

公告本

申請日期	87.3.26
案 號	87104413
類 別	A61K 38%

修正
補充 本91年10月4日
C4

513307

(以上各欄由本局填註)

中文說明書修正頁(91年10月)

發 明 專 利 說 明 書

一、發明 新 型 名 稱	中 文	包含經活化之蛋白質C，用於治療血管疾病之醫藥組合物
	英 文	"PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR TREATING VASCULAR DISORDERS COMPRISING ACTIVATED PROTEIN C"
二、發明 創 作 人	姓 名	1. 布萊恩 威廉 葛利內 2. 丹尼爾 查理士 侯威 3. 查理士 凡 傑克森
	國 籍	均美國
	住、居所	1. 美國印第安那州印第安那普利市東71街3625號 2. 美國印第安那州印第安那普利市湖堤路4524號 3. 美國印第安那州印第安那普利市里臥道9921號
三、申請人	姓 名 (名 稱)	美國禮來大藥廠
	國 籍	美國
	住、居所 (事務所)	美國印第安那州印第安那普利市禮來公司中心
	代 表 人 姓 名	彼得·G·史君格

O:\52\52188\911014.DOC 1

裝 訂 線

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大類：
IPC分類：

A6
B6

本案已向：

國(地區) 申請專利, 申請日期: 案號: , 有 無主張優先權

美國 1997年3月24日 60/042,533 有 無主張優先權

美國 1997年10月20日 60/062,549 有 無主張優先權

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

有關微生物已寄存於: , 寄存日期: , 寄存號碼:

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明(1)

發明範圍

本發明係關於醫藥科學之領域，其特定之範圍係指使用活化的蛋白質C治療血管的不適症。

發明背景

蛋白質C是一種絲胺酸蛋白酶及天然抗凝血劑，其功能是将因子Va及VIIIa去活化以調節一系列凝血串聯反應之恆定性。在活體中，製造人類蛋白質C的主要器官是肝臟，該蛋白質是一種461個胺基酸組成的單鏈多胜肽。其前驅物分子在轉譯後會經過多重之修飾，包括：1) 切除信號序列的42個胺基酸；2) 在酵素原第155位置的離胺酸殘基和第156位置的精胺酸殘基間進行蛋白質水解產生雙鏈形式的分子(即155個胺基酸殘基的輕鏈經雙硫鍵和含262個胺基酸殘基的重鏈絲胺酸蛋白酶鍵結)；3) 將輕鏈前42個胺基酸中的九個麩胺酸進行維生素K-依賴性的羧化反應產生9個 γ -羧基麩胺酸殘基；及4) 將碳水化合物結合至四個位點(一個位於輕鏈，三個位於重鏈)。重鏈含絲胺酸蛋白酶之活性三體(Asp 257、His 211及Ser 360)。最後在循環系統中，此雙鏈酵素原於活體中、在鈣離子的存在下，經凝血酶於磷脂質之表面活化。活化時於重鏈N-端切除十二個胺基酸的胜肽後，產生具酵素活性的活化蛋白質C(aPC)。

和其他蛋白質比較下，蛋白質C可能是血液凝結中最重要之下降調控子。換句話說，蛋白質C酵素系統是抗凝血的主要生理機制。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(2)

凝血系統是一種連鎖反應，該連鎖反應包括經一系列的反應來活化各種酵素原形而成為具活性的絲胺酸蛋白酶，最後產生酵素凝血酶，該反應經有限的蛋白質水解後，將血漿纖維素原轉變成不溶的凝膠(纖維蛋白)。凝血串聯反應中的兩個關鍵反應是用凝血因子IXa將凝血因子X轉變成Xa，及用凝血因子X將凝血酶原轉變成凝血酶。此二反應均發生於細胞表面上(血小板表面)。此二反應進行時須要輔助因子。主要的輔助因子(因子V及VIII)是以不活化的前驅物形式在系統循流，一旦首批少數的凝血酶分子形成後，這些少數的凝血酶經有限的蛋白質水解後能活化該輔助因子。輔助因子(Va及VIIIa)活化後能加速凝血酶原轉變成凝血酶，及將因子X轉變成因子IXa，放大的倍數大約為10的五次方倍。因此活化的蛋白質C壓倒性的經由水解及不可逆的反應產生此二血漿蛋白質底物。此血漿蛋白質底物是活化形式的凝血輔助因子(Va及VIIIa)。活化的蛋白質C僅能少量的降解其不活化的前驅物—凝血因子V及VIII。狗類的活化蛋白質C能急速的增加循環系統中溶解生理纖維蛋白的主要酵素之含量，該酵素為組織血纖維蛋白溶酶原活化劑(tPA)。離體中活化的蛋白質C能增進人類血液中纖維蛋白之水解。因此活化的蛋白質C是人類活體水解纖維蛋白的重要酵素。

目前有少數的有效方法治療血管的閉塞，包括血栓形成後引發的中風。FDA最近已批准在中風後三小時內使用tPA。雖然有時可用肝素或口服的抗凝血劑治療中風，但

五、發明說明(3)

是該治療劑對梗塞的腦部區域具有致使出血的高度危險性。Griffin, et al於U.S. Patent No. 5,084,274中發表一種狒狒之模式，該模式使用重組的aPC (r-aPC)治療血栓形成的閉塞或血栓性栓塞症。Griffin聲稱0.2 mg/kg/hr至1.1 mg/kg/hr之劑量範圍能治療血栓形成的閉塞。但是本發明之申請者發現此劑量範圍是r-aPC的毒性範圍。例如非人類靈長類的前臨床毒理學研究顯示注入r-aPC之最高劑量0.05 mg/kg/hr 96小時並不安全。而Griffin, et al發表的最低劑量(即0.2 mg/kg/hr)，亦大於本發明之申請者建立之人類的毒性劑量的4倍。因此就算是Griffin指出的最低劑量，對腦部梗塞的區域亦有出血的危險，因此可能會加重中風帶來的神經損害。據此就算從Griffin, et al的觀點而言，仍須要確認用aPC治療人類動脈血栓的有效量。

和前述之研究者相反，本發明之申請者發現少量劑量之r-aPC就能治療血栓形成的中風。使用aPC亦能避免微血管的局部擴張及大血管堵塞的動脈血栓，因此能降低中風後神經的損害。

發明摘要

本發明提供一種方法治療人類血管阻塞及動脈血栓性栓塞症的病人，該方法包括對該病人施用劑量大約0.01 mg/kg/hr至大約0.05 mg/kg/hr之活化的蛋白質C。本發明亦提供一種適於連續注入施用之單位劑量形式，該單位劑量形式含一種接受的單位劑量，大約5 mg至大約20 mg之活化的蛋白質C，適於大約0.01 mg/kg/hr至大約0.05 mg/kg/hr

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(4)

之施用劑量。

發明之詳細說明

本發明之目的、揭示及申請專利範圍中，以下之名詞定義如下。

aPC 或活化的蛋白質 C 是指重組的或來自血漿的蛋白質 C。雖然許多種類動物之 aPC 或衍生物具備蛋白質 C 之蛋白質水解、二氫氯酸二氫基酚水解、酯類水解、及生物的(抗凝血劑或纖維蛋白原水解的)活性，但較佳之 aPC 為人類的蛋白質 C。蛋白質 C 衍生物之實施例已描述於 Gerlitz, et al.、U. S. patent No. 5,453,373、及 Foster, et al., U.S. patent No. 5,516,650，全文在此併入參考文獻。

APTT - 部份凝血質活化的時間。

AU - 二氫氯酸二氫基酚水解的單位。

HPC - 人類的蛋白質 C 酵素原。

MEA - 2-胺基乙醇。

tPA - 組織血纖維蛋白溶酶原活化劑。

r-HPC - 重組的人類蛋白質 C 酵素原。

生產 r-aPC-重組的活化蛋白質 C 的方法，是將蛋白質 C 酵素原在離體或活體中活化或直接自原核細胞、真核細胞、或導入外來基因的動物中分泌活化形式的蛋白質 C，例如自人類腎臟的 293 細胞分泌酵素原，然後用揭示於 Yan, U.S. Patent No. 4,981,952，及 Cottingham, WO 97/20043 (全文在此併入參考文獻)中已知的技藝，由熟悉此技藝之專業人士將之純化及活化。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(5)

連續的注入 - 於一特定的時間內連續不斷的從血管注入溶液。

大丸藥注射 - 於多至大約120分鐘的時間內注射定義量之藥品(稱為大丸藥)。

適當的治療 - 從冷凍乾燥的aPC製備配方或溶液作為適當的治療劑。

酵素原 - 一種蛋白質水解酵素之酵素不活化的前驅物。此處之蛋白質C酵素原是分泌、不活化的形式，單鏈或雙鏈之蛋白質C。

本發明之申請者從事人類之外靈長類的前臨床毒理學之研究顯示，96小時內注入大約0.05 mg/kg/hr最高劑量之r-aPC並不安全。此結果和前述之技藝相互矛盾。事實上，基於前述前臨床及臨床研究之結果顯示，使用於人類的r-aPC之劑量，高於上述毒理研究建立之毒性範圍。

本發明提供一種治療人類血管的閉塞及動脈血栓性栓塞症病人的方法，此方法包括對該病人施用大約0.01 mg/kg/hr至大約0.05 mg/kg/hr劑量之活化的蛋白質C。施用低劑量的活化蛋白質C能治療血栓形成後引發的中風，同時不會如高劑量般產生出血的問題。本發明進一步的用重組的人類蛋白質C(r-aPC)進行人類的臨床實驗，以測定血漿中r-aPC之濃度(實施例1)。

本發明亦用犬科動物模式之閉塞冠狀動脈血栓形成(實施例2)之完全阻塞的冠狀動脈，經靜脈注射r-aPC後產生之再灌注效應。令人驚異的是經r-aPC處理後，八隻實驗

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(6)

動物中有六隻出現血管再灌流的現象，而控制組的六隻動物中沒有任何一隻出現再灌流的現象。

本發明係關於用活化的蛋白質C治療血管的閉塞或動脈血栓性栓塞症，包括血栓形成引發的中風、周邊動脈的血栓形成、源自心臟或周圍的動脈栓子、急性的心肌梗塞、及冠狀動脈的疾病。

本發明可依據已知的方法製備aPC的藥學組成物。施用aPC時最好以非經腸的注射方式，連續的注入適當的劑量大約1至大約48小時，以確保其有效形式能運送至血液。較佳的施用方式是連續的注入適當劑量的aPC大約4至大約36小時。更佳的施用方式是連續的注入適當劑量的aPC大約12至大約24小時。最佳的施用方式是連續的注入適當劑量的aPC大約24小時。一旦診斷為中風後，儘快施用aPC。

aPC之施用量大約為0.01 mg/kg/hr至大約0.05 mg/kg/hr，相當於大約20mg/70kg/24小時至大約84mg/70kg/24小時。每24小時均aPC之施用量相同的特定劑量，但熟悉此技藝的專業人士均知此指定劑量不必限於24小時內注入，可在不同的時間連續的注入，例如大約1小時至大約48小時。aPC之較佳aPC之施用量劑量大約為0.01 mg/kg/hr至大約0.04 mg/kg/hr (大約20mg/70kg/24小時至大約67mg/70kg/24小時)。aPC之更佳施用劑量大約為0.01 mg/kg/hr至大約0.03mg/kg/hr (大約20mg/70kg/24小時至大約50 mg/70kg/24小時)。aPC之最佳施用劑量大約為0.024 mg/kg/hr (大約

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(7)

40mg/70kg/24小時)。

此外部份的aPC可採用大丸藥注射的方式，每小時注射適當劑量大約5分鐘至大約30分鐘，接著連續的注入適當的劑量大約23小時至大約47小時，於24小時至48小時的施用時間內注入適當的劑量。

如前述所言，此處之aPC劑量和Griffin等人所提之劑量不同。Griffin申稱的治療血栓形成閉塞的劑量介於0.2 mg/kg/hr至1.1 mg/kg/hr。而本法方申稱的劑量為上述劑量之十分之一，約為0.01 mg/kg/hr至大約0.05 mg/kg/hr。治療血栓形成閉塞最佳之aPC劑量大約為0.024 mg/kg/hr。值得一提的是，本文中之最佳劑量0.024 mg/kg/hr比Griffin聲稱之最低劑量低八倍、而比Griffin聲稱之最高劑量低44倍。

製備1

製備人類的蛋白質C

重組的人類蛋白質C (rHPC)是用熟悉此技藝之專業人士所熟知的方法在人類腎臟的293細胞中生產，參見Yan, U.S. Patent No. 4,981,952，全文在此併入參考文獻。人類的蛋白質C的基因編碼揭示於Bang, et al., 之U. S. Patent No. 4,775,624，全文在此併入參考文獻。在293細胞中表達人類蛋白質C的質體pLPC揭示於Bang, et al., U. S. Patent No. 4,992,373，全文在此併入參考文獻。構建質體pLPC之方法亦描述於European Patent Publication No. 0 445 939，及Grinnell, et al., 1987, Bio/Technology 5:1189-1192，全文在

五、發明說明(8)

此亦併入參考文獻。簡而言之，將質體轉染入293細胞後分離穩定的轉形株，使其在不含血清的培養液中培養生長。發酵後，用微離心法收集不含細胞之培養液。

可採用改良過的技藝(參見Yan, U.S. Patent No. 4,981,952, 全文在此併入參考文獻)將人類的蛋白質C自培養液中分離。將澄清的培養液調整至4 mM之EDTA後通過陰離子交換樹脂(Fast Flow Q, Pharmacia)。用4倍管柱體積之20 mM Tris, 200 mM NaCl, pH 7.4及2倍管柱體積之20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.4清洗，結合至管柱之重組的人類蛋白質C酵素原用20 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, pH 7.4進行溶析。溶析的蛋白質用SDS-聚丙烯醯胺凝膠電泳檢查後得知其純度大於95%。

蛋白質進一步的純化是將蛋白質在3 M之NaCl濃度下吸附到用20 mM Tris, 3 M NaCl, 10 mM CaCl₂, pH 7.4平衡之疏水性作用之樹脂(Toyopearl Phenyl 650M, TosoHaas)上。用2倍管柱體積不含CaCl₂之平衡緩衝溶液清洗後，重組的人類蛋白質C用20 mM Tris, pH 7.4溶析。

將溶析的蛋白質去除殘存的鈣離子以便活化。將重組的人類蛋白質C通過金屬的親和性管柱(Chelex-100, Bio-Rad)以去除鈣離子，並再度結合至陰離子交換管柱(Fast Flow Q, Pharmacia)。依序使用上述管柱並用20 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 6.5預先平衡管柱。管柱中加入蛋白質後，Chelex-100管柱用一倍管柱體積之相同的緩衝溶液清洗。陰離子交換管柱用3倍管柱體積之緩衝溶液

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

錄

五、發明說明(9)

清洗後，蛋白質用 0.4 M NaCl，20 mM Tris-醋酸鹽，pH 6.5 溶析。重組的人類的蛋白質 C 之蛋白質及重組的活化的蛋白質 C 溶液之濃度用 UV 280 nm 測定，消光值 ($E^{0.1\%}$) 分別為 1.85 或 1.95。

製備 2

活化重組的人類蛋白質 C

將牛的凝血酶在 50 mM HEPES，pH 7.5、4°C 下耦合至活化的 CH-Sepharose 4B (Pharmacia)。耦合反應在裝填好樹脂之管柱中進行，大約 5000 單位凝血酶/毫升樹脂。凝血酶溶液循環流經管柱約 3 小時，然後加入 MEA 使其濃度為 0.6 ml/l 之循環溶液。含 MEA 之溶液繼續循環流 10-12 小時以保證將樹脂上未反應的胺類阻塞。阻塞後，凝血酶-耦合樹脂用 10 倍管柱體積之 1 M NaCl/20 mM Tris，pH 6.5 清洗以去除所有非專一結合的蛋白質，此管柱用活化緩衝溶液平衡後進行活化反應。

將純化的 rHPC 溶液調整至 5mM 之 EDTA (螯合任何殘存的鈣離子) 並用 20 mM Tris，pH 7.4 或 20 mM Tris-醋酸鹽，pH 6.5 稀釋至 2 mg/ml。此樣品在 37°C 下通過用 50 mM NaCl，20 mM Tris pH 7.4 或 20 mM Tris-醋酸鹽 pH 6.5 平衡之凝血酶管柱。調整流速至使 rHPC 及凝血酶樹脂的接觸時間約為 20 分鐘。流出之溶析液收集後立刻進行二氫氯酸二氯基酚水解活性的測定。若比活性(二氫氯酸二氯基酚水解的活性)小於標準之 aPC，則將樣品再度通過凝血酶管柱活化 rHPC。接著用 1:1 上述的 20 mM 緩衝溶液 (pH

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

錄

五、發明說明 (10)

介於 7.4 至 6.0，較低之 pH 較佳，因為能避免自動降解) 稀釋樣品，進行下一步驟前將 aPC 在低濃度下保存。

將 aPC 樣品結合至用活化緩衝溶液 (20 mM Tris, pH 7.4 或 20 mM Tris-醋酸鹽, pH 6.5) 之 150 mM NaCl 平衡的陰離子交換樹脂 (Fast Flow Q, Pharmacia) 以去除上述步驟中從管柱滲出之凝血酶。凝血酶在用 2-6 倍管柱體積之 20 mM 平衡緩衝溶液清洗時會通過管柱。結合的 aPC 用 0.4 M NaCl, 5 mM Tris-醋酸鹽, pH 6.5 或 20 mM Tris, pH 7.4 梯度溶析。清洗管柱之體積越大，清除十二胜肽越完全。從管柱溶析的樣品以冷凍溶液 (-20°C) 或冷凍乾燥粉末的形式儲存。

aPC 水解二氫氨酸二氨基酚的活性 (AU) 是利用合成的受質 H-D-Phe-Pip-Arg-p-硝基苯胺 (S-2238, 購自 Kabi Vitrum) 釋放 p-硝基苯胺後用 Beckman DU-7400 兩極真空管排列之分光光度計測定。一個單位之活化的蛋白質 C 的定義是：在 25°C、pH 7.4 下，1 分鐘內能釋出 1 μmol 之 p-硝基苯胺之酵素量，p-硝基苯胺在 405 nm 下之消光係數是 $9620\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 。

抗凝血劑或活化的蛋白質 C 之活性，是測量在活化的部分凝血質時間 (APTT) 之凝血測試中延長凝血時間後加以測定。標準曲線是用稀釋緩衝溶液 (1 mg/ml 放射免疫檢定法純度之 BSA, 20 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.02% NaN_3) 製備之蛋白質 C，其濃度介於 125-1000 ng/ml，而樣品是用稀釋緩衝溶液稀釋 (數次) 至上述濃度範圍後製備而成。各樣品光析管中加入 50 μl 之冷卻的馬血

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

錄

五、發明說明 (11)

漿及 50 μl 之重組活化的局部凝血質時間試劑 (APTT 試劑, Sigma), 並在 37°C 下反應 5 分鐘。反應後, 在各光析管中加入 50 μl 之適當的樣品或標準樣品。用稀釋緩衝溶液替代樣品或標準樣品測定基本凝血時間。各樣品或標準樣品在 37°C 下加入 50 μl 之 30 mM CaCl_2 後啓動纖維計數器 fibrometer (CoA Screener Hemostasis Analyzer, American Labor) 之計時器後進行測試。樣品中活化蛋白質 C 的濃度用得自線性回歸之標準曲線計算。此處之凝血時間, 包括標準樣品曲線, 至少是三重覆實驗的平均值。

熟悉此技藝的專業人士可經上述之描述, 製備治療血栓形成的中風之 aPC。

實施例 1

人類血漿中 aPC 的含量

六位病人以 1 mg/m^2 /小時的速度, 在 24 小時內接受 i.v. 注入 aPC 大約 0.024 $\text{mg}/\text{kg}/\text{hr}$ 。施用之 aPC 冷凍乾燥配方中含有 2ml 水、10 mg aPC、5 mM Tris 醋酸鹽緩衝溶液及 100mM NaCl、pH 6.5。

血漿中之 aPC 濃度用免疫捕獲-二氫氯酸二氨基酚水解的測定法加以測量。在 aPC 之可逆的抗凝血劑檸檬酸鹽及苯甲脒存在下採集血液。酵素自血漿中用 aPC 之鼠科的單株抗體 (C3) 捕獲, 固定在微量滴定盤。清洗去除抑制劑, 測量二氫氯酸二氨基酚水解的活性或用寡肽發色受質測量 aPC。在 37°C 下反應 16-20 小時, 於 405 nm 下測定吸光, 得到的數據用對數重量線性曲線分析。從 0-100 ng/ml 的標

五、發明說明 (12)

準曲線中估算 aPC 之濃度。定量的下限是 1.0 ng/ml。aPC 劑量及血漿濃度大約於 24 小時測定。血漿之範圍介於 2 ng/ml 至 100 ng/ml。較佳的血漿範圍大約為 20 ng/ml 至 80 ng/ml。更佳的血漿範圍大約為 30 ng/ml 至大約 60 ng/ml 而最佳的血漿範圍大約為 50 ng/ml。因此 0.024mg/kg/hr 之劑量在治療血栓形成的中風 24 小時後產生最佳之血漿濃度 50 ng/ml，而不會產生高劑量下出血的問題。

實施例 2

在犬科動物模式血栓形成之冠狀動脈閉塞引發再灌流

將十二隻狗 (17-22 公斤，雌性或雄性，來自 Butler Farms) 用戊巴比妥鈉 (30 mg/kg, i.v.) 麻醉並呼吸一般室內的空氣。設置插管測量血壓，施用藥物，分別在頸動脈、股骨靜脈、及頸靜脈採血。進行左邊胸廓切開術，將心臟懸掛於心臟周圍的支架，於接近第一主要彥斷分枝上，分離出一段 2 cm 長彎成圓的左形冠狀動脈 (LCCA)。將此 LCCA 接上電磁流動探針、刺激電極、及外咬合器分別測量冠狀動脈血流、產生的血管傷害、及提供關鍵性的狹窄症。血管傷害是將電極 (陽極) 和血管內膜端接觸並用 100 μ A d.c 電流 (將陰極置於皮下端完成電路) 刺激陽極。不論血管是否咬合，傷害電流持續刺激 60 分鐘後停止。大約 60 分鐘，血管從血管傷害處起完全閉塞。血管完全閉塞後 30 分鐘 (無冠狀動脈血流後 30 分鐘)，連續靜脈內注入 2.0 mg/kg/hr aPC 或 20 ml TRIS 緩衝溶液，pH 7.4 (賦形劑控制組) 2 hr。從 LCCA 傷害起進行測試 4 hrs。取得並分析動脈

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (13)

血壓、心跳及冠狀動脈血流。從實驗之不同時間點採血測定血液凝血時間(Hemochron 801)、及用Simplate II出血時間裝置測定齒齦的模板出血時間。收集第二組血液樣品(經檸檬酸處理)以測定血漿血纖維蛋白溶酶原活化劑之抑制劑-1 (PAI-1)。血漿之PAI-1含量用IMUBIND™血漿PAI-I ELISA工具組(American Diagnostica)測定。所有的數據(用平均值+SEM表示)用單尾ANOVA分析統計上的差異及student-Neuman-Keuls分析 $p < .05$ 的顯著性。用Fisher's Exact測試分析 $p < .05$ 時之再灌流及其效量。

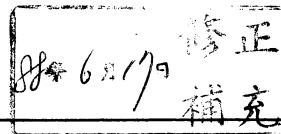
A連續的注入2.0 mg/kg/hr之aPC使全血凝血時間APTT在藥品注入2小時後(表1)增加6倍。APTT在實驗結束時回復正常值。沒有發現凝血酶凝血時間或模板出血時間的效應。結果列於表1。

表 1

aPC之凝血效應及麻醉的狗之模板出血時間

處理	參數	藥品處	灌流 60	灌流 120	實驗終止
		理前	分鐘	分鐘	
控制組 (n=6)	凝血酶時間(秒)	36±1	38±4	33±1	34±1
	APTT(秒)	100±6	95±5	89±10	91±10
	模板流血時間(秒)	132±15	182±14	152±15	159±13

aPC (n=6)	凝血酶時間(秒)	33±1	34±1	34±1	34±1
	APTT(秒)	96±6	573±237	670±209*	138±13*
	模板出血時間(秒)	199±41	272±84	204±20	193±39



五、發明說明 (14)

賦形劑控制組是用 20 ml 之 TRIS-緩衝的生理食鹽水灌流 2 hr，而 aPC (2.0 mg/kg/hr x 2h) 是血管完全閉塞 30 分鐘後施用。

* 實驗組及控制組間顯著之統計差異 $p < .05$ 。各數值用平均值 \pm SEM 表示。

表 2 說明冠狀動脈完全閉後靜脈注射 aPC 之再灌流效應。控制組及實驗組間血栓形成的後冠狀動脈完全閉塞的時間非常類似，分別為 66 ± 7 及 62 ± 6 分鐘。實驗組的六個受測對象中有五個對象之血管在在 aPC-處理後出現再灌流的現象，而控制組的六個對象中沒有人有再灌流的現象；實驗組的冠狀動脈血液再灌流的現象出現時間是 128 ± 17 分鐘；實驗組的冠狀動脈血液再灌流期間的流速為 13.7 ± 2.7 ml/min 而再灌流的體積為 1069 ± 623 ml (大約恢復至冠狀動脈血栓形成前的 60-70%)。血管暴露 aPC 4 hr 後，五個對象中仍有三個對象之血管呈現開放之狀態。因此數據顯示 aPC 能有效的治療犬科動物模式之血栓形成引發的冠狀動脈閉塞。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (15)

表 2

aPC 恢復犬科動物模式之血栓形成引發的冠狀動脈閉塞後
冠狀動脈血流之效應

參數	控制組(載體) (n=6)	實驗組(aPC) (n=6)
閉塞時間(分鐘)	66±7	62±6
血栓大小(mg)	10.8±2.1	8.2±1.2
再灌流現象	0	5/6 *
再灌流時間(分鐘)	0	128±17 *
實驗後開放狀態之血管	0/6	3/5
再灌流期間之 CBF (ml/min)	0	13.7±2.7 *
再灌流體積(ml)	0	1069±623

* 實驗組及控制組間顯著之統計差異 $p < .05$ 。各數值用平均值 ± SEM 表示。

各實驗之血液樣品採樣顯示和靜脈內的注入之 aPC 及血液循環中之血纖維蛋白溶酶原活化劑抑制劑-1 (PAI-1) 相關。靜脈內的注入 aPC 後，血漿中 PAI-1 含量下降 80%。停止注入 aPC 後，血漿中之 PAI-1 回復注入前之水準。

雖然犬科動物模式之劑量高於人類的劑量，但本發明之申請者發現狗類對人類的活化的蛋白質 C 最不敏感，所以本發明申稱之劑量適用於人類。

四、中文發明摘要(發明之名稱: 包含經活化之蛋白質C, 用於治療血管疾病)
之醫藥組合物

修正
補充 本91年10月4日

一種用以治療血管閉塞及血栓性栓塞症之醫藥組合物，
其包含劑量為約0.01 mg/kg/hr至約0.05 mg/kg/hr之經活化
蛋白質C。

英文發明摘要(發明之名稱: "PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR
TREATING VASCULAR DISORDERS
COMPRISING ACTIVATED PROTEIN C")

A pharmaceutical composition for the treatment of
vascular occlusive and thromboembolic disorders, which
comprises activated protein C at a dose of about 0.01
mg/kg/hr to about 0.05 mg/kg/hr.

六、申請專利範圍

公告本

修正
補充 本91年10月14日

1. 一種用以治療血管閉塞及血栓性栓塞症之醫藥組合物，其包含劑量為約 0.01 mg/kg/hr 至約 0.05 mg/kg/hr 之經活化蛋白質 C。
2. 根據申請專利範圍第 1 項之醫藥組合物，其中該血管的閉塞或血栓性栓塞症係血栓形成的中風。
3. 根據申請專利範圍第 2 項之醫藥組合物，其中該劑量係約 0.01 mg/kg/hr 至約 0.03 mg/kg/hr 之經活化蛋白質 C。
4. 根據申請專利範圍第 3 項之醫藥組合物，其中該劑量係約 0.024 mg/kg/hr 之經活化蛋白質 C。
5. 一種套組，其包含溶於無菌溶液中之經活化蛋白質 C，其適合於介於 0.01 mg/kg/hr 至 0.05 mg/kg/hr 之劑量下投遞。
6. 根據申請專利範圍第 5 項之套組，其中該投遞方式係連續注入約 1 至約 48 小時。