beidem (gestrichelte Linie mit Kreisen) längs der x-Achse gegen die Zeit in Stunden entlang der y-Achse.

[0062] Fig. 7B veranschaulicht den Prozentsatz des Überlebens von Ratten nach einer Injektion von Staphylococcus aureus (durchgezogene Linie), Levamisol (Le) (gestrichelte Linie mit Dreiecken) oder beidem (gestrichelte Linie mit Kreisen).

[0063] Fig. 8 veranschaulicht das Überleben von Mäusen nach einer Injektion von E. coli bei einer Behandlung mit alkalischer Phosphatase (gestrichelte Linie) und ohne alkalische Phosphatase (durchgezogene Linie).

Referenzen

1. Gajewski J.L. et al., Transplantation 50, 244–249 (1990).
2. Lau A.S. & Williams B.R., J. Exp. Pathol. 5, 112–22 (1990).
3. Rietschel E.Tt. et al., in Cellular and Molecular Aspects of Endotxin Reactions (Hrsg. Nowothy A., Spitzer J.J. & Ziegler E.J.), 15–32 (Elsevier Science Publishers B,V., Amsterdam, 1990).
4. Peterson A.A. & Munford R.S., Infection and Immunity 55, 974–978 (1987).
5. Parrillo J.E. et al., Ann. Intern. Med. 113. 227–242 (1990).
6. Ohlsson K. et al., Nature 348. 550–552 (1990).
7. MacSween R.N.M., Whaley K. (Hrsg.): Muir's Textbook of Pathology, 13. Auflage. Edward Arnold. London. Melbourne Auckland. Kapitel 8, S. 279–337 (1992).
8. MacSwean R.N.M., Whaley J. (Hrsg.): Muir's Textbook of Pathology, 13. Auflage. Edward Arnold. London. Melbourne Auckland. Kapitel 3. S. 73–111 (1992).
9. Skarnes R.C., in Handbook of Endotoxin., Bd. 3: Cellular Biology of Endotoxins (Hrsg. Berry L.J.), 56–81 (Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 1985).
10. Johnson K.J. et al., Am.J.Pathol. 88: 559–574. 1977.
11, Matsuura S., Kishi F. & Kajii T., Biochem. and Biophys. Res. Comm. 168, 993–1000 (1990).
12. McComb R.B., Bowers Jr. G.N. & Posen S., in Alkatine Phosphatase, 865-902 (Plenum Press. New York, London, 1979).
13. Chikkappa G., Exp. Hematol. 2D, 388–390 (1992).
14. Kaplan M.M., Hepatology 6, 526–528 (1986).
15. Stryer L., in Biochemistry (3. Auflage), S. 275–277 (W.H. Freeman and Company, New York, 1988).
16. McComb R.B., Bowers G.N., Posen S., in Alkaline Phosphatase, S.64–67 (Plenum Press, New York, Landon. 1979).
17. McComb R.B., Bowers C.N., Posen S., in Alkatine Phosphatase, S.589–590 (Plenum Press, New York, London, 1979).
18. Chikkappa G., Exp. Hematol. 20, 388–390, 1992.
19. Ashley D.J.B., in Evans' Histological Appearances of Tumours (dritte Auflage), S. 117–118 (Churchill Livingstone, Edinburgh, London, New York, 1978).
20. Goor van H., Gerrits P.O. & Hardonk M.J., J. Histochem. and Cytochem. 37. 399–403 (1989).
21. Wachstein M. & Meisel E., Am. J. Clin. Pathol. 27, 13–23 (1957).
22. Brock D.J., Lancet 11, 941–943 (1983).
23. Chandrarajan J., Klein L., Anal. Biochem. 72. 407–412 (1976).
24. Samlyo B. et al., Int. J. Immunopharmacol. 14, 131–142 (1992).
25. Levin J., Bang F.B., Bull. Johns Hopkins Hosp. 115. 265–274 (1964).
26. Brozna J.P., Semin. Thromb. Hemost. 16, 326–332 (1990).
27. Poelstra K., Hardonk M.J., Kaudstaal T. & Bakker W.W., Kidney Int. 37. 1500–1508 (1990).
28. Scholtens H.B., Hardonk M.J., Meijer D.K.F., Liver. 2. 1–13, (1982).
29. Rambaldi A. et al., in Blood, Bd. 76, Nr. 12 (15. Dezember), 1990: p. 2565–2571.
30. Yuo A. et al., in Blood, Bd. 70, Nr. 2 (August), 1987: s. 404–411.
31. Clubb J.S., Neale F.C., & Posen S., J. Lab. & Clin. Med. 66, 493-507 (1965).
32. Bos van den T. & Beertsen W., J. Biomed. Mat. Res., in Druck (1994).
33. Ecarot B. et al., J. Bone Miner. Res. 7, 523–530 (1992).
34. McComb R.B., Bowers G.N. & Posen. S., in Alkaline Phosphatase, Kapitel 9. Clinical utilization of alklaline phosphatase messurements, S. 525–786 (Plenum Press. New York, London, 1979).
35. Ross M.H., J. Nutr. 97, 565 (1989).
36. Kaplow L.S., Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 2, 243, (1971).
37. Mueller M., Kappas A. & Damgaard E., J. Clin. Invest. 43. 1905 (1964).

Patentansprüche

1. Verwendung eines Proteins, das alkalische Phosphataseaktivität zeigt und in der Lage ist, Endotoxine zu entgiften, zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung oder Verhinderung eines pathologischen Zu-

standes, welcher aus endotoxischer Aktivität resultiert.

2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Protein, das alkalische Phosphataseaktivität zeigt, eine alkalische Säuger-Phosphatase ist.

3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Protein, das alkalische Phosphataseaktivität zeigt, humane alkalische Phosphatase ist.

4. Verwendung nach irgendeinem der Ansprüche 1–3, wobei das Protein, das alkalische Phosphataseaktivität zeigt, aus der Gruppe gewählt ist, bestehend aus plazentaler alkalischer Phosphatase, plazentalähnlicher alkalischer Phosphatase, intestinaler alkalischer Phosphatase und alkalischer Leber-/Knochen-/Nieren-Phosphatase.

5. Verwendung nach irgendeinem der Ansprüche 1–4, wobei das Protein, das alkalische Phosphataseaktivität zeigt, eine rekombinierte Phosphatase ist.

6. Verwendung nach irgendeinem der Ansprüche 1–5, wobei das Protein, das alkalische Phosphataseaktivität zeigt, chemisch modifiziert ist, um ihre Serum-Halbwertszeit zu vergrößern, verglichen mit einem korrespondierenden nichtmodifizierten Protein, das alkalische Phosphatase zeigt, wobei die erhöhte Serum-Halbwertszeit das Resultat einer chemischen Modifikation ist, die deren Bindung an Galactose-Rezeptoren durch Reduktion oder Oxidation der terminalen Galactose auf der Phosphatase verhindert.

7. Verfahren zum Entgiften von Endotoxin in einem in vitro-Präparat, wobei das Verfahren den Schritt des Inkontaktbringens des Präparats mit einem Protein nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 6, das alkalische Phosphataseaktivität zeigt, umfasst.

8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei das invitro-Präparat ein Impfstoff ist.

Es folgen 8 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Fig-1a



Fig-1b

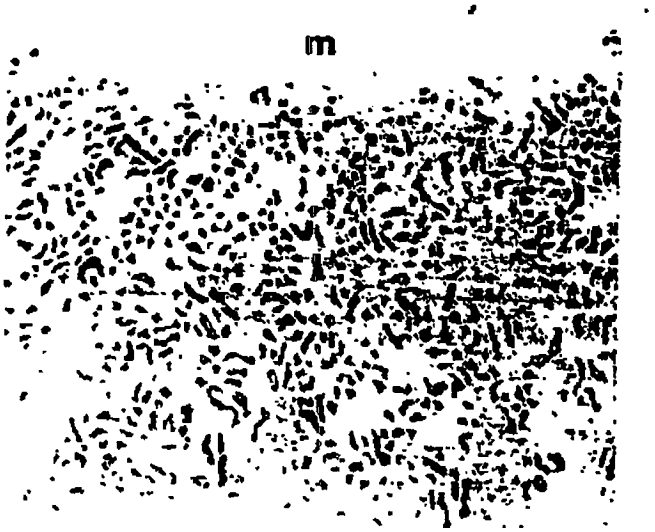


fig-1c



fig-1d



fig-1e



Fig - 1F

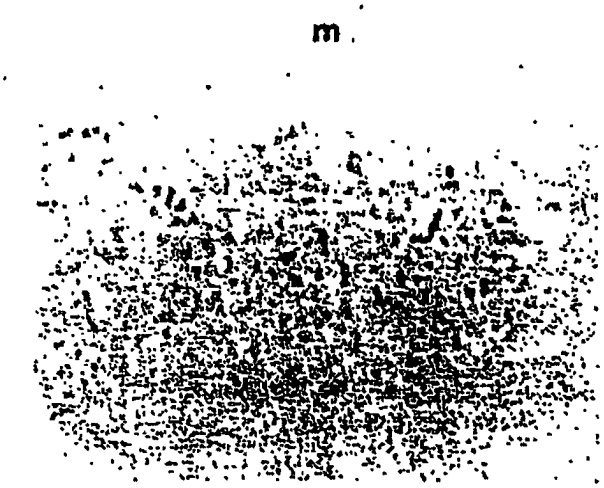


Fig - 4

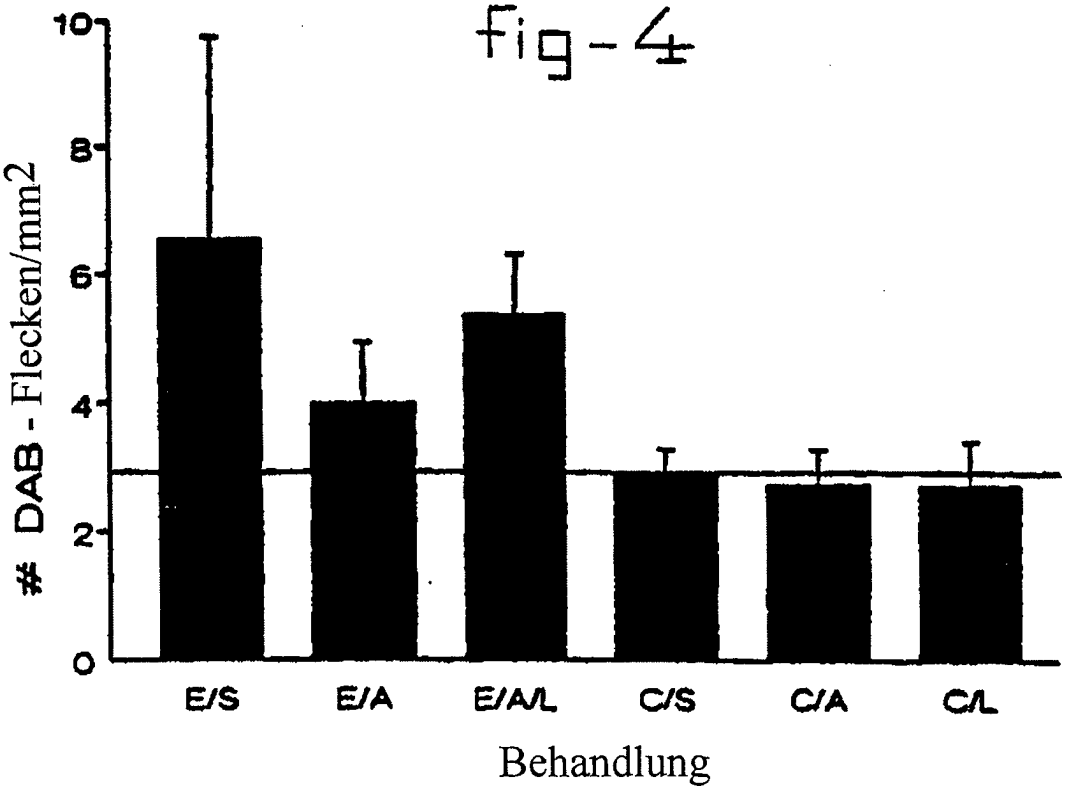


Fig-2

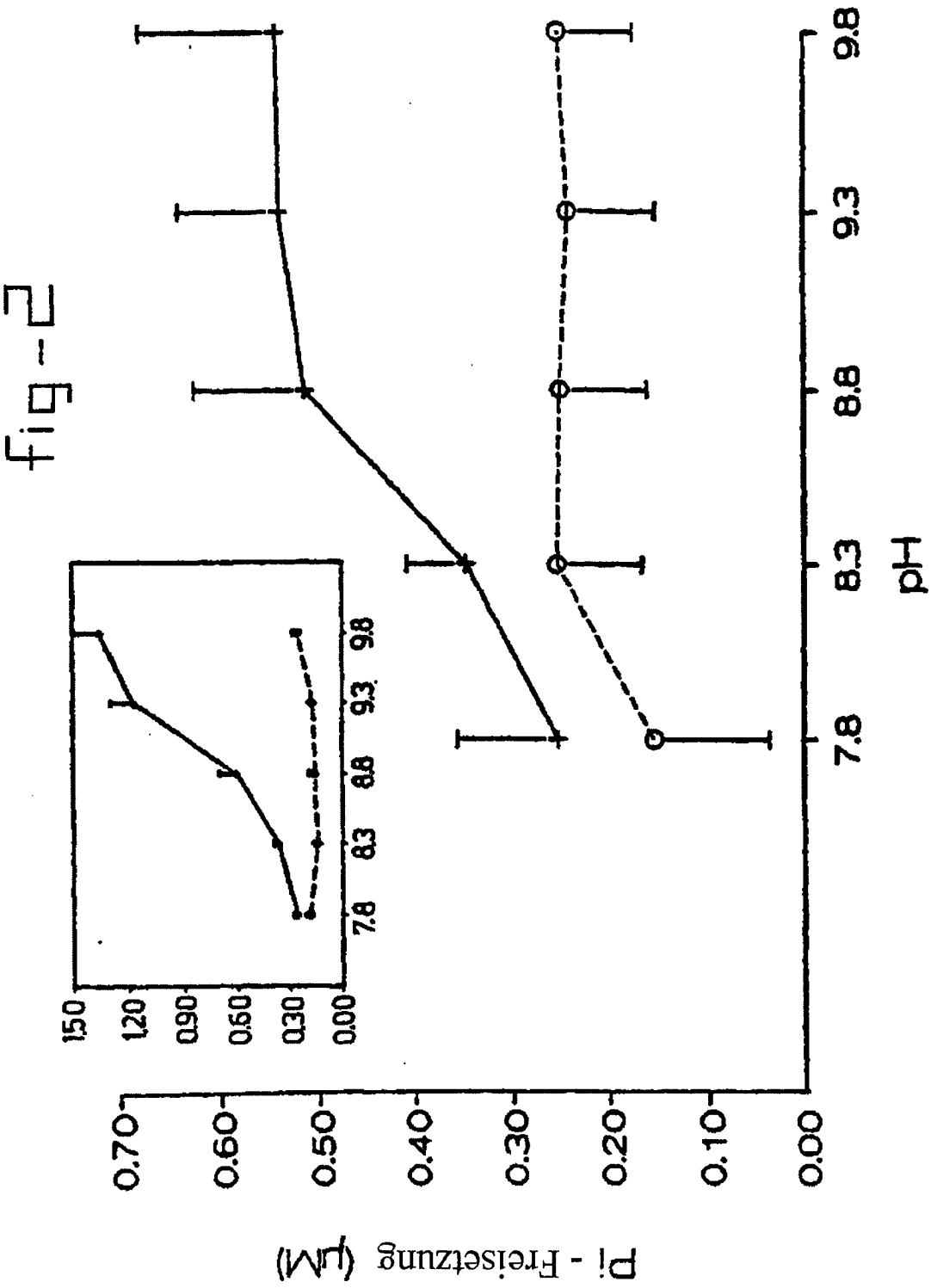

Pi - Freisetzung (µM)
0.70
0.60
0.50
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
7.8
8.3
8.8
9.3
9.8
pH
1.50
1.20
0.90
0.60
0.30
0.00

Fig - 3a

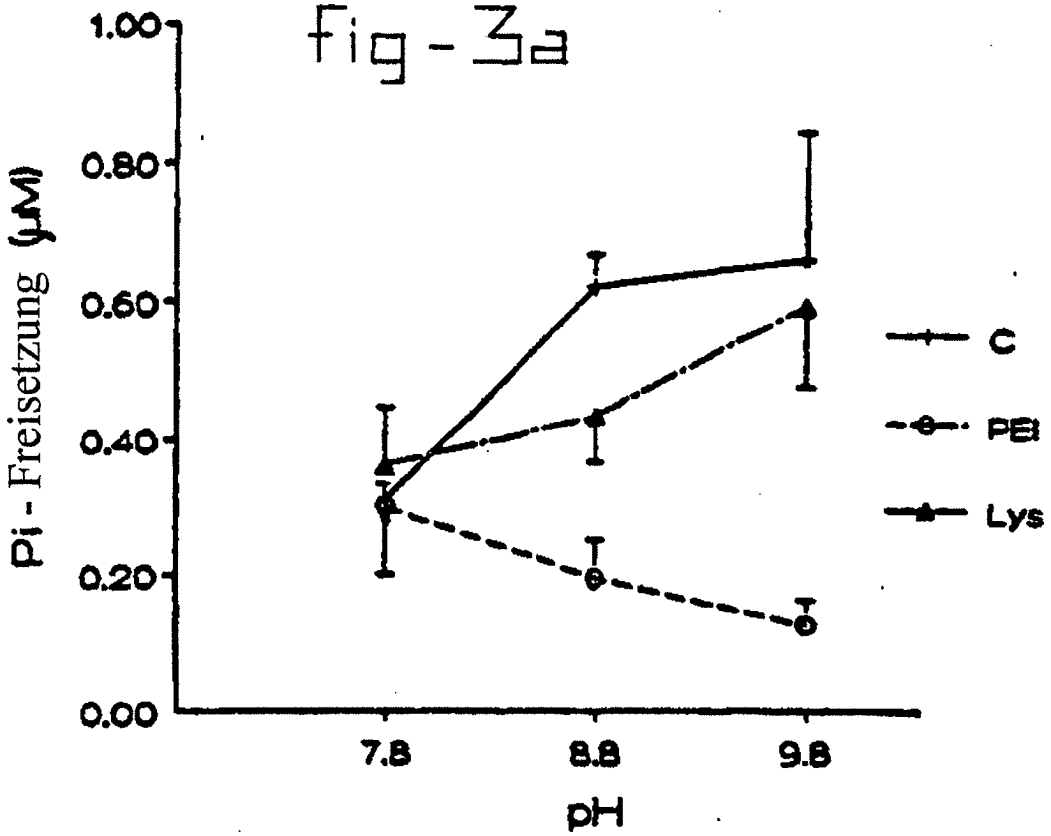

1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
Pi - Freisetzung (µM)
7.8
8.8
9.8
pH
C
PEI
Lys

Fig - 3b

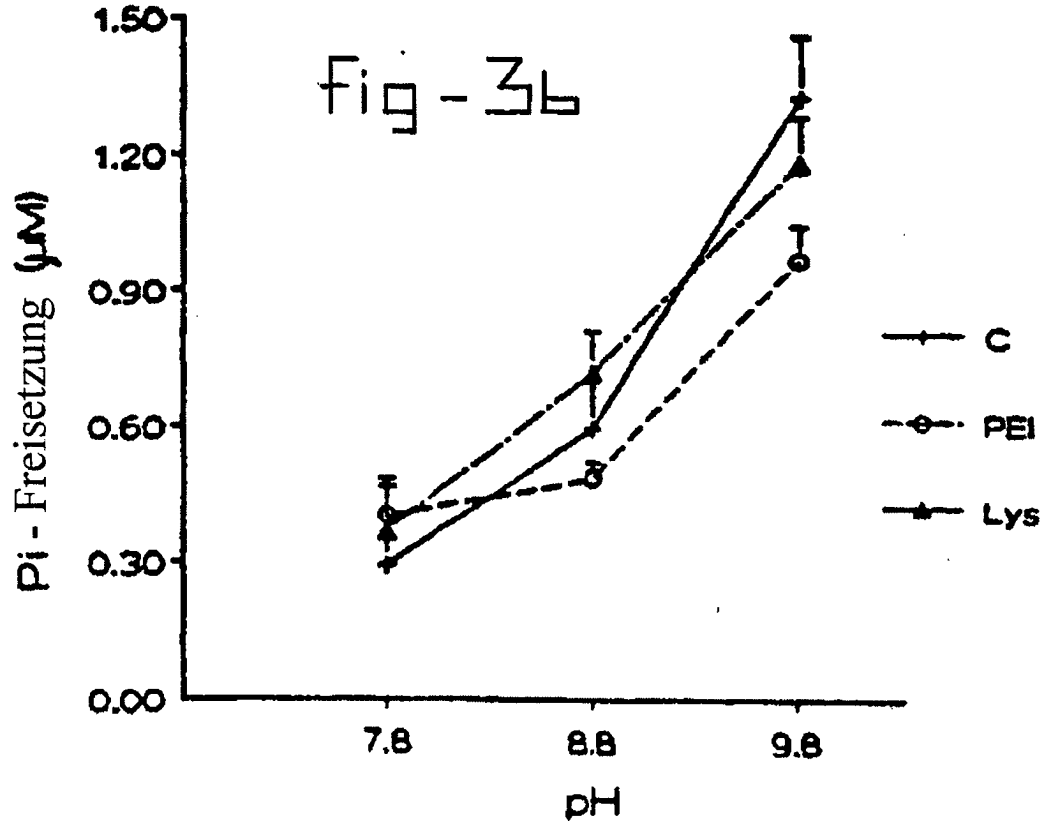

1.50
1.20
0.90
0.60
0.30
0.00
Pi - Freisetzung (µM)
7.8
8.8
9.8
pH
C
PEI
Lys

fig-5

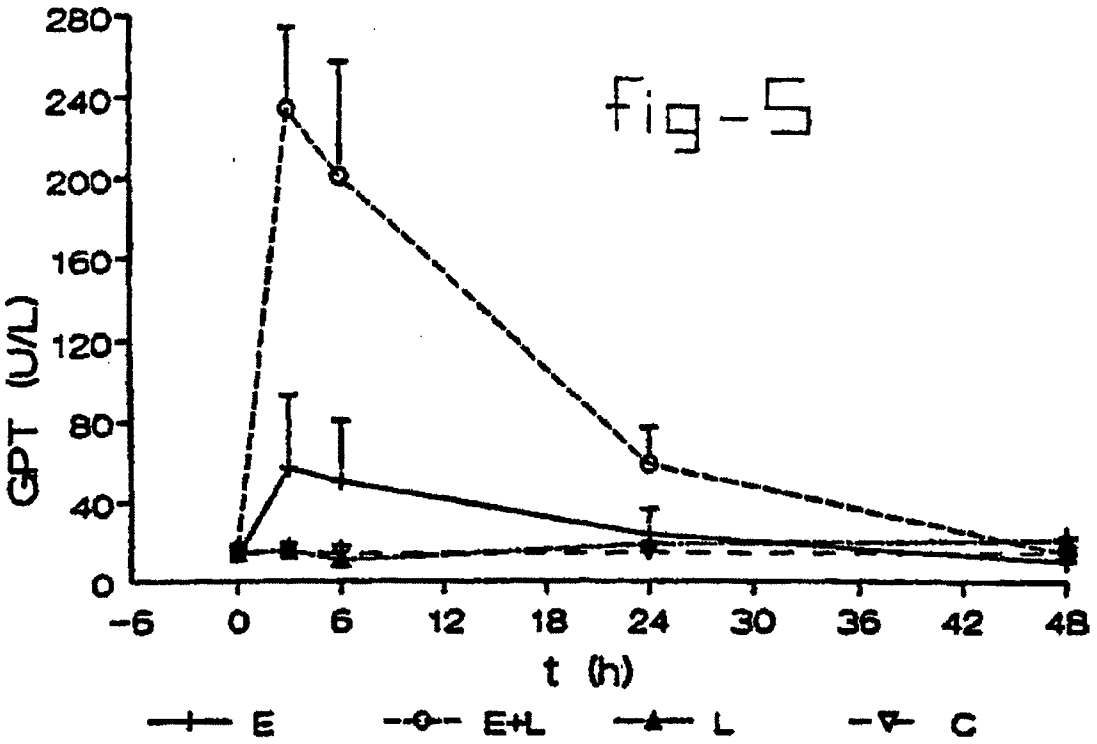

280
240
200
160
120
80
40
0
GPT (U/L)
-6
0
6
12
18
24
30
36
42
48
t (h)
E
E+L
L
C

fig-6

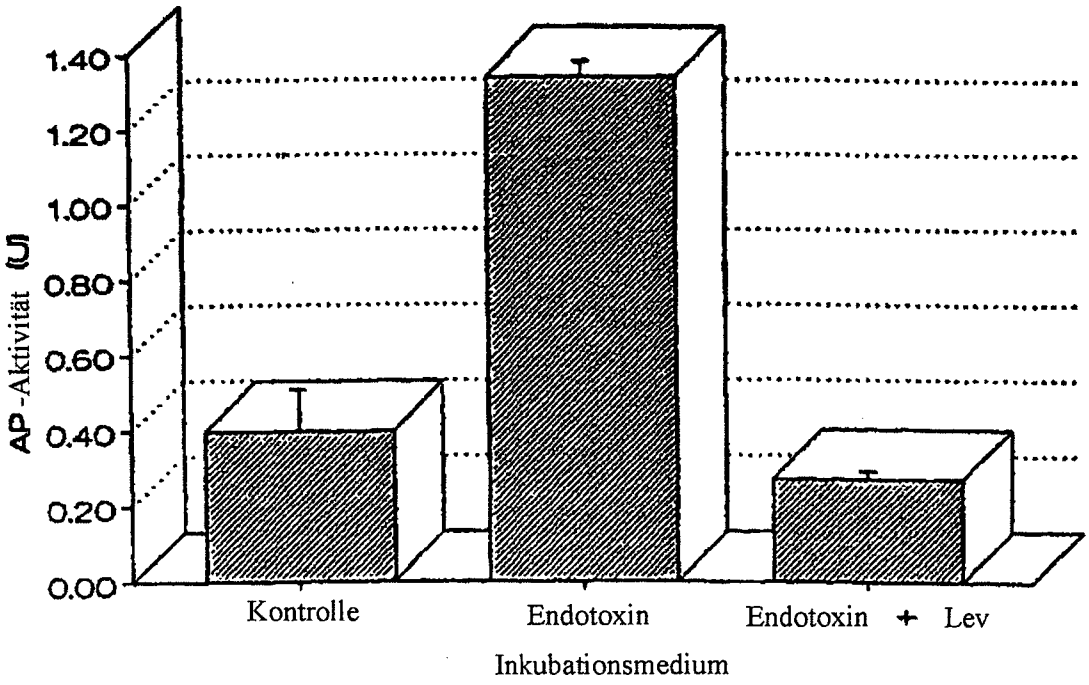

1.40
1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
AP-Aktivität (U)
Kontrolle
Endotoxin
Endotoxin + Lev
Inkubationsmedium

Fig-7a

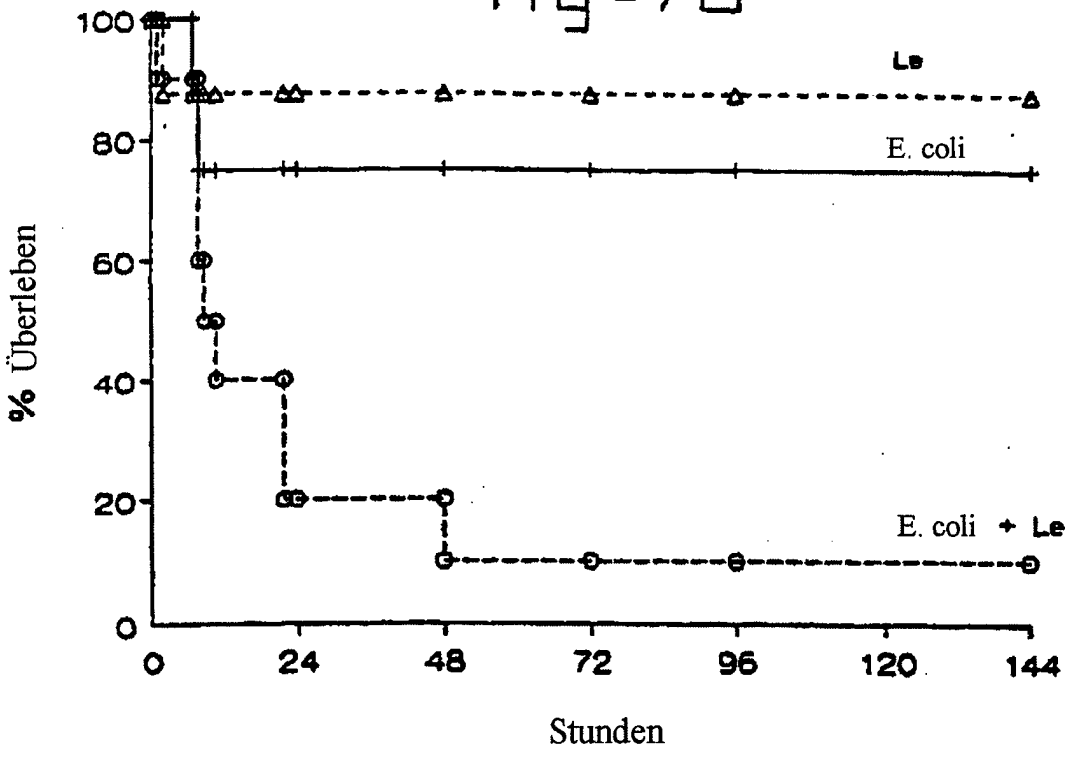

100
80
60
40
20
0
% Überleben
Le
E. coli
E. coli + Le
0
24
48
72
96
120
144
Stunden

Fig-7b

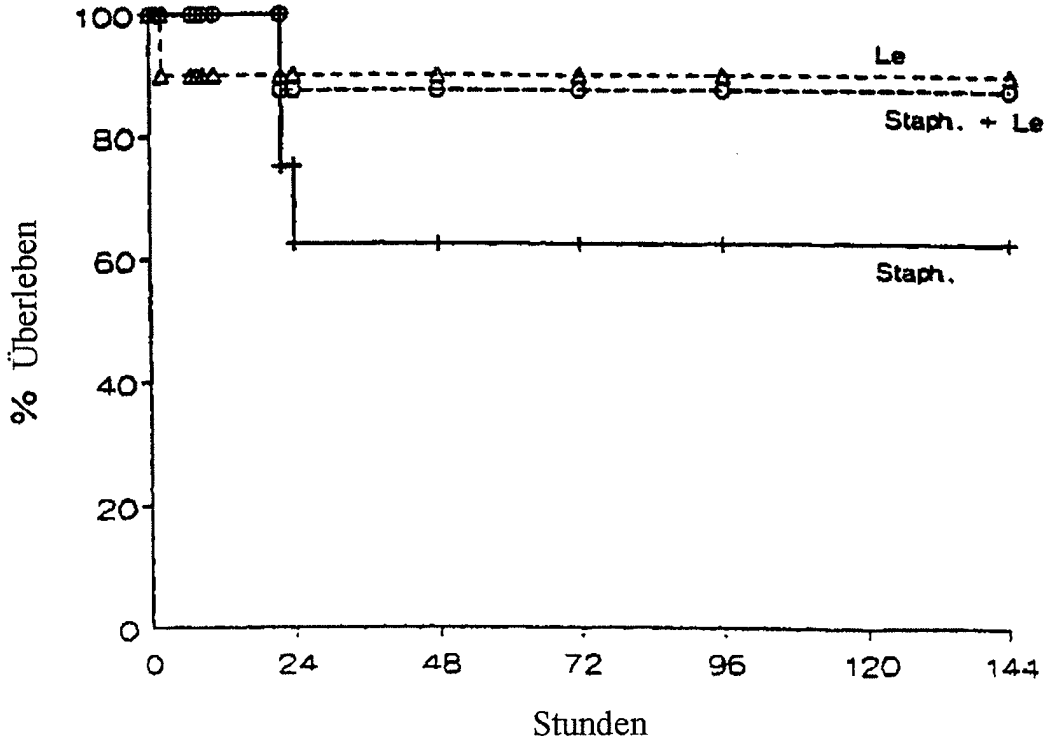
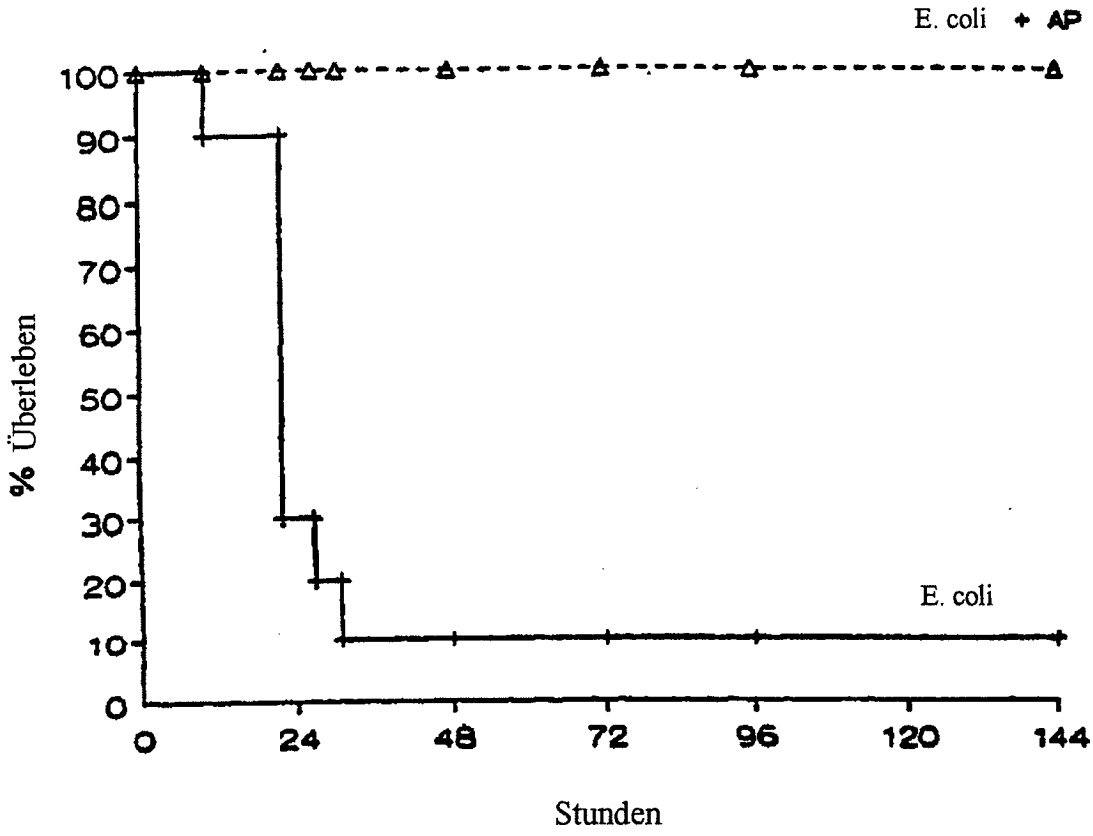

100
80
60
40
20
0
% Überleben
Le
Staph. + Le
Staph.
0
24
48
72
96
120
144
Stunden

Fig-8


E. coli + AP
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
% Überleben
E. coli
0
24
48
72
96
120
144
Stunden