

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

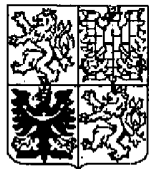
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

3946-98

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **06. 06. 97**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **07.06.96**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **96/660289**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14. 04. 99**
(Věstník č. 4/99)

(86) PCT číslo: **PCT/DK97/00251**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 97/47651**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 07 K 14/745
A 61 K 38/36

(71) Přihlašovatel:

NOVO NORDISK A/S, Bagsvaerd, DK;
ZYMOGENETICS, INC., Seattle, WA, US;

(72) Původce:

Peterson Lars Christian, Horsholm, DK;
Hart Charles E., Brier, DK;
Hedner Ulla, Malmö, SE;
Rasmussen Mirella Ezban, Copenhagen, DK;

(74) Zástupce:

PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1,
Praha 4, 14000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsob zabránění tvorby krevní sraženiny
a použití Faktoru VII**

(57) Anotace:

Způsoby zabránění tvorby krevní sraženiny, které spočívají v podávání terapeuticky účinné dávky preparátu obsahujícího Faktor VII přinejmenším s jednou modifikací v jeho katalytickém centru, kterážto modifikace podstatně inhibuje schopnost modifikovaného Faktoru VII aktivovat plazmatický Faktor X nebo IX. Takto modifikovaný Faktor VII lze použít pro přípravu látek zabraňujících nebo minimalizujících poškození myokardu v souvislosti s obnovením krevního zásobování po ischemickém záchvatu a k udržování nebo vylepšení průchodnosti cév pacienty v souvislosti s chirurgickými zákroky, mikrochirurgií, operacemi cév nebo traumaty.

CZ 3946-98 A3

Způsob zabránění tvorby krevní sraženiny a použití Faktoru VII

Oblast techniky

Uváděný vynález se týká nových způsobů léčby a nového použití modifikovaných forem Faktoru VII, který zamezuje tvorbě krevních sraženin, udržuje nebo zlepšuje cévní průchodnost, zlepšuje průtok krve v oblasti myokardu a zmírňuje poškození myokardu při obnovení průtoku krve po ischemii.

Dosavadní stav techniky

Tvorba krevních sraženin je proces, který se skládá ze složitého vzájemného působení různých složek krve, nebo faktorů, které nakonec dá vznik fibrinové sraženině. Obecně, krevní komponenty, které se účastní procesu, popsanému jako koagulační „kaskáda“ jsou proenzymy nebo zymogeny, enzymaticky neaktivní proteiny, které jsou přeměněny v proteolytické enzymy působením aktivátoru, který sám je aktivovaným srážecím faktorem. Koagulační faktory, které prodělaly takovou změnu jsou obecně řazeny k „aktivním faktorům“ a jsou v textu označeny příponou malého „a“ (např. Faktor VIIa).

Aktivovaný Faktor X („Xa“) je vyžadován pro přeměnu protrombinu na trombin, který následně způsobí změnu fibrinogenu na fibrin, která je poslední fází tvorby fibrinové sraženiny. Existují dva způsoby, nebo cesty, které podporují aktivaci Faktoru X. Jako „vnitřní biochemická dráha“ se označují ty reakce, které vedou ke tvorbě trombinu pomocí využití faktorů přítomných pouze v plazmě. Série proteázami zprostředkovaných aktivací vede nakonec k vytvoření Faktoru IXa, který, ve spojení s Faktorem VIIIa rozštěpí Faktor X na Xa. Identická proteolýza je výsledkem působení Faktoru VIIa a jeho kofaktoru, tkáňového faktoru, ve „vnější biochemické dráze“ srážení krve. Tkáňový protein je protein, vázaný k povrchu membrán, který za normálních podmínek necirkuluje v plazmě. Ovšem při protržení cévy se může spojit s Faktorem VIIa a tím katalyzovat aktivaci Faktoru X, nebo aktivaci Faktoru IX za přítomnosti Ca^{++} a fosfolipidu (Nemerson a Gentry, Biochem. 25:4020-4033 (1986)). Zatímco relativní důležitost dvou způsobů koagulace při zastavení krvácení není jasná, v posledních letech se ukázalo, že Faktor VIIa a tkáňový faktor hrají klíčovou roli v regulaci krevní srážlivosti.

Faktor VII je plazmový glykoprotein, který cirkuluje ve stopovém množství v krvi ve formě jednořetězcového zymogenu. Zymogen je katalyticky neaktivní (Williams a kol., J. Biol. Chem. 264: 7536-7543 (1989); Rao a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:6687-6691 (1988)). Jednořetězcový Faktor VII může být převeden ve dvouřetězcový Faktor VIIa působením Faktoru Xa, Faktoru XIIa, Faktoru IXa nebo trombinu *in vitro*. Má se za to, že Faktor Xa je hlavním fyziologickým aktivátorem Faktoru VII. Jako u několika dalších plasmatických proteinů účastnících se zastavení krvácení, je aktivita Faktoru VII závislá na přítomnosti vitaminu K, který je nutný pro γ -karboxylaci mnoha zbytků glutamové kyseliny, které jsou nahromaděny na amino-konci proteinu. Tyto γ -karboxylované glutamové kyseliny jsou nutné pro asociaci Faktoru VII s fosfolipidy za přítomnosti kovu.

Přeměna zymogenu Faktoru VII v aktivovanou dvouřetězcovou molekulu se děje rozštěpením vnitřní peptidové vazby umístěné přibližně ve středu molekuly. V lidském Faktoru VII je aktivační štěpící místo je mezi Arg₁₅₂-Ile₁₅₃ (Hagen a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 2412-2416 (1986); Thim a kol., Biochem. 27: 7785-7793 (1988) obě citace jsou zde zahrnuty mezi referencemi). Hovězí Faktor VII je aktivován rozštěpením analogické vazby Arg₁₅₂-Ile₁₅₃ (Takeya a kol., J. Biol. Chem. 263: 14868-14877, 1988). V přítomnosti tkáňového faktoru, fosfolipidů a vápenatých iontů dvouřetězcový Faktor VIIa rychle aktivuje Faktor X nebo Faktor IX pomocí omezené proteolýzy.

Často je nezbytné u pacienta selektivně zablokovat koagulační kaskádu. Mohou být použity antikoagulační faktory jako heparin, kumarin, deriváty kumarinu, deriváty indandionu, nebo mohou být použita další činidla, např. během dialýzy ledvin, nebo při léčbě hluboké žilní trombózy, roztroušené nitrocévní srážlivosti (DIC), nebo při množství dalších zdravotních poruch. Např. léčba heparinem nebo mimotělní aplikace citrátových iontů (U.S. Patent No. 4,500,309) mohou být použity při dialýze k prevenci srážlivosti během léčby. Heparin se také používá k prevenci hluboké žilní trombózy u pacientů, kteří podstoupili chirurgický zákrok.

Léčba heparinem a ostatními antikoagulačními prostředky však může mít nežádoucí vedlejší účinky. Dostupné antikoagulačními prostředky obecně působí v rámci celého těla, spíše než aby působily specificky v místech, kde dochází ke tvorbě sraženiny. Např. heparin může způsobit těžké krvácení. Navíc se svým poločasem eliminace 80 min. je heparin velmi rychle odbouráván z krve, takže je nezbytné jeho časté podávání. Protože heparin působí jako kofaktor antitrombinu III (ATIII), a AT III je velmi rychle odčerpáván při léčbě DIC, je často náročné udržovat odpovídající dávku

heparinu, a je nezbytné nepřetržitě monitorovat hladiny AT III a heparinu. Heparin je také neefektivní v případě, že je odčerpávání AT III extrémě rychlé. Navíc dlouhé užívání heparinu může také zvýšit shlukování krevních destiček a snížit jejich množství, je také zahrnut mezi faktory podporující rozvoj osteoporózy. Deriváty indandionu mohou také mít toxické vedlejší účinky.

Kromě antikoagulačních faktorů stručně popsanych dříve, bylo objeveno několik přirozeně se vyskytujících proteinů s antikoagulační aktivitou. Např. Reutelingsperger (U.S. Patent No. 4,736,018) isoloval antikoagulační proteiny z hovězí aorty a cév lidské pupečnickové šňůry. Maki a kol. (U.S. Patent No. 4,732,891) objevil lidské antikoagulační proteiny produkované placentou. Navíc, AT III byl také navržen za léčebný antikoagulační prostředek (Schipper a kol., Lancet 1 (8069): 854-856 (1978); Jordan; U.S. patent No. 4,386,025; Bock a kol.; U.S. Patent No. 4,517,294).

Proliferace buněk hladké svaloviny (SMCs) v cévní stěně je důležitým okamžikem při vzniku cévních poškození při ateroskleróze, po cévní rekonstrukci nebo jako důsledek jiných cévních poranění. Např. léčba aterosklerózy často zahrnuje čištění zablokovaných cév angioplastií, chirurgickým otevřením cév nebo redukční aterektomií, nebo přemostěním pomocí štěpu (bypass), což jsou chirurgické zákroky, při kterých jsou aterosklerotické pláty redukovány nebo odstraněny katetrizací (angioplastie), sloupnutím ze stěny tepny odříznutím (chirurgické otevření cév), nebo přemostěním za použití přirozených nebo syntetických štěpů. Tyto zákroky odstraní žilní endotel, poruší podkladovou vnitřní vrstvu (intima) a vedou k odumření SMCs střední vrstvy. Po těchto zraněních následuje proliferace buněk SMC střední vrstvy a jejich migrace do vnitřní vrstvy (intima), které se běžně objevují v několika prvních týdnech až šesti měsících po zranění a jsou ukončeny tehdy, když je obnovena krycí endoteliální vrstva. U lidí jsou tato poškození tvořena přibližně ve 20 % z buněk a v 80 % z mimobuněčné hmoty.

U přibližně 30 % nebo více pacientů léčených angioplastií, chirurgickým otevřením cév nebo redukční aterektomií, nebo přemostěním pomocí štěpu, způsobuje trombosa anebo proliferace SMC v intimě opětovné uzavření cévy a následkem toho dochází k neúspěchu tohoto chirurgického zákroku. Tento uzávěr cévy, následující po chirurgickém zákroku je označován jako restenosa.

V tomto oboru je neustálá potřeba dokonalejších prostředků s antikoagulační aktivitou, které mohou být podávány v relativně nízkých dávkách a nemají nežádoucí vedlejší účinky, které mají tradiční antikoagulační prostředky. Tento patent uspokojuje

tyto potřeby tím, že poskytuje antikoagulanty, které působí specificky v místech zranění a poskytuje ještě další výhody.

Molekuly modifikovaného Faktoru VII mohou být zvláště užitečné pro podávání lidem při léčbě různých stavů včetně nitrocévního krevního srážení. Např. ačkoli hlubokou žilní trombózu a plicní embólii lze léčit běžnými antikoagulanty, zde popsán modifikovaný Faktor VII může být použit pro prevenci vzniku tromboembolických komplikací u určitých vysoce rizikových pacientů, jako např. těch, kteří podstoupili chirurgický zákrok nebo pacientů s městnavým srdečním selháním. Navíc, modifikovaný Faktor VII může působit jako inhibitor tkáňovým faktorem indukovaného krevního srážení, čímž zamezuje tvorbě trombinu a následnému ukládání fibrinu. Jako takový může být modifikovaný Faktor VII užitečný pro inhibici aktivity tkáňového faktoru, což má za následek např. inhibici krevního srážení, trombózu nebo ukládání krevních destiček.

Molekuly modifikovaného Faktoru VII mohou být zvláště užitečné při léčení hyperplasie vnitřní vrstvy nebo opětného uzavření cévy způsobené akutním cévním poraněním. Akutní cévní poranění jsou taková, která se objeví náhle (tj. během dnů až měsíců), na rozdíl od chronických cévních poranění (např. aterosklerosy), která se rozvíjí v průběhu celého života. Akutní cévní poranění často vznikají v důsledku chirurgických zákroků, jako např. rekonstrukce cév při angioplastice, chirurgickém otevření cév, aterektomii, umístění cévního štěpu a podobných zákrocích.

Hyperplasie může také vzniknout jako opožděná odpověď např. na umístění štěpu nebo transplantaci orgánu. Vzhledem k tomu, že modifikovaný Faktor VII působí selektivněji než heparin, obecně váže jen ten tkáňový faktor, který se ukázal v místě poranění a protože modifikovaný Faktor VII neničí ostatní koagulační proteiny, bude efektivnější a bude s menší pravděpodobností než heparin vyvolávat nežádoucí vedlejší účinky jako např. krvácení, pokud bude používán profylakticky při prevenci hluboké cévní trombózy.

Nedávné pokroky v léčbě onemocnění věnčitých cév zahrnují použití mechanických zákroků k odstranění nebo přemístění překázejícího plátu aterosklerotického materiálu, aby byl obnoven normální průtok krve koronárními tepnami. Navzdory používání různých forem mechanických zákroků, včetně balónkové angioplastie, redukční aterektomie, umístění cévních stentů, léčby laserem nebo rotoblatorem, efektivita těchto postupů zůstává omezena přibližně na 40 % opětovného zúžení průsvitu cévy v průběhu 6 měsíců po léčbě.

Opětovné zúžení průsvitu cévy je pravděpodobně výsledkem složitých interakcí biologických procesů, včetně ukládání krevních destiček a tvorby krevních sraženin, vylučování chemotaktických a mitogenních faktorů, migrace a proliferace buněk hladkých cévních svalů do intimy cévních úseků rozšířených chirurgickým zákrokem. Zamezení shlukování krevních destiček v místech mechanického poranění může omezit vznik opětovného zúžení cévy u lidí. Léčebné použití monoklonálních protilátek proti GpIIb/IIIa krevních destiček je schopno omezit úroveň výskytu opětovného zúžení cévy u lidí (Califf a kol., N. Engl. J. Med., 330:956-961 (1994)). Protilátka je schopna se navázat na receptory GpIIb/IIIa na povrchu krevních destiček a tím zabránit jejich shlukování. Tyto výsledky naznačují, že zamezení shlukování krevních destiček na místě mechanického poškození věnčitých tepen u lidí je přínosné pro celkové hojení. Protože akumulace krevních destiček nastává v místech akutních cévních poranění, tvorba trombinu v těchto místech může být odpovědná za aktivaci krevních destiček a jejich následné shlukování. Obsahující modifikovaný Faktor VII. Jak ukazují následující příklady, modifikovaný Faktor VII, připravený podle tohoto patentu, má schopnost se navázat na tkáňový faktor na povrchu buněk. Například DEGR-Faktor VIIa se navazuje na tkáňový faktor na povrchu buněk se stejnou nebo větší afinitou než původní Faktor VIIa. Ačkoli DEGR-Faktor VIIa nemá žádnou enzymatickou aktivitu, přesto je schopen navázat se na tkáňový faktor a působí jako kompetitivní inhibitor původního Faktoru VIIa a tím inhibuje následně vnější biochemické dráhy, krevního srážení, která vede ke tvorbě trombinu. Indukovaný IRA. Molekuly modifikovaného Faktoru VII, které si zachovávají schopnost vázat tkáňový faktor, zamezují shlukování krevních destiček v místech cévního poranění tím, že brání tvorbě trombinu a následnému ukládání fibrinu.

Vzhledem ke schopnosti DEGR-Faktoru VII blokovat tvorbu trombinu a omezovat ukládání krevních destiček v místech náhlého cévního poranění, molekuly modifikovaného Faktoru VII, které si zachovávají schopnost vázat tkáňový faktor, ale na rozdíl od Faktoru VIIa nejsou enzymaticky aktivní, mohou být použity k zamezení opětovného zúžení průsvitu cév.

Prostředky obsahující modifikovaný Faktor VII jsou zvláště užitečné při léčení pacientů, pokud jsou zakomponovány do farmaceutických prostředků a mohou být podávány jedincům, kteří trpí řadou nemocí, a léčit tak stavy souvisící se srážením krve. Takové modifikované molekuly Faktoru VII, schopné vázat tkáňový faktor, ale mající velmi sníženou schopnost katalyzovat aktivaci dalších faktorů účastnících se

procesu srážení krve, mohou mít delší eliminační poločas v plazmě a proto odpovídající delší období antikoagulační aktivity ve srovnání s ostatními antikoagulanty. Mezi indikace pro podávání těchto prostředků patří ty, které jsou běžně léčeny antikoagulanty, jako např. hluboká žilní tromboza, plicní embolie, mrtvice, roztroušená nitrocévní srážlivost (DIC), ukládání fibrinu v plicích a ledvinách spojené s gram-negativní endotoxikózou a infarkt myokardu. Prostředky lze použít k odvrácení opětovného zúžení průsvitu cév, které se objevuje po mechanických poraněních cév, jako jsou např. poranění způsobené balónkovou angioplastií, chirurgickým otevřením cév, redukční aterektomií, umístěním stentů, léčbou laserem nebo rotoblatorem nebo taková, která se objeví druhotně po použití cévních štěpů, stentů, přemostění pomocí štěpu nebo transplantaci orgánu. Prostředky mohou být také použity k zabránění ukládání krevních destiček a souvisejících poruch. Tento způsob léčby, zabráňující např. koagulaci, opětovnému zúžení průsvitu cév nebo ukládání krevních destiček, obsahuje podávání takových přípravků pacientovi, které obsahují modifikovaný Faktor VII, jako jsou ty, které mají alespoň jednu aminokyselinovou záměnu v katalytické trojici Ser₃₄₄, Asp₂₄₂ a His₁₉₃ a to v množství, které je schopno efektivně zabránit koagulaci, opětovnému zúžení průsvitu cév nebo ukládání krevních destiček. Metody najdou využití také při léčbě náhlého ucpání věnčité tepny u pacientů (např. při akutním infarktu myokardu), což zahrnuje podávání modifikovaného Faktoru VII, který obsahuje DEGR-Faktor VII a FFR-Faktor VII, ve spojení s aktivátorem tkáňového plasminogenu nebo streptokinasou, a může urychlit rozpad krevních sraženin, indukovaný tPA. Modifikovaný Faktor VII je doporučeno podávat před, současně s nebo krátce po podání trombolytických činidel, jako je např. aktivátor tkáňového plasminogenu.

Mezinárodní Aplikace No. WO 92/15686 se týká modifikovaného Faktoru VIIa, polynukleových kyselin a linií savčích buněk, vhodných pro produkci modifikovaného Faktoru VIIa a přípravkům obsahujících modifikovaný Faktor VIIa pro zabránění srážení krve.

Mezinárodní Aplikace No. WO 94/27631 se týká způsobů léčby, které zabráňují opětovnému zúžení průsvitu cév, aktivitě tkáňového faktoru a ukládání krevních destiček.

Mezinárodní Aplikace No. WO 96/12800 se týká způsobu léčby akutního uzavěru koronární tepny, který zahrnuje podávání přípravku, obsahujícího modifikovaný Faktor VIIa ve spojení s aktivátorem tkáňového plasminogenu nebo streptokinasou.

Podstata vynálezu

Tento vynález se týká způsobu léčby, který brání tvorbě krevních sraženin u pacienta a zahrnuje lokální aplikaci na ta místa cév, která jsou náchylná k jejich tvorbě, terapeuticky účinnou dávkou prostředku, obsahujícího Faktor VII, který má provedenu nejméně jednu modifikaci ve svém katalytickém centru, kterážto modifikace podstatně omezuje schopnost modifikovaného Faktoru VII aktivovat plazmatický Faktor X nebo IX. Místo tvorby krevních sraženin může souviset s místem chirurgického zákroku, mikrochirurgického zákroku, angioplastie nebo úrazu.

Dále se vynález týká způsobu udržení nebo zlepšení průchodnosti cév pacienta, který zahrnuje lokální aplikaci na ta místa cév, která jsou náchylná ke snížení průchodnosti, terapeuticky účinnou dávkou prostředku, obsahujícího Faktor VII, který má provedenu nejméně jednu modifikaci ve svém katalytickém centru, kterážto modifikace podstatně omezuje schopnost modifikovaného Faktoru VII aktivovat plazmatický Faktor X nebo IX. Místo tvorby krevních sraženin může souviset s místem chirurgického zákroku, mikrochirurgického zákroku, angioplastie nebo úrazu.

Dále se vynález týká způsobu prevence nebo minimalizace úrazů myokardu, která jsou spojeny s obnovou průtoku krve po ischemickém záchvatu u pacienta, který zahrnuje podávání prostředku, obsahujícího farmakologicky přijatelný Faktor VII, který má provedenu nejméně jednu modifikaci ve svém katalytickém centru, kterážto modifikace podstatně omezuje schopnost modifikovaného Faktoru VII aktivovat plazmatický Faktor X nebo IX.

Dále se vynález týká způsobu léčby, který zlepšuje průtok krve oblastí myokardu během obnovy průtoku krve u pacienta, který zahrnuje podávání prostředku, obsahujícího farmakologicky přijatelný Faktor VII, který má provedenu nejméně jednu modifikaci ve svém katalytickém centru, kterážto modifikace podstatně omezuje schopnost modifikovaného Faktoru VII aktivovat plazmatický Faktor X nebo IX.

Ve výhodném provedení, modifikace Faktoru VII zahrnuje reakci Faktoru VII s inhibítorem serin proteasy. Ve výhodnějším případě je inhibítorem proteasy organofosfátová sloučenina, sulfanyl fluorid, halometylketonový peptid, nebo azapeptid. V ještě výhodnějším případě je inhibítorem proteázy některý z těchto halometylketonových peptidových derivátů - Dansyl-Phe-Pro-Arg chlormetylketon,

Dansyl-Glu-Gly-Arg chlormetylketon, Dansyl-Phe-Phe-Arg chlormetylketon a Phe-Phe-Arg chlormetylketon, přičemž nejvýhodnější je Phe-Phe-Arg chlormetylketon.

Vynález se dále vztahuje použitím Faktoru VII, který má alespoň jednu modifikaci ve svém katalytickém centru, kterážto modifikace výrazně omezuje schopnost modifikovaného Faktoru VII aktivovat plazmatický Faktor X a IX, pro výrobu prostředku sloužícího k prevenci nebo minimalizaci poškození myokardu, spojeného s obnovou průtoku krve po ischemickém záchvatu. Vynález se dále týká použití Faktoru VII, který má alespoň jednu modifikaci ve svém katalytickém centru, kterážto modifikace výrazně omezuje schopnost modifikovaného faktoru VII aktivovat plazmatický Faktor X a IX, pro výrobu prostředku sloužícího k zlepšení průtoku krve oblastí myokardu během obnovy průtoku krve po ischemickém záchvatu.

- Tento vynález poskytuje způsoby a prostředky pro potlačení zhoubných jevů, spojených s obnovou průtoku krve po ischemickém záchvatu. Vážná ischemie zasahující tkáň, orgán nebo končetinu, může být způsobena poklesem průtoku krve a může být spojena s úrazem, chirurgickým zákrokem nebo sníženým krevním tlakem. Jednou z komplikací, která je spojena s těžkou ischemií je zvýšení hladiny tkáňového faktoru v tepenném systému. Má se za to, že tato zvýšená exprese tkáňového faktoru má za následek stimulaci prokoagulační odpovědi, primárně v kapilárním řečišti a tím iniciuje anebo podporuje tvorbu krevních sraženin v cévách. Dále *de novo* tvorba TF endoteliálními buňkami uvnitř věnčitého cévního systému v průběhu obnovy průtoku krve po ischemickém záchvatu, může vést ke snížení průtoku krve koronárními tepnami během tohoto období, což může vést k ovlivňování dalšího osudu ischemického myokardu, který nakonec nekrotizuje. TF antigen a prokoagulační aktivita jsou zvýšeny v atrektomických vzorcích, které byly získány od pacientů s nestabilní anginou pectoris, -v. porovnání s pacienty se stabilní anginou pectoris. Má se tedy zato, že nestabilní angina pectoris u těchto pacientů může být uspíšena objevením se TF v subendoteliální tkáni velké osrdečnickové věnčité tepny, jako důsledek poškození arteriosklerotického plátu. To posléze podnítl vznik krevní sraženiny uvnitř věnčité tepny a následné úplné zamezení průtoku v koronárních cévách.

TF může také ovlivňovat průtok koronárními tepnami i jinak. Po obnovení průtoku krve v ischemické tkáni se mohou tvořit krevní sraženiny, které buď mohou nebo nemusí uzavřít cévy. Tvorba krevních sraženin v tepenném řečišti a ukládání krevních destiček na krevní sraženinu, vede k druhotnému vzniku ischemie v tkáni. Tvorba krevních sraženin a přítomnost krevních destiček může pak způsobit vznik a

uvolnění mnoha bioaktivních faktorů, včetně těch, které jsou produkovány při koagulaci, jako např. trombin a Faktor X, stejně jako faktory uvolňované aktivovanými krevními destičkami. Tyto faktory ovšem mohou indukovat tvorbu faktorů dalších, které jsou produkovány buňkami podložní endoteliální vrstvy a buňkami hladké svaloviny nebo přilehlými mononukleárními buňkami, jako jsou např. TNF-alfa a IL-1. Tyto faktory mohou na oplátku aktivovat endoteliální buňky, což vede ke zvýšení hladin různých adhezních molekul spojených s vazbou monocytů a neutrofilů. Za normálních okolností nevykazují endoteliální buňky, které jsou v kontaktu s cirkulující krví, žádnou patrnou TF aktivitu. Za určitých okolností mohou endoteliální buňky aktivně vyvolat koagulační reakci, která je podobná prokoagulační aktivitě TF. Obzvláště bezkyslíkové radikály (oxygen free radicals - OFRs), vytvářené jak exogenně, tak i endogenně, mohou stimulovat endoteliální buňky věčitého cévního systému k tvorbě a vylučování výrazného množství TF. OFRs jsou vysoce reaktivní druhy molekul, které mohou napadnout různé buněčné složky. Zvýšení tvorby OFRs následuje po obnovení průtoku krve po prodělané ischemii a tyto druhy oxidantů mohou být odpovědné za specifickou formu poranění tkáně způsobenou při obnovování průtoku krve, dále za peroxidaci tuků a jiné nevratné změny buněčných složek. OFRs také dramaticky snižují aktivitu inhibitoru tkáňového faktoru (tissue factor pathway inhibitor - TFPI), což je protein Kunitzova typu, který je syntetizován endoteliálními buňkami a který inhibuje vnější biochemickou dráhu srážení krve. Tento dvojitý efekt OFRs (produkce TF endoteliálními buňkami a snížení aktivity TFPI) může posunout přirozené antikoagulační vlastnosti normálního endotelia do prokoagulačního stavu a tím napomáhá aktivaci nežádoucího nitrocévního srážení krve. Tedy exprese TF ve věčitém systému, která je zprostředkována OFR, má za následek znatelné snížení průtoku krve věčitým systémem v průběhu obnovy průtoku krve po ischemickém záchvatu. Tato exprese TF, zprostředkována OFR a doprovázená aktivací vnější biochemické dráhy srážení krve, má významné důsledky, neboť tento jev má vliv na patofysiologii obnovy průtoku krve po ischemickém záchvatu, zvláště u pacientů s akutním infarktem myokardu, kteří trpí rozpadem krevních sražením ve věčitých tepnách.

Stav, kdy nedojde k obnovení průtoku krve (non-reflow phenomenon), což jest ztráta stejnoměrného krevního zásobování v soustavě mikrocévek v tkáni, která byla předtím postižena ischemií, byl poprvé popsán Krugem a kol. (Circ. Res. 1966; 19:57-62). Má se zato, že nejdůležitější činitelé, které mohou ovlivňovat osud ischemického

myokardu jsou velikost postranního proudění krve během ischemie, velikost rizikové oblasti a požadavek myokardu na kyslík.

V posledním desetiletí bylo hodně pozornosti věnováno postupům léčby pacientů trpících akutním infarktem myokardu technikami obnovujícími průtok krve, včetně koronární trombolysy, primární angioplastie, nebo obou. Přesto ne všechny studie prokázaly zlepšení funkce levé komory po znovuzprůchodnění tepny postižené infarktem. V současné době značný počet pacientů vykazuje stav nízkého průtoku krve v cévním řečišti, které bylo postiženo infarktem. Tento stav znamená téměř úplnou ztrátu výhod získaných chirurgickým zákrokem, alespoň co se týká úmrtnosti. U těchto stavů nízkého průtoku krve se předpokládá, že jsou alespoň částečně způsobeny neschopností krve znovu vstoupit do celého cévního systému myokardu dříve postiženého infarktem. Nyní se překvapivě ukázalo, že FVIIa ovlivňuje a zvyšuje krevní průtok oblastí myokardu v průběhu obnovování průtoku krve. Dále bylo ukázáno, že FVIIa způsobuje překvapivě výrazné zmenšení oblastí, kde nedojde k obnově průtoku krve.

Vázba a přemísťování monocytů a neutrofilů, uvolňování bioaktivních sloučenin těmito buňkami, včetně tvorby bezkyslíkatých radikálů, může zhoršit úroveň aktivace endoteliálních buněk a vést k poškození. Souhrnně řečeno, pokud kaskáda procesů probíhá nekontrolovaně, může vést tento stav k systémovým komplikacím a je možnost, že vyvolá selhání rozmanitých orgánů. Zablokováním tkáňového faktoru podáním specifického inhibitoru vázby tkáňový faktor/Faktor VII (např. FFR-FVIIa) a tedy zablokováním iniciace vnější biochemické dráhy srážení krve, lze zabránit započetí kaskády těchto reakcí a zmírnit tak rozsah škodlivých jevů, spojených s ischemií a obnovou krevního průtoku, jako je např. odstranění nebo výrazné zmenšení poškození myokardu nebo nekrózy.

Modifikovaný faktor se může vyskytovat buď ve formě zymogenu (t.j. jednořetězcová molekula) nebo může být rozštěpen ve svém aktivačním místě. Proto pojmem „modifikovaný Faktor VII“ jsou míněny jak molekuly modifikovaného Faktoru VII, tak molekuly modifikovaného Faktoru VIIa, které váží tkáňový faktor a zabraňují aktivaci Faktoru IX na IXa a aktivaci Faktoru X na Xa. Sekvence Faktoru VII má nejméně jednu modifikaci aminokyseliny, kterážto modifikace je zvolena tak, aby podstatně snižovala schopnost aktivovaného Faktoru VII katalyzovat aktivaci plazmatických Faktorů X nebo IX a tím je schopna zabránit tvorbě krevních sraženin. Modifikovaný Faktor VII má aktivní místo modifikováno nejméně jednou

aminokyselinovou substitucí a ve své modifikované formě má schopnost vázat tkáňový faktor. Sloučeniny modifikovaného Faktoru VII jsou obvykle ve značně čisté formě.

Ve výhodném provedení modifikace lidského a hovězího Faktoru VII, je aminokyselinový zbytek aktivního místa Ser₃₄₄, změněn, a to tak, že je nahrazen Gly, Met, Thr nebo ještě výhodněji Ala. Takovou substituci lze udělat samostatně nebo v kombinaci se substitucí (nebo substitucemi) v dalších místech katalytické triády, která ještě zahrnuje His₁₉₃ a Asp₂₄₂.

Prostředky obsahující modifikovaný Faktor VII jsou vhodné pro podávání rozličným druhům savců, hlavně lidem, k zablokování kaskády srážení krve. Modifikovaný Faktor VII lze podávat pacientům ve spojení nebo namísto ostatních antikoagulačních sloučenin. Prostředky určené pro podávání lidem obvykle obsahují modifikovanou bílkovinu lidského Faktoru VII a farmaceuticky přijatelné nosiče a pufrы.

Faktor VII hraje důležitou roli v procesech srážlivosti, hlavně těch, které jsou součástí vnější biochemické dráhy srážení krve. Je přítomen v cirkulující plazmě jako neaktivní jednořetězcový zymogen, pokud však dojde k jeho aktivaci, Faktor VIIa ve spojení s tkáňovým faktorem a vápenatými ionty aktivuje Faktor X na Xa a Faktor IX na IXa, přičemž konečným výsledkem těchto procesů je vytvoření fibrinové sraženiny.

Bílkoviny Faktoru VII mají katalytická místa, která jsou změněna tak, aby se snížila katalytická aktivita Faktoru VIIa, zatímco molekula si uchová schopnost vázat se k tkáňovému faktoru. Molekuly modifikovaného Faktoru VII soutěží s přirozeným Faktorem VII anebo s Faktorem VIIa o navázání na tkáňový faktor. Výsledkem toho je, že dojde k inhibování aktivace Faktorů X a IX.

Modifikovaný faktor může být kódován polynukleotidovou molekulou, obsahující dvě operativně spojené kódující oblasti, které kódují pre-pro peptid a gla doménu plazmatické bílkoviny, jejíž funkce je závislá na přítomnosti vitamínu K, a dále bílkovinu Faktoru VII bez gla domény. Při expresi tento polynukleotid kóduje molekuly modifikovaného Faktoru VII, který neaktivuje významně plazmatické Faktory X a IX, a je schopen vazby ke tkáňovému faktoru. Molekuly modifikovaného Faktoru VII, které jsou exprimované tímto polynukleotidem jsou biologicky účinným antikoagulantem, což znamená, že jsou schopné inhibovat procesy srážení krve a tedy tvorbu fibrinových ložisek nebo sraženin. Aby došlo k expresi modifikovaného faktoru, je molekula polynukleotidu vnesena do linií savčích buněk, jako jsou např. buněčné linie BHK, BHK 570 nebo 230.

Katalytická aktivita Faktoru VIIa může být omezena chemickými obměnami katalytického centra, neboli triady. Obměna může být provedena reakcí Faktoru VII s nevratným inhibitorem, jakým může být např. organofosfátová sloučenina, sulfonyl fluorid, halometylketonový derivát peptidu nebo azapeptid, nebo k ní může dojít např. acylací. Výhodné halometylketonové deriváty peptidů jsou mimo jiné PPACK (D-Phe-Pro-Arg chlormetylketon; (viz. U.S. Patent No. 4,318,904, uvedený zde jako reference), D-Phe-Phe-Arg a Phe-Phe-Arg chlormetylketon (FFR-cmk); a DEGRck (dansyl-Glu-Glu-Arg chlormethylketon).

Katalytickou aktivitu Faktoru VIIa lze také potlačit substitucí, insercí nebo delecí aminokyselin. Ve výhodném provedení jsou záměny aminokyselin uskutečněny v sekvenci katalytické triády aminokyselin Faktoru VII, definované zde jako oblasti, které obsahují aminokyseliny, přispívající ke katalytickému místu Faktoru VIIa. Substituce, inserce nebo delece v oblasti katalytické triády jsou obvykle přímo v místě nebo v okolí místa, kde se nacházejí aminokyseliny, tvořící katalytické místo. V lidských a hovězích bílkovinách Faktoru VII, tvoří katalytickou triádu aminokyseliny Ser₃₄₄, Asp₂₄₂ a His₁₉₃ (index určuje umístění v sekvenci). Katalytická místa ve Faktoru VII u jiných savčích druhů lze určit pomocí dnes dostupných technik jako jsou mimo jiné izolace bílkovin a analýza sekvence aminokyselin. Katalytická místa mohou být určena také porovnáním sekvence se sekvencemi dalších serinových proteáz, zvláště chemotrypsinu, jehož aktivní místo bylo již dříve určeno (Sigler et al., J.Mol.Biol., 35:143-164 (1968), uvedeno zde jako reference). Pomocí zmíněného porovnání lze určit aminokyselinové zbytky obdobných aktivních míst.

Aminokyselinové substituce, inserce nebo delece aminokyselin jsou prováděny tak, aby zabránily, nebo jinak potlačily aktivaci Faktorů X anebo IX Faktorem VIIa. Takto modifikovaný Faktor VII by si ovšem měl zachovat schopnost soutěžit se skutečným Faktorem VII anebo Faktorem VIIa o navázání na tkáňový faktor ve srážecím procesu. Takovou kompetici lze snadno odhalit např. zde popsanou zkouškou srážlivosti, nebo kompetičním vazebným testem, za použití např. linií buněk, které mají na svém povrchu tkáňový faktor, jako jsou buňky např. nádorové buňky linie J82 z močového měchýře člověka (Sakai a kol. J.Biol.Chem. 264: 9980-9988 (1989), uvedený zde jako reference).

Aminokyseliny, které tvoří katalytické místo Faktoru VII, jako jsou Ser₃₄₄, Asp₂₄₂ a His₁₉₃ u lidského a hovězího Faktoru VII, mohou být buď zaměněny nebo odstraněny. V tomto vynálezu je dávana přednost záměně pouze jedné aminokyseliny, čímž se

minimalizuje pravděpodobnost zvýšené antigenicity molekuly, nebo omezení jejich schopnosti vázat tkáňový faktor. I přesto je možné provést dvě nebo více záměn aminokyselin (substitucemi, adicemi nebo delecemi), rovněž je možno také provést kombinace substituce (substitucí), adice (adicí) a delece (delecí). Ve výhodném provedení je u lidského a hovězího Faktoru VII Ser₃₄₄ přednostně nahrazován Ala, ale pro záměnu mohou být použity i Gly, Met, Thr nebo další aminokyseliny. Je výhodné zaměnit Asp za Glu a zaměnit His za Lys nebo Arg. Záměny jsou obecně vybrány tak, aby došlo k co nejmenšímu porušení terciální bílkovinné struktury. Model popsany Dayhoffem a kol. (v Atlas of Protein Structure 1978, Nat'l Biomed. Res. Found., Washington, D.C.), uveden zde jako reference; může být použit jako návod při výběru dalších substitucí aminokyselin. Lze provést záměny zbytků aminokyselin, jak byly popsány výše, v katalytickém místě sekvence příslušného Faktoru VII člověka, skotu nebo dalších druhů a testovat u výsledných bílkovin požadovanou hladinu inhibice katalytické aktivity a výslednou protisrážlivou aktivitu, jak zde bylo popsáno. U modifikovaného Faktoru VII bude katalytická aktivita významně omezena, katalytická aktivita bude obecně nižší než 5 % aktivity původního Faktoru VII odpovídajících druhů, v lepším případě méně než 1%.

Modifikovaný Faktor VII lze produkovat použitím technik rekombinantní DNA. Obecně je klonovaná sekvence DNA z původního Faktoru VII modifikována tak, aby kódovala požadovanou bílkovinu. Tato modifikovaná sekvence je pak zabudována do expresního vektoru, který je použit k transformaci, neboli je vnesen do hostitelské buňky. Jako hostitelské buňky jsou přednostně používány vyšší eukaryotické buňky, hlavně kultivované savčí buňky. Jsou známy kompletní nukleotidové a aminokyselinové sekvence lidského Faktoru VII. Viz U.S. Patent No. 4,784,950, který je zde uveden jako reference, kde je popsáno klonování a exprese rekombinantního lidského Faktoru VII. Sekvence hovězího Faktoru VII popsal Takeya a kol., J. Biol. Chem. 263:14868-14872 (1988), který je zde uveden jako reference.

Změny v sekvenci aminokyselin lze provést různými postupy. Změny v sekvenci DNA lze docílit pomocí místně-specifické mutageneze. Techniky místně-specifické mutageneze jsou v oboru dobře známy a jsou popsány např. v Zoller and Smith (DNA 3:479-488, 1984). Tedy, při použití nukleotidových a aminokyselinových sekvencí Faktoru VII, může každý provést změnu (změny) podle vlastní volby.

Faktor VII modifikovaný tímto postupem zahrnuje takové proteiny, které obsahují amino-koncovou oblast (gla doménu) zaměněnou za gla doménu jednoho z

plazmatických proteinů, závislých na přítomnosti vitamínu K - Faktoru IX, Faktoru X, prothrombinu, bílkoviny C, bílkoviny S nebo bílkoviny Z. Gla domény plazmatických proteinů závislých na vitamínu K jsou charakterizovány přítomností zbytků gamma-karboxy glutamové kyseliny a jsou obecně dlouhé od 30 do 40 aminokyselin s C-konci odpovídajícími pozicím rozhraní exon-intron v odpovídajících genech. Způsoby pro vytvoření Faktoru VII s heterologní gla-doménou jsou uveřejněny v U.S. No. 4,784,950, uvedeném zde jako reference.

DNA sekvence používající se při vytváření modifikovaného Faktoru VII obvykle kódují pre-pro- peptid na amino-konci proteinu Faktoru VII, aby byla dosaženo patřičné post-translační zpracování (např. gama karboxylace zbytků kyseliny glutamové) a sekrece z hostitelské buňky. Pre-pro- peptid může pocházet z Faktoru VII nebo jiného vitamin- K-dependentního plazmatického proteinu, jako jsou Faktor IX, Faktor X, protrombin, protein C nebo protein S. Pracovníci se zkušenostmi v oboru zjistí, že v aminokyselinové sekvenci modifikovaného Faktoru VII lze provést další změny, které nepoškodí významně schopnost proteinu fungovat jako antikoagulant. Např. Faktor VII, modifikovaný ve své katalytické trojici aminokyselin, může být také modifikován v aktivačním štěpícím místě, čímž se zabrání přeměně inaktivní formy (zymogenu) Faktoru VII do jeho aktivní dvouřetězcové formy, jak je obecně popsáno v U.S. Patent 5,288,629, uvedeném zde jako reference.

Expresní vektory používané pro exprimování modifikovaného Faktoru VIIa budou obsahovat promotor, schopný řízení transkripce klonovaného genu nebo cDNA. Promotory výhodné pro použití v kulturách savčích buněk jsou virové promotory a buněčné promotory. Virové promotory zahrnují SV40 promotor (Subramani a kol., Mol. Cell. Biol. 1: 854-864, 1981) a CMV promotor (Boshart a kol., Cell 41:521-530, 1985). Zvláště výhodný virový promotor je velký pozdní promotor z adenoviru 2 (Kaufman a Sharp, Mol. Cell. Biol. 2:1304-1319, 1982). Buněčné promotory zahrnují promotor myšího genu kappa (Bergman a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:7041-7045, 1983) a myší V_H promotor (Loh a kol., Cell 33:85-93, 1983). Obzvláště výhodný je myší promotor pro metalothionein-I (Palmiter a kol., Science 222:809-814, 1983). Expresní vektory také mohou obsahovat soubor míst pro sestřih RNA, umístěný za promotorem po směru exprese genu a proti směru exprese genu od místa, kde je vklonována vlastní sekvence pro Faktor VII. Výhodná místa pro sestřih RNA lze získat z adenoviru nebo z imunoglobulinových genů. Dále je v expresních vektorech obsažen signál pro polyadenylaci, umístěný po směru exprese genu od inzerčního místa. Zvláště výhodné

polyadenylační signály jsou časný anebo pozdní polyadenylační signál z viru SV40 (Kaufman a Sharp, tamtéž), polyadenylační signál z oblasti Elb adenoviru 5, terminátor lidského genu pro růstový hormon (DeNoto a kol., Nucl. Acids Res. 9:3719-3730, 1981) nebo polyadenylační signál z lidského genu pro Faktor VII nebo hovězího genu pro Faktor VII. Expresní vektory také mohou obsahovat nekódující leader sekvenci, jako např. tripartite leader sekvence adenoviru 2, umístěná mezi promotor a místa pro sestřih RNA; sekvence pro zesílení transkripce, jako např. sekvence pro zesílení transkripce z viru SV40.

Klonované DNA sekvence jsou vneseny do buněk tkáňových kultur savčích buněk např. transfekcí zprostředkovanou fosfátem vápenatým (Wigler a kol., Cell 14:725-732, 1978; Corsaro a Pearson, Somatic Cell Genetic 7: 603-616, 1981; Graham a Van der-Eb, Virology 52d:456-467, 1973), nebo elektroporací (Neumann a kol., EMBO J. 1:841-845, 1982). Pro vyhledání a selekci buněk, které exprimují exogenní DNA, jsou obecně do buněk spolu se žádaným genem či cDNA vnášeny i geny, které buňkám propůjčují selektovatelný fenotyp (selekční markery). Výhodné selekční markery jsou geny, které buňkám propůjčují resistenci k léčivům jako je neomycin, hygromycin a methotrexát. Selektční marker může být také množivý selekční marker. Výhodný množivý selekční marker je sekvence dihydrofolát reduktázy (DHFR). Selektční markery jsou přehledně uvedeny v práci Thillyho (Mammalian Cell Technology, Butterworth Publishers, Stoneham, MA, uvedené zde jako reference). Výběr selekčních markerů závisí na úrovni zkušenosti v oboru.

Selekční markery mohou být vneseny do buněk na zvláštním plazmidu současně se žádaným genem, nebo mohou být umístěny na témže plazmidu. Pokud jsou na témže plazmidu, selekční marker a žádaný gen mohou být pod kontrolou různých promotorů nebo téhož promotoru, v tomto druhém uspořádání je produkována dicistronická mRNA. Konstrukty tohoto typu jsou v oboru známy (např. Levinson a Simonsen, U.S. Patent 4,713,339). Může být také výhodné přidat další DNA, známou jako „nosičová DNA“, ke směsi, jež je vnášena do buněk.

Poté co buňky přijmou DNA, jsou pěstovány ve vhodném růstovém médiu, obvykle 1 až 2 dny, aby začaly exprimovat žádaný gen. Zde použitý termín „vhodné růstové médium“, znamená médium obsahující živiny a jiné složky, vyžadované pro růst buněk a expresi genu modifikovaného Faktoru VII. Média obvykle obsahují zdroj uhlíku, zdroj dusíku, esenciální aminokyseliny, esenciální cukry, vitamíny, soli, fosfolipidy, proteiny a růstové faktory. Pro tvorbu gama-karboxylovaného

modifikovaného Faktoru VII, médium bude obsahovat vitamin K, přednostně v koncentraci 0,1 až 5 mg/ml. Pak je uplatněna selekce léčivy, která umožní růst buňkám, exprimujícím selekční marker ve stabilní formě. U buněk, které byly transfekovány množivým selekčním markerem, se koncentrace selekčního léčiva může zvyšovat, aby se selektoval zvýšený počet kopií klonovaných sekvencí, tedy i zvyšující se hladiny exprese. Klony stabilně transfekovaných buněk se pak testují na expresi modifikovaného Faktoru VII.

Výhodné savčí buněčné linie jsou COS-1 (ATCC CRL 1650), buněčná linie z ledvin novorozených křečků (BHK) a buněčná linie 293 (ATCC CRL 1573; Graham a kol., J. Gen. Virol. 36:59-72, 1977). Výhodná BHK buněčná linie je tk^{ts13} BHK linie (Waechter a Baserga, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:1106-1110, 1982, uvedená zde jako reference), dále zde označovaná jako buňky BHK 570. Buněčná linie BHK 570 byla uložena v Americké typové sbírce kultur (American Type Culture Collection), 12301 Parklawn Dr., Rockville, MD 20852, pod ATCC přístupovým číslem CRL 10314. Tato tk^{ts13} BHK linie je také dostupná v ATCC pod přístupovým číslem CRL 1632. Navíc lze použít řadu jiných buněčných linií včetně Rat Hep I (kryší hepatom; ATCC CRL 1600), Rat Hep II (kryší hepatom; ATCC CRL 1548), TCMK (ATCC CRL 139), buněčná linie z lidských plic – Human lung (ATCC HB 8065), NCTC 1469 (ATCC CCL 9.1), CHO (ATCC CCL 61) a buňky DUKX (Urlaub a Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, 1980).

Pro produkci modifikovaného Faktoru VII lze použít technologii transgenních zvířat. Je výhodné produkovat bílkoviny v mléčných žlázách hostitelské savčí samice. Exprese v mléčných žlázách a následná sekrece žádané bílkoviny do mléka obchází mnoho potíží, se kterými se setkáváme při izolaci bílkovin z jiných zdrojů. Mléko se snadno shromažďuje, je dostupné ve velkých množstvích a je dobře biochemicky charakterizováno. Navíc jsou hlavní mléčné bílkoviny přítomny v mléku ve vysokých koncentracích (typicky 1 až 15 g/l).

Z hospodářského hlediska je jasně výhodnější použití jako hostitele druh, který má vysokou produkci mléka. Zatímco malí živočichové, jako jsou myši a krysy, mohou být použiti (a je jim dáвана přednost při testování základní konstrukce), je výhodné použít savce hospodářského zvířectva, např. mimo jiné vepře, kozy, ovce a skot. Ovce jsou zvláště výhodné kvůli takovým okolnostem, jako je předcházející historie transgeneze u tohoto druhu, produkce mléka, cena a snadná dostupnost zařízení pro sběr ovčího mléka. Viz WIPO Publication WO 88/00239 pro porovnání faktorů, majících

vliv na výběr hostitelských druhů. Je obecně žádoucí vybrat takové plemeno hostitelských zvířat, které bylo vyšlechtěno pro produkci mléka, jako např. východofríské ovce, nebo později s takovým plemenem transgenní linii zkřížit. V každém případě by se měly používat zvířata dobrého a známého zdravotního stavu.

Aby byla dosažena exprese v mléčných žlázách, používá se transkripční promotor mléčného proteinu. Geny mléčných proteinů zahrnují geny kódující kaseiny (viz U.S. Patent No. 5,304,489, uvedený zde jako reference), beta-laktoglobulin, a-laktalbumin a kyselé proteiny syrovátky. Výhodný je beta-laktoglobulinový promotor (BLG). V případě ovčího beta-laktoglobulinového genu se obecně používá oblast nejméně 406 bázových párů bezprostředně sousedící s 5'-koncem genu, ačkoli jsou výhodné i větší části této oblasti (až do 5 kbp), jako např. 4,25 kbp DNA fragment, zahrnující promotor v 5'-oblasti a nekódující část laktoglobulinového genu – viz Whitelaw a kol., *Biochem J.* 286: 31-39 (1992). Vhodné jsou také podobné fragmenty promotorové DNA z pocházející z jiných druhů.

Do konstruktů mohou být zabudovány také jiné oblasti beta-laktoglobulinového genu, stejně tak jako genomické oblasti exprimovaného genu. Obecně se uznává, že např. konstrukty bez intronů, exprimují slaběji, ve srovnání s těmi, které tyto sekvence obsahují (viz Brinster a kol., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:836-840 (1988); Palmiter a kol., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 478-482 (1991); Whitelaw a kol., *Transgenic Res.* 1: 3-13 (1991); WO 89/1343 a WO 91/02318, každý z nich je zde uveden jako odkaz). V tomto ohledu se dává přednost, pokud je to možné, použití takových genomických sekvencí, které obsahují všechny nebo jen některé přirozené introny genu kódujícího žádaný protein nebo polypeptid, tak je např. výhodné zahrnutí přinejmenším některých intronů z beta-laktoglobulinového genu. Jednou takovou oblastí je úsek DNA, který zajišťuje místa pro sestřih intronů a polyadenylaci RNA, pocházející z 3'-nekódující oblasti ovčího beta-laktoglobulinového genu. Tento segment ovčího beta-laktoglobulinu, pokud nahradí přirozené 3'-nekódující sekvence genu, může jak zvýšit, tak i stabilizovat úroveň exprese žádaných proteinů nebo polypeptidů. Při jiném provedení je oblast kolem ATG-počátku sekvence modifikovaného Faktoru VII nahrazena odpovídajícími sekvencemi z genu specifického mléčného proteinu. Taková záměna poskytne předpokládané, tkáňově specifické iniciační prostředí pro rozšíření exprese. Je vhodné zaměnit celé pre-pro- a 5'-nekódující oblasti modifikovaného Faktoru VII, odpovídajícími sekvencemi např. genu BLG, třebaže je možno zaměnit i oblasti menší.

Pro expresi modifikovaného Faktoru VII v transgenních zvířatech, úsek DNA kódující modifikovaný Faktor VII je operativně připojen k dalším DNA úsekům, vyžadovaným pro jeho expresi a tvoří tak expresní jednotky. Takové další úseky obsahují výše zmíněný promotor, rovněž tak sekvence zajišťující terminaci transkripce a polyadenylaci mRNA. Expresní jednotka dále obsahuje úsek DNA, kódující sekreční signální sekvenční operativně připojenou k úseku, kódujícímu modifikovaný Faktor VII. Sekreční signální sekvenční může být buď přirozená sekreční signální sekvenční Faktoru VII, nebo může pocházet z jiného proteinu, jako je např. mléčný protein. Viz např. von Heinje, Nucl. Acids Res. 14: 4683-4690 (1986) a Meade a kol., U.S. Patent No. 4,873,316, které jsou zde uvedeny jako reference.

Konstrukci expresních jednotek pro použití v transgenních zvířatech je vhodné provádět vnesením sekvenční modifikovaného Faktoru VII do plazmidu nebo fágového vektoru, obsahujícího další DNA úseky, třebaže expresní jednotka může být konstruována v podstatě jakoukoli posloupností ligací. Je obzvláště výhodné připravit vektor obsahující DNA úsek kódující mléčný protein a zaměnit kódující sekvenční mléčného proteinu sekvenční modifikovaného polypeptidu Faktoru VII, čímž se vytvoří genová fúze, obsahující expresní kontrolní sekvenční genu pro mléčný protein. V každém případě klonování expresních jednotek v plazmidech nebo jiných vektorech usnadňuje amplifikaci sekvenční modifikovaného Faktoru VII. Amplifikaci je vhodné provádět v bakteriálních hostitelských buňkách (např. *E.coli*), takže vektory běžně obsahují počátek replikace a selekční marker, funkční v bakteriálních hostitelských buňkách.

Expresní jednotka je pak vnesena do oplozeného vajíčka (popřípadě časného embrya) vybraného hostitelského druhu. Vnesení cizorodé DNA se může provést jedním z několika způsobů, mezi jinými mikroinjekcí (např. U.S. Patent No. 4,873,191), infekcí retroviry (Jaenisch, Science 240: 1468-1474 (1988)) nebo místně směřovanou integrací, využívající embryonální kmenové buňky (ES – embryonic stem cells) (přehled viz. Bradley a kol., Bio/Technology 10: 534-539 (1992)). Vajíčka jsou pak implantována do vejcovodů nebo dělohy pseudogavidních samic a ponechána se vyvíjet do konce těhotenství. Potomci obsahující vnesenou DNA ve svých zárodečných buněčných liniích, přenášejí DNA do svého potomstva normálním, Mendelistickým způsobem a umožňují tak vznik transgenních stád.

Obecné postupy pro přípravu transgenních zvířat jsou v oboru známy. Viz např. Hogan a kol., Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, Cold Spring

Harbor Laboratory, 1986; Simons a kol., Bio/Technology 6: 179-183 (1988); Wall a kol., Biol. Reprod. 32: 645-651 (1985); Buhler a kol., Bio/Technology 8: 140-143 (1990); Ebert a kol., Bio/Technology 9: 835-838 (1991); Krimpenfort a kol., Bio/Technology 9: 844-847 (1991); Wall a kol., J. Cell. Biochem. 49: 113-120 (1992); U.S. Patent Nos. 4,873,191 a 4,873,316; WIPO publikace WO 88/00239, WO 90/05188, WO 92/11757 a GB 87/00458, které jsou zde uvedeny jako reference. Techniky pro vnášení cizorodých DNA sekvencí do savců a jejich zárodečných buněk byly původně vyvinuty na myších. Viz např. Gordon a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 7380-7384 (1980); Gordon a Ruddle, Science 214: 1244-1246 (1981); Palmiter a Brinster, Cell 41: 343-345 (1985); Brinster a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 4438-4442 (1985) a Hogan a kol., (tamtéž). Tyto techniky byly následně adaptovány pro použití u větších zvířat, včetně druhů hospodářského zvířectva (viz např. WIPO publikace WO 88/00239, WO 90/05188 a WO 92/11757 a Simons a kol., Bio/Technology 6: 179-183 (1988). Souhrně řečeno, při dosud nejefektivnějším způsobu přípravy transgenních myší nebo hospodářského zvířectva, je několik set lineárních molekul příslušné DNA pomocí zavedené techniky injikováno do jednoho z předjader oplodněného vajíčka. Může se také použít injekce do cytoplazmy zygoty.

Také lze použít produkci v transgenních rostlinách. Expres může být generalizovaná nebo zaměřená na zvláštní orgán, jako je např. hlíza. Viz Hiatt, Nature 344: 469-479 (1990); Edelbaum a kol., J. Interferon Res. 12: 449-453 (1992); Sijmons a kol., Bio/Technology 8: 217-221 (1990) a European Patent Office Publication EP 255,378.

Modifikovaný Faktor VII se může čistit affinitní chromatografií na sloupci s protilátkami proti němu. Zvláště výhodné je použití monoklonálních protilátek, závislých na vápníku, jak je popsáno u Wakabayashi a kol., J. Biol. Chem. 261: 11097-11108, (1986) a Thim a kol., Biochem. 27: 7785-7793 (1988), které jsou zde uvedeny jako reference. Další purifikace se dá dosáhnout vhodnými chemickými purifikačními způsoby, jako je HPLC (high performance liquid chromatography). Jiné způsoby purifikace, včetně precipitace citranem barnatým, jsou v oboru známy a lze je použít k čištění zde popsaného, nově modifikovaného Faktoru VII (obecně viz Scopes, R., Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y., 1982). Pro farmaceutické účely je výhodný značně čistý modifikovaný Faktor VII, který má homogenitu přinejmenším 90 až 95 % a ještě výhodnější je produkt o homogenitě 98 až 99 % a více. Když je purifikován,

částečně nebo do požadované homogenity, pak může být Faktor VII použit terapeuticky.

Modifikovaný Faktor VII je štěpen ve svém aktivačním místě, čímž je převeden na svou dvouřetězcovou formu. Aktivaci lze provést pomocí způsobů v oboru známých, jako ty, které popsali Osteruda kol., Biochemistry 11:2853-2857 (1972); Thomas, U.S. Patent No. 4,456,591; Hedner a Kisiel, J. Clin. Invest. 71:1836-1841 (1983) nebo Kisiel a Fujikawa, Behring Inst. Mitt. 73:29-42 (1983), které jsou zde uvedeny jako reference. Výsledná molekula je pak upravena na léčivo a podávána, jak je popsáno dále.

Prostředky

Sloučeniny budou obvykle podávány v období 24 hodin před provedením zásahu a až 7 nebo více dní po něm. Podání prostředků pro předcházení nebo minimalizaci poškození myokardu lze uskutečnit řadou způsobů, jak je zde dále popsáno. Sloučeniny mohou být také podány místně na cévní místa, citlivá ke tvorbě sraženin, např. na místa, kde bylo provedeno cévní spojení nebo na cévní místa se sníženou průchodností.

Při předcházení nebo léčení poškození myokardu, se dávka modifikovaného Faktoru VII pohybuje v rozmezí 50 mg až 500 mg na den, častěji v rozmezí 1 mg až 200 mg na den a ještě výhodněji v rozmezí 10 mg až 175 mg na den pro pacienta vážícího 70 kg, jak pro úvodní, tak pro udržovací dávky, závisící na váze pacienta a vážnosti stavu.

Farmaceutické prostředky pro léčení poškození myokardu jsou určeny pro parenterální podávání jak při preventivním, tak i léčebném použití. Farmaceutické prostředky jsou výhodněji podávány parenterálně, tj. intravenózně, subkutánně nebo intramuskulárně. Prostředky pro parenterální podávání obsahují roztok molekul modifikovaného Faktoru VII, rozpuštěných v použitelném nosiči, s výhodou se jedná o vodný nosič. Je možno použít řadu vodných nosičů, např. vodu, pufrovanou vodu, 0,4% solný roztok, 0,3% glycin a tak podobně. Molekuly modifikovaného Faktoru VII mohou být upraveny do formy lipozomových přípravků pro cílené podání na zraněná místa. Přípravy lipozomů jsou obecně popsány v např. U.S. 4,837,028, U.S. 4,501,728 a U.S. 4,975,282, uvedených zde jako reference. Přípravky mohou být sterilizovány běžnými, dobře známými způsoby. Výsledné vodné roztoky mohou být baleny pro použití nebo filtrovány za aseptických podmínek a lyofilizovány, lyofilizované preparáty jsou pak před použitím rozpuštěny ve sterilní vodě. Prostředky mohou obsahovat farmaceuticky přijatelné přídavné látky, které jsou vyžadovány pro přiblížení se fyziologickým

podmínkám, jako jsou činidla upravující pH a pufrující, činidla upravující osmotický tlak a podobné, např. octan sodný, mléčnan sodný, chlorid sodný, chlorid draselný, chlorid vápenatý atd. Koncentrace modifikovaného Faktoru VII v těchto přípravcích může kolísat v širokém rozmezí, tj. od méně než 0,5%, obvykle od nejméně 1 % do až 15 nebo 20 váhových % a bude vybírána v první řadě podle objemů tekutin, viskozit atd., ve shodě s určitým zvoleným způsobem podávání.

Tedy typický farmaceutický prostředek pro intravenózní infuzi by měl obsahovat 250 ml sterilního Ringerova roztoku a 10 mg modifikovaného Faktoru VII. Skutečné způsoby přípravy parenterálně podávaných sloučenin jsou známy nebo zřejmé pracovníkům se zkušenostmi v oboru a jsou detailněji popsány např. v Remington's Pharmaceutical Science, 16. vydání, Mack Publishing Company, Easton, PA (1982), která je zde uvedena jako reference.

Prostředky, obsahující molekuly modifikovaného Faktoru VII, mohou být podávány jak za účely preventivními, tak za účely léčebnými. Při léčebných aplikacích jsou prostředky podávány pacientovi, který již trpí nemocí, jak je výše popsáno, v množství postačujícím pro léčení nebo přinejmenším zastavení vývoje nemoci a jejích průvodních projevů. Množství postačující k dosažení tohoto výsledku je definováno jako „terapeuticky účinná dávka“. Toto účinné množství bude záviset na závažnosti nemoci nebo poranění a na váze a všeobecném stavu pacienta, ale obecně se nalézá v rozmezí od 0,05 mg až do 500 mg modifikovaného Faktoru VII na den pro pacienta o váze 70 kg, přičemž bývají běžně používány denní dávky od 1,0 mg až do 200 mg modifikovaného Faktoru VII. Musíme mít na paměti, že materiály uváděné v tomto vynálezu lze obecně využít při vážných nemocech nebo stavech poranění, tedy při život ohrožujících nebo potenciálně život ohrožujících situacích. V takových případech, se zřetelem na minimální obsah cizorodých látek a to, že modifikovaný Faktor VII nevykazuje u lidí imunogenicitu, je možno a dokonce může být ošetřujícím lékařem považováno za žádoucí, podávat značné nadbytky těchto prostředků, obsahujících modifikovaný Faktor VII.

Při preventivních aplikacích jsou prostředky, obsahující modifikovaný Faktor VII podávány pacientovi, citlivému k nemoci, nebo jinak ohroženému nemocí nebo poraněním, aby byly podpořeny vlastní pacientovy protisrážlivé schopnosti. Takové množství definováno jako „preventivně účinná dávka“. Při tomto typu použití, přesné množství opět závisí na pacientovu zdravotním stavu a váze, ale obecně se nalézá

v rozmezí od 0,05 mg až do 500 mg pro pacienta o váze 70 kg, běžněji od 1,0 mg až do 200 mg na 70 kg tělesné váhy.

Mohou se provádět jednotlivá nebo opakovaná podání prostředků, přičemž úroveň dávek a časový průběh bude určen ošetřujícím lékařem. U ambulantně léčených pacientů, vyžadujících denní udržování hladiny, může být modifikovaný Faktor VII podáván kontinuální infuzí, např. pomocí přenosné pumpy.

Místní podávání modifikovaného Faktoru VII jako takového, např. místní podání modifikovaného Faktoru VII na cévní místa citlivá k tvorbě krevní sraženiny, (např. místa, kde byla provedena cévní spojení) nebo na cévní místa náchylná ke snížené průchodnosti, lze provádět např. pomocí spreje, perfúzí, dvojími balónkovými katétry, stenty, začleněnými do cévních štěpů, nebo hydrogely, používanými jako povlaky balónkových katétrů, či jinými, zavedenými způsoby. V každém případě by měly farmaceutické přípravky poskytnout takové množství modifikovaného Faktoru VII, připraveného podle tohoto vynálezu, které je dostatečné pro účinné léčení pacienta.

Popis obrázků

Obr. č.1 ukazuje konstrukci expresního vektoru pro Ser₃₄₄@Ala modifikovanou DNA sekvenci Faktoru VII. Použité symboly jsou: 0-1, 0-1 mapové jednotky sekvence adenoviru 5; E, enhancer z viru SV40; MPL, velký pozdní promotor adenoviru 2; SS, soubor míst pro sestřih; pA, signal k polyadenylaci z SV 40 v pozdní orientaci.

Obr. č.2 ukazuje vliv injekce DEGR-Faktoru VIIa na tvorbu krevní sraženiny (ukládání krevních destiček) v aortě paviána s provedeným mechanickým poškozením, v porovnání s kontrolou ošetřovanou pomocí solného roztoku. Tepny byly měřeny po dobu 60 minut. DEGR-Faktor VIIa významně potlačuje vývoj krevních sraženin bohatých na krevní destičky u tohoto modelu akutního cévního poškození u primátů.

Obr. č.3 ukazuje výsledky získané u buněk hladkého svalstva paviána, které byly inkubovány se zvyšujícími se koncentracemi buď FVIIa (prázdné čtverečky), nebo DEGR-FVIIa v přítomnosti konstantního množství FVIIa (5nM) (plné čtverečky). Úroveň aktivace FX byla poté určena za použití chromogenního substrátu S-2222. Hodnoty jsou vyjádřeny jako procenta amidolytická aktivity, naměřené v přítomnosti samotného 5 nM FVIIa.

Obr. č.4 zobrazuje velikost plochy vnitřní vrstvy u pavíánů, kteří prodělali mechanické poškození karotidy a léčbu DEGR-Faktorem VIIa po dobu 7 nebo 30 dní, v porovnání s kontrolními zvířaty.

Obr. č.5 ukazuje poměr velikosti vnitřní vrstvy k velikosti vnitřní + střední vrstvy stehenní tepny paviana, který podstoupil poranění balónkem a léčbu DEGR-Faktorem VIIa, přičemž kontrolní skupina zahrnovala 5 cév, při 7-denní léčbě bylo zkoumáno 11 cév a při 30-denní léčbě byly zkoumány 2 cévy (n = počet zkoumaných cév).

Obr. č.6 ukazuje protokol pokusu, kde byl měřen rozsáh infarktu (IS), oblast ve které nedošlo k obnovení průtoku krve (NR), oblast rizika (AR), protrombinový čas (PT) a doba částečné aktivace tromboplastinu (aPTT).

Obr. č.7 ukazuje diagram velikosti infarktu na konci období obnovy krevního průtoku, vyjádřené jako procento oblasti s rizikem infarktu ve třech léčebných skupinách, přičemž tyto tři léčebné skupiny jsou zvířata, léčená FFR-Faktorem VIIa, Faktorem VIIa a solným roztokem. V každém ze sloupců je vynesena průměrná hodnota získaná z osmi zvířat $\pm$ SD.

Obr. č.8 ukazuje diagram oblastí, ve které nedošlo k obnovení krevního zásobení (NR) na konci období obnovy krevního průtoku, vyjádřené jako procento oblasti s rizikem infarktu (zvířata léčená FFR-Faktorem VIIa, Faktorem VIIa a solným roztokem). V každém ze sloupců je vynesena průměrná hodnota získaná z osmi zvířat $\pm$ SD.

Obr. č.9 ukazuje závislost mezi očekávanou velikostí oblastí bez obnoveného průtoku krve (jako procento levé srdeční komory, LV), která byla pro každé zvíře vypočítána pomocí rovnice mnohonásobné lineární regrese a skutečně pozorovanou velikostí oblastí bez obnoveného průtoku krve (vyjádřeno jako procento z LV).

Obr. č.10 ukazuje diagram krevního průtoku oblastí myokardu (RMBF) pro myokard postižený ischemií po dobu 20 min. a dále po 10 min. a 2 hodinách po obnovení průtoku krve.

Obr. č.11 ukazuje vliv FFR-Faktoru VIIa a Faktoru VIIa na protrombinový čas (PT) a dobu částečné aktivace tromboplastinu (aPTT).

Následující příklady jsou uvedeny jakožto ilustrace, nikoli jako omezení oblasti působnosti vynálezu

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1. Expres Ser₃₄₄@Ala₃₄₄ Faktoru VII

Pro vytvoření Ser₃₄₄@Ala Faktoru VII s mutovaným aktivním místem, byl plazmid FVII(565+2463)/pDX (U.S. Patent No. 4,784,950, uvedený zde jako citace; uložený v Americké typové sbírce kultur (American Type Culture Collection) pod přístupovým číslem 40205) štěpen Xba I a Kpn I a byl izolován výsledný fragment 0,6 kb, obsahující kódující oblast pro serin 344. Tento fragment byl klonován do M13mp19 štěpeného Xba I, Kpn I jak je ukázáno na Obrázku. Tato manipulace a následující kroky popsané dále byly provedeny podle standardních postupů (popsaných např. v Maniatis a kol., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1982) uvedený zde jako reference).

Mutagenese byla provedena na templátu M13 podle metod Zollera a Smitha, za použití mutagenního oligonukleotidu ZC1656 (5' TGG GCC TCC GGC GTC CCC CTT 3') a „univerzálního„ druhého primeru ZC87 (5' TCC CAG TCA CGA CGT 3'). Reakční produkty byly rozříděny pomocí kinázovaného oligonukleotidu ZC 1656. Pozitivní plaky byly vypíchány a byla připravena DNA matrice, která byla sekvencována od Pst I místa na 1077 do místa Kpn I na 1213. Sekvenční analýza potvrdila přítomnost požadované mutace. Mutovaný klon byl označen 1656.

Za použití klonu 1656 byl konstruován expresní vektor. Mutovaná sekvence byla z M13 vektoru izolována jako 0,14 kb fragment Pst I-Kpn I. Tento fragment byl ligován k 1,7 kb Hind III-Xba I fragmentu z FVII(565+2463)/pDX, 0,5 kb Xba I-Pst I fragmentu z FVII(565+2463)/pDX a 4,3 kb Kpn I-Hind III fragmentu z FVII(565+2463)/pDX, jak je ukázáno na Obrázku. Přítomnost požadované mutované sekvence byla potvrzena štěpením mutovaného a původního klonu pomocí Pst I a mutovaného inzertu Faktoru VII v M13 pomocí Kpn I a Xba I, přípravou Southernových blotů z takto štěpené DNA a hybridizací blotů s radioaktivně značeným oligonukleotidem ZC1656.

Tkáňová linie ledvinných buněk z novorozených křečků BHK 570 (uložená v Americké sbírce kultur (American Type Culture Collection) pod přístupovým číslem 40205) byly transfekovány dvěma izoláty (označeny #544 a #545) expresního vektoru

1656. Buňky byly připraveny zředěním souvisle narostlé 10 cm plotny BHK 570 1:10 na pět 10 cm ploten v neselektivním médiu (Eaglovo médium modifikované podle Dulbecca [DMEM], obsahující 10% fetální hovězí sérum a 1% PSN - směs antibiotik [GIBCO Life Technologies, Gaithersburg, MD]). Po 24 hodinách, když buňky dosáhly 20 až 30 % souvislého nárůstu, byly kotransfekovány jedním izolátem expresního vektoru kódujícího mutaci 1656, plazmidem p486 (obsahující Adenovirus 5 ori, SV40 enhancer, Adenovirus 2 větší pozdní promotor, Adenovirus 2 trojdílnou úvodní sekvenci, 5' a 3' sestřihová místa, DHFR^r cDNA a SV40 polyadenylační signál v pML-1 (Lusky a Botchan, *Nature* 293:79-81, (1981)) a 10 mg nosičové DNA (sonikovaná DNA z lososího spermatu), jak je ukázáno v Tabulce 1. DNA byla přidána do 15 ml zkumavky, pak bylo přidáno 0,5 ml 2x Hepes (25 g Hepes, 40 g NaCl, 1,8 g KCl, 0,75 g Na₂HPO₄·2H₂O a 0,5 g dextrózy, zředěno do 2,5 litru destilovanou vodou a pH upraveno na 6,95 až 7,0) a zkumavky byly promíchány. DNA v každé zkumavce byla sražena přidáním 0,5 ml 0,25 M CaCl₂, přičemž byl tento DNA/Hepes roztok probubláván vzduchem pomocí Pasteurovy pipety. Zkumavky byly pak vortexovány inkubovány při teplotě místnosti 15 min. a znovu vortexovány. Směsi DNA pak byly po kapkách pomocí Pasteurovy pipety přidány na plotny s buňkami. S plotnami bylo rychle zakrouženo a inkubovány při 37 °C po dobu 4 až 6 hodin. Po inkubaci byly ke každé misce přidány 2 ml 20% glycerolu zředěného v Tris-NaCl (0,375 g KCl, 0,71 g Na₂HPO₄·2H₂O, 8,1 g NaCl, 3,0 g Tris-HCl, 0,5 g sacharózy, zředěno v celkovém objemu 1 litr a pH upraveno na 7,9). S plotnami bylo rychle zakrouženo a ponechány při teplotě místnosti 2 min. Médium bylo poté z misek odebráno a nahrazeno 2 ml Tris-NaCl. Plotny byly ponechány 2 min. při teplotě místnosti, pak byl Tris-NaCl odebrán a nahrazen 10 ml neselektivního média. Plotny byly inkubovány při teplotě 37 °C dva dny.

Tabulka 1

Transfekce*

	544	545	544 kontrola	545 kontrola
Jméno plazmidu				
klon 544	15 ml	---	15 ml	---
klon 545	---	30 ml	---	30 ml
p486	1,5 ml	1,5 ml	---	---
nosičová DNA	1,6 ml	1,6 ml	1,6 ml	1,6 ml

* Použité koncentrace DNA byly: klon 544: 0,7 mg/ml; klon 545: 0,3 mg/ml

p486: 1,49 mg/ml.

Po dvou dnech inkubace byly buňky rozředěny v selektivním médiu (DMEM obsahující 10% dialyzované fetální hovězí sérum, 1 % směsi antibiotik PNS a 150 nM methotrexátu) a vysety v ředěních 1:100, 1:250 a 1:500 na velké plotny. Plotny byly inkubovány při 37 °C jeden týden. Po týdnu bylo médium vyměněno, nahrazeno selektivním médiem a u ploten kontrolována tvorba kolonií.

Po dalších osmi dnech, po tvorbě kolonií, bylo náhodně vybráno z transfekčních ploten #544 a #545 s ředěním 1:500 dvacet kolonií. Každý klon byl vyset do jedné jamky na šestijamkové plotně a pěstován v selektivním médiu. Po sedmi dnech byly plotny souvisle narostlé a každý klon byl rozdělen na 10 cm plotny se selektivním médiem.

Výše popsané klony a kontrolní buňky transfekované tak, aby exprimovaly původní typ Faktoru VII byly metabolicky označeny směsí, značící proteiny, s ³⁵S-Metionin-Cystein (NEN DuPont Biotechnology Systems, Wilmington, DE). Klony byly pěstovány v selektivním médiu a připraveny pro pokus pulzního značení. Buňky byly opláchnuty fyziologickým roztokem pufrovaným fosfátovým pufrem (Sigma, St. Louis, MO) a označeny čtyřhodinovým pulzem v 20 mCi/ml ³⁵S-Cys-³⁵S-Met. Po 4 hodinách byly buňky a supernatant odebrány. Buňky byly lyzovány v podstatě jak je popsáno

v Lenk a Penman, Cell 16:289-302,(1979) a 400 ml každého lyzátu a předčištěno s 50 ml staph A (Sigma, St. Louis, MO).

U vzorků z metabolicky značených buněk byla provedena radioimunoprecipitace (RIP) a to inkubací vzorků s 6 ml anti-Faktor VII polyklonálního antiséra po dobu 4 hodin. Ke každému vzorku bylo přidáno šedesát mikrolitrů promytého stafylokokového proteinu A a vzorky byly míchány 1,5 hodiny při 4 °C. Vzorky byly centrifugovány a supernatant byl odstraněn. Sedimenty byly 2x promyty pufrům 0,7 M RIPA (10 mM Tris, pH 7,4, 1% deoxycholová kyselina [Calbiochem Corp., La Jolla, CA], 1% Triton X-100, 0,1% SDS, 5 mM EDTA, 0,7 M NaCl) a 1x pufrům 0,15 M RIPA (10 mM Tris, pH 7,4, 1% deoxycholová kyselina [Calbiochem Corp., La Jolla, CA], 1% Triton X-100, 0,1% SDS, 5 mM EDTA, 0,15 M NaCl). Ke každému vzorku bylo přidáno sto mikrolitrů 1x SDS barvičky (50 mM tris-HCl, pH 6,8, 100 mM dithiothreitol, 2% SDS, 0,1% bromfenolová modř, 10% glycerol) a vzorky byly povařeny 5 min., pak následovala centrifugace, kvůli odstranění proteinu A. Padesát mikrolitrů každého vzorku bylo testováno na 10% polyakrylamidovém gelu. Výsledky ukázaly, že 9 z 10 klonů vylučovalo modifikovaný Faktor VII.

Příklad 2. Antikoagulační aktivita modifikovaného Faktoru VII

Schopnost proteinu modifikovaného Faktoru VII inhibovat krevní srážení byla měřena v jednostupňovém srážecím testu za použití původního typu Faktoru VII jako kontroly. Rekombinantní proteiny byly připraveny v podstatě tak, jak bylo popsáno výše, z buněk pěstovaných v médiu obsahujícího 5 mg/ml vitaminu K. Různá množství modifikovaného Faktoru VII (z klonu 544) nebo rekombinantního původního typu Faktoru VII byla naředěna do 100 ml 50 mM Tris pH 7,5, 0,1% hovězí sérumalbumin. Směsi byly inkubovány se 100 ml plazmy bez Faktoru VII (George King Bio-Medical Inc., Overland Park, KS) a 200 ml tromboplastinu C (Dade, Miami, FL; obsahuje tromboplastin z králíčího mozku a 11,8 mM Ca^{++}). Srážecí test byl proveden v přístroji na automatické měření doby srážení krve (MLA Electra 800, Medical Laboratories Automation, Pleasantville, NY) a srážlivost byla převedena na jednotky aktivity Faktoru VII za použití standardní křivky, zkonstruované z ředění 1:5 až 1:640 normální směsné lidské plazmy (předpokládáno, že obsahuje 1 jednotku aktivity Faktoru VII/ml; připravena spojením citrátovaného séra zdravých dárců). Při použití tohoto testu nevykazovaly preparáty modifikovaného Faktoru VII žádnou detekovatelnou koagulační aktivitu. Tabulka 2 ukazuje výsledky testu s údaji o srážlivosti pro kontrolní

(netransfekované) BHK buňky pěstované v médiu buď s nebo bez vitamínu K, pro původní typ Faktoru VII a dva izoláty z buněk, exprimujících modifikovaný Faktor VII. Aktivita Faktoru VII se projevuje zkrácením doby srážení oproti kontrolním vzorkům.

Tabulka 2

Vzorek	Ředění	Doba srážení (sekundy)
Kontrola +K	1:5	33,1
	1:10	33,4
Kontrola -K	1:5	34,3
	1:10	33,2
Původní typ Faktoru VII	1:20	19,0
	1:40	21,5
	1:80	23,3
Modifikovaný Faktor VII (#6)	1:1	33,5
Modifikovaný Faktor VII (#10)	1:1	32,5

Pro určení vlivu modifikovaného Faktoru VII na substráty plazmatického faktoru, preparáty modifikovaného Faktoru VII, rekombinantní původní typ Faktoru VII nebo nativní Faktor VII jsou inkubovány buď s Faktorem X nebo Faktorem IX a jejich inaktivace je zjišťována buď srážecím testem nebo polyakrylamidovou elektroforézou.

Příklad 3. Schopnost modifikovaného Faktoru VII vázat se k tkáňovému faktoru

Schopnost modifikovaného Faktoru VII kompetovat s původním Faktorem VII o tkáňový faktor a inhibovat tak jeho srážecí aktivitu byla zjišťována v jednostupňovém srážecím testu za přítomnosti omezeného množství tkáňového faktoru (tromboplastinu).

Doby srážení byly určovány jednostupňovým srážecím testem podobně, jak bylo popsáno v Příkladu 2. Ve směsných pokusech bylo použito omezené množství tkáňového faktoru, konstantní množství původního Faktoru VII a zvyšující se množství

variant Faktoru VII. Inhibice Faktor VII/VIIa prokoagulační aktivity by se mělo projevit prodlužováním srážecích časů u testů obsahujících zvyšující se množství změněných Faktorů VII.

Velikost aktivity Faktoru VII v testovaných vzorcích byla spočtena jako procento ze standardní křivky, jež měří aktivitu Faktoru VII v normální směsné plazmě. Standardní křivka pro aktivitu Faktoru VII byla vytvořena pomocí sériových ředění normální směsné plazmy v roztoku pufovaném fosfátem (PBS), jež byla v rozmezí 1:5 až 1:640. Pro tento účel bylo předpokládáno, že normální plazma obsahuje přibližně 500 ng/ml Faktoru VII a toto bylo pokládáno za jednu jednotku aktivity. Směs 100 ml plazmy bez Faktoru VII, 100 ml ředění plazmy a 200 ml tromboplastinu C (Dade, Miami, FL) bylo použito pro měření srážecích časů na automatickém přístroji na měření doby srážení krve MLA Electra 800. Pro stanovení standardní křivky byly výsledky vyneseny do grafu jako procenta aktivity ($1:5 = 100\%$ aktivity) oproti srážecímu času v sekundách.

Test vyžadoval, aby médium, obsahující původní a pozměněný typ Faktoru VII, mělo méně než 1 % séra. Ředění byla provedena v PBS tak, aby se srážecí časy v grafu umístily podél standardní křivky. Typické bylo minimální ředění 1:2. Konečný objem byl 100 ml. V těchto pokusech byly testovány dvě odlišné varianty lidského Faktoru VII Ser₃₄₄®Ala₃₄₄, označené jako klony „#10„ a „#6„. Výsledky sestavené v Tabulce uvedené dále ukazují, že jak se množství pozměněných Faktorů VII zvyšuje, tak se snižuje procento aktivity Faktoru VIIa.

Tabulka 3

Výsledky směsných pokusů s Ser344 → Ala variant (B4A1 (původní typ) médium bylo použito jako 100 % aktivity při 10 µl/reakci).

Ser344 → Ala klon číslo	Množství média	Množství B4A1 média	BHK kontrola*	% FVIIa aktivity
#10	10 µl	10 µl	0	70
	20 µl	10 µl	0	51
	30 µl	10 µl	0	43
	40 µl	10 µl	0	34
	50 µl	10 µl	0	28
#10 (-K) [§]	20 µl	10 µl	0	78
#6	10 µl	10 µl	0	74
	20 µl	10 µl	0	56
	30 µl	10 µl	0	46
	40 µl	10 µl	0	41
	50 µl	10 µl	0	32
	20 µl	10 µl	0	85
BHK kontrola	0	10 µl	20 µl	91
BHK kontrola (-K)	0	10 µl	20 µl	107

* Netransfekované médium

[§] Pro expresi variant Faktoru VII byly buňky pěstovány v přítomnosti vitamínu K, kromě těch, které jsou označeny „-K“.

Tyto výsledky ukazují, že varianty Faktoru VII, které mají substituci Ser₃₄₄®Ala, kompetují s nativním Faktorem VII způsobem, který je závislý na dávce v reakci a inhibují prokoagulační aktivitu nativního Faktoru VII/VIIa. Lze tedy uzavřít, že Ser₃₄₄®Ala varianta lidského Faktoru VII kompetuje s nativním lidským Faktorem VIIa a následkem toho inhibuje aktivaci Faktoru X anebo IX v lidské plazmě.

Příklad 4. Reakce Faktoru VII s PPACK

Rekombinantní faktor VII byl produkován v transfekovaných ledvinných buňkách připravených z novorozeneckých křečků. Protein byl vyčištěn a aktivován podle Thim a kol. (Biochemistry 27: 7785-7793, 1988), Brinkous a kol. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1382-1386, 1989) a Bjoem a Thim (Res. Discl. No. 269, 564, 1986), které jsou zde uvedeny v citacích. Medium z buněčných kultur bylo odebráno, filtrováno a zředěno kvůli snížení koncentrace soli. Zředěné medium pak bylo frakcionováno aniontovou výměnnou chromatografií za použití elučního pufru, obsahujícího CaCl₂. Získaná frakce Faktoru VII byla dále čištěna imunochromatografií za použití Ca-dependentní anti-Faktor VII monoklonální protilátky. Další čištění bylo provedeno za použití dvou stupňů aniontové výměnné chromatografie, kde byl Faktor VII eluován CaCl₂ a NaCl. Faktor VIIa byl získán v konečném eluátu.

Rekombinantní Faktor VIIa (1 mM) v 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, pH 7,4 byl inkubován s 20 mM PPACK (D-Phenylalanyl-Prolyl-Arginyl chloromethyl keton; Calbiochem, La Jolla, CA) po dobu 5, 20 a 60 minut. Poté byl přidán pufr obsahující chromogenní substrát S2288 (H-D-Isoleucine-L-Propyl-L-Arginine p-nitroanilide; Kabi Vitrum AB, Molndal, Sweden) tak, aby se dosáhlo 2,5-násobné zředění a tím konečné koncentrace 0,3 mM S2288. Byla měřena tvorba p-nitroanilinu a srovnána s výsledky dosaženými s neupraveným Faktorem VII jako kontrolou. Výsledky ukazují, že Faktor VIIa je za těchto reakčních podmínek asi po 60 minutách zcela inaktivován.

Příklad 5. Tvorba DEGR-Faktoru VIIa

Rekombinantní lidský Faktor VIIa byl připraven, jak je uvedeno v Příkladu 4. Rekombinantní lidský Faktor VIIa v 10 mM glycinovém pufru, pH 8,0, 10 mM CaCl₂, 50 mM NaCl, byl zředěn na koncentraci 1,5 mg/ml. K tomuto Faktoru VIIa byl přidán 10-násobný molární nadbytek Dansyl-L-Glu-Gly-Arg-chloromethylketonu, DEGRck, (Calbiochem, La Jolla, CA 92037), který byl rozpuštěn v destilované H₂O. Po 2

hodinách inkubace při 37 °C byl ke směsi přidán druhý 10-násobný molární nadbytek DEGRck a inkubováno další 2 hodiny při 37 °C. Pak byl k Faktoru VIIa přidán třetí 10-násobný molární nadbytek DEGRck a inkubováno přibližně 16 hodin při 4 °C. Vzorek DEGRck-Faktor VIIa byl rozsáhle dialyzován při 4 °C proti Tris-pufrovanému solnému roztoku (0,05 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, pH 7,5), aby byl odstraněn veškerý volný DEGRck.

Konečná směs DEGR-Faktor VIIa byla testována na přítomnost volného DEGRck pomocí pokusu s Faktorem Xa a chromogenním substrátem. Směs DEGR-Faktor VIIa byla přidána k čištěnému lidskému Faktoru Xa spolu s chromogenním substrátem S-2222. Tento substrát je specificky štěpen Faktorem Xa a nikoli Faktorem VIIa. Nevázaný DEGRck ve směsi má schopnost se vázat k Faktoru Xa a tak inhibovat jeho chromogenní aktivitu. Vychytání volného DEGRck ve směsi s Faktorem Xa vytvořilo standardní křivku pro měření hladiny volného DEGRck v roztoku proti inhibici chromogenní aktivity Faktoru Xa. Analýza směsi DEGR-Faktor VIIa ukázala, že poměr volného DEGRck DEGR-Faktor VIIa byl po rozsáhlé dialýze menší než 0,5 %, což zajišťuje, že pozorovaná inhibice DEGR-Faktorem VIIa v různých dále popisovaných pokusných systémech nebyla způsobena volným DEGRck.

Příklad 6. Tvorba Faktoru Xa na povrchu buněk hladkých svalů krys

Buňky hladkých svalů cév byly analyzovány na přítomnost povrchového tkáňového faktoru měřením schopnosti těchto buněk stimulovat přeměnu Faktoru X na Faktor Xa za použití chromogenního substrátu, který je specifický pro Faktor Xa.

Kryší buňky hladkých svalů cév (Clowes a kol., J. Clin. Invest. 93:644-651 (1994)) byly vysazeny v růstovém médiu do 96-jamkových kultivačních destiček (American Scientific Products, Chicago, IL) za použití 8000 buněk na jamku (Tabulka 4).

Tabulka 4

500 ml Eaglovo medium modifikováno dle Dulbecca (DMEM) (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD.)

10% fetální telecí sérum (Hyclone, Logan, UT.)

1 mM pyruvát sodný (Irvine, Santa Anna, CA.)

0,29 mg/ml L-glutamin (Hazelton, Lenexa, KS.)

1x PSN (100x je 5 mg/ml penicilin, 5 mg/ml streptomycin, 10 mg/ml neomycin) (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD.)

Po inkubaci 48 hodin při 37 °C bylo medium zaměněno za medium bez séra (Tabulka 5).

Tabulka 5

250 ml Eaglovo medium modifikováno dle Dulbecca (DMEM) (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD.)

250 ml Hamsovo medium F-12 (Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA)

1 mM pyruvát sodný (Irvine, Santa Anna, CA.)

0,29 mg/ml L-glutamin (Hazelton, Lenexa, KS)

20 mM transferin (JRH, Lenexa, KS.)

5 mM insulin (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD.)

16 ng selen (Aldrich, Milwaukee, WI.)

1 mg/ml hovězí sérumalbumin (Sigma, St. Louis, MO.)

Buňky byly inkubovány 72 hodin při 37 °C. Po této inkubaci bylo k buňkám přidáno buď PDGF-BB (10ng/ml) nebo 10% fetální telecí sérum, aby došlo ke stimulaci exprese tkáňového faktoru (Taubman a kol., J. Clin. Invest. 91:547-552, 1993). Paralelní soubor buněk neobdržel ani PDGF ani sérum, kvůli zjištění vnitřní aktivity nestimulovaných buněk. Po 6-hodinové inkubaci byl k buňkám přidán rekombinantní lidský Faktor VIIa v konečné koncentraci 10 nM. K jednomu souboru buněk nebyl Faktor VIIa přidán – tento soubor byl použit jako negativní kontrola. Buňky byly inkubovány 2 hodiny při 37 °C a promyty HEPES puforem (10 mM HEPES, 137 mM NaCl, 4 mM KCL, 5 mM CaCl₂, 11 mM glukóza, 0,1% hovězí sérumalbumin). Po promytí byly buňky inkubovány 5 min. s 50 ml (na kultivační jamku) 200 nM lidského Faktoru X (izolovaného z plazmy) v Tris-pufrovaném solném roztoku doplněném 5 mM CaCl₂. Ke každé kultivační jamce bylo přidáno 25 µl 0,5 M EDTA a 25 ml 800 mM roztoku chromogenního substrátu S-2222 (Kabi Pharmacia, Franklin, OH.). Plotny byly inkubovány 40 min. při teplotě místnosti a poté analyzovány při 405 nm na přístroji na odečítání mikrodestiček THERMOMAX (Molecular Devices, Menlo Park, CA).

Tabulka 6 ukazuje zvýšení absorbance u buněk, na které bylo působeno Faktorem VIIa, ve srovnání s kontrolními buňkami (nepřidán Faktor VIIa). Zvýšení absorbance je přímou mírou úrovně Faktoru X, tvořeného v buňkách a jeho následného štěpení chromogenního substrátu, při kterém je uvolňován chromofor. Údaje také ukazují, že úroveň chromogenní aktivity v buňkách, na které se předem působilo buď PDGF-BB nebo 10% fetálním telecím sérem, byla vyšší, než u nestimulovaných buněk.

Tabulka 6

Testovaný vzorek	OD ₄₀₅
Kontrola	0,043
Vnitřní aktivita	0,247
PDGF-BB	0,360
10% hovězí fetální sérum	0,342

Tyto výsledky jasně ukazují, že aktivace Faktoru X na Faktor Xa na povrchu buněk hladkých svalů cév u krys je závislá na Faktoru VIIa.

Příklad 7: Inhibice chromogenní aktivity na buněčném povrchu pomocí DEGR-Faktoru VIIa

Kryší hladké svalové buňky cév byly nasazeny v růstovém médiu do 96-jamkových kultivačních destiček, jak bylo popsáno výše. Buňky byly pěstovány 72 hodin v médiu bez séra, jak bylo popsáno výše a potom k nim bylo přidáno na 6 hodin 10% fetální telecí sérum, aby došlo k stimulaci exprese tkáňového faktoru. Po stimulaci byl přidán ke každé kultivační jamce buď pouze pufr (kontrola), 10 nM Faktor VIIa, nebo 10 nM Faktor VIIa+100 nM DEGR-Faktor VIIa. Buňky byly inkubovány 2 hodiny při 37 °C a poté promyty HEPES puforem. Po promytí byly buňky inkubovány 5 min. s 50 ml (na kultivační jamku) 200 nM lidského Faktoru X (izolovaného z plazmy) v Tris-pufrovaném solném roztoku doplněném 5 mM CaCl₂. Ke každé kultivační jamce bylo přidáno 25 µl 0,5 M EDTA a 25 ml S-2222 (800 mM) chromogenního substrátu (Kabi Pharmacia). Buňky byly inkubovány 40 min. při teplotě místnosti. Chromogenní aktivita byla analyzována při 405 nm jak bylo popsáno výše.

Tabulka 7 ukazuje stimulaci chromogenní aktivity v buňkách, na které bylo působeno pouze Faktorem VIIa, a naopak inhibici této stimulace, když byl s Faktorem VIIa společně inkubován DEGR-Faktor VIIa. Tyto výsledky ukazují, že DEGR-Faktor VIIa působí jako kompetitivní inhibitor pro vazbu Faktoru VIIa, tudíž inhibuje aktivaci Faktoru X na Faktor Xa a následné štěpení chromogenu S-2222.

Tabulka 7

Testovaný vzorek	OD ₄₀₅
Kontrola	0,035
Faktor VIIa	0,342
Faktor VIIa + DEGR-Faktor VIIa	0,073

Příklad 8. Závislost inhibice chromogenní aktivity na buněčném povrchu svalových buněk hladkých svalů krys na dávce podaného DEGR-Faktoru VIIa

Hladké svalové buňky cév krys byly nasazeny v růstovém médiu do 96-jamkových kultivačních destiček (4000 buněk/jamku) v růstovém médiu doplněném 1% fetálním telecím sérem (jako v Tabulce 4 bez 10% fetálního telecího séra). Po pěti dnech bylo médium odebráno a k buňkám přidány buď zvyšující se koncentrace samotného Faktoru VIIa, nebo 10 nM Faktor VIIa se zvyšujícími se koncentracemi DEGR-Faktoru VIIa. Buňky byly se směsemi Faktoru VIIa inkubovány 2 hodiny při 37 °C. Po inkubaci byly buňky promyty a inkubovány s 50 ml 200 nM Faktoru X v Tris-pufrovaném solném roztoku 5 min. při teplotě místnosti. Ke každé kultivační jamce bylo přidáno 25 ml 0,5 M EDTA a 25 ml 800 mM S-2222 (Kabi Pharmacia) a destičky byly inkubovány 40 min. při teplotě místnosti. Chromogenní aktivita byla analyzována při 405 nm na přístroji na odečítání mikrodestiček, jak bylo popsáno výše.

Tabulka 8 ukazuje zvyšování chromogenní aktivity, závislé na zvyšující se dávce Faktoru VIIa, přidaného do kultivačních jamek. Když byla k buňkám přidána směs DEGR-Faktoru VIIa s 100 nM Faktoru VIIa (Tabulka 9), byla zřejmá inhibice chromogenní aktivity, závisící na podané dávce. Při molárním poměru 1:1 DEGR-Faktor VIIa:Faktor VIIa bylo inhibováno přibližně 95% chromogenní aktivity. Tyto údaje

naznačují, že při tomto pokusném uspořádání má DEGR-Faktor VIIa podstatně vyšší afinitu k tkáňovému faktoru na povrchu buněk, než nativní Faktor VIIa v kulturách buněk hladkých svalů. Pokud by DEGR-Faktor VIIa a Faktor VIIa měly stejnou afinitu pro vazbu tkáňového faktoru, pak by úroveň inhibice, která je pozorována při přidání stejného molárního poměru těchto dvou molekul k buňkám, neměla být tak vysoká.

Tabulka 8

Koncentrace Faktoru VIIa (nM)	OD ₄₀₅
0,10	0,005
0,39	0,025
1,56	0,058
6,25	0,111
65,00	0,154
100,00	0,208

Tabulka 9 ukazuje závislost inhibice chromogenní aktivity Faktoru Xa na buněčném povrchu v kulturách buněk hladkých svalů na dávce DEGR-Faktoru VIIa. Zvyšující se koncentrace DEGR-Faktoru VIIa byly inkubovány společně s 100 nM Faktoru VIIa a chromogenní aktivita Faktoru Xa byla určena za použití chromogenního substrátu S-2222.

Tabulka 9

Konc. DEGR-Faktoru VIIa (nM)	OD ₄₀₅
0,10	0,208
0,39	0,176
1,56	0,116
6,25	0,073
65,00	0,026
100,00	0,014

Příklad 9. Závislost inhibice tvorby Faktoru Xa pomocí DEGR-Faktoru VIIa při testování rozpustného tkáňového faktoru

Přeměna Faktoru X na Faktor Xa pomocí čistěného rekombinantního rozpustného tkáňového faktoru byla stanovena pomocí chromogenního testu. Tkáňový faktor byl exprimován a vyčištěn z *Saccharomyces cerevisiae* (Shigematsu a kol., J. Biol. Chem. 267:21329-21337, 1992). Rozpustný tkáňový faktor byl čištěn a charakterizován Dr. W. Kisielem (University of New Mexico). Byla připravena reakční směs obsahující 65,9 ml rozpustného tkáňového faktoru (2,2 mM), 29,0 ml PCPS (1 mM, Sigma, ST. Louis, MO), 29,5 ml lidského Faktoru X (4,1 mM), 2,77 ml Hanksova pufru (25 mM Tris, pH 7,4, 150 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 5 mM CaCl₂, 0,1% hovězí sérumalbumin). Čtyřicet μ l směsi tkáňový faktor/Faktor X, 25 ml Faktoru VIIa zředěného v TBS a 25 ml DEGR-Faktor VIIa zředěného v TBS bylo přidáno ke každé kultivační jamce v 96-jamkové mikrotitrační destičce. Rovněž byla zahrnuta kontrola používající 40 μ l směsi tkáňový faktor/Faktor X; 25 ml Faktor VIIa zředěného v TBS a 25 ml TBS. Deset mikrolitrů chromogenního substrátu S-2222 (4 mM) bylo přidáno k reakční směsi v kultivačních jamkách a inkubováno při teplotě místnosti 2 až 10 min.. Výsledky byly analyzovány při 405 nm na přístroji na odečítání mikrodestiček, jak bylo popsáno výše.

Standardní křivka pro aktivaci Faktoru X Faktorem VIIa byla stanovena za použití zvyšujících se koncentrací Faktoru VIIa přidávaného v nepřítomnosti DEGR-Faktoru VIIa. Výsledky uvedené v Tabulce 10 ukazují, že existuje zvyšování

chromogenní aktivity, závislé na zvyšující se dávce Faktoru VIIa, přidaného do reakční směsi. Současné přidání různých množství DEGR-Faktoru VIIa a 100 nM Faktoru VIIa vedlo k dávkově závislému snižování chromogenní aktivity (Tabulka 11). Tyto údaje ukazují, že DEGR-Faktor VIIa působí jako kompetitivní inhibitor vazby nativního Faktoru VIIa k rozpustnému tkáňovému faktoru a tedy inhibuje tvorbu Faktoru Xa, což se projevilo naměřeným snížením chromogenní aktivity pro chromogenní substrát S-2222.

Tabulka 10

Stimulační chromogenní aktivity Faktoru Xa zvyšujícími se koncentracemi Faktoru VIIa, přidanému k rozpustnému tkáňovému faktoru. Změny v optické densitě byly měřeny za použití chromogenního substrátu S-2222.

Koncentrace Faktoru VIIa (nM)	OD ₄₀₅
0,78	0,168
1,56	0,288
3,12	0,478
6,25	0,694
12,50	0,764
25,00	0,790
50,00	0,738
100,00	0,770

Tabulka 11

Zde je měřena inhibice chromogenní aktivity Faktoru Xa přidáním DEGR-Faktoru VIIa k rozpustnému tkáňovému faktoru za přítomnosti nativního Faktoru VIIa. Změny v optické densitě byly měřeny za použití chromogenního substrátu S-2222.

Konc. DEGR-Faktoru VIIa (nM)	OD ₄₀₅
0	0,810
50	0,750
100	0,609
200	0,296
400	0,167
800	0,083
1600	0,055

Příklad 10. Inhibice koagulace působením DEGR-Faktoru VIIa

Standardní srážecí pokusy, zjišťující vliv DEGR-Faktoru VIIa na srážlivost, byly připraveny takto: 100 ml normální paviání plazmy, odebrané s citrátem sodným jako antikoagulačním prostředkem, bylo přidáno k 100 ml různých koncentrací DEGR-Faktoru VIIa, zředěného v TBS (20 mM Tris, pH 7,4, 150 mM NaCl). Vzorky byly smíchány, krátce inkubovány při 37 °C a poté vloženy do přístroje na automatické měření doby srážení krve Electra 800 (Medical Laboratories Automation, Pleasantville, NY). Po inkubaci bylo k preparátům DEGR-Faktoru VIIa přidáno 200 ml preparátu tkáňového faktoru, obsahujícího 25 mM CaCl₂. Preparát tkáňového faktoru byl připraven jako extrakt ve fyziologickém roztoku z čerstvě zmražené tkáně paviáního mozku a byla zjišťována jeho schopnost iniciovat koagulaci paviání plazmy. Byla vybrána taková koncentrace tkáňového faktoru, která dávala dobu srážení asi 40 sekund.

Údaje uvedené v Tabulce 12 ukazují zvyšování doby srážení v závislosti na dávce přidaného DEGR-Faktoru VIIa. Dávka asi 1 mg/ml DEGR-Faktoru VIIa v plazmě má za následek zřetelné zvýšení doby srážení.

Tabulka 12
Závislost doby srážení na dávce DEGR-Faktoru VIIa.

Konc. DEGR-Faktoru VIIa ($\mu\text{g/ml}$ plazmy)	Doba srážení (sekundy)
0	40,7
0,5	46,2
1,0	50,8
2,5	64,5
5,0	108,1
10,0	158,4

Příklad 11. Inhibice shlukování krevních destiček působením DEGR-Faktoru VIIa

U nižších primátů byla testována schopnost DEGR-Faktoru VIIa inhibovat shlukování krevních destiček na místech arteriální trombózy, způsobené mechanickým poraněním. Byl použit model vynětí části tepny u pavíánů, jak bylo popsáno u Lumsden a kol. (Blood 81:1762-1770 (1993)). Úsek aorty dlouhý asi 1 až 2 cm byl vyjmut, obrácen a oškrábán, aby byla odstraněna vnitřní vrstva arteriální stěny a přibližně 50 % střední vrstvy. Tepna byla obrácena zpět do správné orientace, na obou koncích byla zavedena kanyla, a umístěna pavíánovi jako mimotělní odbočka. Mechanicky poškozená tepna tedy byla vystavena krvi pavíána při jejím průchodu odbočkou. Těsně před otevřením odbočky pro průtok krve byly zvířeti injekčně podány autologní krevní destičky značené ^{111}In . Úroveň shlukování krevních destiček na místě poraněné tepny byla v reálném čase zaznamenávána gamma kamerou.

Vliv DEGR-Faktor VIIa na inhibici shlukování krevních destiček byl hodnocen po injekčním podání DEGR-Faktoru VIIa nebo fyziologického roztoku (jako kontroly), které

byly podány těsně před otevřením odbočky. Poraněné tepny byly nepřetržitě měřeny po dobu 60 min. Dávka DEGR-Faktoru VIIa 0,005 mg/kg inhibovala shlukování krevních destiček. Při injekčním podání 1,0 mg/kg bylo shlukování krevních destiček přibližně z 90 % inhibováno 60 min. po podání látky. Tyto výsledky jsou ukázány na Obr. 2.

Uvedené údaje ukazují, že v tomto modelu akutního cévního poškození u nižších primátů, může inhibice tkáňového faktoru DEGR-Faktorem VIIa významně zamezovat tvorbě krevních sraženin bohatých krevními destičkami v cévách.

Příklad 12. DEGR-FVIIa inhibuje opětné zúžení cév po operaci cév u atherosklerotických králíků.

Byla hodnocena schopnost DEGR-FVIIa zmírnit vývoj poranění, vzniklých při operaci cév u novozélandských bílých (NZW) atherosklerotických králíků. Tento zvířecí model byl dobře prostudován a ukázal se být vhodný pro hodnocení vlivu anti-thrombotických látek na vývoj cévních poranění (Gimple a kol., *Circulation* 86:1536-1546 (1992) a Rogosta a kol., *Circulation* 89:1262-1271 (1994)). Zvířecí model, použitý k testování DEGR-FVIIa se v podstatě shoduje s Rogosta a kol., tamtéž.

Anestézie byla u králíků navozena intramuskulární injekcí 5 mg/kg xylazinu a 35 mg/kg ketaminu. Proximální stehenní tepny byly odkryty řezem pod tříselným vazem, podvázány a na obou koncích byly zavedeny kanyly. Jehlou byl vytvořen otvor a izolované segmenty byly promyty fyziologickým roztokem, aby byl odstraněn zbytek krve a vysušeny proudem vzduchu při rychlosti 80 ml/min. po dobu 8 min. Po sušení vzduchem byly izolované segmenty znovu propláchnuty fyziologickým roztokem a odstraněno podvázání. Krevní oběh byl udržován místním tlakem. Úseky byly vyznačeny kovovými svorkami. Místní křeče byly léčeny místním podáváním 1% Xylokainu. Den po operaci byla zvířatům nasazena dieta obsahující 1 % cholesterolu a 6 % oleje podzemnice olejné na dobu 1 měsíce, až do operace tepen pomocí balónkového katétru. Pro potlačení pooperační bolesti byl podáván orálně Tylenol v dávce 10 mg/ml během 3. až 5. dne po operaci. Ambipen v dávce 1cc byl podáván během 3. až 5. dne po operaci.

Test podávání léků zvířatům spočíval v podání počáteční injekce bezprostředně před operací pomocí balónkového katétru, následované kontinuální systémovou infuzí pomocí osmotické pumpy přes vnitřní krční žílu. Infuze léku trvala 3 dny. Kontrolním zvířatům byl před operací pomocí balónkového katétru podán heparin v dávce 150

jednotek/kg, následován infuzí fyziologického roztoku. Zvířata léčená DEGR-FVIIa dostala injekci 1 mg/kg a poté následovala infuze 50 mg/kg/hodinu.

Pro umístění osmotické pumpy pro kontinuální systémovou infuzi byla navozena anestézie, jak je popsáno výše, a udržována po dobu procedury dalšími intramuskulárními injekcemi ketaminu a Xylazinu. Řezem podél střední linie krku byla odkryta pravá vnitřní krční žíla, izolována příčným odříznutím a vzdálenější konec byl podvázán. Do pravé vnitřní krční žíly byla zavedena trubice (PE 160). Byl vytvořen podkožní tunel pro vedení této trubice. Trubice byla spojena s osmotickou pumpou, která byla implantována pod kůži na zádech králíka. Pravá krční tepna byla izolována příčným oddělením a vzdálenější konec byl podvázán. Do tepny byl umístěn 5F zaváděč a posunut ke spojení srdečnicového oblouku. Byla odebírána krev pro měření hemostatických parametrů, léků a hladiny cholesterolu. Dvacet miligramů xylokainu bylo aplikováno intraarteriálně. Kontrolní angiogram stehenní aorty byl proveden pomocí 5F Bermanova katétru, umístěného nad rozvětvením aorty za pomoci 3 až 4 ml renografinu, injikovaného ručně po 3 sekundách.

Po odstranění Bermanova katétru byl do sestupné aorty zaveden 0,014 palcový vodící drát a umístěn nad rozvětvením aorty. Za fluoroskopické kontroly byl zaveden angioplastický balónkový katétr vhodné velikosti 2 až 2,5 mm, veden pomocí vodícího drátu a umístěn do zúžení. Balónek byl ručně nafouknut na 6 atmosfér po dobu 60 sekund. Byla provedena 3 nafouknutí, mezi nimiž byly 60 sekundové intervaly. Tato procedura byla provedena u každého zvířete v obou stehenních tepnách.

Po roztažení pomocí balónku byl angioplastický katétr odstraněn a Bermanův katétr znovu uveden do pozice 3 cm nad rozvětvením aorty. Pro minimalizaci křečí bylo intraarteriálně podáno 20 mg lidokainu. Angiogram po proceduře byl proveden, jak bylo popsáno výše. Jednocentimetrový rastr byl umístěn na úrovni stehenní tepny, aby bylo možno vypočítat skutečný průměr. Katétr byl pak odstraněn. Pravá krční tepna pak byla podvázána 3-0 hedvábím a rána sešita. Ambipen a acetaminofen byly podávány, jak bylo popsáno výše.

Protrombinový čas a koncentrace DEGR-FVIIa v krvi byly měřeny bezprostředně před injekcí testovaných látek, 1 hodinu po injekci a po 3 dnech na konci kontinuální infuze. Byly odebrány jeden až dva mililitry plazmy do citrátu a změřeny protrombinové časy a hladiny antigenů.

Standardní test srážlivosti byl použit ke sledování protrombinového času jak v kontrolních zvířatech, tak v zvířatech léčených DEGR-FVIIa. Test byl proveden takto:

Dvacet pět mikrolitrů králičí plazmy odebrané s citrátem sodným jako antikoagulačním prostředkem, bylo přidáno k 150 ml TBS (20 mM Tris, pH 7,4, 150 mM NaCl). Vzorky byly promíchány a umístěny v automatickém přístroji na měření doby srážení krve Electra 800 (Medical Laboratories Automation, Pleasantville, NY). Po inkubaci bylo k preparátům přidáno 200 ml přípravku thromboplastin (Sigma Chemical), obsahujícího 25 mM CaCl_2 . Byla vybrána taková koncentrace thromboplastinu, která způsobovala u kontrolní králičí plazmy dobu srážení přibližně 20 sekund.

Pro určení koncentrace DEGR-FVIIa ve vzorcích plazmy z kontrolních a z DEGR-FVIIa léčených zvířat byl použit ELISA test. V pokusu se napřed naředí protilidská FVIIa monoklonální protilátka (Dr. W. Kisiel, U. of New Mexico) na koncentraci 2,0 mg/ml v 0,1 M uhličitanovém pufru pH 9,6 a rozplní po 100 ml/buňku v 96-jamkových destičkách. Destičky byly pak inkubovány při 4 °C přes noc a poté dvakrát promyty promývacím pufrem (PBS, pH 7,4, obsahující 0,05% Tween 20). Blokování nespecifických vazebných míst bylo dosaženo přidáním 200 ml blokujícího pufru na jamku (PBS, pH 7,4, obsahující 0,05% Tween 20 a 1% hovězí sérumalbumin), inkubováno 2 hodiny při 37 °C a poté promyto promývacím pufrem.

Po blokování byla přidána standardní série ředění DEGR-FVIIa v rozsahu 20 až 0,027 ng/ml, spolu se sérií ředění testované králičí plazmy (1:100 až 1:4000 v blokujícím pufru) v množství 100 ml/jamku. Plazma neimunizovaných králíků byla použita jako negativní kontrola. Destičky byly inkubovány 1 hodinu při 37 °C a následovala 4 promytí promývacím pufrem.

DEGR-FVIIa byl detekován přidáním 100 ml/jamku ředění 1:1000 králičí protilidské FVII, polyklonální protilátky (Dr. W. Kisiel, U. of New Mexico) v blokujícím pufru. Destičky byly inkubovány 1 hodinu při 37 °C a následovalo 5 promytí promývacím pufrem. Vazba specifických protilátek byla detekována za použití 100 ml/jamku ředění 1:2000 kozího proti-králičího konjugátu IgG protilátka-peroxidáza (Tago, Inc). Destičky byly inkubovány 1 hodinu při 37 °C a poté šestkrát promyty promývacím pufrem. Nakonec bylo přidáno 100 ml roztoku substrátu (0,42 mg/ml o-fenylendiamin dichloridu (OPD) v 0,2 M citrátovém pufru, pH 5,0, obsahující 0,3% H_2O_2). Po 1 až 3 min. inkubace při teplotě místnosti byla barevná reakce zastavena přidáním 100 ml/jamku 1 N H_2SO_4 a destičky byly odečteny při 490 nm na spektrofotometru. Koncentrace DEGR-FVIIa ve vzorcích plazmy byla určena porovnáním hodnot A_{490} neznámého vzorku a DEGR-FVIIa standardní křivky.

Analýza protrombinových časů a hladin DEGR-FVIIa antigenu u vzorků plazmy je uvedena v Tabulkách 13 a 14. Jsou uvedeny údaje pro každého testované zvíře. Tabulka 15 ukazuje souhrn průměrných dob srážení. Ve všech případech, zvířata léčená DEGR-FVIIa měla 1 hodinu po obdržení injekce zvýšené protrombinové časy, které se však po třech dnech snížily téměř na úroveň před započítím pokusu. Analýza hladin DEGR-FVIIa antigenu také ukázala vysokou úroveň DEGR-FVIIa v plazmě 1 hodinu po obdržení injekce (v rozsahu 2 až 6 mg/ml plazmy), zatímco po třech dnech byly zjištěny mnohem nižší hladiny. Hladiny DEGR-FVIIa naměřené 1 hodinu po injekci odpovídaly předpověděnému zvýšení protrombinového času, zjištěnému ve standardním *in vitro* ředícím tromboplastinovém testu po přidání DEGR-FVIIa do normální králičí plazmy.

Tabulka 13				
Měření protrombinových časů				
		Doba srážení (sekundy)		
Zvíře číslo	Léčba	Před testem	1 hodina	3 dny
73	Kontrola	24,8	22,3	17,8
74	Kontrola	24,8	27,9	18,6
75	Kontrola	24,6	N/D	20,5
76	Kontrola	22	N/D	17,9
169	Kontrola	21,2	22,9	22
170	Kontrola	24,9	23,5	18,6
173	Kontrola	25,9	21	20,8
174	Kontrola	25	29,4	20,1
77	DEGR-FVIIa	22,5	40,1	18,3
78	DEGR-FVIIa	24,3	34	20,9
80	DEGR-FVIIa	24,7	50	21,7
96	DEGR-FVIIa	N/A	N/A	21
97	DEGR-FVIIa	23,6	33,3	21,2
171	DEGR-FVIIa	20,6	45,8	21,9
172	DEGR-FVIIa	23,5	41,6	22,4

N/A – údaje nezískány

Tabulka 14				
Detekce DEGR-FVIIa v králičí plazmě ELIZA-testem				
		FVIIa ELISA (ng/ml)		
Zvíře číslo	Léčba	Před testem	1 hodina	3 dny
73	Kontrola	0	13	0
74	Kontrola	36	14	4
75	Kontrola	0	N/A	9
76	Kontrola	0	N/A	14
169	Kontrola	0	0	1
170	Kontrola	0	0	0
173	Kontrola	36	31	0
174	Kontrola	87	86	160
77	DEGR-FVIIa	0	3,210	102
78	DEGR-FVIIa	1	4,950	7
80	DEGR-FVIIa	13	4,543	661
96	DEGR-FVIIa	65	4,900	117
97	DEGR-FVIIa	4	4,600	502
171	DEGR-FVIIa	13	2,145	212
172	DEGR-FVIIa	9	2,830	228

N/A – údaje nezískány

Tabulka 15. Statistický souhrn průměrných dob srážení.

Nepárový t-test X:

Před pokusem

DF:	Nepárová t-hodnota	Pravděpodobnost
12	1,12	0,2852

Skupina:	Počet:	Průměr:	Standardní odchylka:	Standardní chyba:
Kontrola	8	24,15	1,64	0,58
DEGR-VIIa	6	23,2	1,48	0,60

Nepárový t-test X:

1 hodina po operaci cév

DF:	Nepárová t-hodnota	Pravděpodobnost
10	-5,44	0,0003

Skupina:	Počet:	Průměr:	Standardní odchylka:	Standardní chyba:
Kontrola	6	24,5	3,35	1,37
DEGR-VIIa	6	40,8	6,53	1,67

Nepárový t-test X:

3 dny po operaci cév

DF:	Nepárová t-hodnota	Pravděpodobnost
10	-2,04	0,0622

Skupina:	Počet:	Průměr:	Standardní odchylka:	Standardní chyba:
Kontrola	8	19,54	1,53	0,54
DEGR-VIIa	7	21,06	1,33	0,50

Tři týdny po operaci cév byl opětne pořízen angiogram již dříve popsáním způsobem přes levou krční tepnu, bezprostředně před usmrcením zvířete. Vertikálním

břišním řezem byla izolována koncová část aorty, podvázána a nad rozvětvení aorty byla umístěna promývací kanyla. Koncová část aorty byla promyta 50 ml fyziologického roztoku, poté *in vivo* fixována 500 ml roztoku Histochoice (AMRESCO, Solon, OH), aplikovaného po dobu 15 min. při tlaku 120 mm Hg. Při započetí promývání byla zvířata usmrcena předávkováním nembutalem (3 ml pentobarbitalu sodného IV, 65 mg/ml). Byl vyříznut pět centimetrů dlouhý úsek stehenní tepny a uchován v roztoku Histochoice pro světelnou mikroskopii.

Aby byl zjištěn vývoj poškození na vnitřní stěně cévy v místě angioplastiky pomocí balónku, vyříznuté stehenní tepny byly rozřezány na 3 mm segmenty, zality do parafínu a byly pořízeny řezy z mnoha oblastí každé tepny. Řezy byly montovány na mikroskopická sklíčka, barveny hematoxylinem, eosinem a van Giemsovým barvivem. Morfometrická analýza byla provedena pomocí programu Bioquant, aby byly získány plošné hodnoty pro průřez, vnitřní stěnu a střední vrstvu. Morfometrická analýza tkáňových řezů z poraněných tepen byla prováděna měřením celkové plochy průsvitu cévy; plochy vnitřní vrstvy – určena změřením oblasti uvnitř vnitřní elastické vrstvy a odečtením odpovídající plochy průsvitu pro každý tkáňový řez; a plochy střední vrstvy - určena změřením oblasti uvnitř vnější elastické vrstvy a odečtením odpovídající plochy uvnitř vnitřní elastické vrstvy. Měření poškození na vnitřní stěně stehenních cév u kontrolních zvířat a zvířat léčených DEGR-FVIIa ukázala, že se významně snížila velikost vnitřní stěny u zvířat léčených DEGR-FVIIa (Tabulka 16). Naopak měření střední vrstvy neukázala žádné významné rozdíly mezi oběma skupinami.

Tabulka 16: Měření vnitřní a střední vrstvy cév u králíků po zákroku pomocí balónkového katétru				
skupina	počet	vnitřní stěna (mm ²)	standardní odchylka	pravděpodobnost
kontroly	13	0,819	0,414	0,0138
DEGR-FVIIa	10	0,438	0,192	
skupina	počet	střední vrstva (mm ²)	standardní odchylka	pravděpodobnost
kontroly	13	0,389	0,098	0,172
DEGR-FVIIa	10	0,329	0,105	

Údaje z angiografických měření jsou uvedeny v Tabulce 17 jako střední průměr průřezu (Mean Luminal Diameter – MLD) +/- standardní odchylka pro kontrolní a DEGR-FVIIa léčená zvířata pro všechny tři časové okamžiky: bezprostředně před cévní operací, bezprostředně po cévní operaci a 21 dní po cévní operaci. Neprokázaly se významné rozdíly mezi MLD u kontrolních a DEGR-FVIIa léčených zvířat ani bezprostředně před cévní operací ani bezprostředně po ní. Významné zvýšení MLD však bylo pozorováno u DEGR-FVIIa léčených zvířat 21 dní po cévní operaci.

Tabulka 17: Měření minimálního průměru průřezu (MLD)				
Měření MLD před operací				
skupina	počet	střední MLD	standardní odchylka	pravděpodobnost
kontroly	13	1,202	0,24	0,3883
DEGR-FVIIa	10	1,283	0,19	
Měření MLD po operaci				
skupina	počet	střední MLD	standardní odchylka	pravděpodobnost
kontroly	13	1,492	0,551	0,5326
DEGR-FVIIa	10	1,323	0,725	
Měření MLD 21 dní po operaci				
skupina	počet	střední MLD	standardní odchylka	pravděpodobnost
kontroly	13	0,889	0,228	0,0001
DEGR-FVIIa	10	1,393	0,242	

Příklad 13. Inhibice tvorby Faktoru Xa vlivem DEGR-Faktorů VIIa na povrchu paviáních hladkých svalových buněk (SMCs).

Byl vyvinut chromogenní test na buněčném povrchu, v podstatě jak bylo popsáno výše v Příkladu 8, aby bylo možno měřit účinnost s jakou DEGR-FVIIa blokuje vazbu Faktoru VIIa na tkáňový faktor na buněčném povrchu a následnou konverzi Faktoru X na Faktor Xa na jednovrstevných tkáňových kulturách paviáních hladkých svalových buněk (SMCs). Tato metoda je modifikací metody popsané Sakai a kol., J. Biol. Chem. 264:9980-9988 (1989) a Wildgoose a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:7290-7294 (1990). Paviáni SMCs byly získány z University of Washington, Seattle, WA a byly pěstovány z explantátů aorty. Paviáni SMCs byly vysety do 96-jamkových kultivačních destiček při použití koncentrace 8000 buněk/jamku v 200 ml/jamku DMEM

kultivačního média, doplněného 10 % fetálního telecího séra a udržovány v tomto médiu 4 dny při 37 °C v 5 % CO₂. Při pokusu bylo odebráno 110 ml média a do jamek byly přidány zvyšující se koncentrace FVIIa nebo FVIIa v kombinaci s DEGR-FVIIa. Byla sestrojena standardní křivka pro koncentraci FVIIa v rozsahu 5 nM až 0,04 nM. Pro změření inhibiční aktivity DEGR-FVIIa na aktivitu FVIIa, byly do testovacích jamek přidány zvyšující se koncentrace DEGR-FVIIa v přítomnosti konstantního množství FVIIa (5 nM). Jak FVIIa tak DEGR-FVIIa byly ředěny v HEPES pufru (10 mM HEPES, 137 mM NaCl, 4 mM KCl, 5 mM CaCl₂, 11 mM glukóza, 0,1 % hovězí sérumalbumin) a 10 ml 10-krát koncentrovaného zásobního roztoku bylo přidáno k buňkám. Buňky byly inkubovány s testovanými látkami 2 hodiny při 37 °C a poté 3-krát promyty HEPES pufrem. Padesát mikrolitrů 200 nM roztoku Faktoru X v trisovém pufru (25 mM Tris, pH 7,4, 150 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 5 mM CaCl₂, 0,1 % hovězí sérumalbumin) bylo pak přidáno ke každé jamce. Po 4 min. při teplotě místnosti bylo přidáno 25 ml 0,5 M EDTA, aby byla zastavena konverze Faktoru X na Faktor Xa. Ke každé jamce bylo přidáno 25 µl 0,8 mM S-2222 v trisovém pufru, chromogenního substrátu specifického pro Faktor Xa, a po 60 min. byla odečtena absorbance při 405 nM na přístroji na odečítání mikrodětiček THERMOMAX (Molecular Devices, Menlo Park, CA).

Výsledky, uvedené v Obr. 3 ukazují dávkovou závislost zvyšování amidolytické aktivity u buněčných kultur, ke kterým byl přidán Faktor VIIa (prázdné čtverečky). Zvýšení absorbance je přímo úměrné úrovni Faktoru Xa tvořeného v buňkách, a jím zprostředkovanému štěpení chromogenního substrátu. Po přidání zvyšujících se množství DEGR-Faktoru VIIa spolu s konstantním množstvím FVIIa (5 nM) nastává snižování amidolytické aktivity, nepřímo úměrné zvyšující se úrovni DEGR-Faktoru VIIa (plné čtverečky). Stejný molární poměr DEGR-FVIIa a FVIIa inhibuje >90 % chromogenní aktivity. Dokonce ještě při 10-násobně nižší úrovni DEGR-FVIIa trvá stále 40 % inhibice tvorby chromogenní aktivity Faktoru Xa. Tyto výsledky podporují závěr, že DEGR-FVIIa je extrémě účinný inhibitor aktivace Faktor X na Faktor Xa na povrchu intaktních jednovrstevných kultur SMCs.

Příklad 14. Vliv DEGR-Faktoru VIIa na tvorbu cévní sraženiny a cévních poranění u pavíánů.

U lidského DEGR-Faktoru VIIa byla testována schopnost inhibovat u tkáňového faktoru (TF) a u aktivovaného Faktoru VII (FVIIa) zprostředkování tvorby cévních

poranění (vascular lesion formation – VLF), které byly indukovány mechanickým poškozením cévy u nižších primátů.

Bezprostředně před vytvořením mechanických cévních poranění u pavíánů, jim byl podáván infúzně DEGR-Faktor VIIa po dobu 7 dní (5 zvířat) nebo 30 dní (1 zvíře). Měření tvorby cévních poranění byla provedena 30. den. Výsledky u pěti léčených zvířat byly srovnány s nálezy u pěti kontrol, kterým byl infúzně podáván pouze příslušný pufr.

Měření základních hodnot bylo získáno u studovaných živočichů pro: a) počet krevních destiček, počet neutrofilů, počet monocytů a počet červených krvinek; b) úroveň plazmatického fibrinogenu; c) úroveň aktivity plazmatických koagulačních faktorů VII, VIIa, X a V, spolu s antigenní hladinou FVII; d) základní úroveň hladiny protilátek proti Faktoru VIIa u plazmatického vzorku.

Pod anestézií a za sterilních operačních podmínek obdržela zvířata, označená autologními ¹¹¹In-krevními destičkami, intravenózní infuze DEGR-FVIIa, přičemž byl použit připevněný systém pro kontinuální intravenózní podávání (počáteční injekce 1 mg/kg, následovaná kontinuální intravenózní infuzí 50 mg/kg/hodinu). Zvířata byla podrobena chirurgickému otevření krční tepny, operaci obou pažních nebo stehenních tepen za použití Fogartova balónkového katétru.

DEGR-Faktor VIIa byl podáván po dobu 7 až 30 dní kontinuální infuzí žilním katétrem, za použití připevněného systému. Třicet dní po operaci byla zvířata uspána halothanem a podrobena *in situ* fixaci, pomocí promývání pod tlakem za použití 4% paraformaldehydu, obsahujícího 0,1 % glutaraldehyd, po dobu 30 min. Po této době byly pomocí metody Harker a kol., Circulation 83:31-44 (1991) a Hanson a kol., Hypertension 18: 18:tension_91) a Hanson a kol., _ího 0,1 % glutaraldríve poraněná místa). Vzorky byly poté fixovány in vitro (4% paraformaldehyd, obsahující 0,1 % glutaraldehyd), uchovány zmražené a zpracovány pro morfometrickou analýzu rozsahu poškození.

Bylo studováno jedenáct normálních dospělých pavíánů (*Paio anubis*). Šesti zvířatům byla podána infuze DEGR-FVIIa (50 mg/kg/hodinu) a zbylých pět byla kontrolní zvířata, která DEGR-FVIIa nedostala. Zvířata byla odčervena a tři měsíce před použitím byla pozorována, zda netrpí nějakou nemocí. Všechny procedury byly odsouhlaseny Výborem pro péči o zvířata a jejich užití v instituci a splňovaly postupy a metody Směrnice pro péči a využití laboratorních zvířat (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals), navržené NIH (National Institute of Health), rovněž tak Zákonu o

péči o zvířata (Animal Welfare Act) a podobné předpisy. Invazivní procedury byly prováděny v anestézii halothanem, po jejím navození ketaminem (10 mg/kg intramuskulárně) a valiem (0,5 mg/kg intravenózně). Pro následné krátkodobé znehybnění při pooperativním provádění experimentálních procedur byl použit hydrochlorid ketaminu (5 – 20 mg/kg intramuskulárně).

Otevření krční tepny bylo provedeno středovým krčním řezem, pomocí techniky Hanson a kol., Hypertension 18:É170-É-176 (1991) a Krupski a kol., Circulation 84:1749-1757 (1991), které jsou zde uvedeny mezi odkazy. Otevření krční tepny bylo použito jako model cévního poranění pro jeho klinickou závažnost a protože VLF, indukované otevřením normálních tepen se ukázalo být reprodukovatelné. Krátce řečeno, krční tepna byla zbavena obklopujících tkání v oblasti od klíční kosti až k jejímu rozvětvení. Tepna byla uzavřena na obou koncích exponované oblasti pomocí netraumatizujících cévních sponek tři min. po injekci heparin-sulfátu (100 U/kg intravenózně; Elkins-Simm Inc., Cherry Hill, NJ) a odříznuta 1 cm před zadní svorkou. Přední segment tepny byl poté obrácen naruby pomocí zahnuté pinzety. Po obrácení co největšího úseku byly provedeny polypropylénovou nití (7-0) dva zajišťovací stehy na každé straně v přední části, druhý pár stehů byl umístěn v zadní části na úseku s exponovaným vnitřkem cévy.

Pak bylo provedeno odstranění vnitřní stěny tepny v úseku 1 cm, počínaje 1 cm od odříznutého konce obráceného úseku cévy. Tato procedura znamenala mechanické odstranění normální vnitřní stěny cévy a částečně i střední vrstvy pomocí pinzety a chirurgického mikroskopu (32-násobné zvětšení). Po tomto odstranění vnitřní stěny tepny byla céva navracena do svého normálního postavení, provedeno sešití (7-0 polypropylénová nit) pod 2,5-násobným zvětšením a rána byla uzavřena.

Při morfometrické analýze VLF byly segmenty zalité v parafinu a s obarvenými tkáňovými pojivovými složkami (kolagen, elastin), dále obarvené hematoxylinem a eosinem, hodnoceny pomocí Ziess Photoscopu spojeného se systémem analýzy obrazu (Thomas Optical Measurement Systems, Columbus, GA), sestávajícího z mikroskopové CCD kamery o vysokém rozlišení (580 řádek), spojené s monitorem o vysokém rozlišení (700 řádek), čipem IBM 386 a s 80 MB počítačem s grafickým digitalizačním tabletem o vysokém rozlišení pro snímání a uchovávání obrazu. Kvantitativní analýza obrazu byla provedena pomocí morfometrického software (Optimas, Bioscan, Inc., Edmonds, WA). Příčné řezy tepen byly hodnoceny s ohledem na celkovou plochu proliferujících poranění v nově se tvořící vnitřní stěně cévy a na

odpovídající plochu střední vrstvy stěny tepny. Pro statistickou analýzu byla provedena porovnání mezi skupinami pomocí Studentova T-testu, pro párované a nepárované údaje.

Výsledky ukázaly, že plocha vnitřní vrstvy byla výrazně zmenšena u zvířat léčených 7 dní DEGR-Faktorem VIIa a zkoumaných ve 30. dni, ve srovnání s kontrolními zvířaty, která prodělala stejné cévní poranění, ale nebyl jim podán žádný DEGR-Faktor VIIa (Obr. 4). Podobný výsledek byl zjištěn u zvířat léčených 30 dní DEGR-Faktorem VIIa a zkoumaných ve 30. dni.

Předběžná studia s modelem balónkové angiografie pažní tepny nenaznačoval žádný měřitelný prospěšný vliv terapie pomocí DEGR-Faktoru VIIa. Tento model však, jak se ukázalo u paviánů, nebyl takovým protrombickým modelem, v němž by hrál klíčovou roli tkáňový faktor.

Studia s poškozením stehenní tepny paviánů pomocí balónku ukázaly na statisticky významný prospěšný vliv DEGR-Faktoru VIIa, ve srovnání s kontrolami, jak je ukázáno v Obr. 5.

Příklad 15. Vliv DEGR-Faktoru VIIa na tPA-indukovanou trombolýzu.

Tvorba krevní sraženiny ve věnčitých cévách během infarktu myokardu je primárně způsobena tkáňovým faktorem (TF) spolu s Faktorem VIIa v průběhu vnějšího systému srážení krve. Byl zjišťován vliv dodatečné inhibice v různých bodech koagulační kaskády zevního srážení krve na efektivitu tkáňového plazminogenového aktivátoru (tPA) trombolýzy.

Tricet šest psů s elektricky indukovanou sraženinou ve věnčitých cévách a podstupujících trombolýzu pomocí tPA (1 mg/kg během 20 min.) bylo léčeno jedním ze čtyř dodatečných postupů: 9 obdrželo protisrážlivý peptid klíštěte (tick anticoagulant peptide – TAP), selektivní inhibitor Faktoru Xa, v dávce 30 mg/kg/min. po dobu 90 min. Komplex TF-Faktor VIIa byl inhibován rekombinantním tkáňovým faktorem inhibujícím srážení (tissue factor pathway inhibitor - TFPI) v dávce 100 až 150 mg/kg/min. po dobu 90 min.) u 9 psů, a pomocí DEGR VIIa (1 až 2 mg/kg), jako kompetitivním inhibitorem aktivovaného Faktoru VIIa u 9 psů. Devět psů dostalo jakožto kontrola fyziologický roztok. Psi byli pozorováni po dobu 120 min. po trombolýze, zda dojde k opětovnému uzavření krevního průtoku. Vliv zkoumaných látek na efektivitu trombolýzy jsou ukázány dále v Tabulce 18 (je uveden průměr hodnot $\pm$ SD (standardní odchylka)).

	fyzilogický roztok	DEGR-FVIIa	TFPI	TAP
obnovení průtoku (min.)	32 ± 13	20 ± 7*	21 ± 6*	18 ± 10*
trvání průtoku (min.)	62 ± 45	70 ± 48	91 ± 35*	120
variace průtoku	70 %	89 %	56 %	0 %
opětné uzavření	70 %	78 %	67 %	0 %

* Hodnoty lišící se od fyziologického roztoku na hladině významnosti 0,05.

Uvedené údaje naznačují, že inhibici vnějšího systému srážení krve Faktorem Xa nebo TF-Faktorem VIIa je možno blokovat buď DEGR VIIa nebo TFPI a urychlit tak tPA-indukovanou trombolýzu. Selektivní inhibice Faktoru Xa efektivněji udržovalo průchodnost tepen po jejich úspěšném zprůchodnění.

Příklad 16. Modifikovaný Faktor VIIa inhibuje tvorbu nitrocévních krevních sraženin bez ovlivnění systémového krevního srážení.

Pro určení, zda inhibice vazby Faktoru VII na TF by mělo za následek protisrážlivé efekty, byly vyvolány cyklické variace průtoku (cycle flow variations – CFVs), pomocí umístění vnějšího konstriktoru kolem králíčích krčních tepen s poraněnou endoteliální vrstvou (Fottův model). Tok krve krční tepnou byl průběžně měřen Dopplerovou průtokovou sondou, umístěnou před konstriktorem. Po umístění konstriktoru kolem tepny se vyvinuly CFVs s průměrnou frekvencí 11 ± 2 cykly/hodinu u 6 králíků ze 6, zatímco rychlost průtoku krve krční tepnou v minimu CFVs činila průměrně 5 ± 2 % základní úrovně. Po 30 min. pozorování CFVs obdržela zvířata infuzi lidského rekombinantního Faktoru VIIa s blokováním aktivním místem (pomocí Phe-Phe-Arg chlormetylketonu) – FVIIai – ($0,1 \text{ mg/kg/min.}$ po dobu 10 min.). Faktor FVIIai zcela eliminoval CFVs u 6 zvířat ze 6 (frekvence CFV = 0 cyklů/hodinu; $p < 0,05$; rychlost průtoku krve krční tepnou = 106,9 % základní hodnoty; $p = \text{NS}$ vzhledem k základní hodnotě). Třicet minut po inhibici CFVs byl infúzně podán lidský

rekombinantní FVIIa v dávkách 0,1 mg/kg/min. po dobu 10 min. Infuze Faktoru VIIa obnovila CFVs u všech zvířat, což ukazuje, že vazba Faktoru VIIa k TF je kompetitivní. Protrombinové časy, doby částečné aktivace tromboplastinu a *ex vivo* agregace krevních destiček jako reakce na ADP a trombin se po infuzi FVIIa nelišily od základních hodnot. FVII-VIIa tedy hraje důležitou roli při iniciaci tvorby krevní sraženiny *in vivo*. Podání Faktoru VIIa ukázalo v tomto modelu silný protisrážlivý efekt bez ovlivnění systémového srážení.

Příklad 17. Inhibice tvorby krevní sraženiny v drobných tepnách pomocí lokální aplikace modifikovaného Faktoru VIIa.

Při cévní chirurgii, chirurgickém rekonstruování mikroskopických cév nebo replantační chirurgii bývá nejčastější příčinou neúspěchu tvorba krevní sraženiny v místech spojení. Riziko uzávěru krevní sraženinou se velmi zvyšuje, když cévy podléhají traumatu, vykazují patologické změny nebo když jsou pro spojení použity žilní segmenty. Proto se často v souvislosti s chirurgickou operací užívá zásah proti srážení krve. Látky, které jsou běžně dostupné a v těchto případech používané se podávají parenterálně (heparin, dextran) nebo orálně (ASA) a se všemi jsou spojeny vedlejší hemoragické účinky. Navíc heparin a zvláště ASA jsou při zabránění tvorby (tepenné) krevní sraženiny pouze částečně účinné. Na základě těchto nedostatků existuje potřeba zabránit tvorbě krevní sraženiny v průběhu chirurgického zákroku na cévách pomocí látky, která se váže a je účinná v oblastech spojení a místech cévního traumatu, látky, kterou je možno aplikovat lokálně a vyhnout se tak nežádoucím vedlejším systémovým účinkům. V tomto Příkladu byla pro vyvolání antitrombotického účinku použita lokální aplikace Faktoru VIIa s inaktivovaným aktivním místem na místa s tepenným traumatem, bez toho, že by souběžně vznikla tendence k zvýšenému krvácení nebo jiným hemostatickým efektům.

Metody:

Švédští králíci (samci i samice), vážící asi 3,5 kg byli krmeni standardní granulovou dietou s dostatkem vody. Před použitím k pokusu byli přinejmenším 1 týden v laboratoři pozorováni, zda netrpí nemocí.

Do okrajové ušní cévy byla králíkům zavedena kanyla a pomocí pentobarbitalu sodného (18 mg/kg) byla navozena anestézie, která byla udržována pomocí opakujících se injekcí.

Na kůži obou uší byly vytvořeny chlopně a vypreparovány 3 cm dlouhé úseky středních tepen (vnější průměr asi 1 mm). Všechny odbočky byly zašity stehy 10-0 a odstřiženy. Prostor operace byl omýván izotonickým solným roztokem a překryt tenkou plastickou fólií. Pro udržení stálého a vysokého průtoku krve a kvůli zabránění křečovitým stahům cév byla zvířata umístěna na tepelné podložky a udržována za slabě hypertermických podmínek při tělesné teplotě asi 39,5 °C (normální tělesná teplota je asi 38,5 °C), a po manipulacích byly místně aplikovány na cévy 3 kapky lidocainu 10mg/ml (po opětném obnovení průtoku a po testování průchodnosti 30 min. po opětném obnovení průtoku).

Na cévy po obou stranách byly současně umístěny dvojice mikrocévních svorek (S&T 2V, S&T Marketing Ltd., Neuhausen, Switzerland), tak aby mezi svorkami byl izolován úsek tepny dlouhý 7 mm. Bylo provedeno podélné rozříznutí tepen (7 mm), načež byly sponky přiblíženy, cévy uvedeny do správné polohy a vnitřek cévy obrácen a zploštěn, čímž se obnažily hlubší úrovně střední vrstvy cévní stěny. Řezy na tepnách byly uzavřeny spojitým jednovláknovým nylonovým 10-0 stehem (Ethilon 10-0 BV-75-3, Ethicon Ltd., Edinburgh, U.K.). Všechny chirurgické procedury byly provedeny jedním chirurgem za použití vysoce kvalitního operačního mikroskopu (Wild M-650, Leica-Heerbrugg, Heerbrugg, Switzerland).

V cévách byl obnoven průtok současným otevřením cévních svorek. Byly rychle překryty gázovými polštářky nasáklými fyziologickým roztokem a kontrolovány jedenkrát za minutu. Byl zaznamenán čas potřebný k úplnému zastavení krvácení z takového poranění tepny.

V době 30 min. a 120 min. po obnovení průtoku krve byla stanovena průchodnost cév pomocí standardního mikrochirurgického „empty/refill„ testu: cévy byly opatrně uzavřeny v místě vzdáleném od traumatické oblasti pomocí páru mikrosvorek a vyprázdněny po směru toku krve jiným párem svorek. Po uvolnění prvního páru svorek bylo hodnoceno opětné naplnění cévy krví, a cévy byly klasifikovány buď jako průchodné nebo uzavřené. Uzavřené cévy nevykazovaly opětné naplňování krví, zatímco průchodné cévy vykazovaly rychlé nebo pomalé naplňování krví, druhé jmenované byly označeny „se sníženou průchodností„. Po konečném testu průchodnosti byly cévy vystřiženy a podélně otevřeny, přičemž trombotický materiál byl vyjmut a zvážen.

Léčiva:

Rekombinantní chemicky inaktivovaný lidský Faktor VIIa (VIIa) v koncentraci 3,1 mg/ml nebo vehikulum byly uloženy ve formě 200 ml alikvotů v kódovaných ampulkách.

Experimentální protokol:

Dvacet králíků bylo ošetřeno ve slepém, náhodně uspořádaném pokusu tak, jak je popsáno dále, přičemž každý králík zároveň sloužil jako vlastní kontrola: po provedení hlubokého tepenného poškození, jak bylo popsáno výše v metodické sekci, obnažené traumatické místo na jednom uchu bylo omýváno v průběhu 5 min. roztokem VIIa (celkem 0,5 mg) a na druhém uchu vehikulem. Promývané traumatické oblasti byly ponechány inkubovat v roztoku po dobu dalších 5 min., po čemž byl veškerý přebytek roztoků opláchnut izotonickým solným roztokem. Arteriotomie byly pak uzavřeny a v cévách obnoven průtok krve.

Statistické metody:

Výsledky měření průchodnosti cév byly porovnány pomocí znaménkového testu a váhy sraženin a údaje o krvácení arteriotomií pomocí Wilcoxonova testu. Jako výsledky jsou uvedeny oboustranné p-hodnoty.

Výsledky:

Podávání VIIa mělo za následek různý protisrážlivý efekt, jak bylo měřeno stupněm průchodnosti cév. Ve skupině VIIa byla průchodnost cév 30 min. po obnovení průtoku krve 85 % a 120 min. po obnovení průtoku krve 75 %. Odpovídající hodnoty u skupiny s vehikulem byly 40 % a 30 %. Rozdíl je statisticky významný ($p=0,008$ a $p=0,004$). Středové váhy sraženin byly 0,3 mg ve skupině VIIa a 0,5 mg ve skupině s vehikulem, třebaže tento rozdíl není statisticky významný ($p=0,19$). Středové doby krvácení arteriotomií byly 1,5 min. ve skupině VIIa a 2 min. ve skupině s vehikulem. Skupiny nejsou statisticky rozlišitelné ($p=1$).

Tento Příklad ukazuje, že místní aplikace VIIa na místo s tepenným poškozením, má protisrážlivý účinek, přičemž však nevyvolává sklon k zvýšenému krvácení. To představuje vysoce atraktivní přístup pro zabránění trombotických komplikací při chirurgických zákrocích, mikrochirurgii krevních cév, cévních operacích a jiných traumatech.

Příklad 18: Místní aplikace FVIIai snižuje váhu krevní sraženiny a zlepšuje průchodnost cév.

Tento Příklad ukazuje, že místní aplikace chemicky inaktivovaného FVIIa (FVIIai) snižuje váhu krevní sraženiny a zlepšuje průchodnost cév.

V tomto Příkladě bylo použito 20 králíků v anestézii. Byla odhalena krční žíla a svorkami byl izolován úsek o délce 10 mm. Sraženina byla indukována pomocí kombinace chemického rozrušení buněčné výstelky (ethoxysclerolem) izolovaného úseku a částečného podvázání, umístěného kaudálně od úseku. Ve slepém, náhodně uspořádaném pokusu byla jedna strana ošetřena 0,5 mg chemicky inaktivovaného FVIIa (FVIIai) a druhá pufr. Testovaná látka byla podána injekčně do izolovaného úseku žíly a inkubována 10 min. po chemickém rozrušení buněčné výstelky. Po 30 a 120 min. byla kontrolována průchodnost cév pomocí standardního „empty/refill” testu. Případná sraženina byla zvážena po usmrcení zvířete.

	středová váha krevní sraženiny	rozsah vah krevních sraženin	p- hodnota	průchodnost po 30 min.	p- hodnota	průchodnost po 120 min.	p- hodnota
FVIIai	0,85 mg	0-22,3 mg	0,035	90 %	0,0070	85 %	0,070
pufr	9,3 mg	0-22,3 mg		55 %		50 %	

Výsledky ukazují, že místní aplikace inaktivovaného FVIIa významně snižovala váhu krevní sraženiny a zlepšovala průchodnost cév v použitém modelu žilní trombózy.

Příklad 19: Podání FVIIai zmenšuje velikost oblasti rizika a zdokonaluje opětovné krevní zásobování.

Metody:

Příprava pokusu.

Bylo studováno dvacet osm Novozélandských bílých králíků obou pohlaví (3,2 až 3,8 kg). Krátce řečeno, králíci byli uspáni směsí ketaminu (35 mg/kg) a xylazinu (5mg/kg) podanou intramuskulárně, intubováni a bylo jim prováděno umělé dýchání pomocí respirátoru (Harvard Apparatus Co., Cambridge, MA). Polyetylenové katétrů byly

zavedeny do aorty levou krkavicí a do krční žíly pro monitorování tepenného tlaku a podávání léčiv. Hrudník byl rozříznut v pátém mezižebním prostoru a byl otevřen osrdečník. Polyetylenový katétr byl umístěn do levého předsíňového přívěsku pro pozdější injekce barvených mikrokuliček. Velká krajní větev zahnuté věnčité tepny byla dočasně uzavřena přibližně 0,3 cm od jejího počátku kličkou chirurgické nitě. Uzavření věnčité tepny bylo ponecháno 30 min., potom bylo podvázání uvolněno a umožněno opětné krevní zásobování po další 5,5 hodiny. Během pokusu byl kontinuálně zaznamenáván systémový tepenný tlak (snímač tlaku Statham P23 DB, Gould Instruments).

Experimentální protokol:

V okamžiku obnovení průtoku krve byla zvířata náhodně přidělena do některé z následujících skupin s odlišnými ošetrovacími postupy. Kontrolní skupina obdržela dávku 5 ml fyziologického roztoku do levé srdeční předsíně; skupina ošetřená lidským rekombinantním Faktorem VIIa s blokováním aktivním místem (FVIIai, Novo Nordisk A/S, Gentofte, Denmark, dávka 1 mg/kg do levé srdeční předsíně); skupina ošetřená lidským rekombinantním aktivovaným Faktorem VIIa (FVIIai, Novo Nordisk A/S, Gentofte, Denmark, dávka 1 mg/kg do levé srdeční předsíně).

Určení velikosti rizikové oblasti, rozsahu infarktu a oblasti bez krevního zásobování (jev „no-reflow“).

Pro odhadnutí rozložení krevního zásobování tkáně na konci pokusu (jev „no-reflow“, NR), obdržela zvířata injekci 6% roztoku thioflavinu S (1 mg/kg) pomocí katétru do levé srdeční předsíně. Aby bylo možno určit velikost rizikové oblasti infarktu, věnčitá céva byla bezprostředně po injekci thioflavinu opětne uzavřena a pomocí katétru byl do levé srdeční předsíně injikován roztok klášterní modři (E.I.DuPont; 1 mg/kg). Srdce bylo ihned nato vyjmuto a levá srdeční komora oddělena od ostatních struktur a zvážena. Levá srdeční komora byla zmrazena na -70°C po dobu 30 min. a rozřezána na 8 až 10 plátků rovnoběžně se síňokomorovou rýhou. Obrysy normálně prokrvované srdeční svaloviny a rovněž riziková oblast byly sledovány podle rozložení klášterní modři na průhledné plastické ploše. Řezy připravené ze srdeční svaloviny pak byly pozorovány v ultrafialovém světle a normálně prokrvovaná svalovina (fluoreskující) byla pak snadno odlišena a oddělena od ischemické svaloviny (nefluoreskující) podle rozložení thioflavinu. Tyto oblasti byly také sledovány na průhledných plastických plochách. Řezy pak byly dále inkubovány v 2% roztoku trifenyltetrazoliumchloridu (TTC, Sigma Chemicals) po dobu 10 min. při 37°C , aby byla zviditelněna oblast nekrózy. Znovu byla

použita průhledné plastická plocha pro sledování obrysů normální svaloviny (TTC-pozitivní) a infarktové části (TTC-negativní).

Byly vypočteny následující proměnné: 1) oblast s rizikem infarktu, jako procento levé komory, zjištěné na konci období obnoveného krevního zásobování (rozložení klášterní modři) (AR); 2) rozsah infarktu (infarct size – IS), jako procento oblasti s rizikem infarktu, ve které se skutečně vyvinula nekróza podle kritérií barvení TTC; 3) procento oblasti s rizikem infarktu, ve které bylo přerušeno zásobování krví na konci období obnoveného krevního zásobování (jev „no-reflow“).

Měření krevního průtoku v oblasti srdeční svaloviny.

Krevní průtok v oblasti krevní svaloviny (RMBF – regional myocardial blood flow) byl měřen u všech králíků v každé ošetřované skupině. Různě zbarvené umělohmotné mikrokuličky (modré, červené a žluté, Triton Technology, San Diego, CA) byly použity pro měření RMBF 20 min. po uzavření a 10 min. a 5 hodin po obnovení krevního zásobování. Velikost mikrokuliček byla $15 \pm 1 \mu\text{m}$ a byly suspendovány v roztoku 10% dextranu s 0,01 % Tweenu 80. Aby byl zajištěno odpovídající rozptýlení, mikrokuličky byly před použitím sonikovány v ultrazvukové lázni po dobu 5 min. Přibližně 500 000 mikrokuliček bylo injikováno (v celkovém objemu 0,5 až 1,0 ml) do katétru levé srdeční předsíně. Minutu před injikováním mikrokuliček bylo započato s odběrem referenčních vzorků tepenné krve, která pokračoval až do doby 1 min. po injekci. Na základě TTC barvení byly vybrány tkáňové vzorky (100 až 300 mg) ze středu ischemické oblasti a z neischemické oblasti. Mikrokuličky pak byly z tkáně odstraněny vyluhováním v 4 M KOH při 72 °C po dobu 3 hodin a z referenčních vzorků krve vyluhováním v 16 M KOH při teplotě místnosti a následnou mikrofiltrací, podle instrukcí výrobce. Barvy pak byly z kuliček získány do známého objemu rozpouštědla (dimetylformamid) a jejich koncentrace určena spektrofotometrií při optimálních vlnových délkách pro každou barvu podle návodů výrobce. Složené spektrum každého barevného roztoku bylo rozloženo na spektra jednotlivých složek pomocí techniky inverzní matrice. Krevní tok pro každý vzorek krevní svaloviny byl spočten podle vzorce: $\text{RMBF} = \text{Fr} \times \text{Am} / \text{Ar}$, kde RMBF = krevní průtok srdeční svalovinou v ml/min., AM = absorbance ve vzorku z krevní svaloviny a Ar = absorbance v referenčním krevním vzorku. Hodnota krevního průtoku srdeční svalovinou byla vydělena váhou vzorku (za vlhka) a vyjádřena v ml/min./g.

Koagulační studia

Pro určení, jaký vliv má podání FVIIa a FVII na systémovou krevní koagulaci, byly měřeny protrombinový čas (PT – prothrombin time) a doba částečné aktivace tromboplastinu (aPTT – activated partial thromboplastine time) na počátku a 30 min. po podání léčiva. Vzorky krve (4,5 ml) byly odebírány do 0,5 ml citrátu sodného (3,8 %) a centrifugovány pro oddělení plazmy při 2000 g 10 min. při teplotě 4 °C. PT a aPTT byly měřeny duplicitně do dvou hodin po provedení krevního odběru.

Statistické analýzy

Výsledky jsou vyjádřeny ve formě průměru $\pm$ standardní odchylka průměru. Pro porovnání mezi skupinami byla použita variance. Odchytky pro jednotlivé skupiny byly testovány Studentovým t-testem pro nepárová pozorování s Bonferroniho korekcí. Pro porovnání hemodynamických proměnných, stejně jako průtoku krve různými oblastmi krevní svaloviny mezi skupinami, byla použita analýza variance v uspořádání pro opakovaná měření.

Výsledky

Dvacet osm králíků podstoupilo chirurgický zákrok; dvě zvířata zahynula v průběhu uzavěru věnčitých cév na fibrilaci srdečních komor ještě před umístěním do té které ošetrovací skupiny a dva další králíci zahynuli během obnovení krevního průtoku (jeden v kontrolní skupině, a jeden ve skupině, ošetřované FVIIa). Tato zvířata byla vyloučena z následujících statistických analýz. Tedy bylo v každé ošetřované skupině zahrnuto do studie osm zvířat.

Hemodynamická měření:

Ve všech ošetřovaných skupinách indukovalo uzavření věnčitých cév slabé snížení srdeční frekvence a středního tepenného tlaku. Mezi těmito třemi skupinami nebyly v průběhu experimentálního období zjištěny odchylky v srdeční frekvenci a středním tepenném tlaku (Tabulka 1).

Určení velikosti rizikové oblasti, rozsahu infarktu a oblasti bez krevního zásobování (jev „no-reflow“):

Uzavření věnčitých cév mělo za následek vznik rizikové oblasti (hodnocené pomocí injekce klášterní modři na konci pokusu), jejíž velikost byla podobná u všech tří různě ošetřovaných skupin ($31,6 \pm 6,3$, $28,2 \pm 4,1$ a $28,2 \pm 5,3$ % levé komory u kontrolní skupiny, skupiny ošetřené FVIIa a skupiny ošetřené FVIIa, $p=NS$).

Po 30 minutovém uzavření věnčitých cév a 5,5 hodiny obnoveného krevního průtoku, byl podíl rizikové oblasti, který přešel do stádia nekrózy $59,8 \pm 12,8 \%$ v kontrolní skupině (Obr.7). Podání FVIIa významně zmenšilo rozsah infarktu na $28,1 \pm 11,3 \%$ plochy rizikové oblasti ($p < 0,01$ podle ANOVA, Obr.1), zatímco podání FVIIa bylo spojeno s významným zvýšením rozsahu infarktu na $80,1 \pm 13,1 \%$ plochy rizikové oblasti ($p < 0,01$ vzhledem ke kontrolám a skupině králíků ošetřených FVIIa, Obr.7).

U skupiny kontrolních králíků $24,4 \pm 2,7 \%$ rizikové oblasti infarktu se stalo oblastí bez krevního zásobování, jak bylo zjištěno pomocí distribuce thioflavinu S na konci pokusu (jev „no-reflow“). Rozsah této oblasti bez krevního zásobování byl výrazně zmenšen pomocí FVIIa na $11,1 \pm 6,1 \%$ a výrazně zvětšen po aplikaci FVIIa na $61,9 \pm 13,8 \%$ rizikové oblasti infarktu ($p < 0,01$, Obr.8).

Předešlé výsledky potvrdily, že rozsah oblasti srdeční svaloviny, která zůstane bez krevního zásobování po obnovení krevního oběhu po infarktu, závisí na různých parametrech; nejdůležitější jsou velikost rizikové oblasti, rozsah infarktu a rozsah zbytkového vedlejšího průtoku během uzavření. Kontrola těchto parametrů dovoluje přesnější odhad vlivu zákroků na rozsah vzniklé oblasti bez krevního zásobování. Když byl rozsah oblasti bez krevního zásobování u kontrolních králíků v předkládané studii s těmito parametry porovnán, byl pozorován vztah, vyjádřený lineární regresní rovnicí: $NR (\% \text{ levé komory [LV – left ventricle]}) = -14,62 + 0,75(AR) + 0,07(IS) + 3,69(RMBF)$; $r^2 = 0,98$; $F \text{ test} = 109,3, (0,37)(0,3)(3,69)$, kde NR je oblast bez krevního zásobování, AR je riziková oblast a RMBF je rozsah zbytkového vedlejšího průtoku během uzavření (v ml/min./g). Číslo v závorkách ukazuje standardní chyby koeficientů. S hodnotou r^2 rovnající se 0,98 tento model vysvětluje >95 % variability plochy oblasti bez krevního zásobování, jež byla pozorována v této studii u kontrolních králíků.

Koeficienty rovnice, které byly získány pomocí hodnot od kontrolních králíků v regresní rovnici, pak byly použity k výpočtu očekávané velikosti oblasti bez krevního zásobování pro jednotlivá zvířata v každé ošetřované skupině (Obr.9). Skutečně pozorované velikosti oblasti bez krevního zásobování u králíků, kterým byl podán FVIIa, byly významně menší, než bylo očekáváno podle výpočtů, provedených pomocí rovnice, získané mnohonásobnou regresní analýzou. Opravdu u králíků léčených FVIIa, pro kteroukoliv očekávanou oblast bez krevního zásobování, skutečně pozorovaná velikost byla vždy menší, takže všechna zvířata této skupiny se rozkládala pod regresní přímkou, získanou pro kontrolní zvířata (Obr.9). Naopak, králíci léčení FVIIa vykazovali pravý opak, tj. pro kteroukoliv očekávanou oblast bez krevního

zásobování, skutečně pozorované velikosti byly vždy významně větší, tak že všechna zvířata se rozkládala nad regresní přímkou, získanou pro kontrolní zvířata (Obr.9). Souhrnně řečeno, tyto údaje ukazují, že zmenšení velikosti oblasti bez krevního zásobování, pozorované u králíků léčených FVIIa, není zcela vysvětlitelné zmenšením rozsahu infarktu a naznačují, že aktivace koagulační kaskády zevního srážení krve během obnovy krevního zásobování po infarktu, přispívá ke vzniku oblasti bez krevního zásobování.

Měření krevního průtoku v oblasti srdeční svaloviny:

U kontrolních zvířat, v oblasti myokardu nepostížené infarktem, byl průměrný RMBF 1,20 ml/min./g tkáně v celém průběhu studia (údaje nejsou uvedeny). U téže skupiny zvířat, RMBF v oblasti myokardu postižené infarktem, byl $0,08 \pm 0,02$, $1,43 \pm 0,28$ a $0,98 \pm 0,19$ ml/min./g tkáně 20 min. po uzavěru věnčité tepny, 10 min. a 5 hodin po obnovení krevního průtoku. Aplikace různých léků, použitých v této práci, významně nezměnila RMBF v průběhu pokusného období ani v normálním myokardu, ani v myokardu postiženém infarktem, ve srovnání s kontrolními zvířaty.

Koagulační studia:

Ke studiu možných systémových vlivů FVIIa, které by mohly zvýšit riziko krvácivosti, byly měřeny PTs a aPTT ve krevních vzorcích odebíraných v 30 min. CFVs a po podání FVIIa a FVIIa. Na konci 30 min. období CFVs byly průměrné hodnoty PTs a aPTT $8,2 \pm 0,6$ sekundy a 25 ± 3 sekundy. Slabé zvýšení PTs na $10,1 \pm 0,6$ sekundy bylo pozorováno po podání FVIIa (Obr.11). Toto zvýšení však nedosahuje statistické významnosti ($p=0,09$ podle ANOVA a Studentova t-testu s Bonferroniho korekcí). aPTT se významně nezměnil po podání FVIIa (Obr.10). Podání FVIIa mělo za následek výrazné zkrácení jak PTs tak aPTTs pouze vzhledem k hodnotám získaným po podání FVIIa (Obr.11).

Tabulka I: Hemodynamické proměnné v průběhu uzavěru a opětného uvolnění věčité tepny

Tepová frekvence (tepy/min.)					
Doba po uzavření	Kontrola	SQ29548	Dazoxiben	R68070	ASA
0	175 ± 5	170 ± 4	178 ± 6	169 ± 5	1
30 min.	169 ± 4	165 ± 5	173 ± 5	164 ± 6	1
1 hodina	169 ± 6	167 ± 4	171 ± 5	166 ± 5	1
2 hodiny	173 ± 5	172 ± 5	175 ± 6	170 ± 5	1
3 hodiny	170 ± 4	168 ± 5	177 ± 5	168 ± 6	1
4 hodiny	175 ± 5	168 ± 6	174 ± 5	169 ± 5	1
5 hodin	175 ± 5	172 ± 2	173 ± 5	172 ± 6	1
6 hodin	168 ± 5	170 ± 4	174 ± 5	168 ± 5	1

Střední tepenný tlak (mm Hg)					
Doba po uzavření	Kontrola	SQ29548	Dazoxiben	R68070	ASA
0	75 ± 5	78 ± 3	78 ± 4	73 ± 3	7
30 min.	69 ± 4	65 ± 4	71 ± 3	67 ± 4	6
1 hodina	69 ± 3	67 ± 4	71 ± 4	69 ± 4	6
2 hodiny	73 ± 4	75 ± 4	75 ± 5	72 ± 4	7
3 hodiny	74 ± 4	75 ± 3	77 ± 5	75 ± 3	7
4 hodiny	75 ± 5	78 ± 4	76 ± 4	73 ± 4	7
5 hodin	73 ± 4	74 ± 5	78 ± 5	72 ± 4	7
6 hodin	73 ± 5	76 ± 4	74 ± 5	73 ± 5	7

Tabulka II: Krevní průtok v srdeční svalovině

Krevní průtok oblastí srdeční svaloviny (ml/min./g tkáně) v průběhu uzavěru věnčitých cév a po následném obnovení krevního oběhu

	Kontrola	FVIIai	FVIIa
Normální srdeční svalovina			
20 min. CAO	$1,19 \pm 0,22$	$1,03 \pm 0,19$	$1,27 \pm 0,24$
10 min. REP	$1,22 \pm 0,15$	$1,10 \pm 0,17$	$1,19 \pm 0,20$
2 hodiny REP	$1,17 \pm 0,18$	$1,07 \pm 0,16$	$1,22 \pm 0,19$
Ischemická srdeční svalovina			
20 min. CAO	$0,09 \pm 0,05$	$0,08 \pm 0,05$	$0,08 \pm 0,04$
10 min. REP	$1,53 \pm 0,12$	$1,65 \pm 0,18$	$1,24 \pm 0,14$
2 hodiny REP	$0,89 \pm 0,14$	$1,23 \pm 0,15$	$0,72 \pm 0,13$

CAO = uzavření věnčité tepny (Coronary Artery Occlusion)

REP = obnovení krevního zásobování (Reperfusion)

Příklad 19: Podávání FVIIai snižuje rozsah infarktu a velikost oblasti rizika infarktu

Expozice tkáňového faktoru nastává v průběhu obnovení krevního zásobení srdce po infarktu uvnitř věnčitých cév a vede ke snížení místního krevního průtoku.

Abychom určili, zda expozice tkáňového faktoru může přispět k poškození myokardu tím, že aktivuje srážení krve a snižuje průtok krve věnčitými cévami v průběhu obnovení krevního zásobení srdce po infarktu, novozélandští bílí králíci byli podrobeni na 30 minut uzavření věnčitých cév, po němž byl krevní oběh na 5,5 hodiny obnoven. V průběhu obnovení krevního oběhu zvířata náhodně dostala: fyziologický roztok (n=8); lidský rekombinantní Faktor VIIa s blokováním aktivním místem (FVIIai, 100 µg/kg/min. po dobu 10 min. do levé srdeční předsíně, n=8) nebo lidský rekombinantní Faktor VIIa (FVIIa, 100 µg/kg/min. po dobu 10 min. do levé srdeční předsíně, n=8). Krevní průtok v oblasti srdeční svaloviny (RMBF) byl měřen pomocí

barvených mikrokuliček v 20 minutách ischemie a 10 min. a 2 hodiny po obnovení krevního zásobování. Na konci pokusu byly pomocí distribuce klášterní modří a thioflavinu a pomocí barvení TTC změřeny: velikost rizikové oblasti infarktu (AR), rozsah infarktu (IS) a velikost oblasti bez krevního zásobení (NR). Podání FVIIa mělo za následek významné zmenšení jak IS, tak NR vzhledem ke kontrolám ($28,1 \pm 11,3$ % a $11,1 \pm 6,1$ % AR oproti $59,8 \pm 12,8$ % a $24,4 \pm 8,2$ % AR, $p < 0,01$), zatímco podání FVIIa mělo za následek významné zvětšení jak IS, tak NR na $80,1 \pm 13,1$ % a $61,9 \pm 13,8$ % AR, $p < 0,01$, vzhledem ke kontrolám. U skupin zvířat nebyly pozorovány rozdíly v krevním tlaku, tepové frekvenci, AR a RMBF v 20 minutách ischemie. RMBF byl významně vyšší 2 hodiny po obnovení krevního zásobování u zvířat, jimž byl podán FVIIa, zatímco u králíků, jimž byl podán FVIIa byl nižší. Tedy tkáňovým faktorem zprostředkovaná aktivace krevního srážení významně přispívá ke vzniku poškození myokardu v období obnovení krevního zásobování po infarktu.

	FVIIa(AR)	Kontrola (AR)	FVIIa (AR)
IS	$28,1 \pm 11,3$	$59,8 \pm 12,8$	$80,1 \pm 13,1$
NR	$11,1 \pm 6,1$	$24,4 \pm 8,2$	$61,9 \pm 13,8$

AR = velikost oblasti s rizikem infarktu

IS = rozsah infarktu

NR = oblast bez krevního zásobení

Ačkoli zde uvedený vynález byl popsán do jistých podrobností ilustracemi a příklady za účelem jasného porozumění, je zřejmé, že v rámci připojených patentových nároků mohou být uplatněny určité změny a modifikace.

Průmyslová využitelnost

Faktor VII s modifikovaným aktivním místem připravený podle vynálezu účinně blokuje kaskádu krevního srážení a je použitelný pro zabránění vzniku poškození myokardu v souvislosti s ischemickou chorobou srdeční, pro léčení takto vzniklých poškození, pro zlepšení průchodnosti cév a rovněž pro místní aplikaci na místa citlivá na vznik krevních srážení.

Seznam sekvencí

(1) Všeobecné informace

- (i) Žadatel: ZymoGenetics a
Novo Nordisk A/S
- (ii) Název vynálezu: Modifikovaný Faktor VII
- (iv) Počet sekvencí: 4
- (v) Adresa pro korespondenci:
 - (A) Adresa: Novo Nordisk A/S, Corporate Patents
 - (B) Ulice: Novo Allé
 - (C) Město: DK-2880 Bagsvaerd
 - (D) Stát: Dánsko
- (viii) Počítačové vybavení:
 - (A) Druh média: Floppy disk
 - (B) Počítač: IBM PC kompatibilní
 - (C) Operační systém: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) Software: PatentIn Release #1.24
- (ix) Údaje o nynější žádosti:
 - (I) Číslo žádosti:
 - (J) Datum podání:
 - (K) Klasifikace:
- (vii) Údaje o předchozí žádosti:
 - (B) Číslo žádosti: 08/475,845
 - (C) Datum podání: 7. června 1995
 - (D) Klasifikace:

(2) Informace k sekvenci č. 1:

(i) Charakteristika sekvence:

- (A) délka: 2422 párů bází
 (B) typ: nukleová kyselina
 (C) typ řetězce: jednovláknový
 (D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: cDNA

(iii) Hypotetická: ne

(iv) Anti-sense: ne

(ix) Význačné rysy:

- (A) Název/klíč: CDS
 (B) Umístění: 28..1420
 (D) Další informace: /startovací_kodon= 28
 /produkt= "Faktor VII"

(xi) Popis sekvence č. 1:

CCTCCCGACA ATACAGGGGC AGCACTGCAG AGATTTCATC ATG GTC TCC CAG GCC 55
 Met Val Ser Gln Ala

-38 -35

CTC AGG CTC CTC TGC CTT CTG CTT GGG CTT CAG GGC TGC CTG GCT GCA 103
 Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln Gly Cys Leu Ala Ala

-30 -25 -20

GTC TTC GTA ACC CAG GAG GAA GCC CAC GGC GTC CTG CAC CGG CGC CGG 151
 Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val Leu His Arg Arg Arg

-15 -10 -5

	CGC GCC AAC GCG TTC CTG GAG GAG CTG CGG CCG GGC TCC CTG GAG AGG	199
	Arg Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg	
	1 5 10 15	
5	GAG TGC AAG GAG GAG CAG TGC TCC TTC GAG GAG GCC CGG GAG ATC TTC	247
	Glu Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe	
	20 25 30	
	AAG GAC GCG GAG AGG ACG AAG CTG TTC TGG ATT TCT TAC AGT GAT GGG	295
10	Lys Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly	
	35 40 45	
	GAC CAG TGT GCC TCA AGT CCA TGC CAG AAT GGG GGC TCC TGC AAG GAC	343
	Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp	
15	50 55 60	
	CAG CTC CAG TCC TAT ATC TGC TTC TGC CTC CCT GCC TTC GAG GGC CGG	391
	Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg	
	65 70 75	
20	AAC TGT GAG ACG CAC AAG GAT GAC CAG CTG ATC TGT GTG AAC GAG AAC	439
	Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn	
	80 85 90 95	
25	GGC GGC TGT GAG CAG TAC TGC AGT GAC CAC ACG GGC ACC AAG CGC TCC	487
	Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser	
	100 105 110	
	TGT CGG TGC CAC GAG GGG TAC TCT CTG CTG GCA GAC GGG GTG TCC TGC	535
30	Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys	
	115 120 125	
	ACA CCC ACA GTT GAA TAT CCA TGT GGA AAA ATA CCT ATT CTA GAA AAA	583
	Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys	
35	130 135 140	

AGA AAT GCC AGC AAA CCC CAA GGC CGA ATT GTG GGG GGC AAG GTG TGC 631
Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys

145

150

155

5

CCC AAA GGG GAG TGT CCA TGG CAG GTC CTG TTG TTG GTG AAT GGA GCT 679
Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala

160

165

170

175

10 CAG TTG TGT GGG GGG ACC CTG ATC AAC ACC ATC TGG GTG GTC TCC GCG 727
Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala

180

185

190

GCC CAC TGT TTC GAC AAA ATC AAG AAC TGG AGG AAC CTG ATC GCG GTG 775
15 Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val

195

200

205

CTG GGC GAG CAC GAC CTC AGC GAG CAC GAC GGG GAT GAG CAG AGC CCG 823
Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg

20

210

215

220

CGG GTG GCG CAG GTC ATC ATC CCC AGC ACG TAC GTC CCG GGC ACC ACC 871
Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr

225

230

235

25

AAC CAC GAC ATC GCG CTG CTC CGC CTG CAC CAG CCC GTG GTC CTC ACT 919
Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr

240

245

250

255

30 GAC CAT GTG GTG CCC CTC TGC CTG CCC GAA CGG ACG TTC TCT GAG AGG 967
Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg

260

265

270

270199

	ACG CTG GCC TTC GTG CGC TTC TCA TTG GTC AGC GGC TGG GGC CAG CTG	1015
	Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu	
	275 280 285	
5	CTG GAC CGT GGC GCC ACG GCC CTG GAG CTC ATG GTC CTC AAC GTG CCC	1063
	Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro	
	290 295 300	
	CGG CTG ATG ACC CAG GAC TGC CTG CAG CAG TCA CGG AAG GTG GGA GAC	1111
10	Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp	
	305 310 315	
	TCC CCA AAT ATC ACG GAG TAC ATG TTC TGT GCC GGC TAC TCG GAT GGC	1159
	Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly	
15	320 325 330 335	
	AGC AAG GAC TCC TGC AAG GGC GAC AGT GGA GGC CCA CAT GCC ACC CAC	1207
	Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His	
	340 345 350	
20	TAC CGG GGC ACG TGG TAC CTG ACG GGC ATC GTC AGC TGG GGC CAG GGC	1255
	Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly	
	355 360 365	
25	TGC GCA ACC GTG GGC CAC TTT GGC GTG TAC ACC AGG GTC TCC CAG TAC	1303
	Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr	
	370 375 380	
	ATC GAG TGG CTG CAA AAG CTC ATG CGC TCA GAG CCA CGC CCA GGA GTC	1351
30	Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val	
	385 390 395	
	CTC CTG CGA GCC CCA TTT CCC TAG C CCAGCAGCCC TGGCCTGTGG	1396
	Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro	
35	400 405	

AGAGAAAGCC AAGGCTGCGT CGAACTGTCC TGGCACCAAA TCCCATATAT TCTTCTGCAG 1456

TTAATGGGGT AGAGGAGGGC ATGGGAGGGA GGGAGAGGTG GGGAGGGAGA CAGAGACAGA 1516

5 AACAGAGAGA GACAGAGACA GAGAGAGACT GAGGGAGAGA CTCTGAGGAC ATGGAGAGAG 1576

ACTCAAAGAG ACTCCAAGAT TCAAAGAGAC TAATAGAGAC ACAGAGATGG AATAGAAAAG 1636

ATGAGAGGCA GAGGCAGACA GCGCTGGAC AGAGGGGCAG GGGAGTGCCA AGGTTGTCCT 1696

10 GGAGGCAGAC AGCCCAGCTG AGCCTCCTTA CCTCCCTTCA GCCAAGCCCC ACCTGCACGT 1756

GATCTGCTGG CCCTCAGGCT GCTGCTCTGC CTTCAITGCT GGAGACAGTA GAGGCATGAA 1816

15 CACACATGGA TGCACACACA CACACGCCAA TGCACACACA CAGAGATATG CACACACACG 1876

GATGCACACA CAGATGGTCA CACAGAGATA CGCAAACACA CCGATGCACA CGCACATAGA 1936

GATATGCACA CACAGATGCA CACACAGATA TACACATGGA TGCACGCACA TGCCAATGCA 1996

20 CGCACACATC AGTGCACACG GATGCACAGA GATATGCACA CACCGATGTG CGCACACACA 2056

GATATGCACA CACATGGATG AGCACACACA CACCAAGTGC GCACACACAC CGATGTACAC 2116

25 ACACAGATGC ACACACAGAT GCACACACAC CGATGCTGAC TCCATGTGTG CTGTCCTCTG 2176

AAGGCGGTTG TTTAGCTCTC ACTTTTCTGG TTCTTATCCA TTATCATCTT CACTTCAGAC 2236

AATTCAGAAG CATCACCATG CATGGTGGCG AATGCCCCCA AACTCTCCCC CAAATGTATT 2296

30 TCTCCCTTCG CTGGGTGCCG GGCTGCACAG ACTATTCCCC ACCTGCTTCC CAGCTTCACA 2356

ATAAACGGCT GCGTCTCCTC CGCACACCTG TGGTGCCTGC CACCCAAAAA AAAAAAAAAA 2416

35 AAAAAA 2422

(2) Informace k sekvenci č. 2:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) délka: 444 aminokyselin

(B) typ: aminokyselina

(D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence č. 2:

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Trp Leu Leu Leu Gly Leu Gln
 -38 -35 -30 -25

15 Gly Cys Leu Ala Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val
 -20 -15 -10

Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro
 -5 1 5 10

20 Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu
 15 20 25

25 Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile
 30 35 40

Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly
 45 50 55

30 Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro
 60 65 70

Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile
 75 80 85 90

35

Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr

95

100

105

Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala

5

110

115

120

Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile

125

130

135

10 Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val

140

145

150

Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu

155

160

165

170

15

Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile

175

180

185

Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg

20

190

195

200

Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly

205

210

215

25 Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr

220

225

230

Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln

235

240

245

250

30

Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg

255

260

265

Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser

35

270

275

280

Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met

285

290

295

5 Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser

300

305

310

Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala

315

320

325

330

10

Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly

335

340

345

Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val

15

350

355

360

Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr

365

370

375

20 Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu

380

385

390

Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro

395

400

405

25

(2) Informace k sekvenci č. 3:

(i) Charakteristika sekvence:

- (A) délka: 21 párů bází
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) typ řetězce: jednovláknový
- (D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: cDNA

(iii) Hypotetická: ne

(iv) Anti-sense: ne

(xi) Popis sekvence č. 3:

TGGGCCTCCG GCGTCCCCCT T 21

(2) Informace k sekvenci č. 4:

(i) Charakteristika sekvence:

- (A) délka: 15 párů bází
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) typ řetězce: jednovláknový
- (D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: cDNA

(iii) Hypotetická: ne

(iv) Anti-sense: ne

27.01.99

78

(xi) Popis sekvence č. 4:

5

TCCCAGTCAC GACGT 15

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob zabránění tvorby krevní sraženiny v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje místní podání terapeuticky účinné dávky preparátu obsahujícího Faktor VII přinejmenším s jednou modifikací v jeho katalytickém centru, kterážto modifikace podstatně inhibuje schopnost modifikovaného Faktoru VII aktivovat plazmatický Faktor X nebo IX, na takové místo cévy, které je náchylné ke vzniku krevní sraženiny u pacienta.
2. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že modifikace zahrnuje reakci Faktoru VII s inhibitorem serin proteázy.
3. Způsob podle nároku 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, že proteázový inhibitor je organofosfátová sloučenina, sulfanylfluorid, halometylketonový derivát peptidu nebo azapeptid.
4. Způsob podle nároku 3, v y z n a č u j í c í s e t í m, že proteázový inhibitor je některý z těchto halometylketonových peptidových derivátů - Dansyl-Phe-Pro-Arg chlormetylketon, Dansyl-Glu-Gly-Arg chlormetylketon, Dansyl-Phe-Phe-Arg chlormetylketon nebo Phe-Phe-Arg chlormetylketon.
5. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4, v y z n a č u j í c í s e t í m, že místo tvorby krevní sraženiny souvisí s chirurgickým zákrokem, mikrochirurgií, operací cév nebo traumatem.
6. Způsob udržování nebo vylepšení průchodnosti cév pacienta v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje místní podání terapeuticky účinné dávky preparátu obsahujícího Faktor VII přinejmenším s jednou modifikací v jeho katalytickém centru, kterážto modifikace podstatně inhibuje schopnost modifikovaného Faktoru VII aktivovat plazmatický Faktor X nebo IX, na takové místo cévy, které je náchylné ke snížené průchodnosti.
7. Způsob podle nároku 6, v y z n a č u j í c í s e t í m, že modifikace zahrnuje reakci Faktoru VII s inhibitorem serin proteázy.

8. Způsob podle nároku 7, v y z n a č u j í c í s e t í m, že proteázový inhibitor je organofosfátová sloučenina, sulfanylfluorid, halometylketonový derivát peptidu nebo azapeptid.
9. Způsob podle nároku 3, v y z n a č u j í c í s e t í m, že proteázový inhibitor je některý z těchto halometylketonových peptidových derivátů - Dansyl-Phe-Pro-Arg chlormetylketon, Dansyl-Glu-Gly-Arg chlormetylketon, Dansyl-Phe-Phe-Arg chlormetylketon nebo Phe-Phe-Arg chlormetylketon.
10. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 6 až 9, v y z n a č u j í c í s e t í m, že místo tvorby krevní sraženiny souvisí s chirurgickým zákrokem, mikrochirurgií, operací cév nebo traumatem.
11. Použití Faktoru VII obsahujícího přinejmenším jednu modifikaci v jeho katalytickém centru, kterážto modifikace podstatně inhibuje schopnost modifikovaného Faktoru VII aktivovat plazmatický Faktor X nebo IX, pro přípravu látek zabraňujících nebo minimalizujících poškození myokardu v souvislosti s obnovením krevního zásobování po ischemickém záchvatu.
12. Způsob podle nároků 16, v y z n a č u j í c í s e t í m, že modifikace zahrnuje reakci Faktoru VII s inhibitorem serin proteázy.
13. Způsob podle nároku 17, v y z n a č u j í c í s e t í m, že proteázový inhibitor je organofosfátová sloučenina, sulfanylfluorid, halometylketonový derivát peptidu nebo azapeptid.
14. Způsob podle nároku 18, v y z n a č u j í c í s e t í m, že proteázový inhibitor je některý z těchto halometylketonových peptidových derivátů - Dansyl-Phe-Pro-Arg chlormetylketon, Dansyl-Glu-Gly-Arg chlormetylketon, Dansyl-Phe-Phe-Arg chlormetylketon nebo Phe-Phe-Arg chlormetylketon.
15. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 16 až 19, v y z n a č u j í c í s e t í m, že poškození myokardu je nekróza myokardu.

16. Způsob zabraňující nebo minimalizující poškození myokardu v souvislosti s obnovením krevního zásobování po ischemickém záchvatu u jedince v y z n a - č u j í c í s e t í m, že obsahuje podání preparátu obsahujícího farmakologicky přijatelný Faktor VII přinejmenším s jednou modifikací v jeho katalytickém centru, kterážto modifikace podstatně inhibuje schopnost modifikovaného Faktoru VII aktivovat plazmatický Faktor X nebo IX.
17. Způsob podle nároku 21, v y z n a č u j í c í s e t í m, že modifikace zahrnuje reakci Faktoru VII s inhibitorem serin proteázy.
18. Způsob podle nároku 22, v y z n a č u j í c í s e t í m, že proteázový inhibitor je organofosfátová sloučenina, sulfanylfluorid, halometylketonový derivát peptidu nebo azapeptid.
19. Způsob podle nároku 23, v y z n a č u j í c í s e t í m, že proteázový inhibitor je některý z těchto halometylketonových peptidových derivátů - Dansyl-Phe-Pro-Arg chlormetylketon, Dansyl-Glu-Gly-Arg chlormetylketon, Dansyl-Phe-Phe-Arg chlormetylketon nebo Phe-Phe-Arg chlormetylketon.
20. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 21 až 24, v y z n a č u j í c í s e t í m, že poškození myokardu je nekróza myokardu.
21. Použití Faktoru VII obsahujícího přinejmenším jednu modifikaci v jeho katalytickém centru, kterážto modifikace podstatně inhibuje schopnost modifikovaného Faktoru VII aktivovat plazmatický Faktor X nebo IX, pro přípravu látek zlepšujících místní průtok krve v myokardu během obnovení krevního zásobování po ischemickém záchvatu.
22. Způsob podle nároku 26, v y z n a č u j í c í s e t í m, že modifikace zahrnuje reakci Faktoru VII s inhibitorem serin proteázy.
23. Způsob podle nároku 27, v y z n a č u j í c í s e t í m, že proteázový inhibitor je organofosfátová sloučenina, sulfanylfluorid, halometylketonový derivát peptidu nebo azapeptid.

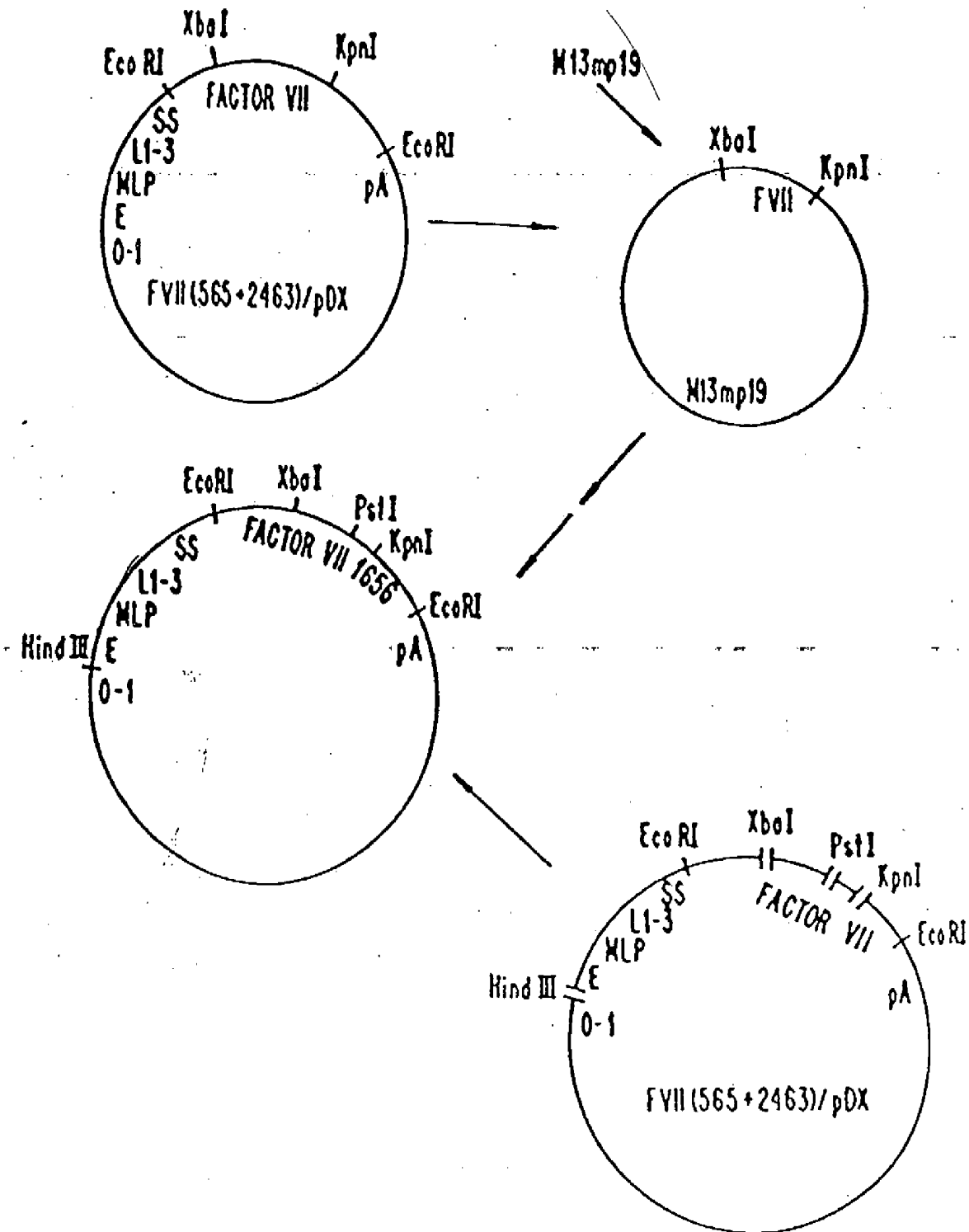
24. Způsob podle nároku 28, v y z n a č u j í c í s e t í m, že proteázový inhibitor je některý z těchto halometylketonových peptidových derivátů - Dansyl-Phe-Pro-Arg chlormetylketon, Dansyl-Glu-Gly-Arg chlormetylketon, Dansyl-Phe-Phe-Arg chlormetylketon nebo Phe-Phe-Arg chlormetylketon.
25. Způsob zlepšení místního průtoku krve v myokardu během obnovení krevního zásobování po ischemickém záchvatu u jedince v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje podání preparátu obsahujícího farmakologicky přijatelný Faktor VII přinejmenším s jednou modifikací v jeho katalytickém centru, kterážto modifikace podstatně inhibuje schopnost modifikovaného Faktoru VII aktivovat plazmatický Faktor X nebo IX.
26. Způsob podle nároku 30, v y z n a č u j í c í s e t í m, že modifikace zahrnuje reakci Faktoru VII s inhibitorem serin proteázy.
27. Způsob podle nároku 31, v y z n a č u j í c í s e t í m, že proteázový inhibitor je organofosfátová sloučenina, sulfanylfluorid, halometylketonový derivát peptidu nebo azapeptid.
28. Způsob podle nároku 32, v y z n a č u j í c í s e t í m, že proteázový inhibitor je některý z těchto halometylketonových peptidových derivátů - Dansyl-Phe-Pro-Arg chlormetylketon, Dansyl-Glu-Gly-Arg chlormetylketon, Dansyl-Phe-Phe-Arg chlormetylketon nebo Phe-Phe-Arg chlormetylketon.

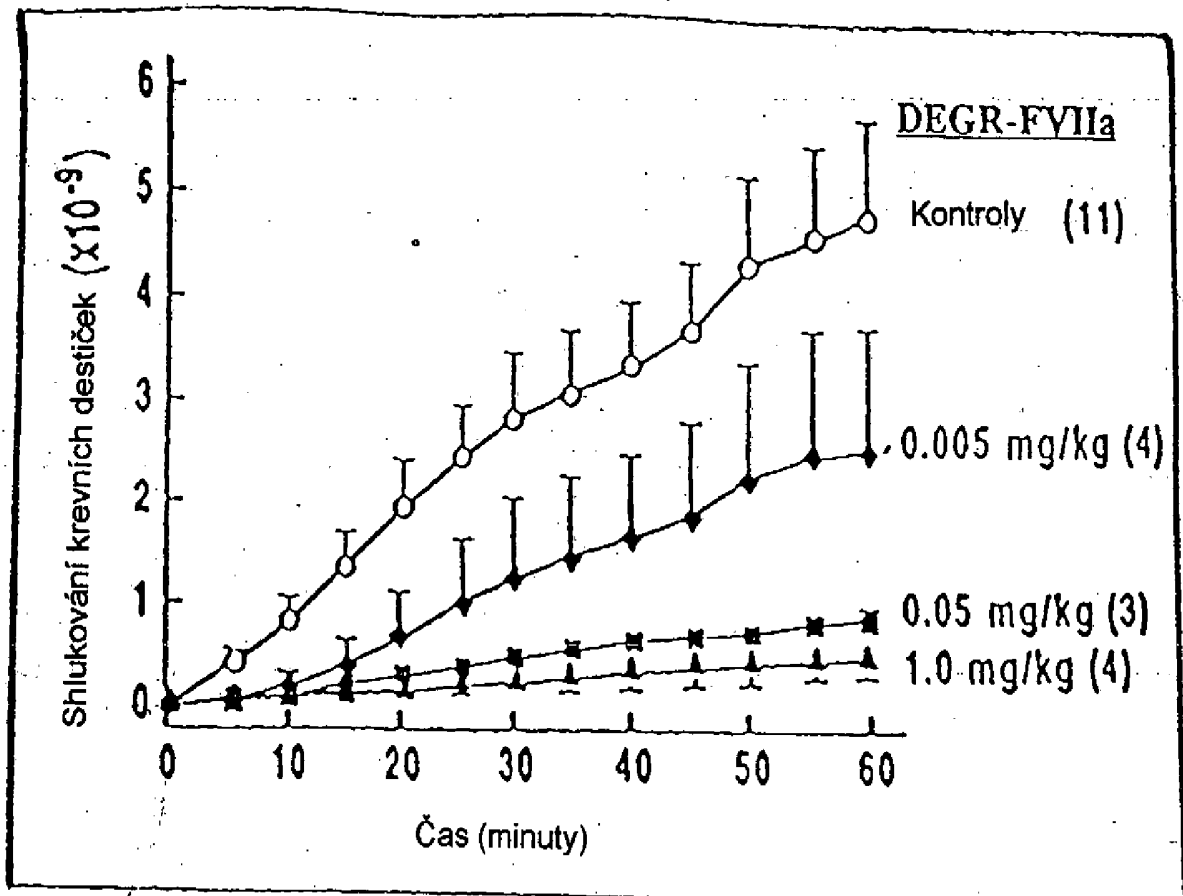
27.01.99

1/11

8119

Obr. 1



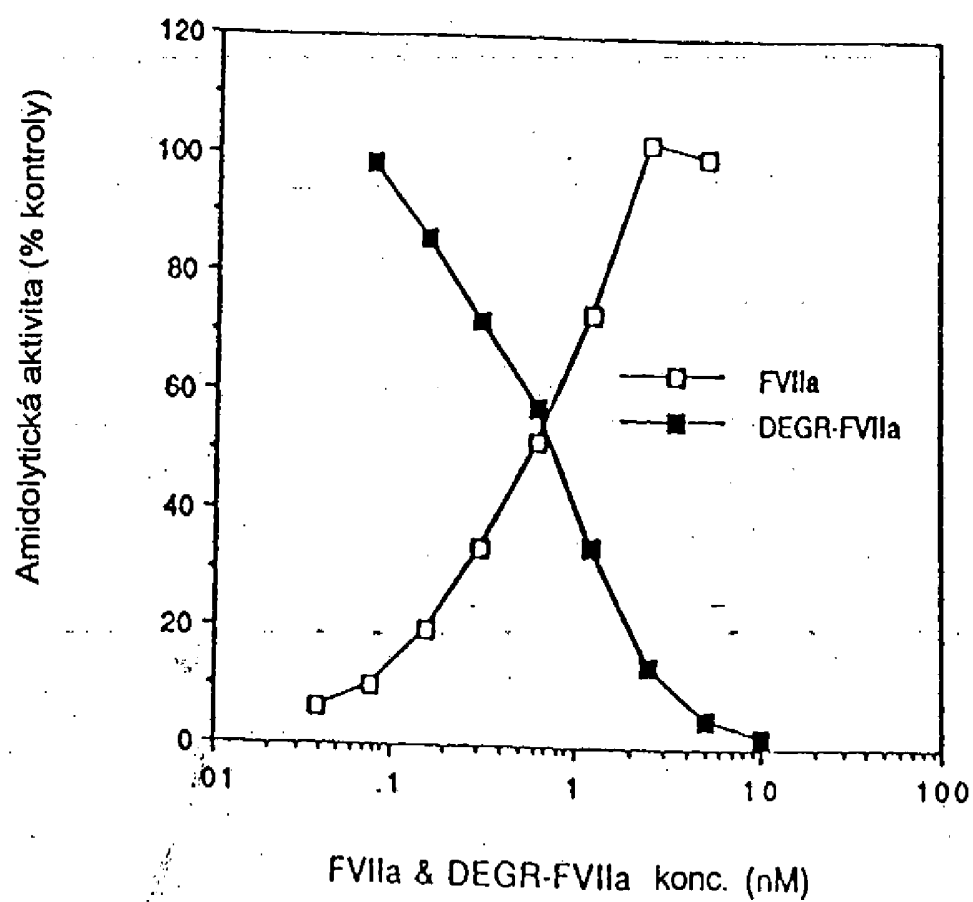


Obr.2

3/11

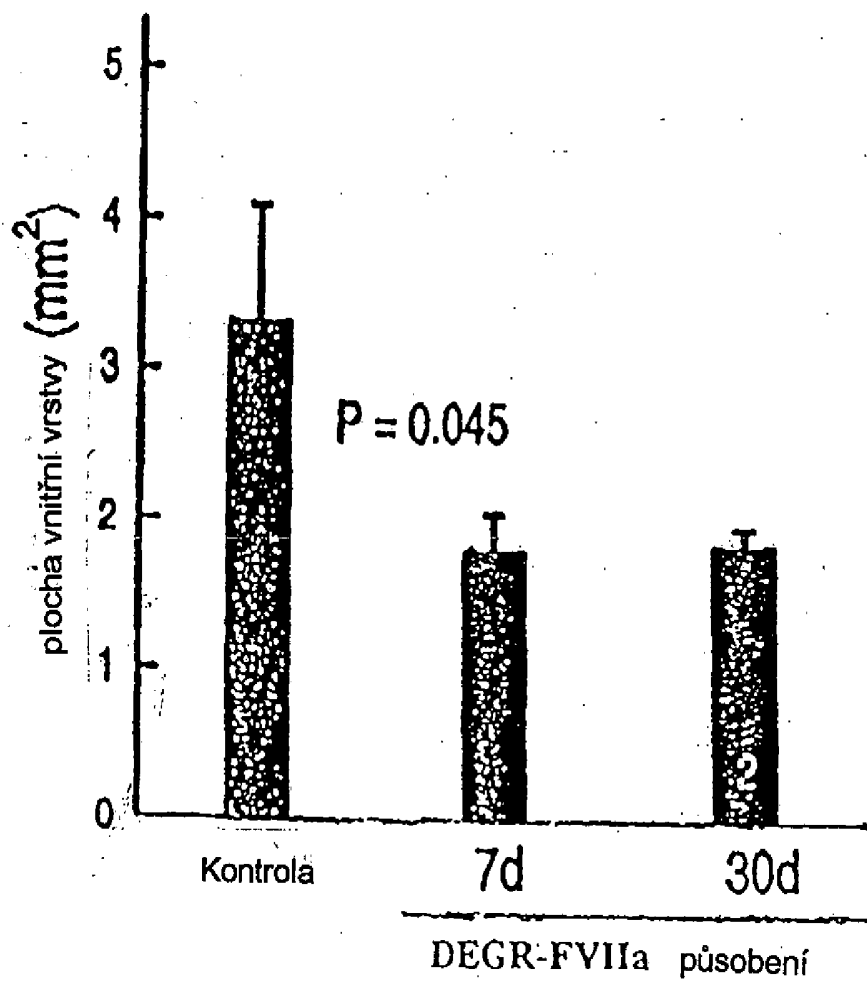
Obr.3

Chromogení aktivita buněk
hladkých svalů pavíánů



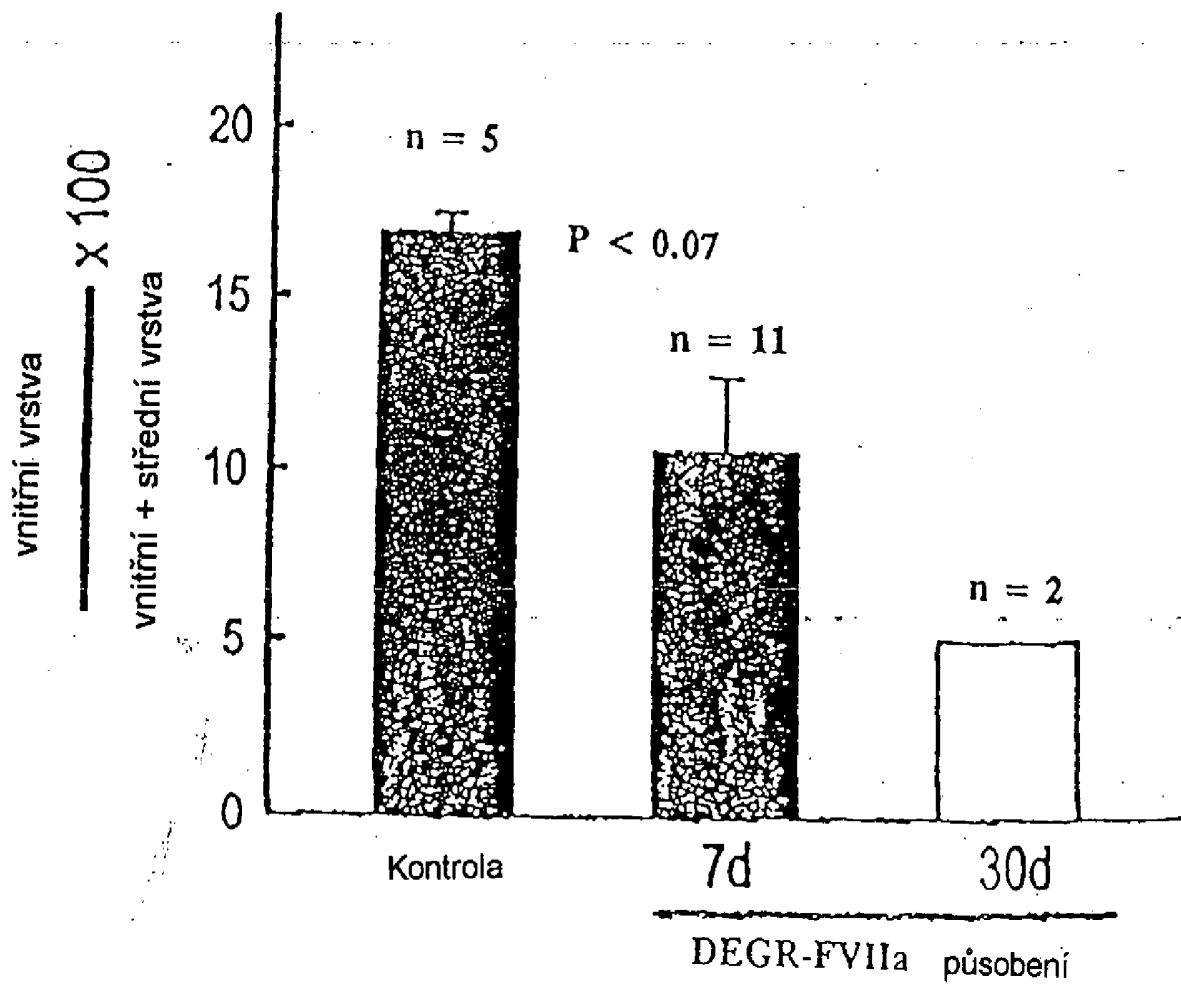
Obr.4

Otevření krční tepny



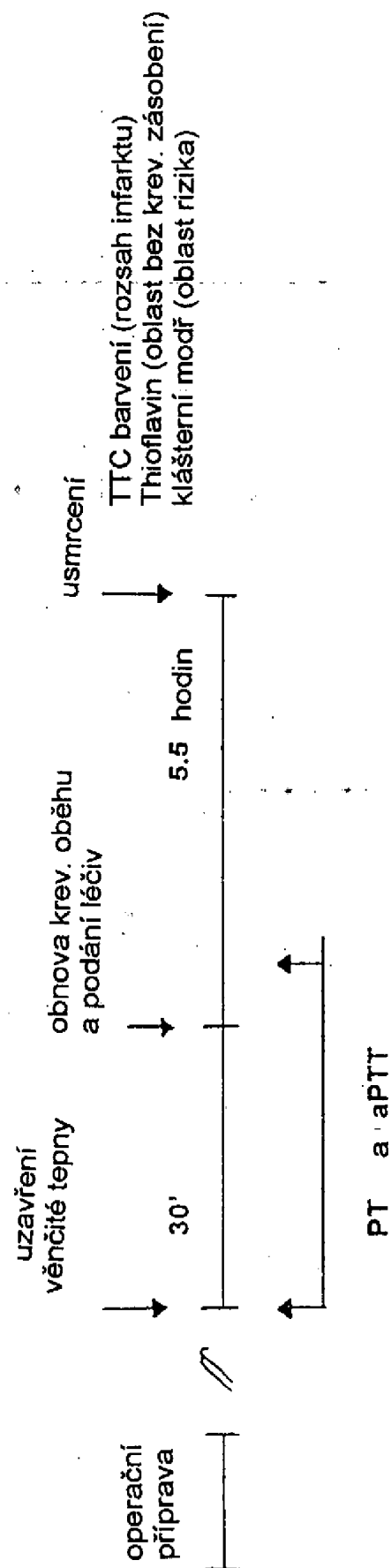
5/11

Poranění stehenní tepny pomocí balónku



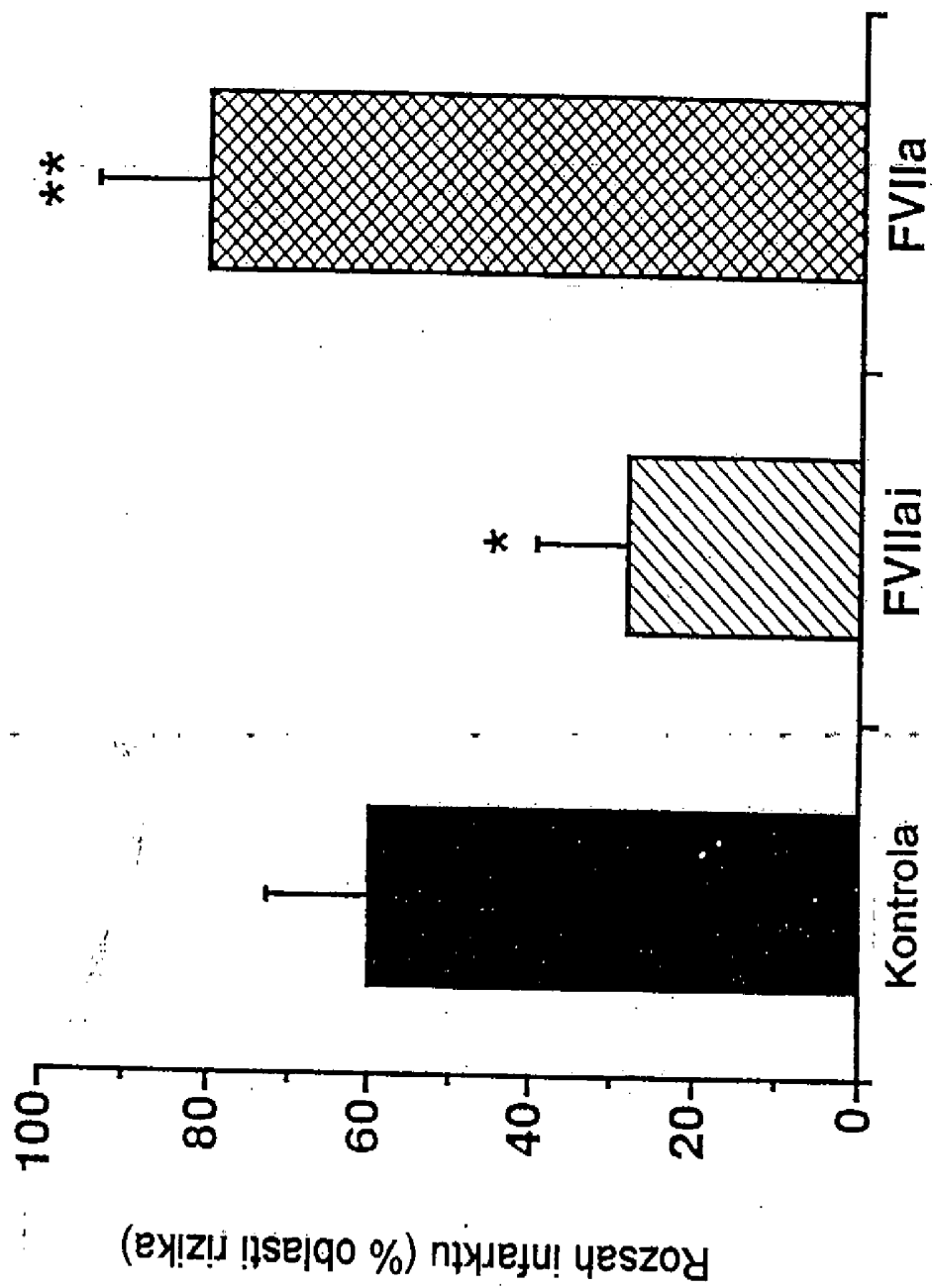
Obr.5

Schéma pokusu



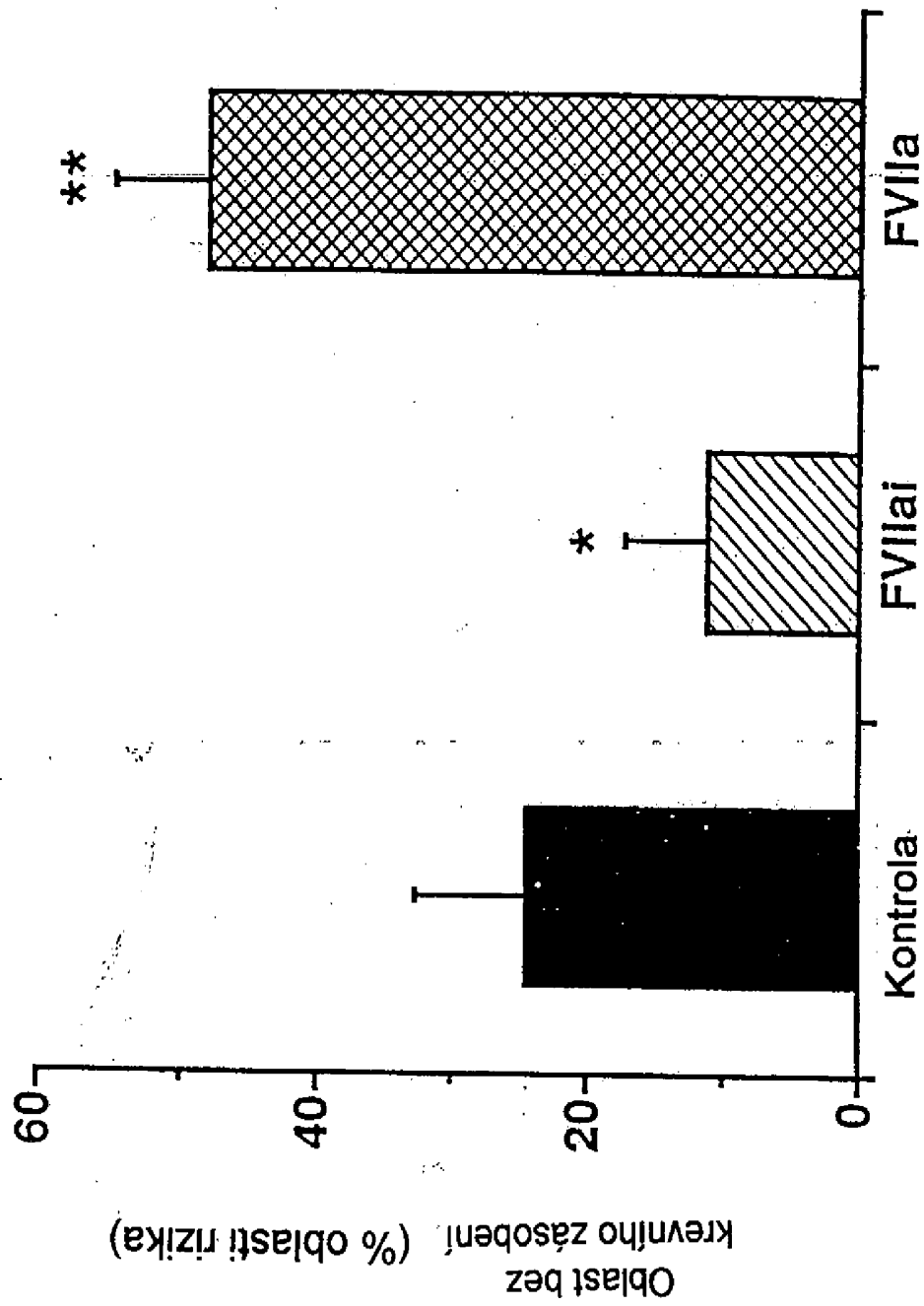
Obr.6

7/11



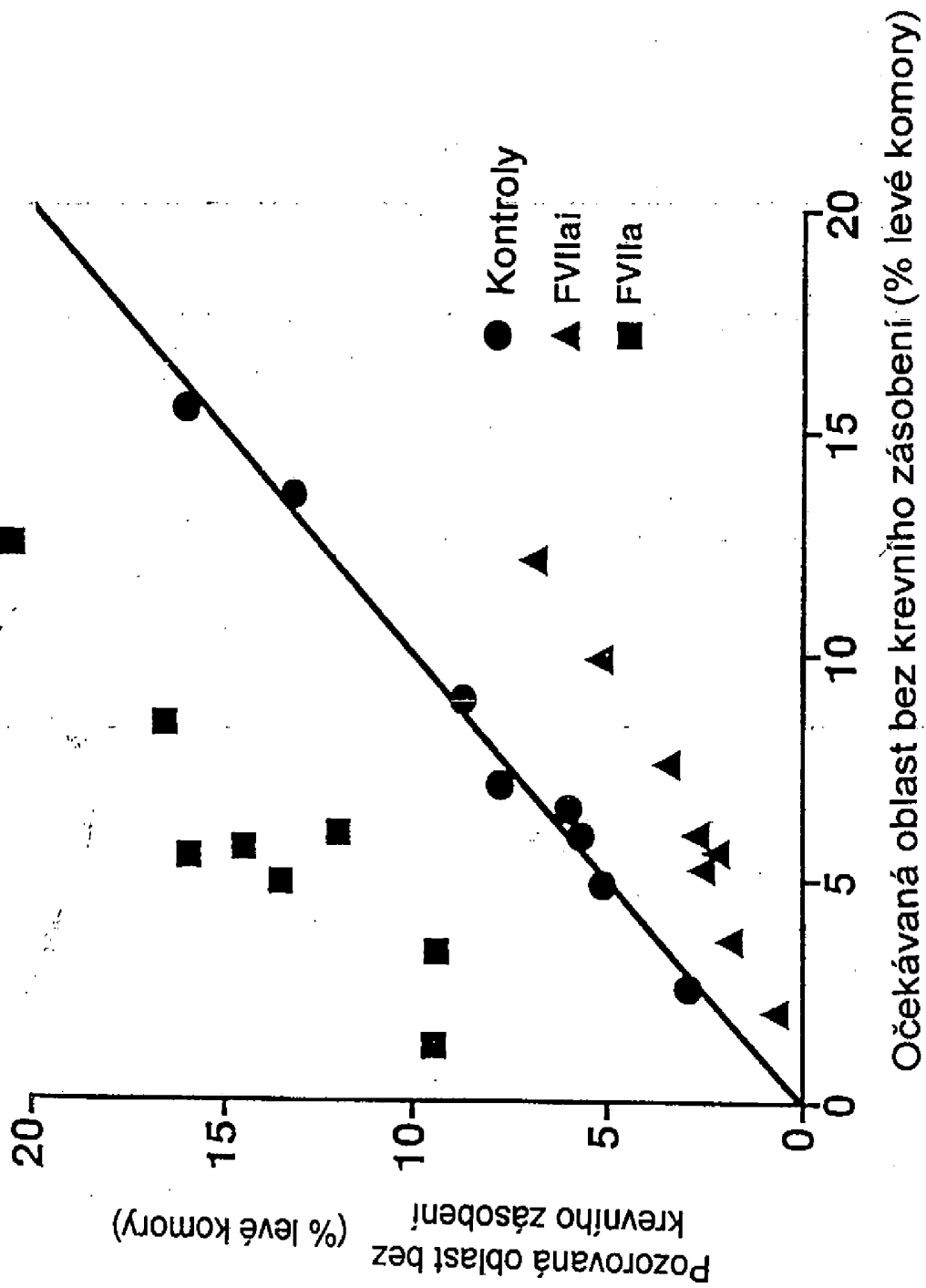
Obr.7

8/11

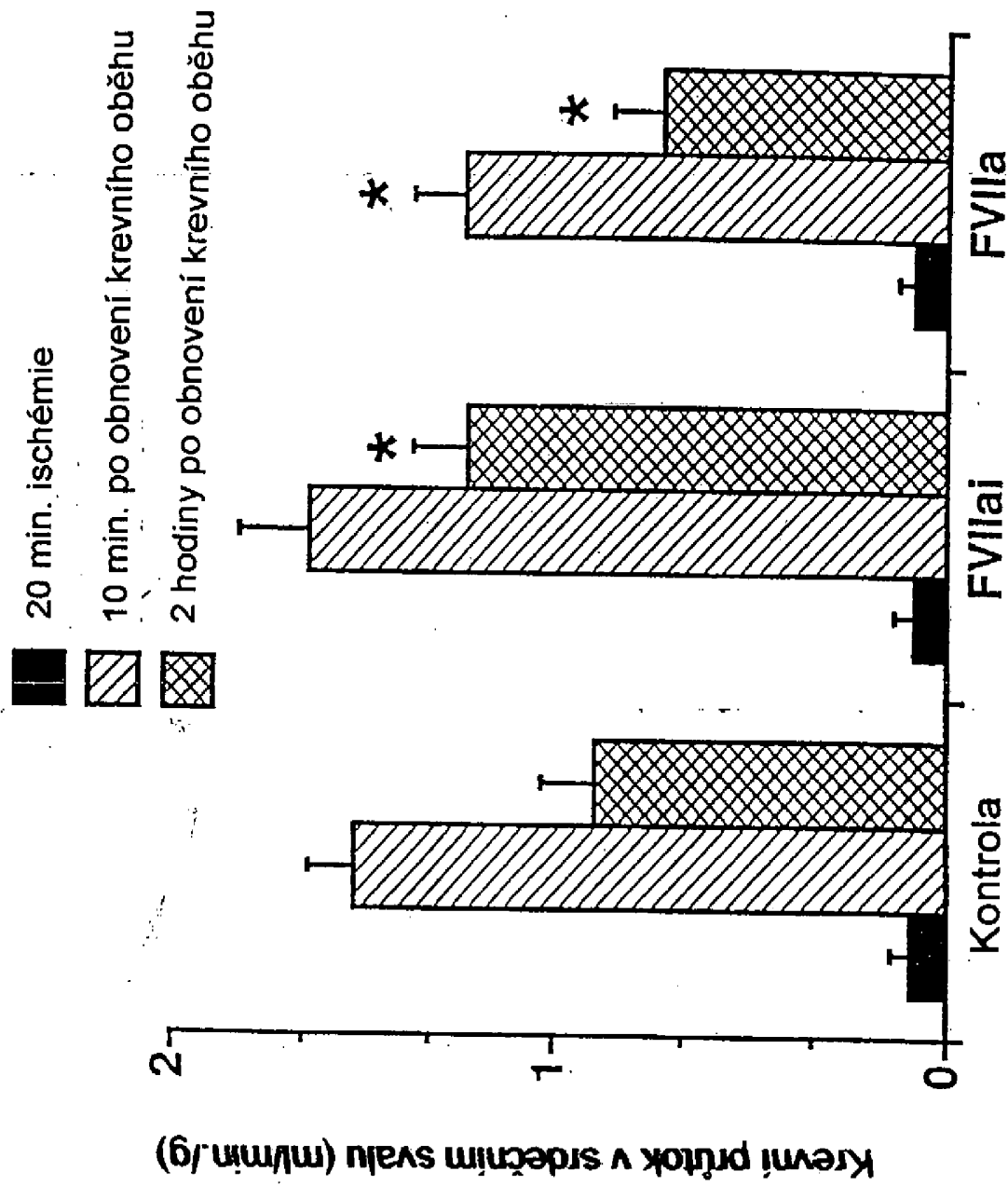


Obr.8

9/11

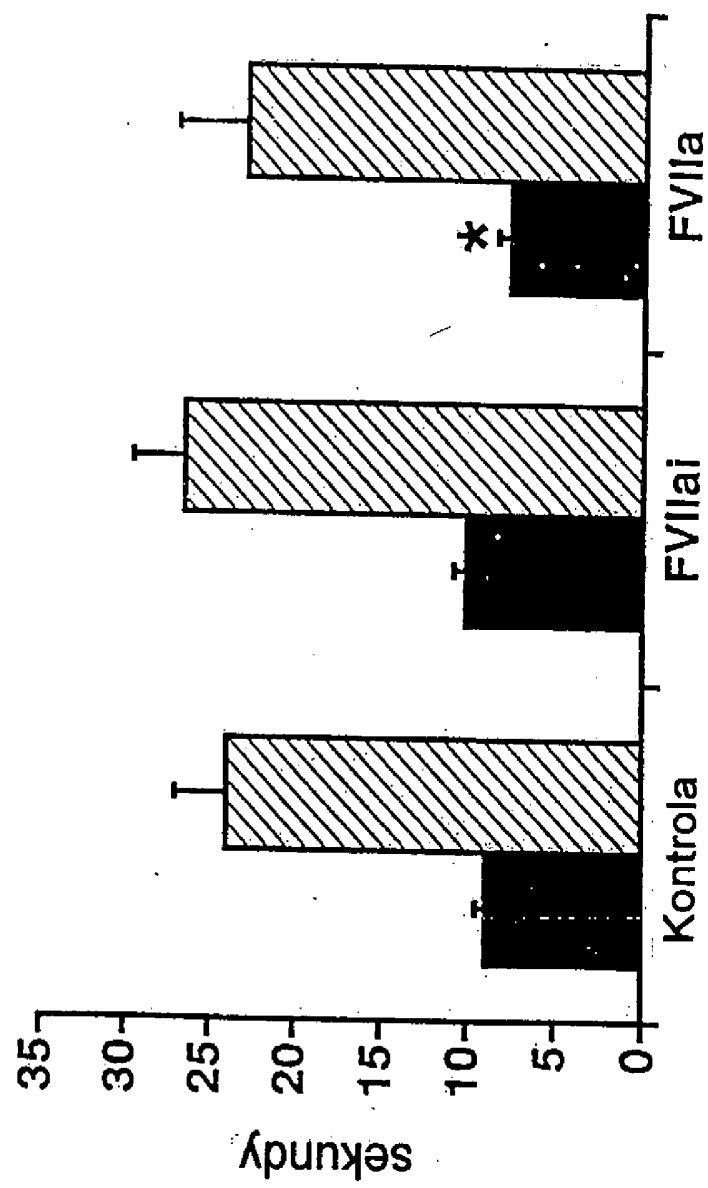


Obr.9



Obr. 10

11/11



Obr. 11