

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037145**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.02.11

(21) Номер заявки
201890019

(22) Дата подачи заявки
2016.06.10

(51) Int. Cl. **A61K 31/727** (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)

(54) ПРИМЕНЕНИЕ ГЕПАРИНА, ОБЕДНЁННОГО ПЕНТАСАХАРИДАМИ, ДЛЯ ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ НЕДОСТАТОЧНОСТИ ТРАНСПЛАНТАТА У РЕЦИПИЕНТА

(31) **15171710.5**

(32) **2015.06.11**

(33) **EP**

(43) **2018.05.31**

(86) **PCT/EP2016/063264**

(87) **WO 2016/198578 2016.12.15**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЮНИВЕРСИТЕЙТ МААСТРИХТ;
АКАДЕМИС ЗИКЕНХЕЙС
МААСТРИХТ (NL)**

(72) Изобретатель:
**Хёри Ван Лодевейк Виллем Эрнест,
Николас Герард Анна Франсискус,
Рётелингспергер Христиан Петер
Мария, Смален Ван Тим Христиан
(NL)**

(74) Представитель:
Агуреев А.П., Фелицына С.Б. (RU)

(56) LODER O. ET AL.: "Suppression of Experimental Autoimmune Diseases and Prolongation of Allgraft Survival by Treatment of Animals with Low Doses of Heparins", JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, AMERICAN SOCIETY FOR CLINICAL INVESTIGATION, US, vol. 83, no. 3, 1 March 1989 (1989-03-01), pages 752-756, XP008109623, ISSN: 0021-9738, DOI: 10.1172/JCI113953, pages 752, 754-page 755

GRADOWSKA L. ET AL.: "Low dose heparin: efficacious treatment for chronic renal allograft rejection", ARCHIVUM IMMUNOLOGIAE ET THERAPIAE EXPERIMENTALIS, BIRKHAUSER VERLAG AG, CH, vol. 41, no. 2, 1 January 1993 (1993-01-01), pages 133-135, XP008178049, ISSN: 0004-069X, page 134

STEVENS R.B. ET AL.: "Administration of nonanticoagulant heparin inhibits the loss of glycosaminoglycans from xenogeneic cardiac grafts and prolongs graftsurvival", TRANSPLANTATION PROCEEDINGS, ELSEVIER INC, ORLANDO, FL; US, vol. 25, no. 1, 1 February 1993 (1993-02-01), page 382, XP008178048, ISSN: 0041-1345, page 382

EP-A2-0251134

EP-A1-2545924

HOOK M. ET AL.: "Anticoagulant activity of heparin: Separation of high-activity and low-activity heparin species by affinity chromatography on immobilized antithrombin", FEBS LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 66, no. 1, 1 July 1976 (1976-07-01), pages 90-93, XP025599609, ISSN: 0014-5793, DOI:10.1016/0014-5793(76)80592-3 [retrieved on 1976-07-01] page 90

(57) Изобретение относится к применению гепарина, обедненного пентасахаридами, для предотвращения, улучшения или уменьшения недостаточности трансплантата после трансплантации у реципиента, где гепарин, обедненный пентасахаридами, представляет собой гепарин, в котором содержание пентасахаридов снижено по меньшей мере на 50% по сравнению с нефракционированным гепарином.

B1**037145****037145 B1**

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области медицинского лечения, в частности изобретение обеспечивает способ профилактики, облегчения или уменьшения недостаточности трансплантата после трансплантации у реципиента.

Предшествующий уровень техники

Трансплантация является сложной медицинской методикой, которая обеспечивает пересадку органов от донора реципиенту, чьи органы неспособны функционировать в достаточной степени, повышая качество жизни реципиента, увеличивая вероятную продолжительность жизни и спасая жизнь.

Недостаточность трансплантата является одной из наибольших проблем трансплантации. После трансплантации органа отмечается неизбежный ответ реципиента и трансплантата. Этот ответ может развиваться в результате травмы, связанной с взятием, перфузией, консервацией органа и с операцией. Этот ответ может также включать специфическое распознавание иммунной системой антигенных различий между донором и реципиентом (1). Взятые вместе, эти механизмы могут развиваться остро или спустя недели, месяцы или даже годы, и приводить к развитию деструктивного ответа, который в конечном итоге приводит к потере трансплантата. Этот процесс также часто называют отторжением трансплантата.

Отторжение трансплантата является результатом многообразия ответов, и начинается с процессов клеточной гибели, которые, если их не остановить, будут возрастать и приведут к недостаточности трансплантата. Травматическое повреждение, приводящее к гибели клеток и вызванное взятием, консервацией и ишемией/реперфузией органа, нельзя полностью предотвратить. Таким образом, необходимы подходящие стратегии лечения для устранения отрицательных эффектов. К сожалению, имеется мало вариантов.

Отторжение является итогом естественного ответа иммунной системы на чужеродную субстанцию, или антиген. Этот сложный процесс опосредован главным образом Т-лимфоцитами, хотя он включает последовательные взаимодействия между чужеродными антигенами, антителами, Т-лимфоцитами, макрофагами, цитокинами (также известными как лимфокины или интерлейкины), молекулами адгезии (т.е. ко-стимулирующими молекулами) и мембранными белками, которые усиливают связывание Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов.

Иммуносупрессивную терапию часто проводят для профилактики и лечения отторжения трансплантата, а также для продления выживания трансплантата и пациента. Однако из-за активности иммуносупрессивных агентов и интер-индивидуальной и интра-индивидуальной вариабельности фармакокинетики, необходима индивидуализация дозы для поддержки адекватной иммуносупрессии при минимизации побочных реакций. Плохая растворимость в воде и биодоступность усложняют применение таких иммуносупрессивных агентов, как циклоспорин и сиролимус. Отторжение трансплантата может быть сверхострым (в течение первых часов после трансплантации или первых дней), вызванным предварительно образованными антителами, острым (в первые дни или месяцы), вызванным Т-лимфоцитами, или хроническим (спустя месяцы или даже годы), вызванным главным образом антителами.

Отмечается постоянный дефицит донорских органов. Это вызывает серьезные проблемы для здоровья, поскольку пациенты из листа ожидания трансплантации органов могут умереть без трансплантации органа. Они представляют тяжелую финансовую нагрузку для системы здравоохранения из-за больших затрат на их лечение (2-10).

Таким образом, необходимы способы повышения уровня эффективности трансплантаций.

Изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение относится к применению гепарина, обедненного пентасахаридами, для предотвращения, улучшения или уменьшения недостаточности трансплантата после трансплантации у реципиента, где гепарин, обедненный пентасахаридами, представляет собой гепарин, в котором содержание пентасахаридов снижено по меньшей мере на 50% по сравнению с нефракционированным гепарином.

Согласно изобретению трансплантат является органом или тканью.

Согласно изобретению орган является кожей, сердцем, печенью, легким, поджелудочной железой, тонкой кишкой или почкой.

Согласно изобретению гепарин, обедненный пентасахаридами, получен с помощью аффинной хроматографии.

Согласно изобретению аффинную хроматографию проводят с применением иммобилизованного антитромбина.

Подробное описание изобретения

Гепарин является смесью полисахаридных цепей (Casu, B. (1989) "Structure of heparin and heparin fragments". Ann. N. Y. Acad. Sci. 556: 1-17 "Структура гепарина и фрагменты гепарина"). Состав полисахаридных цепей и их длина варьирует. Цепи с так называемым пентасахаридным доменом прочно связываются с антитромбином (АТ), который является одним из главных циркулирующих антикоагулянтных белков (Casu, B. et al., Biochem J 197(3) (1981) 599-609).

Гепарин со сниженной антикоагулянтной активностью известен в данной области техники, и имеется несколько способов его получения. Во-первых, из гепарина могут быть удалены его пентасахариды

посредством аффинной хроматографии, с получением не-антикоагулянтного гепарина, или гепарина с пониженной антикоагулянтной активностью. Гепарин может также быть подвергнут химической обработке для получения гепарина со сниженной антикоагулянтной активностью.

Гепарин, обедненный пентасахаридами, может быть получен из нефракционированного гепарина (НФГ) с помощью способов, известных в данной области техники. В предпочтительном способе гепарин, обедненный пентасахаридами, получают посредством аффинной хроматографии. При этом НФГ пропускают через колонку, содержащую иммобилизованный АТ. Молекулы, которые содержат пентасахаридную последовательность, связываются с колонкой, в то время как остальной материал проходит. Несвязанный материал называют низкоаффинным материалом (НАМ), в то время как связавшийся материал называют высокоаффинным материалом (ВАМ). НАМ имеет существенно сниженное содержание пентасахаридов, и следовательно, сниженную антикоагулянтную активность, в то время как ВАМ обладает полной антикоагулянтной активностью.

НАМ может также быть описан как фракция натурального гепарина, обедненная пентасахаридами.

Термин "гепарин, обедненный пентасахаридами" в контексте настоящего изобретения применяется для обозначения фракции гепарина, в которой содержание пентасахаридов существенно снижено, по сравнению с коммерческим гепарином.

Термин "существенно сниженный или уменьшенный", как применяется в настоящей заявке, означает уменьшенный по меньшей мере на 10%, на такое количество, как 20 или 30%, более предпочтительно 40 или 50%, еще более предпочтительно больше чем на 60 или 70 или 80%, на такое количество, как 90%, или больше чем на 98%, на такое количество, как больше чем 99 или даже на 100%. Наиболее предпочтительно фракция, обедненная пентасахаридами, не содержит каких-либо выявляемых пентасахаридов при анализе образования тромбина, как описано Hemker et al. (2003) ниже. В то же время, гепарин со сниженной антикоагулянтной активностью означает гепарин с антикоагулянтной активностью, уменьшенной по меньшей мере на 10%, на такое количество, как 20 или 30%, более предпочтительно на 40 или 50%, еще более предпочтительно больше чем на 60 или 70 или 80%, на такое количество, как 90 или больше чем на 98%, на такое количество, как больше чем 99 или даже на 100%. Наиболее предпочтительно гепарин с уменьшенной антикоагулянтной активностью не содержит какой-либо выявляемой антикоагулянтной активности при анализе образования тромбина, как описано Hemker et al. (2003) ниже.

В разделе, посвященном экспериментам, подробно описано, как можно получить гепарин, обедненный пентасахаридами. В настоящей заявке он называется НАМ, сокращение от "низкоаффинный материал".

Мы установили, что удаление антикоагулянтной фракции гепарина из НФГ позволяет получить гепарин, обедненный пентасахаридами, который нейтрализует цитотоксичность, опосредованную гистонами, и который можно с пользой применять для профилактики недостаточности трансплантатов донорских органов и тканей, таких как сердце, легкие, печень, роговица, кожа, матка, почки, поджелудочная железа и тонкая кишка.

Термин "недостаточность трансплантата", как применяется в настоящей заявке, означает неспособность трансплантированного органа выполнять его нормальную функцию. Это может означать, что трансплантированный орган неспособен выполнять свою функцию полностью или только частично. Недостаточность трансплантата может также означать состояние трансплантированного органа, при котором его функция существенно уменьшена или снижена.

Краткое описание фигур

Фиг. 1 - разделение НФГ на НАМ и ВАМ. Наносили 2 мг НФГ. Этот чертеж демонстрирует оптическую плотность при 254 нм, где первый пик представляет собранный НАМ, а второй пик содержит собранный ВАМ. Второй график представляет электропроводность элюированного материала. НАМ элюировали со скоростью 1 мл/мин, а ВАМ - 4 мл/мин.

Фиг. 2 - антикоагулянтная активность различных гепариновых препаратов. Диаграмма демонстрирует, что десульфирование и удаление пентасахаридов дает гепариновые фракции с уменьшенной антикоагулянтной активностью.

Фиг. 3 - нейтрализация цитотоксичности гистона H3. Диаграмма демонстрирует, что влияние на цитотоксичность гистона H3 снижается для десульфированной фракции гепарина, но полностью сохраняется для гепарина, обедненного пентасахаридами.

Примеры

Пример 1. Подготовка колонки с АТ.

Колонку с АТ готовили в соответствии с упаковочным вкладышем для 5 мл колонки HiTrap (GE Healthcare®). После промывания изопропанолом на колонку наносили примерно 2,5 мг АТ в 5 мл буфера для связывания. Затем применяли описанную процедуру для иммобилизации белка на материале колонки и промывания колонки (в соответствии с упаковочным вкладышем). Наконец, колонку уравнивали 140 mM NaCl, 20 mM Трис (pH 7,4).

Пример 2. Разделение НФГ на НАМ и ВАМ.

На колонку наносили 2 мг нефракционированного гепарина. НАМ элюировали с 140 mM NaCl, 20 mM Трис (pH 7,4), а ВАМ с 2 M NaCl, 20 mM Трис (pH 7,4). Последний буфер наносили в ступенчатом

градиенте. На фиг. 1 показан пример характера элюции.

Для получения большего количества НАМ процедуру, описанную на фиг. 1, повторяли несколько раз.

Чтобы определить отсутствие примесей ВАМ в НАМ, проводили два анализа. Во-первых, собранную ВАМ повторно наносили на колонку с АТ и проводили хроматографию, как описано выше. Не отмечалось пика ВАМ. Во-вторых, определяли влияние НАМ на генерацию тромбина. Реакционная смесь (120 мкл) содержала нормальную плазму из пула в разведении 1,5; 3 мкл НАМ или буфера, 4 мкл DOPC (60% DOPC, 20% DOPC и 20% DOPE), 5 пМ тканевого фактора (Innovin), 100 мМ CaCl_2 и 417 мкМ ZGGR-AMC. Реакцию начинали с CaCl_2 + ZGGR-AMC. Образование тромбина определяли, как описано Hemker, H.C.P. Giesen, et al. (2003) "Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma" *Pathophysiol Haemost Thromb* 33(1): 4-15 ("Калиброванный автоматизированный анализ образования тромбина при коагуляции плазмы"). Генерация тромбина не ингибировалась добавлением 3 мкл ВАМ.

С колонки собирали фракции, содержащие НАМ. Буфер заменяли на аммония бикарбонат (pH 7,8) с помощью среды Сефадекс G-25, и фракции лиофилизировали. Сухой НАМ взвешивали и растворяли в фосфатно-солевом буфере для получения необходимой концентрации.

Пример 3. Профилактика недостаточности трансплантата.

Мы провели наблюдения на модели трансплантата почки, где мы трансплантировали почки мышам. Мы определили условия, при которых для трансплантируемых почек имелась повышенная вероятность недостаточности, а затем проводили эксперимент, где 30 мышам вводили от 0,1 до 10 мг НАМ на мышь на инъекцию. Подходящая контрольная группа мышей не получала какого-либо лечения, другая контрольная группа получала сопоставимые количества ВАМ или натурального гепарина.

Отмечалось, что группа, получавшая НАМ, имела сниженную частоту недостаточности трансплантата.

Пример 4. Антикоагулянтная активность различных гепариновых препаратов.

Нефракционированный гепарин (НФГ) был обеднен пентасахаридами посредством аффинной хроматографии на колонке с иммобилизованным антитромбином. Не связавшаяся с колонкой фракция содержала гепарин, обедненный пентасахаридами (НАМ).

Нефракционированный гепарин десульфировали в соответствии со способом, описанным Yuko Inoue and Kinzo Nagasawa, *Carbohydrate Research* (1976) 46: 87-95.

Десульфированный гепарин (ДС), НФГ и НАМ тестировали в анализе эндогенного тромбинового потенциала (ЭТП) для определения их антикоагулянтной активности (фиг. 2). Мы пришли к выводу, что десульфирование так же, как и удаление пентасахаридов почти полностью устраняет антикоагулянтную активность НФГ, по меньшей мере, до степени ниже 10% от исходной активности НФГ.

Пример 5. Нейтрализация цитотоксичности гистона H3.

ДС, НФГ и НАМ тестировали в анализе цитотоксичности гистона H3, как описано Wildhagen et al. (*Blood* 2014; 123:1098-1101), для определения их защитной активности против цитотоксичности гистона H3 (фиг. 3). Отмечалось, что защитный эффект против цитотоксичности гистона H3 сохранялся во фракции НАМ (100% от активности нефракционированного гепарина (фиг. 3), в то время как десульфированный гепарин показал значительное снижение (более 50%) защитного эффекта по сравнению с нефракционированным гепарином. Мы пришли к выводу, что НФГ и НАМ нейтрализуют цитотоксическую активность гистона H3 в одинаковой степени, в то время как десульфирование гепарина (ДС) приводит к потере способности к нейтрализации цитотоксической активности гистона H3.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

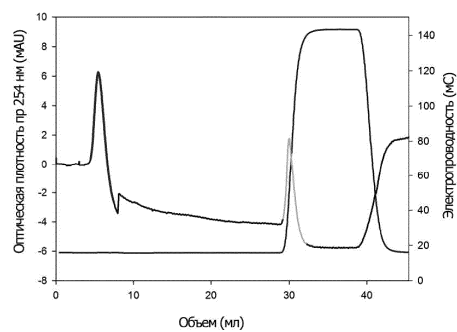
1. Применение гепарина, обедненного пентасахаридами, для предотвращения, улучшения или уменьшения недостаточности трансплантата после трансплантации у реципиента, где гепарин, обедненный пентасахаридами, представляет собой гепарин, в котором содержание пентасахаридов снижено по меньшей мере на 50% по сравнению с нефракционированным гепарином.

2. Применение по п.1, где трансплантат является органом или тканью.

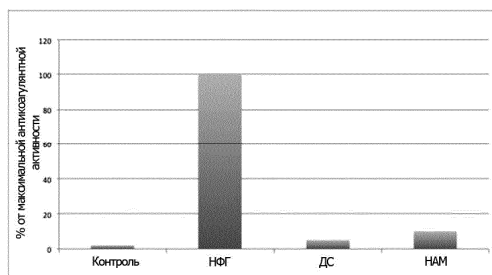
3. Применение по п.2, где орган является кожей, сердцем, печенью, легким, поджелудочной железой, тонкой кишкой или почкой.

4. Применение по любому из пп.1-3, где гепарин, обедненный пентасахаридами, получен с помощью аффинной хроматографии.

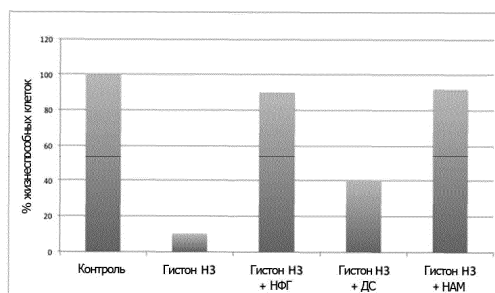
5. Применение по п.4, где аффинную хроматографию проводят с применением иммобилизованного антитромбина.



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3

