

700018/SZE

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDANY**

Szepszis kezelése kis dózisú szöveti faktor bioszintézis
inhibítor (TFPI) beadásával

KIVONAT

A találmány tárgya eljárás szepszis vagy szeptikus sokk profilaktikus vagy terápiás kezelésére, ami abból áll, hogy szöveti faktor bioszintézis inhibítort (TFPI) vagy egy TFPI analógot adnak be szepszisben vagy más gyulladásos állapotban szenvedő betegeknek. Az eljárások magukban foglalják a TFPI vagy egy TFPI analóg folyamatos intravénás infúzióját, kis dózisban, hogy elkerüljék a káros mellékhatásokat.

zelleuro abra Ø
2012.11.14

700018/SZE

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

Szeepszis kezelése kis dózisú szöveti faktor bioszintézis
inhibitor (TFPI) beadásával

A találmány tárgya eljárás szeepszis, szeptikus sokk, valamint akut vagy krónikus gyulladás kezelésére, a mellékhatások minimalizálása mellett. Pontosabban, a találmány tárgya kis dózisú szöveti faktor bioszintézis inhibitor fehérje beadása, hogy gyengítsük a szeepszishez vagy szeptikus sokkhoz kapcsolódó túlmaradó vagy felerősödött fiziológiás bioszintézis utakat.

A szeepszis vagy szeptikus sokk a műtét utáni és a kritikus állapotú betegek esetében a legrettegettebb komplikációk egyike. A Center for Disease Control a szeptikémiát az Amerikai Egyesült Államokban a vezető halálokok között a 13. helyre sorolta (MMWR 39, 31 (1987); US Dept of Health and Human Services 37, 7 (1989)), az idős amerikaiak között pedig a 10. helyre [MMWR 39, 31 (1987)]. Ezeknek a rendellenességeknek az előfordulási gyakorisága nő, és a mortalitás magas marad. A szeptikémiás betegek kezelési költségeit évente dollármilliárdokra becsülik [MMWR 39, 31 (1987)]. A betegek 28-60%-a meghal, és ez a százaléknak semmilyen javulást nem mutatott az elmúlt 20 évben. A Gram-pozitív és Gram-negatív bakteriális fertőzések egyforma valószínűséggel vezetnek szeepszishez vagy szeptikus sokkhoz.

A szeepszis egy toxikus állapot, amely abból ered, hogy a különböző mikroorganizmusok, beleértve a baktériumokat, gombákat, parazitákat, vírusokat és hasonlókat, valamint ezek termékeit (azaz például a Gram-negatív baktériumok endotoxinjait) a fertőzés középpontjából szétterjednek. A szeptikémia a szeepszis egyik

formája, pontosabban egy olyan toxikus állapot, amely abból ered, hogy a bakteriális termékek a véráramban elterjednek, a fertőzés középpontjából kiindulva. A szepszis számos különböző módon eredményezhet sokkot, ezek közül néhány kapcsolatban áll a fertőzés primer fókuszpontjával, és néhány kapcsolatban áll a bakteriális endotoxinok szisztémás hatásaival. A szeptikémiában például a bakteriális termékek, a pro-gyulladásos citokinekkal, azaz például az interleukin-1-gyel, interleukin-6-tal és tumor nekrozis faktorral együtt, aktiválják a koagulációs rendszert, és iniciálják a vérlemezke aggregációt. Ez a folyamat nagyon erős szisztémás gyulladást, valamint széleskörű véralvadást vagy vérzést eredményez, amely kapcsolatban áll a klinikai tünetekkel, beleértve a vérnyomás csökkenését, végül pedig a vese, a szív és a tüdő károsodását.

A szeptikus sokkot a nem kielégítő mértékű szöveti perfúzió jellemzi, ami végül a szövetek nem kielégítő oxigénellátását, alacsony vérnyomást és oliguriát eredményez. A szeptikus sokk azért lép fel, mert a mikroorganizmusok, beleértve a baktériumokat, és azok termékei, azaz például az LPS, közvetlenül aktiválják az immunrendszert, valamint a gazdaszervezet más védelmi mechanizmusait, beleértve a koagulációt és a komplement rendszert, amelyek viszont egy sor, egymással bonyolult kapcsolatban álló mechanizmus révén egymást amplifikálják. A gazdaszervezet ilyen védelmi mechanizmusainak a túlerősítése végül sejtsérülést okoz, valamint a véráramlás megváltozását a mikrovaszkulaturában, ami végül több szerv károsodását eredményezi. A mikroorganizmusok gyakran aktiválják a klasszikus komplement bioszintézis utat, az endotoxin pedig az alternatív bioszintézis utat aktiválja. A komplement aktiválás, a leukotrién generálás és az

endotoxin közvetlenül a neutrofilekre gyakorolt hatásai ahhoz vezetnek, hogy ezek a gyulladásos sejtek felhalmozódnak a tüdőkben, enzimek szabadulnak fel, valamint toxikus oxigéngyökök termelődnek, melyek károsítják a pulmonáris endotéliumot és az akut légzési nehézség szindrómát (ARDS) iniciálják. Az ARDS a halál egyik fő oka a septicus sokkban szenvedő betegeknél, ezt a pulmonáris vérbőség, a granulocita aggregáció, a vérzés és a kapilláris trombusok jellemzik.

A fulmináns disszeminált intravaszkuláris koagulációról (DIC), amit fölös véralvadás vagy súlyos vérzés jellemez, kiderült, hogy a septicus betegeknél majdnem 80%-ában előfordul, és az összes típusú koagulációs abnormalitás sokkal gyakoribb [Levi és mtsai: *Thromb. Haemost.* 82, 695-705 (1999)]. A koagulopátiák végül több szerv károsodásához vezetnek, ami a súlyos szepszises betegeknél a halál legfőbb közvetlen oka. A DIC egy koagulopátiás rendellenesség, amely a szervezetbe behatoló mikroorganizmusokra adott válaszként fordul elő, amit a fibrinnek a kis véredényekben való széleskörű lerakódása jellemez. Úgy tűnik, hogy a DIC indító oka a tromboplasztin (szöveti faktor) kiszabadulása a keringésbe. Ebben a folyamatban csökken a fibrinogén és a vérlemezék mennyisége, és nő a fibrin hasítási termékeinek mennyisége, ami a fibrin lerakódását eredményezi a véredényekben. A betegek vagy trombózisban szenvednek, vagy véreznek, attól függően, hogy a kóros folyamatban mennyire merültek ki a proteáz inhibitorok. A DIC néhány általános komplikációja a súlyos klinikai vérzés, trombózis, szöveti iszkémia és nekrosis, hemolízis és szervkárosodás. A koagulációs kaszkád szabályozásának egy része függ a véráramlás sebességétől. Ha az áramlás sebessége csökken, mint a DIC-ben és a szepszisben, akkor a problémák megsokszó-

rozódnak. A DIC-ről (klinikailag enyhétől súlyosig terjedő formájában) azt gondolják, hogy nagy gyakorisággal fordulnak elő szeptikus sokk betegekben, és számos más szindrómában, azaz például fejsérülésben és égésekben, szülészeti komplikációkban, transzfúziós reakciókban és rákban.

A DIC számos különböző gyulladásos állapottal van kapcsolatban. A szeptikus betegekben a DIC és az akut légzési nehézség tünetben (ARDS) azok a változók, amik a leginkább előre jelzik a 7. napon bekövetkező halált (kockázati arány 4 és 2,3) [Martin és mtsai: Natural History in the 1980s, Abstract No. 317 ICAAC Meeting, Dallas (1989)]. Az események sorrendje, amely szepszishez vezet, beleértve a szöveti faktor expresszióját az endotéliumon, vagy a szöveti faktor érintkezését a vérrel, és a szöveti faktor kiszabadulását a keringésbe, nagyon komplex. Különböző citokinek szabadulnak ki az aktivált monocitákból, az endoteliális sejtekből és máshonnan. Ezek közé a citokinek közé tartozik a tumor nekrosis faktor (TNF), az interleukin-1 (IL-1) (melyekről ismert, hogy felerősíti a szöveti faktor expresszióját), az interleukin-6 (IL-6), a gamma interferon (IFN γ), az interleukin-8 (IL-8) és mások. A komplement kaszkád is aktiválódik, amit a C3a és a C5a szintek megemelkedése demonstrál a szeptikus betegek plazmájában.

A szöveti faktor inhibitor (TFPI) fehérje az emlős vérplazmában levő szerin proteáz inhibitor [Thomas: Bull. Johns Hopkins Hosp. 81, 26 (1947); Schneider: Am. J. Physiol. 149, 123 (1947); Broze & Miletich: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 84, 1886 (1987)]. A TFPI szöveti faktor inhibitor, szöveti tromboplasztin inhibitor, III-as faktor inhibitor, külső bioszintézis inhibitor (EPI) és lipoproteinhez kapcsolódó

koaguláció inhibitor (LACI) néven is ismert. 1991. június 30-án a „szöveti faktor bioszintézis inhibitor” (TFPI) elnevezést fogadta el az International Society on Thrombosis and Hemostasis.

A véralvadás aktiválása a folyékony vér átalakítása szilárfgellé vagy röggé. Emellett a koagulációs proteázok elfogyása súlyos vérzéshez vezet. A legfontosabb esemény az oldható fibrinogén átalakítása oldhatatlan fibrinszállakká, bár a fibrin maga a teljes vérrögnek csak 0,15%-át képezi. Ez a konverzió az utolsó lépés egy komplex enzim-kaszkádban. A komponensek (faktorok) zimogénként, azaz proteolitikus enzimek inaktív prekurzoraiként vannak jelen, amelyek aktív enzimekké specifikus pontokban, proteolitikus hasítással alakulnak át. Egy faktor kis mennyiségének aktiválása katalizálja a következő nagyobb mennyiségének képződését, és így tovább, ami amplifikációt eredményez, aminek eredménye viszont a fibrin nagyon gyors képződését eredményezi.

Azt gondolják, hogy a koagulációt a véredény károsodása okozza, ami a VIIa faktort érintkezésbe hozza a szöveti faktorrall, amely az endotélium alatt levő sejtek felszínén expresszállódik. A VIIa faktor –TF komplex a X-es faktort Xa faktorrá hasítja, és a IX-es faktort IXa faktorrá hasítja. A TFPI mind a VIIa faktorhoz, mind a Xa faktorhoz kötődik. A TFPI, a VIIa faktor (a megkötött szöveti faktorrall) és a Xa faktor között képződött komplex gátolja a X-es faktor és IXa faktor további képződését, ami a fenntartott hemosztázishoz szükséges [Broze, Jr.: Ann. Rev. Med. 46, 103 (1995)].

A koagulációs kaszkád aktiválása bakteriális termékekkel, beleértve az endotoxinokat, közvetlenül a véráramba juttatva, eredményezhetnek kiterjedt fibrin depozíciót az arteriális felszí-

neken, valamint a fibrinogén, protrombin, V-ös faktor és VIII-as faktor, valamint a vérlemezék elfogását. Emellett, a fibrinolitikus rendszer stimulálása eredményezi a fibrin lebomlási termékek további képződését.

Ugyanakkor, amikor a koagulációs aktiválást látszólag iniciálják a bakteriális termékek (azaz például az endotoxinok), úgy tűnik, hogy az ezzel ellentétes mechanizmusok is aktiválódnak véralvadással, nevezetesen a fibrinolitikus rendszer aktiválásával. Az aktivált XIII-as faktor a plazminogén pro-aktivátort konvertálja plazminogén aktivátorrá, amely ezután a plazminogént plazminná alakítva, ezzel a vérrög lízist végrehajtva. A plazma fibrinolitikus rendszer tehát hozzájárulhat a vérzési tendenciákhoz.

Az endotoxémia kapcsolatban van a szöveti plazminogén aktivátor inhibitor keringő szintjének növekedésével. EZ az inhibitor gyorsan inaktiválja a szöveti plazminogén aktivátort (TPA), ezzel akadályozva azt a képességét, hogy elősegíti a fibrinolízist, a plazminogén plazminná való aktiválásával. A fibrinolízis gátlása fibrin lerakódást okozhat a véredényekben, ezzel hozzájárulva a szeptikus sokkhoz kapcsolódó DIC-hez.

Jelenleg is erőfeszítések történnek hogy azonosítsák a kielégítő beavatkozásokat a szepszis és a kapcsolódó koagulopátiák megelőzésére. Egy olyan szer, amely megszakítja a koagulációs bioszintézis utat, nem szükségszerűen hatékony a szeptikus sokk terápiás vagy profilaktikus kezelésében. Például a heparin egy általánosan használt antikoaguláns. Azonban a heparin használatának menedzselése nehéznek bizonyult, mivel a heparin erős vérzéseket képes indukálni, és kiderült, hogy gyengíti a koagulációs abnormalitásokat, de nem kínál túlélési

előnyöket [lásd például: Aoki és mtsai: „A Comparative Double-BLIND randomized Trial of Activated Protein C and Unfractionated Heparin in the Treatment of Disseminated Intravascular Coagulation”, *Int. J. Hematol.* 75, 540-47 (2002)]. Számos klinikai kipróbálás, főleg a meningokokkuszos endotoxémia területén, ahol a heves DIC egy erősen jellemző tulajdonság, heparinos kezeléssel nem volt képes demonstrálni a mortalitás csökkenését szepszisben [lásd például: Corrigan és mtsai: „Heparin Therapy in Septacemia with Disseminated Intravascular Coagulation. Effect on Mortality and on Correction of Hemostatic Defects”, *The New England Journal of Medicine* 283, 778-782 (1970); Lasch és mtsai: Heparin Therapy of Diffuse Intravascular Coagulation (DIC)”, *Thromb. Diath. Haemorrh.* 33, 105 (1974); Straub: „A Case Against Heparin Therapy of Intravascular Coagulation”, *Thromb. Diath. Haemorrh.* 33, 107 (1974)].

Annak a tulajdonságának az ismeretében, hogy gyengíti a koagulációs kaszkád aktiválását, és javítja a gyulladásos választ, és megköti az endotoxint, azt javasolták, hogy a TFPI jól használható a szepszis kezelésében. A rekombináns humán ala-TFPI (egy TFPI analóg) beadásáról kimutatták, hogy állatmodellekben megjavítja a túlélési arányokat (lásd például 6,063,764 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírást). Endogén fehérvérsejt-ként a TFPI jól tolerált. A TFPI intravénás infúzióval vagy szubkután injekcióval történő beadásáról kimutatták, hogy csökkenti a véralvadási képességet, ami a megnövekedett protrombin időben (PT) manifesztálódik. Állatok és emberek vizsgálatában a PT meghosszabbodása lineáris arányban van a plazma TFPI

szintjének megnövekedésével [A.A. Creasey: Sepsis 3, 173 (1999)].

A szakterületen megmaradt az igény azokra a kezelési megközelítési módokra, melyek gátolják a szepszis letális hatásait, és ezzel egyidőben minimalizálják a potenciálisan súlyos mellékhatásokat.

A találmány egyik megvalósítási módja eljárás szepszis kezelésére, azzal jellemezve, hogy szepszises, vagy szeptikussá válás kockázatával élő betegnek TFPI-t vagy TFPI analógot adunk be, folyamatos intravénás infúzióval, olyan dózis-sebességgel, amely ekvivalens a referencia ala-TFPI körülbelül 0,00025 – 0,050 mg/kg/óra dózis-sebességgel, legalább körülbelül 72 óráig történő beadásával.

A találmány egy másik megvalósítási módja egy profilaktikus eljárás, amellyel a szepszis kockázatát és súlyosságát csökkenteni lehet, TFPI-nek vagy egy TFPI analógnak egy olyan betegnek történő beadásával, aki érzékeny a szepsziszre, vagy feltételezhető, hogy szeptikussá válik, a beadáshoz folyamatos intravénás infúziót használva, olyan dózis-sebességgel, amely ekvivalens a referencia ala-TFPI körülbelül 0,00025 – 0,050 mg/kg/óra dózis-sebességgel, legalább körülbelül 72 óráig történő beadásával.

A találmány egy másik megvalósítási módja eljárás akut gyulladás, beleértve a szepszist és a szeptikus sokkot is, profilaktikus és terápiás kezelésére, azzal jellemezve, hogy egy betegnek i) folyamatos intravénás infúzióval TFPI-t vagy TFPI analógot adunk be, olyan dózis-sebességgel, amely ekvivalens a referencia ala-TFPI körülbelül 0,00025 – 0,050 mg/kg/óra dózis-sebességével és ii) valamint beadunk egy további szert, melyet a következő

csoportból választhatunk ki: egy antibiotikum, egy monoklonális ellenanyag, egy citokin inhibitor és egy komplement inhibitor.

A találmány egy másik megvalósítási módja eljárás egy DIC-hez nem kapcsolódó kóros állapot kezelésére, amelyben a TNF, az interleukin-1 vagy más citokin felerősíti a szöveti faktor expresszióját, azzal jellemezve, hogy egy betegnek folyamatos intravénás infúzióval adunk be egy szert, melyet a következő csoportból választunk ki: TFPI vagy egy TFPI analóg, olyan dózis-sebességgel, amely ekvivalens a referencia ala-TFPI körülbelül 0,00025 – 0,050 mg/kg/óra dózis-sebességgel, legalább körülbelül 72 óráig történő beadásával. Egy előnyben részesített megvalósítási mód szerint a kóros állapot krónikus vagy akut gyulladás. Egy másik előnyben részesített megvalósítási mód szerint a szóban forgó betegben a szóban forgó beadási periódusban az interleukin-6 plazmakoncentrációja csökken.

A találmány egy másik megvalósítási módja az előzőekben ismertetett megvalósítási módok bármelyike, ahol a szóban forgó TFPI analóg egy nem-glikozilezett ala-TFPI.

A találmány egy másik megvalósítási módja az előzőekben ismertetett megvalósítási módok bármelyike, ahol a szóban forgó TFPI analóg tartalmaz egy Kunitz domént, amely tartalmazza az 1. számú szekvencia 19-89-es aminosavait. Egy előnyben részesített megvalósítási mód szerint a szóban forgó TFPI analóg tartalmaz még egy második Kunitz domént is, amely az 1. számú szekvencia 90-160-as aminosavait tartalmazza.

Más megvalósítási módok tartalmazzák azokat az előzőekben említett megvalósítási módokat, melyekben a szóban forgó TFPI analóg tartalmazza az 1. számú szekvencia 1-160-as aminosavait, vagy amelyekben a szóban forgó TFPI analóg tartalmaz

egy második Kunitz domént, amely tartalmazza az 1. számú szekvencia 90-160-as aminosavait.

Más megvalósítási módok tartalmazzák azokat az előzőekben említett megvalósítási módokat, melyekben a szóban forgó dózis-sebesség ekvivalens a referencia ala-TFPI körülbelül 0,010-0,045 mg/kg/óra dózis-sebességgel történő beadásával. Egy előnyben részesített megvalósítási mód szerint a szóban forgó dózis-sebesség ekvivalens a referencia ala-TFPI körülbelül 0,025 mg/kg/óra dózis-sebességgel történő beadásával.

Más megvalósítási módok közé tartozik az előzőekben ismertett megvalósítási módok bármelyike, ahol a szóban forgó beadási periódus legalább körülbelül 96 óra.

Más megvalósítási módok közé tartozik az előzőekben ismertett megvalósítási módok bármelyike, ahol a szóban forgó dózis-sebességet úgy alkalmazzuk, hogy akkora össz-dózist kapjunk, amely ekvivalens a referencia ala-TFPI körülbelül 0,024-4,8 mg/kg össz-dózisban történő beadásával.

Más megvalósítási módok közé tartozik az előzőekben ismertett megvalósítási módok bármelyike, ahol a szóban forgó dózis-sebességet úgy alkalmazzuk, hogy akkora napi dózist kapjunk, amely ekvivalens a referencia ala-TFPI körülbelül 0,006mg/kg és kisebb mint körülbelül 1,2 mg/kg napi dózisával.

Más megvalósítási módok közé tartozik az előzőekben ismertett megvalósítási módok bármelyike, ahol a szóban forgó TFPI vagy TFPI analóg beadását leállítjuk, ha a szóban forgó beteg INR-je vagy legalább 20%-kal meghaladja az alapvonal INR-t, vagy értéke legalább körülbelül 2,5.

Más megvalósítási módok közé tartozik az előzőekben ismertett megvalósítási módok bármelyike, ahol a szóban forgó beteg APACHE II értéke legalább 20.

Más megvalósítási módok közé tartozik az előzőekben ismertett megvalósítási módok bármelyike, ahol a szóban forgó beteg alapvonali plazma interleukin-6 koncentrációja legalább körülbelül 1000 pg/ml.

Más megvalósítási módok közé tartozik az előzőekben ismertett megvalósítási módok bármelyike, ahol a szóban forgó beteg sokkban szenved.

Más megvalósítási módok közé tartozik az előzőekben ismertett megvalósítási módok bármelyike, ahol a szóban forgó beteg ARDS-ben szenved.

Más megvalósítási módok közé tartozik az előzőekben ismertett megvalósítási módok bármelyike, ahol a szóban forgó beteg pulmonáris értéke, ICU értéke, vagy több szervre kiterjedő diszfunkciós értéke van, amely a szóban forgó beadás időtartama alatt növekszik.

Más megvalósítási módok közé tartozik az előzőekben ismertett megvalósítási módok bármelyike, ahol a szóban forgó TFPI-t vagy TFPI analógot egy TFPI-t vagy TFPI analógot tartalmazó liofilezett készítményből állítjuk elő.

Más megvalósítási módok közé tartozik az előzőekben ismertett megvalósítási módok bármelyike, ahol a szóban forgó TFPI-t vagy TFPI analógot arginint tartalmazó készítményben adjuk be.

Más megvalósítási módok közé tartozik az előzőekben ismertett megvalósítási módok bármelyike, ahol a szóban forgó TFPI-t vagy TFPI analógot citrátot tartalmazó készítményben adjuk be.

Más megvalósítási módok közé tartozik az előzőekben ismertetett megvalósítási módok bármelyike, ahol a szóban forgó TFPI vagy TFPI analóg koncentrációja körülbelül 0,15 mg/ml egy olyan készítményben, amely körülbelül 300 mmol/l arginin hidrokloridot és körülbelül 20 mmol/l nátrium-citrátot tartalmaz, pH-ja pedig körülbelül 5,5.

Más megvalósítási módok tartalmazzák azokat az előzőekben említett megvalósítási módokat, melyekben a szóban forgó TFPI vagy TFPI analóg beadásának időpontjában, vagy ahhoz képest 24 órán belül egy további szertadunk be, melyet a következők közül választunk ki: antibiotikum, ellenanyag, endotoxin antagónista, antikoaguláns aktivitással rendelkező szöveti faktor analóg, immunstimuláns, sejt adhézió blokkoló, heparin, BPI fehérje, interleukin-1 antagónista, pafase (PAF enzim inhibitor), TNF inhibitor, interleukin-6 inhibitor és komplement inhibitor. Egy előnyben részesített megvalósítási mód szerint a szóban forgó további szer egy ellenanyag, amely specifikusan kötődik az alábbi csoportból választható antigénhez: TNF, interleukin-6 és M-CSF.

A találmány további megvalósítási módjai nyilvánvalóak az alábbiakban idézett ábrák és a részletes leírás alapján.

Az 1A. és 1B. ábrákon a kis dózisú ala-TFPI hatását láthatjuk a túlélésre (1A. ábra) és az interleukin-6 szintekre (1B. ábra) szeptikus humán betegeken. Az 1A. ábrán Kaplan Meier túlélési görbéket látunk 210 szeptikus betegből, akik vagy placebot, vagy *Escherichia coli*-ban expresszált rekombináns nem-glikozilezett ala-TFPI-t adunk be folyamatos intravénás infúzióval, 0,025 – 0,05 mg/kg/óra dózis-sebességgel (lásd az. 5. példát a részletekért). Az eredmények azt a trendet mutatják, hogy a mortalitás aránya csökken ala-TFPI kezeléssel. Az 1B. ábra mutatja azt az

időt, amely az alapvonali interleukin-6 szintek 35%-os csökkenéséhez szükségesek az 1A. ábrán bemutatott betegeknél. A kis dózisú ala-TFPI beadása szignifikánsan csökkenti az interleukin-6 szinteket a placebohoz viszonyítva, két különböző statisztikai megközelítési módot használva (M&M és LOCF; $p=0,009$ és $0,025$).

A 2A. és 2B. ábrán a trombin-antitrombin (TATc) szintek kinetikáját mutatjuk be az 5. példában ismertetett 210 szeptikus betegnél. A 2A. ábrán a TATc szinteket külön mutatjuk az ala-TFPI $0,025$ mg/kg/óra és $0,050$ mg/kg/órás dózisaiban, valamint a placebo beadásánál. A 2B. ábra mutatja a $0,025$ mg/kg/óra és a $0,050$ mg/kg/óra kombinált adatait a placeboval szemben. A TATc geometriai átlaga szignifikánsan alacsonyabb az ala-TFPI-vel kezelt betegekben, mint a placeboval kezelt betegekben, az ala-TFPI beadás első 24 órájában. A TATc szintek 72 óra alatt is szignifikánsan alacsonyabbak maradtak.

A 3. ábrán mutatjuk be az INR és az ala-TFPI („rTFPI”) plazmakoncentrációja közötti összefüggést egészséges önkéntesekben.

A TFPI vagy a TFPI analógok folyamatos kis dózisú beadása (a továbbiakban „kis dózisú TFPI beadás”) hatékony a szepszis megelőzésében és kezelésében, mégis szignifikánsan minimalizálja a potenciálisan káros komplikációkat, melyeket néhány, magasabb dózissal kezelt betegben találtunk. A kis dózisú TFPI beadását általában a TFPI vagy egy TFPI analóg folyamatos intravénás infúziójával hajtjuk végre, olyan dózis-sebességgel, amely ekvivalens a referencia ala-TFPI legalább körülbelül $0,00025$ mg/kg/óra és kisebb mint körülbelül $0,050$ mg/kg/óra dózis-sebességével.

A kis dózisú TFPI beadása gátolja vagy enyhíti az akut vagy krónikus gyulladást, beleértve a szepszist és szeptikus sokkot. Ha a kis dózisú TFPI beadását legalább három napig folytatjuk, akkor a szepszisből származó halál kockázata csökken, miközben a káros mellékhatásokból, leginkább a vérzési rendellenességekből származó komplikációk aránya minimalizálódik, a magasabb dózisú TFPI beadással összehasonlítva.

A kis dózisú TFPI beadásának egy további előnye a tolerancia hatások elkerülése, ami kielégítően magas dózisokban képes csökkenteni a TFPI plazmakoncentrációját. A tolerancia hatások fél-maximálisan stimulálódnak körülbelül 850 ng/ml plazma TFPI koncentrációnál, míg a kis dózisú TFPI beadásánál a plazmaszintek általában 500 ng/ml alatt maradnak.

A találmány optimális egyensúlyt ér el a TFPI és a TFPI analógok hatékonysága között, a gyulladásos rendellenességek, azaz például a szepszis kezelése és a káros mellékhatások elkerülése között, aminek eredménye a magasabb dózisok, vagy a beadás alternatív stratégiái. A kis dózisú TFPI beadása hatékony még a szepszishoz kapcsolódó koagulációs rendellenességek, azaz például a disszeminált intravaszkuláris koaguláció (DIC), az akut légzési nehézségek szindróma (ARDS) és a több szerve kiterjedő károsodás megelőzésében és kezelésében.

Ha a TFPI-t vagy egy TFPI analógot olyan dózis-sebességgel adjuk be, amely ekvivalens az ala-TFPI legalább körülbelül 0,00025 mg/kg/óra (0,00417 µg/kg/perc) dózis-sebességével, és kisebb mint körülbelül 0,050 mg/kg/óra (0,833 µg/kg/perc) dózis-sebesség, akkor a szepszis kezelésének hatékonysága megmarad, és a káros mellékhatásokat, azaz például a vérzést, minimalizálni lehet. Az optimális kombinált hatékonysághoz és

biztonsághoz a dózis előnyösen ekvivalens az ala-TFPI legalább körülbelül 0,010 mg/kg/óra (0,167 µg/kg/perc) dózis-sebességével, és kisebb mint körülbelül 0,045 mg/kg/óra (0,833 µg/kg/óra), vagy ekvivalens az ala-TFPI legalább körülbelül 0,020 mg/kg/óra dózis-sebességével, és kisebb mint körülbelül 0,040 mg/kg/óra, és legelőnyösebben ekvivalens az ala-TFPI körülbelül 0,025 mg/kg/óra (0,417 µg/kg/perc) dózis-sebességével. A beadás módja rendszerint intravénás, ebből a folyamatos intravénás infúziót részesítjük előnyben. Az infúziót beadhatjuk legalább körülbelül 72, 96, 120 vagy 240 óráig. A folyamatos infúziót előnyösen 3-8 napig adjuk be, előnyösebben 3-6 napig, és legelőnyösebben körülbelül 4 napig. A „folyamatos infúzióval” való beadás azt jelenti, hogy az infúziót körülbelül az előírt sebességgel tartjuk fenn, anélkül hogy lényeges megszakítás lépne fel az előírt időtartam alatt. Egy másik változat szerint intermittáló intravénás infúzió alkalmazható. Ha az intermittáló infúziót alkalmazzuk, akkor időátlagos dózis-sebességet kell használni, amely ekvivalens az előzőekben a folyamatos infúzióra előírt dózis-sebességgel. Emellett, az intermittáló infúzió programjának olyan maximális szérum-koncentrációt kell eredményeznie, amely maximum 20%-kal nagyobb a folyamat infúzióval kapott maximális koncentrációnál. Hogy elkerüljük a betegekben a káros mellékhatásokat, leginkább a vérzéssel járó mellékhatásokat, a dózis-sebességnek kisebbnek kell lennie, mint annak a dózis-sebességnek, amely ekvivalens az ala-TFPI körülbelül 0,050 mg/kg/óra folyamatos intravénás infúzióval kapott dózis-sebességgel.

Az összes itt ismertetett dózis, beleértve a dózis-sebességeket és össz-dózisokat is, a gyakorlatban maximum 10%-os

hibahatárral változhatnak, annak a hibának a következtében, ami a fehérje-koncentráció és a protrombin esszé biológiai aktivitásának meghatározásában fellép. Tehát minden olyan, aktuálisan használt dózist, amely maximum 10%-kal kisebb vagy 10%-kal nagyobb az itt megadott dózisnál, ekvivalensnek tekintjük a megadott dózissal. Ezért minden dózist úgy adunk meg, mint egy specifikus dózis „körülbelüli” értékét. Például egy „körülbelül 0,025 mg/kg/óra” dózist ekvivalensnek tekintünk minden, 0,0225-0,0275 mg/kg/óra aktuális dózissal.

A TFPI, vagy egy TFPI analóg bolus injekcióját, vagy rövid ideig valamivel magasabb infúziós sebességét használhatjuk a találmány gyakorlatában, ha alacsony dózisú TFPI beadása követi. Például bolus injekció vagy magasabb infúziós sebesség használható arra, hogy csökkentsük a beadott TFPI vagy TFPI analóg ekvilibrációs idejét egy beteg keringésében. Ha így teszünk, akkor a TFPI végleges állandó plazmaszintje gyorsabban elérhető, és a TFPI receptorok gyorsabban telíthetők. Az ala-TFPI beadása embereknek körülbelül 0,025 mg/kg/óra sebességgel körülbelül 2 óra hosszat, a TFPI (plusz ala-TFPI) plazmaszintjét körülbelül 80 ng/ml-ről körülbelül 125 ng/ml-re növeli, vagy egy körülbelül 50%-os növekedést okoz. Ugyanaz a szint gyorsabban elérhető, ha az infúzió sebességét megnöveljük, vagy bolus injekciót használunk. A nagyobb infúziós sebességek az infúzió magasabb szintjeit eredményezik, ha az infúziót addig folytatjuk, amíg az állandósult állapotot elérjük. A körülbelül 0,050 mg/kg/óra ala-TFPI beadásával elért állandósult szintről kiderült, hogy az körülbelül 300 ng/ml, és a körülbelül 0,33 vagy körülbelül 0,66 mg/kg/óra ala-TFPI beadásáról kiderült, hogy az

körülbelül legalább 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ szintet biztosít a szepszisben szenvedő betegekben.

Az egy gazdaszervezetbe egyetlen folyamatos infúzióval vagy megosztott infúziós dózisokban beadott teljes napi dózis például ekvivalens legalább körülbelül 0,006 $\text{mg}/\text{kg}/\text{nap}$ -tól kisebb mint körülbelül 1,2 $\text{mg}/\text{kg}/\text{nap}$ -ig terjedő mennyiségű ala-TFPI-vel, általában ekvivalens körülbelül 0,24 $\text{mg}/\text{kg}/\text{nap}$ -tól kisebb mint 1,2 $\text{mg}/\text{kg}/\text{nap}$ -ig terjedő dózissal, és előnyösen ekvivalens körülbelül 0,6 $\text{mg}/\text{kg}/\text{nap}$ ala-TFPI dózissal. Ebben a tartományban a kisebb mennyiségek jól használható megelőzési és egyéb célokra. A találmány szerinti dozírozási protokoll kifejezhető a betegnek beadott teljes dózisban is. A teljes dózis az infúziós sebesség és az infúzió teljes idejéből származtatott matematikai mennyiség. Például az ala-TFPI előnyben részesített, körülbelül 0,025 $\text{mg}/\text{kg}/\text{óra}$ dózisában és az előnyben részesített, 96 órás infúziós idővel az össz-dózis körülbelül 2,4 mg ala-TFPI per test-súlykg. A TFPI-nek a találmány szerint beadott teljes dózisa ekvivalens legalább körülbelül 0,75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ és kevesebb mint körülbelül 4,8 mg/kg ala-TFPI-vel. A teljes dózis előnyösen ekvivalens legalább körülbelül 1 mg/kg és kevesebb mint körülbelül 4,8 mg/kg ala-TFPI-vel. Még előnyösebben a teljes dózis ekvivalens körülbelül 2,4 mg/kg ala-TFPI-vel.

Az egyik faktor, amit arra lehet használni, hogy a dózistartományt beállítsuk, az egyes betegek koagulációs funkciója, amit tipikus esetben egy protrombin idő (PT) esszével lehet mérni, vagy a Nemzetközi Normalizált Arány (INR). Az INR a PT esszé standardizálása, amiben az esszét a nemzetközi referens trombo-plasztin reagenssel szemben kalibrálják [R.S. Riley és mtsai: J. Clin. Lab. Anal. 14, 101-114 (2000)]. Egészséges önkéntesekben

az ala-TFPI-re adott INR válasz körülbelül lineáris a látható plazmakoncentráció tartományban (3. ábra). Az INR teljes változása 1,2 egység per 1 $\mu\text{g/ml}$ plazma ala-TFPI koncentráció növekedés. Egy farmakodinámiás modellben az ala-TFPI-re adott INR választ legjobban egy log-lineáris modell írja le, amelyben az INR logaritmus a lineárisan függ az ala-TFPI plazmakoncentrációtól. A válasz log-lineáris természete azt jelenti, hogy az alapvonalon megnőtt INR-rel rendelkező alanyok valószínűleg nagyobb antikoaguláns választ adnak, mint azok az alanyok, akiknél alacsony az alapvonalis érték, és hasonló szinten áll a keringő ala-TFPI. Emellett, a koncentráció-válasz görbe meredeksége nagyobbak tűnik a szepszises betegekben mint az egészséges alanyokban, ami azt sugallja, hogy a súlyos szepszisben szenvedő alanyok fokozottabban érzékenyek az ala-TFPI-re. Abban a vizsgálatban a beteg-populációban az ala-TFPI dózis-sebességek a következő határok között változtak: a referencia ala-TFPI körülbelül 0,025 mg/kg/óra dózisával ekvivalens dózistól a referencia ala-TFPI körülbelül 0,66 mg/kg/óra dózisával ekvivalens dóziséig. Az ala-TFPI szepszises betegeken végzett II-es fázisú vizsgálatából származó adatok, melyeket a referencia ala-TFPI-nek körülbelül 0,025-0,050 mg/kg/óra dózis-sebességéig terjedő dózis-sebességgel kaptunk, azt mutatják, hogy az ala-TFPI-vel nagyobb a mortalitás csökkenése azoknál a betegeknél, akiknek az alapvonalis INR értéke legalább 1,2. (lásd az alábbi, 11. táblázatot). Tehát a találmány néhány megvalósítási módja szerint a kis dózisú TFPI beadást csak olyan betegeknél hajtjuk végre, akiknél a kis dózisú TFPI beadása előtt az alapvonalis INR értéke legalább 1,2, 1,25, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,8 vagy 2,0. Más megvalósítási módok szerint a kis dózisú TFPI beadását csökkentjük, a

TFPI beadás dózis-sebességének csökkentésével, vagy teljesen leállítjuk, ha a beteg INR értéke legalább 10%-kal, 15%-kal, 20%-kal, 25%-kal vagy 30%-kal, vagy jobban az alapvonal fölé nő, vagy, ha a beteg INR értéke veszélyesen magas szintet ér el, azaz például 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 3,0 vagy 3,5 értéket.

Az előzőkben ismertetett dózistartományokat, beleértve a mg/kg/óra alapon megadott dózis-sebességeket és a teljes napi dózist, a „referencia ala-TFPI beadásával ekvivalens” dózisként fejezzük ki. Ez azt jelenti, hogy ezeket mennyiségileg határozzuk meg, a „referencia ala-TFPI” egy dózisára normalizálva, amit úgy definiálunk, mint érett, 100%-osan tiszta (fehérje alapon) helyes térszerkezetű, biológiailag aktív, nem-glikozilezett ala-TFPI-t. Az ala-TFPI egy analóg TFPI, melynek aminosav szekvenciáját a 2. számú szekvenciavázlaton mutatjuk be. A TFPI más formáit is használhatjuk a találmányban, beleértve az érett, teljes hosszúságú TFPI-t, és annak analógjait. Ahhoz, hogy a találmány gyakorlásához meghatározzuk a megfelelő dózistartományt a TFPI ala-TFPI-től eltérő formáival, és az ala-TFPI vagy más TFPI analógok olyan készítményeivel, melyek nem 100%-osan tiszták, az itt a referencia ala-TFPI-re ismertetett dózistartományokat beállíthatjuk a TFPI adott formájának biológiai aktivitása alapján, és a beállítást tovább finomíthatjuk a készítmény biokémiai tisztasága alapján. A TFPI vagy egy TFPI analóg saját biológiai aktivitása a specifikus aktivitása, amit az érett, 100%-os tisztaságú, helyes térszerkezetű TFPI vagy TFPI analóg protrombin esszéjével lehet meghatározni. Tehát a referencia dózist a következőképpen számítjuk ki: $(\text{referencia ala-TFPI dózis})/(\text{relatív saját aktivitás}) \times \text{biokémiai tisztaság}$, ahol a relatív saját aktivitás jelentése $(\text{az analóg saját aktivitása})/(\text{a referencia ala-TFPI belső aktivi-}$

tása). Ha például egy adott TFPI analóg belső biológiai aktivitása a referencia ala-TFPI biológiai aktivitásának 80%-a, akkor az adott TFPI analógra az ekvivalens dózist úgy kapjuk meg, hogy a referencia ala-TFPI dózisát 0,8-cal osztjuk. Továbbá, ha a betegnek beadott készítmény csak 90%-os tisztaságú, azaz 10%-ban olyan molekulafajtákat tartalmaz, melyek nem rendelkeznek a TFPI biológiai aktivitásával, akkor a referencia ala-TFPI dózis egy további korrekciója az, hogy a dózis értékét 0,9-cel osztjuk. Tehát egy feltételezett TFPI analógot adunk be, amely az ala-TFPI-hez viszonyítva 80%-os saját aktivitással rendelkezik, és 90%-os biokémiai tisztaságú, akkor a referencia ala-TFPI 0,025 mg/kg/óra beadásával ekvivalens dózis-sebesség 0,0347 mg/kg/óra lesz (azaz $0,025 / (0,8 \times 0,9)$).

Az ekvivalens dózisok úgy is meghatározhatók, ha nem ismerjük a saját aktivitást vagy a biokémiai tisztaságot, a relatív biológiai aktivitás meghatározásával. A relatív biológiai aktivitást úgy határozhatjuk meg, hogy ha egy adott TFPI analógot hasonlítunk egy TFPI biológiai aktivitás standardhoz, a protrombin esszé alkalmazásával. Például a WO 96/40784 számú szabadalmi leírás 9. példája szerint előállított ala-TFPI, amely körülbelül 85%-ban tartalmaz biológiailag aktív TFPI molekulafajtákat, használható TFPI biológiai aktivitás standardként. A WO 96/40784 számú szabadalmi leírás 9. példája szerint előállított ala-TFPI aktivitása protrombin esszében körülbelül 85%-a a referenci ala-TFPI aktivitásának. A protrombin idő standard görbe ábrázolásánál a véralvadási idő logaritmusát ábrázoljuk a TFPI koncentráció logaritmusával szemben. Ha a TFPI biológiai aktivitás standard a referencia ala-TFPI aktivitásának 85%-ával rendelkezik, akkor elő lehet állítani egy standard görbét, amely

ekvivalens a referenci ala-TFPI görbájével, ha a TFPI biológiai aktivitás standard koncentrációit az ábrázolás előtt 0,85-tel szorozzuk, oly módon, hogy az ábrázolt aktivitás ekvivalens a tiszta referencia ala-TFPI aktivitásával. Ha egy adott TFPI analóg véralvadási idejét hasonlítjuk a standard görbéhez, akkor a referencia ala-TFPI ekvivalens koncentrációja leolvasható a görbéről. Egy másik változat szerint, ha a standard görbe lineáris részének meredekségét lineáris regressziós elemzéssel kapjuk meg, akkor a meredekség korrigálható, a TFPI biológiai aktivitás standardnak a referencia ala-TFPI-hez viszonyított aktivitása alapján. Tehát egy adott TFPI analóg relatív biológiai aktivitása egyenlő a referencia ala-TFPI aktivitása és az analóg aktivitása arányával. Ha például egy adott analógból 1,43 μg kell ugyanakkora protrombin idő generálásához, mint 1,00 μg referencia ala-TFP-nek, akkor az analóg részesítjük előnyben biológiai aktivitása $1,00/0,43$, azaz 0,7. Ehhez az analóghoz egy referencia ala-TFPI dózis ekvivalensét úgy kapjuk meg, ha a referencia ala-TFPI dózist eloszjuk az analóg relatív biológiai aktivitásával. Például a referencia ala-TFPI 0,025 mg/kg/óra dózisa az analóg 0,0357 mg/kg/óra dózisával ekvivalens (azaz $0,025/0,7$).

A TFPI és a TFPI analógok biológiai aktivitását a protrombin esszével lehet meghatározni. A megfelelő protrombin esszéket az 5,888,968 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírásban és a WO 96/40784 számú szabadalmi leírásban lehet megtalálni. Röviden, a protrombin időt egy koagulométerrel lehet meghatározni (azaz például Coag-A-Mate MTX II, az Organon Technika-tól). Egy használható esszé-puffer összetétele: 100 mmol/l nátrium-klorid, 50 mmol/l TRIS (pH=7,5), ami 1 mg/ml szarvasmarha szérum-albumint tartalmaz. Szükséges reagens

még a normál humán plazma (azaz például a „Verify 1”, Organon Teknika), tromboplasztin reagens (azaz például „Simplastin Excel”, Organon Teknika) és TFP standard oldat (azaz például 20 µg 100%-osan tiszta ala-TFPI (vagy annak ekvivalense) per ml esszé puffer). Standard görbét úgy kapunk, hogy a TFPI standard oldat sorozathígításának koagulációs idejét elemezzük, a végkoncentrációk 1-5 µg/ml között változnak. A véralvadási idő meghatározásához a mintát vagy a TFPI oldatot először az esszé pufferbe hígítjuk. Ezután normál humán plazmát adunk hozzá. A véralvadási reakció a tromboplasztin reagens reagens hozzáadásával indul. A berendezés azután feljegyezi a véralvadási időt. Lineáris TFPI standard görbét kapunk, ha véralvadási idő logaritmusát ábrázoljuk a TFPI koncentrációjának logaritmusával szemben. A standard görbét a TFPI standard tisztasága alapján állítjuk be, hogy feleljen meg egy 100%-os standard ekvivalens TFPI koncentrációjának. Ha például a standard egy olyan ala-TFPI készítmény, amely 97%-os biokémiai tisztaságú (azaz 3 tömeg% olyan molekulát tartalmaz, melyeknek nincs TFPI biológiai aktivitásuk), akkor a standard egyes hígításainak a koncentrációját 0,97-tel szorozzuk, hogy megkapjuk a TFPI aktuális koncentrációját. Tehát egy TFPI standard, amely a készítmény aktuális tömege alapján 1,0 µg/ml koncentrációjú, de 97%-os tisztaságú, $1,0 \times 0,97$, azaz 0,97 µg/ml koncentrációval lesz ekvivalens, és úgy fogjuk kezelni.

A továbbiakban a „szepszis” szakkifejezés jelentése egy toxikus állapot, amely a bakteriális endotoxinnak a fertőzés középpontjából való elterjedéséből, valamint a mikroorganizmusok vagy termékeik elterjedéséből ered.

A továbbiakban a „szepszishoz kapcsolódó koagulációs rendellenesség” szakkifejezés egy olyan rendellenességre vonat-

kozik, amely a koagulációs rendszer bakteriális endotoxinnal vagy mikroorganizmusokkal vagy termékeikkel való aktiválásából származik, vagy azzal áll kapcsolatban. Az ilyen, a szepszishez kapcsolódó koagulációs rendellenesség a disseminált intravaszkuláris koaguláció.

A TFPI és a TFPI analógok általában jól használhatók azokban a betegségekben, melyek a szöveti faktor felerősödése, és ezzel a szöveti faktor aktivitásának felerősödése következtében jönnek létre, amit a TNF, az interleukin-1 vagy más citokinek idéznek elő. A kis dózisú TFPI beadása a betegekben csökkentheti az interleukin-6 koncentrációkat, vagy más citokinek koncentrációját. A kis dózisú TFPI beadása jól használható általában a gyulladás kezelésére, beleértve mind az akut, mind a krónikus gyulladást. A kis dózisú TFPI-vel kezelhető tipikus gyulladásos állapotok a következők: arthritis, szeptikus sokk, reperfüziós sérülés, gyulladásos bélbetegség, akut légzési betegség (beleértve az akut légzési nehézség szindrómát, vagy ARDS-t), a trauma és az égés. A krónikus vagy akut gyulladás kezelése esetében a TFPI-t és a TFPI analógokat ugyanúgy, és ugyanabban a dózisban lehet beadni, mint az anti-szepszis eljárásban.

A TFPI-t és a TFPI analógokat arra használhatjuk, hogy olyan állapotokat kezeljünk velük, melyek bakteriális endotoxinok jelenlétéből, vagy mikroorganizmusoknak és termékeiknek a keringésben való jelenlétéből származik. Az ilyen állapotok közé tartozik a szeptikus sokk miatt fellépő bakterémia, hashártyagyulladás, valamint a több szervre kiterjedő károsodás és a DIC, valamint a súlyos tüdőgyulladás és a több szervre kiterjedő károsodás.

A „TFPI” és „érett, teljes hosszúságú TFPI” szakkifejezés jelentése a továbbiakban az érett polipeptid, amely 276 aminosavból áll, és amelynek szekvenciáját az 1. számú szekvenciavázlaton mutatjuk be.

A „TFPI analóg” szakkifejezés jelentése a továbbiakban a TFPI molekula származékai, azaz olyan molekulák, melyek a humán TFPI (1. számú szekvencia) teljes, 276 aminosavból álló szekvenciáját tartalmazzák, melyet egy vagy több aminosav hozzáadásával vagy helyettesítésével (általában konzervatív jellegű), egy vagy több aminosav (például TFPI fragmens) kivágásával, vagy egy vagy több kémiai egységnek egy vagy több aminosavhoz való hozzáadásával módosítunk, mindaddig, amíg a módosítások nem teszik tönkre a TFPI biológiai aktivitását. A polipeptid analógok előállítási módszerei ismertek a szakterületen, ezeket az alábbiakban ismertetjük. Egy előnyben részesített TFPI analóg az N-alanil-TFPI (ala-TFPI), melynek aminosav szekvenciáját a 2. számú szekvenciavázlaton mutatjuk be. A TFPI analógok rendelkeznek a TFPI valamilyen aktivitásával, amit az alábbiakban ismertetett biológiai aktivitási esszével lehet meghatározni. A TFPI és az analógok egy előnyben részesített biológiai aktivitási esszéje a protrombin idő (PT) esszé (lásd az alábbiakban).

A különösen előnyös TFPI analógok közé tartoznak a konzervatív természetű helyettesítések, azaz azok a helyettesítések, amelyek egy olyan aminosav-családon belül játszódnak le, amelyben az aminosavak rokon oldalláncokkal rendelkeznek. Pontosabban, az aminosavakat általában négy csoportba osztják: 1) savas - - aszpartát és glutamát; 2) bázikus - - lizin, arginin, hisztidin; 3) apoláros - - alanin, valin, leucin, izoleucin, prolin, fenilalanin, metionin, triptofán; és 4) töltetlen poláros - - glicin,

aszparagin, glutamin, cisztein, szerin, treonin és tirozin. A fenilalanint, triptofánt és tirozint néha az aromás aminosavak közé sorolják. Az például ésszerűen megjósolható, hogy egy leucin izolált helyettesítés izoleucinnal vagy valinnal, egy aszpartát izolált helyettesítése glutamáttal, egy treonin izolált helyettesítése szerinnel, vagy egy aminosav hasonló konzervatív helyettesítése egy szerkezetileg rokon aminosavval nem lesz nagy hatással a biológiai aktivitásra. Például a számunkra érdekes polipeptid maximum 1-70 konzervatív vagy nem-konzervatív aminosav helyettesítéseket tartalmazhat, azaz például 1, 2, 3, 4, 5, 6-50, 15-25, vagy 1 és 70 között bármilyen egész számú helyettesítést, mindaddig, amíg a molekula kívánt funkciója érintetlen marad. A szakterületen jártas szakember könnyen meg tudja határozni a számára érdekes molekulának azokat a régióit, amelyek módosíthatók, amellet, hogy elfogadható valószínűséggel megtartja az alábbiakban definiált biológiai aktivitását.

A „homológia” szakkifejezés két polinukleotid vagy két polipeptid egység közötti százalékos hasonlóságot jelenti. Két polipeptid szekvencia „lényegében homológ” egymással, ha a szekvenciák legalább körülbelül 50%-os, előnyösen legalább körülbelül 75%-os, előnyösebben legalább körülbelül 80-85%-os, előnyösen legalább körülbelül 90%-os, és legelőnyösebben legalább körülbelül 95-98%-os szekvencia-homológiát, vagy a specifikált tartományon belül bármilyen százalékos homológiát mutatnak, a molekulák egy meghatározott hosszában. A továbbiakban a „lényegében homológ” szakkifejezés olyan szekvenciákat is jelent, amelyek teljes azonosságot mutatnak egy specifikált polipeptid szekvenciával.

Az „azonosság” szakkifejezés általában két polipeptid szekvencia pontos aminosav-aminosav megfelelését jelenti. A száza-

lékos azonosságot a két molekula között a szekvencia-információ közvetlen összehasonlításával lehet meghatározni, a két szekvencia egymás mellé illesztésével, a két illesztett szekvencia közötti pontos illeszkedések megszámlálásával, ezt az értéket a rövidebb szekvencia hosszával osztva, majd a kapott eredményt 100-zal szorozva.

A természetes vagy nem-természetes TFPI analógok aminosav szekvenciája előnyösen legalább 70%-os, 80%-os, 85%-os, 90%-os vagy 95%-os, vagy nagyobb homológiát mutat az 1. számú szekvenciából származó TFPI-vel. Előnyösebben, a molekulák 98%-os vagy 99%-os homológiával rendelkeznek. A százalékos homológiát a Smith-Waterman homológia-kereső algoritmussal lehet meghatározni, rokon rés keresés alkalmazásával, ahol a résnyílási büntetés 12, és a rés-szélesedési büntetés 2, a BLOSUM mátrix 62. A Smit-Waterman homológia-kereső algoritmus megtalálható a szakirodalomban [Smith és Waterman: Adv. Appl. Mat. 2, 482-489 (1981)].

A találmány szerinti TFPI és fragmensei valamint analógjai lehetnek glikozilezettek, vagy nem-glikozilezettek. Az érett, teljes hosszúságú TFPI egy 276 aminosavból álló szérum glikoprotein, molekulásúlya körülbelül 38000 Dalton. A szöveti faktor aktivitásának természetes inhibítora, és ezzel a koaguláció aktiválásának is inhibítora. Az 5,110,730 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírásban ismertetik a szöveti faktort (TF), és az 5,106,833 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírásban ismertetik a TFPI-t. A TFPI cDNS klónozását Wun és munkatársai írták le [Wun és mtsai: 4,966,852 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás] A TFPI fragmenseket és analógokat az 5,106,833 számú

Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírásban ismertetik. Az ala-TFPI egy, a „tifacogin” nemzetközi néven is ismert TFPI analóg. Az ala-TFPI tartalmazza az érett, humán TFPI teljes hosszúságú aminosav szekvenciáját, plus egy további alanin-csoportot az N-terminálison. Az ala-TFPI N-terminális alanin csoportját azért vitték be a TFPI szekvenciába, hogy javítsák *Escherichia coli*-ban való expresszióját, és hogy elvégezzék a hasítást, ami egyébként egy N-terminális metionin-csoport hasítása lenne (lásd a 4,966,852 és 5,212,091 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírást). A találmány szerinti eljárásban használt TFPI-t és TFPI analógokat sejtekből vagy szövetekből lehet előállítani, vagy rekombináns módszerekkel lehet előállítani, prokarióta vagy eukarióta sejtekben.

A TFPI egy proteáz inhibitor, és 3 Kunitz egységet tartalmaz, ezek közül kettőről ismert, hogy kölcsönhatásba lép a VII-es faktorról és a Xa faktorról. A harmadik domén funkciója nem ismert. A TFPI-ről azt gondolják, hogy *in vivo* úgy működik, hogy korlátozza a koaguláció iniciációját, oly módon, hogy inert, kvaterner Xa faktor:TFPI:VIIa faktor:szöveti faktor komplexet képez [Rapaport: Blood 73, 359-365 (1989); Broze és mtsai: Biochemistry 29, 7539-7546 (1990)]. A TFPI számos szerkezeti tulajdonsága kikövetkeztethető más, jól ismert proteáz inhibitorral való homológiájából. A TFPI nem enzim, ezért valószínűleg sztöchiometrikusan gátolja proteáz célpontját, azaz a TFPI egyik Kunitz doménje egy proteáz molekulát gátol. Előnyösen az 1-es és/vagy a 2-es Kunitz domén a találmány szerinti TFPI molekulákban jelen van. A 3-as Kunitz domén funkciója nem ismert.

TFPI és TFPI analógok előállítása

A találmány szerinti eljárásokban használt TFPI-t és TFPI analógokat izolálhatjuk és tisztíthatjuk sejtekből vagy szövetekből, szintetizálhatjuk kémiaiilag, vagy előállíthatjuk rekombináns módszerekkel, prokarióta vagy eukarióta sejtekben.

Az ala-TFPI expresszáltatható nem-glikozilezett fehérje formájában, *Escherichia coli* gazdasejtekben. Leírtak módszereket, melyekben a nagyon aktív ala-TFPI-t magas hozammal lehet előállítani, *in vitro* újra kialakítva az *Escherichia coli*-ban előállított rekombináns fehérje térszerkezetét (lásd például a WO 96/40784 számú szabadalmi leírást).

A TFPI expresszáltatható rekombináns glikozilezett fehérje formájában, emlős gazdaszervezetek felhasználásával. Ilyen például az egér C127 sejt [Day és mtsai: Blood 76, 1538-1545 (1990)], a bébhörcsög vesesejt [Pedersen és mtsai: Journal of Biological Chemistry 265, 16786-16793 (1990)], a kínai aranyhörcsög petefészek sejt, és a humán SK hepatóma sejt. A C127 TFPI-t állatkísérletekben használták, és kimutatták róla, hogy hatékonyan gátolja a szöveti faktor által indukált intravaszkuláris koagulációt nyulakban [Day és mtsai: Blood 76, 1538-1545 (1990)], kutyákban hatékonyan előzi meg az arteriális reokklúziót trombózis után [Haskel és mtsai: Circulation 84, 821-827 (1991)], valamint babuin majmokban hatékonyan csökkenti a mortalitást *Escherichia coli* szepszis modellben [Creasey és mtsai: J. Clinic. Invest. 91, 2850 (1993)].

A TFPI számos különböző módszerrel izolálható. Például a TFPI-t szekretáló sejtek közé tartoznak a koros endoteliális sejtek, a fiatal, de TNF-fel körülbelül 3-4 napig kezelt endoteliális sejtek, a hepatociták és hepatómák. A TFPI-t hagyományos módszerekkel tisztíthatjuk, beleértve a kromatográfiás módszereket

[Pedersen és mtsai: Journal of Biological Chemistry 265, 16786-16793 (1990); Novotny és mtsai: Journal of Biological Chemistry 264, 18832-18837 (1989); Novotny és mtsai: Blood 78, 394-400 (1991); Wun és mtsai: Journal of Biological Chemistry 265, 16096-16101 (1990); Broze és mtsai: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 84, 1886-1890 (1987)]. Emellett, a TFPI a véráramban fordul elő, és vérből tisztítható [Pedersen és mtsai: Journal of Biological Chemistry 265, 16786-16793 (1990)]. Azonban a kielégítő mennyiségű TFPI előállításához nagymennyiségű vérre van szükség.

A TFPI-t és a TFPI analógokat előállíthatjuk rekombináns módszerekkel (4,966,852 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás). Például a kívánt fehérje cDNS-ét egy plazmidba építhetjük be, prokariótákban vagy eukariótákban történő expresszióhoz. A 4,847,201 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírásban adnak meg részleteket mikroorganizmusok specifikus DNS szekvenciákkal való transzformálására, és ezek expresszálására. Számos más, a szakterületen jártas szakember számára ismert referencia van a szakterületen, amelyek részletesen ismertetik a fehérjék mikroorganizmusokban való expresszióját. Ezek közül számosat idéznek a 4,847,201 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírásban [ilyen például a Sambrook és mtsai: Molecular Cloning: A Laboratory Manual; 2. kiadás, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)].

Számos különböző technika hozzáférhető mikroorganizmusok transzformálására, valamint ezeknek TFPI és TFPI analógok expresszálásában való használatára. Az alábbiak pusztán a lehetséges megközelítési módok példái. A TFPI DNS szekven-

ciákat izolálni kell és módszer kontroll szekvenciákhoz kell kapcsolni. A TFPI DNS szekvenciákat a 4,966,852 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírásban ismertetik, ezeket egy plazmidba, azaz például pUNC13 vagy pBR322 plazmidba lehet beépíteni, melyek kereskedelmi forgalomban vannak, beszerezhetők a Boehringer Mannheim-től. Ha a TFPI DNS-t beépítettük egy vektorba, akkor megfelelő gazdaszervezetbe klónoozható. A DNS a szakirodalomban ismertet technikákkal amplifikálható (Mullis és mtsai: 4,683,202 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás; Mullis és mtsai: 4,683,195 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás). A TFPI cDNS-t a sejtek, azaz például hepatóma sejtek (azaz például HepG2 és SKHep) indukálásával lehet előállítani, TFPI mRNS-t készítve, majd azonosítva és izolálva a mRNS-t és reverz transzkripcióval előállítva a TFPI mRNS-t. Miután az expressziós vektort egy gazdaszervezetbe, azaz például *Escherichia coli*-ba transzformáltuk, a baktérium fermentálható és a fehérje expresszáltatható. A baktériumok az előnyben részesített prokarióta mikroorganizmusok, és az *Escherichia coli*-t különösen előnyben részesítjük. A találmányban jól használható, előnyben részesített mikroorganizmus az *Escherichia coli* K-12, az MM294 törzset az ATCC-nél helyeztük letétbe, 1984. február 14-én, 39607 letéti számon, a Budapesti Egyezmény-nek megfelelően.

Természetesen az is lehetséges, hogy a polipeptideket kódoló géneket többsejtes szervezetekből származó eukarióta sejtenyészetekben expresszáltassuk [lásd például: Tissue Culture, szerk.: Cruz és Patterson, Academic Press (1973)]. A jól használható emlős sejtvonalak közé tartoznak a rágcsáló mielómák, az N51, VERO, HeLa sejtek, kínai aranyhőrcsög petefészek (CHO)

sejtek, a COS, C127, Hep G2 és SK Hep sejtek. A TFPI-t és a TFPI analógokat bakulovírustal fertőzött rovarsejtekben expresszálják [lásd például 4,847,201 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás, melyet a fentiekben idéztünk; Pedersen és mtsai: *Journal of Biological Chemistry* 265, 16786-16793 (1990)]. Az eukarióta sejtekben használható expressziós vektorok rendszerint tartalmazznak promotereket és olyan kontroll szekvenciákat, melyek kompatibilisek az emlős sejtekkel, azaz például az általánosan használt Simian Virus 40 (SV40) korai és késői promotereit [Fiers és mtsai: *Nature* 273, 113 (1978)], vagy más virális promotereket, például azokat, amelyek poliómából, adenovírus 2-ből, szarvasmarha papillóma vírusból vagy madár szarkóma vírusból származnak, vagy az immunglobulin promotereket és a hősokk promotereket. Az emlős gazdasajt transzformációit Axel írta le [4,399,216 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás]. Úgy tűnik, hogy a „fokozó” régiók fontosak az expresszió optimalizálásában, ezek általában olyan szekvenciák, melyek a promotor régió előtt találhatóak. A replikációs origó szekvenciákat szükség esetén virális forrásból állítják elő. Azonban a kromoszómába való integráció egy általános mechanizmus a DNS eukariótákba történő replikációja esetében. Gazdaszervezetekként most növénysejtek is hozzáférhetők, és a növénysejtekkel kompatibilis kontroll szekvenciák, azaz például a nopalin szintetáz promotor és a poliadenilezési szekvenciák [Depicker, A. és mtsai: *J. Mol. Appl. Genet.* 1, 561 (1982)] is hozzáférhetők. A növénysejtek transzformációs módszereit és az ehhez használható vektorokat a WO 85/04899 számú szabadalmi leírásban ismertették (publikálva 1985. november 7.).

Az emlős sejtekben expresszált TFPI és TFPI analógok tisztítására használható módszerek közé tartozik a heparin-Sepharose, a MonoQ, a MonoS, és a fordított fázisú HPLC kromatográfia egymás után történő alkalmazása [Pedersen és mtsai: *Journal of Biological Chemistry* 265, 16786-16793 (1990); Novotny és mtsai: *Blood* 78, 394-400 (1991); Wun és mtsai: *Journal of Biological Chemistry* 265, 16096-16101 (1990); Broze és mtsai: *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 84, 1886-1890 (1987); 5,106,833 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás; 5,466,783 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás]. Ezekben a publikációkban emlős sejtekben termelt TFPI tisztítására írnak le módszereket.

Emellett a TFPI-t és a TFPI analógokat baktériumokban vagy élesztőben lehet előállítani, majd ezt követően tisztítani lehet. Általában az 5,212,091; 6,063,764 és 6,103,500 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírásban vagy a WO 96/40784 számú szabadalmi leírásban ismertetett eljárások használhatók. Az ala-TFPI és más TFPI analógok tisztíthatók, szolubilizálhatók, majd a WO 96/40784 számú szabadalmi leírás, valamint Gustafson és munkatársai publikációja szerint térszerkezetük újra kialakítható [Gustafson és mtsai: *Prot. Express. Pur.* 5, 233 (1994)], amely publikációkat a továbbiakban referenciaként kezelünk. Ha például a WO 96/40784 számú szabadalmi leírás 9. példája szerint állítjuk elő, akkor az érett, megfelelő térszerkezetű, biológiailag aktív ala-TFPI az össz-fehérje tömegszázalékának körülbelül 85-90%-át teszi ki, ezek közül körülbelül 10-15% egy vagy több oxidált metionin csoportot tartalmaz. Ezeknek az oxidált formáknak a biológiai aktivitása ekvivalens a nem-derivatizált ala-TFPI-ével, a protrombin esszé alapján, és

várható, hogy aktív az alábbiakban ismertetett találmányban. A megmaradt anyag az ala-TFPI különböző módosított formáit tartalmazza, beleértve a dimerizált, aggregálódott és acetilezett formákat is.

A TFPI és a TFPI analógok szignifikáns számú cisztein csoportot tartalmaznak, és a 4,929,700 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírásban ismertetett eljárás alkalmas a TFPI térszerkezetének újbóli kialakítására. A TFPI és az analógok különböző kromatográfiás módszerekkel tisztíthatók, például azokkal, melyeket az előzőekben említettünk. Ha szükséges, akkor a 4,929,700 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírásban ismertetett módszerek használhatók. Bármelyik módszer használható a TFPI és a TFPI analógok tisztítására, aminek eredménye az emberekhez történő beadásra alkalmas tisztítási szint és aktivitási szint.

Egy TFPI-t vagy TFPI variánst kémiai módszerekkel állíthatunk elő, aminosav szekvenciájának megszintetizálásával, azaz például direkt peptid-szintézissel, szilárd fázisú technikákat alkalmazva [Merrifield: Journal of the American Chemical Society 85, 2149-4154 (1963); Roberge és mtsai: Science 269, 202-204 (1995)]. A fehérjeszintézist manuális technikákkal, vagy automatizált berendezésekkel is elvégezhetjük. Az automatizált szintézist elvégezhetjük például az Applied Biosystems 431A Peptid Synthesizer-rel (Perkin Elmer). Adott esetben a TFPI vagy a TFPI variánsok fragmenseit külön szintetizálhatjuk és kémiai módszerekkel kombinálhatjuk, teljes hosszúságú molekulák előállításához.

Készítmények

A TFPI és TFPI analógok készítményeit előnyösen intravénás infúzióval adjuk be. Leginkább a folyamatos intravénás infúziót részesítjük előnyben. Ennek a beadásnak a módszerei ismertek a szakterületen átlagos jártassággal rendelkező szakember számára. Az infúziót végrehajthatjuk egy centrális vonallal vagy egy periferiális vonallal. Miközben a dózis sebességében a nagy fluktuációkat el kell kerülni, a találmány szerinti dózis-sebességektől való, rövid ideig tartó eltérések elfogadhatók, azzal a feltétellel, hogy a beadott TFPI így kapott plazma-szintje a folyamatos infúzióhoz várhatóhoz 20%-nál kisebb mértékben tér el, konstans dózis-sebesség mellett, a találmány előnyben részesített megvalósítási módjai szerint.

A betegeknek történő beadás előtt formuláló anyagokat lehet a TFPI-hez vagy TFPI analógokhoz adni. A folyadék formájú készítményeket részesítjük előnyben. A TFPI és a TFPI analógok különböző koncentrációban szerelhetők ki, különböző formuláló anyagok használatával, és bármilyen, fiziológiásan elfogadható pH-n, amely kompatibilis a beadás módjával, az oldhatósággal és a TFPI fehérje stabilitásával. Az intravénás infúzióhoz előnyben részesített kisserelési forma az ala-TFPI-t maximum körülbelül 0,6 mg/ml, arginin hidrokloridot maximum 300 mmol/l koncentrációban tartalmazza, és a nátrium-citrát puffer pH-ja 5,0-6,0. Bizonyos beoldódó anyagok, azaz például az arginin, a nátrium-klorid, a szacharóz, és a mannit az ala-TFPI szolubilizálását és/vagy stabilizálását szolgálja (lásd a WO 96/40784 számú szabadalmi leírást). Egy különösen előnyben részesített kisserelési forma az intravénás infúzióhoz tartalmaz körülbelül 0,15 mg/ml ala-TFPI-t, 300 mmol/l arginin hidrokloridot és 20 mmol/l nátrium-citrátot (pH=5,5). A TFPI-t és a TFPI analógokat

kiszerelhetjük a következő koncentrációkban is: maximum 0,15 mg/ml 150 mmol/l nátrium-kloridban és 20 mmol/l nátriumfoszfátban, vagy más pufferben, pH=5,5-7,2, adott esetben 0,005% vagy 0,01% (tömeg/térfogat%) poliszorbát 80-nal (Tween 80). Más kiszerelési formák maximum 0,5 mg/ml TFPI-t vagy TFPI analógot tartalmaznak 10 mmol/l nátrium-acetátban (pH=5,5), amely tartalmaz még 150 mmol/l nátrium-kloridot, 8 tömeg/tömeg% szacharózt vagy 4,5 tömeg/tömeg% mannitot. A TFPI-t és a TFPI analógokat magasabb, akár több mg/ml koncentrációban is kiszerelhetjük, nagy sókoncentráció alkalmazásával. Egy készítmény tartalmaz például maximum körülbelül 6,7 mg/ml ala-TFPI-t 500 mmol/l nátrium-klorid és 20 mmol/l nátriumfoszfát összetételű oldatban, pH=7,0.

A TFPI és a TFPI analógok készítményeinek segédanyagai közé tartoznak az olajok, polimerek, vitaminok, szénhidrátok, aminosavak, sók, pufferek, albumin, felületaktív anyagok vagy térkitöltő anyagok. A szénhidrátok előnyösen cukrok vagy cukoralkoholok, azaz például mono-, di- vagy poliszaccharidok, vagy vízoldható glukánok. A szacharidok közé tartozik például a fruktóz, a dextróz, a laktóz, a glükóz, a mannóz, a szorbóz, a xilóz, a maltóz, a szacharóz, a dextrán, a pullulán, a dextrin, az alfa- és béta ciklodextrin, az oldható keményítő, a hidroxietil keményítő és a karboximetilcellulóz, vagy ezek keveréke. Leginkább a szacharózt részesítjük előnyben. A cukoralkoholok a definíció szerint 4-8 szénatomos szénhidrogének, melyek tartalmaznak egy OH csoportot, ide tartozik a galaktit, az inozit, a mannit, a xilit, a szorbit, a glicerín és az arabit. Leginkább a mannitot részesítjük előnyben. Ezek az előzőekben említett cukrok vagy cukoralkoholok használhatók külön-külön vagy

kombinációban. Nincs rögzített határa a használt mennyiségnek, mindaddig, amíg a cukor vagy cukoralkohol oldódik a vizes készítményben. A cukor vagy a cukoralkohol koncentrációja előnyösen 1,0 tömeg/térfogat% és 7,0 tömeg/térfogat% között van, előnyösebben 2,0 és 6,0 tömeg/térfogat% között.

Az előnyben részesített aminosavak közé tartoznak a karnitin, az arginin és a betain balra forgató (L) formái; azonban más aminosavak is használhatók. Az előnyben részesített polimerek közé tartozik a polivinil-pirrolidon (PVP), melynek átlagos molekulásúlya 3000 és 5000 között van. Az is előnyös, ha egy puffert használunk a készítményben, hogy a liofilezés előtt vagy a beoldás előtt minimalizáljuk a pH változását az oldatban. Leginkább bármelyik fiziológiás puffer használható, de leginkább a citrát-, foszfát-, szukcinát- és glutamát puffereket, vagy ezek keverékeit részesítjük előnyben. A puffer koncentrációja előnyösen 0,01-0,3 mól. A készítményhez hozzáadható felületaktív anyagokat az EP 270,799 és EP 268,110 számú szabadalmi leírásban adják meg.

Emellett, a TFPI és a TFPI analógok kémiaiilag módosíthatók, például egy polimerhez való kovalens konjugációval, azzal a céllal, hogy javítsuk a kerigési felezési idejét. Az előnyben részesített polimereket és ezeknek peptidekhez való kapcsolási módszereit a 4,766,106, 4,179,337, 4,495,285 és 4,609,546 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírásban ismertetik. Az előnyben részesített polimerek a polietoxilezett poliolkok és a polietilén-glikol (PEG). A PEG szobahőmérsékleten vízben oldódik, általános képlete: $R(O-CH_2-CH_2)_n-O-R$, ahol R jelentése lehet hidrogénatom, vagy védőcsoport, azaz például alkil- vagy alkanol csoport. A védőcsoport előnyösen 1-8 szénatomot

tartalmaz, előnyösebben metilcsoport. Az n jelentése pozitív egész szám, előnyösen 1 és 1000 között, még előnyösebben 2 és 500 között. A PEG előnyben részesített átlagos molekulásúlya 1000 és 40000 között van, előnyösebben 2000 és 20000, legelőnyösebben 3000 és 12000 között van. A PEG előnyösen tartalmaz legalább egy hidroxycsoportot, legelőnyösebben egy egy terminális hidroxycsoport. Ez a hidroxycsoport az, amely előnyösen aktívódik, hogy reagáljon az inhibítoron levő szabad aminocsoporttal. Az azonban nyilvánvaló, hogy a reakcióképes csoportok típusa és mennyisége változtatható, hogy megkapjuk a találmány szerinti konjugált PEG/TFPI-t.

A vízzoldható polioxietilezett poliolkok szintén jól használhatók a találmányban. Ide tartozik a polioxietilezett szorbit, a polioxietilezett glükóz, a polioxietilezett glicerín (POG), stb. A POG-ot részesítjük előnyben. Ennek az az egyik oka, hogy a polioxietilezett glicerín glicerín gerince ugyanaz a gerinc, amint amely a természetben előfordul, például állatokban és emberekben, mono-, di- és trigliceridekben. Ezért ezt az elágazást a szervezet nem fogja szükségszerűen idegen ágensnek tekinteni. A POG előnyben részesített molekulásúlya ugyanabban a tartományban van, mint a PEG-é. A POG struktúráját Knauf és munkatársai írták le [Knauf és mtsai: *Journal of Biological Chemistry* 263, 15064-15070 (1988)], és a POG fehérje konjugátumok tárgyalása megtalálható a 4,766,106 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírásban, amely publikációkat a továbbiakban teljes egészükben referenciaként kezelünk.

Miközben a TFPI-t vagy egy TFPI analógot be lehet adni egyetlen aktív antikoagulációs gyógyszerként, ezek a molekulák használhatók egy vagy több további terápiás szerrel kombi-

nációban is. Ezek közé a további terápiás szerek közé tartoznak például a szepszis kezelésére használható ellenanyagok, azaz például anti-endotoxin, monoklonális ellenanyagok (azaz például endotoxin-kötő monoklonális ellenanyagok) és anti-TNF termékek, azaz például anti-TNF rágcsáló monoklonális ellenanyag. A TFPI-t és a TFPI analógokat kombinálhatjuk interleukin-1 receptor antagonistákkal, baktericid/permeabilitást fokozó (BPI) fehérjével, immunstimulánssal, gyulladásellenes hatással rendelkező vegyületekkel, azaz például PAF antagonistákkal (azaz például Pafase, vérlemezka aktiváló faktor acetilhidroláz), és sejttapadást blokkoló szerekkel (azaz például vérlemezke ellene szerekkel, azaz például GPIIb/IIIa inhibitorokkal). Ha kombinációban adjuk be, akkor a terápiás szereket kiszerezhetjük külön készítmények formájában is, amelyeket vagy egy időpontban, vagy eltérő időpontban adunk be, vagy beadhatók egyetlen készítményben is.

A TFPI és a TFPI analógok beadhatók más, a szepszis kezelésében hatékony szerekkel kombinálva is. Például az alábbiak adhatók be TFPI-vel vagy TFPI analóggal kombinálva: antibiotikumok, amelyek képesek kezelni a fertőzés mögött álló bakteriális fertőzést, monoklonális ellenanyagok, melyek a bakteriális sejtfal komponensek ellen irányulnak, receptorok, melyek képesek komplexet képezni azokkal a citokinekkal, melyek a szepszis bioszintézis útban szerepet játszanak, és általában bármilyen szer vagy fehérje, amely képes kölcsönhatásba lépni a szepszis bioszintézis útban citokinekkal, vagy a komplement fehérjékkel is, azzal a céllal, hogy csökkentjük hatásaikat és enyhítsük a szepszist és/vagy tüneteit.

A használható antibiotikumok közé tartoznak az általános kategóriába tartozók: a béta-laktám gyűrűk (penicillin), az aminocukrok glikozidos kapcsolatban (aminoglikozidok), a makrociklusos laktongyűrűk (makrolidok), a naftacénkarboxamid policiklusos származékei (tetraciklinek), a diklórecetsav nitrobenzol származékei, a peptidek (bacitracin, gramicidin és polimixinek), a konjugált kettőskötés rendszert tartalmazó nagy gyűrűk (poliének), a szulfanilamidból származó szulfa gyógyszerek (szulfonamidok), az 5-nitro-2-furanil csoportok (nitrofuránok), a kinolon karbonsavak (nalidixinsav) és számos más. Más antibiotikumok, és a fentiekben specifikált antibiotikumok több verziója megtalálható a szakirodalomban [Encyclopedia of Chemical Technology, 3. kiadás, 2. kötet, 782-1036. oldal, szerk.: Kirk-Othmer (1978); Zinsser, Microbiology, 17. kiadás, szerk.: W. Joldik és munkatársai, 3. kötet 235-277. oldal (1980); Dorland Illustrated Medical Dictionary 27. kiadás, W. B. Saunders Company (1988)].

Más, a TFPI-vel vagy egy TFPI analóggal kombinálható szerek közé tartoznak az endotoxin antagonisták, azaz például az E5531 [egy Lipid A analóg, lásd: Asai és mtsai: Biol. Pharm. Bull. 22, 432 (1999)], az antikoaguláns aktivitású TF analógok [lásd például Kelley és mtsai: Blood 89, 3219 (1997); Lee és Kelley: Journal of Biological Chemistry 273, 4149 (1998)], a szepszis bioszintézis útjában szereplő citokinek elleni monoklonális ellenanyagok, azaz például az interleukin-6 vagy a makrofág telepserkentő faktor elleni monoklonális ellenanyagok (lásd: Creasey és munkatársai 07/451,218 U.S. Ser. No., benyújtva 1989. december 15.), és a TNF elleni monoklonális ellenanyagok [lásd Cerami és mtsai: 4,603,106 számú Amerikai Egyesült

Államok-beli szabadalmi leírás), azoknak a fehérjéknek az inhibítorai, amelyek az érett TNF prohormont lehasítják arról a sejtről, amelyben termelődött (lásd: Kriegler és munkatársai 07/395,253 U.S. Ser. No, benyújtva 1989. augusztus 16.), az interleukin-1 antagonistái [Lásd Haskili és munkatársai: 07/517/276 U.S. Ser. No., benyújtva 1990. május 1], az interleukin-6 citokin expressziójának inhibítorai, azaz például az inhibin (lásd Warren és munkatársai: 5,942,220 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírást, megadva 1999. augusztus 24.), és a különböző citokinek, azaz például az interleukin-1 receptor alapú inhibítorai. A komplement elleni ellenanyagok, vagy a komplement fehérje inhibítorai is használhatók, azaz például a CR₁, a DAF és az MCP.

A folyékony gyógyászati készítmény előállítása után az liofilezhető, hogy megekadályozzuk a lebomlását és megőrizzük sterilitását. A folyékony készítmények liofilezésének módszerei a szakterületen átlagos jártassággal rendelkező szakember számára ismertek. Közvetlenül felhasználás előtt a készítményt steril higítószerrel beoldhatjuk (például Ringer oldat, desztillált víz, vagy steril sóoldat), amely tartalmazhat további adalékanyagokat. A beoldás után a készítményt előnyösen folyamatos intravénás infúzióval adjuk be a betegeknek.

Amint azt az előzőekben megjegyeztük, a TFPI és a TFPI analógok jól használhatók szepszises vagy szeptikus sokkban szenvedő, DIC-es vagy DIC nélküli betegek terápiás vagy profilaktikus kezelésére. A szepszises embereknek általában magas a lázuk (>38,5 °C), vagy nagyon alacsony a testhőmérsékletük (<35,5 °C), alacsony a vérnyomásuk tachypneájuk (>20 lélegzetvétel/perc), tachicardiájuk (>100 szívdobbanás/perc),

leukocitózisuk (>15000 sejt/ mm^3) és trombocitopéniájuk (<100000 vérlemezke/ mm^3) van, bakterémiához kapcsolódva. A TFPI-t és a TFPI analógokat azonnal be kell adni, mielőtt felmerül, hogy egy beteg szeptikus, azaz 20%-ban, vagy ennél nagyobb mértékben csökken a fibrinogénje, vagy fibrin hasítási termékek, vagy más biokémiai változások fordulnak elő, a beteg testhőmérséklete megemelkedik, és leukopéniát, trombocitopéniát és alacsony vérnyomást lehet diagnosztizálni a szepszishez kapcsolódva, vagy Szisztémás Gyulladásos Választ prezentál, beleértve a vérnyomás leesését (hipotenzió), a hőmérséklet megemelkedését vagy csökkenését, a légzési sebesség megnövekedését, leukopéniát, trombocitopéniát, stb., valamint egy fertőzés gyanúját, ami megokolja a szisztémás fertőzés elleni terápiát. A TFPI-t szepszis kockázatában levő betegnek is be lehet adni, például akinek puskagolyó ütötte sebe van, vagy egy műtéti beavatkozásból származó sebe van. A szepszis kockázatával élő betegek közé tartoznak azok a betegek is, akiket egy kórház elsősegély osztályára vagy intenzív osztályára vesznek fel, és akiknél feltételezhető, hogy van egy fertőzési gócpontjuk, vagy szisztémás gyulladásos válasz szindrómájuk (SIRS), vagy meg is találták azt.

A találmányt az alábbi példák alapján ismertetjük, melyek a különösen előnyös megvalósítási módokat ismertetik. Azt azonban meg kell jegyeznünk, hogy ezek a megvalósítási módok csak illusztrációk, és semmiképpen nem tekinthetők a találmány oltalmi köre korlátozásának.

Példák

1. Példa

Ala-TFPI és heparin együttes beadása egészséges embereknek

Escherichia coli-ban expresszált, nem-glikozilezett ala-TFPI-t adunk be heparinnal együtt egészséges önkénteseknek. A heparint intravénás infúzióval, vagy szubkután injekcióval adjuk be 300 vagy 5000 egységes dózisokban, egy 11-órás ala-TFPI infúzió (körülbelül 0,5 mg/kg/óra) hatodik órája után. Az ala-TFPI szintek ideiglenes növekedése volt megfigyelhető a heparin bármilyen úton történő beadása után, potenciálisan az ala-TFPI-nek az endoteliális kötőhelyekről való leszorítása miatt. A PT és aktivált részleges tromboplasztin idő (aPTT) értékek ezalatt az idő alatt változtak, de általában enyhén emelkedtek, majd visszaestek, az ala-TFPI koncentráció változásával párhuzamosan. A heparin dózisok biztonságosak és jól toleráltak voltak, az ala-TFPI-vel kombinációban használva.

2. Példa

Szeepszis kezelése emberekben magas dózisú ala-TFPI-vel

Tizennégy beteget vontak be nem-glikozilezett ala-TFPI II-es fázisú klinikai vizsgálatába, súlyos szeepszis esetében. A vizsgálat II-es fázisú, multicentrikus, kettős vak, randomizált, placebo kontrollált, kétlépéses dózis-kiterjesztéses, biztonsági és tolerabilitási vizsgálat volt, súlyos szeepszisben szenvedő alanyoknál. Az elsődleges cél az ala-TFPI biztonsági profiljának a kiértékelése volt. A másodlagos cél a farmakokinetika, a citokin- és szabályozási markerek, a több szervre kiterjedő károsodás értékszámai, valamint a 15- és 28-napos túlélés meghatározása volt. Öt alanyt randomizáltunk placebora, ötöt randomizáltunk körülbelül 0,33 mg/kg/óra ala-TFPI dózis-sebességre, és négyet körülbelül 0,66 mg/kg/óra dózis-sebességre (mindkét dózist folyamatos intravé-

nás infúzióval adtuk be). A vizsgálatot idő előtt leállítottuk, a vártnál magasabb antikoaguláció (megnöött INR) és vérzés miatt.

Egy káros eseményt (AE) úgy definiáltunk, mint bármilyen kellemetlen orvosi eseménynek az előfordulását egy alanyban, vagy klinikai vizsgálat alatt álló alanyban, akit egy gyógyszerészeti termékkel kezelünk, bármilyen dózisban, amely nem szükségszerűen áll oki kapcsolatban a kezeléssel. Egy AE ezért lehet bármilyen kedvezőtlen, nem szándékos jel (beleértve például egy abnormális laboratóriumi leletet), tünet vagy betegség, amely ideiglenesen asszociálódik a termék használatához, függetlenül attól, hogy ez kapcsolatban van-e a gyógyszerészeti termékkel. Egy súlyos káros eseményt (SAE) úgy definiálunk, mint a kezelés során bármilyen kedvezőtlen esemény, bármilyen dózishoz, amely halált okoz, életveszélyes állapotot idéz elő (azaz az alany a vizsgáló véleménye szerint közvetlen halálveszélyben volt az előforduló esemény következtében), egy alany kórházi kezelésre szorul miatta, vagy meghosszabbodik a kórházi tartózkodása, hosszas vagy szignifikáns rokkantságot/cselekvésképtelenséget eredményez, (azaz az esemény egy személy normális életfunkciók vitelére való képességének lényeges károsodását okozza), egy veleszületett anomália/születési rendellenesség, vagy egy fontos orvoslási esemény, amely a megfelelő orvosi megítélés alapján veszélyeztethette az alanyt, és orvosi vagy sebészi beavatkozásra lehet szükség ahhoz, hogy megakadályozzuk az előzőekben súlyos káros eseményként definiált egy vagy több következményt.

A kilenc ala-TFPI-t kapott alanyból hétnél vérzés lépett fel, míg az öt placebót kapott alanyból csak egynél lépett fel vérzés. Emellett három ala-TFPI-t kapott alanyban volt jelentősen megemelkedett INR, amíg aktív infúziót kapott. Két alanyban az

INR gyorsan csökkent az infúzió abbahagyása után. Egy alanynál az INR visszatért az alapvonalra, bár az infúziót nem állítottuk le. Nem közöltek vérzési eseményt, amíg az INR szintek magasak voltak. A vérzési események mellett a legáltalánosabb SAE a szepszis és annak rokon komplikációi miatt lépett fel.

Az öt, placebót kapott alanyból egynél, az öt, ala-TFPI-t körülbelül 0,33 mg/kg/óra dózisban kapott alanyból ötnél, és négy, az ala-TFPI-t körülbelül 0,66 mg/kg/óra dózisban kapott alanyból kettőnél figyeltünk meg káros eseményt, beleértve a vérzést. A placebo csoportban ötből két alanynál (40%), a 0,33 mg-os ala-TFPI csoportban ötből négy alanynál (80%), és a 0,66 mg-os ala-TFPI csoportban mind a négy alanynál volt legalább egy SAE a vizsgálat során.

A SAE-k összefoglalását az 1. táblázatban adjuk meg. Felhívjuk a figyelmet, hogy az alanyok egynél több SAE-t is elszenvedhettek.

1. Táblázat

A SAE-k összefoglalása

Test rendszer/ COSTART term	Placebo (n=5)	0,33 mg/kg/óra ala-TFPI (n=5)	0,66 mg/kg/óra ala-TFPI (n=5)
Teljes test			
Szepszis	0	0	1
Sokk	0	1	2
Kardiovaszkulá- ris rendszer			
Atriális fibrilláció	0	1	0
Vérzés	0	1	1
Alacsony vérnyo-	1	1	1

más			
Emésztőrendszer			
Gasztrointesztinális vérzés	0	2	0
Vér- és nyirokrendszer			
Megnőtt protrombin	0	1	1
Idegrendszer			
Agyödéma	0	0	1
Agytörzs rendellenesség	0	0	1
Légzési rendszer			
Atelectasis	1	0	0
Pneumothorax	0	1	0
Légzési rendellenesség	0	0	1
Urogenitális rendszer			
Akut veseelégtelenség	0	0	1

Az összesen négy SAE, beleértve a vérzést is, és a két SAE, amely a PT váratlan meghosszabbodásához kapcsolódott, az al-
TFPI csoportban fordult elő. A többi SAE a súlyos szepszis komplikációi miatt voltak.

3. Példa

A kis dózisú TFPI hatékonysága nyúl hashártyagyulladás modellben

A nyulakban végzett vizsgálatok azt mutatják, hogy a 2. példában ismertettettnél alacsonyabb ala-TFPI dózisok hatékonyak lehetnek. Öt különböző, alacsony dózisú nem-glikozilezett ala-TFPI-t kapott csoportot értékeltünk ki nyúl *Escherichia coli* hashártyagyulladás modellben. Mivel egy körülbelül 0,5 mg/kg bolus és körülbelül 5 mg/kg/perc infúzió 24 óra hosszát (humán ekvivalens 0,8 mg/kg/óra) a nyulak 58%-át megmentette (2. táblázat), ez szolgált pozitív kontrollként. Ebben a vizsgálatban az ala-TFPI dóziscsoportok és a placebo között a százalékos túlélésben szignifikáns különbségek voltak megfigyelhetők, a legkisebb dózis kivételével (2. táblázat), amely ugyanazt a százalékos túlélést mutatta, mint a placebóval kezelt kontrollok (20%).

A nyulakat intraperitoneálisan oltjuk be egy hemoglobint (40 µg/ml), sertés mucint (150 µg/ml) és életképes *Escherichia coli* O08:K1 törzset ($1,0 \pm 0,5 \times 10^5$ CFU/kg) tartalmazó szuszpenzióval, amely egy olyan klinikai izolátum, amely emberekben az összes *Escherichia coli* szepszis $\geq 20\%$ -át okozza. A gentamicinnel végzett kezelést (5 mg/kg 12 óránként 5 dózisban) 4 órával a hashártyagyulladás indukciója után. 4 óra elteltével tipikus esetben a klinikai tünetek, azaz láz, hidegrázás és a vérnyomás enyhése lépnek fel. Ennél az időpontnál a nyulakat randomizáltuk, kaptak 24 órás placebo infúziót, vagy a hat különböző ala-TFPI dózis közül egynek az infúzióját, amint az a 2. táblázatban látható, ami tartalmaz egy bolus dózist, és az azt követő folyamatos intravénás infúziót. A hét nap elteltével életben maradt nyulakat tekintjük túlélőknek. Ebben a modellben a halál oka légzési és több szervre kiterjedő elégtelenség. A boncolásnál a nem-túlélők

tüdeje erősen ödémás, és a légutakat rózsaszín, habos folyadék tölti ki. A vesék vérzésesek és vértolulásosak. A vese tipikus esetben tályogos, melyek *Escherichia coli*-t növesztenek ki. Tályogok vannak az egész peritoneális üregben. Ezzel szemben, a hétnapos túlélőknél minimális tüdő vértolulás volt megfigyelhető. Kis, elszórt tályogok gyakran vannak a peritoneális üregben, de a többi szilárd szerv (mellékvesék, máj és lép) alapján véve normális.

2. Táblázat

Az ala-TFPI hatékonysága alacsonyabb dózisokban szepszis nyúl fertőzési fókusz modelljében

ala-TFPI dózis		%-os túlélés	Keringő ala-TFPI szint ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Humán ekvivalens dózis ($\text{mg}/\text{kg}/\text{óra}$)
Bolus (mg/kg)	Folyamatos infúzió ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{perc}$)			
0,5	5	58 (P=0,004)	0,8	0,8
0,05	0,5	36 (P=0,004)	0,4	0,2
0,0001	0,001	73 (P=0,007)	<0,02	<0,002
0,00001	0,0001	41 (P=0,20)	-	-
0,00000 1	0,00001	20	-	-
Kontroll		20	-	-

4. Példa

A kis dózisú ala-TFPI biztonságossága és hatékonysága szepszises humán betegek kezelésében

Ebben a példában a kis dózisú ala-TFPI beadás klinikai használatát ismertetjük, súlyos szepszises betegek kezelésében.

II-es fázisú, egyszeres vak dózis-eszkalációs vizsgálatot hajtunk végre súlyos szepszises betegekkel, hogy placebóval szemben kiértékeljük az *Escherichia coli*-ban előállított, nem-glikozilezett ala-TFPI 0,025 és 0,05 mg/kg/óra dózis-sebességeket. Az ala-TFPI-t folyamatos intravénás (CIV) infúzióval adjuk be 96 óra hosszat 210 betegnek (placebó: n=69; körülbelül 0,025 mg/kg/óra ala-TFPI: n=80; körülbelül 0,05 mg/kg/óra ala-TFPI; n=61). Az alanyokat 30 fős blokkokba soroltuk, a 0,025 mg/kg/óra ala-TFPI dózissal kezdve. Az 1-es dózis stádiumba tartozott a 0,025 mg/kg/óra ala-TFPI és placebó csoportba tartozó alanyok. A 2-es dózis csoportba tartoztak a 0,05 mg/kg/óra ala-TFPI és placebó csoportba tartozó alanyok. A vizsgálat azt mutatta, hogy az ala-TFPI körülbelül 0,025 mg/kg/óra dózisban biztonságos, és asszociálódik a 28-napos, minden okot figyelembe vevő mortalitás-csökkenési trendekkel, és néhány több szervre kiterjedő diszfunkció (MOD) értékek javulásával, a placebóval összehasonlítva. A MOD értékeket a 3. táblázatban megadott értékelési kritérium lista alapján határoztuk meg.

A betegeket a súlyos szepszis fellépésétől számított 24 órán belül felvettük a vizsgálatba. A kiértékelés teljes időtartama alatt a betegek teljeskörű intenzív betegellátásban részesültek, beleértve a folyékony reszuszcitációt, vazopresszorokat, légzési támogatást, parenterális antimikrobiális szereket, és megfelelő sebészeti ellátást.

A protokoll az induláskor különböző betegcsoportokra tartott igényt, melyek 0,025 mg/kg/órától 0,1 mg/kg/óraig terjedő ala-TFPI dózist kaptak, az alacsonyabb dózisoktól a

magasabb dózisok felé haladva. Az alanyokat egymás után harmincas blokkokba soroltuk, a 0,025 mg/kg/óra ala-TFPI dózisszinttel kezdve. 210 alanyt randomizáltunk és infundáltunk 1:2 placebo:ala-TFPI arányban az 1-es dózis stádiumba (S1) (placebó [n=39] és körülbelül 0,025 mg/kg/óra ala-TFPI [n=80], vagy a 2-es dózis stádiumba (S2) (placebó [n=30] és körülbelül 0,05 mg/kg/óra ala-TFPI [n=61]) és négy napig folyamatos intra-vénás infúziót (CIV) kaptak a placebóból vagy az ala-TFPI-ből.

A vizsgálatához megfelelő alanyok bármilyen nemű, ≥ 18 éves betegek, akik írásban beleegyeztek a vizsgálatba, és megfelelnek a következő kritériumoknak: 1) klinikai bizonyíték a fertőzésre, világosan igazolható fertőzőési fókusszal; 2) szisztémás gyulladásos válasz szindróma (SIRS) tünetek (az SIRS tünetei láz (mag, rektális, hónalj vagy fül hőmérséklet ≥ 38 °C), vagy alacsony hőmérséklet (mag vagy rektális hőmérséklet ≤ 36 °C), szívverés > 90 per perc, légzési sebesség > 20 per perc, vagy PaCO_2 (a CO_2 alveoláris részleges nyomása) < 32 Hgmm, vagy ha a beteg lélegeztető berendezésen van, akkor a fehér vérsejtek száma $> 12000/\text{mm}^3$, $< 4000/\text{mm}^3$ vagy $> 10\%$ éretlen csík formák); 3) legalább egy jele a szerv diszfunkciónak/hipoperfúciónak (OD), amiről tanúskodik a pulmonáris diszfunkció ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ arány (az oxigén alveoláris részleges nyomásának aránya a belélegzett oxigén frakciójához viszonyítva) < 250 (vagy < 200 tüdőgyulladás, vagy más lokalizált tüdőbetegség jelenlétében), metabolikus acidózis ($\text{pH} \leq 7,30$, vagy $\geq 5,0$ mEqv/l ($\geq 5,0$ mmol/l) bázis deficit, melyről azt gondolják, hogy a tejsavas acidózis vagy a megnövelt laktát koncentráció következménye, az oliguria (vizelet-ürítés $\leq 0,5$ ml mg/kg/óra minimum 2 egymást követő órában, megfelelő folyékony resuscitacio jelenlétében (nem értékelhető

szerv diszfunkciónak, ha a beteg krónikus dialízisen van)), megmagyarázhatatlan trombocitopénia (vérlemezke-szám ≤ 100000 sejt/mm³), nem feltételezhető, hogy gyógyszer indukálta – ezt a kritériumot nem lehet olyan betegekben használni, akik olyan terápiát kaptak, melyről feltételezhető, hogy trombocitopéniát okoz, vagy alacsony vérnyomás (vazopresszorokra van szükség terápiás dózisokban (azaz például dopamin > 5 mg/kg/perc, vagy bármilyen dózisú epinefrin, norepinefrin vagy fenilepinefrin, a > 90 Hgmm szisztolés vérnyomás legalább két egymást követő órában való fenntartásához).

A kizárás legfontosabb kritériumai a következők: 1) makacs alacsony vérnyomás a vért gyógyszer dozírozás előtt 2 órán belül, 2) ismert vagy feltételezett szívbelhártya-gyulladás, 3) kontrollálhatatlan vérzés; INR > 3 , 4) nagy műtét a vizsgált gyógyszer infúziója előtt ≤ 12 órával, 5) koponyán belüli vérzés előfordulása 6 hónapon belül, vagy zárt fejtrauma vagy sztrók, vagy más, fokozott vérzési kockázattal járó neurológiai állapot előfordulása 1 hónapon belül, 6) vérlemezke-szám ≤ 20000 /mm³, 7) terhesség, 8) > 150 kg testsúly, 9) szignifikáns májbetegség (C fokozatú Child Pugh), és/vagy ismert vagy feltételezett nyelőcső visszértágulat, 10) igazolt, klinikailag evidens hasnyálmirigy gyulladás, 11) kardiopulmonáris leállás a vizsgálatba való bevonás előtt 72 órán belül, 12) bizonyíték akut vagy krónikus transzplantátum kilökődésére; a testfelszín $> 10\%$ -án másod- vagy harmadfokú égés, 13) szisztémás kezelés antikoagulánsokkal, vérlemezkeellenes gyógyszerekkel vagy trombolitikumokkal vagy szöveti plazminogén aktivátorral, 14) napi > 20000 Nemzetközi Egység heparin dózis, 15) a vizsgálatba való bevonás előtt új vizsgálati gyógyszerrel vagy biológikummal való kezelés, vagy 16) mestersé-

ges lélegeztetés, dialízis vagy hemofiltráció, kardioverzió vagy bármilyen szükséges gyógyszer/folyadék terápia visszautasítása a beleegyezés időtartama alatt.

A két kezelési stádiumba való szekvenciális bevonás miatt mindegyik aktív dózis csoportot saját placebo csoportjával hasonlítjuk össze. Emellett az adatokat úgy mutatjuk be, hogy az összes placebót hasonlítjuk össze az összes ala-TFPI alannyal. A vizsgálatból kihagytuk a 0,1 mg/kg/óra dózist, mivel a 0,050 mg/kg/óra dózisban súlyos káros mellékhatások voltak megfigyelhetők.

A vizsgált gyógyszer, az ala-TFPI rekombináns, nem-glikozilezett ala-TFPI, *Escherichia coli*-ban expresszáltatva, és standard kromatográfiás technikákkal tisztítva. A vizsgált gyógyszert ampullákban biztosítjuk, melyek 100 ml steril ala-TFPI oldatot tartalmaznak 0,3 mg/ml koncentrációban, izotóniás pufferben kisserelve. A placebo összetétele a hígító puffer, ugyanúgy csomagolva és tárolva, mint a vizsgált gyógyszer. Az ala-TFPI-t az előre meghatározott dózisszinteken infundáltatjuk, állandó sebességgel, 4 napig. A gyógyszer infúzióját az ala-TFPI-hez vagy a placebohoz rendelt vénás (centrális vagy perifériális) katéterrel hajtjuk végre.

A betegeket 28 napig, vagy halálukig figyeltük meg. A több szervre kiterjedő diszfunkció értékszámait (MODS) és a kísérő gyógyszerkezéseket 8 napig gyűjtjük. Az akut fiziológiás és krónikus egészség értékelési (APACHE II) értékszámokat és a kórházi laboratóriumi INR-t 4 napig gyűjtjük. A rutin biztonsági laboratóriumi paramétereket (teljes bilirubin, kreatinin, transzaminázok, szérum tejsav (csak alapvonal), teljes vérszám (CBC) differenciálal és vérlemezkékkel) 6 napig gyűjtjük. A specializált tesztek,

azaz például a kutatási laboratóriumi paramétereket (trombin-antitrombin komplexek (TATc) és interleukin-6), és a farmakokinetikai mintákat a 4. és 5. napig gyűjtjük. Ha erre klinikailag szükség van, akkor elektrokardiogramokat (EKG) és melkasröntgeneket készítünk a 6. napig. A betegeket 28 napig vizsgáljuk, mutatnak-e káros mellékhatást (AE), és a mortalitás összes okát.

Az INR-t egy ágy melletti monitorral mérjük (CoaguCheck Plus, Roche Diagnostics, Nutley, New Jersey), valamint periodikusan kórházi laboratóriumban. Az ala-TFPI kinetikáját és aktivitását az INR válaszra gyakorolt hatásával mérjük. Egy másik alkalmazott módszer a trombin-antitrombin komplexek (TATc) meghatározása. A TATc mintákat infúzió előtt (-2 órakor a 0. napon), valamint a 2., 3. és 4. napon. A kórházi INR-t a szűrővizsgálat 6 óráján belül, valamint az 1. napon (4 óra), a 2., 3. és 4. napon határozzuk meg; az ágy melletti INR-t infúzió előtt, 1 órakor, 2 órakor, 3 órakor, 4 órakor és minden 6 órában (± 2 óra) kapjuk meg a dózis beadása során, közvetlenül a dózis beadásának abbahagyása előtt, valamint 4 és 8 órával a dózis abbahagyása után. A dózisok beállítását és/vagy megszakítását az INR emelkedések szabályozzák. A nem-tervezett mintákat (dózis-csökkentés) közvetlenül a dózis-csökkentés előtt és 4 órával utána gyűjtjük.

A rekombináns ala-TFPI plazmakoncentrációit infúzió előtt (-2 óra a 0 időponthoz viszonyítva), az 1. napon (4. és 8. óra), a 2. és 3. napon, valamint a dózis beadásának leállításakor határozzuk meg.

A farmakokinetikai mintákat validált elektrokemilumineszcens immuneszével határozzuk meg, TFPI elleni monoklonális

és poliklonális ellenanyagokat használva. A monoklonális ellenanyag a TFPI első Kunitz egységére specifikus. Ennek eredményeképpen az esszé méri az endogén TFPI-t, valamint a rekombináns formát is (ala-TFPI). Az esszé standardjait és a minőségi kontrollokat nyúl plazmában hígítjuk. Mivel a nyúl plazma nem tartalmaz immunológiai keresztreakciót adó TFPI-t, az esszé képes mérni az endogén TFPI-t a humán plazmában. A mennyiségi meghatározás alsó határa 5 ng/ml.

Az első két dózis stádiumnál a betegek bevonásánál a SAE-k növekedésének trendje volt megfigyelhető, beleértve a vérzést a 0,05 mg/kg/óra ala-TFPI csoportban, a 0,025 mg/kg/óra ala-TFPI csoporttal és a placebo csoporttal összehasonlítva. Ez nyilvánvalóvá tette, hogy el kell végezni a 0,1 mg/kg/óra dózissal tervezett vizsgálatokat.

A 28-napos, minden okú mortalitás csökkenésének tendenciája figyelhető meg a 0,025 mg/kg/óra ala-TFPI csoportnál, a placebohoz viszonyítva. A logisztikai regressziós modellezés jelzett egy jelentős kezelést az alapvonali laboratóriumi INR kölcsönhatási hatással, jelezve, hogy a magasabb alapvonali INR egy sokkal kifejezettebb ala-TFPI hatással van kölcsönhatásban.

3. Táblázat

Teljes mortalitás

	1-es dózis stádium	2-es dózis stádium	Összes

	Placebo n=39 [N(%)]	0,025 mg/kg /óra ala- TFPI n=80 [N(%)]	Placebo n=30 [N(%)]	0,05 mg/kg /óra ala- TFPI n=61 [N(%)]	Placebo n=69 [N(%)]	ala- TFPI n=141 [N(%)]
28 na- pos összes okú morta- litási arány	16 (41%)	22 (28%)	10 (33%)	21 (34%)	26 (38%)	43 (30%)

4. Táblázat

Mortalitás alapvonal laboratóriumi INR-rel [alany N ()-ben]

Alcsoport	Összes placebó	0,025 mg/kg/óra ala-TFPI n=80	0,05 mg/kg/óra ala-TFPI n=61
28-napos minden okú mortalitási arányok			
Összes alany	38% (26/69)	28% (22/80)	34% (21/61)
Alapvonal la- boratóriumi INR $\geq$ 1,2	42% (20/48)	27% (15/56)	40% (17/42)

Alapvonalai laboratóriumi INR<1,2	29% (6/21)	29% (7/24)	21% (4/19)
--------------------------------------	---------------	---------------	------------

A több szervre kiterjedő diszfunkciós értéket (MODS) egy módosít Szepszishoz kapcsolódó Szerv Elégtelenségi Becslés (SOFA) értékszám alapján határozzuk meg (lásd 5. táblázat). Az alábbi SOFA módosításokat hajtottuk végre. A koagulációs értéket módosítottuk (lásd 8. táblázat 3-as lábjegyzet), hogy számba vegyük a vérlemezke infúziót. A vese értékszámot módosítottuk (lásd 8. táblázat 4-es lábjegyzet), hogy számba vegyük a dialízist. Egy összetett intenzív kezelési egységet (ICU) adtunk hozzá. Az ICU egység kombinálja a pulmonáris, kardiovaszkuláris és koagulációs értékszámokat (specifikusan a vérlemezke számot).

5. Táblázat

A szerv diszfunkció értékszámai: MODS¹

Szervrendszer	Laboratóriumi teszt/Klinikai kiértékelés	Kódlista
Kardiovaszkuláris rendszer	Átlagos arteriális nyomás (Hgmm) Vazopresszor dózis ²	5=MAP ≥ 4=MAP<70 3=dopamin ≤ 5 μg/kg/perc 2=dopamin > 5 μg/kg/perc VAGY epinefrin/ norepinefrin < 0,1 μg/kg/perc

		VAGY bármilyen epinefrin dózis 1=dopamin > 15 µg/kg VAGY epinefrin/norepinefrin ≥ 0,1 µg/kg/perc
Pulmonáris rendszer	PaO ₂ /FiO ₂ Hgmm (kPa)	5=≥ 400 (≥53,2) 4=300-399 (39,9-53,1) 3=200-299 (26,6-39,8) 2=100-199 (lélegeztető támogatással) (13,3-26,5) 1=<100 (lélegeztető támogatással (<13,3))
Központi idegrendszer	Glasgow Coma érték	5=15 4=13-14 3=10-12 2=6-9 1=≤ 5
Koagulációs rendszer	Vérlemezkek, ×10 ³ /mm ³	5=≥150 4=100-149 3=50-99 2=20-49 1=<20
Vese rendszer	Szérum kreatinin, mg/dm ³ (µmol/l)	5=<1,2 (<110) 4=1,2-1,9 (110-170) 3=2,0-3,4 (171-299) 2=3,5-4,9 (300-440) vagy a vizelet mennyisége <500 ml/24 óra

		1= $\geq 5,0$ (≥ 441) vagy a vizelet mennyisége < 200 ml/24 óra
Hepatikus rendszer	Össz-bilirubin, mg/dm ³ (μ mol/l)	5= $< 1,2$ (< 20) 4=1,2-19 (110-170) 3=2,0-5,9 (33-101) 2=6,0-11,9 (102-204) 1= ≥ 12 (≥ 205)

¹ Módosított forma: Vincent JL, Moreno R. és mtsai: Intensive Care Medicine 22:7, 707-10 (1996)

² A katekolaminokat legalább 1 óra hosszat adjuk be.

Pozitív trendek voltak megfigyelhetők néhány szerv diszfunkciós értékekben az ala-TFPI-t kapó alanyoknál, bármelyik dózisban, a placebohoz viszonyítva, amit az alapvonaltól való nagyobb százalékos eltérés jelez. Ezek a trendek a legkifejezettebbek a pulmonáris és az ICU értékeknél voltak.

6. Táblázat

Szerv diszfunkciós értékek: Az alapvonaltól való átlagos százalékos eltérés¹

Az aktivitás mérése	Összes placebo n=69	0,025 mg/kg/óra ala-TFPI n=80	0,05 mg/kg/óra ala-TFPI n=61	Összes ala-TFPI n=141	p-értékek ²
Pulmonáris	14%	42%	19%	32%	0,056
Kardio-vaszkuláris	55%	76%	79%	77%	0,22

Koaguláció (vérlemez- kék)	7%	12%	10%	11%	0,39
Módosított koagu- láció ³	19%	17%	10%	14%	0,59
Hepatikus	-3%	-3%	-5%	-4%	0,85
Módosított vese ⁴	-1%	5%	6%	5%	0,36
CNS	16%	17%	25%	20%	0,67
ICU érték ⁵	12%	24%	19%	23%	0,16
Módosított ICU érték ⁶	15%	26%	19%	23%	0,16
Összes MODS	5%	10%	8%	10%	0,16
Módosított összes MODS	4%	10%	7%	9%	0,15

¹ A szerv diszfunkció definícióit lásd a 7. táblázatot

² P-értékek az összes ala-TFP alanyra, vs. placebo

³ Ha egy alany vérlemezket kapott, akkor a módosított koagulációs értéket 1-re állítottuk

⁴ Ha egy alany dialízist kapott, akkor a módosított vese értéket 1-re állítottuk

⁵ A kardiovaszkuláris, pulmonáris és koagulációs értékek összege

⁶ A kardiovaszkuláris, pulmonáris és módosított koagulációs értékek (lásd a ³ lábjegyzetet) összege

⁷ A módosított vese (lásd a ⁴ lábjegyzetet) és a módosított koaguláció (lásd a ³ lábjegyzetet)

Az ala-TFPI beadását megszakítottuk, ha az alany INR-je a kezelés során több mint 20%-kal nőtt az alany alapvonalai INR-je fölé, vagy ha az alany INR-re 2,5, vagy magasabb volt. A dózisok beadásának a megnőtt INR miatt történő megszakításának gyakorisága kicsi volt mindegyik csoportban. Ezek az adatok azt sugallják, hogy az INR megnövekedése súlyos szepszises betegekben fordul elő. Az ala-TFPI-vel kezelt alanyokban a dózisok megszakításában enyhe emelkedés volt megfigyelhető, a placebohoz viszonyítva.

7. Táblázat

A megnőtt INR-es alanyok, akiknek dózis-megszakításra volt szükségük

	1-es dózis stádium		2-es dózis stádium		Összes	
Az akti- vítás mérté- ke	Place- bó n=39 [N(%)]	0,025 mg/kg /óra ala-TFPI n=80 [N(%)]	Place- bó n=30 [N(%)]	0,05 mg/kg /óra ala- TFPI n=61 [N(%)]	Place- bó n=69 [N(%)]	ala- TFPI n=141 [N(%)]
Dózis meg- szakítás a megnőtt INR miatt	5 (13%)	11 (14%)	1 (3%)	8 (13%)	6 (9%)	19 (13%)

Nem voltak nagy különbségek az AE-k, a vérzéseket magukban foglaló AE-k és SAE-k között az összes test-rendszerben,

az ala-TFPI versus placebo csoportban. A vérzést magukban foglaló SAE-k teljes előfordulási gyakorisága alacsony volt. Enyhe növekedés volt a vérzést magukban foglaló SAE-k előfordulási gyakoriságában a 0,05 mg/kg/óra ala-TFPI csoportban, a 0,025 mg/kg/óra ala-TFPI-t és placebót kapó csoportokhoz viszonyítva. A vérzést magukban foglaló SAE-k előfordulási gyakoriságát alapvonalis INR-rel is elemeztük ($\geq 1,2$ („megnőtt INR-ű alanyok”) versus $<1,2$ („nem-megnőtt INR-ű alanyok”), amint az a 9. táblázatban látható.

8. Táblázat

Káros mellékhatásokat (AE) és súlyos káros mellékhatásokat (SAE) mutató betegek

	1-es dózis stádium		2-es dózis stádium		Összes	
Alanyok:	Place- bó n=39 [N(%)]	0,025 mg/kg /óra ala-TFPI n=80 [N(%)]	Place- bó n=30 [N(%)]	0,05 mg/kg /óra ala- TFPI n=61 [N(%)]	Place- bó n=69 [N(%)]	ala- TFPI n=141 [N(%)]
Bármilyen AE	34 (87%)	70 (88%)	27 (90%)	57 (93%)	61 (88%)	127 (90%)
Bármilyen, vérzést magában foglaló AE	9 (23%)	16 (20%)	10 (33%)	17 (28%)	19 (28%)	33 (23%)
Bármilyen SAE	25 (64%)	46 (58%)	16 (53%)	37 (61%)	41 (59%)	83 (59%)

Bármilyen, vérzést magában foglaló SAE	2 (5%)	6 (8%)	2 (7%)	7 (11%)	4 (6%)	13 (9%)
---	-----------	-----------	-----------	------------	-----------	------------

9. Táblázat

Vérzést magukban foglaló SAE-k alapvonalai INR-rel

INR	Összes placebo n=69 [N(%)]	0,025 mg/kg/óra ala-TFPI n=80 [N(%)]	0,05 mg/kg/óra ala-TFPI n=61 [N(%)]
≥1,2	3/48 (6%)	4/56 (7%)	7/42 (17%)
<1,2	1/21 (5%)	2/24 (8%)	0/19 0%)

A vérzést magukban foglaló SAE-k előfordulási gyakoriságában növekedés volt a „megnöített INR-ű” alanyok között, akik körülbelül 0,05 mg/kg/óra ala-TFPI-t kaptak, a körülbelül 0,025 mg/kg/óra ala-TFPI-t és a placebót kapó csoporthoz viszonyítva. A „nem-megnöített INR-ű” alanyok csoportjában a vérzést magukban foglaló SAE-k előfordulási gyakorisága alacsony volt.

10. Táblázat

A vérzéssel káros hatások alany-listája

Kezelési csoport, hely- alany szám	Káros hatás- vérzés (szó szerinti kifejezés)	Súlyosság	Gyógyszerhez kapcsolódik	Kimenetel	28-napos túlélési státusz
--	---	-----------	-----------------------------	-----------	---------------------------------

Placebó					
1-es beteg	Vérhányás	Súlyos	Nem	Rendbe jött	Él
2-es beteg	GI hányás	Súlyos	Nem	Rendbe jött	Halott
	Hányás (Örölt kávé)	Közepes	Nem	Rendbe jött	
	Rektális vérzés	Közepes	Nem	Rendbe jött	
	Újra előforduló GI vérzés	Súlyos	Nem	Rendbe jött	
0,025 mg/kg/óra ala-TFPI					
Nincs					
0,05 mg/kg/óra ala-TFPI					
3-as beteg	Felső gasztro-intesztinális vér	Enyhe	Távoli	Rendbe jött	Él
0,1 mg/kg/óra ala-TFPI					
4-es beteg	Orrvérzés	Közepes	Lehet	Rendbe jött	Halott
	Gasztro-intesztinális vérzés	Közepes	Lehet	Rendbe jött	

	Erős hema- turia	Közepes	Lehet	Megma- radó	
--	------------------------	---------	-------	----------------	--

5. Példa

Mortalitási arányok a beteg alcsoportokban

A mortalitási arányokat betegek különböző alcsoportjaiban elemeztük a 4. példában ismertetett II-es fázisú alacsony dózisú ala-TFPI vizsgálatban. Az eredményeket a 13. táblázatban foglaltuk össze. Az eredményeket összehasonlítjuk az összes placebo betegben vs. az összes ala-TFPI betegben (mind a 0,025 mind a 0,050 mg/kg/óra dózis-sebességekben).

11. Táblázat

28-napos, minden-okú mortalitási arányok az alacsony dózisú ala-TFPI-vel kezelt szeptikus betegek alcsoportjaiban

Alcsoport	Összes placebo n=69	Összes ala-TFPI n=141
APACHE II <20	17% (4/24)	11% (4/35)
APACHE II ≥ 20	49% (22/45)	37% (39/106)
Nincs sokk	30% (7/23)	18% (9/50)
Sokk	41% (19/46)	37% (34/91)
Nincs ARDS	18% (6/33)	22% (13/60)

ARDS	57% (20/35)	37% (30/81)
Alapvonal IL-6 < 1000 pg/ml	29% (15/52)	27% 27/101)
Alapvonal IL-6 ≥ 1000 pg/ml	62% (8/13)	41% (16/39)
Alapvonal Lab INR<1,2	29% (6/21)	26% (11/43)
Alapvonal Lab INR≥1,2	42% (20/48)	33% (32/98)

A találmány tárgy a specifikus megvalósítási módok alapján ismertettük. A leírás azoban szándékaink szerint vonatkozik azokra a változtatásokra és helyettesítésekre is, melyeket a szakterületen jártas szakember tehet benne, anélkül hogy eltérne a csatolt igénypontok szellemétől és igénypontjától.

Az alábbiakban részletesen ismertettjük a leírásban említett szekvenciákat, és számítógéppel olvasható formában is megadjuk.

SZEKVENCIALISTA

<110> Chiron Corporation

<120> Súlyos tüdőgyulladás kezelése szöveti faktor bioszintézis inhibitor (TFPI) beadásával

<130> 012441.00029

<150> US 60/328,806

<151> 2001-10-15

<160> 2

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 276

<212> fehérje

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

Asp Ser Glu Glu Asp Glu Glu His Thr Ile Ile Thr Asp Thr Glu Leu
 1             5             10             15
Pro Pro Leu Lys Leu Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp
 20             25             30
Gly Pro Cys Lys Ala Ile Met Lys Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr
 35             40             45
Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn
 50             55             60
Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp Asn
 65             70             75             80
Ala Asn Arg Ile Ile Lys Thr Thr Leu Gln Gln Glu Lys Pro Asp Phe
 85             90             95
Cys Phe Leu Glu Glu Asp Pro Gly Ile Cys Arg Gly Tyr Ile Thr Arg
100             105             110
Tyr Phe Tyr Asn Asn Gln Thr Lys Gln Cys Glu Arg Phe Lys Tyr Gly
115             120             125
Gly Cys Leu Gly Asn Met Asn Asn Phe Glu Thr Leu Glu Glu Cys Lys
130             135             140
Asn Ile Cys Glu Asp Gly Pro Asn Gly Phe Gln Val Asp Asn Tyr Gly
145             150             155             160
Thx Gln Leu Asn Ala Val Asn Asn Ser Leu Thr Pro Gln Ser Thr Lys
165             170             175
Val Pro Ser Leu Phe Glu Phe His Gly Pro Ser Trp Cys Leu Thr Pro
180             185             190
Ala Asp Arg Gly Leu Cys Arg Ala Asn Glu Asn Arg Phe Tyr Tyr Asn
195             200             205
Ser Val Ile Gly Lys Cys Arg Pro Phe Lys Tyr Ser Gly Cys Gly Gly
210             215             220
Asn Glu Asn Asn Phe Thr Ser Lys Gln Glu Cys Leu Arg Ala Cys Lys
225             230             235             240

```

$\langle 210 \rangle$ 2

277

<213> Homo sapiens

Ala	Asp	Ser	Glu	Glu	Asp	Glu	Glu	His	Thr	Ile	Ile	Thr	Asp	Thr	Glu
1				5					10					15	
Leu	Pro	Pro	Leu	Lys	Leu	Met	His	Ser	Phe	Cys	Ala	Phe	Lys	Ala	Asp
			20					25					30		
Asp	Gly	Pro	Cys	Lys	Ala	Ile	Met	Lys	Arg	Phe	Phe	Phe	Asn	Ile	Phe
		35					40					45			
Thr	Arg	Gln	Cys	Glu	Glu	Phe	Ile	Tyr	Gly	Gly	Cys	Glu	Gly	Asn	Gln
	50					55					60				
Asn	Arg	Phe	Glu	Ser	Leu	Glu	Glu	Cys	Lys	Lys	Met	Cys	Thr	Arg	Asp
65				70					75					80	
Asn	Ala	Asn	Arg	Ile	Ile	Lys	Thr	Thr	Leu	Gln	Gln	Glu	Lys	Pro	Asp
			85					90						95	
Phe	Cys	Phe	Leu	Glu	Glu	Asp	Pro	Gly	Ile	Cys	Arg	Gly	Tyr	Ile	Thr
		100					105					110			
Arg	Tyr	Phe	Tyr	Asn	Asn	Gln	Thr	Lys	Gln	Cys	Glu	Arg	Phe	Lys	Tyr
		115					120					125			
Gly	Gly	Cys	Leu	Gly	Asn	Met	Asn	Asn	Phe	Glu	Thr	Leu	Glu	Glu	Cys
	130					135				140					
Lys	Asn	Ile	Cys	Glu	Asp	Gly	Pro	Asn	Gly	Phe	Gln	Val	Asp	Asn	Tyr
145				150					155					160	
Gly	Thr	Gln	Leu	Asn	Ala	Val	Asn	Asn	Ser	Leu	Thr	Pro	Gln	Ser	Thr
		165						170					175		
Lys	Val	Pro	Ser	Leu	Phe	Glu	Phe	His	Gly	Pro	Ser	Trp	Cys	Leu	Thr
		180					185					190			
Pro	Ala	Asp	Arg	Gly	Leu	Cys	Arg	Ala	Asn	Glu	Asn	Arg	Phe	Tyr	Tyr
		195					200					205			

Asn Ser Val Ile Gly Lys Cys Arg Pro Phe Lys Tyr Ser Gly Cys Gly
210 215 220
Gly Asn Glu Asn Asn Phe Thr Ser Lys Gln Glu Cys Leu Arg Ala Cys
225 230 235 240
Lys Lys Gly Phe Ile Gln Arg Ile Ser Lys Gly Gly Leu Ile Lys Thr
245 250 255
Lys Arg Lys Arg Lys Lys Gln Arg Val Lys Ile Ala Tyr Glu Glu Ile
260 265 270
Phe Val Lys Asn Met
275

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás szepszis kezelésére, azzal jellemezve, hogy folyamatos intravénás infúzióval TFPI-t vagy TFPI analógot adunk be egy szepszises betegnek, vagy olyan betegnek, aki a szepszis kockázatával él, olyan dózis-sebességgel, amely ekvivalens a referencia ala-TFPI körülbelül 0,00025-0,050 mg/kg/óra dózis-sebességgel történő beadásával, legalább 72 óra hosszat folytatva a beadást.
2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó TFPI analóg nem-glikozilezett ala-TFPI.
3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó TFPI analóg tartalmaz egy első Kunitz domént, amely az 1. számú szekvencia 18-89-es aminosavait tartalmazza.
4. A 3. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó TFPI analóg tartalmaz egy második Kunitz egységet is, amely az 1. számú szekvencia 90-160-as aminosavait tartalmazza.
5. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó TFPI analóg az 1. számú szekvencia 1-160-as aminosavait tartalmazza.
6. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó TFPI analóg tartalmaz egy második Kunitz egységet is, amely az 1. számú szekvencia 90-160-as aminosavait tartalmazza.
7. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó dózis-sebesség ekvivalens a referencia ala-TFPI körülbelül 0,010-0,045 mg/kg/óra dózis-sebességgel történő beadásával.

8. A 7. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó TFPI analóg nem-glikozilezett ala-TFPI.

9. A 7. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó dózis-sebesség ekvivalens a referencia ala-TFPI körülbelül 0,025 mg/kg/óra dózis-sebességgel történő beadásával.

10. A 9. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó TFPI analóg nem-glikozilezett ala-TFPI.

11. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó beadási periódus legalább körülbelül 96 óra.

12. A 11. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó TFPI analóg nem-glikozilezett ala-TFPI.

13. A 11. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó össz-dózis ekvivalens a referencia ala-TFPI körülbelül 0,024-4,8 mg/kg össz-dózisával.

14. A 13. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó TFPI analóg nem-glikozilezett ala-TFPI.

15. A 11. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó dózis-sebesség ekvivalens a referencia ala-TFPI körülbelül 0,025 mg/kg/óra dózis-sebességgel történő beadásával.

16. A 15. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó TFPI analóg nem-glikozilezett ala-TFPI.

17. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó dózis-sebességet úgy adjuk be, hogy akkora napi dózist biztosítson, amely ekvivalens a referencia ala-TFPI körülbelül 0,006-1,2 mg/kg napi dózisával.

18. A 17. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó TFPI analóg nem-glikozilezett ala-TFPI.

19. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó TFPI-t vagy a szóban forgó TFPI analógot olyan betegnek adjuk be, akinél az alapvonalai Nemzetközi Normalizált Arány (INR) értéke legalább körülbelül 1,2.

20. A 19. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó TFPI analóg nem-glikozilezett ala-TFPI.

21. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve továbbá, hogy leállítjuk a szóban forgó TFPI vagy TFPI analóg beadását, ha a szóban forgó beteg INR-je vagy legalább 20%-kal meghaladja az alapvonalai INR értéket, vagy értéke legalább körülbelül 2,5.

22. A 21. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó TFPI analóg nem-glikozilezett ala-TFPI.

23. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó beteg APACHE II értéke legalább 20.

24. A 23. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó TFPI analóg nem-glikozilezett ala-TFPI.

25. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy, hogy a szóban forgó beteg alapvonalai plazma interleukin-6 koncentrációja legalább körülbelül 1000 pg/ml.

26. A 25. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó TFPI analóg nem-glikozilezett ala-TFPI.

27. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó beteg sokkos.

28. A 27. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó TFPI analóg nem-glikozilezett ala-TFPI.

29. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó beteg ARDS-ben szenved.

30. A 29. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó TFPI analóg nem-glikozilezett ala-TFPI.

31. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó beteg pulmonáris értéke, ICU értéke, vagy a több szervre kiterjedő diszfunkció értéke növekszik a szóban forgó beadási periódus alatt.

32. A 31. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó TFPI analóg nem-glikozilezett ala-TFPI.

33. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó TFPI-t vagy TFPI analógot TFPI-t és TFPI analógot tartalmazó liofilezett készítményből állítjuk elő.

34. A 33. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó TFPI analóg nem-glikozilezett ala-TFPI.

35. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó TFPI-t vagy TFPI analógot arginint tartalmazó készítményben adjuk be.

36. A 35. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó TFPI analóg nem-glikozilezett ala-TFPI.

37. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó TFPI-t vagy TFPI analógot citrátot tartalmazó készítményben adjuk be.

38. A 37. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó TFPI analóg nem-glikozilezett ala-TFPI.

39. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó TFPI vagy TFPI analóg koncentrációja körülbelül 0,15 mg/ml egy olyan készítményben, amely körülbelül 300 mmol/l arginin hidrokloridot és körülbelül 20 mmol/l nátrium-citrátot tartalmaz, és pH-ja körülbelül 5,5.

40. A 39. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó TFPI analóg nem-glikozilezett ala-TFPI.

41. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó beadási periódus alatt, vagy 24 órán belül, tartalmazza még egy további szer beadását, melyet a következő csoportból választhatunk ki: antibiotikum, ellenanyag, endotoxin antagonist, antikoaguláns aktivitással rendelkező szöveti faktor analóg, immunstimuláns, sejt adhézió blokkoló, heparin, BPI fehérje, interleukin-1 antagonist, pafase (PAF enzim inhibitor), TNF inhibitor, interleukin-6 inhibitor és komplement inhibitor.

42. A 41. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó TFPI analóg nem-glikozilezett ala-TFPI.

43. A 41. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó további szer egy ellenanyag, amely specifikusan kötődik az alábbi csoportból választható antigénhez: TNF, interleukin-6 és M-CSF.

44. A 43. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó TFPI analóg nem-glikozilezett ala-TFPI.

45. Profilaktikus eljárás a szepszis kockázatának és súlyosságának csökkentésére, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó eljárás abból áll, hogy szepszises, vagy feltehetően szepszises betegnel folyamatos intravénás infúzióval TFPI-t vagy TFPI analógot adunk be olyan dózis-sebességgel, amely ekvivalens a referencia ala-TFPI körülbelül 0,00025 – 0,050 mg/kg/óra dózis-sebességgel történő, legalább körülbelül 72 óráig tartó beadásával.

46. A 45. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó TFPI analóg nem-glikozilezett ala-TFPI.

47. A igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó TFPI analóg tartalmaz egy első Kunitz domént, amely az 1. számú szekvencia 18-89-es aminosavait tartalmazza.

48. A 7. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó TFPI analóg tartalmaz egy második Kunitz egységet is, amely az 1. számú szekvencia 90-160-as aminosavait tartalmazza.

49. A 5. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó TFPI analóg az 1. számú szekvencia 1-160-as aminosavait tartalmazza.

50. A 45. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó TFPI analóg tartalmaz egy második Kunitz egységet is, amely az 1. számú szekvencia 90-160-as aminosavait tartalmazza.

51. A 45. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó dózis-sebesség ekvivalens a referencia ala-TFPI körülbelül 0,010-0,045 mg/kg/óra dózis-sebességgel történő beadásával.

52. Az 51. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó TFPI analóg nem-glikozilezett ala-TFPI.

53. Az 50. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó dózis-sebesség ekvivalens a referencia ala-TFPI körülbelül 0,025 mg/kg/óra dózis-sebességgel történő beadásával.

54. Az 53. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó TFPI analóg nem-glikozilezett ala-TFPI.

55. A 45. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó beadási periódus legalább körülbelül 96 óra.

56. Az 55. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó TFPI analóg nem-glikozilezett ala-TFPI.

57. Az 55. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó dózis-sebesség ekvivalens a referencia ala-TFPI körülbelül 0,025 mg/kg/óra dózis-sebességgel történő beadásával.

58. Az 57. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó TFPI analóg nem-glikozilezett ala-TFPI.

59. Eljárás akut gyulladás, beleértve a szepszist és a szeptikus sokkot is, profilaktikus és terápiás kezelésére, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó eljárás a következő lépéseket tartalmazza: egy betegnek beadunk i) folyamatos intravénás infúzióval TFPI-t vagy TFPI analógot, olyan dózis-sebességgel, amely ekvivalens a referencia ala-TFPI körülbelül 0,00025 – 0,050 mg/kg/óra dózis-sebességgel történő beadásával, és ii) beadunk egy további szert, melyet a következő csoportból választhatunk ki: egy antibiotikum, egy monoklonális ellenanyag, egy citokin inhibitor és egy komplement inhibitor.

60. Az 59. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó TFPI analóg nem-glikozilezett ala-TFPI.

61. Eljárás egy olyan kóros állapot kezelésére, amely nem kapcsolódik a DIC-hez, és amelyben a TNF, az interleukin-1 vagy más citokin felerősíti a szöveti faktort, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó eljárás abból áll, hogy egy betegnek folyamatos intravénás infúzióval egy szert adunk be, amely lehet TFPI vagy egy TFPI analóg, olyan dózis-sebességgel, amely ekvivalens a referencia ala-TFPI körülbelül 0,00025 – 0,050 mg/kg/óra sebességgel történő beadásával, és a beadási idő legalább körülbelül 72 óra.

62. A 61. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó TFPI analóg nem-glikozilezett ala-TFPI.

63. A 61. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó betegség krónikus vagy akut gyulladás.

64. A 63. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó TFPI analóg nem-glikozilezett ala-TFPI.

65. A 61. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó beteg interleukin-6 plazmakoncentrációja a szóban forgó beadási periódus alatt csökken.

66. A 65. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó TFPI analóg nem-glikozilezett ala-TFPI.


Dr. Ádám K. Szabados
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Szabadalmi Ügyvivői Iroda
tagja
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 461-1000 Fax: 461-1099

75 oldal
4 oldal
2 oldal
Hivatkozás

81 oldal

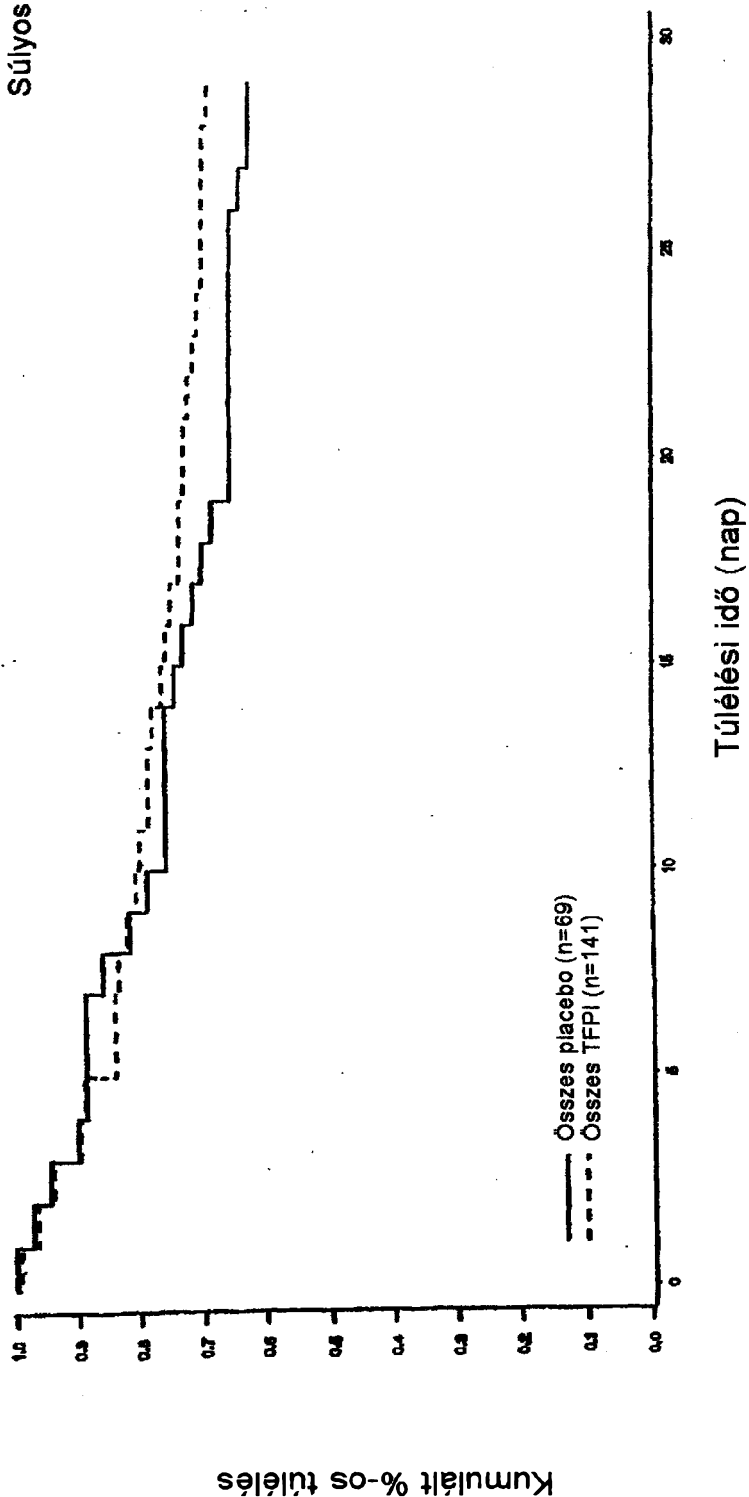
Szabados A.

1A. ábra

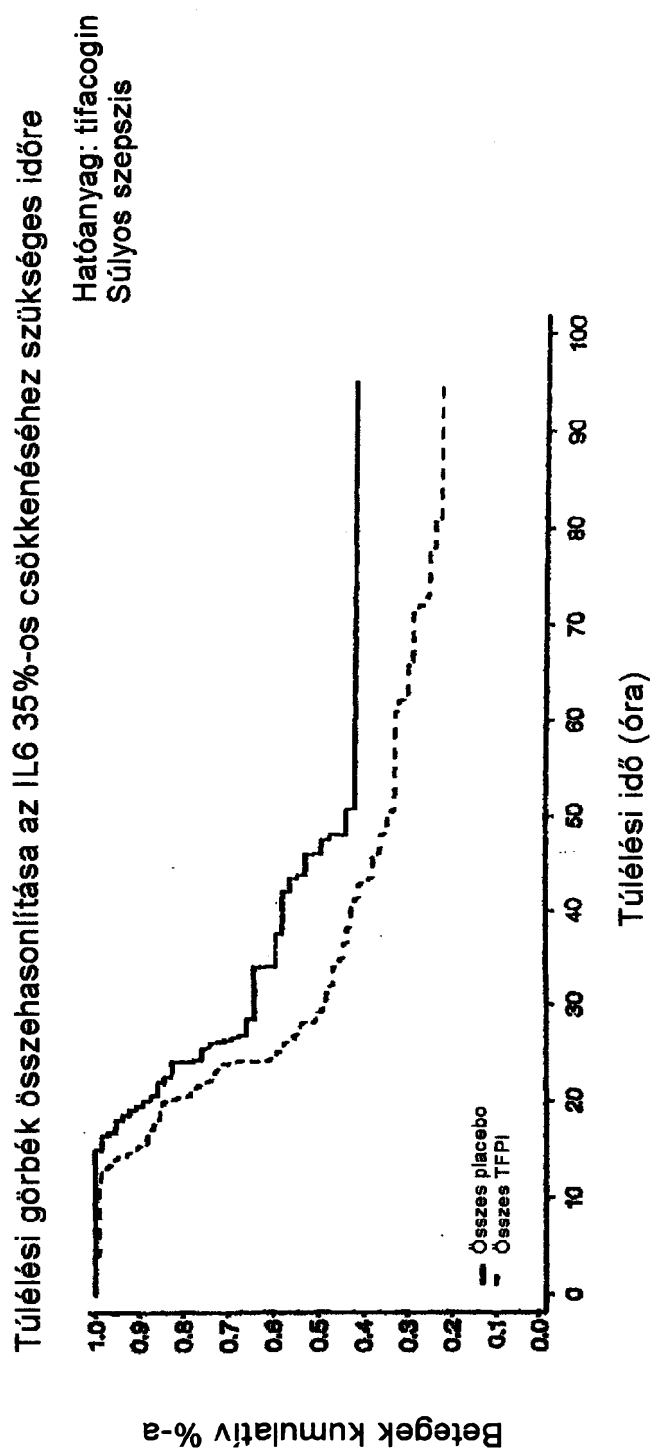
A2

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

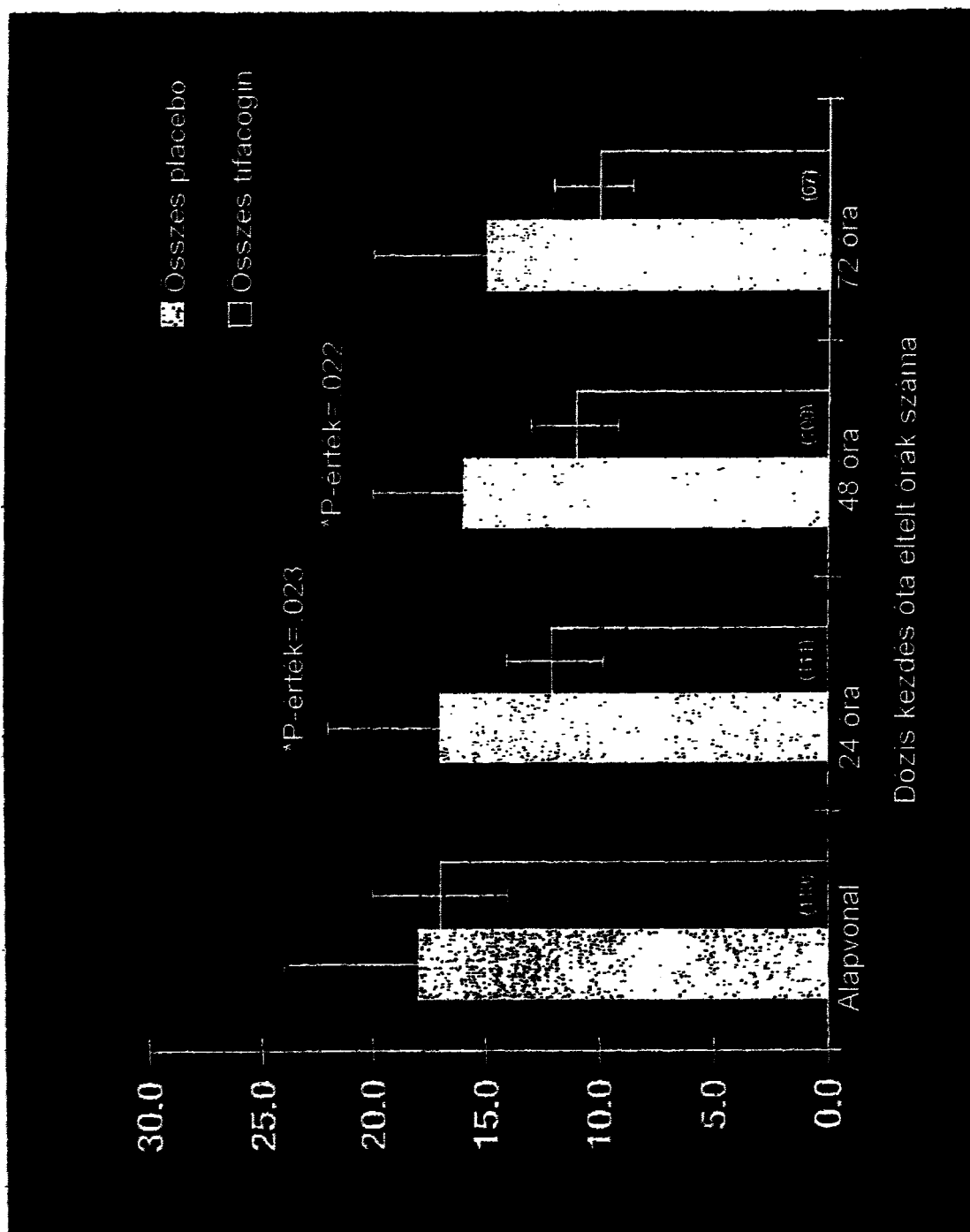
A 28 napos túlélés összehasonlítása a különböző kombinált tifacogin dóziscsoportok és a között (összes alany)

Hatóanyag: tifacogin
Súlyos szepszis

1B. ábra



2. ábra



3. ábra

