FI000104790B



(12) **PATENTTIJULKAISU**
PATENTSKRIFT

(10) **FI 104790 B**

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats **14.04.2000**

(51) Kv.lk.7 - Int.kl.7

A61K 38/46

(21) Patenttihakemus - Patentansökning **885331**

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag **17.11.1988**

(24) Alkupäiva - Löpdag **17.11.1988**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig **18.05.1989**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet

17.11.1987 US 121702 P

SUOMI – FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

(73) Haltija - Innehavare

1 •Scripps Clinic and Research Foundation, 10666 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037-1093, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1 •Griffin,John H., 6845 Condon Drive, San Diego, CA 92122, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 •Gruber,Andras, 7986 Camino Jonata, San Diego, CA 92122, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
3 •Hanson,Stephen R., 201 Meadow Vista Way, Encinitas, CA 92024, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
4 •Harker,Lawrence A., 3498 Lady Hill Road, San Diego, CA 92130, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud: Kolster Oy Ab
Iso Roobertinkatu 23, 00120 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä aktivoidun proteiini C:n valmistamiseksi
Förfarande för framställning av aktiverat protein C

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

EP A 191606 (C12N 15/00),
Chemical Abstracts, Vol. 109, 1988, 104458r

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Menetelmä valtimon tromboottisen tukkeuman tai veritukkotulppauman estämiseen antamalla plasmaperäistä tai rekombinanttituotettua proteiini C:tä yksin tai yhdistelmässä trombolyyttisen aineen tai trombolyyttisten aineiden yhdistelmän kanssa.

Ett förfarande för förhindrande av arterial trombotisk ocklusion eller tromboembolism genom administrering av plasmaderiverat eller genom rekombination producerat protein C enbart eller i kombination med ett trombolytiskt medel eller med trombolytiska medel.

Menetelmä aktivoidun proteiini C:n valmistamiseksi

Tämä keksintö liittyy valtimon tromboottisen tukkeuman tai veritulppatukkeuman estämiseen plasmaperäisellä tai rekombinanttituotetulla aktivoidulla proteiini C:llä yksin tai yhdistelmänä trombolyyttisen aineen kanssa. Tarkemmin sanottuna keksintö koskee menetelmää eristetyn aktivoidun proteiini C:n valmistamiseksi, koostumuksen muodostamiseksi, joka sisältää puhdistettua ja eristettyä aktivoitua proteiini C:tä, jonka puhtaus on vähintään 95 %, terapeuttisesti käytettäväksi akuutin valtimon tromboottisen tukkeuman, veritulppatukkeuman, sepel-, aivo- tai etäisvaltimoiden tai verisuonisiirteiden ahtautumien ehkäisemiseen tai valtimon verihiutaleiden saostumisen ehkäisemiseksi.

Kirurgisista toimenpiteistä moniin sisältyy laskimo- ja valtimotukoksen ja veritulppatukkeuman riski. Nykyisten verihiutalevastaisten ja fibrinolyyttisten lääkkeiden käyttäminen leikkausten aikaisissa ja leikkausten jälkeisissä tapauksissa saattaisi johtaa vakaviin verenvuotokomplikaatioihin. Niinpä näiden aineiden käyttö vaatii erikoista varovaisuutta. Jopa sairauksissa, joissa on komplikaationa valtimotukos, on antitromboottisen ja/tai trombolyyttisen hoidon käytöllä eitoivottuja sivuvaikutuksia, kuten verenvuoto tai uudelleentukkeuma sydänlihaksen infarktissa trombolyyttisen hoidon aikana, kirurgiaa seuraava verenvuoto tai tukos, ja sellaista kirurgiaa seuraava tukos, jossa käytetään siirteitä tai muita sydämen ja verisuoniston prosteettisia laitteita.

Tämän vuoksi on olemassa sellaisen antitromboottisen hoidon tarve, joka samanaikaisesti olisi antikoagulanttinen, verihiutalevastainen ja fibrinolyyttinen ilman verenvuodon vaaroja. Fysiologisten antikoagulanttien joukossa APC on ainutlaatuinen, koska se estää hyytymistä ja stimuloi fibrinolyysiä. APC estää trombiinin välittämän verihiutaleiden aktivaation, kuten myös fibriinin muodostumisen ja siten enimmäkseen verihiutaleista ja fibriinistä koostuvan valtimoveritukoksen muodostumisen. APC:n käyttö alentaa toiminnoillaan kudostyyppisen plasminogeeniaktivaattorin (t-PA) tai muiden trobolyyttisten aineiden annosta. Niinpä APC tarjoaa käyttöön turvallisemman trombolyysin pienellä verenvuodon riskillä ja pienemmällä uudelleentukkeuman riskillä.

APC on tehokas hyytymistä estävä entsyymi in vitro ja in vivo. APC inhiboi verenhyytymisreitit sekä trombiinin muodostumisen F.Va:n ja F.VIIIa:n proteolyyttisellä pilkonnalla, ja se tehostaa myös fibrinolyysiä [Seegers et al., Thrombosis Res., 1, 443 - 460 (1972); Kisiel, J. Clin. Invest., 64, 761 - 769 (1979); Marlar & Griffin, J. Clin. Invest., 66, 1 186 - 1 189 (1980); Marlar et al., Blood, 59,

1 067 - 1 072 (1982); Clouse & Comp, New Engl. J. Med., 314, 1 298 - 1 304 (1986)]. APC muodostuu kiertävästä esiaineestaan, nimittäin K-vitamiinista riippuvaisesta proteiini C:stä (PC) aktivaatiossa verisuonten endoteelillä olevalla immobilisoidulla trombiinilla [Mammen et al., Thromb. Diath. Haemorrh., 5, 218 - 249 (1960); Stenflo, J. Biol. Chem., 251, 355 - 363 (1976); Esmon & Owen, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 2 249 - 2 252 (1981)]. Proteiini C-reitin kautta APC toimii entsyyminä, joka on keskeinen hyytymisen negatiiviselle palautesäätelylle. Peritty PC:n puutos on yhteydessä laskimon veritulppatukkeumasairauksiin [Griffin et al., J. Clin. Invest., 68, 1 370 - 1 373 (1981); Bertina et al., Thromb. Haemost., 48, 1 - 5 (1982); Griffin, Seminars in Thrombosis and Hemostasis, 10, 162 - 166 (1984); Marciniak et al., Blood, 65, 15 - 20 (1985)], mutta peritty proteiini C:n puutos ei ole merkittävästi yhteydessä valtimotukokseen [Coller et al., Arteriosclerosis, 7, 456 - 462 (1987)]. APC:n infuusio alentaa veren hyytyvyyttä useissa eri eläinmalleissa ja estää koagulopaattiset ja tappavat vaikutukset E. coli -infuusiossa paviaaneissa [Comp & Esmon, J. Clin. Invest., 68, 1 221 - 1 228 (1981); Comp et al., J. Clin. Invest., 70, 127 - 134 (1982); Colucci et al., J. Clin. Invest., 74, 200 - 204 (1984); Taylor et al., J. Clin. Invest., 79, 918 - 925 (1987); Burdick & Schaub, Thrombosis Res., 45, 413 - 419 (1987)]. Trombolyyttisen aineen, kuten t-PA:n infuusio ihmisiin johtaa tehokkaaseen trombolyysiin akuutissa sydänlihaksen infarktissa (AMI) [Yusuf et al., European Heart Journal, 6, 556 - 585 (1985); Eurooppalainen Yhteistyötutkimusryhmä, Lancet., 842 - 847 (1985)].

Keksinnön mukaiselle menetelmälle aktivoidun proteiini C:n valmistamiseksi on tunnusomaista se, mitä patenttivaatimuksessa 1 esitetään.

Keksinnön mukaisesti valmistettua farmaseuttista koostumusta voidaan käyttää menetelmässä, jolla estetään akuuttia valtimon tromboottista tukkeumaa, veritulppatukkeumaa tai ahtautumaa sepel-, aivo- tai etävaltimoissa tai verisuonisiirteissä, joka koostumus sisältää tehokkaan määrän plasmaperäistä tai rekombinanttituotettua aktivoitua proteiini C:tä yksin tai yhdistelmänä trombolyyttisen aineen kanssa, sellaisen kuin kudosplasminogeeniaktivaattori tai sen analogit, urokinaasi tai sen analogit, prourokinaasi tai sen analogit, streptokinaasi tai sen analogit, plasminogeenin tai plasmiinin asyloitu muoto tai niiden analogit ja asyloitu streptokinaasi-plasminogeeni -kompleksi. Kuvattua koostumusta voidaan käyttää tuotettaessa tai valmistettaessa lääkettä käytettäväksi menetelmässä, jolla estetään akuuttia valtimon tromboottista tukkeumaa, veritulppatukkeumaa tai ahtautumaa sepel-, aivo- tai etävaltimoissa tai verisuonisiirteissä.

Täydellisempi käsitys tästä keksinnöstä ja monista siihen liittyvistä eduista saadaan helposti, kun keksintö tulee paremmin ymmärretyksi perustuen seuraavaan yksityiskohtaiseen selitykseen yhdistettynä täydentäviin piirustuksiin, joissa kaikki kuvat koskevat pelkän APC:n tai APC:n ja trombolyyttisen aineen infuusion vaikutuksia paviaaneihin, joita on käytetty valtimotukoksen mallina.

Kuviot 1a - 3a esittävät alhaisen APC-annoksen infuusioiden vaikutuksen veren hyytymiseen mitattuna käyttämällä aktivoidun osittaisen tromboplastiiniajan (activated partial thromboplastin time) määrityksiä (APTT).

Kuviot 4a ja 5a esittävät korkean APC-annoksen infuusioiden vaikutuksen APTT:hen.

Kuviot 6a ja 7a esittävät APC:n ja t-PA:n yhdistelmän infuusioiden vaikutuksen APTT:hen.

Kuviot 1b - 5b esittävät APC:n ja kuviot 6b ja 7b APC:n sekä t-PA:n vaikutuksen verenvirtaukseen ja verenvuotoaikaan.

Kuviot 1c - 5c esittävät APC-infuusion tai APC- sekä t-PA-infuusion (kuviot 6c ja 7c) vaikutuksen verihiutaleiden saostumiseen (1. tukoksen muodostumiseen) Dacron-siirteissä analyyseistä radioleimattujen verihiutaleiden radiokuvaustulosaineistosta.

Kuvio 8 esittää t-PA-infuusion vaikutuksen verihiutaleiden saostumiseen (1. tuloksen muodostumiseen) Dacron-siirteissä analyyseistä radioleimattujen verihiutaleiden radiokuvaustulosaineistosta.

Tukosmalli

Valtimotukosmalli on testattu ja kuvattu aikaisemmissa kokeissa [Hanson & Harker, J. Clin. Invest., 75, 1 591 - 1 599 (1985); Hanson & Harker, Thromb. Haemostas., 53, 423 - 427 (1985); Hanson et al., Arteriosclerosis, 5, 595 - 603 (1985)]. Tämä malli on käyttökelpoinen arvosteltaessa lääkkeiden vaikutusta valtimotukoksen muodostumiseen. Koiraspuolisista 10 - 12 kg painavista paviaaneista häädettiin madot ja niitä tarkkailtiin yli 40 päivää eläinpalvelussa ennen kokeita. Reisivaltimon ja -laskimon väliin valmistettiin pysyvä valtimo-laskimo-ohituskytkös käyttämällä 3 mm:n läpimittaista Silastic-putkea. Seuraava 5 cm pitkien, 4 mm:n läpimittaisten Dacron-verisuonisiirteiden väliinasettaminen toimi trombogeenisenä pintana, joka sai aikaan jatkuvan verihiutale-fibriinitukoksen muodostuksen siihen asti, kunnes siirre progressiivisesti tukkeutui 70 ± 20 minuutissa. Käyttämällä rekombinanttituotettua APC:tä paviaanissa tässä paviaanien valtimotukosmallissa saatiin kokeellisia tuloksia, jotka viittaavat samanlaisiin tuloksiin plasmaperäisen APC:n kanssa.

APC:n ja t-PA:n anto

Kaikki paviaanit kävivät läpi ainakin yhden kontrollikokeen ennen APC:n antoa. APC annettiin ruiskuttamalla yhdestä neljäsosasta yhteen kolmasosaan koko PC-annoksesta boluksena ja jäljellä olevat kolmesta neljäsosasta kahteen kolmasosaan annoksesta jatkuvana infuusiona yhden tunnin ajan. Siirteen väliinasettaminen ja boluksen injektio tehtiin ajanhetkellä 0 ja APC annettiin Silastic-ohituskytköksen proksimaaliseen kohtaan. Kokeet jaettiin kolmeen ryhmään:"alhaisen annoksen" APC-ryhmä sai 2,0 - 3,4 mg (kokonaismäärä), "korkean annoksen" APC-ryhmä sai 11 mg (kokonaismäärä) ja yhdistelmäryhmä sai 2,1 mg APC:tä sekä 1,3 mg t-PA:ta (kokonaismäärät).

APC:n valmistus

Proteiini C:n lähteenä oli ihmisen plasman protrombiinikompleksikonsentraatti (Immuno AG, Wien). Valmistettiin PC:n kevyttä ketjua vastaan suunnattu monoklonaalinen vasta-aine (nimetty C3:ksi) ja liitettiin se CNBromidilla aktivoituun Sepharose 4B:hen (Pharmacia, Uppsala, Ruotsi), ja puskuriin (0,02 M/l Tris, 0,002 M/l EDTA; 0,002 M/l bentsamidiini; 0,1 M/l NaCl, 0,075 mM/l pAPMSF, 0,02 % Na-atsidi, 0,02 % Tween 20; pH 7,4) laimennettu protrombiinikompleksikonsentraatti siirrettiin pylvääseen. PC eluoitiin 2 M tiosyanaatilla ja dialysoitiin Tris-puskuroitua suolaliuosta (0,01 M/l Tris; 0,14 M/l NaCl, pH 7,4) vastaan. Puhdistettu PC aktivoitiin käyttäen trombiini-Sepharose-helmiä artikkelissa Marlar et al., Blood, 59, 1 067 - 1 072 (1982) kuvatulla tavalla.

Puhdistettu APC ilmeni SDS-PAGE:ssa kahtena juovana eikä mitään muiden proteiinien aiheuttamaa merkittävää (≥5 %) kontaminaatiota havaittu. Joissakin valmisteissa hyytymismäärityksellä toteen näytetyt vähäiset määrät trombiinia erotettiin käyttämällä joko Bio-Rex 70 -absorptiota tai nopeaa proteiininestekromatografiaa (Fast Protein Liquid Chromatography) (FPLC) -kromatografiaa Mono-Q-pylväällä (Pharmacia, Uppsala, Ruotsi). Puhdistetun APC:n aktiivisuus mitattiin aktivoitu osittainen tromboplastiiniaika (aktivated partial thromboplastin time) (APTT) -hyytymismäärityksellä [Marlar et al., Blood, 59, 1 067 - 1 072 (1982)], joka mittasi antikoagulanttiaktiivisuutta, sekä kromogeeninen substraatti -määrityksellä, ja tuloksia verrattiin aiemmin puhdistetun APC-valmisteen aktiivisuuteen sekä sellaisen APC:n aktiivisuuteen, jonka oli synnyttänyt PC-aktivaattorin, Protacin (American Diagnostica, Greenwich, CT), lisääminen normaaliin ihmisen plasmaan.

Puhdistetun APC:n amidolyyttisyys- ja antikoagulanttimääritykset

Eri määriä (0,5 - 5 mikrolitraa) APC-liuosta tai vertailupuhdistettua APC-liuosta (0,5 mg/ml) lisättiin 210 mikrolitraan puskuria, jossa oli 0,01 M Tris-HCl:a, 0,14 M NaCl:a, 1 % ovalbumiinia, 0,02 % natriumatsidia ja 0,05 % Tween 80:tä (pH 8,0), ja näytteet pantiin mikrotiitterilevyn kuoppiin (Corning, Dynatech-Immulon tai Costar). Kun oli lisätty 20 mikrolitraa kromogeenistä substraattia S-2401 (4,6 mM), muutos näytteen absorbanssissa luettiin käyttäen ELISA-levyn lukijaa huoneen lämpötilassa. APC:n amidolyyttinen aktiivisuus määritettiin vertaamalla havaittuja arvoja vertailuarvoihin. Antikoagulanttiaktiivisuus määritettiin käyttämällä APTT-määritystä. Tässä määrityksessä tehtiin normaalista ihmisen plasmasta (nhp) laimennoksia käyttäen laimennusaineena proteiini C:tä sisältämätöntä plasmaa (pcdp). 100 mikrolitraa näitä seoksia sekoitettiin 100 mikrolitran kanssa Protac-reagenssia (American Diagnostica) ja 100 mikrolitran kanssa APTT-reagenssia (General Diagnostics). 5 minuutin inkubaation jälkeen lisättiin 100 mikrolitraa $CaCl_2$:a (50 mM) ja hyytymisaika määritettiin. Koska nhp sisältää proteiini C:tä 4,0 mikrogrammaa/ml, tuntemattomien APC-liuosten aktiivisuus määritettiin vertaamalla nhp:n laimennoksille saatuihin standardikäyriin. Joissakin kokeissa standardikäyrät APC:n amidolyyttiselle aktiivisuudelle tehtiin käyttämällä Protacilla aktivoidun nhp:n laimennoksia. Joissakin kokeissa käytettiin S-2401:n sijasta S-2366:tta. Kaikkien APC-valmisteiden spesifinen aktiivisuus oli hyvässä sopusoinnissa APC-arvojen kanssa, jotka perustuivat proteiinipitoisuuteen, joka oli määritetty absorbanssilla 280 nm:ssä käyttäen ekstinktiokerrointa 1,4 per cm per mg/ml.

Näissä paviaanikokeissa kuvatut APC-annokset osoittavat APC-valmisteiden toiminnallisen aktiivisuuden verrattuna normaaliin ihmisen plasmaan ja puhdistettuun APC:hen standardeina. Puhdistetut APC-valmisteet osoittivat APTT-määritystä käyttämällä antikoagulanttivaikutusta ihmisen ja paviaanin plasmoihin ja pilkkoivat konsentraatiosta riippuvaisesti kromogeenisiä oligopeptidi-paranitroanilidisubstraatteja S-2366 ja S-2401 (Kabi, Tukholma, Ruotsi). Melanoomasolulinjasta peräisin olevan t-PA:n antoi käyttöön tri Desire Collen (Leuven, Belgia).

Tutkimukset APC:n antitromboottisten ominaisuuksien todistamiseksi valtimotukoksessa

Veren virtaus ohituskytköksessä

Veren virtaus mitattiin käyttäen Doppler-virtausmittaria, joka oli sovitettu Silastic-putken distaalisen osan ympärille. Arvot annettiin ml:ina/min ja ne

olivat alueella 100 - 200 ml/min (vastaa nopeutta 13,3 - 26,5 cm/s) tarjoten käyttöön valtimoirtausolosuhteet. Virtausarvot rekisteröitiin säännöllisin väliajoin koko kokeiden ajan. Menetelmä kuvataan artikkelissa Hanson & Harker et al., Arteriosclerosis, 5, 595 - 603 (1985).

Verihiutaleiden saostuminen Dacron-siirteessä

^{111}In-leimattujen verihiutaleiden saostuminen paljastettiin siirteen tuikekamerakuvilla. Verihiutaleiden leimausmenetelmät ja tulosaineistoanalyysi olivat samanlaiset kuin on kuvattu artikkelissa Hanson & Harker, Thromb. Haemostas., 53, 423 - 427 (1985), sillä ainoalla erolla, että yhtälö verihiutaleiden lukumäärälle siirteessä yksinkertaistettiin seuraavanlaiseksi:

$$\frac{\text{Cpm-siirre x verihiutaleiden määrä/ml}}{\text{Cpm/ml kokoverta}}$$

Kuvauksen kesto pidennettiin myös kahteen tuntiin siirteen aloittamisajasta (t = 0) ja APC-boluksesta APC-kokeissa. Koska verihiutaleiden saostuminen tavallisesti saavutti tasanteen kontrollikokeissa yhden tunnin sisällä, tätä yhden tunnin jaksoa ei ylitetty kuvattaessa verihiutaleiden saostumisen estymistä. Verihiutaleiden saostumisen inhibitio käsitellyissä eläimissä ilmaistiin %:eina kontrollikokeissa aikapisteissä 30 ja 60 minuuttia saostuneiden verihiutaleiden kokonaismäärästä. Yhtälöt estymisen laskemiseksi on esitetty taulukossa I. Koska verihiutaleiden saostuminen riippuu verihiutaleiden määrästä [Harker & Hanson, Thromb. Haemostas., 53, 423 - 427 (1985)], tehtiin verihiutaleiden saostumisen estymisen korjaus käyttäen taulukossa I annettua kaavaa.

Verenvuotoajat

Standardisoidut malliverenvuotoajat saatiin aikaan ajellulla kyynärvarren kämmenpuolen pinnalla ennen koetta ja kokeen aikana artikkelissa Malpass et al., Blood, 57, 736 - 740 (1981) kuvatulla tavalla kahdella viillolla, (kukin 5 mm pitkä, 1 mm syvä) verenpainemittarin puhalluslaajennuksella 40 mm Hg.

APC:n antikoagulanttivaikutusten ja in vivo- plasmatasojen testit

APC-infuusion antikoagulanttivaikutus mitattiin tekemällä APTT-määritykset säännöllisin väliajoin natriumsitraattiin otetusta valtimoverestä. Testi tehtiin 5 - 10 minuutin sisällä näytteenotosta, jotta minimoidaan APC:n in vitro -inhibitio plasman proteiini C -inhibiittor(e)illa. Kiertävän APC:n tasojen määrittämiseksi kehitettiin kromogeeninen amidolyyttinen testi. ELISA-mikrotiitterilevyt (Dynatech-Immulon tai Costar) peitettiin monoklonaalisella anti-proteiini C -vasta-aineella C3, joka ei vaikuta merkittävästi entsyymin amidolyyttiseen aktiivisuuteen. Veri

otettiin 3,8-%:isen sitraatin ja 4,6-%:isen bentsamidiinin liuokseen (9:1) ja välittömän sentrifugoinnin jälkeen saatu plasma pidettiin -80 °C:ssa kunnes se tutkittiin. 10 mikrolitraa tätä plasmanäytettä laimennettiin 160 - 200 mikrolitraan Tris-puskuroidulla suolaliuoksella, joka sisälsi 1 % BSA:ta kantajana ja 0,36 % bentsamidiiniä entsyymi-inhibiittorina, ja inkuboitiin yksi tunti 37 °C:ssa vasta-aineella peitetyissä kuopissa. Liuos poistettiin ja kuopat pestiin sitoutumattomien aineosien ja bentsamidiinin poistamiseksi. Sitten lisättiin kromogeeninen substraatti, joko S-2366 tai S-2401, ja substraatin pilkkoutumisnopeus mitattiin spektrofotometrisesti. Plasmanäytteiden APC-konsentraatio laskettiin kalibraatiokäyriltä standardi-APC-laimennoksia käyttäen.

Tulokset, jotka osoittavat APC:n olevan antitromboottinen valtimovirtausolosuhteissa

Kuviot 1a - 3a esittävät APTT:n pitkittymisen "alhaisen annoksen" kokeissa (avoimet ympyrät). 2,0 - 3,4 mg:n kokonaisannos ihmisen APC:tä suurinpiirtein kaksinkertaisti APTT-arvot keskimäärin. APC-infuusion päättämisen jälkeen (pystysuora nuoli) APTT-arvot alenivat progressiivisesti ja amidolyyttiseen aktiivisuuteen perustuen mitattu APC-taso aleni (yhtenäinen viiva) viitaten verenkierrossa puoliintumisikään 12 - 16 minuuttia. Kuviot 4a ja 5a esittävät "korkean annoksen" APC:n vaikutuksen APTT:hen. 11 mg:n APC-anto johti 3 - 4-kertaiseen APTT:n pitkittymiseen molemmissa kokeissa. APTT-muutosten kaavio ja mitattu APC-taso infuusion päättämisen jälkeen osoittavat samanlaisia APC:n puoliintumisiän arvoja (noin 12 minuuttia) näille korkeammille APC-annoksille. APC:n (2,1 mg) ja t-PA:n (1,3 mg) yhdistelmällä oli samanlainen vaikutus APTT:hen kuin alhaisella APC-annoksella oli yksin (kuviot 6a ja 7a). Yhdessäkään kokeista ei APTT tarkkailun päättyessä (ajanhetkellä 120 min) alentunut lähtöarvoon (ajanhetki 0 min).

Samat kuviot (kuviot 1a - 7a) osoittavat muutokset edellä kuvatulla kromogeenisellä määrityksellä mitatuissa APC-tasoissa (umpinaiset ympyrät). Mitattiin plasman APC-konsentraation yleinen alue 0,38 - 0,70 mikrogrammaa/ml "alhaisen annoksen" kokeissa (kuviot 1a - 3a), 0,94 - 1,64 mikrogrammaa/ml "korkean annoksen" kokeissa (kuviot 4a ja 5a) ja 0,30 - 0,90 mikrogrammaa/ml yhdistelmäkokeissa. Paviaaneissa APC:n puoliintumisikä verenkierrossa amidolyyttisen aktiivisuuden määrityksillä määritettynä oli samanlainen kuin se, joka määritettiin APTT-määrityksistä, APC-entsyymin kokonaisannoksesta välittämättä. In vivo kiertävät APC-tasot eivät täysin palautuneet lähtöarvoihin kahdessa tunnissa. Korkean annoksen kokeissa käytettyjen APC-annosten viisinkertainen ero

alhaisen annoksen kokeisiin verrattuna ei johtanut viisi kertaa korkeampiin kiertävän APC:n tasoihin, viitaten APC:n tehokkaaseen puhdistamiseen tai tilapäisen varastoinnin mekanismiin tai reseptorivälitteiseen säätelyyn.

Kuudessa seitsemästä kokeesta verenvuotoajat pysyivät normaalilla alueella (kuviot 1b ja 3b - 7b pystysuorat segmentit) vähäisellä keskimääräisellä kohoamisella. "Alhaisen annoksen" kokeista yhdessä verenvuotoajat olivat pitkittyneitä ja epänormaaleja ennen koetta, kokeen aikana ja kokeen jälkeen. Koska verenvuotoaika tällä eläimellä oli epänormaalin pitkä ennen APC-infuusiota, ei APC-infuusion aikana havaittu pitkä verenvuotoaika johtunut APC:stä. Nämä tulokset viittaavat siihen, että kiertävä APC ei käytettyinä annoksina muuta merkittävästi standardisoiduilla verenvuotoaikatekniikoilla mitattua hemostaattista verihiutaletoimintaa. Kudosvauriokohdissa (1. ompelulaskoksissa) ei havaittu mitään korkeammille t-PA-annoksille tyypillisiä mustelmia, verenpurkaumia tai uudelleenvuotoja.

Verenvirtaus pysyi pienentymättömänä kokeissa APC-annon aikana (kuviot 1b - 7b, kiinteät ympyrät) vastakohtana kontrollikokeille samoilla eläimillä, joissa säännöllisesti tapahtui tukkeuma. Kuusi seitsemästä siirteestä pysyi auki koko tarkkailujakson ajan hyvällä valtimovirtauksella. APC-t-PA-kokeista yhdessä (kuvio 6b) Dacron-siirre petti 115 minuutin kohdalla. Neljässä yhdeksästä kontrollitutkimuksesta siirteet tukkeutuivat yhden tunnin sisällä ja nämä siirteet pettävät 70 ± 20 minuutissa, kun verenkierrossa ei ole mitään tehokasta antitromboottista ainetta. Verenvirtauksen muutokset kahdessa kontrollikokeessa on esitetty kuviossa 3b ja kuviossa 7b. Kuvio 3b esittää toisen kontrollin virtausnopeudet, kun siirre pysyi auki 1 tuntiin saakka (ensimmäinen siirre tukkeutui). Kuviossa 7b voidaan havaita kontrollisiirteen nopea progressiivinen tukkeuma. Nämä tulosaineistot osoittavat, että APC yksin tai yhdistelmänä t-PA:n kanssa on valtimovirtausolosuhteissa antitromboottinen. Korkean annoksen APC-kokeet osoittivat pitkäkestoisia antitromboottisia vaikutuksia, koska virtaus ei muuttunut merkittävästi koko kahden tunnin aikana.

Kuviot 1c - 7c esittävät tulokset radiokuvaustulosaineiston analyyseistä. Arvot ilmaisevat Dacron-siirteissä saostuneiden verihiutaleiden kokonaismäärän maksimille yhdessä tunnissa kontrolli- ja kahdessa tunnissa APC-kokeissa. Kiinteät ympyrät (—) osoittavat valtimotukoksen muodostuksesta saostuneiden verihiutaleiden lukumäärän, kun APC:tä infusoitiin, kun taas avoimet ympyrät (—) esittävät samoilla eläimillä tehtyjen kontrollikokeiden tulokset. Kontrolleissa voidaan nähdä tyypillinen sigmoidinen käyrä, kuten artikkelissa

Hanson & Harker, Thromb. Haemostas., 423 - 427 (1985) on kuvattu. Kontrolleihin verrattuna verihiutaleiden saostuminen siirteissä estyi merkittävästi jokaisessa APC- tai APC-t-PA-kokeessa. Estymisen aste annetaan prosentteina taulukossa I. Korjatut arvot verihiutaleiden saostumisen estymiselle (I_2, taulukko I) olivat 34 %, 52 % ja 42 % vastaavasti "alhaisen annoksen" kokeissa 30 minuutin kohdalla (keskiarvo: 43 %) (kuviot 1c - 3c). "Korkean annoksen" kokeissa arvot olivat 74 % ja 64 % 30 minuutin kohdalla (keskiarvo: 69 %) ja 72 % ja 83 % 60 minuutin kohdalla (keskiarvo: 78 %) (Kuviot 4c ja 5c) ja APC-t-PA-kokeissa 53 % ja 36 % 30 minuutin kohdalla (keskiarvo: 45 %) (Kuviot 6c ja 7c). Korkean annoksen tutkimuksissa nähtiin APC-infuusion päättämisen jälkeen pitkäkestoinen verihiutaleiden saostumisen estyminen. Kuvio 8 esittää muutamien aikaisempien kokeiden tulokset t-PA:lla samassa koemallissa. Näissä kokeissa infuusiolla 1 mg:lla t-PA:ta (0,1 mg/kg/tunti) oli keskivoimakas verihiutalevastainen vaikutus.

Tulokset antavat todistusaineistoa siitä, että ihmisen APC estää valtimotukoksen muodostumista annoksesta riippuvaisesti ja että APC:n yhdistelmä t-PA:n kanssa estää valtimotukoksen muodostumista. Tämä osoittaa, että APC-infuusio voisi alentaa t-PA:n antitromboottista annosta. Nämä APC:n vaikutukset saavutetaan ilman verenvuotoajan merkittävää pidentymistä ja ilman verenvuotoriskejä.

Ihmisen APC:n infuusiota yksin tai yhdistelmänä trombolyyttisen aineen (t-PA) kanssa voidaan käyttää terapeuttisena aineena ihmisillä, joilla on valtimotukkeuma. Tutkimusten tulokset antavat todistusaineistoa siitä, että APC on hyvin tehokas antitromboottinen aine valtimovirtausolosuhteissa plasmatasoilla 0,24 - 1,6 mikrogrammaa/ml.

Kokeista voidaan päätellä, että APC yksin tai yhdistelmänä trombolyyttisen aineen kanssa on merkittävän tehokas antitromboottinen aine kompleksiselle tukoksen muodostumiselle valtimovirtausolosuhteissa.

APC yksin tai APC:n yhdistelmä trombolyyttisen aineen, kuten t-PA:n kanssa, estää sekä verihiutaleiden että fibriinin muodostuksen osallistumista kompleksin tyypin akuuttiin valtimotukokseen, prosessiin, joka on vasteeton hepariinille tai tällä hetkellä saatavilla oleville verihiutalevastaisille lääkkeille käytettynä yksin tai yhdistelmässä. Koska APC on fysiologinen materiaali, sen annolla on tehokkaita antitromboottisia vaikutuksia ilman, että se aiheuttaa primäärisen hemostaasin merkittävää heikkenemistä (mitattuna verenvuotoaikatesteillä) tai selvää toksisuutta.

Hoito käyttämällä APC:tä yksin tai APC:tä yhdistelmänä trombolyyttisen aineen kanssa on käyttökelpoinen verisuoniston sairauksille, jotka aiheuttavat valtimotukoksen.

Muutamiin esimerkkeihin valtimotukoksista, joissa APC yksin tai yhdistelmänä trombolyyttisen aineen kanssa on käyttökelpoinen, sisältyvät seuraavat kliiniset tilat.

1. Akuutti valtimon tromboottinen tukkeuma, mukaanlukien sepel-, aivo- tai etävaltimot.

2. Akuutti tromboottinen tukkeuma tai uudelleenahtautuma verisuoniplastiikan jälkeen.

3. Uudelleentukkeuma tai uudelleenahtautuma trombolyyttisen hoidon jälkeen. Trombolyyttiset aineet, esimerkiksi t-PA, pelastavat verettömän kudoksen käytettynä tuntien sisällä akuutista sydänkohtauksesta tai -halvauksesta saamalla uudelleen aikaan verenvirtauksen tukkeutuneessa valtimossa. Nykyisin yhdellä neljäsosalla ja yhdellä kolmasosalla potilaista, joilla on onnistunut trombolyyttinen tukkeutuneiden sepelvaltimoiden uudelleenläpäisy, esiintyy myöhemmin uudelleentukkeuma t-PA-infuusion keskeyttämisen jälkeen. Tämä komplikaatio tapahtuu huolimatta täyden annoksen hepariinihoidosta. APC:llä tulee olemaan suurempi teho kuin hepariinilla uudelleentukkeuman estämisessä.

4. Pienen ja suuren kokoluokan verisuonisiirteen tukkeuma. Pienen kokoluokan verisuonisiirteillä, ts. on läpimitaltaan 3-/mm, on korkea tromboottisen tukkeuman esiintymistiheys. APC yksin tai yhdistelmänä trombolyyttisen aineen kanssa on käyttökelpoinen tukkeuman estämiseen.

5. Hemodialyysi. Kaikkien hemodialysaattoreiden prosteettiset pinnat ja virtauskonstruktio ovat trombogeenisiä. Nykyisin dialyysin aikana infusoidaan hepariinia. Hepariini on kuitenkin vain osittain tehokas, rajoittaen siten dialysaattoreiden uudelleenkäyttöä. Hepariinilla on myös joukko hankalia sivuvaikutuksia ja komplikaatioita.

6. Sydän-keuhko-ohituskirurgia. Nykyisin käytetään hepariinia estämään tukkeuman muodostuminen hapettajassa ja pumppulaitteistossa. Se ei kuitenkaan pysty estämään verihiutaleiden aktivoitumista ja tuloksena olevaa tilapäistä verihiutaleiden toimintahäiriötä, joka tekee alttiiksi verenvuoto-ongelmille leikkauksen jälkeen.

7. Sydämen vasemman kammion apulaite. Tämä prosteettinen pumppu on hyvin trombogeeninen ja johtaa elämää uhkaaviin veritulppatukkeumiin -

komplikaatioihin, jotka ovat vain osittain vähennettävissä tavanomaisilla antikoagulanteilla (hepariini tai kumariinilääkkeet).

8. Täydellisesti keinotekoinen sydän ja vasemman kammion apulaitteet.

9. Muu valtimotukos. APC on käyttökelpoinen valtimotukokseen tai veritulppatukkeumaan, joissa nykyisille terapeuttisille toimenpiteille joko on esteitä tai ne eivät ole tehokkaita. APC on esimerkiksi käyttökelpoinen hoidettaessa akuuttia pre- tai postkapillaarista tukkeumaa mukaan lukien transplantaatiot, verkkokalvotukosta, tai minkä tahansa elimen hiussuonitukkoista nekroosia, joka on komplikaationa infektioista, kasvaimista tai kumariinihoidosta.

Yhteenvetona, ihmisen APC, luonnollisesti esiintyvä fysiologinen antritromboottinen ihmisen proteiini, on parempi kuin muut saatavilla olevat antitromboottiset lääkkeet ajateltaessa verevuotopyrkimystä (hepariini, trombolyyttiset lääkkeet, verihiutalevastaiset lääkkeet), toksisuutta (jotkut verihiutalevastaiset lääkkeet), antigeenisyyttä (streptokinaasi), puhdistumanopeutta (hepariini, verihiutalevastaiset lääkkeet), teratogeenisyyttä (kumariinijohdannaiset), yleisiä sivuvaikutuksia (verihiutalevastaiset lääkkeet), välittömän tehokkuuden puutetta (verihiutalevastaiset lääkkeet, kumariinijohdannaiset), allergisia reaktioita (verihiutalevastaiset lääkkeet, streptokinaasi, hepariini), ja verenpainetta alentavia vaikutuksia (prostasykliini).

APC yhdistettynä t-PA:n tai muun trombolyyttisen aineen kanssa parantaa pelkän trombolyyttisen aineen antitromboottista vaikutusta. APC-hoito voi siten alentaa t-PA:n tai muiden trombolyyttisten aineiden annoksia, jotka vaaditaan tromboosin hoidolliseen käsittelyyn, ja siten vältetään korkeiden trombolyyttisten aineiden annosten kompolikaatiot.

104790

Taulukko I

Siirreverihiutaleiden saostumisen estyminen APC/t-PA:lla

	Verihiutaleiden lukumäärä miklitraa kohti		Siirteeseen saostuneet verihiutaleet x 10^{-9}				Estyminen (* %			
Eläin # Alhainen APC-annos	Verihiutaleiden määrä x 10^{-3} Kontrolli	Lääke	Kontrolli 30'	Kontrolli 60'	Lääke 30'	Lääke 60'	Korjaamaton = I_1 30'	Korjaamaton = I_1 60'	Korjattu = I_2 30'	Korjattu = I_2 60'
87 - 05	445	225	9,3	--	3,2	5,8	67	--	34	--
86 - 02	415	445	10,0	13,1	5,2	6,4	48	51	52	54
86 - 00	388	337	6,0	--	3,0	6,2	50	--	42	--
					Keskiarvo:		55	51	43	54
Korkea APC-annos										
86 - 11	173	135	1,5	2,3	0,3	0,5	80	78	74	72
87 - 15	429	340	14,6	22,7	4,2	3,0	71	87	64	83
					Keskiarvo:		76	83	69	78
APC ja t-PA										
87 - 15	429	380	14,6	22,7	6,1	6,7	58	71	53	67
87 - 02	491	430	12,7	--	7,1	--	44	--	36	--
					Keskiarvo:		51	71	41	67

*) $I_1 = (1 - \frac{PDA}{PD_C} \times 100$, $I_2 = (1 - \frac{PD_A}{PD_C} \times \frac{PC_C}{PC_A}) \times 4100$

PD = verihiutaleiden saostuminen
PC = verihiutaleiden määrä

A = APC
C = Kontrolli

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä eristetyn aktivoidun proteiini C:n valmistamiseksi, koostumuksen muodostamiseksi, joka sisältää puhdistettua ja eristettyä aktivoitua proteiini C:tä, jonka puhtaus on vähintään 95 %, terapeuttisesti käytettäväksi akuutin valtimon tromboottisen tukkeuman, veritulppatukkeuman, sepel-, aivo- tai etäisvaltimoiden tai verisuonisiirteiden ahtautumien ehkäisemiseen tai valtimon verihiutaleiden saostumisen ehkäisemiseksi, t u n n e t t u siitä, että

A) puhdistetaan proteiini C lähteestä, joka sisältää proteiini C:tä, jolloin proteiini C puhdistetaan käyttämällä immunoaffiniteettikolonnia, johon on sidottuna vasta-aine, joka sitoutuu proteiini C:n kevyeeseen ketjuun, ja

B) aktivoidaan puhdistettu proteiini C käyttämällä immobilisoitua trombiinia muodostamaan aktivoidun proteiini C:n koostumuksessa,

C) otetaan talteen puhdistettu ja eristetty proteiini C, jonka puhtaus on vähintään 95 %, ja mahdollisesti

D) lisätään trombolyyttinen aine tai trombolyyttisten aineiden yhdistelmä koostumukseen.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että lähde on plasma, plasmaperäinen tai rekombinanttiperäinen.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että lähde on ihmisplasmafraktio.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että lähde on plasmaprotrombiinikompleksikonsentraatti.

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että ennen vaihetta D) eristetystä aktivoidusta proteiini C:stä poistetaan mahdollinen trombiini käyttäen Bio-Rex 70 tai nopeata proteiininestekromatografiaa.

6. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että trombolyyttinen aine on kudosplasminogeeniaktivaattori, urokinaasi, prourokinaasi, streptokinaasi, plasminogeenin tai plasmiinin asyloitu muoto tai asyloitu streptokinaasi-plasminogeeni-kompleksi.

7. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että puhdistettua ja eristettyä aktivoitua proteiini C:tä on läsnä määränä, joka on riittävä luovuttamaan aktivoitua proteiini C:tä annoksena 0,2 - 1,1 mg/kg/h.

8. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 7 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että siinä lisäksi valmistetaan farmaseuttinen koostumus, joka sisältää tarpeeksi puhdistettua ja aktivoitua proteiini C:tä, jonka puhtaus on vähintään

95 %, yhdessä farmaseuttisesti hyväksyttävän kantajan kanssa yksin tai trombolyyttisen aineen kanssa tai trombolyyttisten aineiden yhdistelmän kanssa.

9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että puhdistettua, aktivoitua ja eristettyä proteiini C:tä on läsnä määränä, joka on riittävä luovuttamaan aktivoitua proteiini C:tä annoksena 0,07 mg/kg/h - 1,1 mg/kg/h, yhdessä trombolyyttisen aineen kanssa tai trombolyyttisten aineiden yhdistelmän kanssa.

10. Patenttivaatimuksen 8 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että tarpeeksi aktivoitua proteiini C:tä sekoitetaan kantajan kanssa, jotta saavutettaisiin aktivoidun proteiini C:n plasmapitoisuus välillä 0,1 - 1,6 µg/ml.

11. Patenttivaatimuksen 8 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että trombolyyttinen aine on kudosplasminogeeniaktivaattori, jota käytetään määränä, joka on riittävä aiheuttamaan syntyvälle koostumukselle plasminogeeniaktivaattoriannos, joka on 0,1 - 0,4 mg/kg/h.

12. Patenttivaatimuksen 8 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kudosplasminogeeniaktivaattoria käytetään määränä, joka on riittävä aiheuttamaan syntyvälle koostumukselle plasminogeeniaktivaattoriannos, joka on noin 0,13 mg/kg/h.

13. Immunoadsorbentti, jota käytetään jonkin patenttivaatimuksen 1 - 8 mukaisessa menetelmässä proteiini C:n eristämiseksi lähteestä, joka sisältää proteiini C:tä, ja joka immunoadsorbentti käsittää kantajaan sidotun vasta-aineen, joka on spesifinen proteiini C:n kevyelle ketjulle.

Patentkrav

1. Förfarande för framställning av isolerat, aktiverat protein C för att bilda en komposition, som innehåller renat och isolerat, aktiverat protein C med en renhet på minst 95 % för terapeutiskt bruk för att förhindra akut arteriell trombotisk ocklusion, tromboembolism eller förträngning i krans-, cerebral- eller perifera artärer eller blodkärlstransplantationer eller för att förhindra utfällning av blodplättar i artärerna, k ä n n e t e c k n a t av att man

A) renar protein C ur en källa som innehåller protein C, varvid protein C renas genom att använda en immunoaffinitetskolonn, i vilken man bundit en antikropp som binds vid den lätta kedjan av protein C, och

B) aktiverar det renade proteinet C genom att använda immobiliserat trombin för att bilda aktiverat protein C i en komposition,

C) tar tillvara det renade och isolerade proteinet C med en renhet på minst 95 %, och eventuellt

D) tillsätter ett trombolytiskt medel eller en kombination av trombolytiska medel i kompositionen.

2. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t av att källan är plasma, härstammar från plasma eller är av rekombinant ursprung.

3. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t av att källan är en fraktion av humanplasma.

4. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t av att källan är ett koncentrat av ett plasmaprotrombinkomplex.

5. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t av att man ytterligare, före steg D), avlägsnar eventuellt trombin från det isolerade, aktiverade proteinet C, genom att använda Bio-Rex 70 eller snabb proteinvätskekromatografi.

6. Förfarande enligt något av patentkraven 1 - 5, k ä n n e t e c k n a t av att det trombolytiska medlet är en vävnadsplasminogenaktivator, urokinas, prourokinas, streptokinas, plasminogen eller en acylerad form av plasmin eller acylerat streptokinas-plasminogenkomplex.

7. Förfarande enligt något av patentkraven 1 - 6, k ä n n e t e c k n a t av att det renade och isolerade, aktiverade proteinet C föreligger i en mängd som räcker för att avge aktiverat protein C i en dos på 0,2 - 1,1 mg/kg/h.

8. Förfarande enligt något av patentkraven 1 - 7, k ä n n e t e c k n a t av att man där ytterligare framställer en farmaceutisk komposition, som

innehåller tillräckligt renat och aktiverat protein C med en renhet på minst 95 %, tillsammans med en farmaceutiskt godtagbar bärare enskilt eller tillsammans med ett trombolytiskt medel eller en kombination av trombolytiska medel.

9. Förfarande enligt patentkrav 8, k ä n n e t e c k n a t av att det renade och isolerade, aktiverade proteinet C föreligger i en mängd som räcker för att avge aktiverat protein C i en dos på 0,07 mg/kg/h - 1,1 mg/kg/h, tillsammans med ett trombolytiskt medel eller en kombination av trombolytiska medel.

10. Förfarande enligt patentkrav 8, k ä n n e t e c k n a t av att man blandar tillräckligt med aktiverat protein C med en bärare, för att uppnå en plasmakoncentration av aktiverat protein C på mellan 0,1 - 1,6 µg/ml.

11. Förfarande enligt patentkrav 8, k ä n n e t e c k n a t av att det trombolytiska medlet är en vävnadsplasminogenaktivator, som används i en mängd som räcker för att ge den uppkomna kompositionen en plasminogenaktivatordos, som är 0,1 - 0,4 mg/kg/h.

12. Förfarande enligt patentkrav 8, k ä n n e t e c k n a t av att man använder vävnadsplasminogenaktivatorn i en mängd som räcker för att ge den uppkomna kompositionen en plasminogenaktivatordos som är ca 0,13 mg/kg/h.

13. Immunoadsorbent som används i förfarandet enligt något av patentkraven 1 - 8 för att isolera protein C ur en källa som innehåller protein C och vilken immunoadsorbent innehåller en till en bärare bunden antikropp, som är specifik för den lätta kedjan i protein C.

Figure 1

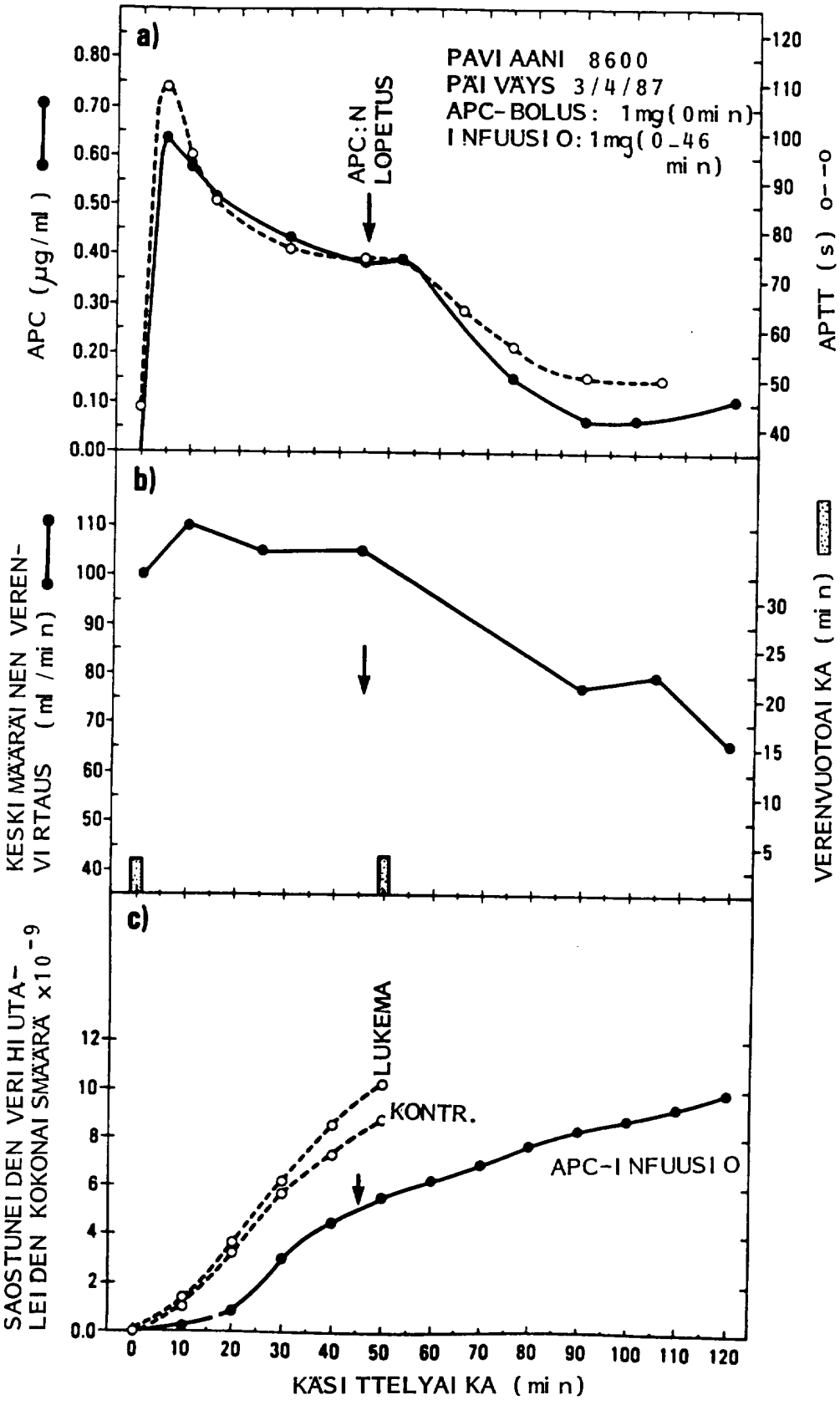
a)
PAVI AANI 8600
PÄI VÄYS 3/4/87
APC-BOLUS: 1mg(0min)
I NFUUSI O: 1mg(0-46 mi n)
APC:N LOPETUS
APC (µg/ml)
APTT (s) o--o
b)
KESKI MÄÄRÄI NEN VEREN-VI RTAUS (ml/mi n)
VERENVUOTOAI KA (mi n)
c)
SAOSTUNEI DEN VERI HI UTA-LEI DEN KOKONAI SMÄÄRÄ x10⁻⁹
LUKEMA
KONTR.
APC-I NFUUSI O
KÄSI TTELYAI KA (mi n)

Figure 2

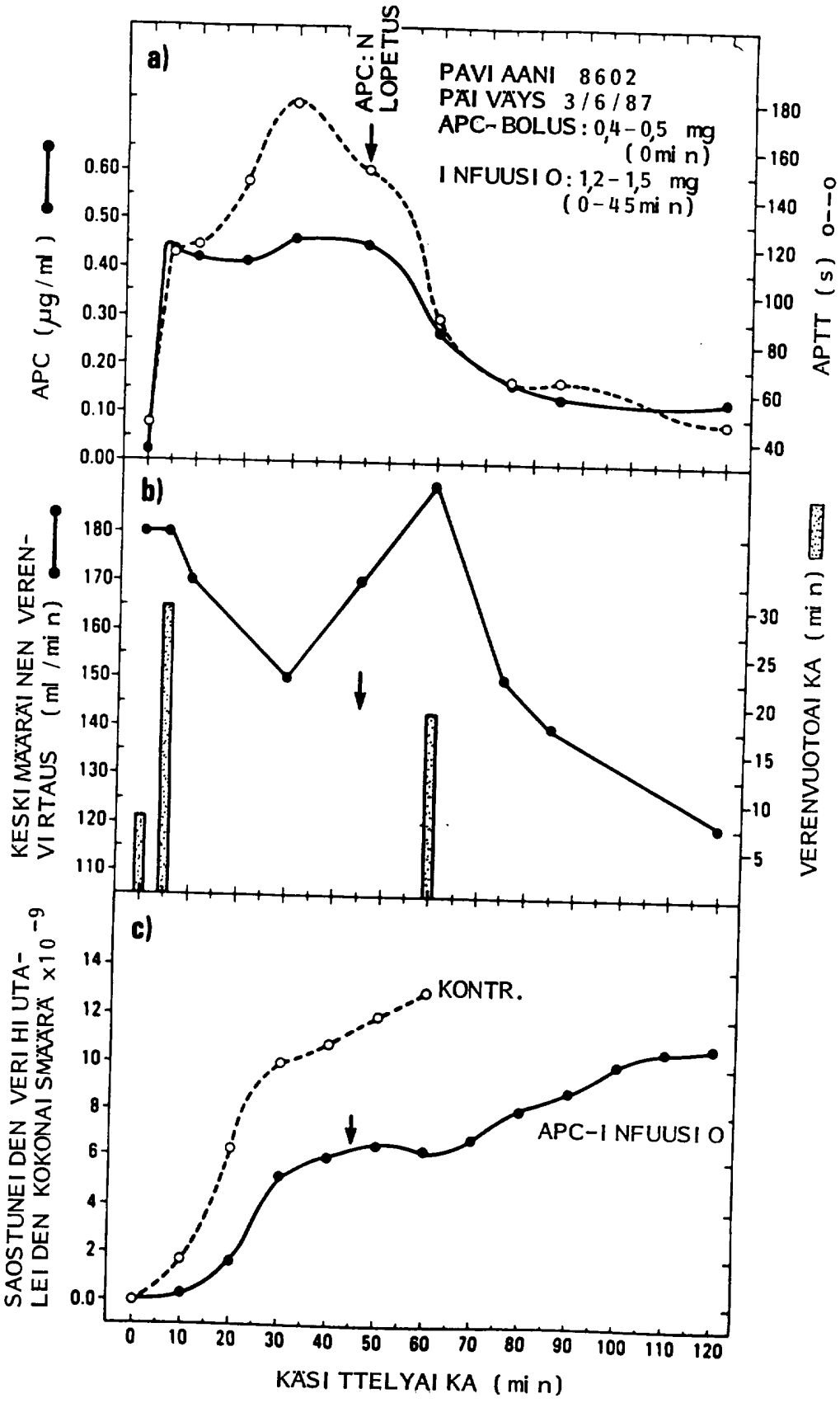
a)
APC:N LOPETUS
PAVI AANI 8602
PÄI VÄYS 3/6/87
APC-BOLUS: 0,4-0,5 mg
(0 min)
I NFUUSI O: 1,2-1,5 mg
(0-45 min)
APC (µg/ml)
APTT (s) o--o
b)
KESKI MÄÄRÄI NEN VEREN-
VI RTAUS (ml/min)
VERENVUOTOAI KA (min)
c)
SAOSTUNEI DEN VERI HI UTA-
LEI DEN KOKONAI SMÄÄRÄ x10⁻⁹
KONTR.
APC-I NFUUSI O
KÄSI TTELYAI KA (min)

Figure 3

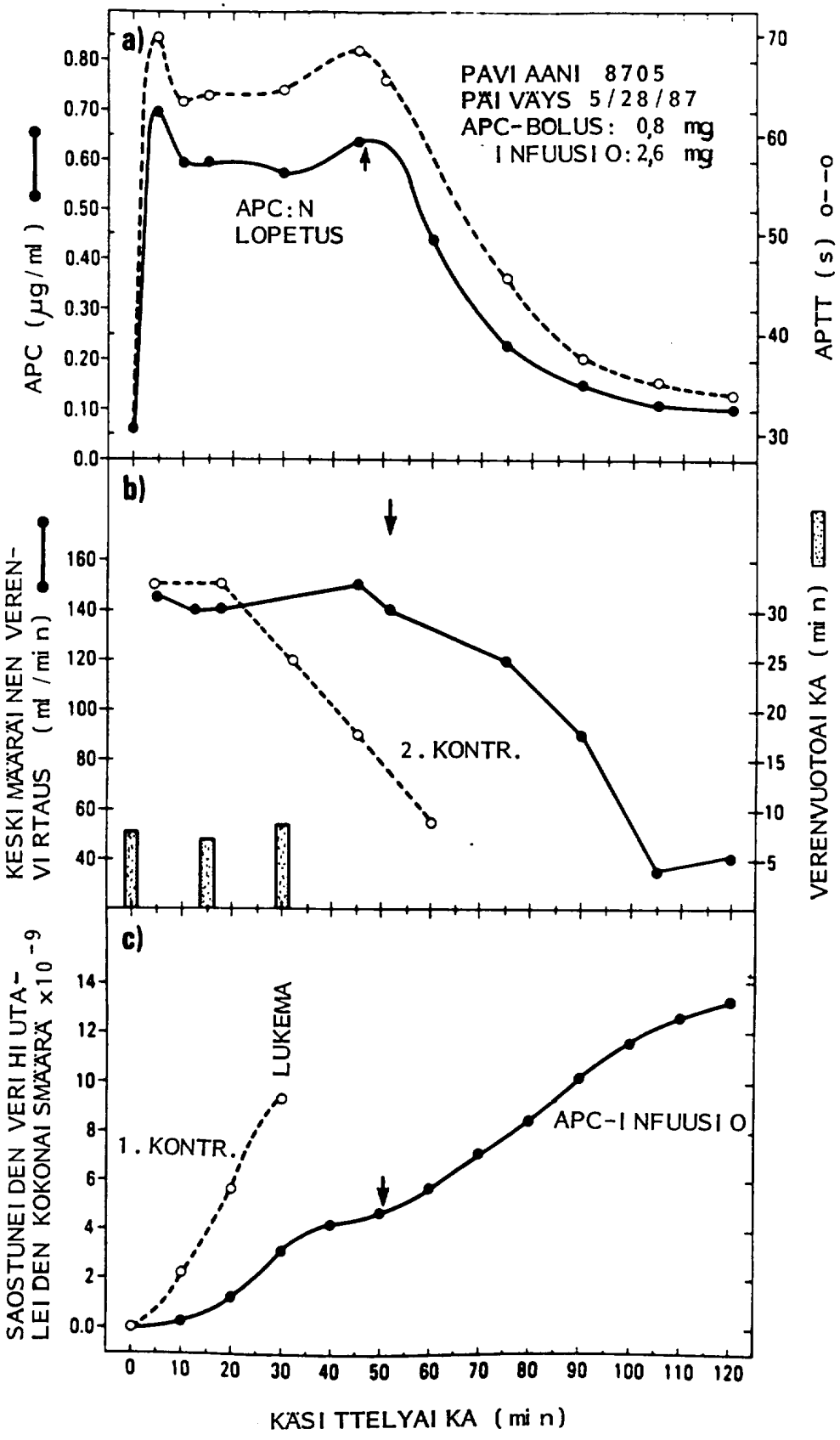
a)
b)
c)
PAVIAANI 8705
PÄIVÄYS 5/28/87
APC-BOLUS: 0,8 mg
INFUUSIO: 2,6 mg
APC:N LOPETUS
APC (µg/ml)
APTT (s) o--o
KESKIMÄÄRÄINEN VERENVIRTAUS (ml/min)
VERENVUOTOAIKA (min)
2. KONTR.
SAOSTUNEIDEN VERIHIUTALEIDEN KOKONAISMÄÄRÄ x10⁻⁹
LUKEMA
1. KONTR.
APC-INFUUSIO
KÄSITTELYAIKA (min)

Figure 4

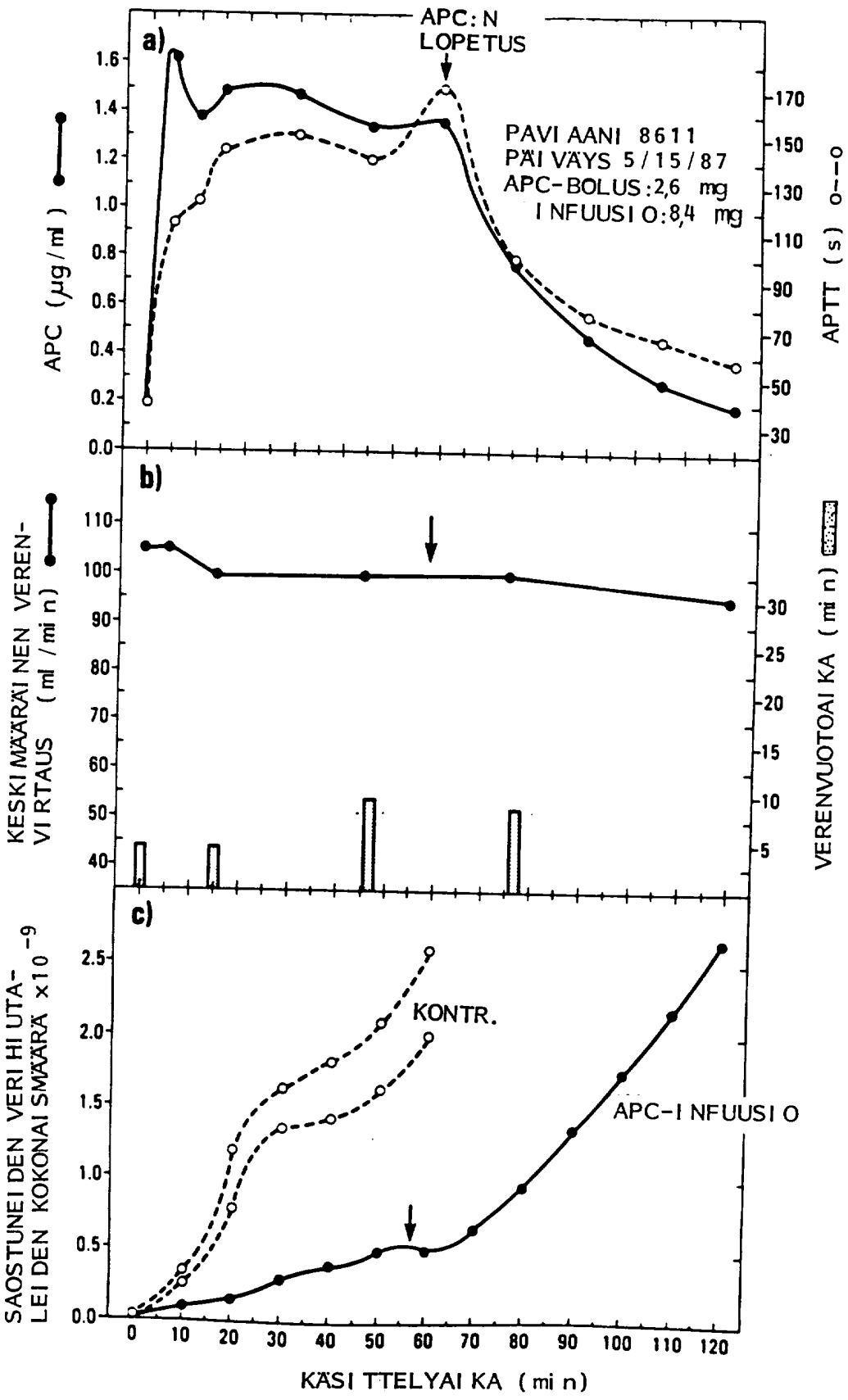
APC:N
LOPETUS
a)
PAVIAANI 8611
PÄIVÄYS 5/15/87
APC-BOLUS:2,6 mg
INFUUSIO:8,4 mg
APC (µg/ml)
APTT (s) o--o
b)
KESKIMÄÄRÄINEN VERENVIRTAUS (ml/min)
VERENVUOTOAIKA (min)
c)
SAOSTUNEIDEN VERIHIUTALEIDEN KOKONAISMÄÄRÄ x10⁻⁹
KONTR.
APC-INFUUSIO
KÄSITTELYAIKA (min)

Figure 5

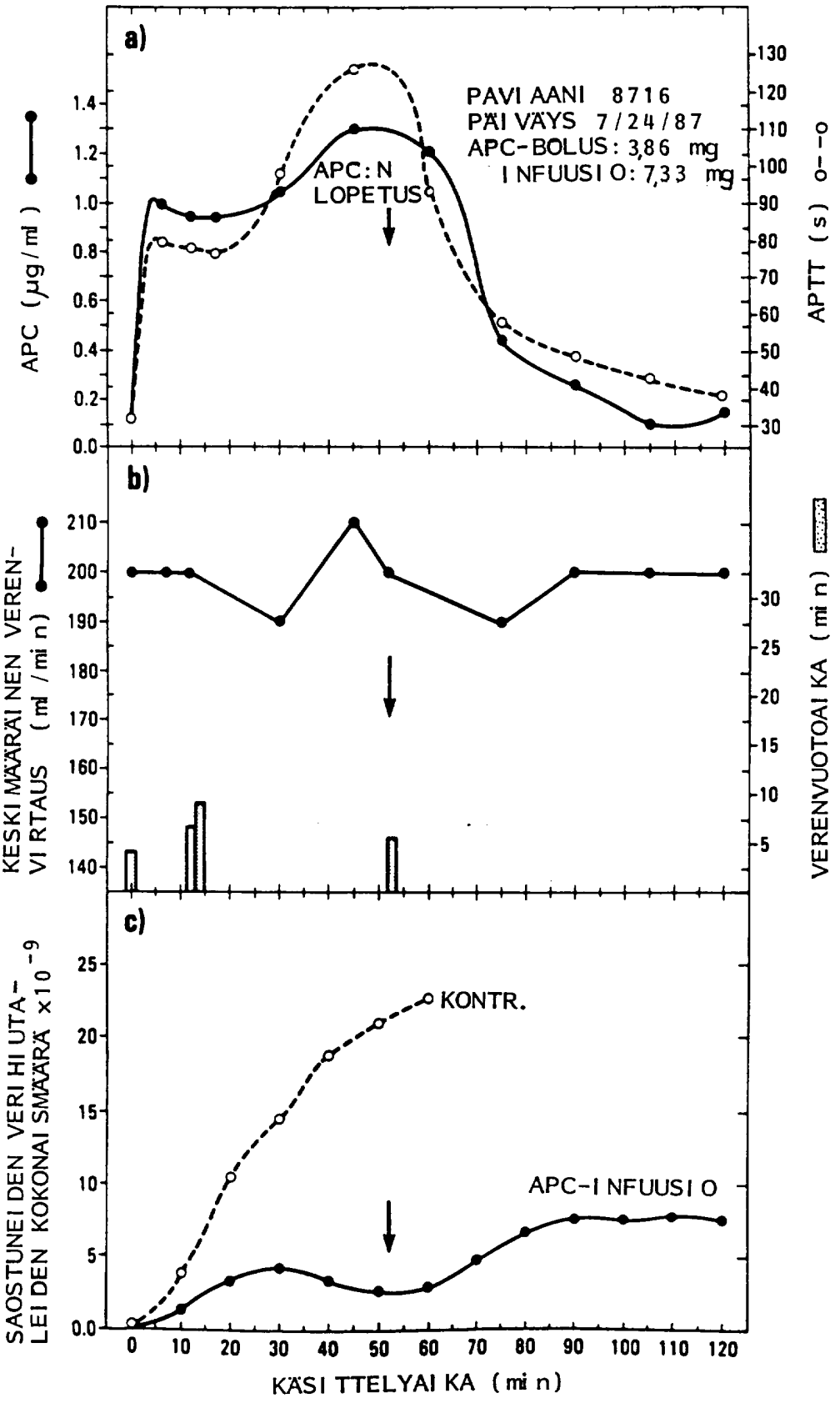
a)
PAVI AANI 8716
PÄIVÄYS 7/24/87
APC-BOLUS: 3,86 mg
INFUUSIO: 7,33 mg
APC:N LOPETUS
APC (µg/ml)
APTT (s) o--o
b)
KESKIMÄÄRÄINEN VERENVIRTAUS (ml/min)
VERENVUOTOAIKA (min)
c)
SAOSTUNEIDEN VERIHIUTALEIDEN KOKONAISMÄÄRÄ x10⁻⁹
KONTR.
APC-INFUUSIO
KÄSITTELYAIKA (min)

Figure 6

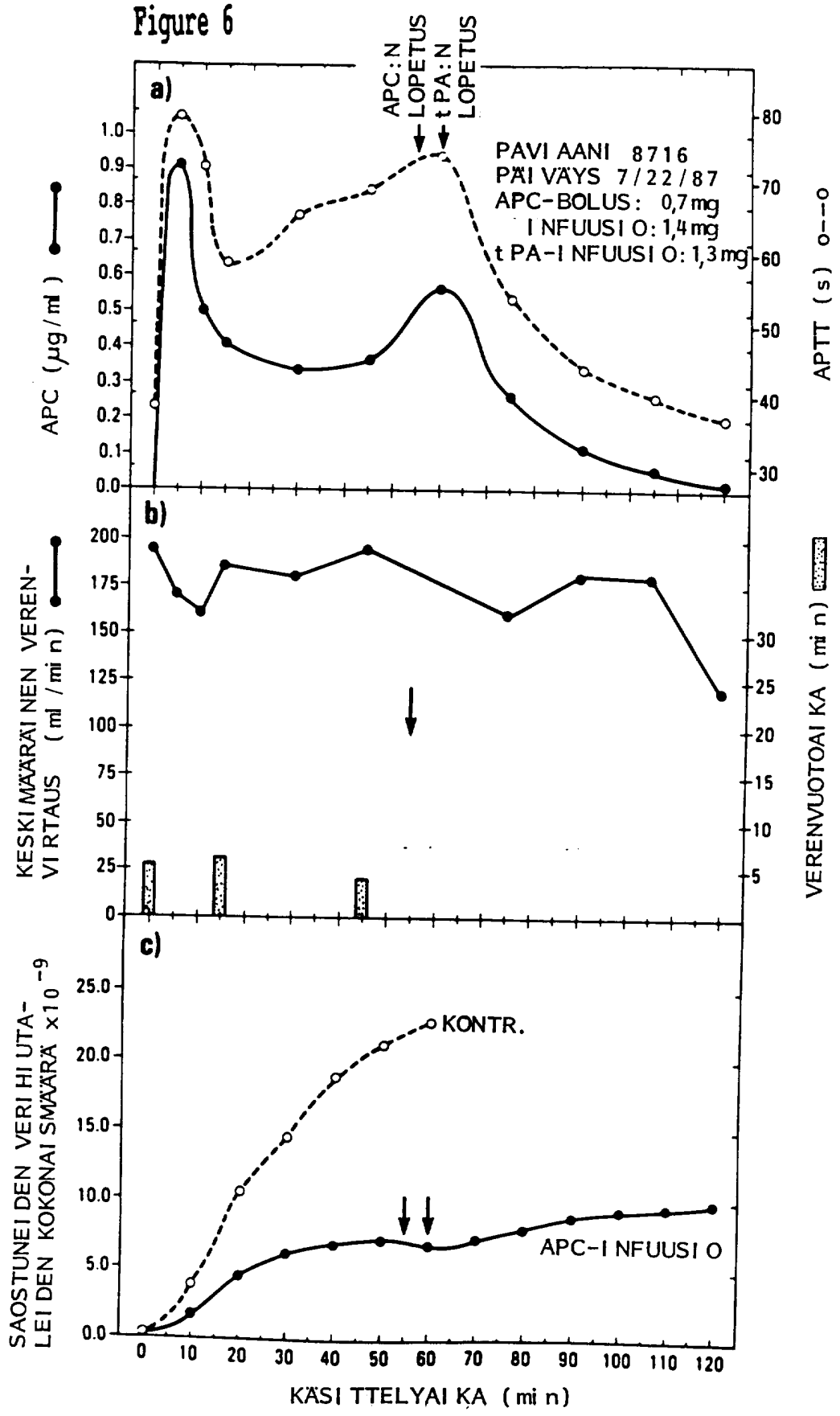
a)
APC:N LOPETUS
tPA:N LOPETUS
PAVI AANI 8716
PÄIVÄYS 7/22/87
APC-BOLUS: 0,7mg
INFUUSIO: 1,4mg
tPA-INFUUSIO: 1,3mg
APC (µg/ml)
APTT (s) o--o
b)
KESKIMÄÄRÄINEN VERENVIRTAUS (ml/min)
VERENVUOTOAIKA (min)
c)
SAOSTUNEIDEN VERIHIUTALEIDEN KOKONAISMÄÄRÄ x10⁻⁹
KONTR.
APC-INFUUSIO
KÄSITTELYAIKA (min)

Figure 7

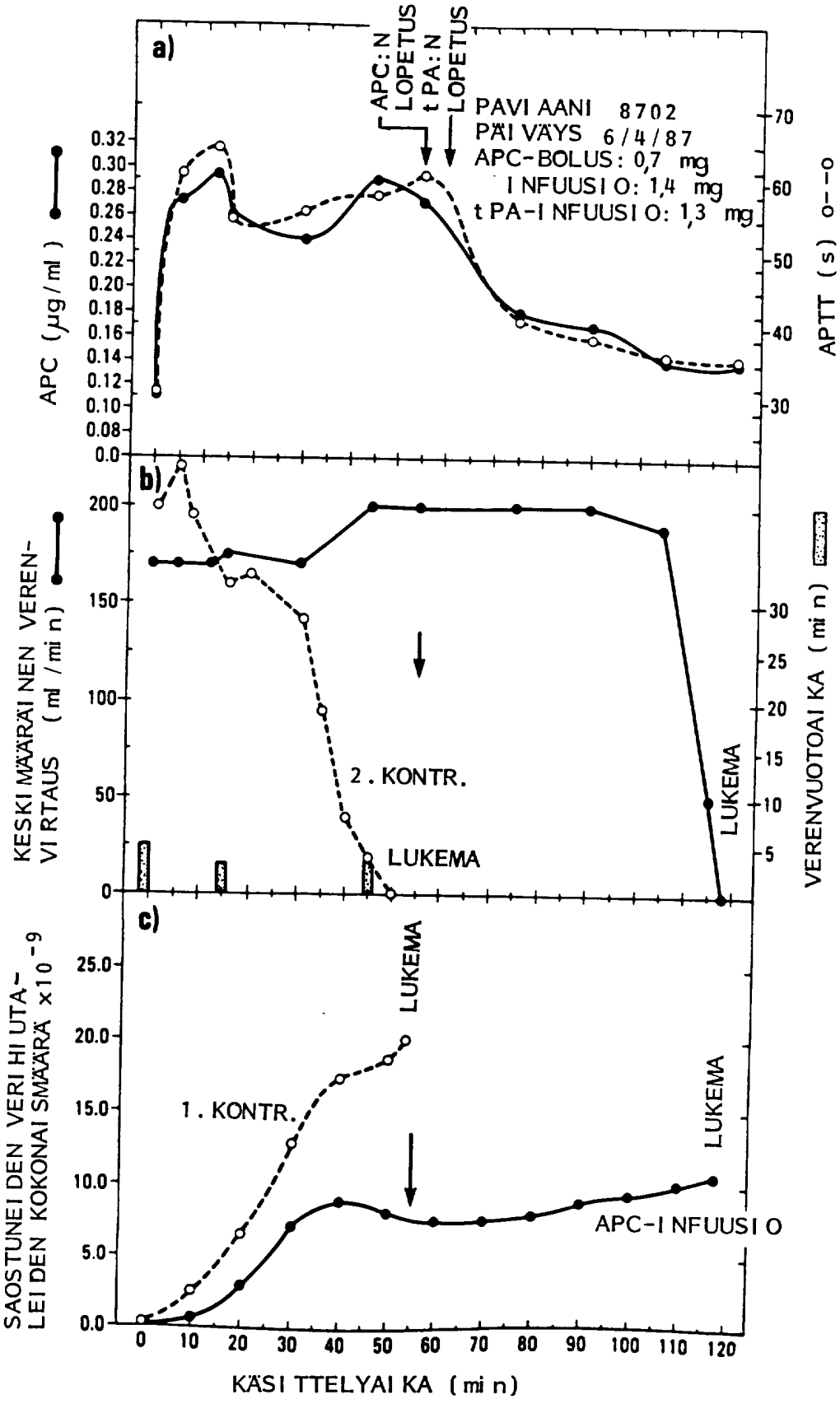
a)
APC:N LOPETUS
tPA:N LOPETUS
PAVIAANI 8702
PÄIVÄYS 6/4/87
APC-BOLUS: 0,7 mg
INFUUSIO: 1,4 mg
tPA-INFUUSIO: 1,3 mg
APC (µg/ml)
APTT (s) o--o
b)
KESKIMÄÄRÄINEN VERENVIRTAUS (ml/min)
VERENVUOTOAIKA (min)
2. KONTR.
LUKEMA
LUKEMA
c)
SAOSTUNEIDEN VERIHIUTALEIDEN KOKONAISMÄÄRÄ x10⁻⁹
LUKEMA
1. KONTR.
LUKEMA
APC-INFUUSIO
KÄSITTELYAIKA (min)

FIGURE 8

t PA-I NFUUSI ON VAI KUTUS VERI HI UTALEI DEN
SAOSTUMI SEEN DACRON-SI I RTEESSÄ

