(12) **PATENT**

(19) NO (11) **316584** (13) **B1**

NORGE (51) Int Cl[7] A 61 K 38/58

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19964007	(86)	Innt.inng.dag og søknadsnr	1995.03.22 PCT/EP95/01061
(22)	Inng.dag	1996.09.24	(85)	Videreføringsdag	1996.09.24
(24)	Løpedag	1995.03.22	(30)	Prioritet	1994.03.25, US, 217618
(41)	Alm.tilgj	1996.11.25			
(45)	Meddelt	2004.03.01			

(71) Søker Roche Diagnostics GmbH,
Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim, Forbundsrepublikken Tyskland

(72) Oppfinner Stephan Fischer, Jakobifeldweg 11, D-82398 Polling, Forbundsrepublikken Tyskland
Ulrich Martin, , Mannheim, Forbundsrepublikken Tyskland

(74) Fullmektig Tandbergs Patentkontor AS,
Postboks 7085 Majorstua, OSLO, 0306, Norge

(54) Benevnelse **Kombinasjon av trombolytisk aktive proteiner og antikoagulanter samt anvendelse derav**

(56) Anførte publikasjoner Yao S-K. et al., 1992. Am J physiol, 262, s. H378. Klement P. Et al, 1992. Thromb. Haemostasis, 68, s. 64-68. Martin U. Et al., 1992. Int. J. Hematol, s. 143-153
EP 365468

(57) Sammendrag

Trombolytisk aktive proteiner kombineres med antikoagulasjonsmidler, så lenge som antikoagulasjonsmidlet ikke er heparin. Antikoagulasjonsmidlet administreres i en intravenøs bolusform mens det trombolytisk aktive protein kan administreres via intravenøs bolus eller intravenøs infusjon.

Foreliggende oppfinnelse angår fremgangsmåte for fremstilling av et farmasøytisk preparat for behandling av en pasient med behov for trombolytisk terapi ved administrering av en effektiv mengde av et trombolytisk aktivt protein. Oppfinnelsen angår også fremgangsmåte for fremstilling av et farmasøytisk preparat for anvendelse ved reduksjon av risikoen for blødning og intracerebral blødning hos en pasient ved administrering av en effektiv mengde av et trombolytisk aktivt protein utvalgt fra streptokinase, urokinase og pro-urokinase. Videre omfatter oppfinnelsen farmasøytisk preparat i form av en forhåndsemballert enhet for anvendelse ved behandling av en pasient med behov for trombolytisk terapi. Også omfattet er anvendelse av et ikke-heparin antikoagulasjonsmiddel for reduksjon av risikoen for blødning og intracerebral blødning hos en pasient med behov for trombolytisk terapi, samt anvendelse av et ikke-heparin antikoagulasjonsmiddel for reduksjon av risikoen for blødning og intracerebral blødning hos en pasient med behov for trombolytisk terapi.

Bakgrunn og kjent teknikk

Kardiovaskulærsykdommer, slik som akutt myokardialt infarkt, slag, perifer arteriell okklusjon, lungeembolisme, dyp venetrombose og andre blodkar-trombotiske sykdommer, er hovedårsaker til sykelighet og død. De ovennevnte sykdommer forårsakes av total eller subtotal okklusiv trombedannelse i blodkar, hvilket forhindrer levering av en tilstrekkelig blodforsyning til vevet. Tromben består av aggregater av blodceller, slik som blodplater, erytrocytter og leukocytter som stabiliseres av et fibrinnettverk.

Aktuelle terapeutiske metoder for behandling av disse trombotiske vaskulærsykdommer involverer lysis av den eksisterende trombe og forhindring av tilbakevendende trombedannelse som fører til ny okklusjon av de tidligere nyåpnede blodkar.

Trombolytisk terapi av akutt myokardialt infarkt er blitt vist markert å forbedre den naturlige utviklingshistorie for akutt myokardialt infarkt, med ca. 30 % reduksjon av dødelighet (GISSI: Lancet 1986; 1: 871-874; ISIS-2; Lancet 1988; 2: 349-360; AIMS: Lancet 1988; 1: 545-549; Wilcox et al., Lancet 1988: 2: 525-539; ISAM: N Engl J Med 1986; 314: 1465-1471). Resultatene fra det nylig fullførte GUSTO-forsøk (global anvendelse av streptokinase og vevstype-plasminogenaktivator mot okkluderte kransarterier) indikerte at akselerert t-PA gitt med intravenøst (i.v.) heparin tilveiebrakte en overlevelsesfordel i forhold til standard trombolytiske regimer (GUSTO: N Engl J Med 1993; 329: 673-682). Av større viktighet understøttet undersøkelsen hypotesen at mer hurtig og fullstendig gjenopprettelse av koronarblod-strømning gjennom den infarktrelaterte arterie førte til forbedret ventrikkelytelse og

lavere dødelighet blant pasienter med myokardialt infarkt (GUSTO; N Engl J Med 1993; 329: 1615-1622).

Nylige data antyder imidlertid at foreliggende reperfusjonsstrategier ikke realiserer det maksimale potensiale for reduksjon av dødelighet og redning av ventrikkelfunksjon (Lincoff og Topol, Circulation 1993; 87: 1792-1805). Fordelene med trombolyse forringes vesentlig hos mange pasienter på grunn av utilstrekkelig tidlig eller hurtig rekanalisering, ufullstendig åpenhet med TIMI grad 3 strømning eller kritisk resterende stenose, fravær av ny gjennomstrømning i myokardialt vev til tross for epikardial arterieåpenhet, uregelmessig koronaråpenhet, senere reokklusjons- eller reperfusjonsskade. Det er derfor forsøk i gang for å oppnå optimal reperfusjon. Disse forsøk er for det meste rettet mot forhøyelse av hastigheten og kvaliteten av trombolyse.

Farmakologiske metoder for å forhøye hastigheten og kvaliteten av trombolyse kan generelt baseres på selve det trombolytiske middel og på hjelpemiddel, dvs. andre midler gitt samtidig med det trombolytiske middel.

Rekombinant vevstype-plasminogenaktivator (rt-PA) er blitt vist å gi høyere åpenhetsgrader som fører til lavere dødelighet når en total dose på 100 mg ble administrert i et akselerert regime, dvs. innen 90 minutter, i stedet for i det konvensjonelle, vedtatte regime på 3 timer (ISIS-3: Lancet 1992: 339: 735-770; GUSTO: N Engl J Med 1993; 329: 673-682). Foruten å modifisere administreringsregimet for rt-PA, ble anvendelsen av et nytt trombolytisk aktivt protein, slik som den nye rekombinante plasminogenaktivator BM 06.022 (også betegnet som rPA), beskrevet i US patent nr. 5 223 256 og inkorporert heri ved referanse, vist å gi meget høye åpenhetsgrader etter en dobbel bolusadministrering (Bode et al., Circulation 1993; 88 (suppl. I): I-292, abstrakt 1562).

Problemet med reokklusjon av den infarktrelaterte arterie etter vellykket reperfusjon er blitt anerkjent å være forbundet med betydelige sykelighets- og dødelighetsgrader (Ohman et al., Circulation 1990; 82: 781-791). Farmakologiske strategier sikter derfor mot reduksjon av reokklusjon og vedvarelse av infarktarterie-åpenhet. Fordi aktivering av blodplater og koagulasjonssystemet etter administrering av trombolytiske midler for det meste er vist å være involvert i patogenesen av reokklusjon, er det blitt utført forsøk på farmakologisk inhibering av blodplateaggregering og koagulering. Anvendelse av aspirin, et antiblodplatemiddel, og heparin, et antikoagulerende middel, anbefales derfor vanligvis i kombinasjon med de trombolytiske midler ved behandling av akutt myokardialt infarkt (Popma og Topol, Ann Int Med 1991; 115: 34-44).

Effektiviteten av aspirin og heparin er imidlertid begrenset. Dette skyldes deres virkningsmåte. Aspirin inhiberer kun én reaksjonsvei for aktivering av blod-

plater (ved inhibering av syklooksygenase). Virkningen av heparin er avhengig av tilgjengeligheten av antitrombin III. Den begrensede effektivitet av heparin er også forårsaket av tilstedeværelse av inhibitorer i plasma og dets begrensede adgang til blodkoagelbundet trombin. Det foreligger derfor stor interesse for nye antiblodplate-midler, slik som antagonister av glykoprotein IIb/IIIa-reseptoren (f.eks. antistoffer, peptider eller lavmolekylære kjemiske enheter) og for nye antikoagulasjonsmidler (peptidiske og syntetiske direkte inhibitor av trombin og andre komponenter av koagulasjonssystemet, slik som inhibitorer av faktor Xa, IXa, VIIa, vevsfaktor etc., eller etterligninger av endogene inhibitorer av koagulasjonssystemet, slik som aktivert protein C eller trombomodulin).

I den senere tid begynte kliniske forsøk å evaluere anvendeligheten av å kombinere t-PA med de kimære 7E3-antistoff som bindes til glykoprotein IIb/IIa-reseptoren (Kleiman et al., J Am Coll Cardiol 1993; 22: 381-389). Atskillige kliniske forsøk er allerede utført for å undersøke virkningen av kombinasjon av et trombolytisk middel med nye direkte inhibitorer av koagulasjonssystemet. Kombinasjonen av akselerert t-PA og hirudin (et rekombinant protein som direkte inhiberer blodkoagel-bundet trombin) resulterte i forebyggelse av reokklusjon og høye TIMI-grad III åpenhetsgrader (Cannon et al., J Am Coll Cardiol 1993; 21: 136A og Neuhaus et al., Circulation 1993; 88 (suppl I): I-292, abstrakt 1563). Det hirudinlignende peptid hirulog ble kombinert med infusjon av streptokinase; undersøkelsen viste at blod-koagellysis forekom hurtigere etter streptokinase pluss hirulog (Lidón et a., J Am Coll Cardiol 1993; 21: 419A).

Fordi anvendelsen av t-PA er forbundet med en høy reokklusjonsgrad (10-20 %) etter trombolyse til tross for anvendelse av aspirin og heparin (Neuhaus et al., J Am Coll Cardiol 1989; 14: 1566-1569 Cheseboro et al., Circulation 1987; 76: 142-154; Neuhaus et al, J. Am Coll Cardiol 1988; 12: 581-587; Califf et al., Circulation 1991; 83: 1543-1556; Neuhaus et al., J Am Coll Cardiol 1992; 19: 885-891), fordret administreringen av de nye hjelpemidler hirudin og hirulog forlenget infusjon i 36, 48 eller 96 timer. Denne lange infusjonsperiode betyr at store mengder rekombinant protein (= hirudin) eller syntetisk peptid (= hirulog) er nødvendig: 532 eller 546 mg hirudin eller 1 008 mg hirulog, som beregnet ved å multiplisere dosen (mg/kg/time) med den gjennomsnittlige kroppsvekt for et menneske (70 kg) og med varigheten av infusjon beskrevet i de ovenfor angitte abstracts. Store mengder protein eller syntetisk peptid er dyre, hvilket i sin tur fører til høye kostnader, og er medisinsk ufordelaktig fordi den høye prisen på antikoagulasjonsmidlet forhindrer utbredt anvendelse. Administreringen av en infusjon øker dessuten kostnadene fordi teknikken fordrer infusjonsmaskiner, kontroll av effektiviteten av antikoagulasjons-midlet og medisinsk personale for å kontrollere infusjonen. Disse hindringer begrenser

den brede anvendelse av hirudin og derfor vil mange pasienter ikke nyte godt av dets fordeler.

De kombinerte resultater fra mega-forsøkene GISSI-2 (Lancet 1990; 336: 65-71) og ISIS-2 (Lancet 1988; 2: 349-360) demonstrerte en "betydelig økt forekomst av hjerneblødning og store ikke-cerebrale blødninger når heparin ble tilført til det trombolytiske/aspirinregime", hvilket er medisinsk meget ufordelaktig (Lincoff og Topol, Circulation 1993; 87: 1792-1805). Fordi tidlig klinisk erfaring med hirudin indikerte at spontan blødning forekom etter administrering av hirudin, t-PA og aspirin, og at det var en økning av blødning på kateterstedet (Neuhaus et al., Circulation 1993; 88 (suppl. I): I-292, abstrakt 1563), synes det ikke å være noen reduksjon av blødningsrisikoen når heparin-infusjon erstattes med hirudin-infusjon.

Eksperimentell evaluering av virkningen av å kombinere hirudin med et trombolytisk aktivt protein er bestandig blitt utført med infusjon av hirudin. Eksempler på dette er rapporter på t-PA pluss hirudin (Haskel et al., Circulation 1991; 83: 1048-1056), streptokinase pluss hirudin (Rigel et al., Circ Res 1993; 72: 1091-1102) og BM 06.022 pluss hirudin (Martin et al., Int J Hematol 1992; 56 (143-153). Alle disse eksperimentelle undersøkelser har vist at hirudininfusjon var overlegen heparin-infusjon med hensyn til forbedring av koronarblodstrømning etter reperfusjon. Administrering av heparin som en enkel intravenøs bolusinjeksjon pluss det trombolytiske middel BM 06.022 var ikke overlegen heparininfusjon sammen med BM 06.022 (Martin et al., J Am Coll Cardiol 1993; 22: 914-920).

Klinisk erfaring har vist at reokklusjon forekom etter reperfusjon helt inntil pasienten ble utskrevet fra hospitalet 7-21 dager etter reperfusjon, med en toppforekomst innen de første få dager etter trombolyse (Ohman et al., Circulation 1990; 82: 781-791). Denne observasjon forklarer hvorfor potent antikoagulasjon må forlenges i flere dager etter trombolytisk behandling.

Farmakokinetisk analyse viste at hirudin har en kort halveringstid på 10-15 minutter hos hunder (Biomed Biochim Acta 1987; 46: 237-244 og Folia Haematol 1988; 115:70-74) og 9-50 minutter hos mennesker (Thromb Haemost 1984; 52: 160-163).

De eksperimentelle, kliniske og farmakokinetiske data diskutert ovenfor antyder at det er nødvendig å administrere antikoagulasjonsmiddel ved kontinuerlig intravenøs infusjon for å oppnå pålitelig tilstrekkelige plasmanivåer for antikoagulasjon ved behandling av akutte vaskulære sykdommer. Den pågående kliniske evaluering av hirudin som et nytt antikoagulasjonsmiddel i kombinasjon med trombolytiske aktive proteiner følger denne resonementlinje.

Til tross for disse forslag foreligger det fremdeles et behov for å redusere mengden av protein, peptid eller en kjemisk enhet anvendt ved trombolytisk

behandling, et behov for å forenkle administrering og et behov for å redusere blødningsrisikoen ved å begrense et legemiddels potens og antikoagulerende effektivitet til et optimum. Dette optimum kombinerer et ønske om maksimal varighet av virkningen med forbedring av kvaliteten av koronarblodstrømmen og den minimale varighet av uønskede bivirkninger, slik som mindre og større blødning og indre hjerneblødning.

Oppsummering av oppfinnelsen

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer fremgangsmåte for fremstilling av et farmasøytisk preparat for behandling av en pasient med behov for trombolytisk terapi ved administrering av en effektiv mengde av et trombolytisk aktivt protein, kjennetegnet ved at det trombolytisk aktive protein har en halveringstid på mer enn det dobbelte av halveringstiden for human vevstype-plasminogenaktivator og administreres kun ved bolusinjeksjon, og det farmasøytiske preparat formuleres for å tilveiebringe et ikke-heparin antikoagulasjonsmiddel for anvendelse i kombinasjon med det trombolytisk aktive protein, og ikke-heparin antikoagulasjonsmidlet foreligger i en form som muliggjør administrering av antikoagulasjonsmidlet ved kun minst én intravenøs bolusinjeksjon.

Oppfinnelsen angår også fremgangsmåte for fremstilling av et farmasøytisk preparat for anvendelse ved reduksjon av risikoen for blødning og intracerebral blødning hos en pasient ved administrering av en effektiv mengde av et trombolytisk aktivt protein utvalgt fra streptokinase, urokinase og pro-urokinase, kjennetegnet ved at det farmasøytiske preparat formuleres for å tilveiebringe et ikke-heparin antikoagulasjonsmiddel for anvendelse i kombinasjon med det trombolytisk aktive protein, og ikke-heparin antikoagulasjonsmidlet foreligger i en form som muliggjør administrering av antikoagulasjonsmidlet ved kun minst én intravenøs bolusinjeksjon.

Denne fremgangsmåte er anvendelig fordi den reduserer mengden av nødvendig antikoagulasjonsmiddel uten å tape den ønskede, farmakologiske virkning med forhøyelse av reperfusjon og forebyggelse av reokklusjon. Fremgangsmåten reduserer derved, og meget overraskende, blødningsrisikoen, dvs. at den forbedrer behandlingssikkerheten. En lavere pris (antakeligvis på grunn av den lavere mengde protein) for behandlingen og det forbedrede forhold mellom risiko og fordel, muliggjør mer utbredt anvendelse av denne fremgangsmåte og resulterer i reduksjon av dødelighet. Fremgangsmåten forenkler dessuten administreringen av det nye antikoagulasjonsmiddel og gir således ikke kun mer bekvemmelighet, men tillater også mer hyppig og effektiv behandling av pasienter og redder derved mange liv.

Oppfinnelsen angår også farmasøytisk preparat i form av en forhåndsemballert enhet for anvendelse ved behandling av en pasient med behov for

trombolytisk terapi,
kjennetegnet ved at det omfatter atskilte deler av et trombolytisk aktivt protein som har en halveringstid på mer enn det dobbelte av halveringstiden for human vevstype-plasminogenaktivator i en første beholder, og et ikke-heparin antikoagulasjonsmiddel i en andre beholder, hvorved mengden av det trombolytisk aktive protein og mengden av ikke-heparin antikoagulasjonsmidlet i hver beholder er slik at administrering av midlene tillates ved kun bolusinjeksjon.

Videre omfatter oppfinnelsen anvendelse av et ikke-heparin antikoagulasjonsmiddel for reduksjon av risikoen for blødning og intracerebral blødning hos en pasient med behov for trombolytisk terapi, idet pasienten gjennomgår trombolytisk terapi ved administrering av en effektiv mengde av et trombolytisk aktivt protein, hvorved det trombolytisk aktive protein har en halveringstid på mer en det dobbelte av halveringstiden for human vevstype-plasminogenaktivator og administreres kun ved bolusinjeksjon, og ikke-heparin antikoagulasjonsmidlet foreligger i en form som muliggjør administrering av antikoagulasjonsmidlet ved kun minst én intravenøs bolusinjeksjon.

Også omfattet av oppfinnelsen er anvendelse av et ikke-heparin antikoagulasjonsmiddel for reduksjon av risikoen for blødning og intracerebral blødning hos en pasient med behov for trombolytisk terapi, idet pasienten gjennomgår trombolytisk terapi ved administrering av en effektiv mengde streptokinase, urokinase eller pro-urokinase, hvorved ikke-heparin antikoagulasjonsmidlet foreligger i en form som muliggjør administrering av antikoagulasjonsmidlet ved kun minst én intravenøs bolusinjeksjon.

Detaljert beskrivelse av foretrukne utførelsesformer

Foreliggende oppfinnelse angår terapeutiske eller profylaktiske preparater og fremgangsmåte for behandling eller forebyggelse av trombotiske sykdommer. Nærmere bestemt angår foreliggende oppfinnelse farmasøytisk effektive preparater og fremgangsmåter for behandling eller profylakse av trombotiske sykdommer, kjennetegnet ved den kombinerte administrering av et antikoagulasjonsmiddel forskjellig fra heparin, gitt ved intravenøs bolusinjeksjon i stedet for forlenget intravenøs infusjon, og et trombolytisk aktivt protein gitt ved intravenøs bolusinjeksjon og/eller intravenøs infusjon.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer preparater og fremgangsmåter for behandling av pasienter med trombotiske sykdommer som overfører fordelene med reduksjon av mengdene av nye antikoagulasjonsmidler, men som opprettholder den ønskede, farmakologiske virkning, med reduksjon av terapikostnadene, med

forhøyelse av administreringsbekvemmeligheten av det nye antikoagulasjonslegemiddel, og mest viktig reduksjon av blødningsrisikoen. Alle disse fordeler vil bidra vesentlig til mer utbredt anvendelse av trombolyse som vil hjelpe til å redde flere liv.

Definisjonen av trombotiske sykdommer ved foreliggende oppfinnelse inkluderer akutt myokardialt infarkt, slag, perifer arteriell okklusjon, lungeembolisme, dyp venetrombose og andre trombotiske blodkarsykdommer med en risiko for reokklusjon eller tilbakevendende trombedannelse etter vellykket trombolyse.

Fordelene ved foreliggende oppfinnelse er åpenbare. Den bekvemme administrering av det ikke-heparininneholdende antikoagulasjonsmiddel forskjellig fra heparin vil bidra til mer utbredt anvendelse selv i fasen før sykehusopphold og tillater mer hyppig og effektiv behandling av pasienter og redder derved mange liv.

Mer viktig er det at begrensningen av administreringen av det ikke-heparininneholdende antikoagulasjonsmiddel, f.eks. hirudin, til kun en intravenøs bolusinjeksjon i stedet for en innledende bolusinjeksjon pluss kontinuerlig intravenøs infusjon i løpet av timer, fører til større sikkerhet for pasienten ved å redusere blødningsrisikoen. Den reduserte blødningsrisiko resulterer fra en kortere varighet for inhibering av koagulasjonssystemet, en hurtigere normalisering av koagulasjons-systemet og en lavere påvirkning på blødningstiden. Som det fremgår fra resultatene gitt i arbeidseksemplet har den aktiverte partielle tromboplastintid (aPTT) som er et mål for den indre del av koagulasjonssystemet 2 timer etter administrering av det trombolytiske, aktive protein (= 3 timer + 10 minutter etter intravenøs bolusinjeksjon av det nye antikoagulerende middel hirudin) nesten vendt tilbake til nivåer før behandling, mens aPTT fremdeles er betydelig forlenget i gruppen med kontinuerlig intravenøs infusjon av antikoagulasjonsmidlet. Dette indikerer den begrensede varighet av antikoagulasjonsmidlets virkning etter intravenøs bolusinjeksjon som var tilstrekkelig lang til å forhindre reokklusjon og tilstrekkelig lang for å unngå blødning. Blødningstiden som er en sterk forutsigende faktor for kliniske blødning (Gimple et al., Circulation 1989; 80: 581-588) er således betydelig lavere i gruppen med intravenøs bolusinjeksjon av det nye antikoagulasjonsmidlet enn i gruppen med intravenøs kontinuerlig infusjon av antikoagulasjonsmidlet.

Som det fremgår fra arbeidseksemplet har dessuten og overraskende begrensningen av administreringen av det nye antikoagulasjonsmiddel til kun en intravenøs bolusinjeksjon i stedet for administreringen av intravenøs bolusinjeksjon pluss kontinuerlig intravenøs infusjon (bolus + infusjon er kjent teknikk) opprettholdt den overlegne virkning med å forebygge reokklusjon ved anvendelse av nye antikoa-gulasjonsmidler gitt som intravenøs bolusinjeksjon pluss infusjon, sammenlignet med den konvensjonelle hjelpebehandling med aspirin pluss heparin som fremdeles er

forbundet med reokklusjon.

Antikoagulasjonsmidler forskjellige fra heparin omfattet av foreliggende oppfinnelse inkluderer peptidiske og syntetiske direkte inhibitorer av trombin og inhibitorer av andre komponenter av koagulasjonssystemer, slik som inhibitorer og faktor XIIIa, Xa, IXa, VIIa, vevsfaktor, von Willebrands faktor (glykoprotein Ib) etc., eller etterligninger eller rekombinante former av endogene inhibitorer av koagulasjonssystemer, f.eks. trombomodulin eller aktivert protein C.

Disse er fortrinnsvis proteiner, peptider eller lavmolekylære kliniske enheter som produseres ved hjelp av rekombinant DNA-teknologi, ved isolasjon og rensing av stoffer fra naturlige kilder, ved peptidsyntese, kjemisk modifikasjon eller ved hjelp av konvensjonell kjemisk syntese.

Foretrukne antikoagulasjonsmidler er naturlige former av hirudin (Markwardt, Methods Enzymol 1970; vol. 19: 924-932 og Markwardt, Biomed Biochim Acta 1985; 44: 1007-1013), nærmere bestemt rekombinante former av hirudin, slik som desulfatohirudin (som mangler sulfatet på tyrosin 63-resten i naturlig hirudin, men som har den samme aminosyresekvens som naturlig hirudin) (variant 1), CGP 39393 (Tromb Haemost 1989; 61: 77-80), eller former som skiller seg fra naturlig hirudin i aminosyre 1 og 2, leucin og treonin, slik som HBW 023 (Markwardt et al., Thromb Res 1988; 52: 393-400 og Röthig et al., Hämostaseologie 1991; 11: 132-136). Desulfatohirudin kan fremstilles i eukaryote celler, f.eks. *Saccharomyces cerevisiae*, eller i bakterieceller, f.eks. *Escherichia coli*. Andre anvendelige cellelinjer inkluderer *Bacillus subtilis*, babyhamster-nyreceller, insektceller og andre. Hirudin og desulfatohirudin består av en enkel polypeptidkjede med 65 aminosyrer, med tre disulfidbroer og med en molekylvekt på ca. 7 000.

Foreliggende oppfinnelse angår også modifiserte former av hirudin, slik som delesjons- eller substitusjonsvarianter av hirudin, og kimære eller kjemisk konjugerte varianter, f.eks. PEG-hirudin eller PEG-hirudinfragmenter. Foreliggende oppfinnelse angår også spesielt hirulog og hirulloglignende peptider (Maraganore et al., Biochemistry 1990; 29: 7095-7101 og Bourdon et al., FEBS letters 1991; 294; 163-166). Hirulog er en 20 aminosyrers syntetisk peptid-trombininhibitor (D-Phe-Pro-Arg-Pro-$[Gly]^4$ koblet til rester 53-64 i HV2-hirudinvarianten).

Hirudin og hirulog, så vel som beslektede peptidformer, virker ved direkte og spesifikk inhibering av trombin. Foreliggende oppfinnelse angår også syntetiske lavmolekylære, direkte trombininhibitorer anvendelige som antikoagulasjonsmidler, slik som Argatroban (= MD-805 og MCI 9038) (Clarke et al., Circulation 1991; 83: 1510-1518), GYKI-14766 (= LY 294468) (Jackson et al., J Pharm Exp Ther 1992; 261: 546-552), DuP 714 (Knabb et al., Thromb Haemost 1992; 67: 56-59) eller andre peptider som borarginin (Kettner et al., J Biol Chem 1990; 265: 18298-18297)

eller SDZ 217766 (Tapparelli og Metternich, Thromb Haemost 1993; 69: 668 abstrakt 455). Andre direkte syntetiske trombininhibitorer er derivater av 3-amidinofenylalanin (Stürzebecher et al. Thromb Haemost 1993; 69: 1316, abstrakt 456), og andre syntetiske direkte trombininhibitorer.

Foretrukne antikoagulasjonsmidler inkluderer også naturlige og spesielt rekombinante former av selektive, tettbindende inhibitorer av blodkoagulasjonsfaktor Xa, slik som antistasin (Nutt et al., Arch Biochem Biophys 1991; 285: 37-44), og naturlige og rekombinante former av langsomme, tettbindende inhibitorer spesifikke for faktor Xa, slik som antikoagulasjonspeptid fra blodmidd (Waxman et al., Science 1990; 248: 593-596) og andre peptidinhibitorer av faktor Xa. Faktor Xa kan også inhiberes av DX 9065a, et oralt aktivt, syntetisk antikoagulasjonsmiddel med en struktur av benzamidintypen (Kim et al., Thromb Haemost 1993; 69: 672, abstrakt 471) og på andre syntetiske, direkte inhibitorer av faktor Xa.

Inhibitorer av faktor IXa (f.eks. Benedict et al., J Clin Invest 1991; 88: 1760-1765), faktor XIIIa (f.eks. Shebuski et al., Blood 1990; 75: 1455-1459), inhibitorer av faktor VIIa (f.eks. Meluch et al., Thromb Heamost 1993; 69: 887, abstrakt 1244), vevsfaktor (f.eks. Ragni et al., Circulation 1993; 88 (suppl. I): I-615, abstrakt 3309), glykoprotein Ib eller von Willebrands faktor (f.eks. Yao et al., Clinical Research 1993; 41: 228A) og andre inhibitorer av komponenter av koagulasjons-systemet, er også inkludert i foreliggende oppfinnelse. Andre antikoagulasjonsmidler anvendelige ved foreliggende oppfinnelse er etterligninger eller rekombinante former av endogene inhibitorer av koagulasjonssystemer, slik som rekombinant trombo-modulin (f.eks. Gomi et al., Blood 1990; 75: 1396-1399), rekombinant inhibitor av vevsfaktorreaksjonsveien (f.eks. Haskel et al., Circulation 1991; 84: 821-827), rekombinant aktivert protein C (f.eks. Gruber et al., Circulation 1990; 82: 578-585) og andre etterligninger av endogene antikoagulasjonsmidler.

Antikoagulasjonsmidlene ifølge foreliggende oppfinnelse administreres i doser fra 0,01 til 10 mg/kg i løpet av 0,5 til 5 minutter som en intravenøs bolus-injeksjon før eller kort etter innledning av administreringen av det trombolytisk aktive protein. Hirudin, hirulog og beslektede peptider administreres fortrinnsvis i doser fra 0,3 til 6 mg/kg i løpet av 0,5 til 3 minutter som en intravenøs bolusinjeksjon før eller innen 5 minutter etter innledning av administreringen av det trombolytisk aktive protein. Nærmere bestemt administreres hirudin, hirulog og beslektede peptider i doser fra 0,5 til 6 mg/kg i løpet av 1-2 minutter som en intravenøs bolus-injeksjon før administrering av det trombolytisk aktive protein. Oral administrering i stedet for intravenøs bolus-injeksjon kan utføres med lavmolekylære former av nye kjemiske enheter og med peptider i kombinasjon med legemiddelutleveringssystemer.

Trombolytisk aktive proteiner anvendelige ved foreliggende oppfinnelse i

kombinasjon med de antikoagulerende midler er midler kjent for den dyktige fagperson, slik som rekombinant vevstype-plasminogenaktivator, f.eks. alteplase og silteplase, og andre som anistreplase, streptokinase, urokinase og pro-urokinase. Foreliggende oppfinnelse angår også trombolytiske midler, slik som rekombinant plasminogenaktivator (rPA), BM 06.022, vampyrflaggermus-plasminogenaktivator (f.eks. Mellott et al., Arterioscler Thrombos 1992; 12: 212-221) og desmodus (vampyrflaggermus) spyttplasminogenaktivator DSPA (f.eks. Witt et al., Blood 1992; 79: 1213-1217) eller beslektede former og TNK-varianter av vevstype-plasminogenaktivator (f.eks. Refino et al., Thromb Haemost 1993; 69: 841, abstrakt 1074). Spesielt foretrukket er det trombolytisk aktive protein BM 06.022, beskrevet ovenfor. Dette er et ikke-glukosylert protein bestående av aminosyrer 1-3 og 176-527 av villtype-humant t-PA. Ytterligere trombolytiske proteiner er beskrevet i USP 4 970 159, EP-A-0 207 589; AU 61804/86, EP-A-0 231 624, EP-A-0 289 508; JP 63133988; EP-A-0 234 051, EP-A-0 263 172, EP-A-0 241 208; EP-A-0 292 009, EP-A-297 066, EP-A-0 302 456, EP-A-0 379 890. Alle disse kan anvendes ved foreliggende oppfinnelse, likeledes som E-6010 (Suzuki et al., J Cardiovasc Pharmacol 1991; 17: 738-746), YM-g66 (Kawasaki et al., Japan J Pharmacol 1993; 63: 135-142) og SUN-9216 (Umemura et al., Stroke 1993; 24: 1077-1082). Ytterligere anvendelige trombolytisk aktive proteiner inkluderer LY 210825 (= K2P fra syrisk hamster-celler; Circulation 1990; 82: 930-940), FE3X og FE1X (= K1K2P fra kinesisk hamster-ovarieceller, Blood 1988; 71: 216-219), FEK1 (K2P fra muse C127-celler, J Cardiovasc Pharmacol 1990: 16: 197-209), t-PA-varianter (Thromb Haemost 1989; 62:542), K2P og D-K2P (Thromb Haemost 1989; 62 393), MB-1018 (FK2K2P), Thromb Haemost 1989; 62: 543), FK2P (FASEB J 1989; 3: A1031, abstrakt 4791), 1X (Circulation 1988; 78: II-15, abstrakt 59), K1K2P (Thromb Res 1988; 50:33-41), FK1K2P (J Biol Chem 1988; 263: 1599-1602).

Dosene og administreringsregimene for de trombolytiske midler inkluderer de godkjente av helsemyndigheter, f.eks 100 mg alteplase eller 1,5 millioner U streptokinase. Dosen og administreringsregimet kan variere. Spesielt foretrukket er en total dose på 15 til 25 megaenheter (MU) rekombinant plasminogenaktivator BM 06.022; helst foretrukket er et regime på 10 + 10 MU boluser av BM 06.022. Administreringsmåten for de trombolytiske midler kan være via intravenøs injeksjon, enkel bolus- eller flerbolusinjeksjon eller via intravenøs infusjon, eller en kombinasjon av disse. Spesielt foretrukket er en dobbel bolus-intravenøs injeksjon av BM 06.022 eller andre trombolytisk aktive proteiner. Når det anvendes trombolytisk aktive proteiner med en lengre halveringstid enn t-PA (se WO 92/18157, som er inkorporert heri ved referanse), er det mer foretrukket å administrere disse proteiner via en dobbel bolusinjeksjon. Tidsintervallet mellom injeksjonene av det trombolytisk

aktive protein kan generelt være 15 til 60 minutter, mer foretrukket fra 20 til 40 minutter og mest foretrukket kan intervallet være 30 minutter.

Kombinasjonen av hirudin som det nye, mer potente og effektive antikoagulasjonsmiddel forskjellig fra heparin ved intravenøs bolusinjeksjon, med BM 06.022 som det trombolytisk aktive protein ved doseregimer beskrevet ovenfor, er spesielt foretrukket. Kombinasjonen av hirulog som det nye mer potente og effektive antikoagulasjonsmiddel forskjellig fra heparin ved intravenøs bolusinjeksjon, med BM 06.022 som det trombolytisk aktive protein ved doseregimer beskrevet ovenfor, er også foretrukket.

Antikoagulasjonsmidlene ifølge foreliggende oppfinnelse administreres som intravenøs bolusinjeksjon før, eller kort tid etter, innledning av administrering av det trombolytisk aktive protein. Tidsintervaller mellom injeksjonen av det ikke-heparin-antikoagulasjonsmiddel og det trombolytisk aktive protein, kan være fra 1-30 minutter, spesielt 2-10 minutter og helst ca. 5 minutter. Fortrinnsvis administreres antikoagulasjonsmidlet før administreringen av det trombolytisk aktive protein. Dersom antikoagulasjonsmidlet administreres etter innledning av administreringen av det trombolytisk aktive protein, er tidsintervallet for administrering av koagulasjonsmidlet fortrinnsvis 2-10 minutter, og spesielt ca. 5 minutter etter den første administrering av det trombolytisk aktive protein.

Administreringen av det ikke-heparin-antikoagulasjonsmiddel som en enkel intravenøs bolusinjeksjon kan etterfølges 1 til 2 timer senere av standardbehandling med heparin ved behandling av akutt myokardialt infarkt, dvs. intravenøs infusjon av heparin, og senere ved subkutan administrering, eller den kan etterfølges direkte av subkutan administrering av heparin.

Den foreliggende metode med administrering av et ikke-heparin-antikoagulasjonsmiddel inkluderer administrering av antiblodplatemidler forskjellige fra aspirin (acetylsalisylsyre = ASA). Antikoagulasjonsmiddel, så vel som antiblodplatemidler, virker klinisk som antitrombotiske midler, men er forskjellige ved deres virkemåte, dvs. at begge virkninger (inhibering av koagulering og inhibering av blodplater) forhindrer trombedannelse og reokklusjon. Antiblodplatemidler forskjellige fra aspirin gis som en enkel intravenøs bolusinjeksjon samtidig med det trombolytisk aktive protein, dvs. før eller innen 30 minutter fra administrering av det trombolytisk aktive protein, og kan etterfølges av administrering av aspirin i løpet av flere dager, i stedet for ved forsinket eller forlenget administrering av det nye, mer potente og effektive antiblodplatemiddel. De nye mer potente og effektive antiblodplatemidler forskjellige fra heparin er fortrinnsvis inhibitorer av glykoprotein IIb/IIIa-reseptoren på blodplater som formidler blodplateaggregering. Slike inhibitorer av blodplateglykoprotein IIb/IIIa (GP IIb/IIIa)-reseptoren kan være antistoffer,

fragmenter av antistoffer, humaniserte antistoffer eller humaniserte fragmenter av antistoffer mot GP IIb/IIIa-reseptoren, peptider eller peptidetterligninger som virker som antagonister mot GP IIb/IIIa-antagonister, og lavmolekylære, syntetiske, nye kjemiske enheter som inhiberer GP IIb/IIIa-antagonisten.

Inhibitorer av GP IIb/IIIa-reseptoren er fortrinnsvis det monoklonale antistoff 7E3 eller det kimære 7E3-antistoff (fragment) mot GP IIb/IIIa (Tcheng et al., Circulation 1993; 88 (suppl. I): I-506, abstrakt 2727), peptidet GP IIb/IIIa-antagonistene Integrelin (Tcheng et al., Circulation 1993; 88 (suppl. I): I-595, abstrakt 3200) og peptidet MK-852 (Theroux et al., Circulation 1993; 88 (suppl. I): I-201, abstrakt 1075), så vel som ikke-peptid-etterligningen av GP IIb/IIIa, MK-383 (Peerlinck et al., Circulation 1993; 88: 1512-1517).

Ytterligere antagonister av GP IIb/IIIa-reseptoren konkluderer Ro 43-5054 (J Pharmacol Exp Ther 1993; 264: 501-508), Ro 44-9883 (Thromb Haemostas 1993; 69: 975, abstrakt 1557) og BIBU 52 (Thromb Haemostas 1993; 69: 1072, abstrakt 1887), SC 49992 (J Pharmacol Exp Ther 1993; 267: 1191-1197) og SC 54684 (Thromb Haemostas 1993; 69: 975, abstrakt 1558), DMP 728 (Circulation 1994; 80: 3-12), GR 144053 (Thromb Haemostas 1993; 69: 1071, abstrakt 1884), FR 144633 (Thromb Haemostas 1993; 69: 706, abstrakt 598), SKF-106760 (Nichols et al., presentert ved the Am Soc Pharmacol Exp Ther Meeting, 30. juli-3. august 1993 i San Francisco, CA, USA). Noen av disse inhibitorer kan gis som en enkel, oral dose i stedet for en enkel intravenøs bolusinjeksjon.

Foreliggende oppfinnelse inkluderer også andre inhibitorer av GP IIb/IIIa som ikke er spesifikt nevnt heri.

Behandling av en pasient med en trombotisk sykdom ved hjelp av en kombinasjon, et preparat og en fremgangsmåte ifølge foreliggende oppfinnelse, kan inkludere fremgangsmåte ifølge foreliggende oppfinnelse, kan inkludere samtidig anvendelse av ytterligere hjelpemidler, slik som antiblodplatemidler, f.eks. aspirin, og antikoagulasjonsmidler, f.eks. heparin eller lavmolekylært heparin, eller andre legemidler, f.eks. β-blokkere, angiotensinomdannelsesenzym-inhibitorer, midler mot reperfusjonsskade og andre.

Foreliggende oppfinnelse angår også farmasøytiske preparater som inneholder et trombolytisk aktivt protein i en egnet beholder og et antikoagulasjonsmiddel i en separat beholder, for anvendelse i overensstemmelse med de ovennevnte administreringsregimer. Dosen av det trombolytisk aktive protein i den første beholder er vesentlig avhengig av den terapeutiske effektivitet av proteinet for behandling av pasienter med trombotiske sykdommer. Proteinet rPA er f.eks. inneholdt i en slik beholder i en mengde på 5-20 MU (som tilsvarer 8-36 mg av proteinet). Det kan også være mulig at det trombolytisk aktive protein tilveiebringes i to eller flere separate

beholdere som tillater administrering av en egnet dose av det trombolytisk aktive protein i form av to eller flere bolusinjeksjoner. Disse to beholdere kan inneholde det trombolytisk aktive protein i det samme eller forskjellige mengder avhengig av det ønskede administreringsregime. I tilfellet med rPA inneholder hver av de to beholdere fortrinnsvis en effektiv mengde på 10 MU. Andre trombolytisk aktive proteiner som må administreres i høyere doser, slik som t-PA, anvendes i større mengder, slik som f.eks. 50-150 mg. Den første beholder kan tilveiebringes i form av en løsning klar for injeksjon, eller alternativt som et lyofilisat som rekonstitueres før administrering med en egnet oppløsning, hovedsakelig vann for injeksjonsformål, for å gi den ønskede injeksjonsoppløsning. Både lyofilisatet og rekonstitusjonsløsningen kan inneholde ytterligere farmasøytiske bærere eller hjelpemidler som f.eks. er anvendelige for å oppnå en isotonisk løsning eller å stabilisere eller oppløse proteinet i det farmasøytiske preparat.

Farmasøytiske emballasjeenheter fremstilt i overensstemmelse med foreliggende oppfinnelse består av en egnet administreringsform som inneholder det trombolytisk aktive protein, og en egnet emballasjeenhet som inneholder antikoagulasjonsmidlet. De to aktive forbindelser er fortrinnsvis til stede i emballasjeenheten i to forskjellige beholdere, f.eks. glassampuller. Avhengig av typen av aktive forbindelser kan det imidlertid også være mulig å tilveiebringe begge forbindelser i en enkel doseringsform. I tilfeller når ikke-heparin-antikoagulasjonsmidlet skal administreres som en dobbel- eller flerbolusinjeksjon, inneholder den farmasøytiske emballasje to eller flere separate beholdere som hver inneholder den egnede mengde av det ikke-heparin-antikoagulasjonsmiddel for den respektive bolusinjeksjon. De farmasøytiske emballasjeenheter inneholder dessuten instruksjoner, f.eks. i form av en pakningsbrosjyre foreskrevet for medikamenter, fra hvilken det følger at administreringen av en terapeutisk aktiv mengde av det trombolytisk aktive protein med fordel finner sted i kombinasjon med en bolusadministrering av et antikoagulasjonsmiddel.

Farmasøytiske emballasjeenheter kan ytterligere inneholde en separat beholder for administrering av en farmakologisk effektiv mengde heparin. Ved dette inneholder slike farmasøytiske emballasjeenheter totalt tre forskjellige, farmasøytiske midler: For det første et trombolytisk aktivt protein, for det andre et antikoagulasjonsmiddel og for det tredje heparin. Slike emballasjeenheter er spesielt verdifulle i nødssituasjoner hvor det er ønskelig å ha et komplett sett av de farmasøytiske midler som skal anvendes for en effektiv behandling av tromboemboliske tilstander ifølge foreliggende oppfinnelse.

Administreringen av antikoagulasjonsmidlet finner sted før, samtidig med eller etter administreringen av det trombolytisk aktive protein. Det er funnet at det er spesielt fordelaktig når det trombolytisk aktive protein administreres som en

dobbel eller flerbolusinjeksjon som kombineres med meget tidlig antikoagulasjon, dvs. at det antikoagulerende middel administreres før administreringen av det trombolytisk aktive protein. Det er dessuten funnet at det er spesielt fordelaktig, for å forhindre reokklusjon av de gjenåpnede blodkar, at den trombolytisk aktive forbindelse administreres i form av en dobbel eller mangedobbel bolus i kombinasjon med meget tidlig antikoagulasjon. Det viste seg at det er enda mer fordelaktig at heparin administreres i tillegg, slik at en tilstrekkelig høy serumkonsentrasjon opprettholdes, spesielt under tiden når det trombolytisk aktive protein administreres.

En slik informasjon angående bruksmåten kan enten gis i informasjonsbrosjyren eller som en pakningsovertrykning på det medisinske preparat som kan bringes sammen med medisinske preparater som inneholder trombolytisk aktive proteiner. På den ene side kan farmasøytiske emballasjeenheter som kun inneholder egnede administreringsformer av de trombolytisk aktive proteiner inneholde en slik informasjon, f.eks. i form av emballasjebrosjyrer hvori den kombinerte administrering sammen med antikoagulasjonsmidler ifølge foreliggende oppfinnelse nevnes. På den annen side kan farmasøytiske emballasjeenheter som kun inneholder antikoagulasjonsmidler inneholde en slik informasjon hvori den kombinerte administrering sammen med trombolytisk aktive proteiner og anvendelsen ifølge foreliggende oppfinnelse nevnes. Et tredje alternativ ville være å tilveiebringe farmasøytiske emballasjeenheter som inneholder et trombolytisk aktivt protein, et antikoagulasjonsmiddel og en passende informasjon om den kombinerte anvendelse av begge disse, f.eks. den vanlige emballasjebrosjyre. Emballasjebrosjyrene kan dessuten inneholde passende anvisninger for anvendelse av det trombolytisk aktive protein, det ikke-heparin-antikoagulasjonsmiddel i kombinasjon med administreringen av heparin.

Passende retningslinjer for anvendelse av de ovennevnte, farmasøytiske midler er essensielle for kommersialisering av slike farmasøytiske emballasjer som enten inneholder det trombolytisk aktive protein, det ikke-antikoagulerende middel eller heparin, eller en kombinasjon derav. Farmasøytiske selskapers kommersialisering av aktuelle farmasøytiske preparater er kun mulig når tidligere godkjennelse av slike farmasøytiske midler og de respektive administreringsregimer oppnås fra de respektive nasjonale helsemyndigheter, slik som FDA i USA eller CPMP-myndigheten i Europa. Dette inkluderer, men er ikke begrenset til, utførelse av kliniske forsøk i overensstemmelse med veletablerte prosedyrer under overoppsyn av det farmasøytiske selskap som senere har til hensikt å kommersialisere slike farmasøytiske midler. Dette inkluderer også innsendelse av passende dokumentasjon av resultatene fra slike kliniske forsøk til de respektive helsemyndigheter for å oppnå markedsføringstillatelse. Tillatelsen er i mange tilfeller begrenset til bestemte administreringsprotokoller eller regimer som må inkluderes skriftlig i den medfølgende informa-

sjonsbrosjyre foreskrevet for medikamenter.

Som egnede administreringsformer for trombolytisk aktive proteiner eller antikoagulasjonsmidler, foretrekkes galeniske formuleringer, f.eks. lyofilisater eller løsninger i egnede beholdere, slik som forbindelse i ampuller. Som en regel inneholder disse farmasøytiske formuleringer vanligvis farmasøytiske hjelpemidler som er egnede for fremstilling av isotoniske løsninger, og kan også inkludere ytterligere stabiliserings- og løsningsmidler. Antikoagulasjonsmidlene kan formuleres på lignende måte som løsninger klare for bruk, eller som lyofilisater som rekonstitueres med vann før bruk.

Andre aspekter av foreliggende oppfinnelse vil fremgå for den dyktige fagperson og behøver ikke gjentas her.

Det er underforstått at beskrivelsen og eksemplene er ment å illustrere, men ikke begrense, foreliggende oppfinnelse, og at andre utførelsesformer innen oppfinnelsens ånd og ramme vil være selvinnlysende for fagfolk.

Eksempel

Det foreliggende eksempel tilveiebringer farmakologisk bevis for den overraskende og overlegne virkning av farmasøytisk effektive preparater og fremgangsmåter for behandling av akutte, okklusive, vaskulære sykdommer beskrevet heri. Den anvendte dyremodell i eksemplet simulerer akutt myokardialt infarkt indusert av akutt koronararterietrombedannelse, og tillater evaluering av risikoen for reokklusjon etter vellykket trombolyse, og av blødningsrisikoen.

Voksne beagle-hunder av begge kjønn ble bedøvet med intravenøs natriumpentobarbital (35 mg/kg kroppsvekt), intubert og kunstig ventilert. Femoralvener og brakialvener ble kateterisert for hhv. legemiddeladministrering eller bloduttak. Arterielt blodtrykk ble målt kontinuerlig ved hjelp av den høyre femorale arterie. Brystet ble åpnet ved det venstre, femte mellomrom mellom ribbenene, og hjertet ble holdt i en perikardial vugge. Et 2 cm langt stykke av den venstre sirkumflekse koronararterie ble isolert og instrumentert som nylig beskrevet (Martin et al., J Cardiovasc Pharmacol 1991; 18: 111-119). En elektromagnetisk gjennomstrømningsprobe ble anvendt for kontinuerlig kontroll av blodgjennomstrømning. Blodtrykk, hjertefrekvens og koronar blodgjennomstrømning ble registrert kontinuerlig på en polygraf.

En trombe i den venstre sirkumflekse koronararterie ble produsert som følger: En justerbar skrue strammet rundt den venstre sirkumflekse koronararterie ble strammet for å produsere en 90 % inhibering av den hyperemiske blodstrømningsrespons på en 20 sekunders okklusjon av koronararterien. En 150 μA kontinuerlig anodisk strøm ble påført på koronararterieelektroden plassert i arteriens hulrom og

festet til den indre overflate av koronararterien, og opprettholdt inntil den venstre sirkumflekse koronararterieblodstrømning sank til, og forble 0 ml/minutt i minst 3 minutter. Elektrisk stimulering ble gitt i minst 15 minutter. Tromben ble tillatt å modnes i én time før det trombolytisk aktive protein ble administrert.

Det trombolytisk aktive protein anvendt for trombolyse i dette eksempel var BM 06.022, beskrevet i US patent nr. 5 223 256. Den spesifikke aktivitet av BM 06.022 anvendt i dette eksperimentforsøk var 575 000 U/mg. Det anvendte anti-koagulasjonsmiddel var rekombinant hirudin produsert i *Hansemula prolymorpha* (variant BK-HV).

Behandling av referansegruppen ble utført med aspirin og heparin. Aspirin ble gitt som en intravenøs bolusinjeksjon på 20 mg/kg 45 minutter etter trombedannelse, dvs. 15 minutter før administrering av det trombolytisk aktive protein. 5 minutter senere (dvs. 50 minutter etter trombedannelse/10 minutter før administrering av det trombolytisk aktive protein), ble heparin administrert som en intravenøs bolusinjeksjon på 120 IU/kg umiddelbart etterfulgt av en kontinuerlig intravenøs infusjon av 80 IU/kg/time heparin.

Behandling av testgruppen ble utført med aspirin og hirudin BK-HV. Aspirin ble gitt som en intravenøs bolusinjeksjon på 20 mg/kg 45 minutter etter trombedannelse, dvs. 15 minutter før administrering av det trombolytisk aktive protein. 5 minutter senere (dvs. 50 minutter etter trombedannelse = 10 minutter før administrering av det trombolytisk aktive protein), ble hirudin BK-HV administrert som en intravenøs bolus på 6 mg/kg i løpet av ett minutt.

Et kontrolleksperiment ble utført med aspirin- og hirudin BK-HV-infusjon. Aspirin ble gitt som en intravenøs bolusinjeksjon på 20 mg/kg 45 minutter etter trombedannelse, dvs. 15 minutter før administrering av det trombolytisk aktive protein. 5 minutter senere (dvs. 50 minutter etter trombedannelse = 10 minutter før administrering av det trombolytisk aktive protein), ble hirudin BK-HV administrert som en intravenøs bolusinjeksjon på 2 mg/kg, umiddelbart etterfulgt av en kontinuerlig intravenøs infusjon av 2 mg/kg/time hirudin BK-HV.

Alle hunder mottok en dobbel bolusinjeksjon av det trombolytisk aktive protein BM 06.022. Den første intravenøse bolusinjeksjon ble utført 60 minutter etter trombedannelse. Den andre intravenøse bolusinjeksjon ble utført 30 minutter senere, dvs. at det var et tidsintervall på 30 minutter mellom bolusinjeksjonene. Hver intravenøs bolusinjeksjon ble gitt i en dose på 140 kU/kg, dvs. at den totale dose av BM 06.022 var 280 kU/kg.

Den eksperimentelle observasjonsperiode var 3,5 time etter den første intravenøse bolusinjeksjon av BM 06.022. Gjennomsnittlig og fase-koronar blod-strømning ble målt. Tiden til reperfusjon ble definert som tiden fra start av trombolyt-

isk behandling til tiden for tilbakevendelse av koronar blodgjennomstrømning til 33 % av kontrollnivået før okklusjon. Sykliske gjennomstrømningsreduksjoner ble definert som antall sykluser med reperfusjon etterfulgt av fullstendig reokklusjon (0 gjennomstrømning). Plasmaprøver ble erholdt før administrering av hjelpemidlene og gjentatt etter start av trombolytisk behandling, for måling av den aktiverte partielle tromboplastintid (aPTT) ifølge Larrieu et al. (Rev Hematol 1957; 12: 199-210) med et testsett fra Boehringer Mannheim, Mannheim, Tyskland. Blødningstid ble målt med et fjærbelastet utstyr (Simplate I fra Organon Teknika Eppelheim, Tyskland) på den bukkale slimhinne på innsiden av leppen hos hundene. Snitt ble utført med simplat I-utstyret på den mukøse membran på innsiden av leppen hos hundene, og varigheten av blødningen ble registrert.

Alle hunder i disse representative eksperimenter viste reperfusjon. Den konjunktive behandling med aspirin pluss bolus-hirudin ga hurtigere reperfusjon enn med aspirin og heparin-infusjon (tabell 1: 15 minutter vs. 25 minutter). Tiden til reperfusjon etter BM 06.022 pluss aspirin og bolus-hirudin var sammenlignbar med den observerte tid i kontrolleksperimentet med BM 06.022 pluss aspirin og hirudin-infusjon. En enkel intravenøs bolusinjeksjon av hirudin ga derfor den samme grad av hurtig reperfusjon som hirudininfusjon (hhv. 15 minutter og 14 minutter).

Aspirin pluss intravenøs bolusinjeksjon av hirudin var dessuten tilstrekkelig til overbevisende å forhindre reokklusjon, i motsetning til aspirin pluss heparininfusjon, hvilket fremgår fra figur 1 som illustrerer tidsforløpet for koronar blodgjennomstrømning for disse to grupper. Virkningene av aspirin pluss bolus-hirudin ved forebyggelse av reokklusjon, var ekvivalente med virkningene av aspirin pluss hirudininfusjon (figur 2). Aspirin pluss bolusinjeksjon av hirudin ga følgelig dramatisk reduksjon av antall sykliske gjennomstrømningsreduksjoner, sammenlignet med aspirin pluss heparininfusjon (figur 3, tabell 1) fra 6,3 til 0,6 sykliske gjennomstrømningsreduksjoner. Bolus-hirudin var ekvivalent med hirudin-infusjon (tabell 1) ved reduksjon av sykliske gjennomstrømningsreduksjoner.

Administrering av hirudin, enten som en bolus eller som en infusjon, induserte en lavere forlengelse av den aktiverte partielle tromboplastintid (aPTT) enn heparininfusjon (figur 4). Når virkningene av hirudin-bolus på aPTT sammenlignes med virkninger av hirudininfusjon på aPTT, fremgår det at bolus-hirudin forlenget aPTT i en mindre grad enn hirudininfusjon (138 vs. 203 % av forbehandlingsverdien ved 2 timer), som funnet i de foreliggende eksperimenter (tabell 2). Sammenligning mellom aPTT-effektene etter bolus-hirudin og publisert erfaring vedrørende kombinasjonen av BM 06.022 pluss hirudininfusjon (Martin et al. Int. J Hematol 1992; 56: 143-153) bekrefter den mindre forlengelse av aPTT etter bolus-hirudin (tabell 2).

90-minutters blødningstiden ble rapportert å være en sterk forutsigelses-

faktor for klinisk blødning (Gimple et al., Circulation 1989; 80: 581-588). De foreliggende eksperimenter viste overraskende at blødningstiden etter bolus-hirudin var mindre forlenget sammenlignet med verdien før behandling, enn etter heparininfusjon, så vel som etter hirudininfusjon (100 vs. hhv. 135 eller 133 %; tabell 3 og figur 5). Forskjellene i blødningstidforlengelse mellom bolus-hirudin og hirudininfusjon fremgår også ved sammenligning med publiserte rapporter vedrørende kombinasjonen av BM 06.022 og hirudininfusjon (Martin et al., Int J Hematol 1992; 56: 143-153; tabell 3).

De eksperimentelle resultater diskutert heri, og sammenligning av resultatene med publiserte data, viser at en enkel intravenøs bolusinjeksjon av hirudin i kombinasjon med BM 06.022 kan gi overlegne virkninger ved å akselerere reperfusjon og forhindre reokklusjon, sammenlignet med heparininfusjon som er sammenlignbare med resultater ved anvendelse av kontinuerlig intravenøs infusjon av hirudin i kombinasjon med BM 06.022. Begrensningen av administreringen av hirudin til en enkel intravenøs bolusinjeksjon i stedet for en kontinuerlig intravenøs infusjon, fører fordelaktig til større terapeutisk sikkerhet, hvilket vises ved lavere forlengelse og mer hurtig normalisering av aPTT, så vel som ved lavere forlengelse av den 90 minutters blødningstid. Begrensningen av administreringen av hirudin til en enkel intravenøs bolusinjeksjon i denne eksperimentutforming (220 minutters infusjon) var dessuten en hjelp til å spare 35 % av hirudinmengden nødvendig for å oppnå de ønskede, farmakologiske virkninger sammenlignet med hirudininfusjon.

Tabell

Virkningsfullhet

Virkningsfullhet etter administrering av BM 06.022 pluss hjelpemidler

Hjelpemidler	N	Forekomst av reperfusjon	Tid til reperfusjon (min)	Sykliske strømningsreduksjoner (n)
ASA + heparininfusjon	3	3/3	25	6,3
ASA + hirudinbolus	3	3/3	15	0,6
ASA + hirudininfusjon	1	1/1	14	1

Gjennomsnittsverdier; *, n for reperfuserte hunder/n for totalt antall hunder.

Tabell 2

Sikkerhet

Aktivert partiell tromboplastintid (aPTT) etter BM 06.022-bolusinjeksjoner pluss hjelpemidler

Hjelpemidler	N	aPTT		
		(sek)		(% av verdi før behandling)
		Pre	2 timer	ved 2 timer
ASA + heparininfusjon	3	12	42	360
ASA + hirudinbolus	3	12	17	138
ASA + hirudininfusjon	1	12	25	203
Litteratur: hirudininfusjon	7	-	-	767

20

aPTT, aktivert partiell tromboplastintid; pre, verdier før behandling.
Gjennomsnittsverdier. Litteratur: Martin et al., Int J Hematol 1992; 56: 143-153 (undersøkelse av kombinasjonen av BM 06.022 pluss hirudininfusjon i den samme hundemodell).

Tabell 3

Sikkerhet

Blødningstid (BT) etter BM 06.022-bolusinjeksjoner pluss hjelpemidler

Hjelpemidler	N	BT		
		(min)		(% av verdi før behandling)
		Pre	90 min	ved 2 timer
ASA + heparininfusjon	3	2,0	2,7	135
ASA + hirudinbolus	3	2,33	2,33	100
ASA + hirudininfusjon	1	1,5	2,0	133
Litteratur: hirudininfusjon	7	-	6,9	-

BT, blødningstid; pre, verdi før behandling. Gjennomsnittsverdier.

Litteratur: Martin et al., J Hematol 1992; 56; 143-153 (undersøkelse av kombinasjonen av BM 06.022 pluss hirudininfusjon i den samme hundemodell).

Som vist ovenfor ga en enkel intravenøs bolusinjeksjon i løpet av ett minutt med 6 mg/kg hirudin til hunder før administrering av det trombolytisk aktive protein, overlegne virkninger sammenlignet med konvensjonell antikoagulasjonsterapi med intravenøs infusjon av heparin, ved å forhindre reokklusjon etter vellykket trombolyse. Kjent teknikk viste at hirudin, i eksperimentelle undersøkelser på hunder med koronararterietrombose, administreres samtidig i infusjonsdoser på 6 mg/kg/time (i kombinasjon med t-PA: Sitko et al., Circulation 1992; 85: 805-815) eller ved 2 mg/kg innledende intravenøs bolusinjeksjon pluss 2 mg/kg/time intravenøs infusjon (i kombinasjon med streptokinase: Rigel et al., Circ Res 1993; 72: 1091-1102) for å oppnå overlegne virkninger i forhold til kontrollgruppen med heparininfusjon. Gitt en eksperimentell observasjonsperiode i hundeundersøkelsene på 3,5 time, fordres de følgende mengder hirudin ved antakelse av en kroppsvekt på 10 kg for en hund:

Undersøkelse	Trombolytisk middel	Dose av hirudin i 3,5 time		Total mengde (mg)
		Bolus (mg)	Infusjon (mg)	
Foreliggende oppfinnelse	BM 06.022	60	-	60
Rigel et al.	Streptokinase	20	70	90
Sitko et al.	t-PA	-	210	210

Denne sammenligning viser tydelig at selv under en kort observasjonsperiode på 3,5 time reduserer bolusadministreringen av hirudin mengden av hirudin med en faktor på hhv. 1,5 eller 3,5. Denne reduserte mengde hirudin var tilstrekkelig til å oppnå den farmakologiske virkning med forebyggelse av reokklusjon som er overlegen virkningen av heparin, men sammenlignbar med virkningen av hirudininfusjon. Kliniske forsøk med hirudin som beskrevet i bakgrunnsteknikken og den kjente teknikk referert til ovenfor, infuserte hirudin i 36, 48 eller 96 timer, hvilket vil dramatisk øke forskjellen mellom de nødvendige mengder for en innledende bolusinjeksjon og de nødvendige mengder for kontinuerlig intravenøs infusjon.

Det skal minnes om at de absolutte doser av hirudin hos mennesker er lavere enn de tilsvarende hos hunder, på grunn av en økt sensitivitet (tilnærmet faktor 10) av humant trombin for inhibering av hirudin. Neuhaus et al. (Circulation 1993; 88 (suppl. I): I-292, abstrakt 1563) administrerte hirudin i form av en innledende intravenøs bolusinjeksjon av 0,4 mg/kg etterfulgt av en kontinuerlig intravenøs infusjon av 0,15 mg/kg i løpet av 48 timer. Cannon et al. (J Am Coll Cardiol 1993; 21: 136A) administrerte hirudin ved hjelp av en innledende intravenøs bolusinjeksjon på 0,6 mg/kg etterfulgt av en intravenøs bolusinfusjon på 0,2 mg/kg i løpet av 36 timer. De relative forskjeller mellom de to regimer (bolus-hirudin i forhold til bolus pluss infusjon-hirudin) ble imidlertid konstant i hver art.

Kort beskrivelse av figurene

Figur 1. Tidsforløp for koronar blodgjennomstrømning hos hunder med koronararterietrombose som mottok en dobbel bolusinjeksjon på 140 og 140 kU/kg BM 06.022, med 30 minutters mellomrom, og tilsvarende behandling med acetylsalisylsyre (ASA = aspirin; 20 mg/kg intravenøs bolusinjeksjon) og heparin (120 IU/kg intravenøs bolus, etterfulgt av kontinuerlig intravenøs infusjon av 80 IU/kg/time heparin) eller med ASA (20 mg/kg intravenøs bolusinjeksjon) og en enkel intravenøs bolusinjeksjon av 6 mg/kg hirudin. Data er gjennomsnittsverdier for n = 3 pr. gruppe.

Figur 2. Tidsforløp for koronar blodgjennomstrømning hos hunder med koronararterietrombose som mottok en dobbel bolusinjeksjon på 140 og 140 kU/kg BM 06.022, med 30 minutters mellomrom, og tilsvarende behandling med acetylsalisylsyre (ASA = aspirin; 20 mg/kg intravenøs bolusinjeksjon) og hirudin (2 mg/kg intravenøs bolus, etterfulgt av kontinuerlig intravenøs infusjon av 2 mg/kg/time hirudin) eller med ASA (20 mg/kg intravenøs bolusinjeksjon) og en enkel intravenøs bolusinjeksjon av 6 mg/kg hirudin. Data er gjennomsnittsverdier for hhv. n = 1 eller n = 3 pr. gruppe.

Figur 3. Antall sykliske gjennomstrømningsreduksjoner som en indikator

på reokklusjon etter vellykket reperfusjon hos hunder med koronararterietrombose som mottok en dobbel bolusinjeksjon på 140 og 140 kU/kg BM 06.022, med 30 minutters mellomrom, og tilsvarende behandling med acetylsalisylsyre (ASA = aspirin; 20 mg/kg intravenøs bolusinjeksjon) og heparin (120 IU/kg intravenøs bolus, etterfulgt av kontinuerlig intravenøs infusjon av 80 IU/kg/time heparin) eller med ASA (20 mg/kg intravenøs bolusinjeksjon) og en enkel intravenøs bolusinjeksjon av 6 mg/kg hirudin. Data er gjennomsnittsverdier for n = 3 pr. gruppe.

Figur 4. Tidsforløp for aktivert, partiell tromboplastintid (aPTT) som en indikator for sikkerhet hos hunder med koronararterietrombose som mottok en dobbel bolusinjeksjon 140 og 140 kU/kg BM 06.022, med 30 minutters mellomrom, og en tilsvarende behandling med acetylsalisylsyre (ASA = aspirin; 20 mg/kg intravenøs bolusinjeksjon) og heparin (120 IU/kg intravenøs bolus, etterfulgt av kontinuerlig intravenøs infusjon av 80 IU/kg/time) eller med acetylsalisylsyre (ASA = aspirin; 20 mg/kg intravenøs bolusinjeksjon) og hirudin (2 mg/kg intravenøs bolus, etterfulgt av kontinuerlig intravenøs infusjon av 2 mg/kg/time hirudin) eller med ASA (20 mg/kg intravenøs bolusinjeksjon) og en enkel intravenøs bolusinjeksjon av 6 mg/kg hirudin. Data er gjennomsnittsverdier for hhv. n = 3 eller n = 1 pr. gruppe.

Figur 5. Blødningstid ved 90 minutter (som % av verdien før behandling) som en indikator på sikkerhet hos hunder med koronararterietrombose som mottok en dobbel bolusinjeksjon på 140 og 140 kU/kg BM 06.022, med 30 minutters mellomrom, og tilsvarende behandling med acetylsalisylsyre (ASA = aspirin; 20 mg/kg intravenøs bolusinjeksjon) og heparin (120 IU/kg intravenøs bolus, etterfulgt av kontinuerlig intravenøs infusjon av 80 IU/kg/time heparin) eller med acetylsalisylsyre (ASA = aspirin; 20 mg/kg intravenøs bolusinjeksjon) og hirudin (2 mg/kg intravenøs bolus, etterfulgt av kontinuerlig infusjon av 2 mg/kg/time hirudin) eller med ASA (20 mg/kg intravenøs bolusinjeksjon) og en enkel intravenøs bolusinjeksjon av 6 mg/kg hirudin. Data er gjennomsnittsverdier for hhv. n = 3 eller n = 1 pr. gruppe.

Patentkrav

1. Fremgangsmåte for fremstilling av et farmasøytisk preparat for behandling av en pasient med behov for trombolytisk terapi ved administrering av en effektiv mengde av et trombolytisk aktivt protein,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det trombolytisk aktive protein har en halveringstid på mer enn det dobbelte av halveringstiden for human vevstype-plasminogenaktivator og administreres kun ved bolusinjeksjon, og det farmasøytiske preparat formuleres for å tilveiebringe et ikke-heparin antikoagulasjonsmiddel for anvendelse i kombinasjon med det trombolytisk aktive protein, og ikke-heparin antikoagulasjonsmidlet foreligger i en form som muliggjør administrering av antikoagulasjonsmidlet ved kun minst én intravenøs bolusinjeksjon.

2. Fremgangsmåte ifølge krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det farmasøytiske preparat tilveiebringer ikke-heparin antikoagulasjonsmidlet i en form som muliggjør to bolusinjeksjoner.

3. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 1 til 2,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det farmasøytiske preparat er en kombinasjon av to deler som muliggjør at det trombolytisk aktive protein kan administreres separat ved mer enn én bolusinjeksjon.

4. Fremgangsmåte ifølge ethvert av de foregående krav,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det trombolytisk aktive protein er BM 06.022.

5. Fremgangsmåte for fremstilling av et farmasøytisk preparat for anvendelse ved reduksjon av risikoen for blødning og intracerebral blødning hos en pasient ved administrering av en effektiv mengde av et trombolytisk aktivt protein utvalgt fra streptokinase, urokinase og pro-urokinase,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det farmasøytiske preparat formuleres for å tilveiebringe et ikke-heparin antikoagulasjonsmiddel for anvendelse i kombinasjon med det trombolytisk aktive protein, og ikke-heparin antikoagulasjonsmidlet foreligger i en form som muliggjør administrering av antikoagulasjonsmidlet ved kun minst én intravenøs bolusinjeksjon.

6. Farmasøytisk preparat i form av en forhåndsemballert enhet for anvendelse ved behandling av en pasient med behov for trombolytisk terapi,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter atskilte deler av et trombolytisk aktivt

protein som har en halveringstid på mer enn det dobbelte av halveringstiden for human vevstype-plasminogenaktivator i en første beholder, og et ikke-heparin antikoagulasjonsmiddel i en andre beholder, hvorved mengden av det trombolytisk aktive protein og mengden av ikke-heparin antikoagulasjonsmidlet i hver beholder er slik at administrering av midlene tillates ved kun bolusinjeksjon.

7. Farmasøytisk preparat ifølge krav 6,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter minst to atskilte beholdere som inneholder atskilte porsjoner av det trombolytisk aktive protein egnet for administrering av det trombolytisk aktive protein ved to eller flere bolusinjeksjoner.

8. Farmasøytisk preparat ifølge krav 6 eller 7,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det trombolytisk aktive protein er utvalgt fra BM 06.022 og K1K2P-type plasminogenaktivator.

9. Farmasøytisk preparat ifølge ethvert av kravene 6 til 8,
k a r a k t e r i s e r t v e d at ikke-heparin antikoagulasjonsmidlet er hirudin eller hirulog.

10. Farmasøytisk preparat ifølge ethvert av kravene 6 til 9,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det videre omfatter en ytterligere beholder som inneholder en atskilt porsjon heparin.

11. Anvendelse av et ikke-heparin antikoagulasjonsmiddel for reduksjon av risikoen for blødning og intracerebral blødning hos en pasient med behov for trombolytisk terapi, idet pasienten gjennomgår trombolytisk terapi ved administrering av en effektiv mengde av et trombolytisk aktivt protein, hvorved det trombolytisk aktive protein har en halveringstid på mer en det dobbelte av halveringstiden for human vevstype-plasminogenaktivator og administreres kun ved bolusinjeksjon, og ikke-heparin antikoagulasjonsmidlet foreligger i en form som muliggjør administrering av antikoagulasjonsmidlet ved kun minst én intravenøs bolusinjeksjon.

12. Anvendelse av et ikke-heparin antikoagulasjonsmiddel for reduksjon av risikoen for blødning og intracerebral blødning hos en pasient med behov for trombolytisk terapi, idet pasienten gjennomgår trombolytisk terapi ved administrering av en effektiv mengde streptokinase, urokinase eller pro-urokinase, hvorved ikke-heparin antikoagulasjonsmidlet foreligger i en form som muliggjør administrering av antikoagulasjonsmidlet ved kun minst én intravenøs bolusinjeksjon.

13. Fremgangsmåte ifølge krav 11 eller 12,
k a r a k t e r i s e r t v e d at de farmasøytiske emballasjeenheter tilveiebringes med instruksjoner for anvendelse av det trombolytisk aktive protein for å tillate administrering derav i form av mer enn én bolusinjeksjon.

14. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 11 til 13,
k a r a k t e r i s e r t v e d at de farmasøytiske emballasjeenheter tilveiebringes med instruksjoner for anvendelse av ikke-heparin antikoagulasjonsmidlet i kombinasjon med heparin.