



УКРАЇНА

(19) UA (11) 76106 (13) C2
(51) МПК
A61K 38/36 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ФАРМАЦЕВТИЧНА КОМПОЗИЦІЯ, ЩО МІСТИТЬ ФАКТОР VIIA ТА ФАКТОР XIII, КОМПЛЕКТ ДЛЯ ВНУТРІШНЬОВЕННОГО ВВЕДЕННЯ, СПОСІБ ПОСИЛЕННЯ УТВОРЕННЯ ФІБРИНОВОГО ЗГУСТКА ТА СПОСІБ ЛІКУВАННЯ ЕПІЗОДИЧНОЇ КРОВОТЕЧІ, ЗАСТОСУВАННЯ ФАКТОРА VIIA ТА ФАКТОРА XIII ДЛЯ ВИГОТОВЛЕННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ЕПІЗОДИЧНОЇ КРОВОТЕЧІ

1

2

(21) 2002118784
(22) 10.05.2001
(24) 17.07.2006
(86) PCT/DK01/00322, 10.05.2001
(31) PA 2000 00771
(32) 10.05.2000
(33) DK
(31) PA 2000 00778
(32) 10.05.2000
(33) DK
(31) PA 2000 00871
(32) 06.06.2000
(33) DK
(46) 17.07.2006, Бюл. № 7, 2006 р.
(72) Петерсен Ларс Крістіан, DK, Хеднер Улла, SE, Рьойк'єр Расмус, DK
(73) НОВО НОРДІСК ХЕЛС КЕА АГ, СН
(56) WO 9729792 A1, 21.08.1997
WO 9958699 A2, 18.11.1999
WO 9312813 A1, 08.07.1993
WO 9306855 A1, 15.04.1993
EP 0225160 A2, 10.06.1987
WO 9628153 A1, 19.09.1996
WO 9932143 A1, 01.07.1999
(57) 1. Фармацевтична композиція для внутрішньовенового введення, яка містить фактор VIIa і фактор XIII.
2. Композиція за п. 1, яка **відрізняється** тим, що фактор VIIa являє собою варіант фактора VII.
3. Композиція за п. 1, яка **відрізняється** тим, що фактор VIIa являє собою фактор VIIa людини.
4. Композиція за п. 1 або п. 3, яка **відрізняється** тим, що фактор VIIa та фактор XIII являють собою рекомбінантний фактор VIIa людини та рекомбінантний фактор XIII людини.
5. Композиція за будь-яким з пп. 1-4, яка **відрізняється** тим, що фактор XIII являє собою a2-димер фактора XIII.
6. Композиція за будь-яким з пп. 1-5, яка **відрізняється** тим, що фактор XIII являє собою активований фактор XIII.
7. Композиція за будь-яким з пп. 1-6, яка **відрізняється** тим, що додатково містить інгібітор TFPI.
8. Композиція за будь-яким з пп. 1-7, яка **відрізняється** тим, що додатково містить фактор VIII.

9. Комплект для внутрішньовенового введення, який містить лікарський засіб для лікування епізодичної кровотечі, що містить
а) ефективну кількість фактора VIIa і фармацевтично прийнятний носій у першій одиничній лікарській формі;
b) ефективну кількість фактора XIII і фармацевтично прийнятний носій у другій одиничній лікарській формі, і
c) контейнер для розміщення в ньому зазначених першої та другої лікарських форм.
10. Комплект за п. 9, який **відрізняється** тим, що додатково містить ефективну кількість інгібітору TFPI та фармацевтично прийнятний носій, у третій одиничній лікарській формі.
11. Комплект за п. 9, який **відрізняється** тим, що перша одинична лікарська форма або друга одинична лікарська форма додатково містить інгібітор TFPI.
12. Комплект за будь-яким з пп. 9-11, який **відрізняється** тим, що додатково містить фактор VIII або виготовлений у формі окремої одиничної лікарської форми, або у складі одиничної лікарської форми, яка також містить одну або більше сполук, вибраних з групи, яка складається з фактора VIIa, фактора XIII або інгібітору TFPI.
13. Застосування фактора VIIa у комбінації з фактором XIII для виготовлення лікарського засобу для лікування епізодичної кровотечі у суб'єкта, причому лікарський засіб призначений для внутрішньовенового введення.
14. Застосування за п. 13 для виготовлення лікарського засобу для скорочення часу утворення згустку у суб'єкта.
15. Застосування за п. 13 для виготовлення лікарського засобу для подовження часу лізису згустку у нормальній плазмі ссавця.
16. Застосування за п. 13 для виготовлення лікарського засобу для збільшення міцності згустку у нормальній плазмі ссавця.
17. Застосування за п. 13 для виготовлення лікарського засобу для посилення утворення фібринового згустку у нормальній плазмі людини.
18. Спосіб посилення утворення фібринового згустку у суб'єкта, який включає введення суб'єкту

(19) UA (11) 76106 (13) C2

ефективної кількості фактора VIIa у комбінації з ефективною кількістю фактора XIII.

19. Спосіб лікування епізодичної кровотечі у суб'єкта, який включає введення суб'єкту ефективної кількості фактора VIIa у комбінації з ефективною кількістю фактора XIII.

20. Спосіб за п. 18 або п. 19, який **відрізняється** тим, що фактор VIIa та фактор XIII вводять у вигляді однократної лікарської форми.

21. Спосіб за п. 18 або п. 19, який **відрізняється** тим, що фактор VIIa та фактор XIII вводять послідовно.

Даний винахід стосується фармацевтичної композиції, що містить фактор VIIa та фактор XIII. Винахід також стосується застосування комбінації фактора VIIa з фактором XIII для одержання медикаменту для лікування суб'єктів, які страждають від нападів кровотечі, або профілактики таких нападів. Винахід також стосується способу лікування нападів кровотечі у суб'єктів та підвищення зсілості крові у суб'єкта. Даний винахід також стосується комплексів, які включають ці сполуки.

Гемостаз викликається утворенням комплексу між тканинним фактором (TF), підданим дії циркулюючої крові внаслідок пошкодження стінки судини, та FVIIa, присутнім у кровообігу в кількості, яка відповідає приблизно 1% загальної маси білка FVII. Цей комплекс закріплюється на клітині, що містить TF, і активує FX до FXa і FIX до FIXa на поверхні клітин. FXa активує протромбін до тромбіну, який активує FVIII, FV, FXI та FXIII. Крім того, обмежена кількість тромбіну, утвореного на цьому першому етапі гемостазу, також активує тромбоцити. Після дії тромбіну на тромбоцити вони змінюють форму і відкривають заряджені фосфоліпіди на своїй поверхні. Ця поверхня активованих тромбоцитів утворює зразок для подальшої активації FX та повного вироблення тромбіну. Подальша активація FX на поверхні активованих тромбоцитів відбувається через комплекс FIXa-FVIIIa, утворений на поверхні активованого тромбоциту, і FXa після цього перетворює протромбін на тромбін, усе ще перебуваючи на поверхні. Тромбін після цього перетворює фібриноген на фібрин, який є нерозчинним і який стабілізує первісну тромбоциту пробку. Цей процес є компартменталізованим, тобто обмежується місцем експресії або дії TF, таким чином, зводячи до мінімуму ризик системної активації системи коагуляції. Нерозчинний фібрин, який утворює пробку, крім того, стабілізується каталізованим FXIII шляхом зшивання волокон фібрину.

FVIIa існує у плазмі здебільшого як одноланцюговий зимоген, який розщеплюється FXa на його дволанцюгову активовану форму, FVIIa. Рекомбінантний активований фактор VIIa (rFVIIa) виявляє себе як прогемостатичний агент. Введення rFVIIa забезпечує швидку і високоефективну прогемостатичну реакцію у суб'єктів з гемофілією, що страждають від кровотечі, при якій не допомагають продукти, що містять фактор коагуляції, через утворення антитіл. FVIIa також успішно може бути застосований для суб'єктів, що страждають від кровотечі, з дефіцитом фактора VII, або суб'єктів, які мають нормальну систему коагуляції, але зазнали надмірної кровотечі. У цих дослідженнях не спостерігалось несприятливих побічних ефектів

rFVIIa (зокрема, випадків тромбоемболії).

Додаткове екзогенне введення FVIIa збільшує вироблення тромбіну на поверхні активованих тромбоцитів. Це відбувається у суб'єктів з гемофілією, що мають дефіцит FIX або FVIII, а отже, позбавлені найефективнішого шляху повного вироблення тромбіну. Також за наявності зменшеної кількості тромбоцитів або тромбоцитів з недостатньою функцією додатковий FVIIa збільшує вироблення тромбіну.

FXIII, фібриностабілізує фактор, є трансглютаміназою, яка зшиває фібринові мономери, таким чином забезпечуючи структуру фібрину, стійкішу до розчинення плазміном та іншими протеолітичними ферментами. Фактор XIII також є відомим як "фібринолігаза" та "фібриностабілізуючий фактор". Активовані FXIIIa може утворювати міжмолекулярні гамма-глутаміл-епсилон-лізінові поперечні зв'язки між боковими ланцюгами молекул фібрину та між іншими субстратами. FXIII виявляють у плазмі та у тромбоцитах. Цей фермент існує у плазмі як тетрамерний зимоген, який складається з двох альфа-субодиноць та двох бета-субодиноць (позначається $\alpha_2\beta_2$), і у тромбоцитах як зимоген, який складається з двох альфа-субодиноць (позначається α_2 -димер).

Обидва зимогени активуються тромбіном та Ca^{2+} . Кальцій вивільнюється з тромбоцитів і накопичується у місці пошкодження. Тромбін відщеплюється від 1-37 N-кінцевих амінокислотних залишків (α_2 -димеру). У разі $\alpha_2\beta_2$ -зимогену бета-субодиноць відокремлюються від активованих альфа-субодиноць. Кальцій однаково добре зв'язується з зимогеном та зміненою тромбіном молекулою. Після тромбінової та кальцієвої активації цистеїн активного центру на альфа-ланцюгу відкривається і утворюється повністю активований фермент. Було виявлено, що суб'єкти з важкою тромбоцитопенією мають низький рівень FXIII у плазмі.

Загальновідомим є те, що суб'єкти, які зазнали надмірної кровотечі у зв'язку з хірургічним втручанням або значною травмою і потребують переливання крові, створюють більше ускладнень, ніж ті, які взагалі не зазнають кровотечі. Однак навіть помірна кровотеча, яка вимагає введення людської крові або продуктів крові (тромбоцитів, лейкоцитів, похідних від плазми концентратів для лікування від порушень коагуляції тощо) може призводити до ускладнень, пов'язаних з ризиком передачі людських вірусів (гепатиту, ВІЛ, парвовірусу та інших, донині невідомих вірусів). Широка кровотеча, яка вимагає переливання крові у великих обсягах, може призводити до розвитку поліорганної недостатності, включаючи порушення фун-

кцій легенів та нирок. З розвитком цих серйозних ускладнень у суб'єкта починається низка явищ, пов'язаних із багатьма цитокінами та запальними реакціями, що робить будь-яке лікування надзвичайно важким і часто, на жаль, марним. Отже, головною метою як хірургічного втручання, так і лікування у разі значного пошкодження тканин є уникнення кровотечі або зведення її до мінімуму.

Для уникнення або зведення до мінімуму такої кровотечі важливо забезпечити утворення стійких і твердих кровоспиняючих пробок, які не можуть бути легко розчинені фібринолітичними ферментами. Крім того, важливо забезпечити швидке й ефективне утворення таких пробок та згустків.

Японська патентна заявка №2-167234 А стосується адгезиву для біологічної тканини, який характеризується тим, що містить фібриноген, протромбін, фактор коагуляції крові VII, фактор коагуляції крові IX, фактор коагуляції крові X, фактор коагуляції крові XIII, антитромбін, інгібітор протеїнази та іон кальцію.

Японська патентна заявка №59-116213А стосується аерозольної композиції для застосування як тканинного клею, який містить коагулянт для крові як активний компонент. Коагулянт для крові вибирають з-поміж факторів коагуляції крові I, II, III, IV, V, VII, VIII, IX, X, XI, XII та XIII, прекалікреїн, високомолекулярний полімер кініноген та тромбін. Перевагу віддають комбінації F XIII та тромбіну.

WO 93/12813 (ZymoGenetics) стосується використання F XIII для зменшення періопераційної втрати крові суб'єктом, підданим хірургічній операції. Композиція також може містити аprotинін. FXIII вводять суб'єктові у формі болюсного вливання, як правило, за день до операції.

Європейський патент №225.160 (Novo Nordisk) стосується композицій FVIIa та способів лікування пов'язаних із кровотечею порушень, викликаних не пошкодженням коагулюючого фактора і не інгібіторами коагулюючого фактора.

Європейський патент №82.182 (Baxter Travenol Lab.) стосується композиції фактора VIIa для використання з метою протидії дефіцитові коагулюючих факторів або впливові інгібіторів коагулюючих факторів на організм суб'єкта.

Міжнародна патентна публікація № WO 93/06855 (Novo Nordisk) стосується місцевого нанесення FVIIa.

Робота Kjalke et al., Thrombosis and Haemostasis, 1999 (Suppl), 095 1, стосується введення додаткового екзогенного FVIIa та впливу на вироблення тромбіну на поверхні активованих тромбоцитів на динамічних моделях з імітацією станів гемофілії А або В.

І досі у даній галузі зберігається потреба у вдосконаленому, надійному і широко застосовуваному способі підвищення коагуляції, швидкого утворення стійких кровоспиняючих пробок та досягнення повного гемостазу у суб'єктів, зокрема, у суб'єктів з порушенням вироблення тромбіну. Також необхідним є спосіб, який би потребував меншої кількості FVIIa для досягнення повного гемостазу.

Однією з цілей даного винаходу є забезпечення композицій, які ефективно можуть бути застосовані для лікування або профілактики нападів

кровотечі та порушень коагуляції.

Другою метою даного винаходу є забезпечення композицій в одній дозованій формі, які ефективно можуть бути застосовані для лікування чи профілактики нападів кровотечі або як прокоагулянти.

Іншою метою даного винаходу є забезпечення композицій, способів лікування або комплексів, які виявляють синергетичний ефект.

Ще однією метою даного винаходу є забезпечення композицій, способів лікування або комплексів, які не виявляють значних побічних ефектів, таких як високий рівень системної активації системи коагуляції.

Інші цілі даного винаходу стануть зрозумілими по ознайомленні з представленим описом.

Автори даного винаходу показали, що комбінація фактора VIIa та фактора XIII може знизити час згортання нормальної плазми людини ефективніше, ніж будь-який з факторів VIIa або XIII, взятий окремо. Було також продемонстровано, що комбінація фактора VIIa та фактора XIII може збільшити стійкість згустка ефективніше, ніж будь-який з факторів VIIa або XIII, взятий окремо. Поєднання фактора VIIa у концентрації, за якої не спостерігається подальшого збільшення стійкості згустка, з фактором XIII, також у концентрації, за якої не спостерігається подальшого збільшення стійкості згустка несподівано виявило, що в цьому разі досягається подальше збільшення стійкості згустка. Було також продемонстровано, що комбінація фактора VIIa та фактора XIII може подовжити час лізису згустка *in vitro* у нормальній плазмі людини ефективніше, ніж будь-який з інгібіторів факторів VIIa або XIII, взятих окремо. Таким чином, шляхом збільшення коагуляції можна ефективніше лікувати кровотечі у суб'єктів. Крім того, пацієнти можуть бути піддані лікуванню за нижчих концентрацій фактора VIIa, що знижує потребу у відносно високих витратах, пов'язаних із традиційним лікуванням самим фактором VIIa.

У першому аспекті винахід стосується фармацевтичної композиції, що містить фактор VIIa та фактор XIII, і, необов'язково, фармацевтично прийнятний носій.

В іншому аспекті винахід стосується фармацевтичної композиції, що містить фактор VIIa та фактор XIII як єдині активні агенти і, необов'язково, фармацевтично прийнятний носій.

В іншому аспекті винахід стосується фармацевтичної композиції, рецептованої для внутрішньовенного введення, яка включає фактор VIIa та фактор XIII і, необов'язково, фармацевтично прийнятний носій.

В іншому аспекті винахід стосується фармацевтичної композиції, рецептованої для внутрішньовенного введення, яка включає фактор VIIa та фактор XIII як єдині активні агенти і, необов'язково, фармацевтично прийнятний носій.

В одному варіанті втілення фактор VIIa є рекомбінантним фактором VIIa, а фактор XIII є рекомбінантним фактором XIII.

В одному варіанті втілення винаходу фактор VIIa є рекомбінантним фактором VIIa. В іншому варіанті втілення фактор VIIa є рекомбінантним людським фактором VIIa. В іншому варіанті вті-

лення фактор VIIa є різновидом фактора VIIa.

В одному варіанті втілення різновиди фактора VIIa є різновиди амінокислотних послідовностей, які мають не більше 20 заміщених, видалених або вставлених амінокислот порівняно з природним фактором VIIa (тобто, поліпептидом, який має амінокислотну послідовність, описану у патенті США №4,784,950). В іншому варіанті втілення різновиди фактора VIIa мають не більше 15 заміщених, видалених або вставлених амінокислот; в іншому варіанті втілення різновиди фактора VIIa мають не більше 10 заміщених, видалених або вставлених амінокислот; в іншому варіанті втілення різновиди фактора VIIa мають не більше 8 заміщених, видалених або вставлених амінокислот; в іншому варіанті втілення різновиди фактора VIIa мають не більше 6 заміщених, видалених або вставлених амінокислот; в іншому варіанті втілення різновиди фактора VIIa мають не більше 5 заміщених, видалених або вставлених амінокислот; в іншому варіанті втілення різновиди фактора VIIa мають не більше 3 заміщених, видалених або вставлених амінокислот порівняно з природним фактор VIIa. В одному варіанті втілення різновиди фактора VIIa є вибраними з-поміж [L305V]-FVIIa, [L305V/M306D/D309S]-FVIIa, [L305I]-FVIIa, [L305T]-FVIIa, [F374P]-FVIIa, [V158T/M298Q]-FVIIa, [V158D/E296V/M298Q]-FVIIa та [K337A]-FVIIa.

В одному варіанті втілення фактором XIII є FXIII a2b2. В іншому варіанті втілення фактором XIII є FXIII a2. В іншому варіанті втілення фактором XIII є активований фактор XIII (FXIIIa). В одному варіанті втілення фактором XIII є різновид фактора XIII. В одному варіанті втілення фактором XIII є фактор XIII людини. В одному варіанті втілення фактором XIII є рекомбінантний фактор XIII. В одному варіанті втілення фактором XIII є рекомбінантний фактор XIII людини. В одному варіанті втілення фактором XIII є a2-димер людини.

В одному аспекті композиція також містить інгібітор TFPI. В іншому аспекті композиція також містить фактор VIII. В іще одному аспекті композиція також містить фактор VIII та інгібітор TFPI.

В одному варіанті втілення композиція також включає інгібітор фібринолітичної системи, наприклад, аprotинін, ϵ -амінокапронову кислоту або транексамову кислоту.

В іншому аспекті винахід стосується комплексу для лікування нападів кровотечі, який включає

а) ефективну кількість фактора VIIa і, необов'язково, фармацевтично прийнятний носій у першій формі дозованої одиниці;

б) ефективну кількість фактора XIII і, необов'язково, фармацевтично прийнятний носій у другій формі дозованої одиниці; і

в) тару для вміщення вищезгаданих першої та другої форм дозованої одиниці. В одному аспекті комплект включає

а) ефективну кількість фактора VIIa і, необов'язково, фармацевтично прийнятний носій у першій формі дозованої одиниці;

б) ефективну кількість фактора XIII і, необов'язково, фармацевтично прийнятний носій у другій формі дозованої одиниці;

в) ефективну кількість інгібітора TFPI і, необов'язково, фармацевтично прийнятний носій у тре-

тій формі дозованої одиниці; і

г) тару для вміщення вищезгаданих першої, другої та третьої дозованих форм.

В іншому аспекті винахід стосується комплексу для лікування нападів кровотечі, який включає

а) ефективну кількість фактора VIIa та інгібітора TFPI і, необов'язково, фармацевтично прийнятний носій у першій формі дозованої одиниці;

б) ефективну кількість фактора XIII і, необов'язково, фармацевтично прийнятний носій у другій формі дозованої одиниці; і

в) тару для вміщення вищезгаданих першої та другої форм дозованої одиниці.

В іншому аспекті винахід стосується комплексу для лікування нападів кровотечі, який включає

а) ефективну кількість фактора VIIa і, необов'язково, фармацевтично прийнятний носій у першій формі дозованої одиниці;

б) ефективну кількість фактора XIII та інгібітора TFPI і, необов'язково, фармацевтично прийнятний носій у другій формі дозованої одиниці; і

в) тару для вміщення вищезгаданих першої та другої форм дозованої одиниці. В іншому аспекті винахід стосується комплексу для лікування нападів кровотечі, який включає

а) ефективну кількість фактора VIIa та фактора XIII і, необов'язково, фармацевтично прийнятний носій у першій формі дозованої одиниці;

б) ефективну кількість інгібітора TFPI і, необов'язково, фармацевтично прийнятний носій у другій формі дозованої одиниці; і

в) тару для вміщення вищезгаданих першої та другої форм дозованої одиниці.

В іншому аспекті винахід стосується комплексу для лікування нападів кровотечі, який включає

а) ефективну кількість фактора VIIa і, необов'язково, фармацевтично прийнятний носій у першій формі дозованої одиниці;

б) ефективну кількість фактора XIII і, необов'язково, фармацевтично прийнятний носій у другій формі дозованої одиниці; і

в) ефективну кількість фактора VIII і, необов'язково, фармацевтично прийнятний носій у третій дозованій формі; і

г) ефективну кількість інгібітора TFPI і, необов'язково, фармацевтично прийнятний носій у четвертій дозованій формі; і

е) тару для вміщення вищезгаданих першої, другої, третьої та четвертої дозованих форм.

В іншому аспекті комплект включає

а) ефективну кількість фактора VIIa та фактора XIII і, необов'язково, фармацевтично прийнятний носій у першій формі дозованої одиниці;

б) ефективну кількість фактора VIII і, необов'язково, фармацевтично прийнятний носій у другій формі дозованої одиниці;

в) ефективну кількість інгібітора TFPI і, необов'язково, фармацевтично прийнятний носій у третій формі дозованої одиниці; і

г) тару для вміщення вищезгаданих першої, другої та третьої дозованих форм.

В іншому аспекті винахід стосується комплексу для лікування нападів кровотечі, який включає

а) ефективну кількість фактора VIIa та інгібітора TFPI і, необов'язково, фармацевтично прийнятний носій у першій формі дозованої одиниці;

скорочення часу згортання плазми ссавця, включаючи контакт плазми з ефективною кількістю фактора VIIa у комбінації з ефективною кількістю фактора XIII. В одному варіанті втілення ефективну кількість фактора у комбінації з ефективною кількістю фактора XIII вводять суб'єктові, який потребує такого лікування. В іншому аспекті винахід стосується способу посилення утворення фібрину у суб'єкта, включаючи введення суб'єктові ефективної кількості фактора у комбінації з ефективною кількістю фактора XIII.

В одному варіанті втілення способів винаходу фактор VIIa та фактор XIII є єдиними активними агентами, які вводять суб'єктові. В іншому варіанті втілення винаходу фармацевтична композиція включає фактор VIIa та фактор XIII як єдині активні агенти.

В одному варіанті втілення винаходу фактор VIIa та фактор XIII вводять одночасно і у формі однинної дози. В іншому варіанті втілення фактор VIIa та фактор XIII вводять послідовно. В іншому варіанті втілення фактор VIIa та фактор XIII вводять з інтервалом у межах приблизно 1-2 годин між ними, наприклад, у межах 30 хвилин між ними, наприклад, у межах 10 хвилин між ними, наприклад, у формі комплекту, який включає фактор VIIa у першій формі дозованої одиниці та фактор XIII у другій формі дозованої одиниці.

В одному варіанті втілення ефективна кількість фактора VIIa становить від 0,05мг/день до 500мг/день (при масі суб'єкта 70кг). В одному варіанті втілення ефективна кількість фактора XIII становить від 0,05мг/день до 500мг/день (при масі суб'єкта 70кг).

В одному варіанті втілення даного винаходу фармацевтична композиція (у формі єдиного препарату) складається, головним чином, з фактора VIIa та фактора XIII, і, необов'язково, принаймні одного фармацевтично прийнятного наповнювача або носія та/або стабілізатора та/або детергента та/або нейтральної солі та/або антиоксиданта та/або консерванта та/або інгібітора протеази.

В іншому варіанті втілення даного винаходу фармацевтична композиція (у формі єдиного препарату) складається, головним чином, з фактора VIIa та фактора XIII, і, необов'язково, принаймні одного фармацевтично прийнятного наповнювача або носія та/або стабілізатора та/або детергента та/або нейтральної солі та/або антиоксиданта та/або консерванта та/або інгібітора протеази та/або інгібітора TFPI.

В іншому варіанті втілення даного винаходу фармацевтична композиція (у формі єдиного препарату) складається, головним чином, з фактора VIIa та фактора XIII, і, необов'язково, принаймні одного фармацевтично прийнятного наповнювача або носія та/або стабілізатора та/або детергента та/або нейтральної солі та/або антиоксиданта та/або консерванта та/або інгібітора протеази та/або інгібітора TFPI та/або фактора VIII.

В іншому варіанті втілення фармацевтична композиція (якщо має форму комплекту) складається з першої форми дозованої одиниці, яка складається, головним чином, з фактора VIIa і, необов'язково, принаймні одного фармацевтично прийнятного наповнювача або носія та/або стабі-

лізатора та/або детергента та/або нейтральної солі та/або антиоксиданта та/або консерванта та/або інгібітора протеази, та другої форми дозованої одиниці, яка складається, головним чином, з фактора XIII, і, необов'язково, принаймні одного фармацевтично прийнятного наповнювача або носія та/або стабілізатора та/або детергента та/або нейтральної солі та/або антиоксиданта та/або консерванта та/або інгібітора протеази.

В іншому варіанті втілення фармацевтична композиція (якщо має форму комплекту) складається з першої форми дозованої одиниці, яка складається, головним чином, з фактора VIIa і, необов'язково, принаймні одного фармацевтично прийнятного наповнювача або носія та/або стабілізатора та/або детергента та/або нейтральної солі та/або антиоксиданта та/або консерванта та/або інгібітора протеази та/або інгібітора TFPI, та другої форми дозованої одиниці, яка складається, головним чином, з фактора XIII, і, необов'язково, принаймні одного фармацевтично прийнятного наповнювача або носія та/або стабілізатора та/або детергента та/або нейтральної солі та/або антиоксиданта та/або консерванта та/або інгібітора протеази та/або інгібітора TFPI та/або фактора VIII.

В іншому варіанті втілення суб'єкт є людиною; в іншому варіанті втілення суб'єкт має порушення вироблення тромбіну; в одному варіанті втілення суб'єкт має знижену концентрацію фібриногену у плазмі (наприклад, суб'єкт, підданий неодноразовому переливанню).

В іншому аспекті композиція також містить фактор VIII. В одному варіанті втілення фактор VIII є активованим фактором VIII (фактором VIIIa). В іншому варіанті втілення фактор VIII є рекомбінантним фактором VIIIa. В іншому варіанті втілення фактор VIII є рекомбінантним фактором VIIIa людини.

В іншому аспекті композиція також включає інгібітор фібринолітичної системи, наприклад, аprotинін, ϵ -амінокапронову кислоту або транексамову кислоту.

На Фігурі 1 показано, що спонтанне утворення згустка у нормальній плазмі людини (NHP), розведений у співвідношенні 1/10 у буфері, що містив 20нМ Hepes, 150мМ NaCl та 5мМ CaCl₂, pH 7,4 у мікротитрувальній лунці (загальний об'єм 250мкл) досягалося за приблизно 2500-3000сек. Згортання фібрину простежувалося за збільшенням оптичної густини при 600нм у Specramax™ 340. Molecular Devices, Sunnyvale CA. На Фіг.1 показано, що 10нМ рекомбінантного фактора VIIa (rFVIIa) від Novo Nordisk A/S Bagsvaerd, Denmark скорочували час утворення згустка до 1600сек (n=2). Подальше скорочення часу утворення згустка досягалося при додаванні 30нМ фактора XIII (FXIII) від American Diagnostica inc, Greenwich, CT разом із 10нМ rFVIIa (n=3). Згусток, утворений у присутності FXIII, був прозорішим (мав нижчу максимальну оптичну густину), ніж за його відсутності, вказуючи на те, що додавання FXIII внаслідок забезпечує дрібнішу гелеву структуру фібрину з тоншими волокнами.

На Фігурі 2 показано, що додатковий FXIII (30нМ) подовжує час лізису фібрину згустків, утворених у присутності rFVIIa та активатора тканинного плазміногену (tPA). Утворення згустка виклика-

ли у присутності або за відсутності 30нМ XIII шляхом додавання від 25мкл NHP до 225мкл 20нМ Hepes, 150мМ NaCl, 5мМ CaCl₂, pH 7,4 що містив 50нМ rFVIIa та 0,5нМ рекомбінантного tPA від Novo Nordisk A/S Bagsvaerd, Denmark. Утворення згустка та наступний лізис згустка, викликаний опосередкованою tPA активацією плазміногену, спостерігали за допомогою Spectramax® 340 при 600нм як збільшення OD_{600нм} з наступним поверненням траєкторії до базового рівня. На Фіг.2 показано, що час лізису згустка за цих умов значно подовжувався завдяки присутності FXIII.

На Фігурі 3 показано вплив rFVIIa та FXIII на максимальну твердість згустка (MCF), а також стійкість згустка до опосередкованого t-PA лізису. Перед додаванням rFVIIa та/або FXIII досягнутий показник MCF становив 25мм, і час, необхідний для лізису половини згустка, становив 12,3 хвилини (Фіг.3). Додавання збільшених концентрацій FXIII (0-40нМ) не змінювало MCF; однак спостерігали залежне від дози подовження часу лізису половини згустка, причому оптимальне спостерігалось при 30нМ FXIII (час лізису половини згустка: 14,3хв, Фіг.3). Так само, додавання rFVIIa (1нМ) внаслідок забезпечує захист згустка від опосередкованого t-PA фібринолізу (час лізису половини згустка: 16,4хв) без будь-якого впливу на MCF (Фіг.3). Однак після додавання rFVIIa (1нМ) разом з FXIII (30нМ) спостерігали збільшення MCF (29мм), а також надійний захист від фібринолізу (час лізису половини згустка: 27,1хв) (Фіг.3). Взяті разом, ці результати демонструють, що додавання rFVIIa та FXIII до плазми синергетично поліпшує механічну міцність згустка та стійкість до опосередкованого t-PA фібринолізу.

Даний винахід забезпечує композицію, яка включає комбінацію фактора VIIa та фактора XIII. Винахід також забезпечує композицію, яка включає комбінацію фактора VIIa та фактора XIII як окремих активних інгредієнтів. Композиція може існувати у формі окремої композиції або у формі багатокомпонентного комплексу. Дані композиції корисні як терапевтичні і профілактичні прокоагулянти та агенти стабілізації фібринового згустка і утворюють швидкі фібринові згустки у ссавців, включаючи приматів, таких як людина.

При згадуванні першої, другої або третьої і т. д. дозованої одиниці в цьому описі вказується не на оптимальний порядок введення; це робиться лише для зручності.

Даний винахід також забезпечує спосіб лікування (включаючи профілактичне лікування або запобігання) нападів кровотечі у суб'єктів, включаючи людину, викликаних, наприклад, травмою або хірургічним втручанням, або у суб'єктів, у яких фактори коагуляції крові FIX або FVIII чи тромбоцити відсутні або пошкоджені.

Було виявлено, що комбінація фактора VIIa та фактора XIIIa є корисним продуктом, який забезпечує утворення твердих і стійких кровоспиняючих пробок, що швидко утворюються.

Повне вироблення тромбіну є необхідним для утворення твердої стійкої кровоспиняючої пробки. Структура фібрину такої пробки залежить як від кількості утвореного тромбіну, так і від швидкості початкового вироблення тромбіну. При порушенні

вироблення тромбіну утворюється пориста фібринова пробка, яка має велику проникність. Фібринолітичні ферменти, які зазвичай є присутніми на поверхні фібрину, легко розчиняють таку фібринову пробку. Утворення стійкої фібринової пробки також залежить від наявності фактора XIIIa, який активується тромбіном, а отже, також залежить від повного вироблення тромбіну. Крім того, описаний вище активований тромбіном фібринолітичний інгібітор, TAFI, вимагає досить великої кількості тромбіну для його активації. Отже, за недостатнього вироблення тромбіну TAFI не може бути активований, внаслідок чого утворюється кровоспиняюча пробка, яка легше за нормальну розчиняється у разі звичайної фібринолітичної активності.

Через збільшення вироблення тромбіну фактор VIIa забезпечує основу для повної активації фактора XIII, що є найважливішим для утворення повністю стабілізованої кровоспиняючої пробки, а отже, для підтримання гемостазу. У випадках зниженої кількості тромбоцитів, тромбоцитопенії, прискорення вироблення тромбіну викликають введенням екзогенного додаткового фактора VIIa. Однак загальне вироблення тромбіну не нормалізується фактором VIIa навіть у високих концентраціях.

Поєднуючи фактор VIIa та фактор XIII, зокрема, альфа-ланцюг фактора XIII (α2-димер), забезпечують повну активацію фактора XIII, що збільшує кровоспиняючий вплив фактора VIIa.

Крім того, у суб'єктів зі зниженою концентрацією фібриногену у плазмі (суб'єктів, підданих неодноразовому переливанню внаслідок множинних травм або широкого хірургічного втручання) повна активація фактора XIII не трапляється. Ефективнішого гемостазу досягають шляхом введення комбінації фактора VIIa та фактора XIII.

Іншим способом збільшення стійкості фібринових кровоспиняючих пробок є забезпечення повної присутності фактора XIIIa (активованого фактора XIII).

Суб'єкти з тромбоцитопенією мають порушення вироблення тромбіну, а також порушення стабілізації фібринових пробок, внаслідок чого кровоспиняючі пробки стають схильними до передчасного розчинення. Крім того, у суб'єктів, які зазнали значної травми або пошкодження органів і через це піддавалися частому переливанню крові, нерідко знижується кількість тромбоцитів, а також знижується кількість фібриногену, фактора VIII та інших коагуляційних білків. У цих суб'єктів порушується (або знижується) вироблення тромбіну. Крім того, знижений рівень фібриногену негативно впливає на активацію фактора XIII. Отже, ці суб'єкти мають недостатній або менш ефективний гемостаз, внаслідок чого утворені фібринові пробки легко і передчасно розчиняються протеолітичними ферментами; крім того, ці ферменти широко вивільнюються у випадках значних травм та пошкодження органів.

Для сприяння утворенню повністю стабілізованих пробок з повною здатністю до підтримання гемостазу суб'єкту вводять композицію згідно з винаходом. Ця композиція є особливо корисною для суб'єктів зі зниженою кількістю тромбоцитів та для суб'єктів зі зниженим рівнем фібриногену

та/або інших коагуляційних білків у плазмі.

У присутності фактора XIII нижчої концентрації фактора VIIa може бути достатньо для забезпечення потрібного гемостазу.

Як зазначалося вище, фактор XIII існує у плазмі як тетрамерний зимоген, який складається з двох альфа-субодиниць та двох бета-субодиниць (позначається a2 b2), але міститься в іншій тканині (наприклад, тромбоцитах) як a2-димер. У межах даного винаходу може застосовуватися будь-яка з цих форм зимогену або активованого фактора XIII (фактор XIIIa), а також генетично змінені різновиди фактора XIII, які зберігають характерну для них здатність до зшивання. В одному варіанті втілення фактором XIII є фактор XIII людини; в іншому варіанті втілення фактором XIII є a2-димером людини; у ще одному варіанті втілення фактором XIII є активований фактор XIIIa людини.

Фактор XIII та фактор VIIa, застосовувані у даному винаході, можуть бути виділені з крові або одержані рекомбінантним способом. Очевидно, що практичне втілення описаних нами способів є незалежним від походження очищеного фактора XIII та фактора VIIa, а отже, даний винахід розглядається як такий, що охоплює застосування будь-якої композиції фактора XIII та фактора VIIa, придатної для застосування за даним винаходом. Перевагу віддають факторові VIIa та факторові XIII людини. У даному винаході також можуть бути застосовані генетично змінені різновиди фактора VIIa та фактора XIII, які зберігають характерну для них активність, пов'язану з гемостазом. Фрагменти різновидів фактора VIIa або фактора XIII, або фактора VIIa-, або фактора XIII-, які зберігають характерну для них пов'язану з гемостазом активність, також можуть бути застосовані у даному винаході. Пов'язану з гемостазом активність фактора VIIa вимірюють, наприклад, застосовуючи аналіз активності фактора VIIa, представлений у даному описі. Пов'язану з гемостазом активність фактора XIII вимірюють, наприклад, застосовуючи аналіз активності фактора XIII, представлений у даному описі.

Прикладами різновидів фактора VII, які мають практично таку саму або кращу біологічну активність порівняно з природним фактором VIIa, є, крім інших, описані у Датських патентних заявках №№ PA 2000 00734, PA 2000 01360, PA 2000 01361 та PA 2001 00477. Прикладами, крім інших, є [L305V]-FVIIa, [L305V/M306D/D309S]-FVIIa, [L305I]-FVIIa, [L305T]-FVIIa, [F374P]-FVIIa, [V158T/M298Q]-FVIIa, [V158D/E296V/M298Q]-FVIIa та [K337A]-FVIIa.

У даному контексті трилітерні або однолітерні позначення амінокислот застосовуються в їх традиційному значенні, як вказано у Таблиці. Якщо прямо не вказано іншого, згадані авторами амінокислотні є L-амінокислотами. Слід розуміти, що перша літера, наприклад, у K337, представляє амінокислоту, яка в природі присутня у вказаній позиції природного фактора VII, і що, наприклад, [K337A]-FVIIa означає різновид FVII, у якому представлена однолітерним кодом K амінокислота, яка в природі присутня у вказаній позиції, заміщується амінокислотою, представленою однолітерним кодом A.

Таблиця

Скорочення для амінокислот

Амінокислота	Трилітерний код	Однолітерний код
Гліцин	Gly	G
Пролін	Pro	P
Аланін	Ala	A
Валін	Val	V
Лейцин	Leu	L
Ізолейцин	Ile	I
Метіонін	Met	M
Цистеїн	Cys	C
Фенілаланін	Phe	F
Тирозин	Tyr	Y
Триптофан	Trp	W
Гістидин	His	H
Лізин	Lys	K
Аргінін	Arg	R
Глютамін	Gln	Q
Аспарагін	Asn	N
Глутамінова кислота	Glu	E
Аспарагінова кислота	Asp	D

Термін "фактор VIIa" або "FVIIa" може вживатися переміжно. Термін "фактор VIIa" включає зимогенний фактор VII (одноланцюговий фактор VII). Термін "фактор XIII або "FXIII" може вживатися переміжно. Термін "фактор VIII або "FVIII" може вживатися переміжно.

Спеціалістові у даній галузі стане зрозуміло, що заміщення можуть відбуватися за межами ділянок, які відповідають за функцію молекули фактора VIIa або фактора XIII і все одно внаслідок забезпечують активний поліпептид. Амінокислотні залишки, суттєві для активності поліпептиду фактора VIIa або фактора XIII, а отже, можуть не підлягати заміщенню, розпізнають згідно з відомим спеціалістам процедурами, такими, як сайт-специфічний мутагенез або аланіноскануючий мутагенез [див., наприклад, Cunningham and Wells, 1989, Science 244:1081-1085]. Згідно з останнім способом, мутації здійснюють у кожному позитивно зарядженому залишку молекули, і отримані внаслідок мутантні молекули випробують на коагуляцію, і, відповідно, здатність до зшивання для розпізнання амінокислотних залишків, які відповідають за активність молекули. Місця взаємодії субстрату з ферментом також визначають шляхом аналізу тривимірної структури, визначеним згідно з цим способом як аналіз на основі ядерного магнітного резонансу, кристалографія або ковалентна фіксація мічених субстратів [див., наприклад, de Vos et al, 1992, Science 255: 306-312; Smith et al, 1992, Journal of Molecular Biology 224: 899-904; Wlodaver et al, 1992, FEBS Letters 309: 59-64].

Внесення мутації у нуклеїново-кислотну послідовність для заміни одного нуклеотиду на інший може здійснюватися шляхом сайт-специфічного мутагенезу з застосуванням будь-яких відомих спеціалістам способів. Особливо доцільною є процедура з застосуванням надспірального, дволан-

цюгового вектора ДНК з потрібною вставкою та двома синтетичними праймерами, що містять потрібну мутацію. Олігонуклеотидні праймери, кожен з яких є комплементарним протилежному ланцюгові вектора, розкручуються під час термоцикування за допомогою Pfu ДНК-полімерази. Після включення праймерів утворюється мутувана плазміда, яка містить розташовані в шаховому порядку ніки (розриви одного ланцюга у дволанцюговій молекулі нуклеїнової кислоти). Після термоцикування продукт обробляють Орлі, який є специфічним до метильованої та геміметильованої ДНК, для дигерування зразка батьківської ДНК та відбору синтезованої ДНК, що містить мутацію. Також можуть бути застосовані інші відомі спеціалістам способи створення, розпізнання та виділення різновидів, наприклад, переміщення генів або виявлення фактів.

Термін "фактор VIII" або "FVIII" включає активований фактор VIII (позначається фактор VIIIa), різновиди та зрізані форми фактора VIII, які зберігають характерну для них коагулянтну активність. В одному варіанті втілення фактор VIII є фактором VIII людини.

Термін "інгібітор TFPI" означає сполуки, які інгібують протикоагулянтну активність TFPI (інгібітора шляху тканинного фактора). Цей термін включає сполуки на зразок тих, які описано у Європейському патенті № 558529, WO 96/28153 та US 5,622,988. "TFPI" та "EPI" (інгібітор зовнішнього шляху) може вживатися переміжно.

Згідно з даним винаходом, "ефективна кількість фактора VIIa та ефективна кількість" фактора XIII визначається як кількість фактора VIIa та фактора XIII, достатня для запобігання чи зниження кровотечі або втрати крові, з метою лікування, послаблення або часткового припинення хвороби та її ускладнень.

Кількість фактора VIIa та кількість фактора XIII, які вводять згідно з даним винаходом, може бути різною, від приблизно 1:100 до приблизно 100:1 (мкг фактора VIIa/мкг фактора XIII).

У цьому контексті "суб'єкти з порушенням вироблення тромбіну" означає суб'єктів, які не можуть виробляти повного тромбіну на поверхні активованих тромбоцитів, і включає суб'єктів, у яких тромбін виробляється у меншій кількості, ніж у суб'єктів, які мають повністю функціонуючу, нормальну кровоспиняючу систему, включаючи нормальну кількість та функцію факторів коагуляції, тромбоцитів та фібриногену, а також включає суб'єктів, у яких відсутні FIX та/або FVIII (гемофілія A та B) або суб'єктів з дефіцитом FIX та/або FVIII або з інгібіторами проти FIX та/або FVIII; суб'єктів, у яких відсутній FXI; суб'єктів зі зниженою кількістю тромбоцитів або тромбоцитами з недостатньою функцією (наприклад, тромбоцитопенією чи тромбоастенією Гланцманна або суб'єктів з надмірною кровотечею); а також суб'єктів, які мають знижений рівень протромбіну, FX або FVII.

Суб'єкти зі зниженою концентрацією фібриногену у плазмі (наприклад, піддані багаторазовому переливанню крові суб'єкти внаслідок множинних травм або широкого хірургічного втручання) також страждають від утворення м'яких і нестійких фібринових пробок, які легко розчиняються.

Термін "повний гемостаз" означає утворення у місці пошкодження стійкого і твердого фібринового згустка або пробки, який ефективно спиняє кровотечу і який не може бути легко розчинений фібринолітичною системою.

Термін "активність фактора VIIa" означає здатність до вироблення тромбіну; термін також включає здатність до вироблення тромбіну на поверхні активованих тромбоцитів за відсутності тканинного фактора.

Термін "посилення нормальної кровоспиняючої системи" означає посилення здатності до вироблення тромбіну.

Вжитий авторами термін "пов'язане з кровотечею порушення" означає будь-яке порушення, уроджене, набуто або викликане, яке має клітинне або молекулярне походження і виявляє себе у кровотечах. Прикладами є дефіцит коагулюючих факторів (наприклад, гемофілія A та B або дефіцит факторів коагуляції XI чи VII), інгібітори коагулюючих факторів, порушення функції тромбоцитів, тромбоцитопенія або хвороба фон Віллебранда (псевдогемофілія).

Термін "напади кровотечі" включає неконтрольовану і надмірну кровотечу, яка є головною проблемою, що виникає у зв'язку як з хірургічним втручанням, так і з іншими формами пошкодження тканин. Неконтрольована та надмірна кровотеча може траплятися у суб'єктів, які мають в цілому нормальну систему коагуляції (однак у цих суб'єктів розвивається коагулопатія внаслідок кровотечі - розчинення коагуляційних білків, збільшення фібринолізу та зменшення тромбоцитів через розчинний вплив кровотечі), та суб'єкти, які мають порушення коагуляції або пов'язані з кровотечею порушення. Дефіцит коагулюючих факторів (гемофілія A та B, дефіцит факторів коагуляції XI або VII) або інгібітори коагулюючих факторів можуть спричинити пов'язані з кровотечею порушення. Надмірна кровотеча також трапляється у суб'єктів з нормально функціонуючим каскадом згортання крові (без дефіциту коагулюючого фактора або інгібіторів проти будь-якого з факторів коагуляції) і може бути викликана порушенням функції тромбоцитів, тромбоцитопенією або псевдо гемофілією фон Віллебранда. У таких випадках кровотеча може бути порівняна з кровотечею, спричиною гемофілією, оскільки кровоспиняюча система, як і при гемофілії, відчуває брак або відхилення у "сполуках", які відповідають за зсілість (таких як тромбоцити або білок фактора фон Віллебранда), що спричинює значні кровотечі. У суб'єктів, які зазнали значного пошкодження тканин у зв'язку з хірургічним втручанням або значною травмою, нормальний кровоспиняючий механізм може бути послаблений через необхідність негайного гемостазу, і у них може посилюватися кровотеча, незважаючи на в цілому нормальний (до травми) кровоспиняючий механізм. Досягнення задовільного гемостазу також є проблемою, коли кровотеча трапляється в таких органах, як мозок, зона внутрішнього вуха та очі, де обмежується можливість хірургічного гемостазу. Така сама проблема може виникнути у процесі біопсії з різних органів (печінки, легенів, пухлинних тканин, шлунково-кишкового тракту), а також при лапароскопічних операціях.

Спільними для всіх цих ситуацій є труднощі, пов'язані з забезпеченням гемостазу хірургічними способами (накладання швів, скоб тощо), що трапляється також при розсіяній кровотечі (геморагічний гастрит та профузна маткова кровотеча). Гострі та профузні кровотечі також можуть траплятися у суб'єктів при антикоагулянтній терапії, у яких порушення гемостазу були викликані наданою терапією. Такі суб'єкти можуть потребувати хірургічного втручання у разі, коли вимагається швидка протидія антикоагулянтному впливові. Для суб'єктів з локалізованим раком передміхурової залози зазвичай застосовують радикальну ретролобову простатектомію. Операція часто ускладнюється значною, часом дуже великою втратою крові. Значна втрата крові під час простатектомії найчастіше буває пов'язана з ускладненим анатомічним розташуванням, з різними густо васкуляризованими ділянками, які є важкодоступними для хірургічного гемостазу і можуть призвести до розсіяної кровотечі з великої площі. Іншою ситуацією, яка може викликати проблеми у разі незадовільного гемостазу, є ситуація, коли суб'єкти з нормальним кровоспиняючим механізмом піддаються антикоагулянтній терапії для запобігання тромбоемболії. Така терапія може включати застосування гепарину, інших форм протеогліканів, варфарину або інших форм антагоністів вітаміну К, а також аспірину та інших інгібіторів агрегації тромбоцитів.

В одному варіанті втілення винаходу кровотеча пов'язана з гемофілією. В іншому варіанті втілення кровотеча пов'язана з гемофілією через набуті інгібітори. В іншому варіанті втілення кровотеча пов'язана з тромбоцитопенією. В іншому варіанті втілення кровотеча пов'язана з псевдогемофілією. В іншому варіанті втілення кровотеча пов'язана з важким пошкодженням тканин. В іншому варіанті втілення кровотеча пов'язана з важкою травмою. В іншому варіанті втілення кровотеча пов'язана з хірургічним втручанням. В іншому варіанті втілення кровотеча пов'язана з лапароскопічним хірургічним втручанням. В іншому варіанті втілення кровотеча пов'язана з геморагічним гастритом. В іншому варіанті втілення кровотеча є профузною матковою кровотечею. В іншому варіанті втілення кровотеча трапляється в органах з обмеженою можливістю механічного гемостазу. В іншому варіанті втілення кровотеча трапляється у мозку, зоні внутрішнього вуха або очях. В іншому варіанті втілення кровотеча пов'язана з процесом біопсії. В іншому варіанті втілення кровотеча пов'язана з антикоагулянтною терапією.

Композиція згідно з винаходом також може включати інгібітор TFPI. Така композиція в оптимальному варіанті має вводитись суб'єктам з гемофілією А або В.

Композиція згідно з винаходом також може включати фактор VIII. Таку композицію в оптимальному варіанті вводять суб'єктам, які не мають інгібіторів фактора VIII.

У цьому контексті термін "лікування" включає як запобігання можливій кровотечі, наприклад, при хірургічному втручанні, так і регулювання кровотечі, яка вже відбувається, наприклад, при гемофільії або травмі, з метою стримування або мінімізації кровотечі. Профілактичне введення фактора VIIa

та фактора XIII, таким чином, охоплюється терміном "лікування".

Вжитий авторами термін "суб'єкт" означає будь-яку тварину, зокрема, ссавця, такого як людина, і може у певному випадку вживатися переміжно з терміном "пацієнт".

Скорочення

TF	тканинний фактор
FVII	фактор VII в його одноланцюговій неактивованій формі
FVIIa	фактор VII в його активованій формі
rFVIIa	рекомбінантний фактор VII в його активованій формі
FXIII	фактор XIII в його зимогенній неактивованій формі
FXIIIa	фактор XIII в його активованій формі
rFXIII	рекомбінантний FXIII
rFXIIIa	рекомбінантний FXIIIa
a2	альфа- або а-ланцюг FXIII або rFXIII
b2	бета- або b-ланцюг FXIII або rFXIII
FXIIIa2	димерна форма FXIII, яка містить два а-ланцюги
FXIIIa2b2	тетрамерна форма FXIII, яка містить два а- та два b-ланцюги
FVIII	фактор VIII в його зимогенній неактивованій формі
rFVIII	рекомбінантний FVIII
FVIIIa	фактор VIII в його активованій формі
rFVIIIa	рекомбінантний FVIIIa
TFPI	інгібітор шляху тканинного фактора

Одержання сполук

Очищений фактор VIIa людини, придатний для застосування у даному винаході, в оптимальному варіанті одержують способом рекомбінантних ДНК, наприклад, як описано в роботі Hagen et al., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 83:2412-2416,1986 або як описано в європейському патенті №200,421 (ZymoGenetics, Inc.). Фактор VIIa, одержаний рекомбінантним способом, може бути автентичним фактором VIIa або більше чи менше модифікованим фактором VIIa, за умови, що такий фактор VIIa має практично таку саму біологічну активність для коагуляції крові, що й автентичний фактор VIIa (природний фактор VIIa). Такий модифікований фактор VIIa одержують шляхом модифікації нуклеїново-кислотної послідовності, що кодує природний фактор VII, або шляхом зміни амінокислотних кодонів, або шляхом видалення деяких із амінокислотних кодонів у нуклеїновій кислоті, що кодує природний фактор VII відомими способами, наприклад, шляхом сайт-специфічного мутагенезу.

Фактор VII також одержують способами, описаними в роботах Braze and Majerus, J.Biol.Chem. 255 (4): 1242-1247,1980, та Hedner and Kisel, J.Clin.invest. 71:1836-1841,1983. Ці способи забезпечують фактор VII без помітної кількості інших факторів коагуляції крові. Ще більше очищений фактор VII одержують шляхом включення додаткової гель-фільтрації як кінцевого етапу очищення. Фактор VII у цьому разі перетворюється на активований фактор VIIa відомими способами, напри-

клад, кількома різними білками плазми, такими як фактор XIIa, IXa або Ха. В альтернативному варіанті, як описано в роботі Bjoern et al. (Research Disclosure, 269 September 1986, pp. 564-565), фактор VII активують шляхом пропущення його через іонообмінну хроматографічну колонку, таку як Mono Q® (Pharmacia fine Chemicals) або іншу подібну колонку.

Фактор XIII для застосування згідно з даним винаходом одержують із плазми згідно з відомими способами, такими як описані в роботах Cooke and Holbrook (Biochem. J. 141:79-84, 1974) та Curds and Lorand (Methods Enzymol. 45:177-191, 1976), на які автори посилаються. Димерну форму a2 фактора XIII одержують із плаценти, як описано у патентах США №№ 3,904,751; 3,931,399; 4,597,899 та 4,285,933, на які автори посилаються. Однак перевагу віддають застосуванню рекомбінантного фактора XIII для уникнення застосування продуктів кров'яного або тканинного походження, пов'язаного з ризиком перенесення хвороб. Способи одержання рекомбінантного фактора XIII є відомими спеціалістам. Див., наприклад, Davie et al., EP 268,772; Grundmann et al., AU-A-69896/87; Bishop et al., Biochemistry 1990,29:1861-1869; Board et al., Thromb. Haemost. 1990, 63:235-240; Jagadeeswaran et al., Gene 1990, 86:279-283; та Broker et al., FEBS Lett. 1989,248:105-110, на які автори посилаються в їх повному обсязі. В одному варіанті втілення a2-димер фактора XIII одержують цитоплазматично у дріжджах *Saccharomyces cerevisiae*, як описано у патентній заявці США №07/741,263, яка також перебуває у стадії розгляду і на яку автори посилаються в її повному обсязі). Клітини збирають і піддають лізису, одержуючи прозорий лізат. Цей лізат фракціонують шляхом аніонообмінної хроматографії при рН від нейтрального до слабо лужного, застосовуючи колонку дериватизованої агарози, такої як швидкоплинна сефароза DEAE Fast-Flow Sepharose.TM. (Pharmacia) або ін. Фактор XIII після цього осаджують з елюату колонки шляхом його концентрування та доведення рН до 5,2-5,5, наприклад, шляхом діалізації на сукцинатно-амонієвому буфері. Осад далі розчиняють і очищають, застосовуючи традиційні способи хроматографії, такі як гель-фільтрація та хроматографія з гідрофобною взаємодією.

Як стане зрозуміло спеціалістам, перевагу віддають застосуванню білків фактора XIII та фактора VIIa, сингеним із суб'єктом, для зниження ризику викликання імунної реакції. Одержання та характеристики фактора XIII не людського походження описано в роботі Nakamura et al. (J. Biochem. 78:1247-1266, 1975). Даний винахід також охоплює застосування таких білків фактора XIII та фактора VIIa у ветеринарних процедурах.

Введення та фармацевтичні композиції

Для лікування у зв'язку з запланованим хірургічним втручанням фактор VII та фактор XIII, як правило, вводять у межах приблизно 24 годин до здійснення втручання і протягом 7 днів або більше після нього. Введення як коагулянта здійснюють різними шляхами, як описано у даному винаході.

Доза фактора VII становить від приблизно 0,05мг до приблизно 500мг/день, наприклад, від

приблизно 1мг до приблизно 200мг/день, або, наприклад, від приблизно 10мг до приблизно 175мг/день для суб'єкта масою 70кг як ударні та підтримуючі дози, залежно від маси суб'єкта, стану та його тяжкості.

Доза фактора XIII становить від приблизно 0,05мг до приблизно 500мг/день, наприклад, від приблизно 1мг до приблизно 200мг/день, або, наприклад, від приблизно 10мг до приблизно 175мг/день для суб'єкта масою 70кг як ударні та підтримуючі дози, залежно від маси суб'єкта, стану та його тяжкості.

Композиції та комплекти даного винаходу корисні для медицини та ветеринарії, наприклад, для лікування або профілактики, розрахованих на суб'єктів, які страждають нападів кровотечі або порушень коагуляції. Для застосування згідно з даним винаходом фактор VIIa та фактор XIII рецептують необов'язково з фармацевтично прийнятним носієм. В оптимальному варіанті фармацевтичні композиції вводять парентерально, тобто внутрішньовенно, підшкірно або внутрішньом'язово, або шляхом безперервного або пульсуючого вливання.

Композиції також можуть включати один або кілька розріджувачів, емульгаторів, консервантів, буферів, наповнювачів тощо і можуть існувати в таких формах, як рідини, порошки, емульсії, форма контрольованого вивільнення і т. ін. Спеціаліст у даній галузі може рецептувати композиції винаходу відповідним чином і згідно з загальноприйнятою практикою, наприклад, як описано у Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990. Композиції для парентерального введення включають фактор VII та фактор XIII у комбінації, в оптимальному варіанті - розчинені у фармацевтично прийнятному носії, в оптимальному варіанті - водному носії. Використовують різні водні носії, такі як вода, буферована вода, 0,4% сольовий розчин, 0,3% гліцин тощо. Різновиди фактора VII згідно з винаходом також можуть бути рецептовані у ліпосомні композиції для введення або спрямування на місця пошкоджень. Загальний опис ліпосомних композицій міститься, наприклад, у U.S. 4,837,028, U.S. 4,501,728 та U.S. 4,975,282.

Типова фармацевтична композиція для внутрішньовенного вливання містить 250мл стерильного розчину Рингера та 10мг фактора VIIa та/або фактора XIII. Фактичні способи приготування композицій для парентерального введення відомі або зрозумілі спеціалістам і описані детальніше, наприклад, у Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA (1990).

Коротко, фармацевтичні композиції, придатні для застосування згідно з даним винаходом, одержують шляхом змішування фактора VIIa або фактора XIII або фактора VIIa у комбінації з фактором XIII, в оптимальному варіанті - в очищеній формі, з підходящими ад'ювантами та підходящим носієм або розріджувачем. До підходящих фізіологічно прийнятних носіїв або розріджувачів належать стерильна вода та розсіл. Композиції можуть містити фармацевтично прийнятні допоміжні речовини, необхідні для наближення до фізіологічних

умов, такі як агенти регулювання pH та буферні агенти, агенти регулювання тонуусу та ін., наприклад, ацетат натрію, лактат натрію, хлорид натрію, хлорид калію, хлорид кальцію та ін. До підходящих ад'ювантів також належать кальцій, білки (наприклад, альбуміни) або інші інертні пептиди (наприклад, гліцилгліцин) чи амінокислоти (наприклад, гліцин або гістидин) для стабілізації очищеного фактора VIIa та/або фактора XIII. Іншими фізіологічно прийнятними ад'ювантами є невідновні цукри, поліспирти (наприклад, сорбіт, маніт або гліцерин), полісахариди, такі як декстрини з низькою молекулярною масою, детергенти (наприклад, полісорбат) та антиоксиданти (наприклад, бісульфіт та аскорбат). Ад'юванти, як правило, присутні у концентрації від 0,001 до 4% (маса/об'єм). Фармацевтична композиція також може містити інгібітори протеази, наприклад, аprotинін або транексамову кислоту, та консерванти. Крім того, композиція також може містити інгібітор TFPI та/або фактор VIII.

Композиції стерилізують традиційними загальновідомими способами стерилізації. Одержані внаслідок стерилізації водні розчини розфасовують для застосування або фільтрують в асептичних умовах і ліофілізують, ліофілізовану композицію перед введенням комбінують зі стерильним водним розчином.

Концентрація фактора VIIa, фактора XIII або фактора у комбінації з фактором XIII у цих композиціях може бути різною в широких межах, тобто, від меншої за приблизно 0,5% за масою, зазвичай або принаймні приблизно 1% за масою, до 15 або 20% за масою, і визначається, насамперед, об'ємом, в'язкістю рідини тощо згідно з конкретним вибраним способом введення.

Перевагу віддають введенню шляхом ін'єкції або вливання, краще - ін'єкції. Таким чином, фактор VIIa та фактор XIII одержують у формі, підходящій для внутрішньовенного введення, такої як композиція, яка є або розчинним ліофілізованим порошком, або рідкою композицією, яка містить як фактор VIIa, так і фактор XIII в одній дозованій формі, або розчинним ліофілізованим порошком, або рідкою композицією, яка містить фактор VIIa та розчинений ліофілізований порошок в одній дозованій формі, або рідкою композицією, яка містить фактор XIII в іншій дозованій формі.

Місцеве введення фактора VIIa та фактора XIII, наприклад, місцеве нанесення, здійснюють, наприклад, шляхом розпилювання, перфузії, подвійних балонних катетерів, розширювача, введення у судинні трансплантати, гідрогелів, які застосовують для вкривання балонних катетерів, або інших традиційно застосовуваних способів. Для амбулаторних пацієнтів, які вимагають щоденного підтримуючого введення, фактор VIIa та фактор XIII може застосовуватися шляхом безперервного вливання за допомогою, наприклад, портативної насосної системи. В усякому разі, фармацевтична композиція має передбачати кількість фактора VIIa та фактора XIII, достатню для ефективного лікування суб'єкта.

Комбінація фактора VIIa та фактора XIII виявляє синергетичний ефект в *in vitro* аналізі твердості згустка та часу фібринолізу. Крім того, комбіна-

ція фактора VIIa та фактора XIII виявляє синергетичний ефект в утворенні стійких фібринових згустків, збільшуючи час лізису половини згустка, збільшуючи міцність згустка та стійкість до фібринолізу.

Композиції, які містять фактор VII та фактор XIII, вводять для профілактичного та/або терапевтичного лікування. При терапевтичному застосуванні композиції вводять суб'єктові, який уже страждає від хвороби, як описано вище, у кількості, достатній для виліковування, послаблення або часткового призупинення хвороби та її ускладнень. Достатню для цього кількість визначають як "ефективну кількість" або "терапевтично ефективну кількість". Як стане зрозуміло спеціалістові, ефективна кількість залежить від тяжкості хвороби або пошкодження, а також маси та загального стану суб'єкта. Слід зважати, що матеріали даного винаходу зазвичай застосовують у разі серйозної хвороби або пошкодження, тобто коли існує або може існувати загроза для життя. У цих випадках для зменшення побічних ефектів і за умов загального браку імуногенності фактора VIIa та фактора XIII у людини, лікар може вважати можливим і бажаним введення значної надлишкової кількості цих композицій.

При профілактичному застосуванні композиції, які містять фактор VIIa та фактор XIII, вводять суб'єктові, сприйнятливому або іншим чином підданому ризикові хвороби або пошкодження, для підвищення його здатності до коагуляції. Така кількість визначається як "профілактично ефективна доза."

Одно - або багаторазове введення композицій здійснюють у дозах і за схемою, які визначаються лікарем. Композиції можуть вводиться один або кілька разів на день або тиждень. Ефективною кількістю такої фармацевтичної композиції є кількість, яка забезпечує клінічно значущий ефект проти нападів кровотечі. Така кількість частково залежить від конкретного стану, який піддають лікуванню, віку, маси та загального стану здоров'я суб'єкта, а також інших чинників, які є очевидними для спеціалістів.

Композицію, як правило, вводять однією окремою дозою до передбачуваної кровотечі або на початку кровотечі. Однак вона також може вводиться і кількома дозами, в оптимальному варіанті - з інтервалами 2-4-6-12 годин, залежно від дози та стану суб'єкта.

Композиція може існувати у формі окремого препарату, який містить як фактор VIIa, так і фактор XIII у підходящих концентраціях. Композиція також може існувати у формі комплексу, який складається з першої форми дозованої одиниці, яка включає фактор VIIa, та другої форми дозованої одиниці, яка включає фактор XIII і, необов'язково, одну або кілька інших форм дозованих одиниць, які включають фактор VIII та/або інгібітор TFPI. У цьому разі фактор VIIa та фактор XIII вводять послідовно, в оптимальному варіанті - з інтервалом приблизно 1-2 години між ними, наприклад, у межах 30 хвилин між ними, краще - у межах 10 хвилин, ще краще - у межах 5 хвилин між ними. Будь-яка з цих двох форм дозованих одиниць може бути введена першою.

Оскільки даний винахід стосується профілактики або лікування нападів кровотечі або забезпечення коагуляції шляхом лікування комбінацією активних інгредієнтів, які можуть вводитися окремо, винахід також стосується поєднання окремих фармацевтичних композицій у формі комплекту. Комплект включає принаймні дві окремі фармацевтичні композиції. Він також включає тару для окремих композицій, таку як флакон з перегородкою або пакет із фольги з перегородкою. Як правило, комплект включає інструкцію з введення окремих компонентів. Форма комплекту є особливо вигідною у разі, коли перевагу віддають введенню окремих компонентів у різних дозованих формах, з різними інтервалами між дозами, або коли лікар вважає бажаним титрування окремих компонентів комбінації.

Аналізи

Випробування на активність фактора VIIa:

Підходящий аналіз для випробування на активність фактора VIIa, а отже, й відбір підходящих різновидів фактора VIIa, здійснюють як просте попереднє *in vitro* випробування:

In vitro гідролітичний аналіз

Природний (дикого типу) фактор VIIa та різновид фактора VIIa (далі обидва вказуються як "фактор VIIa") можуть бути піддані аналізу на специфічну активність. Вони також можуть бути паралельно піддані аналізу для прямого порівняння їхньої специфічної активності. Аналіз здійснюють у мікротитрувальному планшеті (MaxiSorp, Nunc, Данія). Хромогенний субстрат D-Ile-Pro-Arg-р-нітроанілід (S-2288, Chromogenix, Швеція), кінцева концентрація 1мМ, додають до фактора VIIa (кінцева концентрація 100нМ) у 50мМ Hepes, pH 7,4, що містить 0,1М NaCl, 5мМ CaCl₂ та 1мг/мл альбуміну сироватки великої рогатої худоби. У пристрої для зчитування планшетів SpectraMax™ 340 (Molecular Devices, США) безперервно вимірюють оптичну густину при 405нм. Від значення оптичної густини, виявленого під час 20-хвилинної інкубації, віднімають значення оптичної густини у чистій лунці, що не містить ферменту, і різницю застосовують для розрахунку співвідношення показників активності різновиду та природного фактора VIIa:

Співвідношення = $(A_{405\text{нм}} \text{ різновиду фактора VIIa}) / (A_{405\text{нм}} \text{ фактора VIIa дикого типу})$.

На основі даного рівняння можуть бути ідентифіковані різновиди фактора VIIa з активністю, приблизно рівною або вищою від природного фактора VIIa, наприклад, різновиди, у яких співвідношення між активністю різновиду та активністю природного фактора VII, як показано на Фіг.1, становить приблизно 1,0, але не більше.

Активність фактора VIIa або різновидів фактора VIIa також вимірюють, застосовуючи фізіологічний субстрат, такий як фактор X, в оптимальному варіанті - у концентрації 100-1000нМ, причому вироблений фактор Ха вимірюють після додавання підходящого хромогенного субстрату (наприклад, S-2765). Крім того, аналіз активності може здійснюватися при фізіологічній температурі.

Здатність фактора VIIa або різновидів фактора VIIa до вироблення тромбіну також може бути виміряна шляхом аналізу, який включає всі відповід-

ні фактори коагуляції, інгібітори у фізіологічних концентраціях (мінус фактор VIII при імітації умов гемофільії А) та активовані тромбоцити (як описано на стор. 543 роботи Monroe et al. (1997) Brit. J. Haematol. 99, 542-547, на яку автори посилаються).

Випробування на активність фактора XIII:

Підходящий аналіз з випробуванням на активність трансглютамінази фактора XIII, а отже, вибір підходящих різновидів фактора XIII, здійснюють як просте *in vitro* випробування, як описано, наприклад, у роботі [Methods of Enzymology, т.45 (1976), Proteolytic Enzymes, ч.В, стор.177-191 (Ed. Lorand, L)].

Даний винахід далі пояснюється за допомогою наведених прикладів, які, однак, не повинні тлумачитися як такі, що обмежують обсяг захисту. Особливості, описані вище, та нижчеподані приклади можуть, як окремо, такі і у будь-якій комбінації, бути суттєвими для розуміння винаходу в його різних формах.

Приклади

Приклад 1.

Фактор XIII посилює викликану фактором VIIa зсілість фібрину.

Нормальну плазму людини (NHP) розводили 1/10 у буфері, що містив 20мМ HEPES, 150мМ NaCl, 5мМ CaCl₂, pH 7,4, у мікротитрувальній лунці (загальний об'єм 250мкл) і зсілість фібрину простежувалася за збільшенням оптичної густини при 600нм у Spectramax™ 340 (Molecular Devices, Sunnyvale CA).

Спонтанне утворення згустка досягалося за приблизно 2500-3000сек. На Фіг.1 показано, що 10нМ рекомбінантного фактора VIIa (rFVIIa) (Novo Nordisk A/S Bagsvaerd, Данія) скорочували час утворення згустка до 1600сек (n=2). Подальше скорочення часу утворення згустка досягалося, коли додавали 30нМ фактора XIII (FXIII) (American Diagnostica inc, Greenwich, CT) разом з 10нМ rFVIIa (n=3). Згусток, утворений у присутності FXIII, був прозорішим (мав нижчу максимальну оптичну густину), ніж за його відсутності, вказуючи на те, що додавання FXIII забезпечує дрібнішу гелеву структуру фібрину з тоншими волокнами.

Приклад 2.

Присутність додаткового фактора XIII під час викликаного фактором VIIa утворення згустка забезпечує збільшення стійкості до фібринолітичного розпаду.

Фібриновий згусток, який складається з тонких волокон, є механічно міцнішим і важче піддається розпадові, ніж згусток, який містить таку саму кількість фібрину, але складається з товстих волокон або меншої кількості поперечно зшитих волокон. Результати експерименту, наведені на Фіг.2, свідчать про те, що додатковий FXIII (30нМ) подовжує час лізису фібрину згустків, утворених у присутності rFVIIa та активатора тканинного плазміногену (t-PA, American Diagnostica). Утворення згустка ініціювали у присутності або за відсутності 30нМ FXIII шляхом додавання 25мкл NHP до 225мкл 20нМ HEPES, 150мМ NaCl, 5мМ CaCl₂, pH 7,4, що містив 50нМ rFVIIa та 0,5нМ рекомбінантного t-PA. Утворення згустка та наступний лізис згустка, викликані опосередкованою t-PA активацією плазмі-

ногену, спостерігали за допомогою Spectramax® 340 при 600nm як збільшення OD_{600nm} з наступним поверненням траєкторії до базового рівня. На Фіг.2 показано, що час лізису згустка за цих умов значно подовжувався завдяки присутності FXIII.

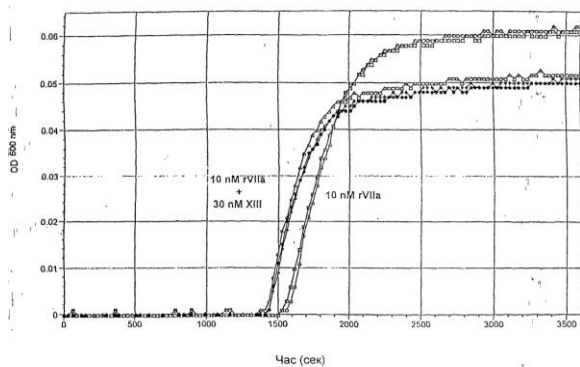
Приклад 3.

Фактор VIIa у комбінації з фактором XIII збільшує максимальну твердість згустка і стійкість згустка до фібринолізу.

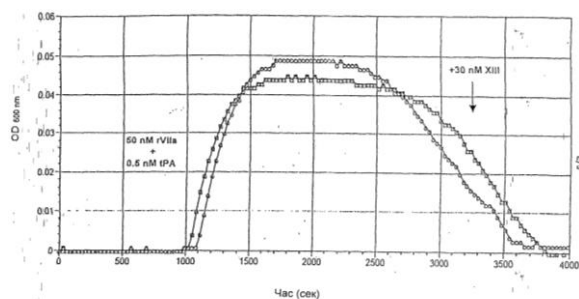
Тромбеластиграфічні вимірювання здійснювали на нормальній плазмі людини, до якої додавали 6нМ рекомбінантного активатора плазміногену тканинного типу (t-PA, American Diagnostica), і аналізувати вплив додавання 1нМ rFVIIa (Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Данія), окремо або у комбінації з різними концентраціями фактора XIII (FXIII, Haematologic Technologies, HXIII-0160, Lot N1212). Зсілість викликали додаванням інновіну (Innovin) (кінцева концентрація 2000-разового розчинення, Dade Behring # 526945) та кальцію (кінцева концентрація 15мМ) у 20мМ буфера HEPES, 150мМ NaCl, pH 7,4.

Тромбеластиграфічні вимірювання застосову-

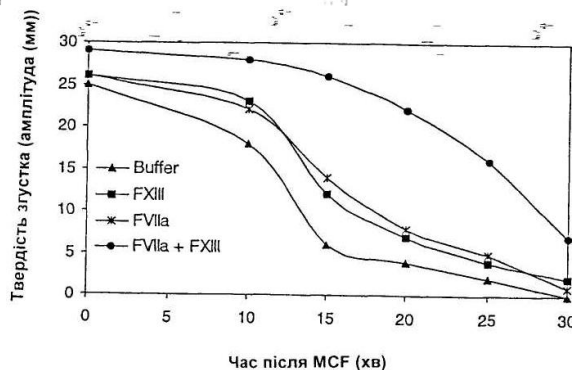
вали для аналізу впливу rFVIIa та FXIII на максимальну твердість згустка (MCF), а також стійкість згустка до опосередкованого t-PA лізису. Перед додаванням rFVIIa та/або FXIII досягнутий показник MCF становив 25мм, і час, необхідний для лізису половини згустка, становив 12,3 хвилини (Фіг.3). Додавання збільшених концентрацій FXIII (0-40нМ) не змінювало MCF; однак спостерігалось залежне від дози подовження часу лізису половини згустка, причому оптимальні дані спостерігалися при 30нМ FXIII (час лізису половини згустка: 14,3хв, Фіг.3). Так само додавання rFVIIa (1нМ) забезпечує захист згустка від опосередкованого t-PA фібринолізу (час лізису половини згустка 16,4хв) без будь-якого впливу на MCF (Фіг.3). Однак після додавання rFVIIa (1нМ) разом з FXIII (30нМ) спостерігали збільшення MCF (29мм), а також надійний захист від фібринолізу (час лізису половини згустка 27,1хв) (Фіг.3). Разом ці результати демонструють, що додавання rFVIIa та FXIII до плазми синергетично поліпшує механічну міцність згустка та стійкість до опосередкованого t-PA фібринолізу.



Фіг. 1



Фіг. 2



Фіг. 3