NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO (11) **304679** (13) B1

(51) Int Cl[6] A 61 K 38/48, 38/46

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19921883	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	
(22) Inng. dag	13.05.1992		
(24) Løpedag	13.05.1992	(85) Videreføringsdag	
(41) Alm. tilgj.	16.11.1992	(30) Prioritet	14.05.1991, AT, 991/91
(45) Meddelt dato	01.02.1999		

(73) Patenthaver Immuno AG, Industriestrasse 67, A-1221 Wien, AT
(72) Oppfinner Johann Eibl, Wien, AT
Ludwig Pichler, Wien, AT
Hans Peter Schwarz, Wien, AT
(74) Fullmektig Oslo Patentkontor AS, 0306 Oslo

(54) Benevnelse **Anvendelse av protein C eller aktivert protein C ved fremstilling av legemiddel**

(56) Anførte publikasjoner EP A 318201, WO A 90/12028, WO A 90/08556
Am. J. of Surgery, mars 1982, 143(3), s. 356-362

(57) Sammendrag Oppfinnelsen vedrører anvendelse av protein C eller aktivert protein C ved fremstilling av et legemiddel til opprettholdelse og forbedring av mikrosirkulasjonen hos pasienter med forstyrrelser i blodomløpet, særlig med det forbehold at legemidlet ikke inneholder immunoglobulin G.

Oppfinnelsen vedrører en ny anvendelse av henholdsvis protein C og aktivert protein C ved fremstilling av et legemiddel, til opprettholdelse og forbedring av mikrosirkulasjonen hos pasienter med blodomløps-forstyrrelser samt profylakse og terapi av klinisk indikert lokal og generell Schwartzman-reaksjon, særlig med det forbehold at legemidlet ikke inneholder immunoglobulin G.

Protein C er et vitamin K-avhengig glykoprotein som blir syntetisert i leveren og som sirkulerer i plasmaet som inaktivt zymogen i en konsentrasjon på 4 µg/ml. Ved åreveggoverflaten (endotel) blir det av trombin-trombomodulinkomplekset overført til aktiv serinprotease (aktivert protein C). Det er kjent at aktivert protein C har profibrinolytiske egenskaper. Det virker også antikoagulatorisk, fordi det ved proteolyse nedbryter faktor Va, kofaktoren for den faktor Xa-induserte protrombinaktivering (trombindannelse) og faktor VIIIa, kofaktoren for den faktor IXa-induserte faktor X-aktivering.

Aktiveringen av protein C in vivo utgjør en negativ feedback-reaksjon i trombingenereringen. En fremgangsmåte for fremstilling av aktivert protein C in vitro blir f.eks. beskrevet i EP-A - 0 416 890.

Det er kjent at aktivert protein C utviser fordelaktig virkning i forbindelse med sepsis og septisk sjokk.

Det septiske sjokk er den systemiske reaksjon på frigivelse til blodomløpet av endotoksiner, lipopolysakkaridbestanddeler i celleveggen hos gramnegative bakterier. Det septiske sjokk er en av de hyppigste dødsårsaker hos sykehuspasienter. Ofte blir det som årsak til sepsis påvist gramnegativ bakteriemi.

I likhet med det septiske sjokk oppviser også Schwartzmanreaksjonen sammenlignbare patofysiologiske elementer.

Schwartzmann-reaksjonen er en hudlesjon som på grunn av betennelse, blødning og trombose er nekrotiserende, og som blir utløst gjennom lokal og etterfølgende intravenøs administrasjon av endotoksin i gramnegative bakterier. Schwartzman-reaksjonen kan knyttes til spesielle sykdomsbilder hos mennesker.

En hudlesjon som opptrer makroskopisk ved Schwartzman-reaksjonen er svært lik purpura fulminans-syndromet ved septiske tilstander (f.eks. meningokokksepsis). Purpura fulminans er et livstruende sykdomsbilde, som fører til omfattende hudnekroser og egenamputasjon av ekstremitetene. Til tross for vanlige terapiforsøk, f.eks. med antibiotika eller intensivmedisinsk behandling, er dødeligheten meget høy.

Likeledes er kroniske ulcusiøse tarmsykdommer et eksempel på Schwartzman-reaksjonen hos mennesker. Infeksjon av tarmveggen, en lokal lesjon som tilsvarer Schwartzman-reaksjonen, utløses også av sirkulerende endotoksiner.

Følgene av septisk sjokk utløst ved en infeksjon med E. coli fra bavianer, er oppsummert i Critical Care Medicine (1988). Primært kommer det til en betennelsesreaksjon og sekundært til koagulopatiske reaksjoner og celleskader. Det blir nevnt at infusjon med aktivert protein C beskytter mot de sekundære følgene av infeksjonen.

I PCT-søknad WO 90/08556 beskrives kombinasjonspreparater for behandling og profylakse av sepsis og septisk sjokk, som har et bakteriedrepende virksomt innhold av immunoglobulin G samt et blodpropp-oppløsende innhold av aktivert protein C. Anvendelse av zymogenet protein C blir frarådet på grunn av mulige vanskeligheter ved in vivo-aktiveringen.

Likeledes er det kjent fra J. Clin. Invest. (1987) at når in vivo-aktiveringen av protein C blokkeres, kan virkningen

av en infeksjon med E. coli i bavianer forverres. Dette kan til og med ved subletale doser av E. coli føre til at forsøksdyrene dør. Imidlertid kan det ved ko-infusjon av aktivert protein C forhindres at dyrene dør. En preventiv eller terapeutisk virkning av zymogen kan ikke påvises.

Videre er det kjent at mange pasienter som har for lite protein C oppviser purpura fulminans-syndromet, som virksomt behandles med et legemiddel inneholdende protein C (Blood 10, Suppl. 1: 2070, 1990). Måten denne sykdom utløses på er imidlertid meget forskjellig fra en purpura fulminans utløst ved en mikrobiell infeksjon. En lignende behandling ved sepsis-tilfeller er derfor ikke nærliggende.

Utløst ved endotoksiner kan det ved siden av purpura fulminans også komme til en dermatitis ulcerosa. Mot disse sykdomsbilder er det hittil ikke kjent noe middel for profylakse og terapi.

Foreliggende oppfinnelse har som oppgave å utvide det terapeutiske anvendelsesområde for henholdsvis protein C og aktivert protein C.

Oppfinnelsen består i anvendelse av protein C eller aktivert protein C ved fremstilling av et legemiddel som opprettholder og forbedrer mikrosirkulasjonen hos pasienter med forstyrrelser i blodomløpet, samt i anvendelse for profylakse og terapi ved klinisk indikert lokal og generell Schwartzman-reaksjon, spesielt med det forbehold at legemidlet ikke inneholder immunoglobulin G. Det har vist seg at både protein C og aktivert protein C uten kombinasjon med baktericide virkestoffer utviser en fremragende virkning i de ovennevnte tilfeller.

Protein C og aktivert protein C har vist seg å være spesielt godt egnet til behandling av forstyrrelser i blodomløpet ved maligne sykdommer, autoimmun-sykdommer, immunkom-

pleks-sykdommer, infeksjonssykdommer og ved sjokksyndrom.

Ytterligere foretrukne indikasjoner er:

- nedregulering av betennelser betinget av en nedsatt mikrosirkulasjon;
- profylakse og terapi av purpura fulminans betinget av en mikrobiell infeksjon; og
- profylakse og terapi av klinisk indikert lokal og generell Schwartzman-reaksjon.

Likeledes kan protein C i henhold til oppfinnelsen anvendes ved fremstilling av legemidler for profylakse og terapi av kronisk betente tarmsykdommer og for profylakse og terapi av dermatitis ulcerosa.

I dyreforsøk ble det påvist at både zymogenet protein C og aktivert protein C gjør Schwartzman-reaksjonen svakere. Det blir antatt at virkningsmekanismen ligger i hemming av leukocyttstimuleringen fremkalt av endotoksin og i syntese og frigjøring av cytokiner. Videre blir det antatt at endotelstimulering og ekspresjon av leukocyttadhesjonsmolekyler forhindres og leukocyttadhesjonen undertrykkes. Det kunne påvises at protein C og aktivert protein C forhindrer koaguleringsaktivisering og trombosering i mikro-blodomløpet, utløst ved mikrobiell infeksjon.

I det følgende beskrives fremstilling av protein C og av aktivert protein C, samt undersøkelse av innvirkningen på den lokale Schwartzman-reaksjon.

Utvinning av protein C

Rent protein C ble utvunnet fra en fraksjon av råprotein C som ble fremstilt av kommersielt tilgjengelig protrombin-kompleks-konsentrat. Rensing ble foretatt affinitetskromatografisk ved hjelp av monoklonale antistoffer. Monoklonale anti-protein-C-antistoffer ble fremstilt som følger:

BALB/C-mus ble immunisert med 100 µg human protein C ved intraperitoneal injeksjon med to ukers mellomrom. Etter seks uker ble det injisert 50 µg human protein C, og tre dager senere ble fusjonen foretatt. Myelomcellelinjen (P3-X-63-AG8-653, 1,5 x 10^7 celler) ble blandet med 1,7 x 10^8 miltceller fra en mus, og fusjonen ble gjennomført i henhold til en modifisert Köhler & Milestein-metode under anvendelse av PEG 1500.

Positive kloner som var undersøkt ved hjelp av ELISA, ble subklonet to ganger. Ascitesproduksjon skjedde ved injeksjon av 5 x 10^6 hybridomceller pr. BALB/C-mus to uker etter pristanbehandling.

Immunoglobulinet ble renset fra ascites ved ammoniumsulfatutfelling og umiddelbart påfølgende kromatografi ved hjelp av QAE-Sephadex (Pharmacia) og påfølgende kromatografi på Sephadex G200 (Pharmacia). For å redusere risikoen for overføring av murine virus ble antistoffet underkastet ennå et virusinaktiverinstrinn. De således erholdte monoklonale antistoffer mot protein C ble koblet til CNBr-aktivert Sepharose 4B (Pharmacia). For rensing av protein C ved hjelp av affinitetskromatografi ble det anvendt følgende buffere:

Som adsorpsjonsbuffer: 20 mM Tris, 2 mM EDTA, 0,25 M NaCl og 5 mM benzamidin; som vaskebuffer: 20 mM Tris, 1 M NaCl, 2 mM benzamidin, 2 mM EDTA, pH-verdi 7,4; som elueringsbuffer: 3 M NaSCN, 20 mM Tris, 1 M NaCl, 0,5 mM benzamidin, 2 mM EDTA.

Nærmere beskrevet: Protrombinkompleks-konsentratet ble oppløst i adsorpsjonsbuffer, ca. 10 g av protrombinkomplekskonsentratet ble anvendt for en 20 ml monoklonal antistoffkolonne. Deretter ble det oppløste prototrombinkompleks-konsentrat filtrert, sentrifugert ved 20.000 rpm i 15 min og sterilfiltrert på et 0,8 µm filter. Det steril-

filtrerte og oppløste protrombinkompleks-konsentrat ble satt på kolonnen med en strømningshastighet på 10 ml/t. Deretter ble kolonnen vasket proteinfri med vaskebufferen og endelig ble det bundne protein C eluert med elueringsbufferen ved en strømningshastighet på 5 ml/t, og fraksjonene ble samlet opp. Det eluerte protein C ble dialysert mot en buffer (0,2 mol/l Tris, 0,15 M glysin og 1 mM EDTA, pH 8,3). Protein C-innholdet ble bestemt antigenmessig ved hjelp av metoden ifølge Laurell og aktivitetsmessig ifølge Protac-aktivering.

Det erholdte protein-C-eluat ble gjort til et farmasøytisk anvendbart preparat på følgende måte:

Eluatet ble først underkastet et ultrafitrerings- og et diafiltreringstrinn. Til diafiltreringen ble det anvendt en buffer med en pH-verdi på 7,4, som inneholdt 150 mMol NaCl og 15 mMol trinatriumcitrat.$2H_2O$ pr. liter. Det erholdte filtrat ble frysetørket og virusinaktivert ved en 1 times dampbehandling ved 80°C ± 5°C og 1375 ± 35 mbar.

Det frysetørkede virusinaktiverte materiale ble deretter oppløst i en steril isoton NaCl-løsning, og ved hjelp av ionebyttekromatografi på Q-Sepharose¿ (Pharmacia) ble henholdsvis antistoffer og serumamyloid P som eventuelt var tilstede, fjernet. Den rensede løsning ble konsentrert ved et ytterligere ultrafiltrerings- og diafiltreringstrinn. Deretter ble det tilsatt 10 g albumin, 150 mMol NaCl og 15 mMol trinatriumcitrat til den erholdte løsning. Løsningens pH-verdi var 7,5. Muse-immunoglobulin samt faktorene II, VII, IX og X kunne ikke påvises. Deretter ble løsningen sterilfiltrert, fylt over og frysetørket. Den spesifikke aktivitet var på 14 enheter protein C/mg. En enhet protein C-aktivitet er definert som protein C-aktiviteten i 1 ml normalplasma og blir kalibrert mot den første internasjonale standard for protein C. Som aktiviteststest ble det anvendt en amidolytisk test, ved hvilken protein C ble

aktivert ved hjelp av Protac (firma Pentapharm).

Utvinning av aktivert protein C

Aktiveringen av det rensede protein C foregikk på den måte at 70 ml trombin (500 NIH enheter/ml, tilsvarende ca. 2000 NIH enheter/mg protein) ble koblet til CNBr-aktivert Sepharose 4B (Pharmacia), hvoretter protein C ble blandet med trombingelen i et forhold på ca. 6 enheter protein C til 1 enhet trombin ved 37°C og fikk være i reaksjon i 3 timer under rysting. Protein C-aktiviteten ble deretter bestemt med kromogent substrat (S 2366). Det aktiverte protein C ble så sterilfiltrert og gjort til et farmasøytisk preparat på samme måte som beskrevet ovenfor.

Innflytelse av protein C på den lokale Schwartzman-reaksjon hos kanin

Metode:

Forsøkene ble gjort på kaniner (hvite newzealendere) av begge kjønn med en vekt på 2 til 3 kilo.

I kortnarkose (20 mg/kg Ketamin + 5 mg/kg Rombun® i.m. ble hårene på bukhuden av kaniner fjernet ved barbering og under anvendelse av Depilan®. Deretter ble det tilført hvert dyr intradermalt 6 blærer på 0,2 ml endotoksin av Salmonella typhimurium (Sigma L 7261). De anvendte toksiner var på 6,25; 12,5; 25; 50; 100; og 200 µg (preparative doser). 24 timer senere ble det gitt kaninene 20 µg/kg av endotoksinet i.v. i en vene i øret (0,2 ml/kg; provokasjonsdose).

Det ble undersøkt:

A) aktivert protein C (n = 5 dyr) etter følgende skjema intravenøst: 250 E/kg umiddelbart etter provokasjonsdosen samt 50 E/kg 1, 2 og 3 timer senere. Injeksjonsvolumet var 0,25 ml/50 E.

B) Protein C (n = 7 dyr), 500 E/kg i.v. umiddelbart etter

provokasjonsdosen samt 100 E/kg 1, 2 og 3 timer senere. Injeksjonsvolumet var 0,8 ml/100 E.

C) Til hver forsøksgruppe (A, B) ble det opprettet en kontrollgruppe (n = henholdsvis 6 og 7 dyr). Disse dyr fikk utover de preparative endotoksiner og provokasjonsdosen ingen ytterligere behandling.

Bedømmelse av hudforandringene ble foretatt 6, 24 og 48 timer etter provokasjonsdosen. De parametere som ble bedømt var "fortykning og svelling" (0 - 3), "størrelse" (0 - 4), "farve" (0 - 4) og "ringdannelse" (0 - 1) (Tallene i parentes angir vurderingstallene som ble brukt for å kvantifisere hver enkelt parameter). Vurderingstallene for de enkelte parametere ble så addert til en samlet poengsum, som karakteriserte omfanget av den enkelte hudforandring.

For den samlede poengsum pr. dosegruppe ble gjennomsnittet funnet både for dyrene i forsøksgruppen og for kontrolldyrene, og de er oppført i tabellen. Disse resultater baserer seg på 6 timers-verdiene.

Resultater:
Det ble registrert hudlesjoner som var fra petekkialt røde til sterkt intradermal hemoragiske med skorpedannelse på overflaten. Graden av hudskade var avhengig av dosen av preparativ toksininjeksjon og av behandlingen med testsubstanser. Som det fremgår av tabellen er forandringene hos ubehandlede kontrolldyr svært store, men hos behandlede kaniner (aktivert protein C, protein C) er de bare svakt utviklet.

Tabell

Schwartzman-reaksjon i kaniner

Behandlingsgruppe	n	Hudlesjoner, vurderingstall (gj.snitt), på de steder som fikk preparativ toksininjeksjon (μg)					
		6,25	12,5	25	50	100	200
A	5	0,4	0,2	2,8	4,6	5,0	5,8
C_A	6	2,5	4,7	5,4	8,3	8,7	9,7
B	7	1,0	1,1	2,0	3,3	3,6	5,4
C_B	5	1,2	2,2	4,8	7,0	7,8	8,4

Aktivert protein C (400 E/kg i.v.) og protein C (800 E/kg i.v.) er likeverdige med hensyn til den utviste beskyttende virkning. Hvis man oppstiller gjennomsnittsverdien av vurderingstallene (se tabellen) logaritmisk, vil kurvene for dosevirkningen være parallelle.

Forbehandling med aktivert protein C og protein C forskyver de kurver for dosevirkning som er funnet for de tilsvarende kontroller mot høyre med en faktor på 4, mot høyere doser.

P a t e n t k r a v

1. Anvendelse av protein C eller aktivert protein C ved fremstilling av et legemiddel til opprettholdelse og forbedring av mikrosirkulasjonen hos pasienter med blodomløpsforstyrrelser samt for profylakse og terapi av klinisk indikert lokal og generell Schwartzman-reaksjon, særlig med det forbehold at legemidlet ikke inneholder immunoglobulin G.

2. Anvendelse av protein C eller aktivert protein C ved fremstilling av et legemiddel ifølge krav 1 til behandling av forstyrrelser i blodomløpet ved maligne sykdommer, autoimmun-sykdommer, infeksjonssykdommer og ved sjokksyndrom.

3. Anvendelse av protein C eller aktivert protein C ved fremstilling av et legemiddel ifølge krav 1 eller 2 for å nedregulere betennelsesprosesser betinget av en nedsatt mikrosirkulasjon.

4. Anvendelse av protein C eller aktivert protein C ved fremstilling av et legemiddel ifølge ethvert av kravene 1 til 3 for profylakse og terapi av Purpura fulminans som er betinget av mikrobiell infeksjon.

5. Anvendelse av protein C eller aktivert protein C ved fremstilling av et legemiddel ifølge krav 1 for profylakse og terapi av klinisk indikert lokal og generell Schwartzman-reaksjon.

6. Anvendelse av protein C eller aktivert protein C ved fremstilling av et legemiddel ifølge krav 5 for profylakse og terapi av kroniske tarmbetennelser.

7. Anvendelse av protein C eller aktivert protein C ved fremstilling av et legemiddel ifølge krav 5 for profylakse og terapi av Dermatitis ulcerosa.