

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201790969 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2017.11.30

(51) Int. Cl. A61P 9/00 (2006.01)
C12Q 1/60 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2015.11.03

(54) СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ БЕЗОПАСНОГО И ЭФФЕКТИВНОГО ТРОМБОЛИЗИСА

(31) 62/074,374

(32) 2014.11.03

(33) US

(86) PCT/US2015/058878

(87) WO 2016/073514 2016.05.12

(88) 2016.08.11

(71) Заявитель:

ТРОМБОЛИТИК САЙЕНС, ЭлЭлСи
(US)

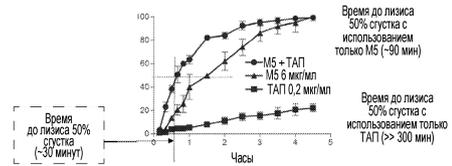
(72) Изобретатель:

Гуревич Виктор (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к способам, композициям и наборам для безопасного и эффективного тромболизиса, например, в терапии потенциального инсульта или острого инфаркта миокарда.



201790969

A1

A1

201790969

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-542047EA/081

СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ БЕЗОПАСНОГО И ЭФФЕКТИВНОГО ТРОМБОЛИЗИСА

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к способам и композициям для безопасного и эффективного тромболизиса.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Тромбоз возникает, когда кровяной сгусток (тромб) образуется внутри кровеносного сосуда и препятствует потоку крови в системе кровообращения. При повреждении кровеносного сосуда, организм использует тромбоциты и фибрин, образующие кровяной сгусток, чтобы придать непроницаемость травмированным сосудам и предотвратить потерю крови. Этот процесс называется гемостазом. Даже тогда, когда кровеносный сосуд не травмируется, сгустки крови могут образовываться в организме при определенных обстоятельствах. Сгустки крови состоят в основном из агрегированных тромбоцитов и сети из поперечно-сшитого фибрина, который представляет собой природный полимер фибриногена в крови. Когда тромб является достаточно крупным, чтобы снизить приток крови к ткани, могут возникнуть гипоксия или аноксия, приводящие к повреждению или даже к смерти ткани. В зависимости от положения в артериальной системе, т.е. в сердце, головном мозге или в ноге, тромб может вызвать сердечный приступ, инсульт или периферическую гангрену. В венозной циркуляции тот же самый процесс может вызвать тромбофлебит (тромбоз глубоких вен) или эмболию легочной артерии. Все вместе эти сердечно-сосудистые заболевания являются ведущими причинами смертности и инвалидности в промышленно развитых странах.

Тромболизис в основном включает в себя использование тромболитических препаратов для растворения проблемного сгустка крови и восстановления кровотока. Тромболитические препараты, такие как ТАП и его производные, используемые на сегодняшний момент, действуют путем активации профермента плазминогена до протеазы плазмина, которая разрушает фибриновую сеть в сгустке крови и делает сгусток растворимым, таким образом восстанавливая

кровоток в закупоренных кровеносных сосудах. Однако существующие тромболитические лекарственные препараты также вызывают разрушение гемостатического фибрина, который заживляет раны, и генерируют плазмин в плазме крови, который разрушает три фактора свертывания крови - фибриноген, фактор V и фактор VII (гемофильный фактор). Таким образом, существующая тромболитическая терапия несет риск возникновения кровотечения из-за гемофилиеподобных побочных эффектов или разрушения гемостатического фибрина. Это накладывает серьезные ограничения на количество пациентов, которые могут получать лечение, и ограничивает дозу тромболитика, которая может быть использована. В результате лечение получают только около 5% пациентов с инсультом, и эффективность такого лечения является ограниченной.

Инсульт может быть вызван либо сгустком крови, либо кровоточащим сосудом в головном мозге. Однако корректная диагностика конкретной причины инсульта требует КТ или МРТ, что может отсрочить лечение, если они не доступны немедленно. При отсутствии такого точного диагноза может быть очень опасно вводить тромболитический агент, такой как тканевый активатор плазминогена («ТАП»), поскольку если причиной инсульта является кровотечение, а не сгусток крови, то введение ТАП или другого тромболитического агента пациенту с мозговым кровотечением может в результате привести к летальному исходу.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение основано, по меньшей мере частично, на обнаружении того факта, что отличающаяся и различная специфичность ТАП и мутанта проурокиназы (мутанта «проУК» или «мпроУК») означает, что низкие дозы каждого в комбинации индуцируют тромболизис, который является более быстрым и безопасным, то есть является более специфичным и имеет меньшую частоту осложнений в виде кровотечений, например, для лечения инсульта или острого инфаркта миокарда («ОИМ»), чем это возможно с использованием любого одного фермента (монотерапии) в высоких дозировках, которые дают максимальную скорость лизиса кровяного сгустка, но с высоким риском геморрагических осложнений.

«мпроУК» может включать в себя замену гистидином лизина в

аминокислотном положении 300 (Lys300→His) проурокиназы, указываемый в данном документе как «M5». мпроУК, как проУК, является проферментом, т.е. неактивным предшественником активного фермента. Он отличается от проУК тем, что ферментативная форма мутанта урокиназы или мУК в отличие от урокиназы (УК) ингибируется плазматическим ингибитором, C1-ингибитором, который дополнительно к более низким необходимым дозам помогает уменьшить побочные геморрагические эффекты, наблюдаемые для проУК, обуславливаемые УК, для которой в плазме присутствует недостаточное количество ингибитора (ингибитора-1 активатора плазминогена, PAI-1).

Для пациентов с инсультом или ОИМ время, необходимое для тромболизиса и реперфузии, имеет решающее значение для клинического исхода и выживаемости. Это означает, что лечение должно быть достаточно безопасно, чтобы проводиться вне лечебного учреждения без предварительного диагностического тестирования. Однако это возможно только в том случае, если риск кровотечений значительно снижается или устраняется, как в случае новых способов, описанных в настоящем документе, включающих введение минидозы ТАП (например, болюсом менее 5,0 мг, например, менее или равным 4,5 мг, 4,0 мг, 3,5 мг, 3,0 мг, 2,5 мг или 2,0 мг) и низкой дозы мпроУК (например, инфузией в течение от 60 до 90 минут (например, за 60, 70, 80 или 90 минут) со скоростью от 60 до 120 мг/час, например, от 60 до 90 мг/час, например, 60, 65, 70, 75, 80, 85 или 90 мг/час) в комбинации.

Если эндогенная концентрация C1-ингибитора недостаточна у данного субъекта, она может быть восполнена в новых способах путем введения эффективного количества C1-ингибитора, например, коммерчески доступного C1-ингибитора, такого как CINRYZE®, CETOR®, BERINERT® и RUCONEST®. C1-ингибитор является дополнительной мерой предосторожности в случае, если произойдет некоторая конверсия мпроУК в мутантную УК, но он может быть необязательным в связи с низкой требуемой дозой мпроУК и тем фактом, что C1-ингибитор является острофазовым белком, который автоматически повышается в организме сразу после сердечного

приступа или инсульта.

В первом аспекте данного изобретения предложены способы лечения субъекта, например, человека с симптомами инсульта или острого инфаркта миокарда с максимальной скоростью лизиса сгустка крови и с минимальными связанными побочными геморрагическими эффектами, причем способы включают: (а) идентификацию субъекта, который потенциально перенес инсульт или ОИМ, путем наблюдения одного или нескольких симптомов инсульта или инфаркта миокарда без определения причины инсульта; и (б) введение субъекту болюса первой композиции, включающей минидозу, т.е. менее 5 мг, тканевого активатора плазминогена (ТАП), например, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0 или 4,5 мг ТАП, с последующей внутривенной инфузией второй композиции, включающей низкую дозу мутанта проурокиназы (мпроУК), вводимой в течение от 60 до 90 минут, например, за 60, 65, 70, 75, 80, 85 или 90 минут, при низкой скорости введения от 60 до 120 мг, например, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 100 или 120 мг/час; где максимальная скорость лизиса сгустка достигается с минимальными связанными побочными геморрагическими эффектами.

В некоторых вариантах осуществления этих способов минимальные связанные побочные геморрагические эффекты могут быть определены как уровень деградации фибриногена в крови субъекта менее примерно 30 процентов, например, менее 27,5%, 25%, 22,5% или 20% деградации фибриногена (тогда как деградация фибриногена составляет примерно от 50 до 80% при монотерапии любой одиночной композицией). В некоторых вариантах осуществления максимальная скорость лизиса сгустка указывается как достигнутая при оценке по шкале TIMI (шкале Тромболизиса при инфаркте миокарда) в 2 балла или выше. В других вариантах осуществления максимальная скорость лизиса сгустка указывается как достигнутая при лизисе примерно 50% массы по меньшей мере одного сгустка у субъекта в течение 75 минут, например, в течение 70, 60, 50, 40, 04 30 минут.

В этих способах мутант проурокиназы может включать замену гистидином лизина в аминокислотном положении 300 (Lys300→His)

проурокиназы. Эти способы могут включать начало введения второй композиции в течение 5, 10 или 15 минут после введения первой композиции. В некоторых вариантах осуществления первая композиция и вторая композиция совместно лизируют 50% массы по меньшей мере одного сгустка крови у субъекта в течение менее одного часа.

В некоторых вариантах осуществления способы могут дополнительно включать в себя введение субъекту третьей композиции, включающей болюс C1-ингибитора. Третью композицию можно вводить субъекту до или примерно в то же время, например, в течение 5 минут после введения второй композиции. В некоторых вариантах осуществления третью композицию вводят в количестве, достаточном, чтобы создать концентрацию C1-ингибитора, которая составляет около 500–750 мкг/мл в крови субъекта. В некоторых вариантах осуществления третья композиция представляет собой болюс, содержащий 500–1500 мг C1-ингибитора.

В некоторых из этих способов первая композиция и вторая композиция совместно лизируют сгустки крови в присутствии C1-ингибитора с разрушением фибриногена менее чем на 30% по сравнению с монотерапией любым одним из ТАП или проурокиназы.

В другом аспекте изобретение относится к наборам, которые включают: первую композицию в первом контейнере, включающем 2–5 мг тканевого активатора пламиногена (ТАП); и вторую композицию во втором контейнере, включающем 60–120 мг мутанта проурокиназы (мпроУК), имеющего замену гистидином лизина в аминокислотном положении 300 (Lys300→His) проурокиназы. В этих наборах, первая композиция может быть составлена подходящей для введения в виде болюса, и/или вторая композиция может быть составлена подходящей для внутривенной инфузии. В некоторых вариантах осуществления наборы дополнительно включают третью композицию, содержащую 500–1500 мг C1-ингибитора, например, составленную подходящей для введения в виде болюса.

В другом аспекте изобретение относится к композициям для применения в любом из способов, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления композиции для применения

при лечении субъекта с симптомами инсульта или острого инфаркта миокарда при максимальной скорости лизиса сгустка и с минимальными связанными геморрагическими побочными эффектами. Эти композиции включают первую композицию, включающую менее 5 мг тканевого активатора плазминогена (ТАП), причем первая композиция предназначена или изготавливается для введения субъекту в виде болюса; и вторую композицию, включающую мутанта проурокиназы (мпроУК), причем вторая композиция предназначена или изготавливается для введения субъекту с помощью внутривенной инфузии по схеме от 60 до 120 мг/час в течение 60 до 90 минут после введения первой композиции; где субъекта идентифицируют как потенциально перенесшего инсульт или ОИМ путем наблюдения одного или нескольких симптомов инсульта или ОИМ без определения причины инсульта перед введением первой композиции; и где максимальная скорость лизиса сгустка достигается при минимальных связанных побочных геморрагических эффектах. Эти композиции могут включать в себя все признаки и элементы, описанные в настоящем документе.

Термин «лечение» или «терапевтическое лечение» означает введение одного или несколько фармацевтических агентов субъекту или выполнение медицинской процедуры с организмом субъекта. Термин терапевтическое лечение также включает в себя корректировку (например, увеличение или уменьшение) дозы или частоты введения одного или нескольких фармацевтических агентов, которые субъект может принимать, введение одного или нескольких новых фармацевтических агентов субъекту или исключение одного или нескольких фармацевтических агентов из схемы лечения субъекта.

В контексте настоящего изобретения «субъектом» или «пациентом» является человек.

«Эффективное количество» в контексте настоящего изобретения представляет собой количество, достаточное для достижения тромболизиса, не вызывающее значительных геморрагических или гемофилиеподобных побочных эффектов. Эффективное количество может вводиться за одно или несколько введений, применений или в одной или нескольких дозах. Терапевтически эффективное

количество фармацевтической композиции (т.е. эффективная доза) зависит от выбранной фармацевтической композиции.

«Максимальная скорость лизиса» кровяных сгустков определяется в настоящем документе как скорость лизиса кровяных сгустков по меньшей мере такая же высокая, как та, которая может быть достигнута с помощью монотерапии с использованием ТАП, проУК или мпроУК в максимально эффективной дозе (т.е. дозе препарата, при которой сгусток не может лизироваться быстрее за счет добавления дополнительного препарата, например, при максимально эффективной дозе показано плато в скорости лизиса сгустка) без каких-либо связанных побочных геморрагических эффектов. Важно отметить, что максимальная скорость лизиса, достигаемая с помощью монотерапии, например, с помощью ТРА или М5, может вызвать значительное кровотечение у пациента, что показано, например, по уровню деградации фибриногена более чем на 30%. Неожиданно, данные терапевтические способы обеспечивают максимальную скорость лизиса без побочных геморрагических эффектов, на которые может указывать уровень деградации фибриногена менее 30%, который не был бы связан с избыточным кровотечением и был бы клинически приемлемым.

Если не указано иначе, все технические и научные термины, используемые в данном описании, имеют такое же значение, которое обычно понимается обычным специалистом в области техники, к которой относится данное изобретение. Хотя способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в данном документе, могут быть использованы на практике или при тестировании настоящего изобретения, подходящие способы и материалы описаны ниже. Все публикации, патентные заявки, патенты и другие ссылки, указанные в настоящем описании, полностью включены в него путем ссылки. В случае конфликта настоящее описание, включая определения, будет являться решающим. Кроме того, материалы, способы и примеры являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения изобретения.

Другие признаки и преимущества настоящего изобретения будут очевидны из приведенного ниже подробного описания и из формулы изобретения.

ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фиг.1А представляет собой линейную диаграмму, показывающую лизис меченых флуоресцеином сгустков плазмы с помощью ТАП в трех дозировках: 1, 2, или 3 мкг/мл. Время, занимаемое ТАП для лизиса 50% сгустков плазмы в дозе насыщения, составляет 60 минут. Фиг.1В представляет собой столбиковую диаграмму, показывающую остаток фибриногена в конце лизиса сгустков, выраженный в процентах от исходного уровня.

Фиг.2А представляет собой линейную диаграмму, показывающую лизис меченных флуоресцеином сгустков плазмы с помощью мпроУК (М5) в трех дозировках: 10, 12,5 или 15 мкг/мл. Время, занимаемое М5 для лизиса 50% сгустков плазмы в дозе насыщения, составляет 50 минут. Фиг.2В представляет собой столбиковую диаграмму, показывающую остаток фибриногена в конце лизиса сгустков, выраженный в процентах от исходного уровня. Фиг.2С представляет собой линейную диаграмму, показывающую, что на время, занимаемое мпроУК (М5) для лизиса меченных флуоресцеином сгустков плазмы, не влиял С1-ингибитор (750 мкг/мл). Фиг.2D представляет собой столбиковую диаграмму, показывающую, что фибриногенолизис, осуществляемый М5, был предотвращен С1-ингибитором (750 мкг/мл).

Фиг.3 представляет собой линейную диаграмму, показывающую максимальную скорость лизиса сгустка с помощью комбинации ТАП (0,2 мкг/мл) и М5 (6 мкг/мл) (круги). Индуцируемый комбинацией лизис сгустка был намного быстрее, чем лизис, вызываемый 0,2 мкг/мл ТАП (квадраты) или 6 мкг/мл М5 (треугольники) в одиночку. Результаты представляют один эксперимент, выполненный в трипликатах.

Фиг.4А представляет собой линейную диаграмму, показывающую лизис сгустка с помощью комбинации ТАП (0,2 мкг/мл) и М5 (6 мкг/мл) (круги). Индуцируемый комбинацией лизис сгустка был намного быстрее лизиса, вызываемого 0,2 мкг/мл ТАП (квадраты) или 6 мкг/мл М5 (треугольники) в одиночку. Фиг.4В представляет собой столбиковую диаграмму, показывающую остаток плазматического фибриногена в конце лизиса сгустка, выраженный в процентах от исходного уровня фибриногена. Результаты

представляют 10 экспериментов, проведенных в трипликатах.

Фиг.5А представляет собой линейную диаграмму, показывающую максимальную скорость лизиса сгустка с помощью комбинации ТАП (0,2 мкг/мл) и М6 (6 мкг/мл) в дополнение к С1-ингибитору (750 мкг/мл). Добавление С1-ингибитора в комбинацию не ингибирует лизис, однако это ингибирует лизис, вызываемый только одним ТАП. Фиг.5В представляет собой столбиковую диаграмму, показывающую остаток плазматического фибриногена в конце лизиса сгустка, выраженный в процентах от исходного уровня фибриногена. С1-ингибитор ослабляет фибринолизис.

Фиг.6 представляет собой линейную диаграмму, показывающую, что дозы ТАП, превышающие 0,2 мкг/мл, дополнительно не увеличивают скорость лизиса сгустка в комбинации с 6 мкг/мл М5.

Фиг.7 представляет собой столбиковую диаграмму, показывающую среднее время, необходимое для лизиса 50% сгустков плазмы с помощью комбинации 0,2 мкг/мл ТАП и 6 мкг/мл М5 («ТАП+М5»), 0,2 мкг/мл ТАП («ТАП 0,2»), 6 мкг/мл М5 («М5 6»), 15 мкг/мл М5 («М5 15»), 3 мкг/мл ТАП («ТАП 3»). Данные объединены из нескольких экспериментов (число экспериментов показано над каждым столбиком).

Фиг.8 представляет собой столбиковую диаграмму, показывающую остаток фибриногена (% от исходного уровня) в конце лизиса сгустка комбинацией 0,2 мкг/мл ТАП и 6 мкг/мл М5 при различных экспериментальных условиях, а именно: (1) в 2 мл плазмы; (2) в 2 мл плазмы плюс С1-ингибитор (500 мкг/мл); и (3) в 5 мл плазмы. Увеличение объема плазмы, естественно, уменьшало дегградацию фибриногена (объем плазмы крови у человека составляет около 3000 мл в среднем), и, таким образом, использование С1-ингибитора скорее всего, не требуется *in vivo*, но полезно в исследованиях *in vitro* для лучшей имитации условий *in vivo*.

Фиг.9 представляет собой линейную диаграмму, показывающую, что при отсутствии сгустка крови, никакого фибринолизиса комбинацией 0,2 мкг/мл ТАП и 6 мкг/мл М5 не происходило в течение по меньшей мере 3 часов, что свидетельствует о том, что в отсутствии сгустка *in vivo* комбинация также будет неактивной.

Фиг.10А представляет собой столбиковую диаграмму,

показывающую объем гематомы после внутримозгового кровоизлияния в крысиной модели. Объем гематомы измеряли по содержанию гемоглобина через 2 часа после введения дозы. Никаких существенных различий ($p=0,5194$) не было найдено между животными, которым вводили С1-ингибитор/М5, и теми, которым вводили физиологический раствор/физиологический раствор. С1-ингибитор был включен, так как у крыс отсутствует этот ингибитор М5/УК.

Фиг.10В представляет собой столбиковую диаграмму, показывающая гистологическое определение объема кровоизлияния после внутримозгового кровоизлияния в крысиной модели. Никаких существенных различий ($p=0,6899$) в объеме кровоизлияния не было найдено между животными, которым вводили С1-ингибитор/М5, и теми, которым вводили физиологический раствор/физиологический раствор.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение основано, по меньшей мере частично, на открытии того, что тромболизис может быть достигнут при максимальной скорости лизиса стустка, чтобы достигнуть увеличения кровотока, например, по оценке тромболизиса при инфаркте миокарда (TIMI) в 2 балла или выше в течение примерно 75 минут и без ожидаемого риска кровотечений, путем введения комбинации минидозы тканевого активатора плазминогена (ТАП) и низкой дозы мутанта проурокиназы (про-УК мутанта» или «мпроУК»), например, мпроУК, который включает замену гистидином лизина в аминокислотном положении 300 (Lys300→His) проурокиназы, указываемого в настоящем документе как «М5». Для пациентов с инсультом или острым инфарктом миокарда время, необходимое для тромболизиса и реперфузии, имеет решающее значение для клинического исхода и выживаемости. Чтобы обеспечить эту возможность, лечение также должно быть настолько безопасным, чтобы пациенты могли получать лечение до госпитализации. В настоящем изобретении предложены способы лечения субъекта, который потенциально перенес инсульт или острый инфаркт миокарда.

Эти способы могут быть использованы для лечения пациентов с симптомами инсульта или острого инфаркта миокарда без задержки, вызванной диагностическими процедурами, отнимающими много времени, тем самым повышая шансы лучшего клинического исхода и выживаемости для таких пациентов. Поскольку фибринолиз может быть достигнут с помощью минидоз ТАП и низких доз мпроУК в комбинации, неспецифическая активация плазминогена и гемофилиеподобные побочные эффекты, связанные со схемами, включающие высокие дозы активатора плазминогена, могут быть снижены до минимальных уровней при одновременном достижении максимальной скорости лизиса сгустка. Также настоящее изобретение предлагает наборы, которые включают первую композицию, содержащую ТАП, и вторую композицию, содержащую мпроУК, для использования в способах, описанных в настоящем документе.

Сгустки крови лизируются в три стадии протеазой плазмином, который является активированной формой плазминогена. Стадия 1: плазминоген, присутствующий в плазме крови, связывается с интактным фибриновым сгустком в специфичном сайте связывания на D-домене, который прилегает к сайту связывания ТАП. ТАП активирует плазминоген в этом так называемом «тройном комплексе», который состоит из фибрина, плазминогена и ТАП, и инициирует фибринолиз. Стадия 2: плазмин расщепляет фибрин преимущественно после остатка лизина, создавая карбокси-концевые лизины, которые представляют новые сайты связывания плазминогена. Один из этих вновь созданных сайтов связывания является высокоаффинным сайтом связывания, состоящим из трех C-концевых лизинов в E-домене фибрина. Когда плазминоген связывается с этим сайтом в E-домене фибрина, его конформация меняется особым образом, что позволяет ему активироваться за счет внутренней каталитической активности проУК и мпроУК. Стадия 3: активация плазминогена проУК/мпроУК сопровождается взаимной активацией проУК/мпроУК плазмином до фермента урокиназы (УК)/мУК. УК/мУК затем активирует оставшийся фибрин-связанный плазминоген, тем самым завершая фибринолиз (см. патенты США №№ 5055295, 5472692, 5626841, 5759542, 7074401, 7837992, 8187592;

Pannell, J. Clin. Invest. 81: 853-859, 1988; Zarich, J Am Coll Cardiol 1995; 26: 374-379; Lee, AJNR Am J Neuroradiol 25: 1470-1475, 2004).

Автор настоящего изобретения обнаружил, как новые способы комбинированной терапии, описанные в данном документе, поддерживаются стадиями фибринолиза, описанными выше. Только ТАП может эффективно выполнить стадию 1, поскольку только ТАП связываются с фибрином, образует тройной комплекс с плазминогеном и специфично активируется интактным фибрином или фибриновым фрагментом D. проУК/мпроУК не связываются с фибрином *in vivo* при нормальных условиях (т.е. они могут связываться с фибрином только в очень высоких, неспецифических дозах). Таким образом, стадия 2 может быть выполнена эффективно только проУК/мпроУК, поскольку они имеют высокую субстратную аффинность в отношении конформации плазминогена, которая возникает, когда он связывается с фибриновым E-доменом деградированного фибрина. Фибриновый фрагмент E не оказывает никакого влияния на ТАП, который не связывается с этим доменом, и способствует активации плазминогена только в результате действия проУК/мпроУК. Таким образом, стадия 3 также активируется только проУК/мпроУК, потому что, когда проУК активирует плазминоген, связанный с фибриновым E-доменом, возникает обратная активация проУК в УК в результате действия плазмينا, и УК завершает лизис путем активации оставшегося связанного с фибрином плазминогена (в отличие от этого, ТАП не активируется, поскольку его одно и двухцепочечные формы имеют одинаковую активность). Единственным способом, когда ТАП может выполнить стадии 2 и 3, являются высокие неспецифические дозы, которые связаны с высоким риском кровотечения.

Автор настоящего изобретения обнаружил, что фибринолиз может быть достигнут с помощью комбинации минидозы ТАП (только 2-5% от стандартной дозы в 100 мг) и низкой дозы мпроУК, например, М5 (40-50% от монотерапевтической дозы) при максимальной скорости лизиса сгустка с минимальным уровнем деградации фибриногена менее примерно 30% (например, менее примерно 25 или 20%). Эта комбинация ТАП-мпроУК обеспечивает

фибринолиз при максимальной скорости лизиса, которая по меньшей мере равна максимальной скорости лизиса, которая может быть достигнута в результате монотерапии с использованием ТАП или мпроУК в максимальной дозе, но с гораздо более низким уровнем деградации фибриногена, что является безопасным и клинически приемлемым, поскольку риск кровотечения не возникает при таком низком уровне препаратов, что невозможно для известных вариантов монотерапии. Таким образом, способы по настоящему изобретению, описанные в данном документе, обеспечивают тромболизис, который явно превосходит любую предполагаемую синергическую комбинацию, которая не будет включать в себя недавно обнаруженные двойные преимущества максимальной скорости лизиса кровяного сгустка с максимальной безопасностью для пациента, т.е. минимальными связанными побочными геморрагическими эффектами.

«Максимальная скорость лизиса» сгустков крови определяется в данном документе как скорость лизиса сгустков крови по меньшей мере такая же высокая, как та, что может быть достигнута при монотерапии с использованием ТАП, проУК или мпроУК в максимально эффективной дозе (т.е. дозе препарата, при которой сгусток не может лизироваться быстрее за счет добавления дополнительного препарата, например, при максимально эффективной дозе показано плато в скорости лизиса сгустка). Однако важно отметить, что максимальная скорость лизиса, достигаемая с помощью монотерапии, например, с помощью ТРА или М5, может вызвать значительное кровотечение у пациента, что показано, например, по уровню деградации фибриногена более чем на 30%. Неожиданно оказалось, что «максимальная безопасность», достигаемая новыми способами, описанными в настоящем описании, определяется как деградация фибриногена менее 30%, что не было бы связано с избыточным кровотечением и было бы клинически приемлемым.

Например, сочетание ТАП-мпроУК может лизировать 50% массы по меньшей мере одного сгустка крови, например, множества сгустков крови, менее чем за час, например, за 48, 50, 55, 60, 65, 70, 75 или 80 минут. Комбинация также позволяет использовать значительно более низкие дозы, которые являются гораздо более специфичными в отношении фибрина, безопасными и экономичными.

мпроУК, например, М5, используется вместо нативной проУК, потому что мпроУК более стабилен в плазме в терапевтических дозах и остается в фибрино-специфичной проферментной форме, тогда как нативная проУК, как правило, спонтанно превращается в урокиназу, которая является неспецифическим активатором плазминогена, который может вызвать осложнения в виде кровотечения. По этой причине проУК было отказано ЕМЕА в доступе на рынок в Европе, после чего ее разработка также была прекращена в этом регионе.

Как показано в примерах, приведенных ниже, при инкубации в плазме в отсутствие кровяного сгустка, очень низкие дозы, используемые в комбинации ТАП-мпроУК, не вызывают какой-либо деградации фибриногена, и, поэтому, ожидается, что эта же комбинация будет иметь низкий эффект или не будет иметь эффекта на коагуляцию или заживление ран. Кроме того, поскольку М5 является проферментом, и для его активации требуется фибрин, он должен быть безопасным даже при наличии кровотечения, например, при геморрагическом инсульте. Кроме того, С1-ингибитор, который доступен в виде фармакологического агента, может быть использован для подавления любой неспецифической активности любого мУК, который может возникнуть во время фибринолиза (Pannell, J Thromb Haemost. 5(5):1047-54, 2007), например, в тестах, проведенных *in vitro*, а также в терапии *in vivo*, в случае необходимости. Этот эффект С1-ингибитора не относится к УК, и является уникальным для мутанта проУК.

В клинике комбинированная терапия ТАП-мпроУК может быть использована для лечения пациентов с симптомами инсульта или инфаркта без задержки, вызываемой длительными диагностическими процедурами, которые в настоящее время являются обязательными в связи со значительным риском кровотечения, связанного с ТАП, при лечении инсульта. Лечение может проводиться при подозрении на указанный диагноз или в машине скорой помощи. Поскольку время является решающим для выживания и клинического исхода у этих больных, то комбинированная терапия обеспечивает более высокую эффективность и результативность, чем ТАП в виде монотерапии, которая является единственным методом лечения, доступным и одобренным для применения в настоящее время. Терапевтический

эффект монотерапии ТАП при лечении инсульта остается спорным, и разрешение на его применение недавно было поставлено под сомнение (Sandercock P, Lancet. 2014 Aug 23; 384(9944):660-1). мпроУК преимущественно активирует плазминоген в «плохих» окклюзионных сгустках, щадя плазминоген в «хороших» ранозаживляющих сгустках. Поэтому, существует лишь низкий риск открытия гемостатического участка. В противоположность этому, мишенью ТАП является такой участок, который состоит из интактного фибрина, как описано выше в стадии 1 фибринолиза. Свободный плазминоген в плазме также защищен за счет действия С1-ингибитора, что снижает риск возникновения гемофилиеподобного состояния.

Максимальная скорость лизиса сгустка по настоящим способам могут быть определена *in vivo*, например, с помощью стандартных методов оценки реканализации кровеносных сосудов. Например, степень окклюзии кровеносных сосудов может быть оценена по аналогии с оценкой по шкале Тромболизиса при инфаркте миокарда (TIMI), где оценка TIMI 0 соответствует полной окклюзии, TIMI 1 – минимальной перфузии, TIMI 2 соответствует частичному потоку (реканализации), а оценка TIMI 3 соответствует полному потоку. В исследовательской группе TIMI эта градуированная шкала была разработана для коронарного кровотока на основании визуальной оценки скорости контрастного помутнения инфарктной артерии (см., например, The TIMI Study Group. The Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) trial: phase I findings. N Engl J Med. 1984;33:523-530; и The TIMI Study Group. Comparison of invasive and conservative strategies after treatment with intravenous tissue plasminogen activator in acute myocardial infarction: results of the Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) phase II trial. N Engl J Med. 1989; 320:618-627, которые включены в данное описание путем ссылки из-за находящегося в них описания классификационной шкалы TIMI).

Шкала TIMI для оценки потока стала стандартом для полуавтоматической количественной оценки перфузии миокарда до и после коронарных реперфузионных методов лечения, а также для определения методов лечения инсульта. Обе TIMI-оценки потока 2 и

3 считаются признаком успешной реперфузии. Таким образом, в контексте настоящего изобретения максимальная скорость лизиса сгустка, как ожидается, будет связана у людей или у пациентов с достижением оценки по шкале TIMI 2 или большей оценки в течение приблизительно 75 минут или меньшего времени, например, в пределах 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35 или 30 минут.

Конформации плазминогена и различия между «хорошими» и «плохими» кровяными сгустками

Плазминоген может принимать по меньшей мере три различных конформации до превращения в активный плазмин. Первой конформацией является нативная «закрытая» конформация, т.е. не связанная ни с каким фибрином, и в крови плазминоген присутствует в первой конформации. Урокиназа может активировать плазминоген в первой конформации и может вызвать неспецифический геморрагический диатез, т.е. гемофилиеподобное состояние. Поскольку проУК в терапевтических дозах является нестабильной и легко превращается в урокиназу в терапевтической концентрации, проУК может также вызвать гемофилиеподобные побочные эффекты.

Связанный с фибрином, плазминоген может принимать две или три различные «открытые» конформации, что дает возможность отличать хорошие ранозаживляющие сгустки от плохих окклюзионных сгустков. Первой из них является конформация плазминогена, которая образуется, при связывании плазминогена с внутренним лизином в D-домене интактного фибрина. Второй из них является конформация плазминогена, которая образуется при связывании плазминогена с тремя C-концевыми лизинами на E-фрагменте фибрина, который становится доступным только после некоторой дегградации фибрина, как описано выше, на стадии 2 фибринолиза.

Когда гемостатический фибрин образуется для заживления раны, он действует как бинт и никак не препятствует кровотоку. Интактный фибрин в таком гемостатическом сгустке имеет только внутренний сайт связывания плазминогена, расположенный в D-домене, который индуцирует первую из этих фибрин-связанных конформаций. В этой конформации плазминоген может активироваться ТАП, чей сайт связывания фибрина находится рядом, но не проУК, которая не связывается с фибрином, а связывается с субстратом за

счет второй конформации, индуцированной Е-доменом фибрина.

Когда тромб образуется в кровеносном сосуде, он препятствует кровотоку или останавливает его, запускает местное высвобождение ТАП из стенки закупоренного кровеносного сосуда и приводит к деградации фибрина. Деградация фибрина высвобождает новый сайт связывания плазминогена Е-фрагменте фибрина. Плазминоген связывается с этим новым сайтом связывания на Е-фрагменте фибрина. ПроУК преимущественно активирует плазминоген, связанный с Е-фрагментом фибрина.

Использование этого важного различия между «хорошими» и «плохими» фибриновыми сгустками может позволить достижение эффективного тромболизиса, одновременно защищая гемостатические пробки, которые перекрывают травмы. Мутант проУК имеет тот же механизм действия, как проУК.

Третья конформация фибрин-связанного плазминогена возникает, когда плазминоген связывается с одиночным С-концевым сайтом, как полагают, располагающимся на гамма-цепи фибрина.

Тканевый активатор плазминогена

Тканевый активатор плазминогена представляет собой сериновую протеазу, содержащуюся в эндотелиальных клетках, выстилающих стенки кровеносных сосудов. Когда тромб закупоривает кровеносный сосуд, ТАП высвобождается из стенки кровеносных сосудов и лизирует фибриновые сгустки.

В настоящее время большинство терапевтического тромболизиса выполняется с использованием тканевого активатора плазминогена (ТАП) и его производных, однако ТАП может вызвать геморрагические побочные эффекты. Например, было показано, что ТАП в дозе 150 мг обеспечивает превосходный коронарный тромболизис, однако сопровождаемый недопустимой частотой внутричерепных кровоизлияний, что обуславливает введение менее эффективной дозы в 100 мг (Braunwald, J Amer Coll Cardiol. 9: 467, 1987; Grossbard, J Amer Coll Cardiol. 9:467, 1987). В сравнительных клинических испытаниях на пациентах с острым инфарктом миокарда (ОИМ), результаты при чрескожном коронарном вмешательстве (РСІ) были значительно лучше, чем при внутривенном введении ТАП, хотя РСІ является более дорогостоящим, технически

сложным и отнимает много времени. Этот клинический результат был неожиданным, но может быть объяснен следующими свойствами ТАП: (1) терапевтическая доза ТАП ограничена осложнениями внутричерепных кровоизлияний; и (2) эффективность ТАП подавляется относительно высокой скоростью коронарного ретромбоза, которая ассоциируется с гематологическим доказательством образования тромбина (Verheugt, *J Am Coll Cardiol* 1996, 27: 766-773; Gurewich, *Circulation* 1993, 87: 1759-1761; Rapold, *Blood* 1991, 78: 1490-1495; Gulba, *Lancet* 1988, 2: 97; Gulba, *Circulation* 1991, 83: 937-944).

При ишемическом инсульте необходимо дополнительное снижение дозы из-за 20% случаев осложнений внутричерепных кровоизлияний при введении ТАП в дозах, эквивалентных используемым при ОИМ (Naske, *JAMA* 1995, 274: 1017-1025). Применение гепарина, который используется вместе с ТАП при ОИМ, исключается при инсульте, поскольку согласно опубликованным данным частота реокклюзии составляет 14-31% (Alexandrov, *Neurology* 2002, 59: 862-867; Rubiera, *Stroke* 2005, 36: 1452-1456; Saqqur, *Stroke* 2007; 38: 69-74). В итоге только около 2-5% пациентов с ишемическим инсультом получают терапию с использованием ТАП в Соединенных Штатах (Kleindorfer, *Stroke* 2008; 39: 924-928).

Полагают, что вызываемое ТАП кровотечение в первую очередь связано с лизисом гемостатического фибрина, необходимого для восстановления травмированных участков в стенке сосуда, которые, как правило, являются скрытыми и непредсказуемыми, но зависят от дозы ТАП. проУК/М5 пропускает эти участки вследствие отличающегося механизма действия, описанного выше.

Проурокиназа и мутанты проурокиназы

Проурокиназа (проУК) менее хорошо известна в качестве тромболитического препарата, но фаза 3 клинических испытаний при остром инфаркте миокарда уже завершена (Michels R, *J Thromb Thrombolysis* 1995, 2: 117-124; PRIMI Trial Study Group. *Lancet* 1989, 1: 863-867; Tebbe U, *J Am Coll Cardiol* 1998, 31: 487-493). ПроУК вызывала небольшой (5%) коронарный ретромбоз или вовсе не вызывала его, и в этих исследованиях не было обнаружено никаких гематологических доказательств образования тромбина (PRIMI Trial

Study Group. Lancet 1989, 1: 863-867; Weaver, J Am Coll Cardiol 1994, 241: 242-1248). К сожалению, в терапевтических дозах проУК склонна к спонтанной активации в ферментативную форму, двухцепочечную урокиназу (дцУК), в плазме крови. Если это произошло, то оно влечет за собой риск кровотечения, и по этой причине проУК было отказано в доступе на рынок, и ее разработка была прекращена в западных странах.

Нестабильность проУК связана с ее относительно высокой собственной каталитической активностью. Структурно-функциональные исследования показали, что заряженные остатки в гибкой петле, состоящей из аминокислотных остатков 297-313 в каталитическом домене, несут ответственность за эту активность. Мутагенез в области гибкой петли обеспечивает модуляцию внутренней активности проУК. Примеры мутантов в «гибкой петле» проУК с пониженной внутренней каталитической активностью, описаны в патенте США № 5472692 (включен в данное описание путем ссылки во всей полноте), такие как мутант Gly299→Ala, мутант Lys300→His (известный как «М5» или «мутант М5»), мутант Lys300→Ala и мутант Glu301→His.

Один из этих мутантов в «гибкой петле» проУК, М5 (Lys300→His), был протестирован как *in vitro*, так и *in vivo*, и было показано, что он растворяет кровяные сгустки гораздо быстрее, чем нативная проУК (Liu et al., Circulation Research, 90:757-763, 2002). Внутренняя активность одноцепочечного мутанта М5 пять раз ниже, чем у проУК, так что М5 является более стабильным в крови чем нативная проУК и с меньшей вероятностью спонтанно превращается в активную форму фермента и вызывает гемофилиеподобные побочные эффекты (Liu, Biochemistry 1996, 35: 14070-14076). Активность ферментативной двухцепочечной формы мпроУК, например, М5, и механизм действия мпроУК, например, М5, остаются такими же, как и у нативной проУК (Sun Z, J Biol Chem 1997, 272: 23818-23823; Liu, Circu. Res. 2002, 90: 757-763). мпроУК, подобные М5, обладают еще одним превосходным свойством - они могут ингибироваться эндогенным плазматическим С1-ингибитором, обеспечивающим защиту от неспецифических побочных

эффектов, не мешая фибринолизу под действием мпроУК (Gurewich, J Thrombos Haemost, 2006, 4: 1559-1565; Pannell, J Thromb Haemost, 2007, 5: 1047-1054; Gurewich, Thromb Haemost, 2009, 102: 279-286). Важно отметить, что мпроУК, такие как М5, не дают каких-либо геморрагических побочных эффектов, обычно связанных с тромболитическими агентами, как описано в патенте США № 7074401 (включен в данное описание путем ссылки во всей полноте). Кроме того, мпроУК, такие как М5, могут быть синтезированы в соответствии со способами, описанными в патенте США № 7070958 (включен в данное описание путем ссылки во всей полноте).

М5 и другие мпроУК, как ожидается, будут безопасными для введения человеку, поскольку: (1) они являются по существу белком человека (99,8% сходства с нативной проУК), (2) они свободны от антигенных (иммунологических) реакций, и (3) проУК человека и рекомбинантную проУК человека из *E.coli* уже безопасно вводили примерно 5000 пациентам в фазе III клинических исследований.

Комбинированная терапия низкой дозой ТАП и мпроУК

Используя комплементарный механизм действия ТАП и проУК на действие плазминогена, автор настоящего изобретения показал, что фибринолиз при максимальной скорости лизиса сгустка может быть достигнут с помощью комбинации минидозы ТАП (2-5% от стандартной дозы в 100 мг, например, 1,0, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0 или 4,5 мг болюсом) с инфузией мпроУК, например, М5 (40-50% от монотерапевтической дозы, например, от 60 до 120 мкг/мл вливают в течение 60-90 минут), дающей максимальную скорость лизиса сгустка, которая является по меньшей мере такой же высокой, как максимальная скорость лизиса сгустка, которая может быть достигнута с помощью монотерапии с использованием ТАП или мпроУК в одиночку в их максимальных эффективных дозах (фиг.1А-5В). Например, комбинация ТАП-мпроУК может лизировать 50% массы кровяных сгустков менее чем за час, например, в среднем за 48 минут (см. фиг.7, ТАП+МФ). Хотя ТАП и мпроУК (М5) в одиночку могут обеспечить аналогичное время лизиса при очень высоких дозах, например, ТАП при 3 мкг/мл или мпроУК (М5) при 15 мкг/мл (фиг.7), неспецифическая активация плазминогена и полученная в

результате деградации фибриногена, составляющие около 77% для М5 (см. фиг.2В) и около 80% для ТАП (см. фиг.1В), могут возникать при этих дозах и приводить к значительным и клинически неприемлемым гемофилиеподобным побочным эффектам.

Вместо нативной проУК используется мпроУК, такой как М5, поскольку мпроУК более стабилен в плазме и остается в проферментативной форме, тогда как нативная проУК, как правило, спонтанно превращается в урокиназу и вызывает гемофилиеподобные побочные эффекты. Таким образом, максимальная скорость лизиса сгустка может быть достигнута с помощью комбинации ТАП-мпроУК с использованием только доли монотерапевтических доз ТАП и мпроУК.

При инкубации в плазме в отсутствие кровяного сгустка сочетание ТАП-мпроУК не вызывает какой-либо деградации фибриногена (фиг.9), и, таким образом, как ожидается, не оказывает никакого влияния на коагуляцию и заживление ран *in vivo*. Кроме того, С1-ингибитор может быть использован для подавления любой неспецифической активности мУК (ферментативной формы мпроУК) в плазме (фиг.2D и 6), добавляя дополнительную защиту от осложнений в виде кровотечений.

В клинической практике комбинированная терапия ТАП-мпроУК может быть использована для лечения пациентов с симптомами инсульта или инфаркта без задержки, вызванной диагностическими процедурами, отнимающими много времени. В настоящем изобретении предложены способы лечения субъекта с симптомами инсульта или острого инфаркта миокарда путем (а) идентификации субъекта, который потенциально перенес инсульт или острый инфаркт миокарда путем наблюдения одного или нескольких симптомов без определения основной причины инсульта или острого инфаркта миокарда; и (b) введения субъекту болуса первой композиции, содержащей 5 мг или меньшее количество ТАП с последующей инфузией второй композиции мпроУК со скоростью от 60 до 120 мг/час, вливаемой за 60-90 минут. Вторую композицию можно вводить через примерно 5, 10 или 15 минут после введения первой композиции. Первую композицию и вторую композицию вводят в таком количестве, чтобы лизировать любой сгусток крови, который вызывает симптомы инсульта или острого инфаркта миокарда при максимальной скорости лизиса.

Первая композиция может включать в себя от 2 до 5 мг ТАП, например, примерно 2 мг, примерно 2,5 мг, примерно 3 мг, примерно 3,5 мг, примерно 4 мг, примерно 4,5 мг, примерно 5 мг. Вторая композиция, которая включает в себя мпроУК, подобный М5, может быть введена путем внутривенной инфузии. Внутривенная инфузия мпроУК, подобного М5, может быть выполнена со скоростью примерно 60-120 мг/ч (например, 60-100, 70-90 или 75-85 мг/час) в течение 60, 70, 80 или 90 минут.

Описанные в настоящем документе способы могут быть использованы для лечения инсульта. Инсульт может быть ишемическим или геморрагическим. Ишемический инсульт вызван тромбом, мешающим кровотоку, в то время как геморрагический инсульт вызван поврежденным кровеносным сосудом. Примерно в 85% случаев инсульт является ишемическим, например, вызывается сгустком крови и, поэтому, поддается лечению с помощью тромболитического агента. Время реперфузии после ишемического инсульта имеет решающее значение, потому что чем дольше клетки мозга не имеют доступа к насыщенной кислородом крови, тем больше клеток мозга теряется. Однако полноценная диагностика причины инсульта является трудоемкой и занимает много времени, но точный диагноз имеет решающее значение при лечении имеющимися в настоящее время тромболитическими средствами в связи с высоким риском развития геморрагических побочных эффектов. Введение тромболитического агента пациенту с ишемическим инсультом может быть надлежащей терапией, но введение же тромболитического агента пациенту с геморрагическим инсультом усугубит проблему и может убить пациента. Несмотря на то, что требуется время для подтверждения диагноза, основные симптомы инсульта у человека (например, внезапное начало одностороннего паралича) могут быть легко определены специалистом в данной области медицины, таким как как фельдшер скорой помощи, медсестра или врач, или даже неспециалистом с минимальным уровнем подготовки.

Субъекта с симптомами инсульта можно лечить с помощью способов, описанных в данном документе, путем введения болюсом низкой дозы ТАП с последующей инфузией мпроУК. Очень низкая доза ТАП в комбинации снижает потенциальный риск кровотечений.

Поскольку ТАП в комбинации представляет собой минидозу, и мпроУК может лизировать тромб, но не затрагивает гемостатический фибрин, комбинация может безопасно использоваться для лечения пациентов с возможным ишемическим инсультом с небольшим риском усугубления кровоизлияния в мозге. Таким образом, можно начинать лечение в машине скорой помощи на основании клинического подозрения диагноза.

Способы, описанные в данном документе, также могут быть использованы для лечения сердечного приступа, например, острого инфаркта миокарда. Сердечный приступ происходит, когда одна из коронарных артерий блокируется, например, сгустком крови. Время реперфузии после сердечного приступа является критическим, поскольку чем дольше сердечная мышца находится без обогащенной кислородом крови, тем больше мышечных клеток повреждаются или теряются. В настоящее время предпочтительным способом лечения являются катетеризация и ангиопластика, которые требуют госпитализации, доступного помещения для катетеризации и персонал наготове. Это задерживает лечение и влечет за собой высокую стоимость лечения. Первый час после окклюзии коронарной артерии называется «золотым часом», поскольку представляет собой время, в течение которого возможно максимальное спасение сердечной мышцы и максимальное снижение смертности. От предварительного введения ТАП для выигрыша во времени до катетеризации вообще отказались, поскольку многочисленные исследования показали, что ТАП значительно увеличивает частоту осложнений при катетеризации.

Субъекта с симптомами сердечного приступа можно лечить введением болюсом низкой дозы ТАП с последующей инфузией мпроУК, такого как М5, как описано в данном документе. Опыт показал, что предварительное введение проУК не связано с пост-катетеризационными осложнениями, так что предварительное лечение с помощью комбинации должно хорошо переноситься и может также снизить потребность в последующей катетеризации.

C1-ингибитор

C1-ингибитор представляет собой ингибитор сериновых протеаз весом 104 кДа с концентрацией в плазме в норме примерно 250

мкг/мл и временем полужизни около 28 часов. Недостаток этого белка связан с болезнью, называемой наследственной ангиоэдемой. С1-ингибитор уже давно используют в клинической практике для лечения наследственной ангиоэдемы. Коммерчески доступные С1-ингибиторы включают CINRYZE®, CETOR®, BERINERT® и RUCONEST®.

Активные ферменты - двухцепочечные УК или МУК, образующиеся в процессе фибринолиза, в конечном счете выходят в плазму, где они отвечают за активацию плазминогена. Для подавления этой активности необходимы ингибиторы в плазме крови. Как описано в патенте США № 7837992 (включен в данное описание путем ссылки), ингибиторный комплекс С1-ингибитора появляется в течение нескольких минут инкубации фермента МУК с плазмой человека или собаки. С1-ингибитор присутствует эндогенно в организме человека и может быть дополнен фармакологически. Показано, что эндогенный С1-ингибитор очень эффективно подавляет активность МУК, например, дцМ5, но не активность УК (Gurewich V, J Thrombos Haemost, 2006; 4: 1559-1565; Pannell R, J Thromb Haemost, 2007; 5: 1047-1054; Gurewich, Thromb Haemost, 2009; 102: 279-286). Как показано в патенте США № 7837992, С1-ингибитор за счет ингибирования МУК эффективно стабилизировал мпроУК, подобного М5, в плазме и позволял переносить более высокую концентрацию мпроУК, подобного М5, без нарушения специфичности к фибрину.

Способы лечения субъекта с симптомами инсульта или острого инфаркта миокарда, описанные в данном документе, могут дополнительно включать в себя введение субъекту третьей композиции, содержащей С1-ингибитор. С1-ингибитор можно вводить в виде болюса в количестве, достаточном, чтобы создать концентрацию С1-ингибитора в плазме субъекта, которая находится в пределах диапазона от двух до трех раз выше нормального физиологического уровня С1-ингибитора (около 250 мкг/мл), т.е. около 500-750 мкг/мл. Например, третья композиция может включать в себя 500-1500 мг С1-ингибитора. В некоторых вариантах осуществления третья композиция может быть введена субъекту до введения второй композиции. В некоторых вариантах осуществления третья композиция может вводиться субъекту одновременно со

второй композицией.

Фармацевтические композиции, схемы лечения и способы введения

Фармацевтические композиции, предлагаемые в настоящем изобретении, могут включать в себя определенные дозы ТАП и мутанта проУК, такого как М5, в качестве действующих ингредиентов. Действующий ингредиент фармацевтической композиции, например, ТАП или мпроУК, может быть введен в фармацевтический состав для доставки с помощью внутривенной инъекции.

Способы изготовления подходящих фармацевтических композиций известны в данной области, см., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st ed., 2005; and the books in the series Drugs and the Pharmaceutical Sciences: a Series of Textbooks and Monographs (Dekker, NY). Например, растворы или суспензии, используемые для парентерального введения, могут включать следующие компоненты: стерильный разбавитель, такой как вода для инъекций, физиологический раствор, нелетучие масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные агенты, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA); буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и агенты для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза; рН можно регулировать с помощью кислот или оснований, таких как соляная кислота или гидроксид натрия. Парентеральный препарат может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы или многодозовые флаконы, изготовленные из стекла или пластика.

Фармацевтические композиции, подходящие для инъекций, могут включать стерильные водные растворы (если они растворимы в воде), дисперсии и стерильные порошки для приготовления для немедленного введения стерильных инъекционных растворов или дисперсий. Для внутривенного введения, подходящие носители включают физиологический солевой раствор, бактериостатическую

воду, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) или фосфатно-солевой буфер (PBS). Во всех случаях композиция должна быть стерильной и должна быть жидкой в такой степени, чтобы свободно набираться в шприц. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения и должна быть защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носитель может быть растворителем или дисперсионной средой, включающей, например, воду, этанол, многоатомный спирт (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси. Текучесть может поддерживаться, например, за счет использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и использования поверхностно-активных веществ.

Предупреждение действия микроорганизмов может быть достигнуто с помощью различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тимеросала и т.п. Во многих случаях будет предпочтительно включать в композиции изотонические агенты, например, сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит и хлорид натрия. Стерильные инъекционные растворы могут быть получены путем введения действующего соединения в требуемом количестве в соответствующем растворителе с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, при необходимости с последующей стерилизацией фильтрованием. Как правило, дисперсии получают путем введения действующего соединения в стерильный носитель, который содержит базовую дисперсионную среду и требуемые другие ингредиенты из тех, которые перечислены выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов предпочтительными способами приготовления являются вакуумная сушка и сушка вымораживанием, которые дают порошок действующего ингредиента плюс любой дополнительный желательный ингредиент из предварительно стерилизованного фильтрацией раствора.

Фармацевтические композиции могут быть включены в контейнер, упаковку или диспенсер вместе с инструкцией по

применению.

Схемы лечения могут быть скорректированы, чтобы обеспечить оптимальный терапевтический ответ. См., например, Physicians' Desk Reference, 63rd edition, Thomson Reuters, November 30, 2008. Например, дозировка, токсичность и терапевтическая эффективность терапевтических соединений могут быть определены с помощью стандартных фармацевтических процедур на клеточных культурах или экспериментальных животных, например, для определения LD50 (дозы, летальной для 50% популяции) и ED50 (дозы, терапевтически эффективной для 50% популяции). Соотношение между дозами, дающими токсические и терапевтические эффекты, является терапевтическим индексом, и он может быть выражен в виде соотношения LD50/ED50. Соединения с высокими терапевтическими индексами являются предпочтительными. Хотя соединения, которые проявляют токсические побочные эффекты, могут использоваться, следует соблюдать осторожность, чтобы разработать систему доставки, которая направляет такие соединения к месту пораженной ткани, с тем чтобы свести к минимуму потенциальную опасность повреждения неинфицированных клеток и тем самым снизить побочные эффекты.

Данные, полученные из анализов на культурах клеток и исследований на животных, могут быть использованы при определении диапазона доз для применения у людей. Доза таких соединений, предпочтительно, будет находиться в пределах диапазона концентраций в крови, которые включают ED50 с небольшой или никакой токсичностью. Доза может варьировать в пределах этого диапазона в зависимости от используемой лекарственной формы и способа введения. Для любого соединения, используемого в способе по настоящему изобретению, терапевтически эффективная доза может быть оценена первоначально на основе анализов на клеточных культурах. Доза может быть определена на животных моделях для достижения диапазона концентраций в плазме, который включает в IC50 (т.е. концентрацию испытуемого соединения, которая обеспечивает половину максимального ингибирования симптомов), определенную в

клеточной культуре. Такая информация может быть использована для более точного определения доз, используемых для человека. Содержание в плазме может быть измерено, например, с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Болюс ТАП может включать 2-5 мг ТАП, например, примерно 2 мг, примерно 2,5 мг, примерно 3 мг, примерно 3,5 мг, примерно 4 мг, примерно 4,5 мг или примерно 5 мг. Внутривенная доза мпроУК, например, М5, может составлять 60-120 мг/час (например, 60-100, 70-90, или 75-85 мг/час) в течение 60, 65, 70, 75, 80, 85 или 90 минут. С1-ингибитор может быть введен в виде болюса в количестве, достаточном для установления концентрации С1-ингибитора в плазме субъекта, составляющей примерно 500-750 мкг/мл. Например, болюс С1-ингибитора может включать в себя 500-1500 мг С1-ингибитора.

Для пациентов с инсультом или острым инфарктом миокарда время, необходимое для реперфузии, имеет решающее значение для выживания и клинического исхода. Эти данные свидетельствуют о том, что комбинация минидозы ТАП и М5 может достичь терапевтического тромболизиса более безопасным и более эффективным способом. Таким образом, пациенты с инсультом или острым инфарктом миокарда могут получать лечение комбинацией ТАП и М5 с небольшой задержкой или безотлагательно.

Эффективность тромболизиса определяется скоростью лизиса. Однако клиническое использование требует, чтобы в эффективности учитывалась частота геморрагических осложнений при этой скорости. С использованием комбинированной терапии, описанной в данном документе, данные свидетельствуют об отсутствии максимальной клинической эффективности, поскольку оптимальная комбинация обеспечивает максимальную скорость лизиса без существенной деградации фибриногена (см. Pannell et al., PLOS ONE, DOI:10.1371/ journal.pone.0122018 от 26 марта 2015 г., которая включена в настоящее описание путем ссылки во всей полноте). Это обеспечивает намного превосходящий индекс клинической эффективности, фактически, это дает максимальный возможный индекс эффективности, т.е. максимальную скорость лизиса ступка, возможную для активаторов плазминогена, без

побочных эффектов.

Наборы

Также в настоящем изобретении предложены наборы, которые включают по меньшей мере композицию, содержащую тканевой активатор плазминогена (ТАП) в одном контейнере, и другую композицию, содержащую мпроУК, например, М5, в отдельном контейнере. Наборы используются для осуществления терапевтических способов, описанных в настоящей заявке. Первая композиция может быть изготовлена подходящей для введения в виде болюса, и может включать 2-5 мг ТАП. Вторая композиция может быть изготовлена подходящей для внутривенного вливания. Вторая композиция может включать в себя 60-120 мг (например, 60, 65, 70, 75, 80, 85 или 90 мг) мутанта проУК для инфузии в течение 60-90 минут. Набор может также включать третью композицию, содержащую С1-ингибитор. Третья композиция может быть изготовлена подходящей для введения в виде болюса, и может включать в себя около 500-1500 мг С1-ингибитора.

Наборы обычно включают следующие основные элементы: упаковку, реагенты, содержащие связывающие композиции, описанные выше, необязательно, контрольные элементы и инструкции. Упаковка может представлять похожую на коробку структуру для содержания флакона (или ряда флаконов), содержащих композиции, и инструкции для применения в способе, описанном в данном документе. Специалист в данной области может легко изменить упаковку в соответствии с индивидуальными потребностями.

Композиции и наборы по настоящему изобретению могут быть использованы в соответствии с любым из способов (например, способов лечения), описанных выше. Например, композиции и наборы, включающие композицию, содержащую ТАП и другую композицию, содержащую мутанта проУК, например, М5-мутанта, могут быть использованы для лечения инсульта, сердечного приступа или других сердечно-сосудистых заболеваний, вызванных тромбом, таких как периферическая гангрена. Специалисты в данной области техники будут осведомлены о других подходящих вариантах применения композиций и наборов по настоящему изобретению и будут иметь возможность использовать композиции и наборы для

таких вариантов.

ПРИМЕРЫ

Изобретение далее описано в приведенных ниже примерах, которые не ограничивают объем изобретения, определенный в формуле изобретения.

Пример 1. Максимальная скорость лизиса сгустка при тромболизисе *in vitro* с помощью ТАП/М5

Были изучены фибринолитические и фибриногенолитические эффекты определенных комбинаций ТАП и М5 *in vitro* в среде плазмы человека.

Материалы

МпроУК, который включает в себя замену гистидином лизина в аминокислотном положении 300 (Lys300→His) проурокиназы (М5) был получен из *E. coli* в PхTherapeutics (Grenoble, France). Тканевый активатор пламиногена (ТАП) был получен от Genentech (South San Francisco, CA). Фибриноген человека, Kabi Grade L, был получен от Chromogenix, Milan, Italy. Апротинин и флуоресцеинизотиоцианат были получены от Sigma Chemicals, St. Louis, MO. Тромбин (ThromboMax, 100 NIH-Ед. на мл) был получен от Sigma (St Louis, MO). С1-ингибитор клинического качества был получен от CSL Behring, Marburg, Germany. В экспериментах использовали просроченную плазму крови человека из банка, объединенную от четырех доноров.

Следует отметить, что различные животные модели имеют различную чувствительность к проУК человека (см., например, таблицу 1 в Gurewich et al., J. Clin. Invest., 73:1731-1739 (1984), которая включена в настоящее описание путем ссылки во всей полноте). Поэтому, дозы для животных не могут использоваться для определения доз для человека, и дозы, описанные в данном документе, основаны на опыте использования отдельных компонентов в испытаниях на человеке. Исследования *in vitro* на плазме человека показывают, что как минимум двукратный избыток М5 относительно проУК необходим для такой же скорости лизиса. Монотерапевтическая доза проУК/М5 известна из исследований III фазы, и новооткрытая минидоза ТАП с низкой

дозой М5 в способах комбинированной терапии, описанных в данном документе, основаны на этом факторе 2х.

Эксперименты по лизису кровяных сгустков

Фибринолиз с помощью М5 был изучен в содержащей ингибитор плазматической среде. Сгустки крови были получены рекальцификацией 0,2 мл объединенной плазмы из банка крови с помощью 35 мМ кальция в присутствии следовых количеств тромбопластина и меченого флуоресцеином фибриногена (см. Dmitry V, J Biol Chem, 1996; 271: 2133-2138). Сгустки крови затем инкубировали в течение часа при 37°C с последующим инкубацией в течение ночи при комнатной температуре. На следующий день сгустки крови помещали в 2 мл плазмы из банка крови с последующим добавлением ТАП, М5 или комбинации ТАП и М5. Лизис сгустка контролировали путем забора 50 мкл образцов плазмы в определенные моменты времени и измеряя эмиссию флуоресценции. Эмиссия флуоресценции в образце соответствует количеству продуктов деградации фибрина, высвобождающихся из сгустков крови. В некоторых экспериментах объем плазмы был увеличен до 5 мл и был добавлен немеченый фибриноген, чтобы компенсировать разбавление меченого флуоресцеином фибриногена. В этих экспериментах, конец лизиса кровяных сгустков определяли визуально.

Каждый эксперимент по лизису кровяных сгустков проводили в трипликатах. Программу Graph Pad Prism использовали для построения графиков и проведения статистического анализа.

Кривые лизиса откладывали на графике в виде процента лизиса сгустков крови в зависимости от времени. Точка 100% была получена из среднего для самых высоких показаний. Базовую линию получали в начале путем вычитания количества флуоресценции, испускаемое плазмой (~15% от полного сигнала), чтобы получить нулевую точку. Время до 50%-го лизиса для каждого экспериментального условия определяли из графика лизиса и использовали в качестве основной конечной точки.

Определение оставшегося фибриногена после лизиса кровяных сгустков

После того завершения лизиса кровяных сгустков получали финальный образец плазмы (1,0 мл) для определения оставшегося фибриногена. К образцу добавляли апротинин (200 кМЕ/мл), чтобы предотвратить дальнейший протеолиз. Остаток фибриногена записывали как процент от исходного уровня фибриногена.

Фибриноген измеряли как свертываемый тромбином белок. После разбавления образца плазмы равным количеством фосфатно-буферного солевого раствора, добавляли 200 мг тромбина (1000 NIH-Ед./мл раствора). Раствор осторожно перемешивали и инкубировали в течение часа при 37°C с последующей инкубацией в течение ночи при комнатной температуре. На следующее утро каждый сгусток крови наматывали на тонкий, длинный конец пластиковой трансферной пипетки с прикрепленным гелем и содержащую сыворотку отжимали путем надавливания на стенку пробирки, а затем на бумажное полотенце. Белый фибрин на кончике пипетки помещали по меньшей мере в 5 мл физиологического раствора на по меньшей мере один час, чтобы обеспечить диффузию любых оставшихся белков сыворотки. Фибрин затем снимали с кончика пипетки и помещали в 1 мл 5%-ого NaOH, кипятили в течение одной минуты и затем выдерживали при комнатной температуре до тех пор, пока весь фибрин не переходил в раствор. Белок в растворе измеряли спектрофотометрически при длине волны 280 нм.

Определение кратчайшего времени лизиса в результате действия только ТАП или М5

Эксперименты по лизису кровяных сгустков осуществляли, как описано выше, в присутствии 1, 2, или 3 мкг/мл ТАП. Кривые лизиса откладывали на графике в виде процента лизиса сгустков крови в зависимости от времени, и время, используемое для лизиса 50% сгустков крови для каждого экспериментального условия, определяли по кривой лизиса. Кратчайшее время для лизиса (на основе которого может быть определена максимальная скорость лизиса сгустка) определяли как время, при котором не существует никакого дальнейшего дозозависимого сокращения времени лизиса. Результаты типичного эксперимента показаны на фиг.1А, и было найдено, что самое короткое время лизиса 50% сгустков крови с

помощью ТАП составляет 60 минут при использовании 3 мкг/мл ТАП. Таким образом, максимальная скорость лизиса сгустка представляет собой 50%-й лизис за один час.

На фиг.1В показан процент оставшегося фибриногена от исходного уровня в конце лизиса для каждой испытуемой дозы ТАП, варьирующий от 19% до 45%. Таким образом, ТАП в одиночку вызывал 55%-81%-ю деградацию фибриногена.

Для М5, эксперименты по лизису кровяных сгустков проводили, как описано выше, в присутствии 10, 12,5, 15 мкг/мл М5. Кратчайшее время для лизиса 50% сгустков крови с помощью М5 было определено как 50 минут при использовании 15 мкг/мл мпроУК (фиг.2А). Таким образом, максимальная скорость лизиса сгустка представляет собой 50%-й лизис за 50 минут.

Процент оставшегося фибриногена от исходного уровня в конце лизиса для каждой дозы М5, варьирующий в диапазоне от 25% до 55%, показан на фиг.2В. Таким образом, М5 в одиночку вызывал 45%-75%-ю деградацию фибриногена.

Влияние С1-ингибитора на лизис фибриногена с помощью М5

Для предотвращения лизиса фибриногена в экспериментах по лизису кровяных сгустков, 750 мкг/мл С1-ингибитора добавляли в плазму перед добавлением 10, 12,5, 15 мкг/мл М5. Присутствие 750 мкг/мл С1-ингибитора не влияет на время лизиса 50% сгустков крови с помощью М5, которое оставалось 50 минут (фиг.2С). Однако, как показано на фиг.2D, небольшая деградация фибриногена происходила в присутствии С1-ингибитора.

Эксперимент с С1-ингибитором не повторяли для ТАП, поскольку уже было показано, что С1-ингибитор ингибирует вызываемый ТАП лизис кровяных сгустков (Tomasi S, PLoS One., 2011; 6: e21999).

Максимальная скорость лизиса сгустка в результате действия комбинации минидозы ТАП и низкой дозы М5

Для того, чтобы определить самую низкую дозу ТАП и М5, которая необходима для достижения минимального времени лизиса (и максимальной скорости лизиса сгустка) при использовании в комбинации, эксперименты по лизису кровяных сгустков были выполнены с использованием различных комбинаций и соотношений

ТАП и М5. Самые низкие дозы ТАП и мпроУК при использовании в комбинации, позволяющие постоянно достигать максимальную скорость лизиса сгустка, были определены как 0,2 мкг/мл ТАП и 6 мкг/мл М5. Эти дозы соответствуют 6% от дозы ТАП, необходимой для достижения минимального времени лизиса плюс 40% от дозы М5, необходимой для достижения этой же цели при раздельном применении в монотерапии. На фиг.3 приведены результаты типичного эксперимента по лизису сгустка, где время, используемое для лизиса 50% кровяных сгустков комбинацией 0,2 мкг/мл ТАП и 6 мкг/мл М5, составляло 53 минуты, тогда как время, используемое для лизиса 50% сгустков крови 6 мкг/мл М5 в одиночку, составило 135 минут, а время, используемые для лизиса 50% сгустков крови 0,2 мкг/мл ТАП в одиночку, составило 225 минут. Эти результаты показывают, что небольшая доза ТАП, например, 0,2 мкг/мл, значительно сокращает время лизиса сгустка под действием М5. Это наблюдение согласуется с функцией ТАП в инициации фибринолиза.

На фиг.4А показаны результаты десяти представительных экспериментов по лизису кровяных сгустков с использованием комбинации (0,2 мкг/мл ТАП+6 мкг/мл М5) (круги), которая индуцирует в среднем 50% лизиса примерно за 75 минут. При этой же дозе М5 в одиночку (треугольники) время лизиса составило 135 минут, а ТАП в одиночку (квадраты) вызывал лизис за 225 минут. Результаты показывают, что минидоза ТАП обуславливала примерно на 45% сокращение времени начала лизиса под действием М5. На фиг.4В показано содержание плазматического фибриногена в конце лизиса, выраженное в процентах от исходного уровня фибриногена. Все эксперименты проводились в трипликатах.

Чтобы проверить, ограничивается ли функция ТАП в комбинации инициацией фибринолиза, эксперименты по лизису кровяных сгустков проводили с использованием четырех комбинаций ТАП-М5. Каждая комбинация ТАП-М5 включает фиксированную дозу 6 мкг/мл М5 и другую дозу ТАП, выбранную из 0,2, 0,6, 1,0, и 3,0 мкг/мл. Время, используемое для лизиса 50% сгустков крови, составляет примерно 48-60 минут для всех протестированных четырех комбинаций, а дозы ТАП выше 0,2 мкг/мл не приводили к

дальнейшему сокращению времени, необходимого для лизиса 50% сгустков крови (фиг.6). Эти данные согласуются с функцией ТАП в комбинации, необходимой для инициации фибринолиза, но не способствующей фибринолизу после инициации.

Среднее время, используемое для лизиса 50% сгустков крови *in vitro*, из нескольких экспериментов по лизису кровяных сгустков было сведено в таблицу и сравнивалось. На фиг.7 показано, что среднее время, используемое для лизиса 50% кровяных сгустков комбинацией 0,2 мкг/мл ТАП плюс 6 мкг/мл М5, составляет 48 ($\pm 2,5$) минут ($n=10$); время, используемое для лизиса 50% кровяных сгустков только 0,2 мкг/мл ТАП, составляет 156 ($\pm 5,3$) минут ($n=5$); для 6 мкг/мл только одного М5 оно составляло 118 ($\pm 7,2$) минут ($n=7$); для 15 мкг/мл только одного М5 оно составляло 48 ($\pm 1,6$) минут ($n=9$); и для 3 мкг/мл только одного ТАП оно составляло 55 (± 5) минут ($n=6$). Время, занимаемое для лизиса 50% кровяных сгустков комбинацией 0,2 мкг/мл ТАП плюс 6 мкг/мл М5, было значительно меньше времени, требующегося для монотерапии с использованием 0,2 мкг/мл ТАП или 6 мкг/мл М5 (фиг.7). Хотя ТАП и мпроУК в одиночку могут достичь такого же времени фибринолиза при очень высоких дозах, например, ТАП при 3 мкг/мл или М5 при 15 мкг/мл (фиг.7), при этих дозах может произойти неспецифическая активация плазминогена и вызывать гемофилиеподобные побочные эффекты.

Влияние объема и С1-ингибитора на лизис фибриногена комбинацией ТАП и М5

Во время фибринолиза, мпроУК активируется плазмином и превращается в мУК, который затем может диффундировать в плазму. Ограничение протеолиза сгустком становится функцией плазматических ингибиторов, например, С1-ингибитора. В пробирке ограниченный объем плазмы *in vitro* относительно объема *in vivo* может оказывать влияние. Поэтому, эксперименты по лизису сгустка проводились при трех условиях: (1) контрольный объем плазмы 2 мл, (2) увеличенный объем плазмы 5 мл и (3) 2 мл плазмы с 500 мкг/мл С1-ингибитора. В этих экспериментах были использованы немеченые сгустки крови, и время, затраченное для лизиса 100%

сгустков крови, было определено как 75–80 минут при всех трех тестируемых условиях. В стандартном объеме плазмы 2 мл комбинация ТАП-М5 разрушала 70% фибриногена, что отражает высокую скорость генерации дцМ5 плазином (фиг.8). При добавлении С1-ингибитора, лизис фибриногена снижался до 45% с 55% оставшегося фибриногена (фиг.8). Аналогичный эффект наблюдался в объеме плазмы 5 мл, вероятно, отражая разбавление дцМ5 в ближайшем окружении сгустка (фиг.8). Это влияние объема предполагает, что лизис фибриногена комбинацией ТАП-М5 может быть дополнительно ослаблен *in vivo*, когда соотношение объема плазмы и сгустка значительно больше.

Менее выраженное действие С1-ингибитора по сравнению с фиг.2D связано с более быстрой фибрин-зависимой генерацией плазмينا, индуцированной комбинацией ТАП-М5, по сравнению с монотерапией М5. В дополнительных исследованиях было подтверждено, что способность С1-ингибитора ингибировать фибриногенолизис комбинацией ТАП-М5 снижается по сравнению с его способностью ингибировать фибриногенолизис только М5. С1-ингибитор является относительно медленным ингибитором и, поэтому, в меньшей степени способен подавлять более быстро образующийся дцМ5 после более быстрого фибринолиза, достигаемого с помощью комбинации ТАП-М5. Может быть необходима более высокая концентрация С1-ингибитора, чтобы в достаточной степени подавить дцМ5, генерируемый из комбинации ТАП-М5.

На фиг.5А показаны результаты представительных экспериментов по лизису сгустка с использованием комбинации (0,2 мкг/мл ТАП+6 мкг/мл М5) (круги) в дополнение к С1-ингибитору. С1-ингибитор (750 мкг/мл) добавляли через 30 минут после добавления активаторов. Как показано на фиг.5А, это добавление не ингибирует лизис (круги), который в среднем сокращался приблизительно до 30 мин, но ингибировал лизис одним только ТАП (квадраты). На фиг.5В показано содержание плазматического фибриногена в конце лизиса, выраженное в процентах от исходного фибриногена. Как показано на фиг.5В, С1-ингибитор ослабляет фибриногенолизис. Все эксперименты проводились в трипликатах.

Фибриногенолизис комбинацией ТАП-М5 в отсутствие сгустка

Чтобы проверить действие комбинации ТАП-М5 на фибринолизис в отсутствие сгустка крови, комбинацию 0,2 мкг/мл ТАП и 6 мкг/мл М5 инкубировали с плазмой при температуре 37°C и отбирали образцы для определения фибриногена через 2-5 часов. Как показано на фиг.9, фибринолизис не наблюдался в течение по меньшей мере 3 часов, что значительно превышает длительность терапевтического тромболитического действия. Эти данные показывают, что генерация плазмина, индуцированная комбинацией ТАП-М5, была фибрин-зависимой, и в отсутствие кровяного сгустка эта фибринолитическая комбинация не вызывает активации пламиногена.

Пример 2. Тромболитическое действие *in vivo* комбинацией ТАП и М5

Кобелей беспородных собак весом 10-15 кг анестезируют пентобарбиталом натрия и поддерживают дыхание комнатным воздухом. Сгустки крови получают из 1 мл нативной цельной крови собак, как описано в патенте США № 7074401, к которой добавляют радиоактивно меченый фибриноген (1,9 мКю, 0,75 мКю/мг белка) и тромбин (10 единиц). Через 20 минут, сгустки промывают солевым раствором три раза, а затем нарезают на мелкие (около 1 мм³) кусочки и вводят через 16G-иглу в бедренную вену. Через 15 минут образец крови отбирают из канюли в контралатеральной бедренной вене для измерения исходной радиоактивности.

Собак разделяют на четыре группы и вводят (1) физиологический раствор, (2) болюсом 2-5 мг ТАП, (3) внутривенной инфузией М5 (20 мкг/кг/мин) в течение 60 минут, или (4) болюсом 2-5 мг ТАП с последующей внутривенной инфузией М5 (20 мкг/кг/мин) в течение 60 минут. Через определенные промежутки времени в течение инфузии отбирают образцы крови и измеряют радиоактивность и фибриноген. Время, затраченное на лизис сгустков крови, определяют и сравнивают между четырьмя группами.

Пример 3. Характеристика С1-ингибитора и М5 в крысиной модели внутримозгового кровоизлияния (ВМК)

Целью данного исследования было изучение влияния М5 на объем внутримозгового кровоизлияния.

В исследовании использовали двадцать взрослых самцов крыс Sprague-Dawley. Крысы были случайным образом выбраны для использования в дни операций. Крысам присваивали уникальный идентификационный номер путем маркировки хвоста. Непосредственно перед началом операции животным вводили цефазолин натрия с помощью внутрибрюшинной инъекции (40 мг/кг; Hospira 101C049) и бупренорфин подкожно (1 мг/кг, Reckitt Benckiser, 219202). Пока крысы находились под изофлурановой анестезией (от 1,5% до 2%) при спонтанном дыхании смесью закиси азота/кислорода (2:1), было просверлено маленькое трепанационное отверстие, и 10-микролитровую микроинъекционную иглу 30G (Hamilton, 700-я серия) медленно опускали в правый стриатум в следующих координатах от темени: 0,0 мм вперед, 3 мм вбок и на глубину 6 мм. В течение 3-минут вводили 3 мкл физиологического раствора, содержащего 0,45 Ед. коллагеназы VII-S (Sigma, St, Louis, MO). Иглу оставляли на месте на 2 минуты, а затем медленно удаляли за 5 минут. После этого кожу головы зашивали скобками, и крыс оставляли восстанавливаться. Вся хирургическая процедура длилась около 20 минут для каждой крысы. Для поддержания температуры тела животного используется нагревательный коврик ($37\pm 1^\circ\text{C}$).

C1-ингибитор и тестируемый препарат (M5) были приготовлены перед введением. Тестируемые растворы хранили на льду во время ежедневного использования. Оставшиеся неиспользованные растворы хранили при -20°C . Сразу же после болюса в количестве 4 мл/кг (внутривенно), животные получали внутривенную инфузию (в течение 30 минут), начиная с 15 минут после ВМК в количестве 4 мл/кг. Через 2 часа после начала инфузии животных гуманно умерщвляли под изофлураном при ингаляции 100%-м N_2O . Удаляли мозг и нарезали секции в 2-миллиметровой матрице для мозга крысы. При стандартных условиях были сделаны изображения срезов мозга с помощью цифровой камеры. Размер гематомы рассчитывали с помощью программного обеспечения ImageJ (доступно в Интернете по адресу rsb.info.nih.gov/ij).

Через два часа после индукции кровотечения крыс умерщвляли под глубокой (5%) изофлурановой анестезией (100% N_2O). Мозг

удаляли и помещали в фосфатно-солевой буфер (PBS) на льду. Мозг нарезали на 7 секций по 2 мм каждая и фотографировали для визуальной оценки гематомы. Гистологическая оценка не проводилась на индивидуальных срезах. В качестве количественного измерения объема кровоизлияния определяли содержание гемоглобина. Пораженную кровоизлиянием сторону (с учетом всех 7 секций) отделяли из нормальной стороны и помещали в 1,5 мл холодного PBS. Через 30 секунд после гомогенизации (вручную с помощью Polytron PT2100), использовали ультразвук в течение 1 минуты, чтобы лизировать мембраны эритроцитов. После центрифугирования в течение 30 минут (13000 об./мин, 4°C) 200 мкл надосадочной жидкости добавляли к 800 мкл реагента Drabkins (Sigma, St, Louis, MO) и выдерживали в течение 10 минут при комнатной температуре. С использованием спектрофотометра определяли степень поглощения при 540 нм, а объем геморрагической крови вычисляли для поврежденной половины мозга на основе стандартной кривой. Стандартную кривую получали с использованием интактных восьми полушарий головного мозга от животных, совпадающих по возрасту и весу (со средним субъектом исследования). К этим интактным полушариям головного мозга была добавлена объединенная кровь в нарастающем объеме от 0 до 192 мкл. Статистическую достоверность оценивали с помощью дисперсионного анализа (ANOVA).

Время, когда измеряли размер кровоизлияния (2 часа после индукции кровоизлияния), было определено из предшествующей работы, оптимизированной в Biotrofix.

Крысам вводили, как описано, болюсом (4мл/кг) носитель (физиологический раствор) (4 мл/кг), с последующим немедленным 30-минутным вливанием носителя или болюсом С1-ингибитора (200U/4мл/кг), за чем немедленно следовала 30-минутная инфузия М5 (10 мг/4 мл/кг) через пятнадцать минут после ВМК.

Клинические наблюдения и выживаемость

Все животные пережили период исследования для данного исследования. Животное # 24 не было включено для анализа, поскольку кровоизлияние, индуцированное у этого животного, было

недостаточным для включения этого животного.

Гистологическое определение объема кровоизлияния

В крысиной модели ВМК было изучено немедленное введение М5 после болюсной инъекции С1-ингибитора. В этой модели, внутримозговое кровоизлияние индуцировали путем инъекции коллагеназы в правый стриатум мозга. Через пятнадцать минут после травмы вводили М5 (в дозе 10мг/4мл/кг) или носитель с помощью 30-минутной внутривенной инфузии сразу же после инъекций болюсов, как описано выше. Никаких существенных различий ($p=0,6899$) не было отмечено между животными, которым вводили С1-ингибитор/М5, и теми, кому вводили физиологический раствор/физиологический раствор (фиг.1).

Прямой объем гематомы

Как и с гистологическим определением объема кровоизлияния не было отмечено существенных различий ($p=0,5194$) между животными, которым вводили С1-ингибитор/М5, и теми животными, кому вводили физиологический раствор/физиологический раствор (фиг.10А и 10В). Фиг.10А представляет собой столбиковую диаграмму, показывающую объем гематомы после внутримозгового кровоизлияния в крысиной модели. Внутримозговое кровоизлияние индуцировали стереотаксической инъекцией коллагеназы. Через 15 минут после травмы крысам вводили болюсную инъекцию С1-ингибитора, за которой немедленно следовала 30-минутная инфузия М5 (в дозе 10 мг/4 мл/кг). Объем гематомы измеряли по содержанию гемоглобина через 2 часа после введения дозы. Никаких существенных различий ($p=0,5194$) не было определено между животными, которым вводили С1-ингибитор/М5, и теми животными, кому вводили физиологический раствор/физиологический раствор.

Фиг.10В представляет собой столбиковую диаграмму, показывающую гистологическое определение объема кровоизлияния после внутримозгового кровоизлияния в крысиной модели. Внутримозговое кровоизлияние индуцировали стереотаксической инъекцией коллагеназы. Через 15 минут после травмы крысам вводили болюсную инъекцию С1-ингибитора, за которой немедленно следовала 30-минутная инфузия М5 (в дозе 10 мг/4 мл/кг). Никаких существенных различий ($p=0,6899$) в объеме кровоизлияния не было

определено между животными, которым вводили С1-ингибитор/М5, и теми животными, кому вводили физиологический раствор/физиологический раствор.

В этой крысиной модели индуцируемого коллагеназой внутримозгового кровоизлияния, введение С1-ингибитора и М5, вводимого через 15 минут после индукции ВМК, не отличалось по объему гематомы или по объему кровоизлияния относительно животных, которым вводили физиологический раствор/физиологический раствор. Таким образом, М5 не индуцирует или не усиливает кровотечение в этой модели инсульта и, следовательно, должен быть безопасным для использования при сопровождаемых кровотечениями событиях, таких как геморрагический инсульт.

Пример 4. Клиническое испытание комбинации ТАП и М5

В клиническое испытание включают здоровых мужчин в возрасте от 18 до 35 лет включительно, с массой тела менее 60 кг и с индексом массы тела (ИМТ) от 18,5 до 25 кг/м² включительно. Субъекты имеют нормальные уровни эндогенных С1-ингибитора, α 2-антиплазмина и фибриногена, отрицательный серологический анализ на ВИЧ, HBsAg и HCV, и отрицательный тест на злоупотребление алкоголем и наркотиками при скрининге и в 1-й день исследования. Субъекты не могут иметь клинически значимых отклонений.

Субъекта не включают, если он соответствует одному или нескольким из следующих критериев: (1) субъект имеет известные или подозреваемые наследственные, врожденные или приобретенные заболевания или состояния, которые влияют на гемостатические или коагуляционные механизмы или связаны с повышенной тенденцией к кровотечениям; (2) субъект имеет хороший шанс развития клинически значимого события кровотечения или события кровотечения, которое может пройти незамеченным в течение значительного периода времени на протяжении исследования, например, субъект (а) претерпел крупные (внутренние) операции или травмы в течение последних трех месяцев от предполагаемого дня введения, (b) имеет кишечную или церебральную сосудистую мальформацию, или (c) участвовал в травматичных контактных видах

спорта, таких как кик-боксинг, в течение двух недель от предполагаемого дня введения; (3) субъект получал какое-либо системно адсорбируемое лекарственное средство или вещество (в том числе рецептурное, безрецептурное или альтернативные средства), которые не разрешены данным протоколом перед введением без прохождения периода вымывания, по меньшей мере в семь раз превосходящего время полувыведения продукта; (4) субъект курил табак в любой форме в течение трех месяцев от введения или когда-либо курил более пяти сигарет в день (или их эквивалент) в среднем; (5) субъект получал производные крови или плазмы в год, предшествующий дню введения; (6) субъект терял кровь или плазму в количестве, выходящем за пределы, установленные местной службой донорства крови (т.е. Sanquin), за три месяца до введения дозы; (7) субъект имеет известную гиперчувствительность к любому из исследуемых веществ или родственных соединений; (8) субъект имеет историю тяжелой гиперчувствительности или аллергии с тяжелыми реакциями; (9) субъект имеет историю злоупотребления психоактивными веществами, в том числе кофеином, табаком и алкоголем; (10) субъект имеет состояние или демонстрирует отношение, которое, по мнению исследователя, может поставить под угрозу здоровье или благосостояние субъекта, или научную достоверность результатов исследования; (11) субъект является психически или юридически недееспособным, чтобы дать информированное согласие.

Включенных субъектов случайным образом распределяют в одну из следующих групп лечения:

(1) Введение болюса 2,5 мг ТАП с последующей внутривенной инфузией мпроУК, например, М5, в течение 60-90 минут в количестве приблизительно 80 мг/час (50% от монотерапевтической дозы);

(2) Введение болюса 2,5 мг ТАП с последующей внутривенной инфузией плацебо в течение 60-90 минут;

(3) Введение болюса плацебо с последующей внутривенной инфузией мпроУК, например, М5, в течение 60-90 минут в количестве приблизительно 160 мг/час; или

(4) Введение болюса 2,5 мг ТАП с последующим введением

болюса С1-ингибитора (Berinert®) (например, 1000 МЕ (2 флакона)) и внутривенной инфузией мпроУК, например, М5, в течение 60-90 минут в количестве приблизительно 80 мг/час (50% от монотерапевтической дозы).

Доза для мпроУК варьирует в диапазоне 60-120 мг/час, болюс С1-ингибитора состоит из 25-100 Ед/кг Berinert® (в пересчете на массу тела пациента). Это исследование заканчивается либо при возникновении плазминемии или, когда достаточное количество данных будет собрано.

На основании данных, полученных из этого исследования, оцениваются общая безопасность и переносимость комбинации ТАП и мпроУК, такого как М5. Оценивается эффект минидозы ТАП на индуцированные мпроУК изменения коагуляции. Оценивается эффект однократной дозы С1-ингибитора на общую безопасность и переносимость комбинации ТАП-мпроУК, и оценивается его эффект на индуцированные ТАП-мпроУК изменения коагуляции.

ДРУГИЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Следует понимать, что хотя изобретение описано в сочетании с его подробным описанием, приведенное выше описание предназначено для иллюстрации и не ограничивает объем изобретения, который определяется объемом прилагаемой формулы изобретения. Другие аспекты, преимущества и модификации изобретения находятся в пределах объема следующей ниже формулы изобретения.

ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения субъекта с симптомами инсульта или острого инфаркта миокарда (ОИМ) при максимальной скорости лизиса сгустка крови и с минимальными связанными побочными геморрагическими эффектами, причем способ включает:

(а) идентификацию субъекта, который потенциально перенес инсульт или ОИМ путем наблюдения одного или нескольких симптомов инсульта или ОИМ без определения причины инсульта; и

(б) введение субъекту болюса первой композиции, содержащей менее 5 мг тканевого активатора плазминогена (ТАП), с последующей внутривенной инфузией второй композиции, содержащей мутант проурокиназы (мпроУК), вливаемой в течение от 60 до 90 минут в количестве от 60 до 120 мг;

где максимальная скорость лизиса сгустка достигается при минимальных связанных побочных геморрагических эффектах.

2. Способ по п.1, где субъект имеет симптомы инсульта.

3. Способ по п.1, где минимальные связанные побочные геморрагические эффекты определяются как уровень деградации фибриногена в крови субъекта менее примерно 30 процентов.

4. Способ по любому одному из пп.1-3, где максимальная скорость лизиса сгустка указывается как достигнутая при оценке по шкале Тромболизиса при инфаркте миокарда (TIMI) в 2 балла или выше.

5. Способ по любому одному из пп.1-4, где максимальная скорость лизиса сгустка указывается как достигнутая при лизисе примерно 50% массы по меньшей мере одного сгустка у субъекта, достигаемом в течение 75 минут.

6. Способ по любому одному из пп.1-5, где мутант проурокиназы содержит замену гистидином лизина в аминокислотном положении 300 (Lys300→His) проурокиназы.

7. Способ по любому одному из пп.1-6, где болюс содержит от 2 до 4,5 мг тканевого активатора плазминогена (ТАП).

8. Способ по п.7, где болюс содержит от 2 до 4,0 мг ТАП.

9. Способ по п.7, где болюс содержит 2 мг ТАП.

10. Способ по любому одному из пп.1-9, где вторая композиция вводится в виде внутривенной инфузии со скоростью 60-90 мг/час

мпроУК в течение 60–90 минут.

11. Способ по п.10, где вторую композицию вводят в виде внутривенной инфузии со скоростью 60–80 мг/час мпроУК в течение 60 минут.

12. Способ по любому одному из пп.1–11, где введение второй композиции начинается в течение пяти минут после введения первой композиции.

13. Способ по любому одному из пп.1–12, где первая композиция и вторая композиция вместе лизируют 50% массы по меньшей мере одного сгустка крови у субъекта в течение менее одного часа.

14. Способ по любому одному из пп.1–13, дополнительно включающий введение субъекту третьей композиции, содержащей болюс С1-ингибитора.

15. Способ по п.14, где третью композицию вводят субъекту перед введением второй композиции.

16. Способ по п.14, где третью композицию вводят субъекту примерно в то же время, что и вторую композицию.

17. Способ по п.14, где третью композицию вводят в количестве, достаточном, чтобы создать концентрацию С1-ингибитора, которая составляет примерно 500–750 мкг/мл в крови субъекта.

18. Способ по п.14, где третья композиция содержит болюс 500–1500 мг С1-ингибитора.

19. Способ по п.14, где первая композиция и вторая композиция вместе лизируют сгустки крови в присутствии С1-ингибитора с менее чем 30%-й деградацией фибриногена по сравнению с монотерапией ТРА или проурокиназой в одиночку.

20. Набор, включающий:

первую композицию в первом контейнере, содержащем 2–5 мг тканевого активатора плазминогена (ТАП); и

вторую композицию во втором контейнере, содержащем 60–120 мг мутанта проурокиназы (мпроУК), включающего замену гистидином лизина в аминокислотном положении 300 (Lys300→His) проурокиназы.

21. Набор по п.20, где первая композиция составлена подходящей для введения в виде болюса.

22. Набор по п.20, где вторая композиция составлена

подходящей для внутривенной инфузии.

23. Набор по п.20, дополнительно содержащий третью композицию, содержащую 500-1500 мг С1-ингибитора.

24. Набор по п.23, где третья композиция составлена подходящей для введения в виде болюса.

25. Композиция для применения при лечении субъекта с симптомами инсульта или острого инфаркта миокарда (ОИМ) при максимальной скорости лизиса сгустка и с минимальными связанными побочными геморрагическими эффектами, причем композиция содержит:

первую композицию, содержащую менее 5 мг тканевого активатора плазминогена (ТАП), где первая композиция предназначена или изготавливается для введения субъекту в схеме введения болюсом; и

вторую композицию, содержащую мутант проурокиназы (мпроУК), где вторая композиция предназначена или изготавливается для введения субъекту с помощью внутривенной инфузии в схеме введения от 60 до 120 мг/час в течение от 60 до 90 минут после введения первой композиции;

где субъект идентифицируется как потенциально перенесший инсульт или ОИМ путем наблюдения одного или нескольких симптомов инсульта или ОИМ без определения причины инсульта перед введением первой композиции; и

где максимальная скорость лизиса сгустка достигается при минимальных связанных побочных геморрагических эффектах.

26. Композиция по п.25 для применения при лечении субъекта с симптомами инсульта.

27. Композиция по п.25 или п.26, где минимальные связанные побочные геморрагические эффекты определяются как уровень деградации фибриногена в крови субъекта менее примерно 30 процентов.

28. Композиция по п.25 или п.26, где максимальная скорость лизиса сгустка указывается как достигнутая при оценке по шкале Тромболизиса при инфаркте миокарда (ТІМІ) в 2 балла или выше.

29. Композиция по п.25 или п.26, где максимальная скорость лизиса сгустка указывается как достигнутая при лизисе примерно 50% массы по меньшей мере одного сгустка у субъекта, достигаемом в

течение 75 минут.

30. Композиция по любому одному из пп.25-29, где мутант проурокиназы содержит замену гистидином лизина в аминокислотном положении 300 (Lys300→His) проурокиназы.

31. Композиция по любому одному из пп.25-30, где болюс содержит от 2 до 4,5 мг ТАП.

32. Композиция по любому одному из пп.25-30, где болюс содержит от 2 до 4,0 мг ТАП.

33. Композиция по п.32, где болюс содержит 2 мг ТАП.

34. Композиция по любому одному из пп.25-33, где вторая композиция изготовлена для введения в виде внутривенной инфузии со скоростью 60-90 мг/час мпроУК за 60-90 минут.

35. Композиция по п.34, где вторая композиция изготовлена для введения в виде внутривенной инфузии со скоростью 60-80 мг/час мпроУК в течение 60 минут.

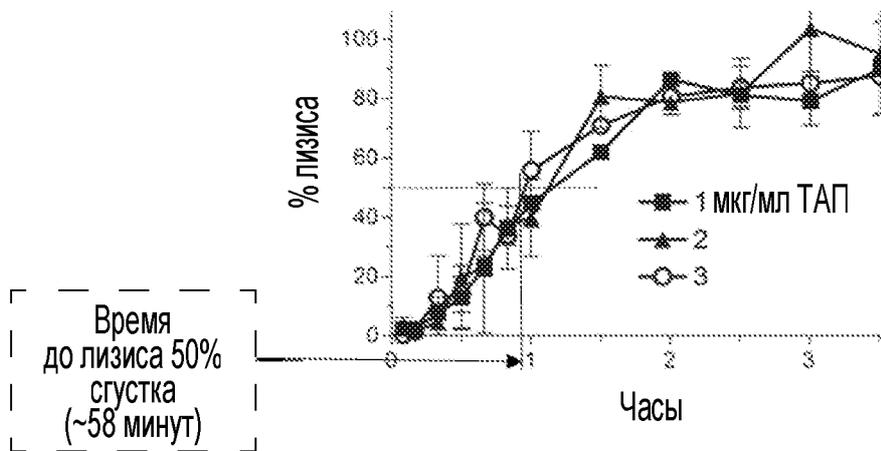
36. Композиции по любому одному из пп.25-35, дополнительно включающая третью композицию, содержащую болюс С1-ингибитора.

37. Композиция по п.36, где третья композиция содержит болюс 500-1500 мг С1-ингибитора.

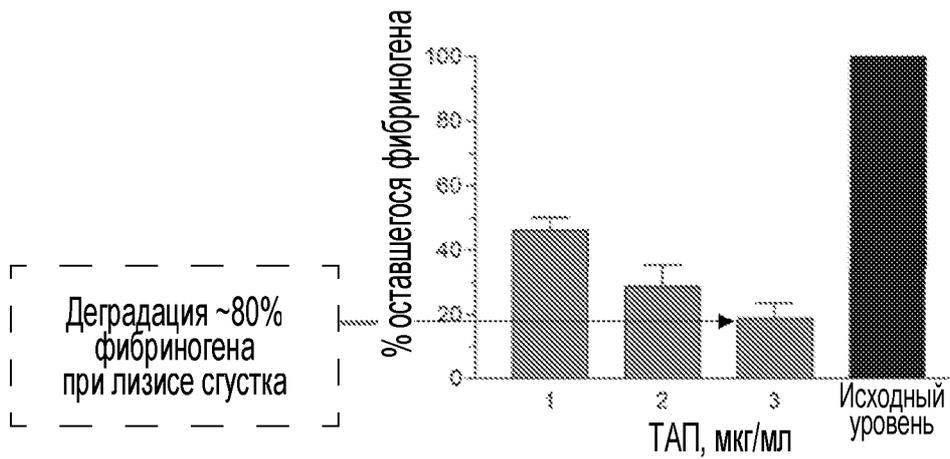
38. Композиция для применения в способах по пп.1-19.

По доверенности

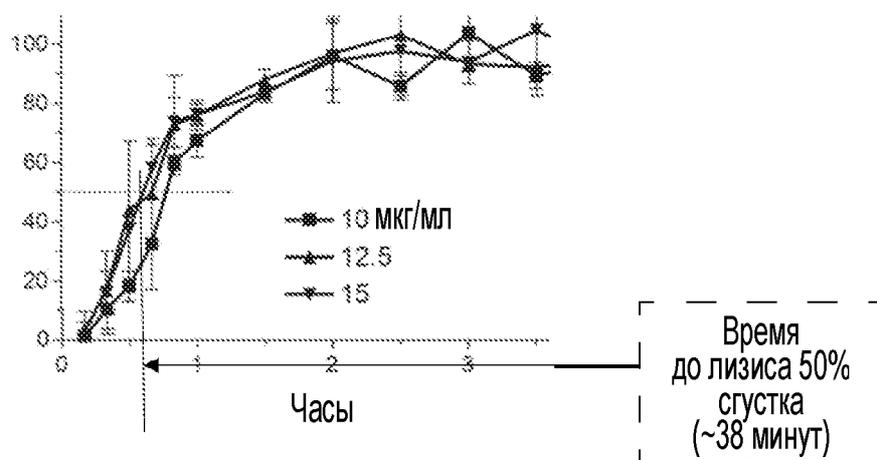
ФИГ. 1А



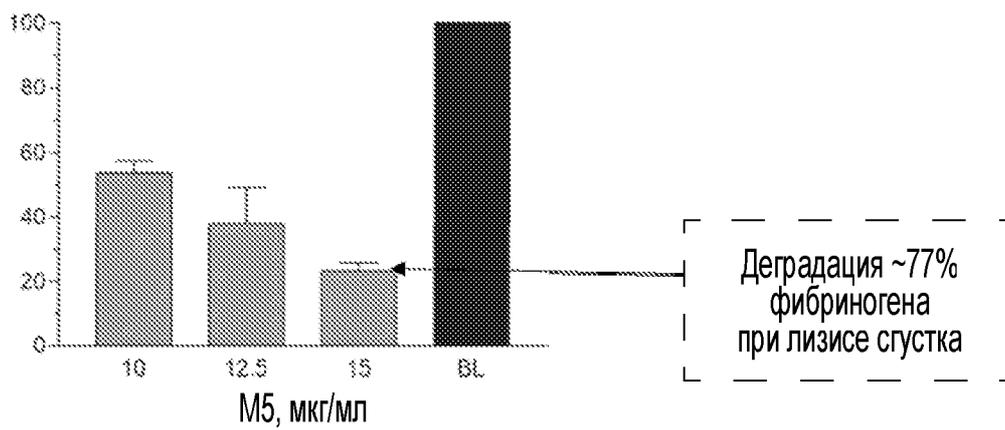
ФИГ. 1В



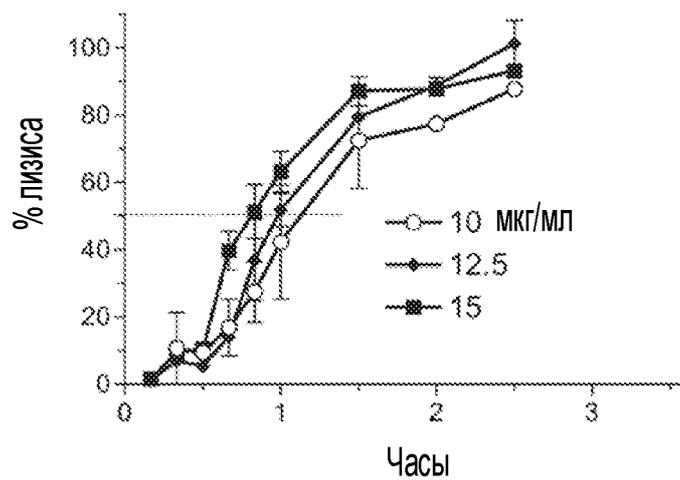
ФИГ. 2А



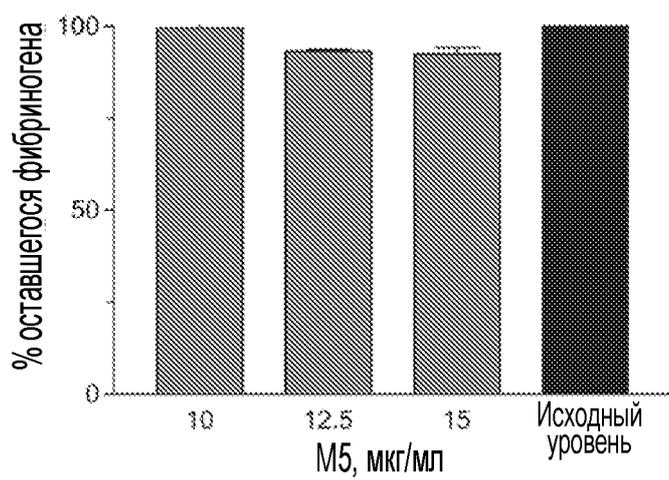
ФИГ. 2В



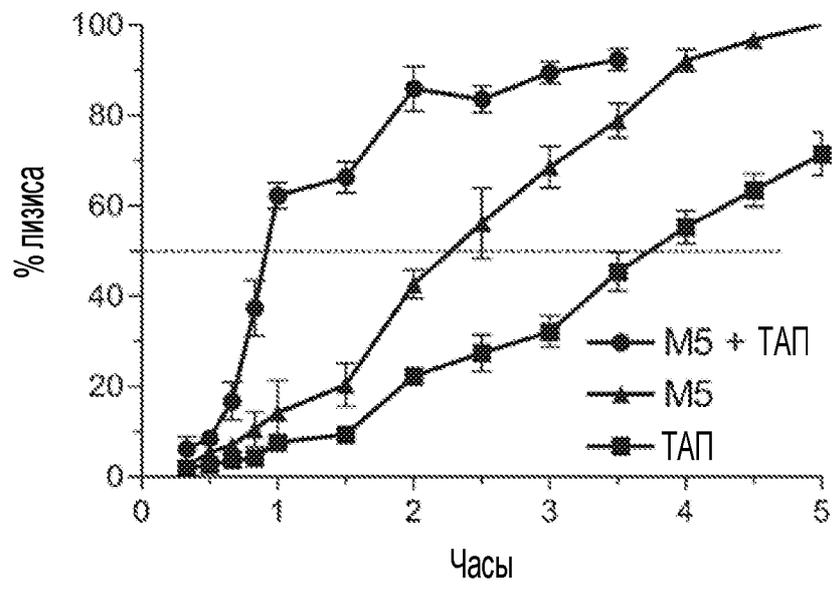
ФИГ. 2С



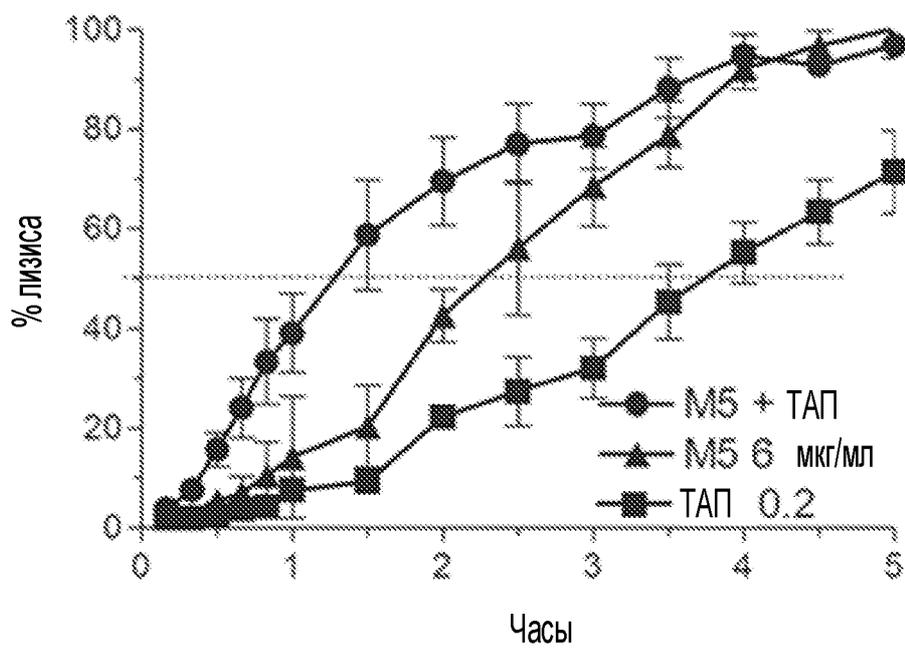
ФИГ. 2D



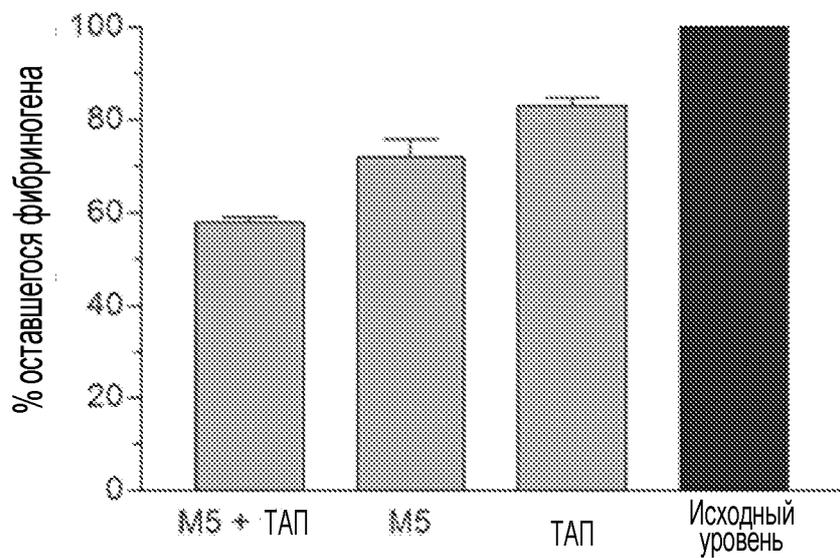
ФИГ. 3



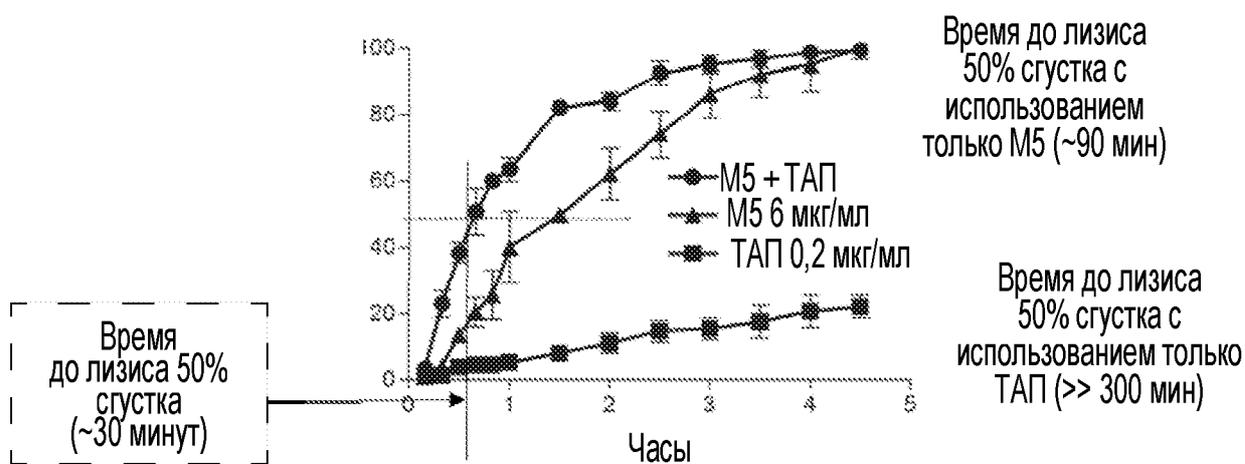
ФИГ. 4А



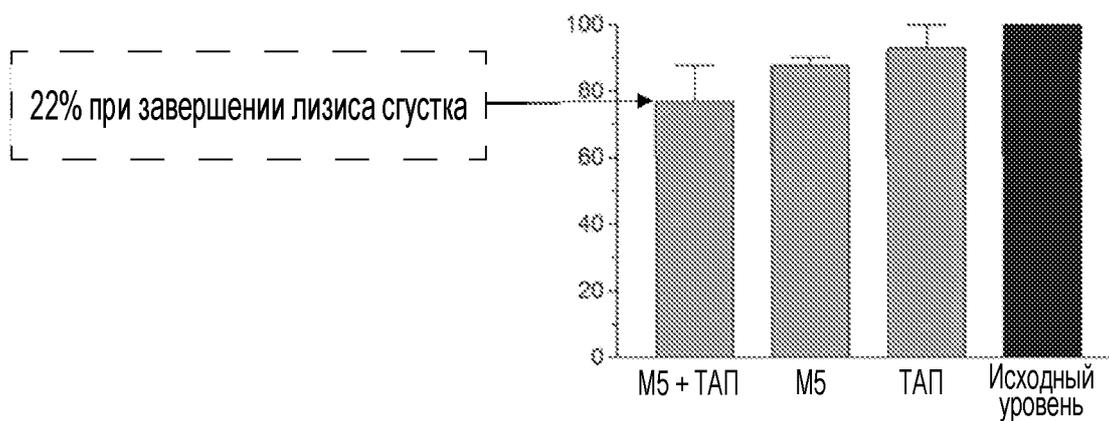
ФИГ. 4В



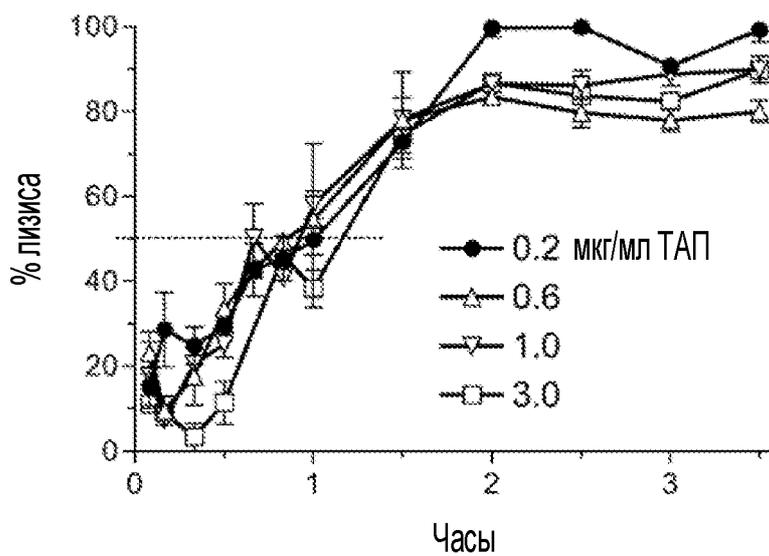
ФИГ. 5А



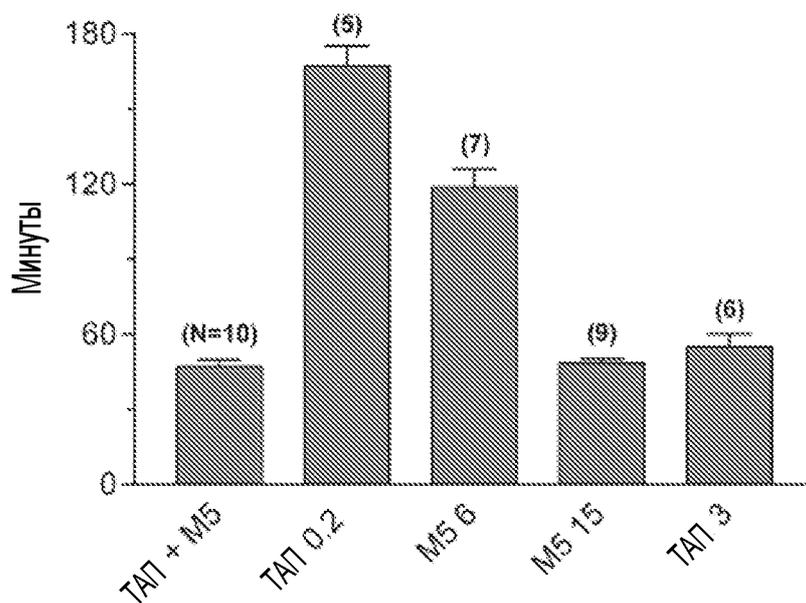
ФИГ. 5В



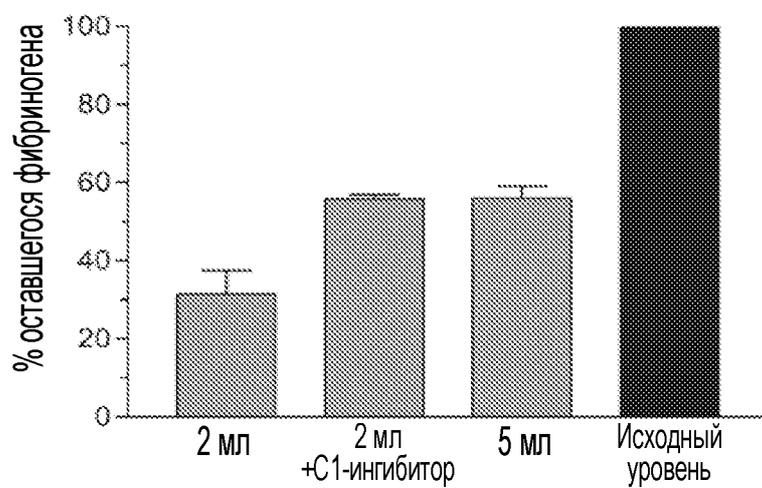
ФИГ. 6



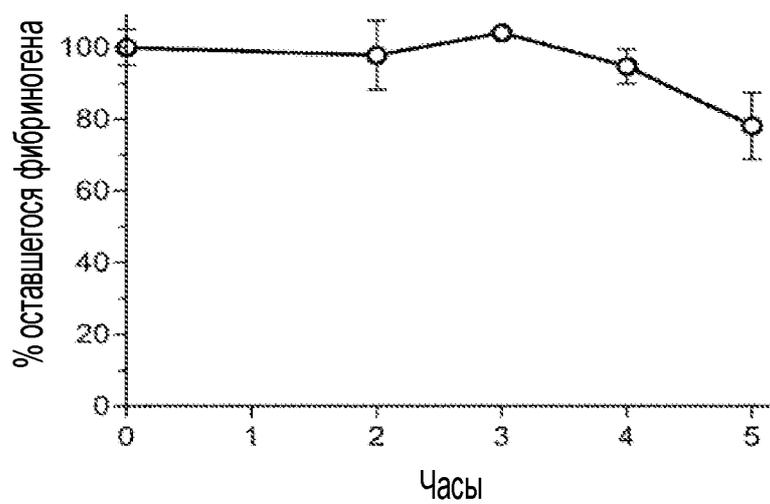
ФИГ. 7



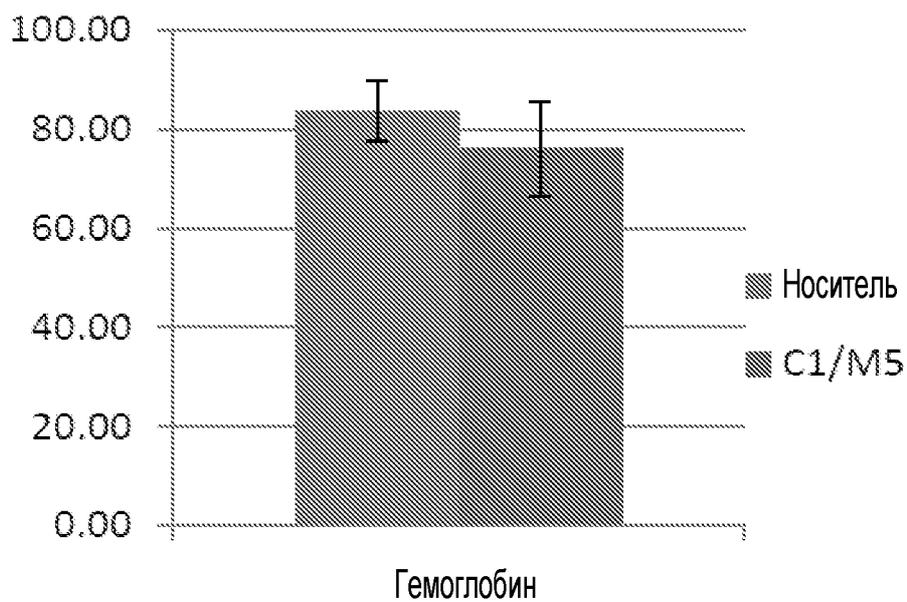
ФИГ. 8



ФИГ. 9



ФИГ. 10А



ФИГ. 10В

