(19) Bureau voor de Industriële Eigendom Nederland

(11) **1020962**

(12) C **OCTROOI**[20]

(21) Aanvrage om octrooi: **1020962**

(22) Ingediend: **28.06.2002**

(51) Int.Cl.[7]
A61K38/17, A61M1/36, G01N33/68, A61P31/04

(41) Ingeschreven:
30.12.2003

(47) Dagtekening:
30.12.2003

(45) Uitgegeven:
01.03.2004 I.E. 2004/03

(73) Octrooihouder(s):
Nederlandse Organisatie voor toegepast-natuurwetenschappelijk onderzoek TNO te Delft.

(72) Uitvinder(s):
Patrick Cornelis Nicolaas Rensen te Leiden
Aloysius Maria Havekes te Alphen aan den Rijn

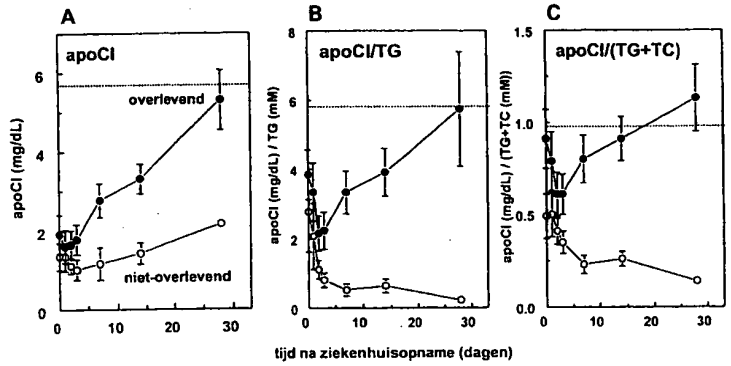
(74) Gemachtigde:
Mr. Ir. A.W. Prins c.s. te 2508 DH Den Haag.

(54) **Therapie en prognose/monitoring bij sepsis en septische shock.**

(57) De uitvinding betreft het gebruik van een peptide dat aan lipopolysaccharide (LPS) of lipoteichoëzuur (LTA) bindt, voor het vervaardigen van een farmaceutische samenstelling voor het behandelen van sepsis of septische shock, waarbij een peptide wordt gebruikt dat de aminozuursequentie

$$KX^1\,KX^2\,KX^3\,K$$

omvat, waarin K een lysineresidu voorstelt en X^1, X^2 en X^3 een aminozuurresidu voorstellen. Bij voorkeur wordt apoCI of een daarvan afgeleid peptide gebruikt. Het peptide kan klinisch aan septische patiënten worden toegediend, of extracorporaal gebruikt worden om bloed van septische patiënten van LPS of LTA te ontdoen. Meting van het apoCI gehalte in bloed kan voor bepaling van de ernst en prognose van het verloop van de septische conditie of voor monitoring worden aangewend.



NL C 1020962

De inhoud van dit octrooi komt overeen met de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekeningen.

Titel: Therapie en prognose/monitoring bij sepsis en septische shock

GEBIED VAN DE UITVINDING

De uitvinding ligt op het gebied van de geneeskunde, meer in het bijzonder het gebied van therapie en prognose bij sepsis en septische shock. De uitvinding verschaft middelen voor therapeutische behandeling van sepsis en septische shock, alsmede middelen om de ernst van een septische conditie te bepalen en een prognose voor het verdere verloop te doen, en middelen voor septische monitoring van het verloop van een behandeling van sepsis en septische shock.

ACHTERGROND VAN DE UITVINDING

Sepsis en septische shock.

Een normale bacteriële ontsteking is een sterk gereguleerd proces waarbij het afweersysteem bacteriën opruimt. Bij mensen met een verzwakte afweer krijgt de bacterie de kans zich (vrijwel ongeremd) te vermenigvuldigen en door te breken naar de bloedbaan. De aanwezigheid van bacteriën in de bloedbaan wordt sepsis genoemd. Dit leidt tot een extreme produktie van cytokines door witte bloedcellen (monocyten en macrofagen) in het bloed, wat resulteert in ernstige koorts, spontane bloedstolling en beschadiging van weefsels door zuurstofgebrek en door bacteriedodende produkten. In ernstige gevallen kunnen organen (met name nier, hart en lever) stoppen met functioneren en de patiënt in zogenaamde 'septische shock' raken, waaraan hij vervolgens kan overlijden.

Incidentie.

Septische shock resulteert in 20-80% van de gevallen (afhankelijk van de toegepaste definitie) tot de dood en alleen al in de Verenigde Staten

1020962

leiden de gevolgen van sepsis tot 250.000 sterfgevallen per jaar. Het toenemend gebruik van invasieve chirurgische technieken, chemotherapie en toepassen van immunosuppressie in patiënten met orgaantransplantaties of inflammatoire ziektes vormen oorzaken van een toenemend aantal gevallen van sepsis. De langere levensverwachting van ouderen en patiënten met metabole, neoplastische en immunodeficiënte afwijkingen door verbeterde medische zorg, leidt eveneens tot populaties met een verhoogde kans op bacteriële infectie.

Lipopolysaccharide en lipoteichoic acid.

Sepsis and septische shock worden voornamelijk door Gram-negatieve bacteriën (bijvoorbeeld *E. coli* en *K. pneumoniae*) en (in mindere mate) Gram-positieve bacteriën (*S. aureus* en *S. epidermidis*) veroorzaakt.

Lipopolysaccharide (LPS) is het belangrijkste bestanddeel van het buitenmembraan van Gram-negatieve bacteriën. LPS is de meest toxische komponent van Gram-negatieve bacteriën en veroorzaakt hetzelfde klinische beeld als de bacteriën zelf. LPS activeert mononucleaire cellen (monocyten en macrofagen), waarna deze cellen proinflammatoire mediatoren zoals cytokines (TNFα, IL-1ß, IL-6) en schadelijke zuurstofradicalen produceren. Deze cytokines, en met name TNF, zijn verantwoordelijk voor de metabole veranderingen die leiden tot pathologische condities en uiteindelijk tot de dood, zoals aangetoond in konijnen, apen en muizen.

Het toxische equivalent van LPS bij Gram-positieve bacteriën is lipoteichoic acid (LTA), dat een structuur bezit die sterke homologie met die van LPS vertoont.

Huidige klinische en experimentele therapieën.

De complexiteit van sepsis en de immunologische afweer bemoeilijken de ontwikkeling van farmacologische interventies. De

standaard behandeling bestaat vaak uit het toedienen van vocht en bloeddrukverhogers (zgn. vasopressoren) om de bloeddruk en de zuurstofvoorziening van organen te normaliseren, en antibiotica om de bacterieproliferatie te remmen (Rackow, 1991; Cohen, 1991; Wheeler, 1999).

Het is echter ook noodzakelijk de schadelijke effekten van de ontsteking te remmen, met behoud van de anti-bacteriële afweer. Experimentele therapieën met antilichamen tegen o.a. TNFα (Fisher, 1996; Clark, 1998) en de IL-1 receptor (Fisher, 1994; Opal, 1997) bleken tot op heden echter niet effectief, waardoor het sterftecijfer ten gevolge van sepsis nog steeds hoog is (zie boven).

Sepsis heeft echter ook grote gevolgen voor het lipoproteïnen metabolisme. Patiënten die de kliniek bereiken, vertonen sterk verlaagde bloedspiegels van cholesterol en triglyceriden, die normaliseren na succesvolle antibacteriële therapie. Onderzoek *in vitro* en in proefdieren heeft aangetoond dat lipoproteïnen kunnen beschermen tegen sepsis, maar de complexiteit van lipoproteïnen (waaronder samenstelling, endogene karakter) bemoeilijkt hun klinische toepassing. Daarbij is het mechanisme waardoor lipoproteïnen een beschermende rol spelen nog onbekend. Het is beschreven dat infusie van eiwitvrije triglyceriden-rijke lipidenemulsies geen bescherming geeft (Van der Poll, 1995), wat erop duidt dat de eiwitcomponenten van lipoproteïnen een grote beschermende rol kunnen spelen bij sepsis.

In de literatuur zijn vele suggesties voor het behandelen van sepsis of septische shock gedaan, die met elkaar gemeen hebben dat aan sepsis patiënten een aan LPS bindend peptide wordt toegediend. De toe te dienen peptiden kunnen bijv. zijn afgeleid van LBP (LPS Bindend Protein; zie WO 95/25117), apoA en apoE (WO 98/07751), apoA1 (WO 95/25786; WO 99/16458; WO 99/16459; WO 99/16408; WO 99/16409), CAP37 (US 6,107,460; US 5,650,392; US 5,627,262; US 5,607,916), CD14 (WO 96/20956), prophenin (WO 95/34289; WO 95/26747), of polyphemusin (WO

02/00687). Al deze suggesties hebben echter tot nog toe geen effectieve aanpak voor sepsis en septische shock opgeleverd.

KORTE SAMENVATTING VAN DE UITVINDING

Doel van de uitvinding is te voorzien in een effectieve aanpak van sepsis en septische shock die efficiënter is dan de tot nog toe voorgestelde behandelingsmethoden en/of nadelen daarvan vermijdt.

Een ander doel van de uitvinding is te voorzien in middelen en methoden waarmee effectief de toxische componenten van bacteriën, in het bijzonder LPS en/of LTA, uit het bloed van septische patiënten kunnen worden verwijderd.

Weer een ander doel van de uitvinding is een betrouwbare bepaling van de ernst van een septische conditie en betrouwbare prognose van sepsis of septische shock te verschaffen.

Nog een ander doel van de uitvinding is een betrouwbare evaluatie van de ziektetoestand van septische patiënten te verschaffen, waardoor het effect van een behandeling van de ziekte kan worden gemeten.

De uitvinding voorziet daartoe in het gebruik van een peptide dat aan lipopolysaccharide (LPS) of lipoteichoëzuur (LTA) bindt, voor het vervaardigen van een farmaceutische samenstelling voor het behandelen van sepsis of septische shock, waarbij een peptide wordt gebruikt dat de aminozuursequentie

$$K\ X^1\ K\ X^2\ K\ X^3\ K$$

omvat, waarin K een lysineresidu voorstelt en X^1, X^2 en X^3 een aminozuurresidu voorstellen. Liefst gaat het bij dit peptide om humaan apoCI, dan wel een fragment ervan dat de genoemde aminozuursequentie, liefst K V K E K L K omvat.

In het bijzonder gaat het hierbij om een toepassing, waarbij een aan LPS bindend peptide wordt gebruikt voor het behandelen van een door

020962

Gram-negatieve bacteriën veroorzaakte sepsis of septische shock, alsmede om een toepassing, waarbij een aan LTA bindend peptide wordt gebruikt voor het behandelen van een door Gram-positieve bacteriën veroorzaakte sepsis of septische shock.

Tevens wordt volgens de uitvinding in een farmaceutische samenstelling voor het behandelen van sepsis of septische shock voorzien, welke samenstelling een peptide zoals hierin gedefinieerd alsmede een farmaceutisch aanvaardbare drager omvat.

De onderhavige uitvinding verschaft verder een houder voorzien van een vulling waaraan een peptide is gebonden zoals hierin gedefinieerd en geschikt voor het doorleiden van bloed om LPS en/of LTA uit het door de houder geleide bloed te verwijderen.

De uitvinding verschaft een werkwijze voor het verwijderen van LPS en/of LTA uit een vloeistof die LPS en/of LTA bevat, waarbij de vloeistof in contact wordt gebracht met een peptide zoals hierin gedefinieerd en eventueel het peptide met daaraan gebonden LPS en/of LTA van de vloeistof wordt gescheiden. De vloeistof is bij voorkeur bloed of bloedplasma, meer in het bijzonder bloed van een patiënt met sepsis of septische shock.

Het contact tussen het peptide en het bloed kan volgens de uitvinding tot stand worden gebracht door aan de patiënt een farmaceutische samenstelling toe te dienen die het peptide bevat. Volgens een alternatieve methode wordt het contact tussen het peptide en het bloed tot stand gebracht door bloed van de patiënt extracorporaal door een houder te leiden waarin het bloed in contact wordt gebracht met een vulling waaraan het peptide is gebonden, waarna het aldus behandelde bloed naar het individu wordt teruggevoerd.

Verder voorziet de uitvinding in een werkwijze voor het behandelen van een individu dat aan sepsis of septische shock lijdt, waarbij aan het individu een werkzame hoeveelheid wordt toegediend van een peptide zoals hierin gedefinieerd.

De uitvinding omvat een werkwijze voor het behandelen van een individu dat aan sepsis of septische shock lijdt, waarbij bloed van het individu extracorporaal door een houder wordt geleid waarin het bloed in contact wordt gebracht met een vulling waaraan een peptide zoals hierin gedefinieerd is gebonden, waarna het aldus behandelde bloed naar het individu wordt teruggevoerd.

Tevens verschaft de uitvinding een werkwijze voor het bepalen van de ernst van een septische conditie en het doen van een prognose voor het verdere verloop van de sepsis of septische shock, waarbij het apoCI gehalte van een bloedmonster van een individu dat lijdt aan sepsis of septische shock wordt bepaald; alsmede in een werkwijze voor het monitoren van een behandeling van sepsis of septische shock, waarbij het apoCI gehalte wordt bepaald van een bloedmonster van een individu dat tegen sepsis of septische shock wordt behandeld.

BEKNOPTE FIGUURBESCHRIJVING

Figuur 1 toont het verband tussen het apoCI niveau in het bloedplasma van sepsis-patiënten en het tijdsverloop na opname in de kliniek. De figuur demonstreert de voorspellende waarde van het apoCI niveau voor de overlevingskans van sepsis.

Van 17 patiënten die met ernstige sepsis in de kliniek werden opgenomen werden gedurende 28 dagen bloedmonsters genomen. In het bloedplasma werden de gehaltes van apoCI, triglyceriden (TG) en totaal cholesterol (TC) gemeten. In figuur A is het apoCI gehalte uitgezet tegen de tijd. In figuur B is het apoCI gehalte gecorrigeerd voor het triglyceriden gehalte als maat voor de hoeveelheid triglyceriden-rijke lipoproteïnen, en in figuur C is het apoCI gehalte gecorrigeerd voor zowel triglyceriden als cholesterol als maat voor de totale hoeveelheid circulerende lipoproteïnen. Onderscheid is gemaakt tussen de patiënten die de sepsis overleefden (9 patiënten; dichte symbolen) en de patiënten die binnen 30 dagen aan de

sepsis overleden (8 patiënten; open symbolen. De gestippelde lijnen geven de waarden weer zoals gevonden in gezonde personen. **Figuur 2** toont het verband tussen het TNF-alpha niveau in het bloedplasma van met LPS geïnjecteerde muizen en het tijdsverloop na de injectie. De figuur demonstreert dat muizen met overexpressie van humaan apoCI minder gevoelig voor LPS zijn.

Wild-type (C57Bl6/J) muizen (dichte symbolen) en genetisch gemodificeerde muizen die humaan apoCI tot overexpressie brengen (open symbolen) werden intraveneus geïnjekteerd met LPS Re595 (25 µg/kg), en bloedmonsters werden genomen vòòr injektie en op de aangegeven tijdstippen na injektie. In het bloedplasma werd vervolgens de TNFα gehaltes gemeten m.b.v. een muis-specifieke TNFα ELISA, en uitgezet tegen de tijd.

Figuur 3 toont het effect van gezuiverd apoCI op het gedrag van radioaktief gemerkt LPS na intraveneuze injektie in muizen. De figuur demonstreert dat apoCI in staat is de binding van LPS aan macrofagen (die voornamelijk in de lever en milt voorkomen) sterk te reduceren.

Verdoofde wild-type (C57Bl6/J) muizen werden intraveneus geïnjekteerd met radioaktief (125I) gelabeld LPS Re595 (10 µg/kg) zonder apoCI (dichte symbolen) en in aanwezigheid van gezuiverd apoCI (400 µg/kg) (open symbolen). Bloedmonsters en stukjes lever werden afgenomen op t = 2, 5, 10, 20, en 30 minuten na injektie. In de monsters werd vervolgens de hoeveelheid LPS gemeten op basis van de hoeveelheid radioaktieve straling, en de hoeveelheden LPS in het bloedserum en lever werden vevolgens uitgezet tegen de tijd (figuur A en B). De muizen werden na 30 minuten getermineerd, en de hoeveelheid LPS werd vervolgens ook bepaald in de milt (figuur C).

UITGEBREIDE BESCHRIJVING VAN DE UITVINDING

Rol van apoCI in sepsis.

Wij hebben gevonden, zoals voorbeeld 1 en figuur 1 laten zien, dat het niveau (de concentratie) van apolipoproteïne CI (apoCI) in septisch bloed sterk verlaagd is, wat voor de (talrijke) overige apolipoproteïnen niet of in veel mindere mate geldt. Dit verlaagde apoCI gehalte in septisch bloed wordt door de literatuur bevestigd (Barlage, 2001).

ApoCI is het kleinste apolipoproteïne (6.6 kDa, 57 aminozuren) dat voornamelijk door de lever wordt gsynthetiseerd en in vrij hoge concentratie in het bloed circuleert (~6 mg/dL), zowel in vrije, ongebonden vorm als ook als bestanddeel van lipoproteïnen (chylomicronen, VLDL, HDL) (Jong, 1999).

De aminozuurvolgorde van apoCI is bekend (zie Tabel 1). Tot nog toe zijn geen mutaties bekend geworden die leiden tot verschillende variaties ('polymorfismen') van apoCI.

Met behulp van transgene muizen die het humaan apoCI tot overexpressie brengen, hebben wij aangetoond dat apoCI een rol speelt in het lipidenmetabolisme aangezien apoCI overexpressie leidt tot verhoogde lipidenspiegels in het bloed (Jong, 1996; Jong, 1998), maar een eventuele rol van apoCI in sepsis was nog niet bekend.

Wij ontwikkelden de hypothese dat de sepsis-geïnduceerde apoCI depletie een direkt gevolg is van bacteriële infektie. ApoCI zou mogelijkerwijs met LPS complexen kunnen vormen die versneld uit het bloed weggevangen zouden kunnen worden.

Via een uitgebreide literatuurstudie bleek dat LPS-bindende eiwitten gemeenschappelijke kenmerken hebben, waarbij de aanwezigheid van een kombinatie van positief geladen en hydrofobe aminozuren essentieel is.

Twee van deze eiwitten zijn de limulus anti-LPS faktor (LALF) (Hoess, 1993), een factor in de 'LAL assay' waarmee routinematig de LPS aktiviteit wordt gemeten, en CAP18 (Larrick, 1994), dat door polymorfonucleaire cellen wordt gesynthetiseerd.

Inderdaad bevat apoCI een groot aantal positief geladen lysines (één op elke zes aminozuren), afgewisseld met hydrofobe aminozuren. Tot onze verrassing bevat humaan apoCI een peptidesequentie in zijn C-terminale helix (K*V*KEK*L*K) die vrijwel identiek is aan de LPS-bindende sequenties van LALF (K*W*KYK*G*K) en CAP18 (K*I*KEK*L*K) waarin vet en cursief gedrukte symbolen respektievelijk positief geladen en hydrofobe aminozuren voorstellen. Wij hebben recent aangetoond dat apoCI, geïsoleerd uit humaan plasma, inderdaad sterk aan LPS bindt.

Werkingsmechanisme van apoCI.

De bevinding dat apoCI een direkte interactie aangaat met LPS is nieuw en duidt op een direkte rol van apoCI in de endogene bestrijding van bacteriële sepsis. De aanwezigheid van apoCI op zowel chylomicronen, VLDL en HDL, kan verklaren dat deze lipoproteïnen een beschermende rol spelen bij sepsis.

Wij veronderstellen dat de binding van LPS aan apoCI de activatie van witte bloedcellen remt, daarbij de productie van proinflammatoire cytokines (TNFα, IL-1ß, en IL-6) remt, en als zodanig de ontstekingscascade - die leidt tot septische shock en tenslotte de dood - voorkomt.

Inderdaad hebben wij aangetoond dat injectie van LPS in muizen die humaan apoCI tot overexpressie brengen tot een sterk verminderde pro-inflammatoire respons leidt vergeleken met controle muizen, wat blijkt uit een 72% verminderde TNFα produktie. Tevens hebben wij aangetoond dat macrofagen die geen apoCI produceren, een grotere LPS-geïnduceerde pro-inflammatoire reaktie vertonen dan macrofagen met apoCI, wat blijkt uit een 50% verhoogde TNFα produktie. Tevens hebben wij aangetoond dat de

binding van LPS aan weefselmacrofagen in de muis (die zich met name in de lever en milt bevinden) na intraveneuze injectie sterk geremd wordt door de toevoeging van gezuiverd apoCI.(zie voorbeelden 3, 4 en 5 en figuren 2 en 3).

Naast een direkte interactie van apoCI met LPS, kan de toediening van apoCI aan septische patiënten ook leiden tot verhoging van de lipoproteïnen spiegels; onderzoek binnen onze groep heeft aangetoond dat overexpressie van humaan apoCI in transgene muizen leidt tot sterke verhoging van zowel VLDL en LDL in het bloed (Jong, 1996; Jong, 1998). Dit lipoproteïnen-inducerend effekt van apoCI kan derhalve een additioneel beschermend anti-septisch effekt opleveren.

Eiwitten zoals CAP37, prophenin en polyphemusin, die niet onderdeel uitmaken van lipoproteïnen, zijn weliswaar eveneens in staat LPS te binden, maar komen, in tegenstelling tot apoCI, niet in hoge concentratie in het bloed voor en hebben daarom geen hoge (fysiologische) relevantie voor systemische verwijdering van LPS uit het bloed.

Het apolipoproteïne apoAI komt wel in hoge concentratie in het bloed voor en de concentratie ervan is in sepsis patiënten verlaagd (zij het minder dan bij apoCI het geval is). Deze verlaging van het apoAI gehalte is echter secundair. Zij is het gevolg van een verlaging van het lipoproteïne HDL, waarvan apoAI het voornaamste eiwitbestanddeel is. Bij apoCI valt de sterke verlaging ervan in sepsis patiënten niet samen met de veel minder sterke daling van lipoproteïnen (zie ook figuur 1). Gecombineerd met de aanwezigheid van de genoemde homologe LPS-bindingssequentie duidt dit feit erop dat apoCI wel een fysiologische rol speelt bij de verwijdering van bacteriebestanddelen uit het bloed.

Klinische toepasbaarheid.

De geringe grootte van apoCI maakt verkrijgbaarheid van het eiwit op grote schaal via zogenaamde 'solid-phase peptide synthese' mogelijk. Dit

geldt in sterkere mate voor kleinere peptiden (fragmenten van apoCI), die LPS binden en LPS-geïnduceerde activatie van witte bloedcellen voorkomen. Aangezien apoCI een endogeen plasma eiwit is, zal het goed getolereerd worden en geen (additionele) immuunreakties opwekken.

Meting apoCI gehalte voor prognose of monitoring.

Zoals in voorbeeld 1 en figuur 1 wordt aangetoond, vertonen patiënten met ernstige sepsis een sterk verlaagd apoCI niveau. In het gegeven voorbeeld (17 patiënten die met ernstige sepsis in de kliniek zijn opgenomen) bedroeg het apoCI niveau gemiddeld 1.6 mg/dL. De apoCI niveaus in patiënten die uiteindelijk de sepsis overleefden (47%: 8/17) vertoonden een progressieve stijging na 3 dagen en normaliseerden na circa 4 weken. De apoCI gehaltes in de patiënten die uiteindelijk binnen 4 weken aan de sepsis bleken te overlijden (53%: 9/17) vertoonden daarentegen geen stijging. Uit deze data blijkt dat monitoring van de apoCI concentratie in bloedplasma een prognostische waarde heeft voor de overlevingskans van de septische patiënt (zie ook figuur 1), en kan worden toegepast voor monitoring van het aanslaan van anti-septische therapieën.

Tabel 1. Primaire aminozuursequentie van apoCI.

De sequenties zoals die voorkomen in de mens (boven) en muis (onder) zijn vergeleken. Positief geladen aminozuren zijn vetgedrukt, en hydrofobe aminozuren zijn cursief gedrukt. De aminozuursequentie die vrijwel identiek is aan die van LALF en CAP18 zijn onderstreept.

Humaan apoCI

(1-30) T*P*D*V*SS*AL*D**K***L***K**E*F*GNT*L*ED**K**A**R**E*L*IS**R***I***K**

(31-57) QSE*L*S**A**K*M*R**E***W***F***SETFQ**K**V**K**E**K**L**K***I*DS

Muis apoCI

(1-34) *APDLSGTLESIPDKLKEF*GNT*LEDKARAAIEHIK*

(35-62) QKE*IL*TKTR*AWF*SE*AF*G<u>K*V*KE*KLK*</u>TT*F*S

A. De volgens de uitvinding te gebruiken peptiden.

Zoals hierboven uiteengezet, omvat de uitvinding de toepassing van humaan apoCI en daarvan afgeleide peptiden die aan LPS binden voor de therapeutische behandeling van Gram-negatieve bacteriële sepsis. Echter, aangezien apoCI en daarvan afgeleide peptiden ook binden aan lipoteichoic acid (LTA), het toxische equivalent van LPS in Gram-positieve bacteriën, omvat de uitvinding de toepassing van apoCI bij bacteriële infekties in het algemeen, dus ook bij Gram-positieve bacteriële sepsis.

Op basis van de primaire aminozuursequentie van apoCI en vergelijking met de LPS-bindende sequenties van LALF en CAP18 moeten de peptiden volgens de uitvinding in elk geval de aminozuursequentie

K X^1 K X^2 K X^3 K

omvatten, waarin K een lysineresidu voorstelt en X^1, X^2 en X^3 een aminozuurresidu voorstellen.

Bij voorkeur stellen X^1 en X^3 residuen van een hydrofoob aminozuur voor, terwijl X^2 een willekeurig aminozuurresidu is.

Daarbij stellen X^1 en X^3 liefst een residue voor van een aminozuur, gekozen uit de groep bestaande uit glycine (G), isoleucine (I), leucine (L), valine (V) en tryptofaan (W), terwijl X^2 een glutaminezuur (E) of tyrosine (Y) residu is. Hiervan zijn G, I, L en V alifatische aminozuren en W een aromatisch aminozuur, terwijl E een negatief geladen aminozuur en Y een neutraal aminozuur is.

Liefst is of omvat het peptide de aminozuursequentie K V K E K L K van de aminozuren 48-54 van humaan apoCI.

Volgens een bepaalde voorkeursuitvoeringsvorm is of omvat het peptide de aminozuursequentie SAKMREWFSETFQKVKEKLKIDS van de

aminozuren 35-57 van humaan apoCI. Deze aminozuursequentie vertegenwoordigt de tweede helix van apoCI.

Volgens een andere voorkeursuitvoeringsvorm is omvat het peptide de gehele aminozuursequentie van apoCI, de sequentie TPDVSSALDKLKEFGNTLEDKARELISRIKQSELSAKMREWFSETFQKV KEKLKIDS van de aminozuren 1-57 van humaan apoCI.

Volgens andere voorkeursuitvoeringsvormen is of omvat het peptide de aminozuursequentie K W K Y K G K (een sequentie uit LALF) of de aminozuursequentie K I K E K L K (een sequentie uit CAP18).

B. Verkrijging van de peptiden.

Het volledige humane apoCI eiwit (aminozuren 1-57) is commercieel verkrijgbaar (BIODESIGN International, Maine, USA en INTRACEL Corporation, Maryland, USA). Tevens zijn procedures beschreven om humaan apoCI als zuiver eiwit uit bloed te isoleren (Tournier, 1984; Jackson, 1986). Tenslotte bestaat de mogelijkheid om een adenovirale expressievector te construeren die codeert voor humaan apoCI, waardoor humaan apoCI op grote schaal door astrocytomacellen in kweek kan worden geproduceerd (Kypreos, 2001). Omdat humaan apoCI een zeer klein eiwit is bestaat tevens de mogelijkheid het te verkrijgen vanuit de individuele aminozuren door middel van de 'solid phase peptide synthese' (Clark-Lewis, 1986). Deze techniek maakt het tevens mogelijk alle overige apoCI-afgeleide peptiden zoals hierboven beschreven te synthetiseren.

C. Toedieningsvormen en routes.

Humaan apoCI is wateroplosbaar en kan dus in een waterige oplossing intraveneus worden toegediend (bijvoorbeeld in een fysiologisch zoutoplossing). Eenmalige (bolus) injectie is een mogelijkheid, evenals infusie.

Tevens heeft apoCI lipiden-bindende eigenschappen, zodat ook intraveneuze toediening mogelijk is als bestanddeel van commercieel verkrijgbare triglyceriden-rijke lipidenemulsies (bijv. Intralipid®, Intrafat® en Lipofundin®) die klinisch routinematig worden toegepast als efficiënte parenterale energiebron. Ook hiervoor geldt dat bolus injectie en infusie beide tot de mogelijkheden behoren.

Een en ander geldt eveneens voor de peptiden volgens de uitvinding.

Orale toediening van peptiden volgens de uitvinding en van apoCI in het bijzonder is in principe eveneens mogelijk.

D. Therapeutische dosis.

De plasmaconcentratie van apoCI in gezonde individuen bedraagt gemiddeld 6 mg/dL (Curry, 1981), terwijl wij hebben aangetoond dat apoCI in septische patiënten sterk verlaagd is. Verwacht wordt dat een plasmaconcentratie van 0.05-500 mg/dL (*bij voorkeur* 0.5-50 mg/dL) therapeutisch effektief kan zijn.

Gebaseerd op een gemiddeld plasmavolume van 2.5 L bij een lichaamsgewicht van 70 kg, kan berekend worden dat een dosis van 0.02 mg/kg-200 mg/kg (*bij voorkeur* 0.2 mg/kg-20 mg/kg) effektief kan zijn bij eenmalige (bolus) injektie.

Bij toediening als infusie zal de dosis sterk afhankelijk zijn van de snelheid van verwijdering van het apoCI uit het bloed, zodat de dosering binnen ruime grenzen kan variëren, bijv. van 0.01 tot 10 mg/kg/minuut.

E. Andere behandelingsmethoden.

Verder kan gedacht worden aan het aanbrengen van een peptide volgens de uitvinding, bijv. apoCI, op een kolom, waardoorheen bloed van septische patiënten kan worden geleid om aldus via plasmapheresis (d.w.z. continue venoveneuze of arterioveneuze hemoperfusie) extracorporaal (dus

buiten het lichaam om) van LPS ontdaan kan worden. Immobilisatie van het peptide volgens de uitvinding kan geschieden aan een kolomvulling, zoals polystyreen-gederivatiseerde fibers, microsferen of andere aan de vakman bekende materialen. Het peptide kan aan dergelijke materialen chemisch worden gebonden dan wel door middel van fysische adsorptie. Geschikte technieken voor immobilisatie van peptiden zijn aan de vakman bekend.

F. Verwachte effect behandeling.

Verwacht wordt dat apoCI vrij circulerend LPS en LTA zal binden en afvoeren, waardoor LPS en LTA niet meer in staat zullen zijn proinflammatoire reakties te induceren. Concreet zal dit leiden tot verlaging van proinflammatoire cytokines (met TNFα als voornaamste indicator) en normalisering van de verlaagde lipoproteïnenniveaus (LDL en HDL). Deze plasma-parameters worden routinematig bepaald in de kliniek. Tevens zal succesvolle therapie leiden tot het voorkómen van de dood tgv. sepsis.

G. Prognose en monitoring van sepsis of septische shock.

Het apoCI niveau in bloedplasma kan op elke geschikte wijze worden vastgesteld. Bij voorkeur wordt het apoCI niveau bepaald met een sandwich Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (sandwich ELISA). Hiertoe worden bijvoorbeeld 96-wells platen (medium-binding platen; Costar) gecoat met een (10.000-voudige verdunning van een) polyklonaal antilichaam tegen humaan apoCI dat is opgewekt in de geit (goat-anti human apoCI; Academy Bio-Medical Company, Houston, USA; cat. 31A-G1b). Vervolgens wordt humaan bloedplasma of serum toegevoegd (100.000-300.000-voudige verdunning), waarbij het hierin aanwezige apoCI kwantitatief wordt gebonden door dit primair antilichaam. Het apoCI wordt weer herkend door een secundair antilichaam (15.000-voudige verdunning) dat gekoppeld is aan mierikswortel peroxidase (horse-radish peroxidase,

HRP) (HRP-goat-anti human apoCI; Academy Bio-Medical Company, Houston, USA; cat. 31H-G1b). Het HRP wordt vervolgens gekwantificeerd d.m.v. een kleurreaktie met 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) als substraat, en de kleurintensiteit wordt vergeleken met een ijkcurve die geconstrueerd wordt m.b.v. zuiver humaan apoCI (Labconsult, Brussels, Belgium; cat. A50366H).

EXPERIMENTELE ONDERBOUWING

De vinding dat apoCI (en daarvan afgeleide peptiden) een beschermende rol speelt in Gram-negatieve (en Gram-positieve) sepsis wordt door een aantal experimenten ondersteund. Hiertoe wordt gebruik gemaakt van:

a. bloed van septische patiënten

b. muizen die geen apoCI synthetiseren (*apoc1*$^{-/-}$ muizen)

c. transgene muizen die humaan apoCI tot overexpressie brengen (*APOC1* muizen)

d. apoCI dat gezuiverd is uit humaan bloed

e. peptiden die vanuit de aminozuur-bouwstenen kunstmatig worden gesynthetiseerd.

De bevindingen worden in de hieronder gegeven voorbeelden beschreven.

<u>Voorbeeld 1: Voorspellende waarde van het apoCI niveau voor de overlevingskans in sepsis</u>

Wij hebben de apoCI niveaus gemeten in het bloedplasma van 17 septische patiënten gedurende vier weken na opname in de kliniek. Wij gebruikten daartoe de humaan apoCI-specifieke sandwich ELISA zoals hierboven beschreven onder G.

De resultaten worden getoond in figuur 1.

Van de 17 septische patiënten die met ernstige sepsis in de kliniek werden opgenomen, werden gedurende 28 dagen bloedmonsters genomen. In het bloedplasma werden de gehaltes van apoCI, triglyceriden (TG) en totaal cholesterol (TC) gemeten. In figuur A is het apoCI gehalte uitgezet tegen de tijd. In figuur B is het apoCI gehalte gecorrigeerd voor het triglyceridengehalte als maat voor de hoeveelheid triglyceriden-rijke lipoproteïnen, en in figuur C is het apoCI gehalte gecorrigeerd voor zowel triglyceriden als cholesterol als maat voor de totale hoeveelheid circulerend lipoproteïne. Tussen de patiënten die de sepsis overleefden (9 patiënten; dichte symbolen) en de patiënten die binnen 30 dagen aan de sepsis overleden (8 patiënten; open symbolen) is onderscheid gemaakt. De gestippelde lijnen geven de waarden weer zoals gevonden in gezonde personen.

Alle patiënten die in het onderzoek werden opgenomen vertoonden een sterk verlaagd apoCI niveau in het bloed (ca. 1.6 mg/dL). De patiënten die binnen vier weken aan de gevolgen van sepsis overleden, vertoonden op het moment van opname een lager apoCI niveau (ca. 1.3 mg/dL) dan de patiënten die de sepsis overleefden (ca. 1.9 mg/dL). Terwijl het apoCI niveau zich binnen vier weken vrijwel normaliseerde in patiënten die de sepsis overleefden (ca. 5 mg/dL), vertoonde het apoCI niveau geen stijging in de patiënten die uiteindelijk aan sepsis overleden.

Uit deze gegevens blijkt dat het plasma niveau van apoCI een voorspellende waarde heeft voor de overlevingskans in sepsis. Tevens wordt onze hypothese onderstreept dat apoCI tekort schiet in patiënten die overlijden aan sepsis, en dus een therapeutische toepassing kan hebben.

Voorbeeld 2: ApoCI bindt sterk aan LPS

In dit voorbeeld wordt aangetoond dat gezuiverd humaan apoCI sterk aan LPS bindt en dat deze binding bestand is tegen elektroforetische

krachten (agarosegelelektroforese). Hierbij bleek de natuurlijk voorkomende micellaire struktuur van LPS verloren te gaan.

LPS Re595 (*Salmonella minnesota*) werd radioactief gelabeld met ^{125}I zoals beschreven (Rensen, 1997) en geïncubeerd (30 min bij 37°C) met toenemende hoeveelheden humaan apoCI dat uit humaan bloed geïsoleerd is (Tournier, 1984). Vervolgens werden de incubatievolumes opgebracht op een agarosegel, waarna een elektrisch veld werd aangelegd (zgn. agarosegelelektroforese). Door zijn negatieve lading is LPS geneigd naar de positieve pool (anode) te migreren, wat echter verhinderd wordt doordat de LPS grote micellaire strukturen vormt die de relatief kleine poriën gevormd door de agarosematrix niet kunnen passeren. Toevoeging van een kleine hoeveelheid apoCI (slechts 0.7 molekulen apoCI t.o.v. 1 molekuul LPS) leidde echter al tot volledige migratie van de LPS naar de positieve pool, wat erop duidt dat apoCI bindt aan LPS onder vorming van relatief kleine apoCI/LPS komplexen.

Voorbeeld 3: ApoCI-deficiënte macrofagen zijn gevoeliger voor LPS

Wij hebben macrofagen geïsoleerd uit de buikholte van wild-type muizen en genetisch gemodificeerde muizen die geen apoCI produceren, en deze macrofagen blootgesteld aan LPS (1 µg/ml). De macrofagen zonder apoCI bleken een sterkere ontstekingsreaktie te vertonen dan de macrofagen met apoCI, wat bleek uit een 50% hogere productie van TNFα.

Wild-type (C57Bl/6J) muizen die endogeen apoCI produceren, en genetisch gemodificeerde *apoCI*$^{-/-}$ muizen die geen apoCI tot expressie brengen, werden intraperitoneaal geïnjecteerd met 1 ml van 3% Brewer's thioglycollate medium. Na 4 dagen werden de muizen verdoofd en werd de buikholte gewassen met 10 ml ijskoude fosfaat-gebufferde saline (PBS). De macrofagen die zich hierin bevonden, werden vervolgens uitgeplaat in 24-wells platen ($0.6x10^6$ macrofagen per well) en gekweekt in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) met 10% foetaal kalver-serum (FCS). Na

24 uur werd LPS Re595 toegevoegd (1 µg/ml). Nog eens 24 uur later werden de media geïsoleerd en werd de hoeveelheid TNFα hierin gekwantificeerd m.b.v. een muis-specifieke TNFα ELISA volgens de bijgeleverde instructies (Immunosource, Halle, Belgium; cat. BMS607MST). De macrofagen zonder apoCI bleken een 50% verhoogde TNFα produktie te vertonen (gemiddeld 62.3 ng/mg celeiwit), vergeleken met de macrofagen met apoCI (42.5 ng/mg celeiwit), wat erop duidt dat de afwezigheid van apoCI in macrofagen leidt tot een sterkere ontstekingsreaktie.

Voorbeeld 4: Muizen met overexpressie van humaan apoCI zijn minder gevoelig voor LPS

We hebben LPS (25 µg/kg) intraveneus toegediend aan wild-type muizen en muizen die humaan apoCI tot overexpressie brengen. Overexpressie van apoCI reduceerde inderdaad de gevoeligheid voor LPS, wat bleek uit een 72% verlaagde TNFα productie.

Wild-type (C57Bl6/J) muizen en genetisch gemodificeerde *APOCI* muizen die humaan apoCI tot overexpressie brengen, werden intraveneus geïnjecteerd met LPS Re595 (25 µg/kg) en bloedmonsters werden genomen voor injectie en op t = 30, 60, 90, 120 en 180 minuten na injectie. De hoeveelheid TNFα in het bloedplasma werd vervolgens gekwantificeerd m.b.v. een muis-specifieke TNFα ELISA volgens de bijgeleverde instructies (Immunosource, Halle, Belgium; cat. BMS607MST).

De resultaten, uitgezet tegen de tijd, worden getoond in figuur 2. Hierin duiden de dichte symbolen op experimenten in wild-type C57Bl6/J muizen, de open symbolen op experimenten in genetisch gemodificeerde, humaan apoCI tot overexpressie brengende muizen.

De muizen die apoCI tot overexpressie brengen, bleken na LPS injectie een 72% verlaagde productie van TNFα te vertonen in vergelijking met muizen die apoCI niet tot overexpressie brengen. Overexpressie van apoCI blijkt dus inderdaad de gevoeligheid voor LPS te reduceren.

Voorbeeld 5: ApoCI voorkomt binding van LPS aan macrofagen in de lever en milt

We hebben LPS (10 µg/kg) intraveneus toegediend aan wild-type muizen in afwezigheid of aanwezigheid van gezuiverd apoCI. Toevoeging van apoCI bleek de binding van LPS aan de macrofaag-rijke organen lever en milt sterk te reduceren.

Wild-type (C57Bl6/J) muizen werden onder narcose gebracht en intraveneus geïnjecteerd met radioactief (^{125}I) gemerkt LPS Re595 (10 µg/kg) zonder en met apoCI (400 µg/kg). Bloedmonsters en stukjes leverweefsel werden afgenomen op t = 2, 5, 10, 20 en 30 minuten na injectie. Hierna werden de muizen getermineerd, en werd de milt ook uitgenomen. De hoeveelheden LPS in de bloedsera en organen werden vervolgens gekwantificeerd op basis van de hoeveelheid radioactieve straling.

De resultaten worden getoond in figuur 3. In figuren A en B zijn de hoeveelheden ^{125}I-LPS in respectievelijk het bloedserum en in de lever uitgezet als percentage van de geïnjecteerde dosis tegen de tijd. Figuur C toont de opname van ^{125}I-LPS door de milt na 30 minuten. De dichte symbolen duiden op experimenten in afwezigheid van apoCI, de open symbolen op experimenten in aanwezigheid van apoCI.

De aanwezigheid van apoCI bleek de afname van LPS uit het bloed sterk te remmen, en de binding van LPS aan de lever en milt sterk (resp. 20- en 80-voudig) te reduceren. De binding van apoCI aan LPS (zie voorbeeld 1) blijkt dus ook in het bloed relevant. Dit leidt tot sterk verminderde binding aan macrofagen, wat zodoende activatie van macrofagen voorkomt en uiteindelijk tot een sterk verminderde ontstekingsreactie leidt (zie voorbeeld 4).

REFERENTIES

- Barlage, S., Frohlich, D., Bottcher, A. (2001) ApoE-containing high density lipoproteins and phospholipid transfer protein activity increase in patients with a systemic inflammarory response. J. Lipid Res. 42, 281-290.

- Clark, M.A., Plank, L.D., Connolly, A.B. *et al.* (1998) Effect of a chimeric antibody to tumor necrosis factor-α on cytokine and physiologic responses in patients with severe sepsis: a randomized, clinical trial. Crit. Care Med. 26, 1650-1659.

- Clark-Lewis, I., Aebersold, R., Ziltener, H., Schrader, J.W., Hood, L.E., Kent, S.B. (1986) Automated chemical synthesis of a protein growth factor for hemopoietic cells, interleukin-3. Science 231, 134-139.

- Cohen, J., Glauser, M.P. (1991) Septic shock: treatment. Lancet 338, 736-739.

- Curry, M.D., McConathy, W.J., Fesmire, J.D., and Alaupovic, P. (1981) Quantitative determination of apolipoproteins C-I and C-II in human plasma by electroimmunoassays. Clin. Chem. 27, 543-548.

- Fisher, C.J., Dhainaut, J.F., Opal, S.M. (1994) Recombinant human interleukin 1 receptor antagonist in the treatment of patients with sespsis syndrome: results from a randoized double-blind, placebo-controlled trial. JAMA 271, 1836-1843.

- Fisher, C.J., Agosti, J.M. Opal, S.M. *et al.* (1996) treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein. The Soluble TNF Receptor sepsis study Group. N. Engl. J. Med. 334, 1697-1702.

- Hoess, A., Watson, S., Siber, G.R., Liddington, R. (1993) Crystal structure of an endotoxin-neutralizing protein from the horseshoe crab, Limulus anti-LPS factor, at 1.5Å resolution. EMBO J. 12, 3351-3356.

- Jackson, R.L., Holdsworth, G. (1986) Isolation and properties of human apolipoproteins C-I, C-II, and C-III. Methods Enzymol. 128, 288-297.

020962

- Jong, M.C., Dahlmans, V.E.H., Van Gorp, P.J.J. *et al.* (1996) In the absence of the low density receptor, human apolipoprotein C1 overexpression in transgenic mice inhibits the hepatic uptake of very low density lipoproteins via a receptor-associated protein-sensitive pathway. J. Clin. Invest. 98, 2259-2267.

- Jong, M.C., Gijbels, M.J.J., Dahlmans, V.E.H. *et al.* (1998) Hyperlipidemia and cutaneous abnormalities in transgenic mice overexpressing apolipoprotein C1. J. Clin. Invest. 101, 145-152.

- Jong, M.C., Hofker, M.H., Havekes, L.M. (1999) Role of apoCs in lipoprotein metabolism: functional differences between apoC1, apoC2, and apoC3. Artherioscler. Thromb. Vasc. Biol. 19, 472-484.

- Kypreos, K.E., Willems van Dijk, K., Van der Zee, A., Havekes, L.M., Zannis, V.I. (2001) Domains of apolipoprotein E contributing to triglyceride and cholesterol homeostasis in vivo. J. Biol. Chem. 276, 19778-19786.

- Larrick, J.W., Hirata, M., Zheng, H. *et al.* (1994) A novel granylocyte-derived peptide with lipopolysaccharide-neutralizing activity. J. Immunol. 152, 231-240.

- Opal, S.M., Fisher, C.J., Dhainaut, J.F. *et al.* (1997) Confirmatory interleukin-1 receptor antagonist trial in severe sepsis: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. The Interleukin-1 Receptor Antagonist Sepsis Investigator Group. Crit. Care Med. 26, 1115-1124.

- Rackow, E.C., Astiz, M.E. (1991) Pathophysiology and treatment of septic shock. JAMA 266, 548-554.

- Rensen, P.C.N., Van Oosten, M., Van de Bilt, E. *et al.* (1997) Human apolipoprotein E protects redirects lipopolysaccharide from Kupffer cells to liver parenchymal cells in rats in vivo. J. Clin. Invest. 99, 2438-2445.

- Tournier, J.F., Bayard, F., Tauber, J.P. (1984) Rapid purification and activity of apolipoprotein C_I on the proliferation of bovine vascular endothelial cells in vitro. Biochim. Biophys. Acta 804, 216-220.

- Van der Poll, T., Braxton, C.C., Coyle, S.M. *et al.* (1995) Effect of hypertriglyceridemia on endotoxin responsiveness in humans. Infect. Immun. 63, 3396-3400.
- Wheeler, A.P., Bernard, G.R. (1999) Treating patients with severe sepsis. N. Engl. J. Med. 340, 207-214.

CONCLUSIES

1. Gebruik van een peptide dat aan lipopolysaccharide (LPS) of lipoteichoëzuur (LTA) bindt, voor het vervaardigen van een farmaceutische samenstelling voor het behandelen van sepsis of septische shock, waarbij een peptide wordt gebruikt dat de aminozuursequentie

$$K\ X^1\ K\ X^2\ K\ X^3\ K$$

omvat, waarin K een lysineresidu voorstelt en X^1, X^2 en X^3 een aminozuurresidu voorstellen.

2. Gebruik volgens conclusie 1, waarbij een aan LPS bindend peptide wordt gebruikt voor het behandelen van een door Gram-negatieve bacteriën veroorzaakte sepsis of septische shock.

3. Gebruik volgens conclusie 1, waarbij een aan LTA bindend peptide wordt gebruikt voor het behandelen van een door Gram-positieve bacteriën veroorzaakte sepsis of septische shock.

4. Gebruik volgens een of meer van de conclusies 1-3, waarbij X^1 en X^3 residuen van een hydrofoob aminozuur voorstellen en X^2 een aminozuurresidu voorstelt.

5. Gebruik volgens conclusie 4, waarbij X^1 en X^3 een residue voorstellen van een aminozuur, gekozen uit de groep bestaande uit glycine, isoleucine, leucine, valine en tryptofaan, en X^2 een glutaminezuur- of tyrosineresidu voorstelt.

6. Gebruik volgens conclusie 5, waarbij het peptide de aminozuursequentie K V K E K L K van de aminozuren 48-54 van humaan apoCI is of omvat.

7. Gebruik volgens conclusie 6, waarbij het peptide de aminozuursequentie SAKMREWFSETFQKVKEKLKIDS van de aminozuren 35-57 van humaan apoCI is of omvat.

8. Gebruik volgens conclusie 7, waarbij het peptide de aminozuursequentie TPDVSSALDKLKEFGNTLEDKARELISRIKQSELSAKMREWF SETFQKVKEKLKIDS van de aminozuren 1-57 van humaan apoCI is of omvat.

9. Gebruik volgens conclusie 5, waarbij het peptide de aminozuursequentie K W K Y K G K is of omvat.

10. Gebruik volgens conclusie 5, waarbij het peptide de aminozuursequentie K I K E K L K is of omvat.

11. Farmaceutische samenstelling voor het behandelen van sepsis of septische shock, welke samenstelling een peptide zoals gedefinieerd in een of meer van de conclusies 1-10 alsmede een farmaceutisch aanvaardbare drager omvat.

12. Houder voorzien van een vulling waaraan een peptide zoals gedefinieerd in een of meer van de conclusies 1-10 is gebonden en geschikt voor het doorleiden van bloed om LPS en/of LTA uit het door de houder geleide bloed te verwijderen.

13. Werkwijze voor het verwijderen van LPS en/of LTA uit een vloeistof die LPS en/of LTA bevat, waarbij de vloeistof in contact wordt gebracht met een peptide zoals gedefinieerd in een of meer van de conclusies 1-10 en eventueel het peptide met daaraan gebonden LPS en/of LTA van de vloeistof wordt gescheiden.

14. Werkwijze volgens conclusie 13, waarbij de vloeistof bloed of bloedplasma is.

15. Werkwijze volgens conclusie 14, waarbij de vloeistof bloed van een patiënt met sepsis of septische shock is.

16. Werkwijze volgens conclusie 15, waarbij het contact tussen het peptide en het bloed tot stand wordt gebracht door aan de patiënt een farmaceutische samenstelling toe te dienen die het peptide bevat.

17. Werkwijze volgens conclusie 15, waarbij het contact tussen het peptide en het bloed tot stand wordt gebracht door bloed van de patiënt extracorporaal door een houder te leiden waarin het bloed in contact wordt gebracht met een vulling waaraan het peptide is gebonden, waarna het aldus behandelde bloed naar het individu wordt teruggevoerd.

18. Werkwijze voor het behandelen van een individu dat aan sepsis of septische shock lijdt, waarbij aan het individu een werkzame hoeveelheid wordt toegediend van een peptide zoals gedefinieerd in een of meer van de conclusies 1-10.

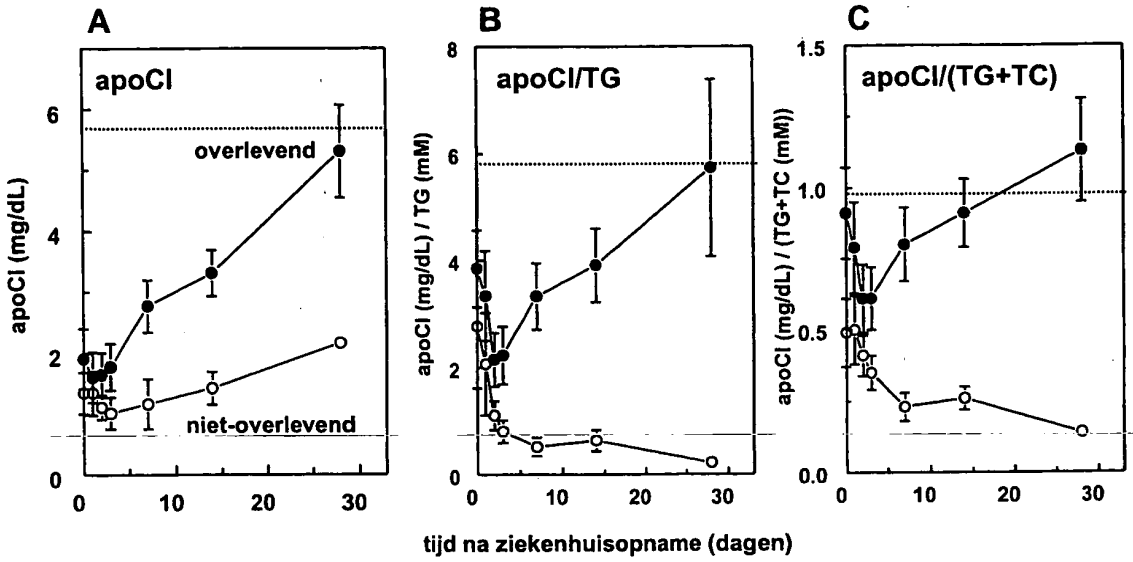
19. Werkwijze voor het behandelen van een individu dat aan sepsis of septische shock lijdt, waarbij bloed van het individu extracorporaal door een houder wordt geleid waarin het bloed in contact wordt gebracht met een vulling waaraan een peptide zoals gedefinieerd in een of meer van de conclusies 1-10 is gebonden, waarna het aldus behandelde bloed naar het individu wordt teruggevoerd.

20. Werkwijze voor het bepalen van de ernst van een septische conditie en het doen van een prognose voor het verdere verloop van de sepsis of septische shock, waarbij het apoCI gehalte van een bloedmonster van een individu dat lijdt aan sepsis of septische shock wordt bepaald.

21. Werkwijze voor het monitoren van een behandeling van sepsis of septische shock, waarbij het apoCI gehalte wordt bepaald van een bloedmonster van een individu dat tegen sepsis of septische shock wordt behandeld.

Figuur 1

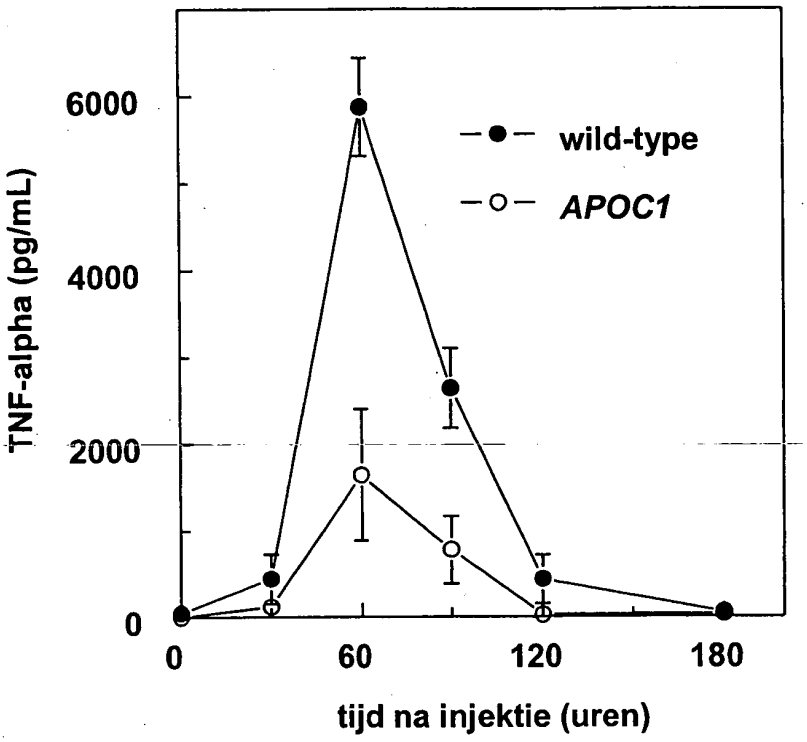
Voorspellende waarde van het apoCI gehalte in bloedplasma voor de kans op overleving van sepsis



1020962

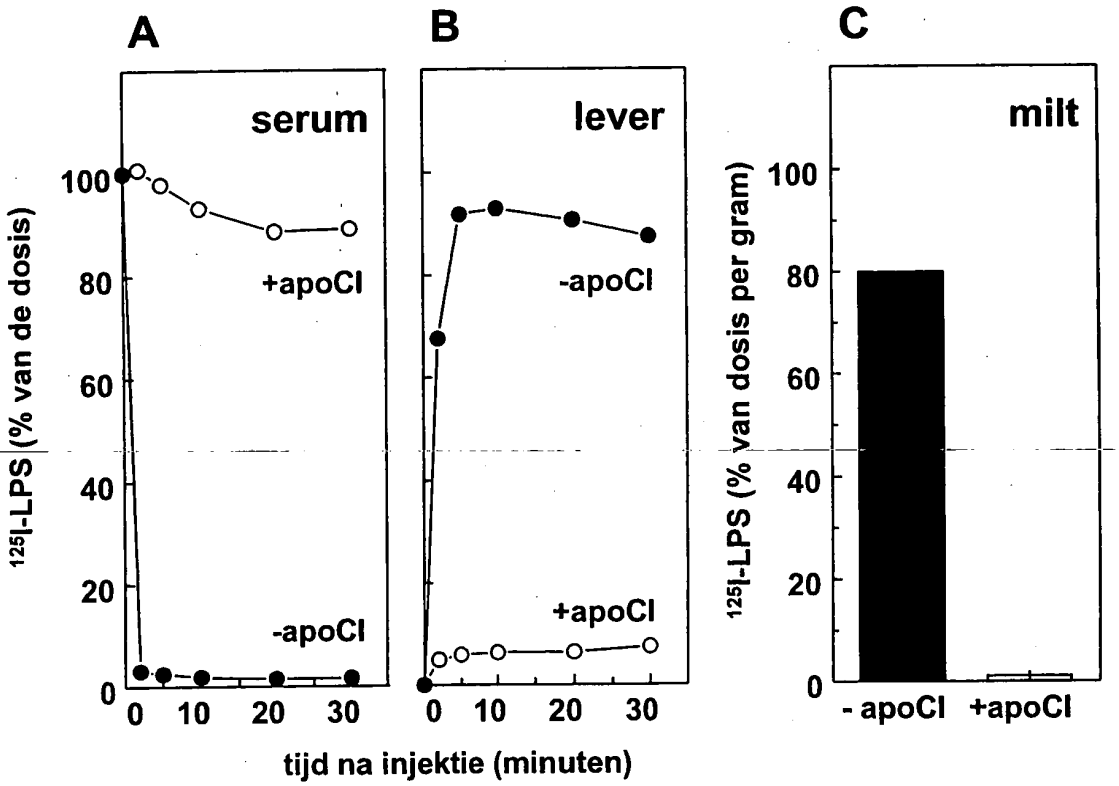
Figuur 2

Muizen die humaan apoCI tot overexpressie brengen zijn minder gevoelig voor LPS.



Figuur 3

ApoCl voorkomt binding van LPS aan macrofagen in de lever en milt.



020962

SAMENWERKINGSVERDRAG (PCT)

RAPPORT BETREFFENDE NIEUWHEIDSONDERZOEK VAN INTERNATIONAAL TYPE

IDENTIFICATIE VAN DE NATIONALE AANVRAGE	KENMERK VAN DE AANVRAGER OF VAN DE GEMACHTIGDE P59702NL00
Nederlands aanvraag nr. 1020962	Indieningsdatum 28 juni 2002
	Ingeroepen voorrangsdatum
Aanvrager (Naam) TNO	
Datum van het verzoek voor een onderzoek van internationaal type	Door de Instantie voor Internationaal Onderzoek (ISA) aan het verzoek voor een onderzoek van internationaal type toegekend nr. SN 39205 NL

I. CLASSIFICATIE VAN HET ONDERWERP (bij toepassing van verschillende classificaties, alle classificatiesymbolen opgeven)

Volgens de internationale classificatie (IPC)

Int. Cl.7: A61K38/17 A61M1/36 G01N33/68 A61P31/04

II. ONDERZOCHTE GEBIEDEN VAN DE TECHNIEK

Onderzochte minimum documentatie

Classificatiesysteem	Classificatiesymbolen
Int. Cl.7:	A61K A61M C07K

Onderzochte andere documentatie dan de minimum documentatie, voor zover dergelijke documenten in de onderzochte gebieden zijn opgenomen

III. ☐ **GEEN ONDERZOEK MOGELIJK VOOR BEPAALDE CONCLUSIES** (opmerkingen op aanvullingsblad)

IV. ☐ **GEBREK AAN EENHEID VAN UITVINDING** (opmerkingen op aanvullingsblad)

VERSLAG VAN HET NIEUWHEIDSONDERZOEK VAN INTERNATIONAAL TYPE

Nummer van het verzoek om een nieuwheidsonderzoek
NL 1020962

A. CLASSIFICATIE VAN HET ONDERWERP
IPC 7 A61K38/17 A61M1/36 G01N33/68 A61P31/04

Volgens de Internationale Classificatie van octrooien (IPC) of zowel volgens de nationale classificatie als volgens de IPC.

B. ONDERZOCHTE GEBIEDEN VAN DE TECHNIEK

Onderzochte miminum documentatie (classificatie gevolgd door classificatiesymbolen)
IPC 7 A61K A61M C07K

Onderzochte andere documentatie dan de mimimum documentatie, voor dergelijke documenten, voor zover dergelijke documenten in de onderzochte gebieden zijn opgenomen

Tijdens het internationaal nieuwheidsonderzoek geraadpleegde elektronische gegevensbestanden (naam van de gegevensbestanden en, waar uitvoerbaar, gebruikte trefwoorden)
EPO-Internal, BIOSIS, PAJ, WPI Data, MEDLINE, CHEM ABS Data

C. VAN BELANG GEACHTE DOCUMENTEN

Categorie °	Geciteerde documenten, eventueel met aanduiding van speciaal van belang zijnde passages	Van belang voor conclusie nr.
	ONVOLLEDIG ONDERZOEK zie aanvullingsblad C ---	
X Y	US 5 747 455 A (NOVITSKY THOMAS J ET AL) 5 Mei 1998 (1998-05-05) kolom 2, regel 55 -kolom 3, regel 20; conclusies; figuren 15,16; voorbeelden --- -/--	1-5,9, 11-19 1-21

[X] Verdere documenten worden vermeld in het vervolg van vak C.

[X] Leden van dezelfde octrooifamilie zijn vermeld in een bijlage

° Speciale categorieën van aangehaalde documenten

"A" document dat de algemene stand van de techniek weergeeft, maar niet beschouwd wordt als zijnde van bijzonder belang

"E" eerder document, maar gepubliceerd op de datum van indiening of daarna

"L" document dat het beroep op een recht van voorrang aan twijfel onderhevig maakt of dat aangehaald wordt om de publikatiedatum van een andere aanhaling vast te stellen of om een andere reden zoals aangegeven

"O" document dat betrekking heeft op een mondelinge uiteenzetting, een gebruik, een tentoonstelling of een ander middel

"P" document gepubliceerd voor de datum van indiening maar na de ingeroepen datum van voorrang

"T" later document, gepubliceerd na de datum van indiening of datum van voorrang en niet in strijd met de aanvrage, maar aangehaald ter verduidelijking van het principe of de theorie die aan de uitvinding ten grondslag ligt

"X" document van bijzonder belang; de uitvinding waarvoor uitsluitende rechten worden aangevraagd kan niet als nieuw worden beschouwd of kan niet worden beschouwd op inventiviteit te berusten

"Y" document van bijzonder belang; de uitvinding waarvoor uitsluitende rechten worden aangevraagd kan niet worden beschouwd als inventief wanneer het document beschouwd wordt in combinatie met één of meerdere soortgelijke documenten, en deze combinatie voor een deskundige voor de hand ligt

"&" document dat deel uitmaakt van dezelfde octrooifamilie

Datum waarop het nieuwheidsonderzoek van internationaal type werd voltooid	Verzenddatum van het rapport van het nieuwheidsonderzoek van internationaal type
1 April 2003	
Naam en adres van de instantie European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	De bevoegde ambtenaar Ryckebosch, A

2

Formulier PCT/ISA/201 (tweede blad) (juli 1992)

VERSLAG VAN HET NIEUWHEIDSONDERZOEK VAN INTERNATIONAAL TYPE

Nummer van het verzoek om een nieuwheidsonderzoek
NL 1020962

C.(Vervolg). VAN BELANG GEACHTE DOCUMENTEN

Categorie °	Geciteerde documenten, eventueel met aanduiding van speciaal van belang zijnde passages	Van belang voor conclusie nr.
X	J.W. LARRICK ET AL.: "A novel granulocyte-derived peptide with lipopolysaccharide-neutralizing activity." JOURNAL OF IMMUNOLOGY, deel 152, 1994, bladzijden 231-240, XP002236820 BALTIMORE, US in de aanvraag genoemd	1-5, 10-19
Y	bladzijde 236, rechter kolom, regel 5 -bladzijde 238, rechter kolom, laatste regel; figuur 1; tabel III	1-21
Y	WO 99 17740 A (DASSEUX JEAN LOUIS) 15 April 1999 (1999-04-15) bladzijde 6, regel 23 - regel 37; conclusies 1-5,10-15,31-34 bladzijde 7, regel 34 -bladzijde 8, regel 2 bladzijde 18, regel 1 - regel 13	1-21
Y	DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; Februari 2001 (2001-02) BARLAGE STEFAN ET AL: "ApoE-containing high density lipoproteins and phospholipid transfer protein activity increase in patients with a systemic inflammatory response." Database accession no. PREV200100192387 XP002236821 samenvatting & JOURNAL OF LIPID RESEARCH, deel 42, nr. 2, Februari 2001 (2001-02), bladzijden 281-290, ISSN: 0022-2275 in de aanvraag genoemd	1-21

Formulier PCT/ISA/201 (vervolg tweede blad) (juli 1992)

ONVOLLEDIG ONDERZOEK
AANVULLINGSBLAD C

Octrooiaanvrage Nr.:

SN 39205
NL 1020962

Ofschoon de conclusies 16-19 gericht zijn op een methode voor het therapeutisch behandelen van het menselijk of dierlijk lichaam, is het vooronderzoek uitgevoerd op basis van de veronderstelde werking van de verbinding/samenstelling.

VERSLAG VAN HET NIEUWHEIDSONDERZOEK VAN INTERNATIONAAL TYPE

Informatie over leden van dezelfde octrooifamilie

Nummer van het verzoek om een nieuwheidsonderzoek
NL 1020962

In het rapport genoemd octrooigeschrift	Datum van publicatie	Overeenkomend(e) geschrift(en)		Datum van publicatie
US 5747455 A	05-05-1998	US	5594113 A	14-01-1997
		US	6222021 B1	24-04-2001
		US	5627266 A	06-05-1997
		US	5614369 A	25-03-1997
		US	6384200 B1	07-05-2002
		AU	2006892 A	30-12-1992
		DE	69232307 D1	31-01-2002
		DE	69232307 T2	18-07-2002
		EP	0586573 A1	16-03-1994
		WO	9220715 A1	26-11-1992
		AT	207205 T	15-11-2001
		AU	3772289 A	12-01-1990
		CA	1338836 A1	07-01-1997
		DE	68925275 D1	08-02-1996
		DE	68925275 T2	22-08-1996
		DE	68929334 D1	22-11-2001
		EP	0379549 A1	01-08-1990
		EP	0687911 A2	20-12-1995
		JP	2774343 B2	09-07-1998
		JP	3501733 T	18-04-1991
		WO	8912644 A1	28-12-1989
WO 9917740 A	15-04-1999	US	6287590 B1	11-09-2001
		AU	749344 B2	27-06-2002
		AU	9671598 A	27-04-1999
		CA	2305704 A1	15-04-1999
		CN	1280490 T	17-01-2001
		EP	1019025 A1	19-07-2000
		HU	0003930 A2	28-05-2001
		JP	2001522781 T	20-11-2001
		NO	20001683 A	10-05-2000
		NZ	503721 A	31-08-2001
		PL	339654 A1	02-01-2001
		WO	9917740 A1	15-04-1999
		US	6455088 B1	24-09-2002