

Цей винахід має відношення до медицини, зокрема, до лікування станів гіперкоагуляції або набутієї недостатності білку С за допомогою активованого білку С.

Білок С є сериновою протеазою та природним антикоагулянтом, який відіграє роль у регулюванні гемостазу завдяки своїй здатності до блокування продукування тромбіну шляхом інактивації факторів Va та VIIIa у системі згортання крові. Людський білок С утворюється *in vivo* головним чином у печінці у вигляді одноланцюгового поліпептиду, який складається з 461 амінокислоти. Ця молекула-попередник піддається численним посттрансляційним модифікаціям, до яких належать 1) гідроліз 42-амінокислотної сигнальної послідовності; 2) протеолітичне видалення з одноланцюгового зимогену залишку лізину у положенні 155 та залишки аргініну у положенні 156 з одержанням молекули 2-ланцюгової форми (тобто легкого ланцюгу з 155 амінокислотних залишків, який приєднано через дисульфідний місток до важкого ланцюгу з 262 амінокислотних залишків, до складу якого входить серинова протеаза); 3) залежне від вітаміну К карбоксилювання дев'яти залишків глютамінової кислоти, згрупованих у перших 42 амінокислотах згаданого легкого ланцюгу, наслідком чого є одержання дев'яти залишків гамма-карбоксиглутамінової кислоти; та 4) приєднання вуглеводу у 4 місцях (одне у згаданому легкому ланцюзі та три у згаданому важкому ланцюзі). До складу згаданого важкого ланцюгу входить добре відома серинпротеазна триада Asp 257, His 211 та Ser 360. І, нарешті, циркулюючий 2-ланцюговий зимоген активується *in vivo* тромбіном на поверхні фосфоліпиду у присутності іону кальцію. Активація є наслідком видалення додекапептиду на N-кінцевій ділянці згаданого важкого ланцюгу з утворенням активованого протезу С (aPC), який має ферментну активність.

У злагоді з іншими білками, активований протеїн С функціонує як, можливо, найважливіший негативний регулятор згортання крові, наслідком чого є захист від тромбозу. На додаток до антикоагуляційних функцій aPC має протизапальні ефекти завдяки тому, що він інгібує продукування цитокінів (наприклад, TNF (фактор некротизації пухлинних клітин) та IL-1 (інтерлейкін-1)), а також має профібринолітичні властивості, які полегшують лізис згустку крові. Таким чином, ферментна система білку С представляє собою головний фізіологічний антикоагуляційний, протизапальний та фібринолітичний механізм.

#### СЕПСИС.

Сепсис визначають як системну запальну реакцію на інфекцію, яка пов'язується з та опосередковується активацією цілого ряду механізмів захисту хазяїна, у тому числі сітки цитокінів, лейкоцитів та системи комплементу та коагуляції/фібринолізу. [Местерс (Mesters) та інші, Blood, 88: 881-886, 1996]. Дисеміноване внутрішньосудинне згортання [DIC] з поширеним відкладенням фібрину у мікроциркуляторній частині судинного русла різноманітних органів є початковим проявом сепсису/септичного шоку. Дисеміноване внутрішньосудинне згортання є важливим посередником у розвитку синдрому одночасної недостатності багатьох органів і додає свій внесок до несприятливого прогнозу пацієнтів з септичним шоком [Фур'єр (Fourrier) та інші, Chest, 101: 816-823, 1992].

Було повідомлено про декілька обнадійливих передклінічних досліджень з використанням білку С на різних тваринних моделях сепсису. Під час проведення дослідження Тейлором (Taylor) та іншими, [J.Clin. Invest., 79: 918-25, 1987] у моделі сепсису на павіанах було використано одержаний з плазми людський активований білок С. Тварин піддавали профілактичній обробці (тобто, aPC вводили перед започаткуванням двогодинної інфузії LD<sub>100</sub> E.coli). П'ять з п'яти тварин вижили впродовж 7 днів і їх було віднесено до тварин, які, за згаданим експериментальним протоколом, виживають постійно. П'ять з п'яти контрольних тварин, яким було проведено ідентичне впродовж E.coli, завинули впродовж 24-32 годин. Ефективна доза становила від 7мг/кг до 8мг/кг.

У ліпополісахаридній (LPS; E.coli) моделі сепсису на пацюках [Мураками (Murakami) та інші, Blood, 87: 642-647, 1996] пошкодження легених судин, яке було спричинено ліпополісахаридом, пригнічували активованим білком С, який було одержано з людської плазми, у дозі 100мг/кг. На додаток до цього на моделі сепсису у кролів, який було викликано накладенням лігатури та пункцією, Окамото (Okamoto) та інші, [Gastroenterology, 106: A747, 1994], було продемонстровано ефективність плазматичного людського активованого білку С щодо захисту тварин від коагулопатії та недостатності органів у дозі 12мг/кг/год впродовж дев'яти годин. Унаслідок видоспецифічності aPC результати, які було одержано на згаданих тваринах, не є обов'язково прогностичними для лікування людей. Рівні ефективної дози людського активованого білку С є надзвичайно змінними та непередбачуваними у залежності від обраної тваринної моделі. Наприклад, час напівжиття людського активованого білку С у кров'яному руслі людей становить від 30 хвилин до 40 хвилин, порівняно до 8-10 хвилин у павіанів та 90 хвилин у кролів.

Нещодавно було здійснено численні спроби лікування сепсису у людей з застосуванням, у більшості випадків, агентів, які блокують посередники запалення, пов'язані з патофізіологією цього захворювання. Однак, клінічні дослідження з різноманітними агентами, які блокують посередники запалення, були невдалими [оглядова стаття Натансона (Natanson) та інших, Ann. Intern. Med., 120: 771-783, 1994; Джібальді (Gibaldi), Pharmacotherapy, 13: 302-308, 1993]. Оскільки багато зі згаданих посередників, які залучено до запального процесу, є компенсаторними реакціями і, таким чином, вони мають корисні ефекти, деякі дослідники висунули припущення, що блокування їхньої дії може бути невідповідним [наприклад, Паррілло (Parrillo), N.Engl. J. Med., 328: 1471-1477, 1993].

Нещодавно блокування дисемінованого внутрішньосудинного згортання було запропоновано як нову ціль клінічних досліджень при сепсисі [наприклад, Леві (Levi) та інші, JAMA, 270: 975-979, 1993]. Однак просте блокування коагуляційного пошкодження при сепсисі може бути недостатнім. Як повідомляється у оглядовій роботі Есмона (Esmon), [Arteriosclerosis&Thromb., 12: 135-145, 1992], декілька протитромбоцитарних препаратів виявились неефективними у моделі сепсису на павіанах, у тому числі активний фактор Ха з блокованими ділянками [Тейлор (Taylor) та інші, Blood, 78: 364-368, 1991], гірудин та гірулог [Мараганоре (Maraganore), Perspective in Drug Discovery and Design, 1: 461-478, 1994]. Кожен зі згаданих протитромбоцитарних препаратів був здатним до блокування коагулопатії споживання у тварин, але вони не були здатними до поліпшення виживаності. На додаток до цього японські дослідники [заявка на патент Японії JP-7097335A] запропонували лікування коагулопатії, пов'язаної з печінковою недостатністю, яка має потенціал

розвитку симптомів, які нагадують дисеміноване внутрішньосудинне згортання, за допомогою плазматичного активованого білку С

До цього часу зимоген плазматичного людського білку С було використано як вдалий допоміжний засіб до інвазивних методів лікування двадцяти п'яти пацієнтів з блискавичною пурпурою, після бактеріального сепсису від якої двадцять два пацієнти вижило (Герсон (Gerson) та інші, *Pediatrics*, 91:418:422, 1993; Сміт (Smith) та інші, *Thromb. Haemost.*, PS1709, стор.419, 1997; Рінтала (Rintala) та інші, *Lancet*, 347: 1767, 1996; Рівард (Rivard) та інші, *J.Pediatr.*, 121: 646-652, 1995). У роботі Герсона (Gerson) та інших, [1993], наведено опис випадку лікування дитини з підтвердженою грампозитивною бактеріемією та блискавичною пурпурою, яка не реагувала на традиційні інвазивні методи лікування. Згаданого пацієнта лікували плазматичним зимогеном людського білку С (ударна доза 280мкг/кг+інфузія 40мкг/кг/год), внаслідок чого вдалось досягти асоційованої корекції коагулопатії та дисемінованого внутрішньосудинного згортання, та пригнічення клінічних симптомів розвитку пов'язаного з блискавичною пурпурою септичного шоку. У роботі Рінтала (Rintala) та інших, [1996] повідомлялось про лікування 2 дорослих з менінгококовою септицемією у поєднанні з блискавичною пурпурою. Згаданих пацієнтів лікували плазматичним зимогеном білку С (ударна доза, 400мкг/кг, кожні шість годин впродовж 8-10 днів). Один вмер, один вижив. У роботі Ріварда (Rivard) та інших, [1995] повідомлялось про лікування чотирьох пацієнтів з менінгококемією, також у поєднанні з блискавичною пурпурою, усі з яких вижили після лікування зимогеном людського білку С. Згаданих пацієнтів лікували шляхом введення ударної дози, 400мкг/кг, кожні шість годин. Незважаючи на невеликі розміри зразків зі згаданих досліджень, смертність унаслідок менінгококемії у поєднанні з блискавичною пурпурою, перевищує 50% [Поуерс (Powers) та інші, *Clin. Infectious Diseases*, 17: 254-261, 1993]. Однак, оскільки згадані дослідження проводили з зимогеном людського білку С, одержані результати не дозволяють робити значні припущення щодо встановлення дози та тривалості лікування за допомогою активованого білку С.

На додаток до менінгококемії, блискавична пурпура та/або дисеміноване внутрішньосудинне згортання пов'язуються з численними бактеріальними, вірусними або протозойними інфекціями, до яких належать, але якими не обмежуються, інфекції, які викликаються *Rickettsia* (плямиста пропасниця Скелястих Гір, клішова гарячка, висипний тиф і т.ін.) [Грейбілл (Graybill) та інші, *Southern Medical Journal*, 66 (4): 410-413, 1973; Лубсер (Loubser) та інші, *Annals of Tropical Paediatrics*, 13: 277-280, 1993]; *Salmonella* (черевний тиф, пропасниця від укусу пацюка) [Коул (Koul) та інші, *Acta Haematol*, 93: 13-19, 1995]; *Pneumococci* [Карпентер (Carpenter) та інші, *Scand. J.Infect. Dis.*, 29: 479-483, 1997], *Yersinia pestis* (бубонна чума) [Батлер (Butler) та інші, *The Journal of Infectious Disease*, 129: 578-584, 1974]; *Legionella pneumophila* (хвороба леґіонерів); *Plasmodium falciparum* (церебральна малярія) [Леркарі (Lercari) та інші, *Journal of Clinical Apheresis*, 7: 93-96, 1992]; *Burkholderia pseudomallei* (меліодоз) [Путучері (Puthuchery) та інші, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 86: 683-685, 1992]; *Streptococci* (одонтогенні інфекції) [Ота І. (Ota Y.), *J.Japanese Assoc. Infect. Dis.*, 68: 157-161]; вірусом оперізуючого лишая [Нгуєн (Nguyen) та інші, *Eur. J.Pediatr.*, 153: 646-649, 1994]; *Bacillus anthracis* (сибірка) [Франц (Franz) та інші, *Journal of the American Medical Assoc*, 278 (5): 399-411, 1997]; *Leptospira interrogans* (лептоспіроз) [Хілл (Hill) та інші, *Seminars in Respiratory Infections*, 12 (1): 44-49, 1997]; *Staphylococci* [Левін М. (Levin M.), *Pediatric Nephrology*, 8: 223-229]; *Haemophilus aegyptius* (бразильська пурпурова пропасниця); *Neisseria* (гонококемія, менінгококемія) та *Mycobacterium tuberculosis* (міліарний туберкульоз).

Незважаючи на те, що стани блискавичної пурпури, дисемінованого внутрішньосудинного згортання або набутої недостатності білку С при сепсисі/септичному шоку або інших інфекціях, було добре задокументовано, як вказано перед тим, існує незначний об'єм даних відносно того, як лікувати згаданих пацієнтів за допомогою активованого білку С. Встановити рівні людської дози на основі передклінічних фармакологічних даних, які було одержано при лікуванні активованим людським білком С на тваринних моделях, важко внаслідок видоспецифічних властивостей біологічної дії білку С.

#### ТРАНСПЛАНТАЦІЯ

Після пересадження кісткового мозку (ВМТ), печінки, нирок або трансплантування іншого органу можуть відбуватись різноманітні тромбоемболічні ускладнення, пов'язані з пересадженням [Хер (Haige) та інші, *JAMA*, 274: 1289-1295, (1995); Харпер (Harper) та інші, *Lancet*, 924-927 (1988); та Соренсен (Sorensen) та інші, *J.Inter. Med.*, 226: 101-105 (1989); Гордон (Gordon) та інші, *Bone Marrow Transplan.*, 11: 61-65, (1993)]. Повідомляли про знижені рівні циркулюючого білку С після пересадження кісткового мозку [Базарбаші (Bazarbachi) та інші, *Nouv. Rev. Fr.Hematol*, 35: 135-140 (1993); Гордон (Gordon) та інші, *Bone Marrow Trans.*, 11: 61-65 (1993)], трансплантації нирок [Соренсен (Sorensen) та інші, *J.Inter. Med.*, 226: 101-105 (1989)] та трансплантації печінки [Харпер (Harper) та інші, *Lancet*, 924-927 (1988)]. Згадана недостатність білку С додає свій внесок до стану гіперкоагуляції, внаслідок чого у пацієнтів з'являється небезпека тромбоемболічних ускладнень.

Наприклад, первинний тромбоз печінкових вен (VOD) є головним ускладненням, яке викликає обмеження дози у передтрансплантаційних схемах прийому лікарського засобу у разі пересадки кісткового мозку. Гадають, що первинний тромбоз печінкових вен є результатом облітерації невеликих внутрішньопечінкових венул внаслідок внутрішньосудинного відкладення фібрину. [Файоні (Faioni) та інші, *Blood*, 81: 3458-3462 (1993)]. На додаток до цього, первинний тромбоз печінкових вен викликає значну захворюваність та смертність після пересадження кісткового мозку [Коллінз (Collins) та інші, *Throm. and Haemo.*, 72: 28-33 (1994)]. Повідомляли про знижений рівень білку С, який співпадав з максимальним рівнем первинного тромбозу печінкових вен [Харпер (Harper) та інші, *Bone Marrow Trans.*, 5: 39-42 (1990)] і який, можливо, є сприятливим фактором генезу цього стану.

Дисфункція органу після пересадження кісткового мозку, у тому числі легень, центральної нервової системи, печінки або нирок, є ускладненням, яке відбувається у високого відсотку, трансплантованих пацієнтів [Хер (Haige) та інші, *JAMA*, 274: 1289-1295, (1995)]. Дисфункція одного органу у разі пересадження кісткового мозку є вагомим прогностичним фактором синдрому одночасної недостатності багатьох органів (MODS), який є провідною причиною смерті пацієнтів з пересадженим кістковим мозком. Дисеміноване внутрішньосудинне згортання (DIC) внаслідок масованої активації системи коагуляції та поширеного відкладення фібрину у

мікроциркуляторній частині судинного русла різних органів є важливим посередником розвитку синдрому одночасної недостатності багатьох органів [Фур'єр (Fourrier) та інші, Chest, 101: 816-823, 1992]. Таким чином, недостатність рівнів білку С у пацієнтів, яких було піддано пересадженню кісткового мозку або інших органів, веде до стану гіперкоагуляції, яка забезпечує схильність згаданих пацієнтів до венозних тромбоемболічних ускладнень та дисфункції органів. Зараз існує потреба визначення способу лікування людей зі станом гіперкоагуляції, пов'язаним з трансплантацією органів, з застосуванням активованого білку С.

#### ОПІКИ

Здавна визнається, що пацієнти з тяжкими опіками мають ускладнення, пов'язані з гіперкоагуляцією [Каррері (Curreri) та інші, Ann. Surg., 181: 161-163 (1974)]. Пацієнти з опіками мають наднормальну коагулявальну активність *in vitro*. У згаданих пацієнтів часто спостерігається розвиток дисемінованого внутрішньосудинного згортання, яке характеризується раптовим виникненням дифузного крововиливу; споживанням фібриногену, тромбоцитів та активністю Фактору VIII; внутрішньосудинним гемолізом; вторинним фібринолізмом; та мікротромбами, підтвердженими біопсією [МакМаніс (McManis) та інші, J. of Trauma, 13: 416-422, (1973)]. Нещодавно повідомляли про те, що у пацієнтів з тяжкими опіками спостерігались дуже знижені рівні білку С, і що згадане зниження природного антикоагулянту може привести до підвищення ризику дисемінованого внутрішньосудинного згортання [Ло (Lo) та інші, Burns, 20: 186-187 (1994)]. На додаток до цього Уяма (Ueyama) та інші, при обговоренні патофізіології дисемінованого внутрішньосудинного згортання на ранньому етапі опікової травми, дійшли висновку, що масоване утворення тромбину та зниження антикоагулянтної активності може відбуватися пропорційно до тяжкості опіків [Уяма (Ueyama) та інші, Nippon Geka Gakkai Zasshi, 92: 907-12 (1991)]. Дисеміноване внутрішньосудинне згортання є одним із поширених ускладнень у пацієнтів, які страждають на тяжкі опікові травми.

Як вказувалось перед тим, у пацієнтів з тяжкими опіками було задокументовано недостатність білку С; існує, однак, невеликий об'єм даних відносно того, чи буде ефективною заміщувальна терапія з застосуванням білку С, та відносно того, яким чином лікувати згаданих пацієнтів за допомогою активованого білку С.

#### ВАГІТНІСТЬ

Добре відомо, що вагітність викликає численні зміни у системі згортання, що може привести до стану гіперкоагуляції. Наприклад, під час вагітності та після пологів ризик венозного тромбозу майже у п'ять разів вищий, ніж у разі відсутності вагітності. На додаток до цього, підвищуються рівні факторів системи згортання крові, знижуються рівні природних інгібіторів згортання, відбуваються зміни у фібринолітичній системі, посилюється венозний стаз, підвищується травмування судин під час пологів унаслідок відокремлення плаценти, кесарева розтину або інфекції [Барбур (Barbour) та інші, Obstet. Gynecol., 86: 621-633, 1995].

Незважаючи на те, що ризик ускладнення унаслідок згаданого стану гіперкоагуляції у жінок без ніяких факторів ризику є незначним, жінки, у анамнезі яких є тромбоемболічні випадки, знаходяться у стані підвищеного ризику рецидиву, коли вони вагітніють. На додаток до цього, жінки зі станом гіперкоагуляції, який знаходиться у основі, з урахуванням недавнього відкриття спадкової стійкості до активованого білку С, також мають підвищений ризик рецидиву [Далбек (Dahlback), Blood, 85: 607-614, 1995].

Таким чином, було висунуто припущення, що жінки, які мають у анамнезі венозні тромбоемболічні явища, недостатність антитромбіну-III, білку С або білку S, знаходяться у стані значного ризику рецидиву тромбозу і повинні піддаватися профілактичному антикоагулянтному лікуванню [Конрад (Conrad) та інші, Thromb. Haemost., 63: 319-320, 1990].

Стани прееклампсії та еклампсії у вагітних жінок виявляються станом підвищеної коагулопатії, як свідчить підвищення утворення фібрину, активація фібринолітичної системи, активація тромбоцитів та зниження кількості тромбоцитів [Clin. Obstet Gynecol., 35: 338-350, 1992]. Гадають, що прееклампсія є результатом матково-плацентарної ішемії унаслідок аномалії "судинного прикріплення" плаценти. До наслідків прееклампсії належить гіпертензія, а також дисеміноване внутрішньосудинне згортання, яке призводить до вивільнення численних мікротромбів, які викликають плацентарні та церебральні пошкодження, а також пошкодження нирок та печінки [Rev. Fr.Gynecol. Obstet., 86: 158-163, 1991]. На додаток до цього, прееклампсія може призвести до тяжкого з загрозой для життя стану, відомого, як синдром HELLP, який визначається як прееклампсія, ускладнена тромбоцитопенією, гемолізом та порушенням функціонування печінки [Ратгебер (Rathgeber) та інші, Anesth. Intensivther. Notfallmed., 25: 206-211, 1990]. На додаток до цього, документально було зафіксовано зниження рівнів білку С у вагітних жінок з тяжкою прееклампсією, порівняно до випадків нормальної вагітності [Де Стефано (De Stefano) та інші, Thromb. Haemost., 74: 793-794, 1995].

Таким чином, ризик венозних тромбоемболічних ускладнень, які відбуваються у вагітних жінок, є головною турботою, зокрема, у жінок, анамнез яких включає тромбоемболічні явища. Незважаючи на те, що імовірність тяжких ускладнень, наприклад, прееклампсії або дисемінованого внутрішньосудинного згортання, є відносно низькою, було висунуто припущення про необхідність започаткування лікування згаданого дисемінованого внутрішньосудинного згортання негайно після діагностування шляхом пригнічення активованої системи згортання [Ратгебер (Rathgeber) та інші, Anesth. Intensivther. Notfallmed., 25: 206-211, 1990]. Ускладнення прееклампсії або дисемінованого внутрішньосудинного згортання є аналогічними до ситуації, яка складається під час сепсису, тим, що спостерігається стан гіперкоагуляції та зниження рівнів білку С.

#### ВЕЛИКЕ ОПЕРАТИВНЕ ВТРУЧАННЯ/ТРАВМА

У пацієнтів, які видужують після великого оперативного втручання або травми, яка є наслідком нещасного випадку, часто спостерігаються ускладнення зі згортанням крові як результат індукованого стану гіперкоагуляції [Уоткінс (Watkins) та інші, Klin. Wochenschr., 63: 1019-1027, 1985]. Стани гіперкоагуляції усе частіше визнаються як причина венозної тромбоемболії у хірургічних пацієнтів [Томас (Thomas) та інші, Am. J.Surg., 158: 491-494, 1989; ЛеКлерк Дж.Р. (LeClerc J.R.), Clin. Appl. Thrombosis/Hemostasis, 3 (3): 153-156, 1997]. На додаток до цього, згаданий стан гіперкоагуляції може привести до ускладнень з симптомами, які нагадують дисеміноване внутрішньосудинне згортання, що зустрічаються нечасто, але, незважаючи на це, є загрозливими і часто ведуть до летального кінця у разі виникнення. [Коллінз (Collins), та інші, Am. J.Surg., 124:

375-380, 1977].

На додаток до цього, у пацієнтів, яких було піддано обхідному шунтуванню коронарної артерії (CABG) [Менгес (Menges) та інші, J.Cardiothor. Vase. An., 10: 482-489, 1996], великому спінальному оперативному втручанню [Майер (Mayer) та інші, Clin. Orthop., 245: 83-89, 1989], великому порожнинному оперативному втручанню [Блемі (Blarney) та інші, Thromb. Haemost., 54: 622-625, 1985], великому ортопедичному оперативному втручанню або артропластичному оперативному втручанню на нижніх кінцівках [ЛеКлерк (LeClerc), 1997] або оперативному втручанню інших типів [Томас (Thomas) та інші, Am. J.Surg., 158: 491-494, 1989], іноді розвиваються венозні тромбоемболічні ускладнення. На додаток до цього, японські дослідники запропонували лікування мікросудинного тромбозу, пов'язаного з травмою спинного мозку, [заявка на патент Японії JP-8325161A], плазматичним білком С у дозі 1-10мг/день для дорослих, або, за переважним варіантом, 2-6мг, поділених на 1-2 рази, для введення у вигляді ударної дози або шляхом внутрішньовенозної інфузії.

Висунули припущення, що антикоагулянтна терапія є важливою, як профілактична терапія для запобігання венозним тромбоемболічним явищам у травмованих пацієнтів або пацієнтів, яких було піддано великому оперативному втручанню [Томас (Thomas) та інші, 1989; ЛеКлерк (LeClerc), 1997]. Наприклад, багато пацієнтів, які вмирають від емболії легеневої артерії, не мають клінічних свідчень попередніх тромбоемболічних явищ, і вмирають до встановлення діагнозу та започаткування лікування [ЛеКлерк (LeClerc), 1997]. Профілактичні засоби, які існують, наприклад, варфарин, низькомолекулярні гепарини, мають обмеження, наприклад, залишковий проксимальний тромбоз або шляхом внутрішньовенозної інфузії.

#### РЕСПІРАТОРНИЙ ДИСТРЕС-СИНДРОМ У ДОРОСЛИХ (ARDS)

Респіраторний дистрес-синдром у дорослих [ARDS] характеризується набряком легень, мікротромбами, інфільтрацією запальних клітин та пізнім фіброзом. Основною подією згаданих численних клітинних та запальних реакцій є активація коагуляції, наслідком чого є стан гіперкоагуляції. До поширених розладів згортання, пов'язаних з респіраторним дистрес-синдромом у дорослих, належать внутрішньосудинне згортання та пригнічення фібринолізу. Фібрин, який було утворено унаслідок активації системи згортання та пригнічення фібринолізу, можливо, сприяє патогенезу гострого травмування легень. Сепсис, травми та інші критичні захворювання є важливими факторами ризику, які ведуть до респіраторного дистрес-синдрому у дорослих [Хасегава (Hasegawa) та інші, Chest, 105 (1): 268-277, 1994].

Респіраторний дистрес-синдром у дорослих пов'язується з активацією коагуляції та пригніченням фібринолізу. Існує значне клінічне підтвердження присутності легневих судинних мікроемболів, що є аналогічним до гіперкоагуляції, яка спостерігається у разі дисемінованого внутрішньосудинного згортання. Таким чином, зараз існує потреба ефективного лікування згаданого стану гіперкоагуляції, який пов'язується з респіраторним дистрес-синдромом у дорослих.

Для полегшення порівняння рівнів доз білку С, наведених у літературі та патентних документах, у Таблиці 1 наведено нормалізовані рівні доз за даними декількох досліджень на людях та нелюдиноподібних приматах. Ці дані встановлюють рівні доз, які є вищими або нижчими за рівні доз, які передбачаються цим винаходом. Слід прийняти до уваги, що дослідження на людях здійснювались з застосуванням плазматичного зимогену білку С, у той час, як у дослідженнях на нелюдиноподібних приматах було застосовано рекомбінантний людський аРС.

Таблиця 1

Довідкове джерело	Доза за публікацією	Нормалізована доза
Тейлор (Taylor) та інші, патент США №5009889	Інтравенозне введення від 2мкг до 64мкг аРС/кг/хв.; додатково може вводиться ударна доза від 1мг до 10мг аРС [стовпчик 5, рядки 14-19]	Впорскування від 120мкг/кг/год. до 3800мкг/кг/год. впродовж 8-10 годин
Рівард (Rivard) та інші, J.Ped., 126: 646, 1995	Інтравенозне введення у дозі 100МОд.* /кг плазматичного зимогену білку С впродовж 15-20 хвилин кожні 6 годин впродовж гострої фази, потім 1-2 рази на день впродовж 9 днів [стор.648, стовпчик 1, перший параграф]	400мкг/кг впродовж 15-20 хвилин
Герсон (Gerson) та інші, Ped., 91: 418-422, 1993	Інтравенозне введення ударної дози 70МОд.* /кг плазматичного зимогену білку С кожні 6 годин. У подальшому, безперервна інфузія 10МОд/кг/год впродовж 11 днів. [стор.419, стовпчик 2, 1 параграф]	Ударна доза 280мкг/кг кожні 6 годин, після чого безперервна інфузія 40мкг/кг/год. впродовж 11 днів
Рінтала (Rintala) та інші, Lancet, 347: 1767, 1996	Інтравенозне введення починали через 3 години після госпіталізування хворого та здійснювали впродовж 7 днів. 100МОд.* /кг плазматичного зимогену білку С кожні 6 годин з пізнішим коректування дози відповідно до активності плазматичного білку С. [стор.1767, стовпчик 2, 2 параграф]	Ударна доза 400мкг/кі кожні 6 годин впродовж 7 днів
Сміт (Smith) та інші, Thromb. Haem., PS-1709, 1997	Кожному пацієнту вводили ударну дозу 100МОд.* /кг плазматичного зимогену білку С з подальшою безперервною інфузією 15МОд/кг. [стор.419, стовпчик 1, PS-1709]	Ударна доза 400мкг/кг+60мкг/кг/год. (тривалість впорскування не наведено)
Фуджівара (Fujiwara) та інші, патент Японії JP7097335A	Звичайна доза 20-1000Од** плазматичного аРС/кг маси тіла/день або, за більш переважним варіантом, 50-300Од/кг з 1-2-разовим введенням. Найбільш прийнятним способом введення є інтравенозне впорскування, [стор.9, параграф]	Від 4мкг/кг до 200мкг/кг. Тривалість впорскування не наведено.

	0016]	
Окаджіма (Okajima) та інші, патент Японії JP8325161A	Ефективна доза плазматичного білку С або аРС дорівнює 1-10мг/день для дорослого, або, за переважним варіантом, 2-6мг з 1-2-разовим введенням. Способом введення може бути введення ударної дози (одноразово) або інтравенозне впорскування, [стор.10, параграф 0013]	Від 42мкг/год. до 420мкг/год.
Окаджіма (Okajima) та інші, Amer. J. of Hematology, 33:277-278 (1990)	Введення плазматичного аРС (3мг/день впродовж 2 днів, після чого 6мг/день впродовж 3 днів), [стор.278, стовпчик 1, 1 повний параграф]	2мкг/кг/год. та 4мкг/кг/год.
Бенг (Bang) та інші, патент США №4775624	Доза активованого білку С коливається у межах 1-10мг у вигляді ударної дози з подальшим безперервним впорскуванням у кількості від 3мг/день до 30мг/день. [стовпчик 19, рядки 55-59]	Від 1,8мкг/кг/год. до 18мкг/кг/год. Тривалість впорскування не наведено.

+ нормалізована доза представляє собою перетворення повідомленої дози на еквівалентне позначення у мкг/кг/год.

\* 1МОд є еквівалентом, приблизно, 4мкг білку С.

\*\* 1Од визначається, як кількість, яка подвоює час активованого протромбіну (АРТТ) у нормальній людській плазмі з подальшим перетворенням на, приблизно, 5Одиниць/мкг аРС.

Однак, незважаючи на ці повідомлення, схема прийому лікарського засобу для безпечного та ефективного лікування людей, які страждають на стан набутої гіперкоагуляції або набутої недостатності білку С, пов'язані з сепсисом, трансплантаціями, опіками, вагітністю, великим оперативним втручанням, травмами або респіраторним дистрес-синдромом у дорослих, залишається невідомою. Ці дослідження не є прогностичними для застосування рекомбінантного активованого білку С за цим винаходом для лікування станів гіперкоагуляції або набутої недостатності білку С у людей.

Цей винахід розкриває застосування аРС у клінічних випробуваннях на пацієнтах з тяжким сепсисом. У згаданих пацієнтів група, яку було піддано обробці г-аРС, демонструвала статистичне поліпшення функціонування органів, зниження рівнів маркерів дисемінованого внутрішньосудинного згортання та зниження рівня смертності порівняно до контрольної групи, яка одержувала плацебо. Дози аРС, які було застосовано для лікування пацієнтів з тяжким сепсисом, становили 12мкг/кг/год, 18мкг/кг/год, 24мкг/кг/год та 30мкг/кг/год з інфузією впродовж 48 годин. Під час згаданого дослідження була встановлена неефективність доз 12мкг/кг/год та 18мкг/кг/год. Подиву гідне, але дози 24мкг/кг/год та 30мкг/кг/год, які було застосовано під час проведення згаданого дослідження, виявились ефективними та значно і неочікувано низькими, порівняно до опублікованих передклінічних фармакологічних даних.

На додаток до цього заявники встановили, що результати передклінічних токсикологічних досліджень на нелюдиноподібних приматах вказують, що безпечність аРС для 96-годинного впорскування обмежується верхньою дозою приблизно 50мкг/кг/год. Ці дані також є неочікуваними, порівняно до попередніх даних, які були відомі у цій галузі. Фактично, рівні доз г-аРС для людей, які було оснований на результатах попередніх передклінічних або клінічних досліджень, будуть перевищувати токсикологічний діапазон, який було встановлено у вищезгаданих токсикологічних дослідженнях.

Цей винахід надає спосіб лікування пацієнтів-людей зі станом набутої гіперкоагуляції або набутою недостатністю білку С, який включає введення згаданому пацієнту активованого білку С у дозі від приблизно 20мкг/кг/год до приблизно 50мкг/кг/год шляхом безперервної інфузії впродовж від приблизно 24 годин до приблизно 144 годин.

Цей винахід додатково надає спосіб лікування пацієнтів-людей зі станом набутої гіперкоагуляції або набутою недостатністю білку С, який включає введення згаданому пацієнту ефективної кількості активованого білку С для досягнення рівнів активованого білку С у плазмі у діапазоні від 2нг/мл до 200нг/мл.

Таким чином, цей винахід надає способи застосування аРС для лікування стану гіперкоагуляції або недостатності білку С, пов'язаної з сепсисом, блискавичною пурпурою та менінгококемією у пацієнтів-людей.

Цей винахід надає способи застосування аРС для лікування стану гіперкоагуляції або недостатності білку С, пов'язаної з тяжкими опіками.

Цей винахід надає способи застосування аРС для лікування стану гіперкоагуляції або недостатності білку С, пов'язаної з пересадженням кісткового мозку або іншого органу.

Цей винахід надає способи застосування аРС для лікування стану гіперкоагуляції або недостатності білку С у пацієнтів-людей, які піддаються або видужують від великого оперативного втручання або тяжкої травми.

Цей винахід надає способи застосування аРС для лікування стану гіперкоагуляції або недостатності білку С, пов'язаної з ускладненнями під час вагітності.

Цей винахід додатково надає спосіб лікування пацієнтів-людей зі станом набутої гіперкоагуляції або набутою недостатністю білку С, пов'язаною з респіраторним дистрес-синдромом у дорослих.

Для цілей цього винаходу, які розкрито та заявлено у цьому описі, використано наведені терміни, визначення яких наведено далі.

Термін "аРС або активований білок С" означає рекомбінантний активований білок С аРС включає та є переважно людським білком С, хоча аРС може включати також білок інших видів або похідні, які мають повну протеолітичну, амідолітичну, ефіролітичну та біологічну (антикоагулянтну або профібринолітичну) активність білку С. Приклади похідних білку С наведено у патенті США №5,453,373, який було видано на ім'я Герліцу (Gerlitz) та інших, та у патенті США №5,516,650, який було видано на ім'я Фостера (Foster) та інших; описи до

згаданих патентів включено до цього опису у повному об'ємі як посилання. Рекombінатний активований білок С можна одержувати шляхом активування рекombінантного зимогену людського білку С *in vitro* або безпосереднім секретуванням активованої форми білку С. Білок С може продукуватись клітинами, еукаріотичними клітинами, трансгенними тваринами або трансгенними рослинами, у тому числі, наприклад, секретуванням лінії 293 людських клітин нирок у вигляді зимогену, з подальшим очищенням та активуванням способами, відомими досвідченому фахівцю.

Термін "лікування" означає догляд та піклування про пацієнта з метою подолання хвороби, стану або розладу, та включає профілактичне введення аРС з метою запобігання появі симптомів або ускладнень хвороби, стану або розладу, або введення аРС з метою лікування хвороби, стану або розладу.

Безперервне впорскування - по суті, безперервне продовження введення розчину до вени впродовж певного періоду часу.

Впорскування ударної дози речовини - впорскування певної кількості лікарського засобу (яка носить назву ударної) впродовж періоду часу до приблизно 120 хвилин.

Придатний для введення - ліофілізована лікарська форма або розчин, придатні для введення як терапевтичний засіб.

Поємник - контейнер, наприклад, ампула або пляшечка, яка використовується для вміщення певного матеріалу, наприклад, аРС.

Термін "стандартна дозована форма" означає фізично дискретні одиниці, придатні як стандартні дози для людей, кожна одиниця включає визначену кількість активного матеріалу, яка, за розрахунками, викличе необхідний терапевтичний ефект, у поєднанні з придатним фармацевтичним наповнювачем.

Стан гіперкоагуляції - надмірна коагульовальна здатність, пов'язана з дисемінованим внутрішньосудинним згортанням, передтромботичними станами, активацією коагулювання, уродженою або набутою недостатністю факторів системи згортання крові, наприклад, аРС.

Зимоген - термін "зимоген білку С", який використано у цьому описі, означає секретовані неактивні форми, одно- або дволанцюгові, білку С.

Юнак/підліток — пацієнт-людина з включенням, але без обмеження, новонароджених, немовлят та дітей, молодших за 18 років.

Ефективна кількість - терапевтично ефективна кількість фармацевтичної сполуки.

Пурпура блискавична - екхімозні пошкодження шкіри, пропасниця, гіпотензія, пов'язані з бактеріальним сепсисом, вірусними, бактеріальними або протозойними інфекціями; при цьому, як правило, реєструється дисеміноване внутрішньосудинне згортання.

Цей винахід має відношення до лікування або профілактики станів гіперкоагуляції або набутої недостатності білку С, пов'язаної з сепсисом, трансплантаціями, опіками, вагітністю, великим оперативним втручанням, травмами або респіраторним дистрес-синдромом у дорослих, активованим білком С. аРС можна одержувати за допомогою способів, добре відомих у цій галузі, з використанням ліній еукаріотичних клітин, трансгенних тварин або трансгенних рослин. Досвідченим фахівцям легко зрозуміло, що до відповідних ліній еукаріотичних клітин-хазяїв належать, але ними не обмежуються, клітини HEPG-2, LLC-MK2, CHO-K1, 293 або AV12, приклади яких наведено Гріяеллом (Grinnell) у патенті США №5,681,932, який включено до цього опису як посилання. На додаток до цього, приклади трансгенного продукування рекombінантних білків наведено Дроганом (Drohan) та іншими у патенті США №5,589,604 та Арчібальдом (Archibald) та іншими у патенті США №5,650,503, які включено до цього опису як посилання.

З метою повної активації та забезпечення можливості функціонування за згаданими способами, аРС, який було одержано за будь-яким зі згаданих способів, необхідно піддати посттрансляційним модифікаціям, наприклад, доданню дев'яти гамма-карбокси-глутаматів (гамма-карбоксилування, наприклад, вмісту Gla), доданню одного еритро-бета-гідрокси-Asp (бета-гідроксилування), доданню чотирьох Asn-пов'язаних олігосахаридів (глікозилювання), видаленню лідерної послідовності (42 амінокислотних послідовностей) та видаленню дипептиду Lys 156-Arg 157. Без згаданих посттрансляційних модифікацій аРС не є повністю функціональним або є повністю нефункціональним.

аРС може вводиться до складу лікарської форми за допомогою відомих способів з метою одержання фармацевтично придатних композицій. аРС буде вводиться парентерально для забезпечення його доставки до кровотоку у ефективній формі впорскуванням відповідної дози шляхом безперервної інфузії впродовж від приблизно 24 годин до приблизно 144 годин. Кількість введеного аРС буде становити від приблизно 20мкг/кг/год до приблизно 50мкг/кг/год. За більш переважним варіантом, кількість введеного аРС буде становити від приблизно 22мкг/кг/год до приблизно 40мкг/кг/год. За ще більш переважним варіантом, кількість введеного аРС буде становити від приблизно 22мкг/кг/год до приблизно 30мкг/кг/год. Найпереважніша кількість введеного аРС буде становити від приблизно 24мкг/кг/год до приблизно 30мкг/кг/год.

За альтернативним варіантом, аРС буде вводиться впорскуванням частини (від 1/3 до 1/2) відповідної дози на годину шляхом впорскування ударної дози впродовж періоду часу від приблизно 5 хвилин до приблизно 120 хвилин, з подальшою безперервною інфузією відповідної дози впродовж періоду часу від приблизно двадцяти чотирьох годин до приблизно 144 годин, внаслідок чого відповідну дозу буде введено впродовж періоду часу від 24 годин до 144 годин.

Лише після ретельно контрольованих клінічних досліджень та вичерпних експериментальних досліджень заявники відкрили, що ефективне лікування забезпечується при рівнях доз у межах від приблизно 20мкг/кг/год до приблизно 50мкг/кг/год за умови безперервної інфузії впродовж періоду часу від приблизно 24 годин до приблизно 144 годин. Найпереважніша доза аРС до введення з метою лікування пацієнтів-людей зі станом набутої гіперкоагуляції або набутої недостатності білку С, за наведеним описом, буде становити приблизно 24мкг/кг/год.

Препарат 1

Одержання людського білку С

Рекombінантний людський білок С (r-hPC) було одержано з лінії клітин 293 людських нирок за способами,

добре відомими досвідченому фахівцю, наприклад, за способами, які викладено у патенті США №4,981,952, який було видано на ім'я Яна (Yan), опис якого у повному об'ємі включено до цього опису як посилання. Ген, який кодує людський білок С, розкрито та заявлено у патенті США №4,775,624, який було видано на ім'я Бенга (Bang) та інших, опис якого у повному об'ємі включено до цього опису як посилання. Плазмідною, яку було використано для експресування людського білку С у лінії клітин 293, була плазміда рLPC, яку розкрито у патенті США №4,992,373, який було видано на ім'я Бенга (Bang) та інших, опис якого у повному об'ємі включено до цього опису як посилання. Опис конструкції плазмиди рLPC наведено також у Європейській патентній публікації №0445939 та у роботі Гріннелла (Grinnell) та інших, 1987, Bio/Technology 5: 1189-1192. які також включено у повному об'ємі до цього опису як посилання. Стисло, згадану плазмідною було трансфектовано лінію клітин 293, після чого стійкі трансформанти було виявлено, субкультивовано та вирощено у безсироваткових живильних середовищах. Після зброджування безклітинне живильне середовище було одержано шляхом мікрофільтрування.

Згаданий людський білок С було відокремлено від культуральної рідини за способом Яна (Yan), патент США №4,981,952, опис якого у повному об'ємі включено до цього опису як посилання. Освітлене живильне середовище розводили до 4мМ у етилендіамінтетраоцтовій кислоті (EDTA) перед тим, як його було абсорбовано аніонообмінною смолою (Fast-Flow Q, компанія Pharmacia). Після промивання 4 об'ємами колонки 20мМ Трис-буфером, 200мМ NaCl, pH7,4, та 2 об'ємами колонки 20мМ Трис-буферу, 150мМ NaCl, pH7,4, зв'язаний зимоген рекомбінантного людського білку С елюювали 20мМ Трис-буфером, 150мМ NaCl, 10мМ CaCl<sub>2</sub>, pH7,4. Чистота одержаного елююваного білку, за даними електрофорезу у поліакриламідному гелі у присутності додецилсульфату натрію, перевищувала 95%.

Додаткове очищення згаданого білку здійснювали шляхом його розчинення (3М) у NaCl, з подальшим адсорбуванням на гідрофобну інтерактивну смолу (Toyopearl Phenyl 650M, компанія TosoHaas), яку було урівноважено за допомогою 20мМ Трис-буферу, 3М NaCl, 10мМ CaCl<sub>2</sub>, pH7,4. Після промивання 2 об'ємами колонки урівноваженого буферу без CaCl<sub>2</sub>, одержаний рекомбінантний людський білок С елюювали за допомогою 20мМ Трис-буферу, pH7,4.

Одержаний елююваний білок готували до активування шляхом видалення залишкового кальцію. Одержаний рекомбінантний людський білок С пропускали через металеву афінну колонку (Chelex-100, компанія Bio-Rad) з метою видалення кальцію та поновно зв'язували з аніонообмінною смолою (Fast Flow Q, компанія Pharmacia). Обидві згадані колонки розміщували послідовно та урівноважували за допомогою 20мМ Трис-буферу, 150мМ NaCl, 5мМ EDTA, pH7,4. Після завантаження згаданого білку, колонку Chelex-100 промивали одним об'ємом колонки того ж самого буферу перед її відокремленням від згаданої послідовності. Згадану аніонообмінну колонку промивали 3 об'ємами колонки урівноважувального буферу перед елююванням білку за допомогою 0,4М NaCl, 20мМ суміші Трис-буферу-ацетату, pH6,5. Концентрації білку у розчинах рекомбінантного людського білку С та рекомбінантного активованого білку С вимірювали шляхом визначення екстинкції ультрафіолетового випромінювання на 280нм.  $E^{0,1\%} = 1,85$  або 1,95, відповідно.

#### Препарат 2

##### Активация рекомбінантного людського білку С

Тромбін великої рогатої худоби сполучали з активованою сефарозою (Activated CN-Sepharose 4B (компанія Pharmacia)) у присутності 50мМ ГЕПЕС-буферу, pH7,5 при температурі 4°C. Згадану реакцію сполучення здійснювали на смолі, якою вже було заповнено колонку, з використанням приблизно 5000 одиниць тромбіну/мл смоли. Розчин тромбіну циркулював через колонку впродовж приблизно 3 годин перед доданням 2-аміноетанолу (MEA) до концентрації 0,6мл/л циркуляторного розчину. Одержаний розчин, який вміщував MEA, додатково піддавали циркуляції впродовж 10-12 годин для забезпечення повного блокування на смолі амінів, які не прореагували. Після блокування тромбін, зв'язаний зі смолою, промивали 10 об'ємами колонки 1М NaCl, 20мМ Трис-буфером, pH6,5 для видалення усього неспецифічно зв'язаного білку, та використовували у реакціях активування після урівноважування у активаційному буфері.

Очищений r-hPC розчиняли (5мМ) у EDTA (для утворення хелатних сполук з будь-яким залишковим кальцієм) та розбавляли до концентрації 2мг/мл за допомогою 20мМ Трис-буферу, pH7,4 або 20мМ суміші Трис-буферу-ацетату, pH6,5. Цей матеріал пропускали через тромбінову колонку, урівноважену при температурі 37°C за допомогою 50мМ NaCl та 20мМ Трис-буферу, pH7,4, або 20мМ суміші Трис-буферу-ацетату, pH6,5. Швидкість потоку регулювали таким чином, щоб забезпечити приблизно 20-хвилинну тривалість контактування r-hPC та тромбіну на смолі. Потік, який витікав, збирали та негайно перевіряли на амідолітичну активність. У разі, якщо одержаний матеріал не мав специфічної активності (амідолітичної), порівняно до встановленого стандарту aPC, його поновно пропускали через згадану тромбінову колонку для завершення активування r-hPC. Після цього одержаний матеріал розбавляли 1:1 за допомогою 20мМ буферу, як згадувалось перед тим, з доведенням pH до рівня між приблизно 7,4 або 6,0 (перевага надається більш низьким рівням pH для запобігання саморозпаду) з метою підтримання найнижчих концентрацій aPC до наступного етапу його обробки.

Видалення вилуженого тромбіну з одержаного aPC здійснювали шляхом зв'язування згаданого aPC з аніонообмінною смолою (Fast Flow Q, компанія Pharmacia), яку було урівноважено у активаційному буфері (або 20мМ Трис-буфер, pH7,4, або, за переважним варіантом, 20мМ суміш Трис-буферу-ацетату, pH6,5) 150мМ NaCl. Тромбін пропускали через колонку та елюювали 2-6 об'ємами колонки 20мМ урівноважувального буферу. Зв'язаний aPC елюювали ступінчастим градієнтом з застосуванням 0,4М NaCl у 5мМ суміші Трис-буферу-ацетату, pH6,5 або 20мМ Трис-буферу, pH7,4. Промивання колонки більшими об'ємами полегшувало більш повне видалення додекапептиду. Матеріал, який було елюювано зі згаданої колонки, зберігали у вигляді замороженого розчину (-20°C) або у вигляді ліофілізованого порошку.

Амідолітичну активність (AU) aPC визначали шляхом виділення р-нітроаніліну з синтетичного субстрату H-D-Phe-Pip-Arg-р-нітроаніліді (S-2238) який було закуплено від компанії Kabi Vitrum, з застосуванням діодного спектрофотометру Beckman DU-7400. Одиницю активованого білку С було визначено, як кількість ферменту, необхідну для виділення 1мкмоль р-нітроаніліну впродовж 1 хвилини при температурі 25°C, pH7,4, з

використанням коефіцієнту екстинкції для р-нітроаніліну на 405нм, який дорівнював  $9620 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ .

Антикоагулянтну активність активованого білку С визначали вимірюванням подовження часу згортання у аналізі коагуляльної активності крові при додаванні частково активованого тромбoplastину (APTT). Стандартну криву було одержано у буфері для розбавлення (1мг/мл сироваткового альбуміну великої рогатої худоби (BSA) (чистого для радіоімуннологічних проб), 20мМ Трис-буфер, pH7,4, 150мМ NaCl, 0,02%  $\text{NaN}_3$ ) з концентрацією білку С у межах 125-1000нг/мл, у той час, як проби було виготовлено у декількох розведеннях у згаданому діапазоні концентрацій. До кожної кювети з пробою додавали 50мкл холодної конячої плазми та 50мкл відновленого частково активованого тромбoplastинового реактиву (APTT Reagent, компанія Sigma), та інкубували при температурі 37°C впродовж 5 хвилин. Після інкубування до кожної кювети додавали 50мкл відповідних проб або стандартів. Для визначення основного часу згортання крові замість проби або стандарту додавали буфер до розбавлення. Таймер фібротесту (CoA Screener Hemostasis Analyzer, компанія American Labor) запускали після додавання до кожної проби або стандарту 50мкл 30мМ  $\text{CaCl}_2$  (температура 37°C). Концентрацію активованого білку С у пробах вираховували за допомогою лінійного рівняння регресії зі стандартної кривої. Час згортання, який наведено у цьому описі, представляє собою середнє як мінімум трьох повторів, у тому числі, зразків стандартних кривих.

Наведені описи надають фахівцю з відповідним досвідом у цій галузі можливість одержання аРС та його застосування для лікування станів гіперкоагуляції або набутої недостатності білку С, яка є пов'язаною, але не обмежується, сепсисом, трансплантаціями, опіками, вагітністю, великим оперативним втручанням/травмами та респіраторним дистрес-синдромом у дорослих.

#### Приклад 1

##### Рівні аРС у плазмі людини

Шість пацієнтів одержували інтравенозне впорскування аРС у дозі 1мг/м<sup>2</sup>/год. або приблизно 0,024мг/кг/год. впродовж 24 годин. аРС, який було введено, представляв собою ліофілізовану лікарську форму, до складу якої входило 10мг аРС, 5мМ Трис-ацетатного буферу та 100мМ хлориду натрію, яку було відновлено двома мл води та pH доведено до 6,5.

Концентрації аРС у плазмі вимірювали за допомогою твердофазного аналізу амідолітичної активності з захопленням антигену або антитіла (Immunocapture-Amidolytic Assay). Кров збирали у присутності цитратного антикоагулянту та бензамідину, зворотного інгібітора аРС. Згаданий фермент захоплювали з плазми аРС-специфічним мишачим моноклональним антитілом, C3, імобілізованим на титраційному мікропланшеті. Згаданий інгібітор видаляли промиванням і рівень амідолітичної активності або аРС вимірювали за допомогою олігопептидного хромогенного субстрату. Після інкубування впродовж 16-20 годин при температурі 37°C, поглинання вимірювали на 405нм і одержані дані аналізували за допомогою лінійного зваженого алгоритму з підбором емпіричної кривої. Концентрації аРС, які було визначено за стандартною кривою, дорівнювали 0-100нг/мл. Межа кількісного визначення при проведенні аналізу дорівнювала 1,0нг/мл. Дози аРС та концентрації у плазмі визначали впродовж приблизно 24 годин. Доза 0,024мг/кг/год. забезпечувала концентрацію у плазмі приблизно 50нг/мл впродовж 24 годин.

#### Приклад 2

##### Подвійне сліпе плацебо-контрольоване випробування на пацієнтах-людях з сепсисом. Етап 1

Цей протокол представляє собою двоетапне подвійне сліпе плацебо-контрольоване випробування на пацієнтах з тяжким сепсисом. На Етапі 1, у цілому, 72 пацієнтам впродовж 48 годин впорскували рекомбінантний людський активований білок С (г-аРС).

Критерії для включення до випробування включали три з чотирьох традиційно прийнятих критеріїв для сепсису (частота серцевих скорочень, зусилля для здійснення вдиху/видиху, підвищена/знижена температура, підвищена/знижена кількість лейкоцитів). Пацієнти також повинні були демонструвати певну ступінь дисфункції органів, яка визначалась, як шок, знижене виділення сечі або гіпоксемія. Було застосовано чотири різні дози: 12мг/кг/год., 18мг/кг/год., 24мг/кг/год., 30мг/кг/год. г-аРС вливали впродовж 48 годин шляхом безперервної інфузії. Головні кінцеві точки цього дослідження: безпека, як функція дози та тривалості введення дози; здатність г-аРС до коректування коагулопатії, як функція дози та тривалості введення дози.

Інформація про смертність включала усі дози, навіть найнижчі, якщо не було вказано інше. Важливо занотувати, що смертність у разі застосування плацебо у нашому випадку співпадає з запрогнозованою смертністю для плацебо. 28-денна смертність від будь-яких причин була кінцевою точкою для пацієнтів, які одержували плацебо, порівняно до пацієнтів, які одержували г-аРС.

Загальний коефіцієнт смертності у групі з плацебо дорівнював 38% (10/26), у той час, як загальний коефіцієнт смертності у групі з г-аРС дорівнював 20% (9/46). Підгрупа, яка залучала лише дві верхні дози г-аРС (24 та 30мг/кг/год), порівняно з пацієнтами, які одержували плацебо, мала коефіцієнт смертності 13% (3/24).

До аналізу другої підгрупи було включено пацієнтів з набутою недостатністю білку С, яку було визначено, як вихідну активність білку С, яка становила менше за 60%. З 64 пацієнтів, які мали дані по вихідній активності білку С, 61 пацієнт (або 95%) мав набуту недостатність білку С на момент включення до згаданого випробування. Коефіцієнт смертності у групі пацієнтів з недостатністю білку С, які одержували плацебо, дорівнював 41% (9/22), у той час, як коефіцієнт смертності у групі пацієнтів з недостатністю білку С, які одержували г-аРС, дорівнював 18% (7/39).

Значуща частина інформації, яка дозволяє зробити припущення про те, що лікування низькими дозами г-аРС є благойним для пацієнтів з тяжким сепсисом, включає середній час до настання смерті у пацієнтів, які одержували плацебо, порівняно до пацієнтів, які піддавались лікуванню. У десяти пацієнтів, які вмерли у групі, яка одержувала плацебо, середній час до настання смерті дорівнював 6 дням. У пацієнтів, яких лікували за допомогою г-аРС, середній час до настання смерті дорівнював 14 дням. На додаток до цього 4 з 9 пацієнтів, які вмерли у групі, яку лікували за допомогою г-аРС, залишались живими впродовж 21 або більше днів, і у подальшому вмерли з приводу, який не було пов'язано з їхнім першим епізодом сепсису. Два з чотирьох випадків пізньої смерті трапились у групі, яка одержувала низьку дозу (12мг/кг/год). Обидва пацієнти



знаходились у відділенні інтенсивної терапії та піддавались штучному вентильованню легень за допомогою автоматичного дихального апарату впродовж усього періоду проведення випробування до моменту настання смерті (день 27). Два інші пацієнти з пізнім настанням смерті належали до групи, яка одержувала високу дозу (30мкг/кг/год). У обох згаданих пацієнтів спостерігалось початкове поліпшення. Через два тижні обох було знято з штучного вентильовання легень за допомогою автоматичного дихального апарату та переведено з відділення інтенсивної терапії. Один пацієнт вмер за тиждень від респіраторного дистрес-синдрому, який було індуковано сепсисом, після набуття за власною вимогою статусу DNR ("реанімації не піддавати"). Другий пацієнт вмер на 28 день після епізоду легеневої недостатності, пов'язаної з другим епізодом сепсису. Цей пацієнт також набув статусу DNR за власною вимогою, і з цього приводу його не було реінтубовано. Слід звернути увагу на те, що повторне лікування за допомогою г-аРС пацієнту з другим епізодом тяжкого сепсису під час 28-денного випробування протоколом лікування не передбачалось.

Інформація відносно смертності, яку було одержано під час проведення цього випробування, є неочікуваною та викликає подив. Жодне інше подвійне сліпе плацебо-контрольоване дослідження сепсису не надало даних, які б демонстрували таке явно виражене зменшення рівня 28-денної смертності від будь-яких причин.

### Приклад 3

Одержання лікарської форми активованого білку С

Стійку ліофілізовану лікарську форму активованого білку С було одержано способом, який включає ліофілізування розчину, до складу якого входять приблизно 2,5мг/мл активованого білку С, приблизно 15мг/мл цукрози, приблизно 20мг/мл NaCl та натрійцитратний буфер, який має рН більше за 5,5 та менше ніж 6,5. На додаток до цього, одержання стійкої ліофілізованої лікарської форми активованого білку С включає ліофілізацію розчину, до складу якого входять приблизно 5мг/мл активованого білку С, приблизно 30мг/мл цукрози, приблизно 38мг/мл NaCl та цитратний буфер, який має рН більше за 5,5 та менше ніж 6,5.

Співвідношення аРС:сіль:наповнювач (у масовому відношенні) є важливим фактором у лікарській формі, придатній для процесу ліофілізації. Згадане співвідношення змінюється у залежності від концентрації аРС, вибору та концентрації солі та вибору та концентрації наповнювача. Зокрема, перевага надається співвідношенню, яке складає приблизно 1 частину активованого білку С до приблизно 7,6 частини солі та до приблизно 6 частин наповнювача.

Стандартну дозовану лікарську форму активованого білку С, придатну для введення шляхом безперервного впорскування, було одержано шляхом змішування активованого білку С, NaCl, цукрози та натрійцитратного буферу. Після змішування, 4мл одержаного розчину переносили до поємнику для стандартної дози та ліофілізували. Поємник для стандартної дози, який вміщував від приблизно 5мг до приблизно 20мг активованого білку С, придатного для введення дози, яка складає від приблизно 0,02мг/кг/год. до приблизно 0,05мг/кг/год., пацієнту, який цього потребує, герметично закривали та зберігали до використання.