



(19) Országkód

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR
SZABADALMI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

217 609 B

(21) A bejelentés ügyszáma: P 94 01817

(22) A bejelentés napja: 1994. 06. 17.

(30) Elsőbbségi adatok:

P 43 20 294.2 1993. 06. 18. DE

(51) Int. Cl.⁷

A 61 K 38/02

(40) A közzététel napja: 1995. 01. 30.

(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 2000. 03. 28.

(72) Feltalálók:

dr. Eibl, Johann, Bécs (AT)

dr. Lozano-Molero, Miguel, Barcelona (ES)

Schwarz, Hans-Peter, Bécs (AT)

(73) Szabadalmas:

Baxter AG, Bécs (AT)

(74) Képviselő:

DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.,
Budapest

(54) **Eljárás natív humán C-proteint tartalmazó, trombocitaaggregációt gátló
gyógyászati készítmény előállítására**

KIVONAT

A találmány tárgya eljárás hatóanyagként natív humán C-proteint tartalmazó gyógyászati készítmény előállítására, amelyre jellemző, hogy az ismert módon előállított hatóanyagot gyógyászati készítmények előállítása során szokásosan alkalmazott segédanyagok-

kal együtt trombocita, trombocitamikrorészecskék és az alvadási folyamatban szerepet játszó fehérvérsejtek lerakódásának és/vagy kicsapódásának megelőzésére és kezelésére alkalmazható gyógyászati készítményé alakítják.

A találmány tárgya eljárás natív humán C-proteint tartalmazó trombocitaaggregációt gátló gyógyászati készítmény előállítására, amely elsősorban trombociták lerakódásának és/vagy kicsapódásának megelőzésére és kezelésére alkalmazható.

A humán C-protein (továbbiakban h-C-protein) egy K-vitamin-függő protein, ami a májban szintetizálódik és inaktív zimogénként 4 ml/l koncentrációban vesz részt a keringésben. A trombin-trombomodulin komplex segítségével alakul át aktív szerinproteázzá (aktivált h-C-protein, a továbbiakban aktív h-C-protein) a véredények falának felszínén (endothelium). Ismert, hogy az aktív h-C-protein profibrinolitikus tulajdonságú. Antikoaguláns hatással is rendelkezik, minthogy proteolízissel inaktiválja az Va-faktort, ami a Xa-faktor indukálta protrombinaktiválás (trombinképzés) kofaktora, valamint a VIIa-faktort, ami a IXa-faktor indukálta X-faktoraktiválás kofaktora. A h-C-protein aktiválása in vivo a trombinképzés negatív visszacsatolását okozza. Az optimális biológiai aktivitás kifejlődéséhez szükséges egy kofaktor (S-protein).

Az EP 406 216 számú európai szabadalmi leírás egy olyan gyógyászati készítményt ismertet, amely szabadon választhatóan tartalmaz S-proteint aktív h-C-proteinnel kombinálva, és trombózis és trombo-embóliás szövődmények kezelésére, illetve megelőzésére alkalmazható.

Az EP 0 519 900 számú szabadalmi leírás szerint egy h-C-proteint tartalmazó gyógyászati készítmény és egy trombolitikus hatású anyag együttes használata alkalmazható trombózis kezelésében és az ér-újraelzáródás megelőzésében. Úgy találták, hogy a trombolitikus kezelés során h-C-proteinhiány lép fel, ezért a h-C-protein pótlása tanácsos.

A natív (avagy: inaktív vagy zimogén) h-C-protein hatása alapvetően különbözik az aktív enzim, az aktivált h-C-proteinétől.

Az aktív h-C-protein lehetővé teszi artériás trombózis vagy beszűkülés megelőzését, előnyösen egy trombolitikus hatású anyaggal (szöveti plazminogén aktivátor, tPA) kombinálva; lásd EP 0 318 201.

Ismert továbbá, hogy a trombocitában gazdag vérplazmakészítményben (továbbiakban: PRP – platelet rich plasma) az aktív h-C-protein gátolja meg a trombocitaaggregációt, amit a trombin aktiválása indukál. Az aktív h-C-protein magasabb koncentrációban azonban ellentétes hatású, nevezetesen a trombociták aggregációjához vezet [E. N. Santander és munkatársai, *Acta Physiologica Latino-Americana*, 33 (2), 1983].

Az aktivált vagy stimulált trombociták IIb–IIIa glikoprotein komplexszel rendelkeznek, ami receptorként szolgál különböző odakötődő molekulának. A stimulált trombociták IIb–IIIa GP helyéhez kötődő proteinek közé tartoznak a fibrinogén, a von Willebrand-faktor és a fibronectin. Feltételezések szerint a kötődő molekulának egy tripeptidszekvenciája, nevezetesen Arg-Gly-Asp (RGD) kötődik a receptorhoz. Az RGD-szekvenciával rendelkező proteinek közé tartoznak a natív h-C-protein és az aktív h-C-protein is [Schwarz és munkatársai, *Adv. in Appl. Biotech. Series Vol. 11*, 83–89. (1990)]. Az interakció a natív h-C-protein, az

aktív h-C-protein és a trombociták között nem tisztázott. Azt találták például, hogy az aktív h-C-protein hozzákötődik a stimulálatlan trombocitához S-protein jelenlétében, és ezáltal az Va-faktor inaktiválását elősegíti. A natív h-C-protein azonban nem kötődik trombocitához [J. Biol. Chem., 260 (4), 2007–10., 1985].

5 Trombocitákra alkalmazott áramlási citometria segítségével tanulmányozhatók a trombociták felszíne. Az áramlási citometria lehetővé teszi a receptorproteinek gyors és érzékeny vizsgálatát egy egyedülálló sejten. A vizsgálatok során 400–1000 trombocita/mp az átáramlás sebessége. A trombociták méretét a fény-
10 szórás mértékével fejezzük ki. Fluoreszcein-izotiocianáttal jelölt antitestek révén a trombocita ligandjai (a kötődő proteinek) mérhetők. [Az eljárás ismertetése: Blood, 86 (1), 173–179., 1986.]

A fibrinogén kötődése a stimulált trombocitákhoz végső soron aggregációhoz és/vagy ezeknek a sérült endotheliumra rakódásához és ezáltal a sérülés elzárásához vezet. A tromboembóliás szövődmények vagy az érelzáródás ugyancsak a fibrinogénnek a stimulált trombocitákhoz való kötődésének tulajdonítható. Például a ballon angioplasztika az endothelium sérülésével jár, és ezáltal lehetőséget teremt újabb artériás elzáródásra.
20

25 A találmány tárgya az ismert módon előállított natív h-C-protein alkalmazási területének kibővítése és egy olyan készítmény előállítása, amely a trombocitakerakódás és/vagy -kicsapódás megelőzésére és kezelésére alkalmazható.

30 Az „ismert módon előállított” kifejezés az elsőbbség napja előtt ismertté vált eljárásokat öleli fel.

A találmány fenti tárgyának megvalósítása során a humán h-C-proteint egy olyan gyógyászati készítmény előállítására használjuk, amely alkalmas trombociták, trombocitamikrorészecskék és véralvadás elősegítésében szerepet játszó fehérvérsejtek lerakódásának és/vagy aggregációjának megelőzésére és kezelésére. A natív h-C-protein kivédi a lerakódást a véredények falára vagy az érszűkületknél, különösen a sérült, vírussal fertőzött vagy károsodott endothelium esetén és/vagy a felszínre került subendothelium vagy a művi érfeületek vagy az endothellel rendelkező, illetve a nélküli érprotézisek esetén. Tapasztalatok szerint a fibrinogénnek a stimulált trombocitákhoz való kötődése megelőzhető natív h-C-protein adásával dóziszfüggő módon. PRP-t stimuláltunk adenzin-difoszfát (ADP) hozzáadásával, és mértük a fibrinogénkötődést. Fibrinogénellenes fluoreszcein-izotiocianáttal jelzett antitestek hozzáadása lehetővé tette a PRP-ben a trombocitákhoz kötött fibrinogén áramlási citométerrel való mérését. A fibrinogénstimulált trombocitákhoz való kötődésének megelőzése meglepő volt, minthogy az aktív h-C-protein nem gyakorolt befolyást a fibrinogénkötődésre. Így valószínűleg a protein RGD-szekvenciája nem tehető egyedül felelőssé a fibrinogénkötődés kivédéséért.
40
45
50
55

A monoklonális antitestekkel végzett kísérletek (például PAC-1, egy IgM antitest, amelyik csak az aktív formáját ismeri fel a IIb–IIIa komplexnek; lásd S. J. Shattil, J. Biol. Chem., 260, 11107., 1985) világossá
60

tették, hogy a IIb–IIIa a GP komplex, ami a trombocita aktiválásával kerül felszínre, nem kötődik az antitestekhez a natív h-C-protein jelenlétében. Így feltételezhető a natív h-C-proteinnek a IIb–IIIa GP-hez való kompetitív kötődése. A PAC–1 helyett azonban más trombocitaaktiváció-függő epitóp elleni monoklonális antitestet is alkalmazhatunk, mint például PADGEM (J. Clin. Invest., 78, 130., 1986), GMP (J. Biol. Chem., 264, 1816., 1989) és 2.28 (Blood, 70, 838., 1987). Így a fibrinogén kötőhelye blokkolt. A többi kötődő proteinnel ellentétben a trombociták aggregációját ez nem elősegíti, hanem megakadályozza. Perfúziós kamrával végzett kísérletek alátámasztották, hogy a natív h-C-protein megakadályozta a trombociták lerakódását vérrel átáramoltatott nyúlaortában. Az endothelium stabilizálódik a natív h-C-protein jelenlétében, miáltal a stimulált trombociták lerakódása kivédett.

A C-protein natív proteinként, ezek származékaként vagy RGD-szekvenciával rendelkező mutánsként használható a találmány szerint. A C-protein ezen formáját nevezik inaktív, illetve zimogén formaként is. Ezen forma alkalmazásának az is az előnye, hogy a proteint nem kell aktiválni a fibrinogénnek vagy a von Willebrand-faktornak a stimulált trombocitához való kötődésének megakadályozására. Ezért a találmány szerint a natív h-C-protein bizonyos körülmények között – mint a homocysteinuria, diabétesz vagy uraemia – ugyancsak használható, ahol a C-protein endogén aktiválódása gátolt. A natív h-C-protein nem rendelkezik az aktív C-protein hátrányos tulajdonságával sem, amely szerint az magas koncentrációban a trombociták aggregációjához vezet.

Az áramlási citometria segítségével végzett kísérletek megerősítették, hogy a natív h-C-protein alkalmas mindenképp az artériás újraelzáródás megelőzésére. A találmány szerinti natív h-C-protein így alkalmazható mindenfajta érprotóló beavatkozás, valamint érkatéterezés esetén a stimulált trombociták egymás közötti, leukocitákkal és az endotheliummal történő interakciójának megelőzése céljából.

A natív h-C-protein megfigyelt hatásmechanizmusa alapján a találmány szerint mód nyílik a testnedvek, mint vér vagy ascites, extrakorporális (testen kívüli) kezelésére, amellyel a trombocitáknak a keringési szervekben történő lerakódását és/vagy aggregációját előzhetjük meg. Ez az eljárás például dializálókészülék vagy művese esetében is alkalmazható.

A következő példák szemléltetik a találmányt közelebbről.

Fibrinogénkötődés az aktivált PRP-hez

10 ml vért veszünk le citrátos oldatba. A PRP-hez konvencionális centrifugálással jutottunk. ADP hozzáadása a trombociták stimulációját eredményezte. Ezután fluoreszcein-izotiocianáttal jelzett fibrinogénelles antitestet adtunk hozzá, és a trombocitákhoz kötött fibrinogént áramlási citométeres (FACScan[®], Becton Dickinson) vizsgálattal határoztuk meg. A fibrinogénkötést a zöld fluoreszcens intenzitással határoztuk meg [egyparaméteres statisztika, x-tengelyen a zöld fluoreszcencia logaritmus (kötött antifibrinogén), y-tengelyen a

sejtek száma vagy pedig fényszóródás mérésével két-paraméteres analízis, x-tengelyen a zöld fluoreszcencia logaritmus, y-tengelyen a fényszóródás logaritmus (trombociták mérete)].

5 Az 1–3. ábrák mutatják a fluoreszcens intenzitást, azaz a fibrinogénkötődést a stimulált trombocitákhoz, valamint a trombociták méretét. Az 1. ábra mutatja a fibrinogénkötődést a PRP-ben ADP-stimulációt követően. Agonista alkalmazása fibrinogénkötődést eredményez a sejtfelszínhez, de a trombociták méretének megváltozását is okozza. Ezzel szemben a 2. ábra az ADP-stimuláció utáni fibrinogénkötődést olyan koncentrációjú natív h-C-protein jelenlétében mutatja, ami megfelel a plazmakoncentráció négyszeresének. A fibrinogénkötődés szignifikáns csökkenése tapasztalható. Ezzel szemben aktív C-protein jelenléte ebben a tesztkeverékben nem vezet a fibrinogénnek a trombocitákhoz való kötődésének csökkenéséhez.

PAC–1 kötődése az aktivált trombocitákhoz

20 A PAC–1 monoklonális antitest a IIb–IIIa glikoprotein komplexszel reagál a trombociták felszínén azoknak ADP-vel történő aktiválása után.

EDTA/Trasyol-oldatba vesszük le a vért. Ezután trombocitakonzentrátum-készítményt (PRP) és trombocitamentes plazmát (PPP) állítottunk elő konvencionális centrifugálással. A PRP-t 1:40 arányban hígítottuk PPP-vel. Ezután PAC–1-et adtunk hozzá ADP-vel és tetszés szerint natív h-C-proteint vagy aktív C-proteint, és szobahőmérsékleten 10 percig inkubáltuk. Egy anti-egér antitest (fluoreszceinnel konjugált, FITC a Sigma Chemical Co.-tól) hozzáadása és további 20 perc inkubációs idő után a PAC–1 kötődését a trombocitákhoz áramlási citometriás vizsgálattal határoztuk meg.

4. ábra PAC–1 kötődése PRP/ADP-hez,

35 5. ábra A PAC–1 trombocitákhoz való kötődésének megelőzése natív h-C-protein jelenlétében,

6. ábra Az aktív C-protein nem befolyásolja a PAC–1 kötődését az ADP-vel stimulált trombocitákhoz,

40 Az ábrák felső részén látható diagram az egyparaméteres statisztikát mutatja, alatta pedig a kétparaméteres statisztika található.

Trombocitalerakódás a subendotheliumba átáramoltatásos kísérletben

45 Vénás vért alvadásában gátoltuk citrát-foszfát-dextrózzal (19 mmol/l). C-proteint állítottunk elő (Immuno AG), és az alvadásgátolt vér 20 ml-éhez adtuk az átáramoltatás előtt. Az átáramoltatás 37 °C-on történt egy perfúziós kamrában (kísérleti leírás: Thromb. Haemost, 37, 1–16., 1977).

50 Nyúlból származó enzimmal kezelt aortamintákat helyeztünk a perfúziós kamrába. Egy, a hemodialízisnél használatos pumpa (Renal Systems, Minneapolis, Minn., USA) segítségével megfelelő áramlást biztosítottunk. Ötperces átáramoltatás után az aortamintákat pufferrel átmostuk és fixáltuk [glutáraldehid:formaldehid=2%:3% (térfogat/térfogat)]. Ezután beágyasztuk őket JB4-be (Polyscience, Warrington, USA), megfestettük toluidinkékkel, és morfometriás vizsgálatnak ve-

tettük alá. Egy komputerprogram (Haemostasis, 16, 8–14, 1986) segítségével a trombocitákat a következők szerint osztályoztuk: adhézió (trombocitaréteg <5 µm), trombus (aggregáció ≥ 5 µm). Mindkettőt a véredény teljes hosszának százalékos arányával fejeztük ki. Az

eredményeket az 1. táblázatban ismertetjük. Kevesebb mint 16 µg/ml koncentrációnál a natív h-C-protein nem mutat hatást a trombociták adhéziójára a kontrollhoz képest. 16 és 32 µg/ml koncentrációknál a bevont felület szignifikánsan csökkent.

1. táblázat

Trombocitakerakódás a subendotheliumra perfúziós kísérletben citráttal alvadásában gátolt vérből a natív h-C-proteinkoncentráció függvényében (n=3, átlag±SD) (átáramlás=800 s⁻¹)

	Bevont felület	Adhézió	Vérrög
Kontroll	18,1±5,3	9,3±4,5	8,8±1,9
Natív h-C-protein, 16 µg/ml	13,1±3,5	4,8±0,9	8,3±2,9
Natív h-C-protein, 32 µg/ml	9,6±5,7	4±2,5	5,6±3,4

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás hatóanyagként natív h-C-proteint tartalmazó gyógyászati készítmény előállítására, *azzal jellemezve*, hogy az ismert módon előállított hatóanyagot gyógyászati készítmények előállítása során szokásosan alkalmazott segédanyagokkal együtt trombocita, trombocitamikrorészecskék és az alvadási folyamatban szerepet játszó fehérvérsejtek lerakódásának és/vagy kicsapódásának megelőzésére és kezelésére alkalmazható gyógyászati készítménnyé alakítjuk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy érfalra, érszűkületbe, különösen sérült, vírussal fertőzött vagy károsított endotheliumra vagy felszínre

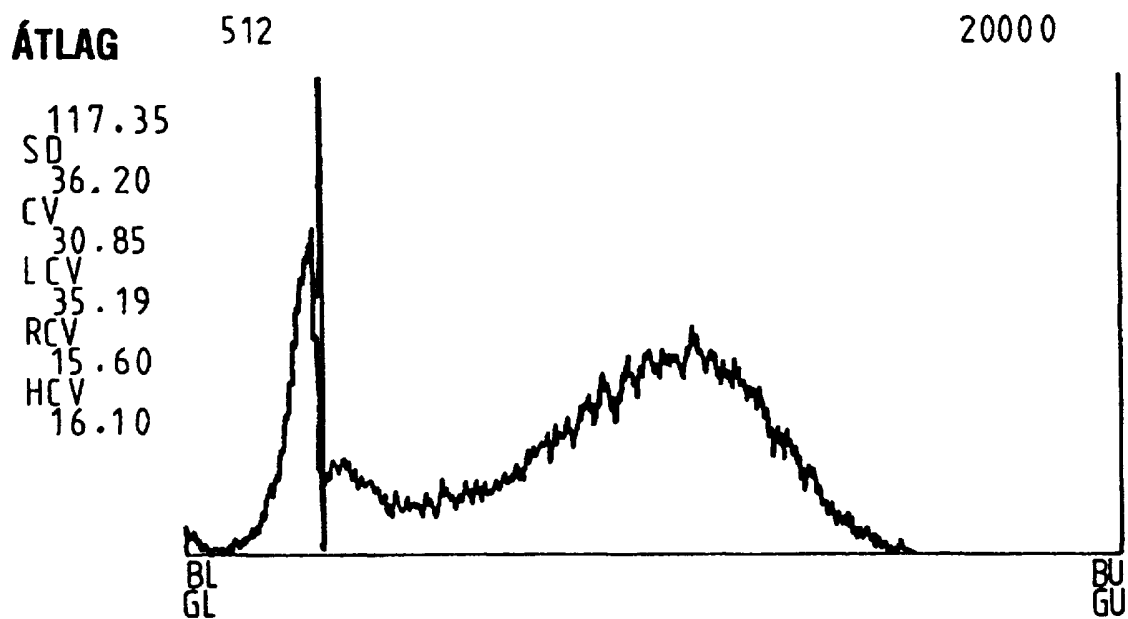
került subendotheliumra vagy műérfelszínre vagy endotheliummal rendelkező vagy a nélküli érprotézisekbe való lerakódásnak és/vagy aggregációnak kezelésére és megelőzésére alkalmazható gyógyászati készítményt alakítunk ki.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy artériás újraelzáródás megelőzésére alkalmas gyógyászati készítményt alakítunk ki.

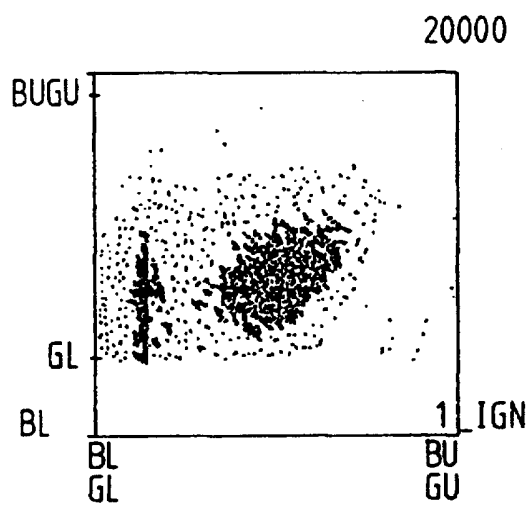
4. Eljárás trombociták lerakódásának és/vagy aggregációjának in vitro körülmények között való megelőzésére, *azzal jellemezve*, hogy natív h-C-proteint adagolunk az in vitro körülmények között kezelt vér- vagy ascitesmintához.

1. ábra

EGYPARAMÉTERES STATISZTIKA

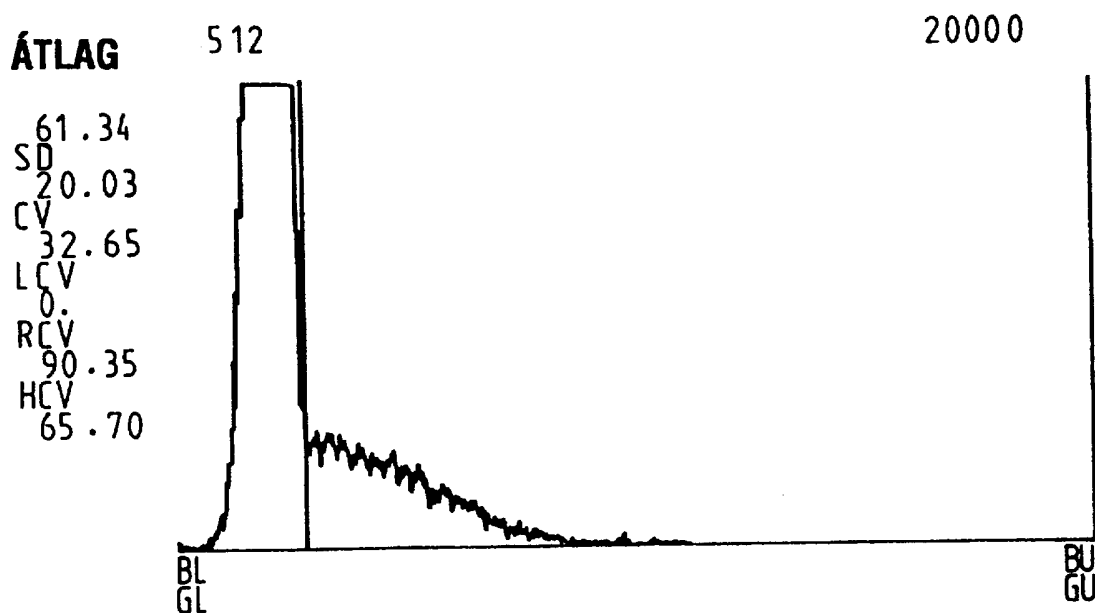


KÉTPARAMÉTERES STATISZTIKA

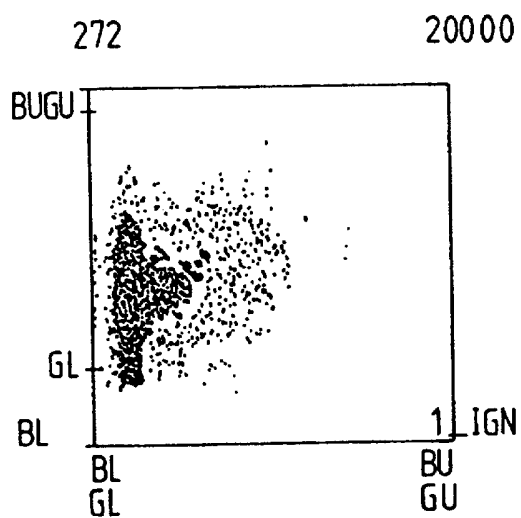


2. ábra

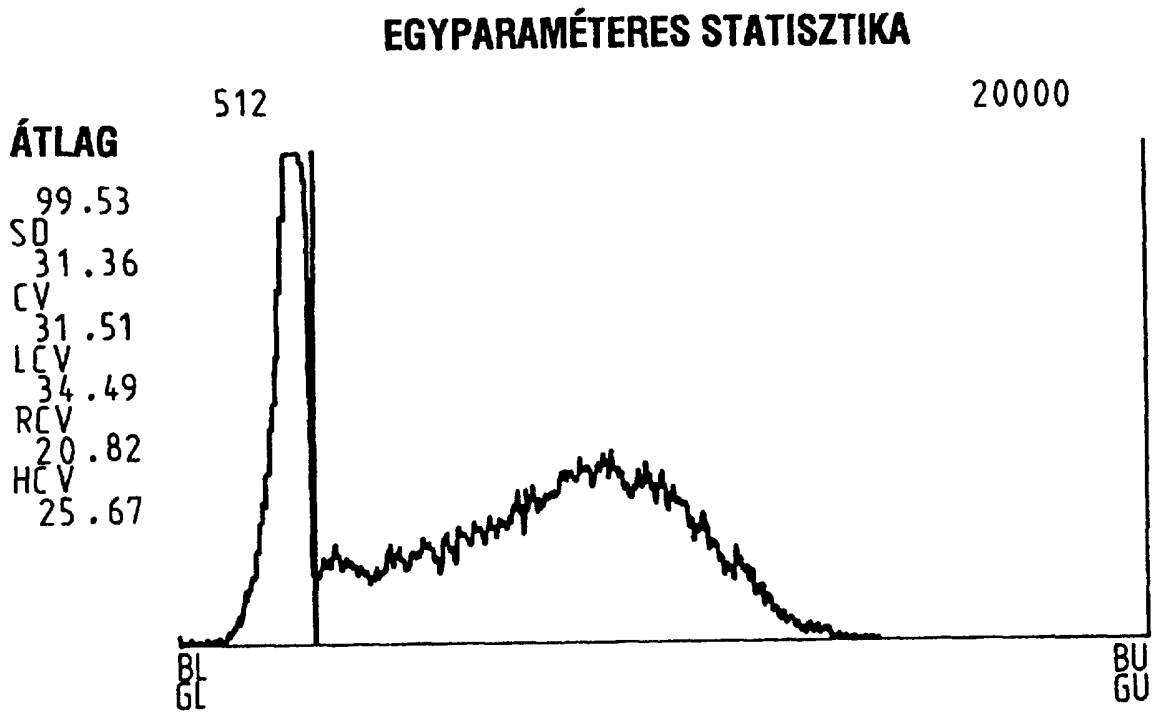
EGYPARAMÉTERES STATISZTIKA



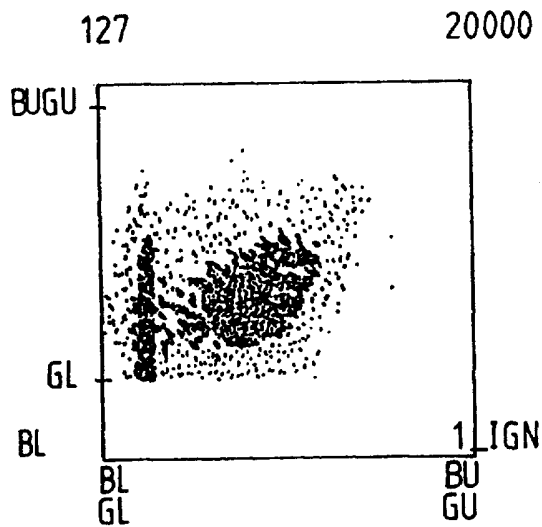
KÉTPARAMÉTERES STATISZTIKA



3. ábra

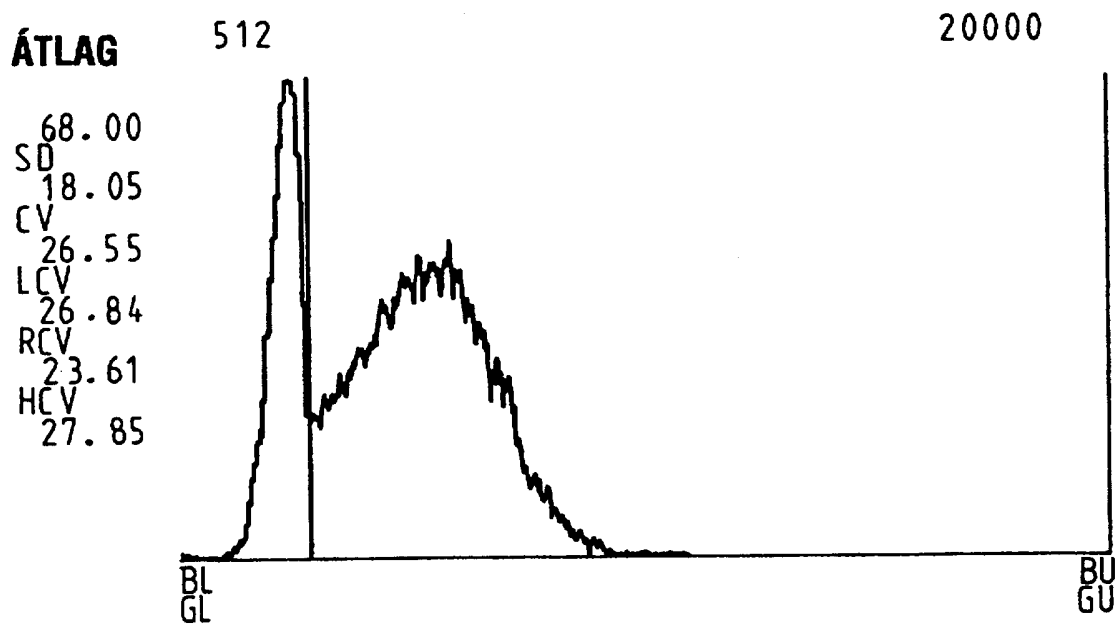


KÉTPARAMÉTERES STATISZTIKA

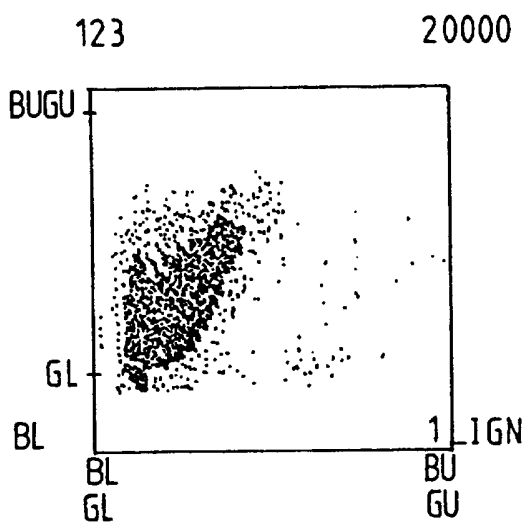


4. ábra

EGYPARAMÉTERES STATISZTIKA

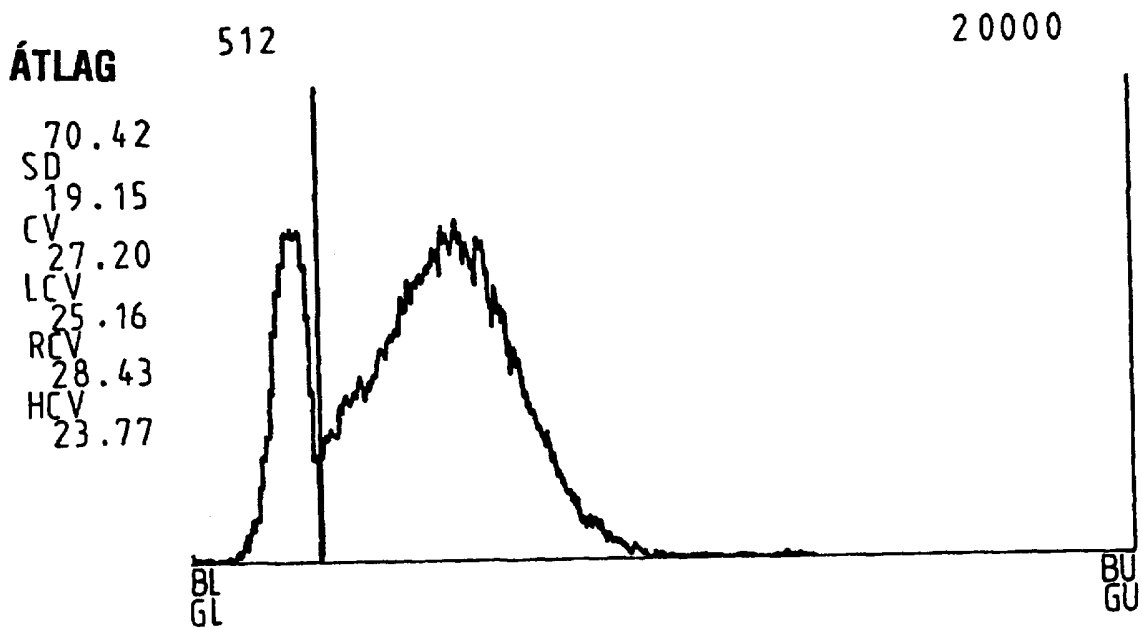


KÉTPARAMÉTERES STATISZTIKA

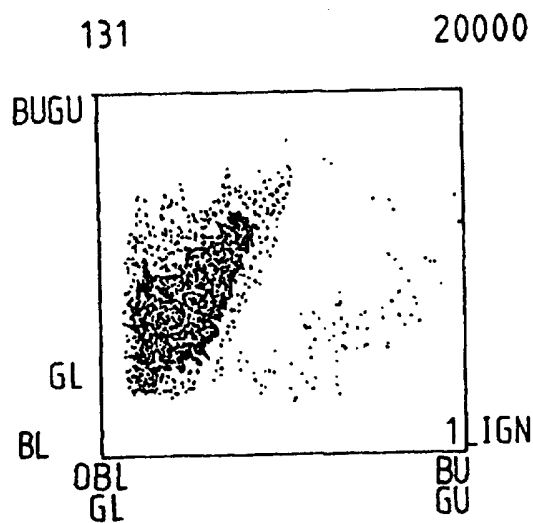


5. ábra

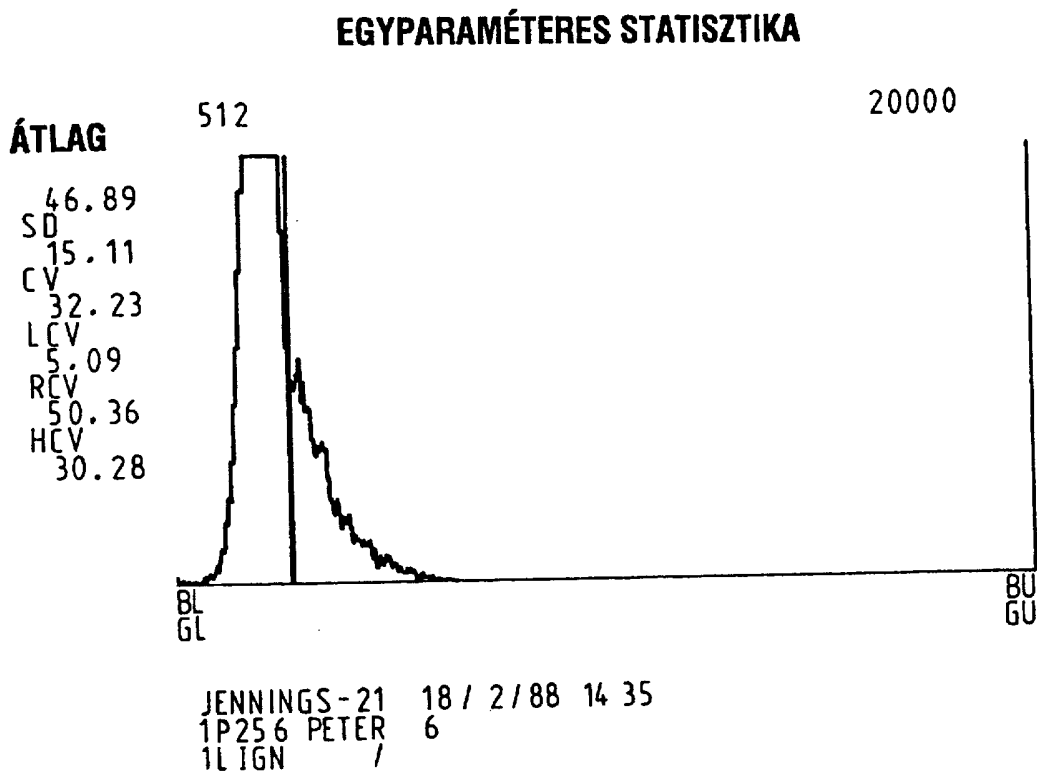
EGYPARAMÉTERES STATISZTIKA



KÉTPARAMÉTERES STATISZTIKA



6. ábra



KÉTPARAMÉTERES STATISZTIKA

