(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202292432 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.12.07

(22) Дата подачи заявки
2021.03.05

(51) Int. Cl. ***A61K 38/46*** (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01)
C12N 9/14 (2006.01)
A61P 7/02 (2006.01)
A61P 7/04 (2006.01)

(54) СИНЕРГЕТИЧЕСКИЕ И ОБЕСПЕЧИВАЮЩИЕ НАЦЕЛИВАНИЕ КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ АРТЕРИАЛЬНЫХ И ВЕНОЗНЫХ ТРОМБОЗОВ

(31) **62/986,006**
(32) **2020.03.06**
(33) **US**
(86) **PCT/EP2021/055558**
(87) **WO 2021/176038 2021.09.10**

(71) Заявитель:
АСТРАЗЕНЕКА АБ (SE)

(72) Изобретатель:
Чэнь Жидун, Чон Сун Сок (US)

(74) Представитель:
Поликарпов А.В., Соколова М.В., Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В., Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)

(57) Комбинации апиразы и аннексина, в том числе слитые белки на их основе, представляют собой синергетические антитромботические средства, которые не вызывают нежелательных кровотечений.

202292432 A1

202292432 A1

СИНЕРГЕТИЧЕСКИЕ И ОБЕСПЕЧИВАЮЩИЕ НАЦЕЛИВАНИЕ КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ АРТЕРИАЛЬНЫХ И ВЕНОЗНЫХ ТРОМБОЗОВ

Область техники, к которой относится изобретение

[0001] Настоящее изобретение относится к области лечения состояний, характеризующихся нежелательным тромбозом, таких как сердечный приступ, инсульт и осложнения вследствие хирургической операции, при которых кровотечение должно быть сведено к минимуму. В частности, оно направлено на введение факторов, которые связывают фосфатидилсерин на поверхности активированных тромбоцитов, конкурируя с протромбиназным комплексом, совместно с апиразой для предупреждения или лечения тромбоза.

Предшествующий уровень техники

[0002] Соответствующие состояния, которые подвергают лечению посредством способа по настоящему изобретению, представляют собой как артериальный, так и венозный тромбоз.

[0003] В случае артериального тромбоза рутинно используется высокая концентрация нефракционированного гепарина для предупреждения периоперационной коагуляции у пациентов, подвергаемых хирургической операции, представляющей собой аортокоронарное шунтирование (CABG). Несмотря на применение нейтрализации протамином, лечение с помощью гепарина увеличивает послеоперационное кровотечение, и примерно 30 процентам пациентов требуется переливание крови после CABG. Другая антитромботическая терапия также значительно увеличивает риск послеоперационного кровотечения. Клопидогрел (торговая марка: Plavix), прасугрел (торговая марка: Effient), тикагрелор (торговая марка: Brilinta) и ибупрофен обычно отменяют за несколько дней до хирургической операции на коронарных артериях. Пациентам, принимающим варфарин (торговая марка: Coumadin), апиксабан (торговая марка: Eliquis), ривароксабан (торговая марка: Xarelto), эдоксабан (торговая марка: Savaysa) или дабигатран (торговая марка: Pradaxa), следует прекратить их прием перед хирургической операцией. Таким образом, крайне необходимым является антитромботическое средство лечения, не вызывающее пери- или послеоперационных кровотечений.

[0004] Современная дополнительная антитромботическая терапия в ходе чрескожного коронарного вмешательства (PCI), ранее известная как ангиопластика с использованием стента, также увеличивает массивное кровотечение. Ишемическую болезнь сердца можно диагностировать по наличию острого инфаркта миокарда с подъемом сегмента ST (STEMI) на электрокардиограмме. Тромбоциты играют центральную роль в тромботических

осложнениях (Heit, JA, *J Thromb Haemost* (2005) 3:1611-1617). Лечение такого состояния направлено на восстановление нормального коронарного кровотока и максимальное сохранение функционального миокарда.

[0005] Современные руководства США и Европы рекомендуют первичное PCI наряду с дополнительной терапией, которая включает двойные антитромбоцитарные средства плюс антикоагулянт. Однако доступные в настоящее время средства с антитромбоцитарной активностью характеризуются отсроченным началом действия у приблизительно 40-50% пациентов со STEMI (Riteau, N., et al., *Am J Respir Crit Care Med* (2010) 182:774-783), и все комбинации имеют механизмы действия, которые усиливают кровотечение. В недавнем клиническом исследовании у 11-12% пациентов наблюдалось массивное кровотечение (Ufer, M., *Thromb Haemost* (2010) 103:572-585). Кроме того, ни одно из современных антитромботических средств (т. е. комбинации антитромбоцитарных и антикоагулянтных средств) не защищает от реперфузионного повреждения, которое определяется как инфаркт миокарда, связанный с восстановлением коронарного кровотока после ишемии. Реперфузионное повреждение обуславливает вплоть до 50% конечного размера затронутой инфарктом миокарда области и вызывает сопутствующие сердечные дисфункции. Это может объяснить, почему, несмотря на оптимальную коронарную реперфузию, уровень смертности после AMI достигает 10%, а частота развития сердечной недостаточности составляет почти 25% (Heit, JA, *J Thromb Haemost* (2005) 3:16 11-1617; Spyropoulos, AC, et al., *J Manag Care Pharm* (2007) 13:475-486; Marcus, AJ, et al., *Semin Thromb Hemost* (2005) 31:234-246).

[0006] Таким образом, давно ощущается неудовлетворенная медицинская потребность в быстродействующих терапевтических средствах в качестве дополнения к PCI, которые будут способствовать реперфузии без увеличения кровотечения, а также ослабят реперфузионное повреждение, что улучшит спасение миокарда и восстановление функции левого желудочка, обеспечивая таким образом снижение частоты развития сердечной недостаточности.

[0007] Устройство поддержки левого желудочка (LVAD) представляет собой насос, который применяется для пациентов, достигших терминальной стадии сердечной недостаточности. LVAD представляет собой механический насос с батарейным питанием, имплантированный хирургическим путем, который затем помогает левому желудочку (главной насосной камере сердца) перекачивать кровь к остальным частям тела. LVAD можно использовать до тех пор, пока не станет доступным сердце, или пациенты могут получать длительное лечение с применением LVAD, которое может продлить и улучшить жизнь пациентов. Несмотря на значительное улучшение выживаемости, функциональных

возможностей и качества жизни, частыми осложнениями являются обусловленные помпой тромбоз, инсульт и кровотечение. Поскольку все современные антитромботические лекарственные средства повышают риск кровотечения, достижение оптимальной антитромботической терапии, обеспечивающей баланс между предупреждением тромбоза и усилением кровотечения, остается сложной задачей.

[0008] Текущие клинические рекомендации предполагают прекращение антитромботической терапии перед хирургической операцией у пациентов, получающих длительную антитромботическую терапию, которые подвергаются хирургической операции, поскольку такие лекарственные средства повышают риск чрезмерного кровотечения. Например, предусматривают прекращение приема аспирина незадолго до хирургической операции у пациентов, которым требуется CABG; прекращение введения нефракционированного гепарина за 4-6 часов до хирургической операции у пациентов, прием последней дозы низкомолекулярного гепарина за 24 часа до хирургической операции у пациентов. Однако прекращение использования таких антитромботических средств лечения также увеличивает риск периоперационного тромбоза, такого как легочная эмболия, которая может характеризоваться высоким уровнем летальности. В настоящее время не существует антитромботического средства лечения, которое можно было бы безопасно применять в периоперационном ведении.

[0009] Сходные недостатки обнаруживаются в отношении лечения антикоагулянтами при венозной тромбоэмболии, поскольку это лечение сопровождается учащением случаев массивного кровотечения и обеспечивает минимальную защиту от утолщения или фиброза венозной стенки. Венозная тромбоэмболия, в том числе тромбоз глубоких вен (DVT) и легочная эмболия (PE), является основным источником заболеваемости и смертности во всем мире.

[0010] Текущая профилактика и лечение DVT предусматривают введение парентерального антикоагулянта, например гепарина, с последующим переходом на активный при пероральном приеме антикоагулянт, такой как варфарин (Heit, JA, *J Thromb Haemost* (2005) 3:1611-1617; Kyrle, PA, et al., *Lancet* (2005) 365:1163-1174). Применяли и другие средства, например ривароксабан был одобрен как для кратковременного, так и для длительного лечения (Perzborn, E., et al., *Nature Rev. Drug Discovery* (2011) 10:61-75; Ufer, M., *Thromb Haemost* (2010) 103:572-585), но все они имеют механизмы действия, обуславливающие кровотечение, что ограничивает дозу, которую можно вводить. Кроме того, современные виды лечения не обеспечивают эффективной защиты от посттромботического синдрома (PTS), который характеризуется рефлюксом крови, вызванным нарушенным функционированием венозных клапанов, обструкцией перетока и

тканевой гипоксией, вторичной по отношению к утолщению и фиброзу венозной стенки (Popuri, RK, et al., *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2011) 31: 479-484; Saarinen, J., et al., *J Cardiovasc Surg* (2000) 41:441-446; Deatrick, KB, et al., *J Vasc Surg* 2011 53:139-146).

[0011] Влияние DVT усиливается с ростом стареющего населения. В 2005 году Сенат США объявил март "Месяцем осведомленности о тромбозе глубоких вен". Ясно, что бремя DVT для здоровья и экономики является значительным, и пациенты с DVT получат большую пользу от эффективного антитромботического средства, которое не ограничено тем, что оно обуславливает повышенный риск кровотечения, а также способно ослаблять PTS.

[0012] Как описано ниже, композиции и способы по настоящему изобретению также предлагают решение этой неудовлетворенной медицинской потребности.

[0013] Применение апираз, в частности растворимой формы CD39L3 и его модификаций, для лечения состояний, связанных с тромбозом, раскрыто в US 7247300; US 7390485 и US 8021866. Применение апираз в качестве средства терапии при состояниях, обусловленных кровотечением, описано в US 8535622, а усиленная форма апиразы на основе растворимой формы CD39L3 раскрыта в US 8771683. Кроме того, терапия апиразой, проводимая в отношении фибропролиферативных заболеваний, легочной гипертензии и сердечной недостаточности раскрыта в US 14/666121, в настоящее время находящейся на рассмотрении.

[0014] Белок, который, как известно, связывает фосфатидилсерин на поверхности активированных тромбоцитов, конкурируя с протромбиназным комплексом за связывание, представляющий собой аннексин V, как полагают, ассоциирован с предупреждением и лечением тромбоза в связи с демонстрацией того, что антитела, являющиеся реактивными по отношению к аннексину V, оказывают влияние на артериальный и/или венозный тромбоз, например, у пациентов с системной красной волчанкой (Esposito, G., et al., *Autoimmunity Rev* (2005) 4:55-60). Действительно, хотя в настоящее время аннексин V главным образом используется в качестве метки для обнаружения апоптоза, понятно, что аннексин V подавляет активацию протромбина и способен предупреждать образование тромбов в условиях нормального венозного и артериального кровотока. Было показано, что антитела, являющиеся реактивными по отношению к аннексину V, приводят к тромботическим осложнениям у пациентов с диабетом 1 типа. (Bakar, F., et al., *J Clin Endocrinol Metab* (2014) 99:932-937).

[0015] В настоящее время обнаружено, что аннексин V или другие аннексины, которые связывают фосфатидилсерин на поверхности активированных тромбоцитов, и апираза при введении в комбинации как таковые или при введении в виде одного слитого белка

проявляют синергетический антитромботический эффект и не усиливают нежелательное кровотечение.

[0016] Таким образом, такая комбинация представляет собой решение проблем, связанных в настоящее время с лечением как артериальных, так и венозных тромбозов. Также было обнаружено, что определенные варианты аннексина V, связанного с апиразой в виде слитого белка, проявляют благоприятные свойства в отношении рекомбинантного получения.

[0017] Все документы, цитируемые в данном документе, включены посредством ссылки во всей своей полноте.

Раскрытие изобретения

[0018] В одном аспекте настоящее изобретение направлено на композицию, содержащую апиразу и аннексин, который связывает фосфатидилсерин (PS) на поверхности активированных тромбоцитов; при этом указанные апиразу и аннексин вводят в количествах, которые в совокупности эффективны для обеспечения подавления тромбоза без усиления кровотечения.

[0019] Комбинацию аннексина и апиразы также можно вводить в виде одной молекулы, где апираза и аннексин ковалентно связаны.

[0020] Что касается простоты получения такой ковалентно связанной комбинации, то преимущественно, чтобы апираза и аннексин были ковалентно связаны посредством линкерного пептида с образованием слитого белка, особенно, где линкерный пептид устойчив к гидролизу в плазме крови и/или в надосадочной жидкости культуры клеток.

[0021] Настоящее изобретение также направлено на рекомбинантное получение ковалентно-связанной формы апиразы и аннексина, в том числе материалы, связанные с таким рекомбинантным получением, а также на способы лечения субъекта, страдающего тромбозом или подверженного риску его развития, с применением композиций по настоящему изобретению.

Краткое описание графических материалов

[0022] На фиг. 1A и 1B показан эффект апиразы APT102, используемой как таковая, и слитого белка на ее основе, представляющего собой APT402, в отношении агрегации тромбоцитов в реакционной смеси *ex vivo*, содержащей богатую тромбоцитами плазму крови человека (PRP), активированную посредством 20 мкМ АДФ. Показана сравнимая эффективность подавления АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов человека с помощью APT102 по сравнению с APT402. На оси X отображено время анализа (длительность 6 мин), на оси Y отображено светопропускание. (A) APT102 дозозависимым образом подавляет агрегацию тромбоцитов, индуцированную 5 мМ АДФ. (B) APT402

дозозависимым образом подавляет агрегацию тромбоцитов, индуцированную 5 мМ АДФ. Стрелки указывают на процедуры добавления АДФ и апиразы.

[0023] На фиг. 2 показана активность по подавлению активации фактора X для APT402 по сравнению с аннексином в PBMC. Показана сравнимая эффективность подавления индуцированной LPS прокоагуляционной активности при использовании APT402 по сравнению с таковой при использовании аннексина V. Мононуклеарные клетки периферической крови инкубировали с LPS (1 мг/мл) для индукции экспрессии тканевого фактора и активации FX, измеренной в присутствии FVII, FX и хромогенного субстрата S2765.

[0024] На фиг. 3 показаны синергетические эффекты аннексина V и APT102 в отношении ослабления образования тромбина. Показаны тромбограммы наномолярного тромбина, которые получали для богатой тромбоцитами плазмы крови человека, активированной 20 мМ АДФ. Обработка с помощью APT402 или APT102 плюс аннексин V демонстрирует сопоставимые подавляющие эффекты. Эти результаты превосходят результаты, полученные с применением APT102 или аннексина V отдельно.

[0025] На фиг. 4 показан PK-анализ APT402 у кроликов (n=2) для вводимой i.v. болюсной инъекции в дозе 0,4 мг/кг.

[0026] На фиг. 5 показан PK-анализ (ELISA) APT402 при болюсной инъекции в дозе 0,2 мг/кг с последующей непрерывной IV инфузией в течение 120 мин у кроликов.

[0027] На фиг. 6 показано подавление АДФ-индуцированной (50 мкМ) агрегации тромбоцитов в богатой тромбоцитами плазме крови кролика с помощью APT402 в дозе 0,2 мг/кг болюсно с последующим введением 24 мкг/кг/мин в течение 120 мин. Агрегация эффективно подавлялась через 60 и 110 мин и возвращалась к исходному уровню через 180 мин.

[0028] На фиг. 7 показано ослабление образования тромбина с помощью APT402 при болюсной дозе 0,2 мг/кг с последующей инфузией 24 мкг/кг/мин в течение 120 мин у кроликов. Образование тромбина эффективно уменьшалось через 60 и 110 мин, но возвращалось к исходному уровню через 180 мин.

[0029] На фиг. 8A-C показано, что APT402 предпочтительно локализуется в тромботических участках поврежденных артерий. A. APT402 конъюгировали с флуоресцентным красителем (LS288); B. Интенсивность флуоресценции в поврежденной артерии кролика, получавшего обработку с помощью APT402 в дозе 0,2 мг/кг болюсно, а затем 12 мг/кг/мин в течение 120 мин. Каждая полоса представляет собой среднее значение для 3 считываний. C. APT402 предпочтительно связывается с тромбами.

[0030] На фиг. 9 показана частота окклюзии в контрольной группе и в различных группах обработки в модели повреждения электрическим током (EIM) у кроликов. Обработка с помощью APT402 в дозе 12 или 24 мкг/кг/мин полностью предупреждало окклюзию.

[0031] На фиг. 10 показан вес артериального тромба (мг) в контрольной группе и различных группах обработки в EIM у кроликов. Обработка с помощью APT402 в дозе 24 мкг/кг/мин была более эффективной, чем любая другая обработка, отдельно или в комбинации.

[0032] На фиг. 11 показано, что APT402 не увеличивает длительность кровотечения (BT) в дозах, которые обеспечивают полное предупреждение окклюзии (предел измерения BT: 5 мин), в то время как клопидогрел, LMWH, бивалирудин и тикагрелор, отдельно или в комбинации с бивалирудином, увеличивают длительность кровотечения.

[0033] На фиг. 12 показано, что APT402 в эффективных дозах не влияет на протромбиновое время у кроликов, в то время как бивалирудин отдельно или в комбинации с тикагрелором увеличивал протромбиновое время.

[0034] На фиг. 13 показано, что APT402 в эффективных дозах не влияет на частичное тромбопластиновое время у кроликов, в то время как LMWH, бивалирудин, тикагрелор, отдельно или в комбинации с бивалирудином, увеличивали частичное тромбопластиновое время.

[0035] На фиг. 14 показано, что APT402 не влияет на среднее артериальное давление (миллиметры ртутного столба; мм рт. ст.).

[0036] На фиг. 15 показано, что APT402 не влияет на частоту сердечных сокращений (ударов в минуту; BPM).

[0037] На фиг. 16A-D показаны эффекты APT402 в отношении последствий EIM при тромбозе глубоких вен (DVT).

[0038] На фиг. 17 показан эффект APT402 в отношении отложения коллагена при уменьшении EIM-опосредованного DVT.

Способы осуществления настоящего изобретения

[0039] В настоящем изобретении используется преимущество неожиданного синергетического комбинированного действия антитромбоцитарных и антикоагулянтных белков, представленных апиразой и аннексином, для предупреждения или лечения как артериального, так и венозного тромбозов. Комбинация обеспечивает решение проблем, связанных с коммерчески доступными антитромботическими средствами, и, в частности, характеризуется более благоприятным профилем в отношении предотвращения усиленного кровотечения по сравнению с такими коммерчески доступными антитромботическими

средствами. Кроме того, настоящее изобретение включает уникальные слитые белки, где апираза и аннексин связаны дополнительной аминокислотной последовательностью. В случае получения в виде слитого белка, настоящее изобретение включает его преимущественные формы с точки зрения уровней их экспрессии при рекомбинантном получении и с точки зрения их устойчивости к протеолизу как в культуре рекомбинантных клеток, так и в плазме крови. Эти особенности, по-видимому, зависят от линкера, расположенного между компонентом, представленным аннексином, и компонентом, представленным апиразой.

Компоненты

[0040] Как правило, можно использовать любую апиразу, которая подавляет активацию и агрегацию тромбоцитов. Обсуждение таких апираз можно найти в US 7390485. Некоторые мутантные варианты растворимых форм CD39L3 являются особенно применимыми.

[0041] Особенно применимой формой апиразы является растворимая форма CD39L3, последовательность которой раскрыта в US 7390485. Полноразмерный CD39L3 и его выведенная аминокислотная последовательность представлены под SEQ ID NO: 55 и SEQ ID NO: 56 соответственно. В этом патенте также раскрыты растворимая форма и последовательность кодирующих нуклеотидов под SEQ ID NO: 59, а также выведенная аминокислотная последовательность под SEQ ID NO: 60 соответственно.

[0042] В патенте ‘485 также описывается сайт-направленный мутагенез как растворимой формы CD39, так и растворимой формы CD39L3. Особенно применимыми в настоящем изобретении являются мутантные формы растворимой формы CD39L3, где мутированы аминокислоты в положениях 67 и 69. Двумя из этих мутантных вариантов растворимой формы CD39L3 являются R67A T69R и R67G T69R. Растворимая форма R67G T69R CD39L3 является особенно предпочтительным двойным мутантом. “Улучшенная” форма этой последовательности раскрыта в US 8771683, а соответствующие нуклеотидные и аминокислотные последовательности воспроизведены в данном документе под SEQ ID NO:1 и 2 соответственно. Этот вариант осуществления обозначен как APT102.

[0043] Компонентом, представленным аннексином, применимым в настоящем изобретении, является аннексин V, который связывает фосфатидилсерин на активированных тромбоцитах. Аннексины являются представителями большого семейства белков со сходными структурами, но с различными видами физиологической активности. Любой аннексин, который проявляет вышеупомянутое свойство аннексина V, может применяться в настоящем изобретении. Структуры этих аннексинов, включая нативные или оптимизированные нуклеотидные последовательности, кодирующие их, известны из

уровня техники. В некоторых вариантах осуществления выбранный аннексин будет относиться к тому же виду, что и субъект лечения.

Получение компонентов по настоящему изобретению

[0044] В целом, компоненты, применимые в настоящем изобретении, целесообразно получать с применением рекомбинантных технологий. Это особенно относится к вариантам осуществления, где апираза и аннексин связаны ковалентно. Рекомбинантные методики для таких белков в настоящее время хорошо известны из уровня техники, и рекомбинантное получение может быть осуществлено в ряде различных клеток и условий, в том числе клетках животных, растений и микроорганизмов, находящихся в культуре, а также в качестве местоположения *in situ* в многоклеточных организмах. Таким образом, настоящее изобретение включает рекомбинантные материалы для получения этих компонентов, как например системы экспрессии с подходящими последовательностями для контроля, векторы, клетки-хозяева, несущие их, и т. п.

Введение композиций по настоящему изобретению *in vivo*

[0045] Композиции по настоящему изобретению можно вводить теплокровным животным, в том числе человеку и другим млекопитающим, а также видам домашней птицы. Например, это могут быть животные-компаньоны или сельскохозяйственные животные. Для лечения болезней человека квалифицированный врач определит, каким образом следует применять композиции по настоящему изобретению с точки зрения дозы, графика и пути введения с применением установленных протоколов. Аналогичную функцию выполняет ветеринар в отношении других видов. В таких областях применения также может использоваться повышение дозы.

[0046] Предпочтительно фармацевтические композиции по настоящему изобретению вводят парентерально, т. е. внутриартериально, внутривенно, внутрибрюшинно, подкожно или внутримышечно. Более предпочтительно фармацевтические композиции вводят внутривенно или внутрибрюшинно путем болюсной или инфузионной инъекции.

[0047] Фармацевтические композиции по настоящему изобретению получают в соответствии со стандартными методиками и могут содержать воду, забуференную воду, физиологический раствор, глицин, декстрозу, изоосмотические растворы сахарозы и т. п., в том числе гликопротеины для повышения стабильности, такие как альбумин, липопротеин, глобулин и т. п. Эти композиции можно стерилизовать с помощью традиционных хорошо известных методик стерилизации. Полученные водные растворы могут быть упакованы для применения или отфильтрованы в асептических условиях и лиофилизированы, при этом перед введением лиофилизированный препарат объединяют со стерильным водным раствором. Композиции могут содержать фармацевтически

приемлемые вспомогательные вещества, необходимые для того, чтобы приблизительно соответствовать физиологическим условиям, как например средства для регулирования уровня pH и буферные средства, средства для регулирования тоничности и т. п., например, ацетат натрия, лактат натрия, хлорид натрия, хлорид калия, хлорид кальция и т. п.

[0048] Концентрация компонентов по настоящему изобретению в фармацевтических составах может варьироваться в широких пределах, как например от менее чем приблизительно 0,05%, обычно составляя или составляя по меньшей мере приблизительно 2-5%, вплоть до 10-30% по весу, и будет выбрана в первую очередь по значениям объема, вязкости жидкости и т. п. в соответствии с выбранным конкретным способом введения. Например, концентрация может быть увеличена для снижения жидкостной нагрузки, связанной с лечением.

[0049] Предпочтительно фармацевтические композиции по настоящему изобретению вводят внутривенно. Дозировка составов со средой-носителем для доставки будет зависеть от соотношения лекарственного средства и липидов и мнения лечащего врача, основанного на возрасте, весе и состоянии пациента. Один предпочтительный протокол предусматривает болюсное IV введение с последующей продолжительной IV инфузией.

[0050] В дополнение к фармацевтическим композициям можно получить подходящие составы для ветеринарного применения и вводить их способом, подходящим для субъекта. Предпочтительные ветеринарные субъекты включают виды млекопитающих, например, отличные от человека приматы, собаки, кошки, крупный рогатый скот, лошади, овцы и домашнюю птицу. Субъекты также могут включать лабораторных животных, например, в частности, крыс, кроликов, мышей и морских свинок.

Показания

[0051] Композиции по настоящему изобретению применимы у субъектов, у которых тромбоз подлежит лечению или предупреждению, не вызывая чрезмерного кровотечения. К этому относятся, помимо прочего, хирургическая операция, например, торакальная хирургия, в том числе CABG, и обширная хирургическая операция с высоким риском тромбообразования или хирургическая операция или медицинские исследования, при которых антитромботическое лечение применяется как профилактика коагуляции на постоянных катетерах или местах установки устройств (например, электрофизиологические исследования, имплантация кардиостимулятора, чрескожная установка или пластика сердечного клапана). Субъекты, подлежащие лечению с помощью композиций по настоящему изобретению, также включают субъектов с инфарктом миокарда, в том числе STEMI, подвергающихся реваскуляризационному/реперфузионному лечению посредством PCI или тромболизиса, и субъектов со стабильной или нестабильной

ишемической болезнью сердца, подвергающихся коронарной реваскуляризации посредством PCI. Подходящими субъектами являются таковые с заболеванием периферических сосудов, подвергающиеся реваскуляризации путем пластики периферических сосудов или внутрипросветной баллонной ангиопластики со стентированием или без него, а также субъекты, получающие длительную антитромботическую терапию, в том числе таковые с фибрилляцией предсердий и получающие лечение/профилактику венозной тромбоэмболии (VTE), и, следовательно, с высоким риском тромботических осложнений, в качестве промежуточной стратегии/периоперационного ведения во время голодания и хирургических процедур, когда субъекты не могут переносить пероральное антитромботическое лечение.

[0052] Композиции также применимы в качестве средства профилактики или лечения VTE, включая тромбоз глубоких вен и легочную эмболию, в том числе профилактического лечения, связанного с ортопедической хирургией, и лечения переломов, а также в отношении иммобилизованных субъектов, субъектов с острыми или хроническими заболеваниями (включая рак), а также подверженных высокому риску тромбоза. Кроме того, композиции по настоящему изобретению применяют для лечения субъектов с гепарин-индуцированной тромбоцитопенией (HIT) и субъектов с острым ишемическим инсультом, которым требуется дополнительное антитромботическое лечение, добавленное к стандартному лечению, в том числе до, во время или после возможного реперфузионного лечения (но также когда реперфузионное лечение не применялось), а также при лечении или во время процедур легочной ангиопластики у субъектов с хронической тромбоэмболической легочной болезнью/гипертензией (CTEPH).

[0053] Инсульт определяется как потеря неврологической функции ввиду ишемии головного мозга или внутричерепных кровоизлияний, при этом показания к применению включают без ограничения предупреждение разрушения тканей и улучшение неврологической функции и исхода в отношении острого ишемического инсульта; ишемический инсульт с окклюзией крупных и/или мелких сосудов в сочетании с реперфузией путем тромболизиса или тромбэктомии; эмболический инсульт; а также предупреждение повторного инсульта у пациентов с острыми церебральными транзиторными ишемическими атаками с высоким риском инсульта.

Наборы

[0054] Апиразы и аннексин, применяемые в композициях по настоящему изобретению, могут быть составлены по отдельности в отдельных композициях или в одной и той же композиции или могут быть ковалентно связаны. Отдельные композиции можно раздельно вводить субъектам одновременно или последовательно. Компоненты наборов, которые

предусматривают в отдельных контейнерах первую композицию в первом контейнере, содержащую апиразу, и вторую композицию, содержащую подходящий аннексин, во втором контейнере, затем можно упаковывать с получением набора.

[0055] Набор также будет содержать инструкции относительно способа введения композиций субъекту, содержащие по меньшей мере описание соотношения количеств каждой подлежащей введению композиции. В одном варианте осуществления вводят эквимолярные количества. Однако молярное соотношение апиразы и аннексина будет зависеть от вариантов выбора, сделанного в отношении этих компонентов, и может варьироваться от 10:1 до 1:10 для апиразы:аннексина. В качестве альтернативы или в дополнение набор сконструирован таким образом, что значения количества композиций в каждом контейнере предварительно измеряются, так что содержимое одного контейнера в комбинации с содержимым другого представлено при соответствующем соотношении. В качестве альтернативы или в дополнение контейнеры могут быть маркированы измерительной шкалой, позволяющей распределять соответствующие количества в соответствии с видимыми шкалами. Контейнеры сами по себе могут использоваться при введении; например, набор может содержать соответствующие количества каждой композиции в отдельных шприцах. Композиции, которые предусматривают заранее составленное соответствующее соотношение терапевтических средств, также могут быть упакованы таким образом, чтобы композиция вводилась непосредственно из шприца, предварительно упакованного в наборе.

[0056] Если не указано иное, все специальные термины, обозначения и другие научные термины или терминология, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области техники, к которой относится данное изобретение. В некоторых случаях термины с общепринятыми значениями определены в данном документе для ясности и/или для использования в качестве справочного материала, и включение таких определений в данный документ не обязательно должно толковаться как то, что они представляют существенное отличие от того, что обычно понимается под ними в данной области техники. Многие из методик и процедур, описанных или упомянутых в данном документе, хорошо изучены и широко используются специалистами в данной области с применением традиционной методологии. При необходимости процедуры, предусматривающие применение имеющихся в продаже наборов и реагентов, как правило, проводят в соответствии с установленными производителем протоколами и/или параметрами, если не указано иное. Все патенты, заявки, опубликованные заявки и другие публикации, упомянутые в данном документе, включены посредством ссылки во всей своей полноте. Если определение, изложенное в

этом разделе, противоречит или иным образом несовместимо с определением, изложенным в патентах, заявках, опубликованных заявках и других публикациях, которые включены в данный документ посредством ссылки, то определение, изложенное в этом разделе, имеет преимущественную силу над определением, которое включено в данный документ посредством ссылки.

[0057] Используемые в данном документе формы единственного числа означают “по меньшей мере один” или “один или несколько”.

[0058] Следующие примеры приведены с целью иллюстрации, а не для ограничения настоящего изобретения. Более того, нижеприведенные научные обсуждения лежащих в основе механизмов, выявленных на основании данных, также не подразумевают ограничения изобретений, описанных в данном документе.

Сокращения: BT: длительность кровотечения; aPTT: активированное частичное тромбопластиновое время; TCT: тромбиновое время; ACT: активированное время свертывания; PT: протромбиновое время; LMWH: низкомолекулярный гепарин; FX: фактор X; DVT: тромбоз глубоких вен; EIM: модель повреждения электрическим током; IVC: нижняя полая вена.

ПРИМЕР 1

Конструирование слитой конструкции на основе аннексина, апиразы и линкера

[0059] Средство на основе апиразы, используемое в данных примерах, представляет собой средство на основе растворимой формы апиразы, полученное на основе конструкции, кодирующей растворимую форму R67G T69R CD39L3: с гомогенизированным N-концом, как описано в US 8771683, обозначенное как APT102 (SEQ ID NO: 2) в данном документе.

[0060] Нуклеиновую кислоту, кодирующую аннексин V, сливали с C-концом средства на основе апиразы с помощью линкеров различной длины для оптимизации уровней экспрессии и предупреждения разрушения, и получали различные версии с последовательностью, кодирующей последовательность каппа-цепи мышиного IgG, как показано под SEQ ID NO:3 и 4 в данном документе, и осуществляли их встраивание в экспрессионную плазмиду pSecTag2c.

[0061] Клетки HEK 293 стабильно трансформировали линеаризованной экспрессионной плазмидой, которая обеспечивает экспрессию слитых белков на основе апиразы и аннексина V с вариациями линкерной последовательности.

[0062] Трансформанты адаптировали к бессывороточной суспензионной культуре и постоянно разделяли с их размещением в колбах большего размера. Типичную суспензионную культуру инокулировали при концентрации $0,5 \times 10^6$ клеток на мл, и через

5-6 дней количество клеток HEK 293 обычно увеличивалось, составляя более чем $3,5 \times 10^6$ клеток на мл. Клетки разделяли каждые 3-4 дня и собирали слитые белки в кондиционированных средах. Получение продукта слияния апиразы и аннексина V с линкером из 20 а. к. увеличивали до соответствия объему флакона с перемешиванием, составляющему 3 л.

[0063] Белки очищали до гомогенности с применением колонок IMAC, Q и SP. Аминокислотные последовательности различных разработанных линкеров показаны ниже.

>m0 (исходная конструкция: расщепляется протеазой)

GGCTCGACGAGCGGCGGGTCGACAAGTGGTGGATCTACTAGTGGCTCTGGATCCGGAATTGCT

G S T S G G S T S G G S T S G S G S G I A

расщепление |Anx V

>m1 (расщепляется протеазой)

GGCTCGACGAGCGGCGGGTCGACAAGTGGTGGATCTACTAGTGGCTCTGGATCCacAATTGCT

G S T S G G S T S G G S T S G S G S T I A

|Anx V

>m2 (расщепления не обнаружено)

GGCTCGACGAGCGGCGGGTCGACAAGTGGTGGATCTACTAGTGGCTCTGGAgCCacAATTGCT

G S T S G G S T S G G S T S G S G A T I A

|Anx V

>m3 (расщепления не обнаружено)

GGCTCGACGAGCGGCGGGTCGACAAGTGGTGGATCTACTAGTGGCTCTGGAcagacAATTGCT

G S T S G G S T S G G S T S G S G Q T I A

|Anx V

[0064] В случае первоначально сконструированного линкера m0 примерно 50% очищенного белка подвергали разрушению в области линкера посредством активности протеазы, присутствующей в культуральной среде. Дальнейшее исследование показывает, что низкий pH (например, 5,0) ускоряет разрушение по сравнению с pH 7,4. Слитый белок, устойчивый к протеазе, конструировали путем введения замены G на T, как показано для m1, который все еще был подвержен разрушению протеазой, когда pH осветленной надосадочной жидкости снижали до 5 с помощью цитрата натрия. Когда эту мутацию сочетали с заменой серина на аланин или глутамин, как показано для m2 и m3, разрушение сводилось к минимуму.

[0065] Было также показано, что линкер из 20 аминокислот обеспечивал наибольшие преимущества исходя из сравнения уровней экспрессии.

[0066] Уровни экспрессии сравнивали применительно к гибким линкерам из 5, 10, 15 и 20 аминокислотных остатков или жесткому линкеру из 9 аминокислотных остатков.

5AA. GSTSG
10AA. (GSTSG)x2
15AA. (GSTSG)x3
20AA. (GSTSG)x3 SGATI
9AA. PAPAPAPAP

[0067] Белки из осветленных надосадочных жидкостей кондиционированных сред, как описано выше, разделяли посредством электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии SDS. Анализ показывает, что экспрессия слитого белка положительно коррелировала с длиной линкеров, при этом длина 20 а. к. приводит к самому высокому уровню экспрессии. Конструкция с жестким линкером также приводила к более низкому уровню экспрессии по сравнению с вариантом с гибким линкером длиной 20 а. к. Аминокислотная и нуклеотидная последовательности этого линкера длиной 20 а. к. показаны под SEQ ID NO:3.

[0068] Конечная конструкция, использованная в примерах 2-10, имеет нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 7, где сигнальная последовательность кодирует сигнальный пептид бычьего альфа-лактальбумина. Кодируемый продукт слияния апираза-линкер-аннексин V обозначен как APT402.

ПРИМЕР 2

Экспрессия и очистка APT402 из клеток CHO

[0069] Средством на основе апиразы в конструкции для получения слитого белка APT402 является APT102. Продукт слияния апиразы и аннексина V с линкером из 20 а. к., описанный в примере 1, получали в клетках CHO с сигнальной последовательностью сигнального пептида бычьего α-лактальбумина из конструкции, представленной под SEQ ID NO: 7. Как уже отмечалось, белок апираза-линкер-аннексин обозначали как APT402. Линии клеток-продуцентов получали путем проведения четырех циклов трансдукции исходной линии клеток CHO ретровектором, полученным от Catalent (Мэдисон, США), и ретровекторной экспрессионной плазмидой. Объединенную популяцию трансдуцированных клеток назвали пулом CHO-S-APT402-R 4X. Образцы объединенных популяций клеточных линий подвергали криоконсервации.

[0070] Для получения в объеме 10 л пул клеточной линии CHO-S-APT402-R 4X пассировали каждые 3-4 дня во время фазы экспоненциального роста для увеличения масштаба, обеспечивающего получение в биореакторе Braun на 10 л в PFCHO LS (HyClone). Клетки инокулировали при плотности клеток примерно 300000-400000 клеток/мл в среде PFCHO LS (HyClone) в два биореактора на 10 л. Добавками для подпитки, применяемыми

для данного исследования, являлись HyClone PS307 (12% (вес/объем) растворы), полная питательная среда AGT CD CHO 5X Feed Medium Complete (Invitrogen), 20% раствор глюкозы, 200 мМ L-глутамин, 50X раствор L-аспарагина (15 г/л)/L-серина (10 г/л), 50X раствор L-тирозина (4 г/л)/L-цистина (2 г/л).

[0071] Хроматография ANX. Сбор 10LBRX-3380-4Xpool-001 из сосуда на 10 л выполняли в день 12 культивирования. Колонку промывали для уравновешивания 10 мМ Tris-Cl, pH 7,4. Среду, обработанную Triton, разбавляли равным объемом (6,60 л) WFI для получения загружаемого образца ANX. В колонку вносили загружаемый образец (13,2 л). Затем колонку промывали с помощью 10 мМ Tris, 100 мМ NaCl, pH 7,4, и собирали 3 л этой промывочной жидкости. Фракцию APT402 элюировали с помощью 10 мМ Tris, 270 мМ NaCl, pH 7,4 и собирали (2,37 л).

[0072] Хроматография на колонке SP Sepharose. Колонку дезинфицировали с помощью 1 М NaOH в течение более часа, а затем колонку промывали с помощью WFI. Колонку уравновешивали в 10 мМ Tris, 50 мМ NaCl, 20 мМ $CaCl_2$, pH 7,4. Загружаемый образец (элюат ANX + 9,4 л 10 мМ Tris, pH 7,4 + 34,5 г $CaCl_2$, добавленные и перемешиваемые в течение 20 минут, 11,75 л) вносили в колонку и собирали проточную фракцию плюс промывочная жидкость (~12 л). Колонку промывали с помощью 10 мМ Tris, 50 мМ NaCl, pH 7,4, и восстанавливали исходный уровень. Колонку элюировали с помощью 10 мМ Tris, 300 мМ NaCl, pH 7,4, и осуществляли сбор материала, соответствующего пику элюируемого компонента (1,0 л), в виде прозрачного бесцветного раствора.

[0073] Хроматография со смолой Hyper D с гепарином. Колонку промывали с помощью 10 мМ Tris, 1 М NaCl, pH 7,4. Затем колонку уравновешивали в 10 мМ Tris, pH 7,4. В колонку вносили загружаемый образец (SP-пул с заменой буфера, 0,88 л) и собирали проточную фракцию плюс промывочная жидкость (1,40 л). Колонку очищали от оставшегося белка с помощью 10 мМ Tris, 1 М NaCl, pH 7,4, и его тоже собирали (~100 мл). Хроматограмма представлена ниже. Для полученной при использовании смолы с гепарином проточной фракции (1,40 л) осуществляли замену буфера в прерывистом режиме с применением насоса Masterflex и полисульфоновой мембраны Pellicon 10K на 10 мМ Tris, 150 мМ NaCl, pH 7,4. SP-пул концентрировали в ~ 7 раз до 200 мл, разбавляли в ~ 10 раз с помощью 10 мМ Tris, 150 мМ NaCl, pH 7,4, до 2,0 л, снова концентрировали до 200 мл и снова разбавляли в ~ 10 раз до 2,0 л с помощью 10 мМ Tris, 150 мМ NaCl, pH 7,4. После третьей процедуры концентрирования до ~100 мл фильтр промывали с помощью 200 мл 10 мМ Tris, 150 мМ NaCl, pH 7,4, и полученное добавляли к ретентату. Конечный объем концентрата составлял 300 мл, и осуществляли сбор ~4,9 л пермеата (~24,5-кратный объем исходного концентрата). Раствор ретентата дополнительно концентрировали с

применением прибора с мешалкой Amicon с использованием мембраны из регенерированной целлюлозы с молекулярной массой 10 кДа.

[0074] Белок очищали до гомогенности. Общий конечный выход извлеченного материала составил ~54%. Бионагрузка составляла 0 КОЕ, а содержание эндотоксина в нерасфасованном составе по результатам анализа составляло $1,0 < X < 2,0$ EU/мл или $0,6 < X < 1,2$ EU/мг.

ПРИМЕР 3

APT402 проявлял антитромбоцитарную активность *ex vivo*, сравнимую с APT102, и подавление активации фактора X *ex vivo*, сравнимое с аннексином V

[0075] APT402 разрабатывали для поддержания ферментативной и биологической активности как APT102, так и аннексина V. С применением анализа на основе малахитового зеленого авторы настоящего изобретения обнаружили, что параметры ферментативной кинетики APT402 применительно к АТФ и АДФ были сопоставимы с таковыми для APT102. Сходным образом APT402 подавлял АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов человека с эффективностью, сравнимой с APT102 (фигура 1). Активность по подавлению активации FX анализировали с применением мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), очищенных из крови нормальных доноров-людей и анестезированных кроликов стандартными способами. Наблюдалось аналогичное дозозависимое снижение LPS-индуцированной активации FX как для APT402, так и для аннексина V в PBMC кролика и человека (фигура 2). Как и ожидалось, APT102 не оказывал какого-либо эффекта в отношении прокоагулянтной активности PBMC.

ПРИМЕР 4

APT402 продемонстрировал синергетическое подавление образования тромбина в активированной богатой тромбоцитами плазме крови человека по сравнению с APT102 и аннексином V в отдельности

[0076] Образование тромбина в цитратной богатой тромбоцитами плазме крови человека (PRP) количественно определяли с помощью калиброванной автоматизированной тромбографии (CAT) с применением системы Thrombinoscope (Synapse) в соответствии со способами, разработанными Hemker et al. Аликвоты PRP инкубировали со средствами в течение 15 мин при комнатной температуре, а затем в течение 5 мин при 37°C в лунках 96-луночных планшетов. Образование тромбина инициировали добавлением 0,5 пМ тканевого фактора и $CaCl_2$ до получения 16,7 мМ и отслеживали с помощью флуорометра для микротитровальных планшетов (Fluoroskan Ascent, Thermo Electron Corp., Вантаа, Финляндия). С применением программного обеспечения Thrombinoscope получали тромбограммы (нМ тромбина в зависимости от времени), а также ключевые параметры

образования тромбина: время задержки до начала образования тромбина (мин), пиковая концентрация тромбина (нМ), время до достижения пикового уровня тромбина (мин) и эндогенный тромбиновый потенциал (ETP; интегральная площадь под кривой тромбограммы).

[0077] Эффекты APT102, аннексина V, APT102 + аннексин V и APT402 в равных молярных концентрациях в отношении образования тромбина, опосредованного 20 мкМ АДФ-активированных тромбоцитов человека, сравнивали с применением анализов CAT (фигура 3). Аннексин V значительно увеличивал время до достижения пикового уровня тромбина, при этом незначительно снижая пиковую концентрацию тромбина. APT102 оказывал незначительный подавляющий эффект в отношении обоих параметров. Тем не менее, APT102 плюс аннексин V синергетически подавляли образование тромбина, что обеспечивало значительное увеличение в 4 раза времени до достижения пикового уровня тромбина и значительное снижение в 3 раза пикового уровня тромбина. Эти характеристики были имитированы при использовании APT402.

ПРИМЕР 5

APT402 продемонстрировал быстрое начало действия после однократного болюсного введения дозы у здоровых кроликов

[0078] APT402 вводили IV в виде однократной болюсной дозы (0,40 мг/кг) двум кроликам. Фармакокинетическое моделирование показало наилучшее соответствие двухфазным экспоненциальным кривым для активности АДФазы (фигура 4). Максимальную активность обнаруживали в плазме крови через 30 мин после введения. Фаза распределения и период полувыведения ($t_{½}$) для APT402 составляли 30 мин и 6 ч соответственно, что значительно повышено по сравнению с периодом полураспределения, составляющим 5 мин, и периодом полувыведения, составляющим 20 мин (в 18 раз), для аннексина V. Введение APT402 продемонстрировало быстрое начало действия, подавляя на 95% индуцированную 20 мкМ АДФ агрегацию тромбоцитов *ex vivo* через 10 мин после IV введения дозы и характеризуясь 90% и 80% подавлением через 1 и 6 ч после введения дозы соответственно. Эти данные свидетельствуют о том, что при относительно коротком периоде полувыведения APT402 следует вводить в виде болюсной дозы с последующей IV инфузией, чтобы обеспечить устойчивое ослабление тромбоза.

ПРИМЕР 6

Непрерывная IV инфузия APT402 обеспечивала быстрое начало и прекращение действия у здоровых кроликов

[0079] Предварительные данные показывают, что APT402 имел короткий период полураспределения. Затем APT402 вводили IV кроликам в виде однократной болюсной

дозы (0,2 мг/кг) с последующей IV инфузией в дозах 12 и 24 мкг/кг/мин в течение 120 мин. Данные ELISA показывают, что APT402 обнаруживался в плазме крови через 30 мин после введения. Концентрация APT402, подавление АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов и образование тромбина сохранялись в течение периода вплоть до 120 мин во время инфузии, затем значительно снижались через 60 мин после прекращения инфузии APT402 (фигуры 5, 6, 7). Различий между получавшими обработку с помощью APT402 и контрольными животными в отношении длительности кровотечения, ACT, PT, aPTT или количества тромбоцитов не наблюдалось. Данные свидетельствуют о том, что оптимальная обработка с помощью APT402 будет достигнута при 30-минутной предварительной обработке, чтобы обеспечить ослабление как локального, так и системного тромбоза.

ПРИМЕР 7

APT402 преимущественно локализуется в тромботических участках поврежденных артерий у кроликов

[0080] Флуоресцентный краситель для ближней инфракрасной области (NIR) (LS288, длина волны возб./исп. 773/793) в метаноле конъюгировали с функциональными аминами APT402 (~1:1). Очищенный биоконъюгат продемонстрировал одну флуоресцентную полосу (фигура 8A). Для визуализации тромба *in vivo* с помощью флуоресцентной молекулярной томографии (FMT) использовали специально сконструированную волоконную портативную систему передачи видеосигналов, как описано (CITE). К игольчатому электроду в сонной артерии подавали анодный ток для инициации тромбоза через 30 мин после болюсного введения APT402 (меченного NIR и немеченого APT402) с последующей внутривенной инфузией при 12 мкг/кг/мин, которая поддерживала проходимость поврежденной сонной артерии в течение 2 ч. Средние значения флуоресценции и доверительные интервалы для трех кроликов показаны на фиг. 8B. В месте повреждения наблюдалось приблизительно 6-7-кратное увеличение флуоресценции по сравнению с исходным уровнем ввиду образования тромба вокруг транслюминального игольчатого электрода. Важно отметить, что было обнаружено, что APT402 находился в связанном с тромбом состоянии (фигура 8C). Напротив, повышенного сигнала в неповрежденной контрольной сонной артерии не наблюдали (данные не показаны). Таким образом, APT402 специфично нацеливается на участок артериального повреждения и тромбоза. Распределение в тканях NIR-меченного APT402 указывает на то, что большая часть количества метки была поглощена печенью и селезенкой.

ПРИМЕР 8

АРТ402 являлся более эффективным в отношении ослабления артериального тромбоза у кроликов, чем другие антитромботические или антикоагулянтные средства, отдельно или в комбинации, без увеличения риска кровотечения

[0081] Кроликов рандомизировали на следующие одиннадцать групп, при этом процедуры обработки начинали за 30 мин до повреждения электрическим током.

Группа 1 (n=10):	Контрольная IV инфузия физиологического раствора в течение 2 ч;
Группа 2 (n=6):	Клопидогрел в дозе 4 мг/кг перорально и IV инфузия физиологического раствора;
Группа 3 (n=6):	низкомолекулярный гепарин (LMWH) в дозе 0,7 мг/кг IV болюсно с последующей IV инфузией при 1 мг/кг/ч;
Группа 4 (n=7):	Бивалирудин в дозе 5 мг/кг IV болюсно с последующей внутривенной инфузией при 5 мг/кг/ч;
Группа 5: (n=6):	АРТ102 в дозе 0,3 мг/кг IV болюсно (n=2) или 1,0 мг/кг IV болюсно (n=4);
Группа 6 (n=6):	АРТ402 в дозе 0,2 мг/кг IV болюсно с последующей IV инфузией при 4 мкг/кг/мин в течение 2 ч, начинаемой за 30 мин до повреждения электрическим током;
Группа 7 (n=6):	АРТ402 в дозе 0,2 мг/кг IV болюсно с последующей IV инфузией при 12 мкг/кг/мин в течение 2 ч, начинаемой во время процедуры повреждения.
Группа 8 (n=6):	АРТ402 в дозе 0,2 мг/кг IV болюсно с последующей IV инфузией при 24 мкг/кг/мин в течение 2 ч, начинаемой во время процедуры повреждения.
Группа 9 (n=6):	Тикагрелор в дозе 10 мг/кг в гидроксипропилметилцеллюлозе (HPMC) перорально и IV инфузия с использованием физиологического раствора.
Группа 10 (n=6):	Тикагрелор в дозе 10 мг/кг в HPMC перорально и бивалирудин в дозе 5 мг/кг IV болюсно с последующей IV инфузией при 5 мг/кг/ч.
Группа 11 (n=6):	пероральное введение с использованием HPMC и IV инфузия с использованием физиологического раствора.

[0082] Электрическое повреждение вызывало окклюзию у 60% кроликов, получавших обработку физиологическим раствором в течение 2 ч. Средний вес образовавшихся тромбов составлял 7,8 мг. Обработка с помощью APT402 в дозе 12 или 24 мкг/кг/мин, тикагрелора, отдельно или в комбинации с ангиомаксом, полностью предупреждала окклюзию (фигура 9). Вес образовавшихся тромбов дозозависимо снижалась под действием APT402 (фигура 10). Что удивительно, обработка с помощью APT402 в дозе 24 мкг/кг/мин приводила к самому низкому весу образовавшихся тромбов по сравнению с любыми другими вариантами обработки, включая комбинацию тикагрелора и бивалирудина. При этом APT402 не оказывал влияния на длительность кровотечения (фигура 11), протромбиновое время (фигура 12), частичное тромбопластиновое время (фигура 13), кровяное давление (фигура 14) или частоту сердечных сокращений (фигура 15).

ПРИМЕР 9

APT402 обеспечивал ослабление венозного тромбоза без увеличения кровотечения или индукции гипокоагулируемости в мышиной модели индуцированного острым повреждением электрическим током (EIM) венозного тромбоза, т. е. тромбоза глубоких вен (DVT)

[0083] Модель индуцированного повреждением электрическим током венозного тромбоза использовали для изучения непосредственных эффектов (Diaz JA et al. *Thromb Haemost*. 104: 366-375, 2010.

[0084] Мышей рандомизировали на следующие четыре группы (n = 10/группа).

1) Контроль: физиологический раствор ip в дни 1 и 2;
2) LMWH: 6 мг/кг/день sc в дни 1 и 2;
3) APT402 в низкой дозе (LD): 0,2 мг/кг ip болюсно с последующей sc инфузией при 0,03 мг/кг/ч в течение 48 ч; а также
4) APT402 в высокой дозе (HD): 0,2 мг/кг ip болюсно с последующей sc инфузией при 0,09 мг/кг/ч в течение 48 ч.

[0085] EIM неизменно вызывал тромбоз IVC у всех мышей со средним весом тромбов 22,5 мг. Вес тромбов, BT, APTT и TCT измеряли через 48 ч после индукции DVT.

[0086] Обработка с помощью LMWH обеспечивала уменьшение веса тромбов на 57% по сравнению с контрольными животными и была ассоциирована со значительным увеличением в 3 раза длительности кровотечения, в 2,5 раза aPTT и в 2 раза TCT (фигура 16).

[0087] APT402 дозозависимым образом обеспечивал снижение веса тромбов на 44% и 65% при низких и высоких дозах соответственно. Важно отметить, что APT402 не вызывал заметного увеличения BT, aPTT или TCT (фигура 16). Аналогичным образом APT402 в

болюсной дозе 1,0 мг/кг, вводимой ip ежедневно в течение 2 дней, также обеспечивал снижение веса тромбов на 53% без увеличения длительности кровотечения.

[0088] Эти данные свидетельствуют о том, что APT402 безопасен и будет более эффективен для лечения DVT, чем эноксапарин, ввиду отсутствия дозолимитирующих эпизодов кровотечения.

ПРИМЕР 10

APT402 уменьшал фиброз в мышиной модели индуцированного хроническим электролитным повреждением (EIM) DVT без увеличения кровотечения

[0089] В исследовании хронического фиброза мышей рандомизировали и разделяли на следующие группы (n = 5-12/группа).

Контрольная:
здоровые (n=5);
плацебо (n=12): физиологический раствор ip ежедневно в течение 14 дней;
APT402: болюсная доза 1,0 мг/кг, вводимая ip ежедневно в течение 14 дней; а также
APT102: болюсная доза 1,0 мг/кг, вводимая ip ежедневно в течение 14 дней.

[0090] Отложения коллагена подвергали трихромному окрашиванию по Массону через 14 дней после индукции DVT. EIM неизменно индуцировал фиброз IVC у всех мышей и увеличивал средний уровень отложений коллагена примерно в 6 раз по сравнению со здоровыми мышами (фигура 17).

[0091] Обработка с помощью APT402 и APT102 обеспечивала значительное уменьшение уровня отложений коллагена на 33% и 11% соответственно. В группе плацебо наблюдали один летальный исход, в то время как в группах, получавших APT402 и APT102, не наблюдалось наличия летальных исходов, усиления кровотечения или выраженных побочных эффектов.

[0092] Эти данные свидетельствуют о том, что APT402 безопасен и может быть эффективным средством лечения посттромботического синдрома.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Растворимая форма R67G T69R CD39L3 (APT102)

SEQ ID NO:1 – нуклеотидная

SEQ ID NO:2 – аминокислотная

gaggtcctccctccaggactgaagtatggtattgtgctggatgccgggtcttca**ggg**acc
E V L P P G L K Y G I V L D A G S S **G** T
cgcgtctacgtgtatcaatggccagcagaaaaagagaataataccggagtggtcagtcaa
R V Y V Y Q W P A E K E N N T G V V S Q
accttcaaatgtagtgtgaaaggctctggaatctccagctatggaaataacccccaagat
T F K C S V K G S G I S S Y G N N P Q D
gtccccagagcctttgaggagtgtatgcaaaaagtcaaggggcaggttccatcccacctc
V P R A F E E C M Q K V K G Q V P S H L
cacggatccacccccattcacctgggagccacggctgggatgcgcttgctgaggttgcaa
H G S T P I H L G A T A G M R L L R L Q
aatgaaacagcagctaatgaagtccttgaaagcatccaaagctacttcaagtcccagccc
N E T A A N E V L E S I Q S Y F K S Q P
tttgactttaggggtgctcaaatcatttctgggcaagaagaaggggtatatggatggatt
F D F R G A Q I I S G Q E E G V Y G W I
acagccaactatttaatgggaaatttcctggagaagaacctgtggcacatgtgggtgcac
T A N Y L M G N F L E K N L W H M W V H
ccgcatggagtggaaaccacgggtgccctggacttaggtggtgcctccacccaaatatcc
P H G V E T T G A L D L G G A S T Q I S
ttcgtggcaggagagaagatggatctgaacaccagcgacatcatgcaggtgtccctgtat
F V A G E K M D L N T S D I M Q V S L Y
ggctacgtatacacgctctacacacacagcttccagtgctatggccggaatgaggctgag
G Y V Y T L Y T H S F Q C Y G R N E A E
aagaagtttctggcaatgctcctgcagaattctcctaccaaaaaccatctcaccaatccc
K K F L A M L L Q N S P T K N H L T N P
tgttaccctcgggattatagcatcagcttcaccatgggccatgtatttgatagcctgtgc
C Y P R D Y S I S F T M G H V F D S L C
actgtggaccagaggccagaaagttataaccccaatgatgtcatcacttttgaaggaact
T V D Q R P E S Y N P N D V I T F E G T
ggggacccatctctgtgtaaggagaaggtggcttccatatttgacttcaaagcttgccat
G D P S L C K E K V A S I F D F K A C H
gatcaagaaacctgttcttttgatggggtttatcagccaaagattaaagggccatttgtg
D Q E T C S F D G V Y Q P K I K G P F V
gcttttgcaggattctactacacagccagtgctttaaatctttcaggtagcttttccctg
A F A G F Y Y T A S A L N L S G S F S L
gacaccttcaactccagcacctggaatttctgctcacagaattggagtcagctcccactg
D T F N S S T W N F C S Q N W S Q L P L
ctgctccccaaatttgatgaggtatatgcccgctcttactgcttctcagccaactacatc
L L P K F D E V Y A R S Y C F S A N Y I
taccacttgtttgtgaacggttacaaattcacagaggagacttggccccaaatacacttt
Y H L F V N G Y K F T E E T W P Q I H F
gaaaaagaagtggggaatagcagcatagcctggtctcttggctacatgctcagcctgacc
E K E V G N S S I A W S L G Y M L S L T
aaccagatcccagctgaaagccctctgatccgtctgcccatagaaccacctgtctga
N Q I P A E S P L I R L P I E P P V -

APT402 с оптимизированными кодонами и последовательностью сигнального пептида каппа-цепи мышиного Ig

SEQ ID NO:3 – нуклеотидная

SEQ ID NO:4 – аминокислотная

atggagacagacacactcctgctatgggtactgctgctctgggttccaggttccactggt
M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G
|лидерная последовательность каппа-цепи мышиного Ig ->

gacgcgcccgaggtgctgcccccaggcctgaagtacgggatcgtcctggacgccggaagc
D A P E V L P P G L K Y G I V L D A G S
|растворимая форма R69G T69R CD39L3 ->

tccggtacccgggtctatgtgtaccagtggcccgccgaaaaggagaacaatacaggcgtg
S G T R V Y V Y Q W P A E K E N N T G V

gtgtcacaaaccttcaagtgttcagtcaaaggtagtggaatttcttcatatgggaacaat
V S Q T F K C S V K G S G I S S Y G N N

ccccaggatgtgcctagggcatttgaggaatgtatgcagaaagtcaagggccaggtccca
P Q D V P R A F E E C M Q K V K G Q V P

tctcatctgcatggttcaactcccatccatctgggtgccactgcaggaatgaggctgctg
S H L H G S T P I H L G A T A G M R L L

cggctgcagaatgaaaccgcagccaacgaggtcctggaatccattcaaagttacttcaag
R L Q N E T A A N E V L E S I Q S Y F K

tcccaacctttgacttccgaggcgctcaaattatcagtggtcaggaagagggagtctat
S Q P F D F R G A Q I I S G Q E E G V Y

ggctggatcaccgcaaactacctgatgggtaattttctggagaagaacctgtggcatatg
G W I T A N Y L M G N F L E K N L W H M

tgggtccatccccacggtgtcgaaacaactggagccctggatctgggcggtgccagtaca
W V H P H G V E T T G A L D L G G A S T

cagatctcatttgtcgctggtgagaaaatggacctgaacaccagcgatatcatgcaagtc
Q I S F V A G E K M D L N T S D I M Q V

tctctgtatggatacgtctatactctgtacacccactctttccaatgttacggtcgcaac
S L Y G Y V Y T L Y T H S F Q C Y G R N

gaagccgagaagaaattcctggctatgctgctgcaaaattctcctaccaagaatcatctg
E A E K K F L A M L L Q N S P T K N H L

actaatccttgctatcccagggactacagtattagctttactatgggccacgtgttcgat
T N P C Y P R D Y S I S F T M G H V F D

tccctgtgcacagtcgaccagcggcccgagtcttacaatcccaacgatgtgatcaccttc
S L C T V D Q R P E S Y N P N D V I T F

gagggcactggtgacccctcactgtgcaaggagaaagtcgcaagtatcttcgactttaag
E G T G D P S L C K E K V A S I F D F K

gcttgccacgatcaagaaacttgctcctttgatggcgtctatcaaccaaaaatcaagggc
A C H D Q E T C S F D G V Y Q P K I K G

ccatttgtcgccttcgccgggttctattataccgcatccgccctgaacctgtctggtagc
P F V A F A G F Y Y T A S A L N L S G S

ttcagtctggacacttttaattcaagtacatggaacttctgctctcagaattggagtcaa
F S L D T F N S S T W N F C S Q N W S Q

ctgcccctgctgctgcccaaattcgatgaggtgtacgctaggagttattgtttctcagca
L P L L L P K F D E V Y A R S Y C F S A

aactatatctaccatctgtttgtgaatggctacaaattcacagaggagacatggccacaa
N Y I Y H L F V N G Y K F T E E T W P Q

attcactttgagaaagaggtcggaaattcatctattgcatggagcctggggtacatgctg
I H F E K E V G N S S I A W S L G Y M L

agcctgactaatcagattcccgctgaatcacccctgatccgactgcctattgaaccaccc
S L T N Q I P A E S P L I R L P I E P P

gtcggctcgacgagcggcgggtcgacaagtggtggatctactagtggctctggatccgga
V G S T S G G S T S G G S T S G S G S G
|Линкер из 20 аминокислот ->

attgctcaagtgctgaggggaactgtgactgacttcccaggcttcgatgaaagggcagac
I A Q V L R G T V T D F P G F D E R A D
|Аннексин V ->

gctgagactctgcgcaaagcaatgaagggtctgggtacagatgaagagagtattctgaca
A E T L R K A M K G L G T D E E S I L T

ctgctgactagtcgctccaacgcccaaagacaggagattagcgcagcattcaaaactctg
L L T S R S N A Q R Q E I S A A F K T L

ttcggtagggatctgctggacgatctgaaatctgaactgaccgggaaattcgagaaactg
F G R D L L D D L K S E L T G K F E K L

atcgtggccctgatgaaaccaagtcggctgtatgatgcatacgaactgaagcacgctctg
I V A L M K P S R L Y D A Y E L K H A L

aagggagccggcactaatgagaaggtgctgacagaaattatcgcatctcgaacccccgag
K G A G T N E K V L T E I I A S R T P E

gaactgcgcgctatcaagcaagtgtatgaagaggaatatggttccagcctggaggacgat
E L R A I K Q V Y E E E Y G S S L E D D

gtcgtcggggatacctcaggttattaccaacgcatgctggtggtgctgctgcaggccaac
V V G D T S G Y Y Q R M L V V L L Q A N

agggaccctgacgctggcatcgatgaagcccaggtggaacaagacgcccaggcactgttc
R D P D A G I D E A Q V E Q D A Q A L F

caagcaggggagctgaagtgggggaccgacgaggaaaagtttatcaccatctttggaact
Q A G E L K W G T D E E K F I T I F G T

cggagtgtgagccatctgcgcaaagtctttgacaagtatatgacaatttccggcttccaa
R S V S H L R K V F D K Y M T I S G F Q

atcgaggaaaccattgatcgagagactagcggcaatctggaacagctgctgctggctgtg
I E E T I D R E T S G N L E Q L L L A V

gtgaaatcaatcagatcaattcctgcatatctggcagagacactgtattacgcaatgaaa
V K S I R S I P A Y L A E T L Y Y A M K

ggagccggaaccgacgatcatactctgattagagtcatggtcagtcggtccgagatcgac
G A G T D D H T L I R V M V S R S E I D

ctgtttaacattagaaaggagttccgcaagaattttgcaacttccctgtactcaatgatc
L F N I R K E F R K N F A T S L Y S M I

aaaggcgatacctctggtgactacaagaaagctctgctgctgctgtgcggcgaggatgac
K G D T S G D Y K K A L L L L C G E D D

taa
-

Линкер из 20 а. к.
SEQ ID NO:5 – нуклеотидная
SEQ ID NO:6 – аминокислотная
ggctcgacgagcggcgggtcgacaagtggtggatctactagtggctctgga
G S T S G G S T S G G S T S G S G

gccacaatt
A T I

APT402 с оптимизированными кодонами и сигнальным пептидом бычьего альфа-лактальбумина
SEQ ID NO:7 – нуклеотидная

SEQ ID NO:8 – аминокислотная

atgatgtcctttgtctctctgctcctggttggcatcctattccatgccacccaggccgac
M M S F V S L L L V G I L F H A T Q A D
|сигнальный пептид альфа-лактальбумина

gcgcccgaggtgctgcccccaggcctgaagtacgggatcgtcctggacgccggaagctcc
A P E V L P P G L K Y G I V L D A G S S
|APT402 ->

ggtacccgggtctatgtgtaccagtggcccgccgaaaaggagaacaatacaggcgtggtg
G T R V Y V Y Q W P A E K E N N T G V V

tcacaaaccttcaagtgttcagtcaaaggtagtggaatttcttcatatgggaacaatccc
S Q T F K C S V K G S G I S S Y G N N P

caggatgtgcctagggcatttgaggaatgtatgcagaaagtcaagggccaggtcccatct
Q D V P R A F E E C M Q K V K G Q V P S

catctgcatggttcaactcccatccatctgggtgccactgcaggaatgaggctgctgcgg
H L H G S T P I H L G A T A G M R L L R

ctgcagaatgaaaccgcagccaacgaggtcctggaatccattcaaagttacttcaagtcc
L Q N E T A A N E V L E S I Q S Y F K S

caacctttgacttccgaggcgctcaaattatcagtggtcaggaagagggagtctatggc
Q P F D F R G A Q I I S G Q E E G V Y G

tggatcaccgcaaactacctgatgggtaattttctggagaagaacctgtggcatatgtgg
W I T A N Y L M G N F L E K N L W H M W

gtccatccccacggtgtcgaaacaactggagccctggatctgggcggtgccagtacacag
V H P H G V E T T G A L D L G G A S T Q
atctcatttgtcgctggtgagaaaatggacctgaacaccagcgatatcatgcaagtctct
I S F V A G E K M D L N T S D I M Q V S

ctgtatggatacgtctatactctgtacacccactctttccaatgttacggtcgcaacgaa
L Y G Y V Y T L Y T H S F Q C Y G R N E

gccgagaagaaattcctggctatgctgctgcaaaattctcctaccaagaatcatctgact
A E K K F L A M L L Q N S P T K N H L T

aatccttgctatcccagggactacagtattagctttactatgggccacgtgttcgattcc
N P C Y P R D Y S I S F T M G H V F D S

ctgtgcacagtcgaccagcggcccgagtcttacaatcccaacgatgtgatcaccttcgag
L C T V D Q R P E S Y N P N D V I T F E

ggcactggtgacccctcactgtgcaaggagaaagtcgcaagtatcttcgactttaaggct
G T G D P S L C K E K V A S I F D F K A

tgccacgatcaagaaacttgctcctttgatggcgtctatcaaccaaaaatcaagggccca
C H D Q E T C S F D G V Y Q P K I K G P

tttgtcgccttcgccgggttctattataccgcatccgccctgaacctgtctggtagcttc
F V A F A G F Y Y T A S A L N L S G S F

agtctggacacttttaattcaagtacatggaacttctgctctcagaattggagtcaactg
S L D T F N S S T W N F C S Q N W S Q L

cccctgctgctgcccaaattcgatgaggtgtacgctaggagttattgtttctcagcaaac
P L L L P K F D E V Y A R S Y C F S A N

tatatctaccatctgtttgtgaatggctacaaattcacagaggagacatggccacaaatt
Y I Y H L F V N G Y K F T E E T W P Q I

cactttgagaaagaggtcggaaattcatctattgcatggagcctggggtacatgctgagc
H F E K E V G N S S I A W S L G Y M L S

ctgactaatcagattcccgctgaatcacccctgatccgactgcctattgaaccacccgtc
L T N Q I P A E S P L I R L P I E P P V

ggctcgacgagcggcgggtcgacaagtggtggatctactagtggctctggagccacaatt
G S T S G G S T S G G S T S G S G A T I
|Линкер из 20 аминокислот с S456A/G457T ->

gctcaagtgctgaggggaactgtgactgacttcccaggcttcgatgaaagggcagacgct
A Q V L R G T V T D F P G F D E R A D A
|Аннексин V ->

gagactctgcgcaaagcaatgaagggtctgggtacagatgaagagagtattctgacactg
E T L R K A M K G L G T D E E S I L T L

ctgactagtcgctccaacgcccaaagacaggagattagcgcagcattcaaaactctgttc
L T S R S N A Q R Q E I S A A F K T L F

ggtagggatctgctggacgatctgaaatctgaactgaccgggaaattcgagaaactgatc
G R D L L D D L K S E L T G K F E K L I

gtggccctgatgaaaccaagtcggctgtatgatgcatacgaactgaagcacgctctgaag
V A L M K P S R L Y D A Y E L K H A L K

ggagccggcactaatgagaaggtgctgacagaaattatcgcatctcgaacccccgaggaa
G A G T N E K V L T E I I A S R T P E E

ctgcgcgctatcaagcaagtgtatgaagaggaatatggttccagcctggaggacgatgtc
L R A I K Q V Y E E E Y G S S L E D D V

gtcggggatacctcaggttattaccaacgcatgctggtggtgctgctgcaggccaacagg
V G D T S G Y Y Q R M L V V L L Q A N R

gaccctgacgctggcatcgatgaagcccaggtggaacaagacgcccaggcactgttccaa
D P D A G I D E A Q V E Q D A Q A L F Q

gcaggggagctgaagtgggggaccgacgaggaaaagtttatcaccatctttggaactcgg
A G E L K W G T D E E K F I T I F G T R

agtgtgagccatctgcgcaaagtctttgacaagtatatgacaatttccggcttccaaatc
S V S H L R K V F D K Y M T I S G F Q I

gaggaaaccattgatcgagagactagcggcaatctggaacagctgctgctggctgtggtg
E E T I D R E T S G N L E Q L L L A V V

aaatcaatcagatcaattcctgcatatctggcagagacactgtattacgcaatgaaagga
K S I R S I P A Y L A E T L Y Y A M K G

gccggaaccgacgatcatactctgattagagtcatggtcagtcggtccgagatcgacctg
A G T D D H T L I R V M V S R S E I D L

tttaacattagaaaggagttccgcaagaattttgcaacttccctgtactcaatgatcaaa
F N I R K E F R K N F A T S L Y S M I K

ggcgatacctctggtgactacaagaaagctctgctgctgctgtgcggcgaggatgactaa
G D T S G D Y K K A L L L L C G E D D -

APT402 с оптимизированными кодонами
SEQ ID NO:9 – нуклеотидная
SEQ ID NO:10 – аминокислотная

gaggtgctgcccccaggcctgaagtacgggatcgtcctggacgccggaagctcc
E V L P P G L K Y G I V L D A G S S
|APT402 ->
ggtacccgggtctatgtgtaccagtggcccgccgaaaaggagaacaatacaggcgtggtg
G T R V Y V Y Q W P A E K E N N T G V V

tcacaaaccttcaagtgttcagtcaaaggtagtggaatttcttcatatgggaacaatccc
S Q T F K C S V K G S G I S S Y G N N P

caggatgtgcctagggcatttgaggaatgtatgcagaaagtcaagggccaggtcccatct
Q D V P R A F E E C M Q K V K G Q V P S

catctgcatggttcaactcccatccatctgggtgccactgcaggaatgaggctgctgcgg
H L H G S T P I H L G A T A G M R L L R

ctgcagaatgaaaccgcagccaacgaggtcctggaatccattcaaagttacttcaagtcc
L Q N E T A A N E V L E S I Q S Y F K S

caacctttgacttccgaggcgctcaaattatcagtggtcaggaagagggagtctatggc

Q P F D F R G A Q I I S G Q E E G V Y G

tggatcaccgcaaactacctgatgggtaattttctggagaagaacctgtggcatatgtgg
W I T A N Y L M G N F L E K N L W H M W

gtccatccccacggtgtcgaaacaactggagccctggatctgggcggtgccagtacacag
V H P H G V E T T G A L D L G G A S T Q
atctcatttgtcgctggtgagaaaatggacctgaacaccagcgatatcatgcaagtctct
I S F V A G E K M D L N T S D I M Q V S

ctgtatggatacgtctatactctgtacacccactctttccaatgttacggtcgcaacgaa
L Y G Y V Y T L Y T H S F Q C Y G R N E

gccgagaagaaattcctggctatgctgctgcaaaattctcctaccaagaatcatctgact
A E K K F L A M L L Q N S P T K N H L T

aatccttgctatcccagggactacagtattagctttactatgggccacgtgttcgattcc
N P C Y P R D Y S I S F T M G H V F D S

ctgtgcacagtcgaccagcggcccgagtcttacaatcccaacgatgtgatcaccttcgag
L C T V D Q R P E S Y N P N D V I T F E

ggcactggtgacccctcactgtgcaaggagaaagtcgcaagtatcttcgactttaaggct
G T G D P S L C K E K V A S I F D F K A

tgccacgatcaagaaacttgctcctttgatggcgtctatcaaccaaaaatcaagggccca
C H D Q E T C S F D G V Y Q P K I K G P

tttgtcgccttcgccgggttctattataccgcatccgccctgaacctgtctggtagcttc
F V A F A G F Y Y T A S A L N L S G S F

agtctggacacttttaattcaagtacatggaacttctgctctcagaattggagtcaactg
S L D T F N S S T W N F C S Q N W S Q L

cccctgctgctgcccaaattcgatgaggtgtacgctaggagttattgtttctcagcaaac
P L L L P K F D E V Y A R S Y C F S A N

tatatctaccatctgtttgtgaatggctacaaattcacagaggagacatggccacaaatt
Y I Y H L F V N G Y K F T E E T W P Q I

cactttgagaaagaggtcggaaattcatctattgcatggagcctggggtacatgctgagc
H F E K E V G N S S I A W S L G Y M L S

ctgactaatcagattcccgctgaatcacccctgatccgactgcctattgaaccacccgtc
L T N Q I P A E S P L I R L P I E P P V

ggctcgacgagcggcgggtcgacaagtggtggatctactagtggctctggagccacaatt
G S T S G G S T S G G S T S G S G A T I
|Линкер из 20 аминокислот с S456A/G457T ->

gctcaagtgctgaggggaactgtgactgacttcccaggcttcgatgaaagggcagacgct
A Q V L R G T V T D F P G F D E R A D A
|Аннексин V ->

gagactctgcgcaaagcaatgaagggtctgggtacagatgaagagagtattctgacactg
E T L R K A M K G L G T D E E S I L T L

ctgactagtcgctccaacgcccaaagacaggagattagcgcagcattcaaaactctgttc
L T S R S N A Q R Q E I S A A F K T L F

ggtagggatctgctggacgatctgaaatctgaactgaccgggaaattcgagaaactgatc
G R D L L D D L K S E L T G K F E K L I

gtggccctgatgaaaccaagtcggctgtatgatgcatacgaactgaagcacgctctgaag
V A L M K P S R L Y D A Y E L K H A L K

ggagccggcactaatgagaaggtgctgacagaaattatcgcatctcgaacccccgaggaa
G A G T N E K V L T E I I A S R T P E E

ctgcgcgctatcaagcaagtgtatgaagaggaatatggttccagcctggaggacgatgtc
L R A I K Q V Y E E E Y G S S L E D D V

gtcggggatacctcaggttattaccaacgcatgctggtggtgctgctgcaggccaacagg
V G D T S G Y Y Q R M L V V L L Q A N R

gaccctgacgctggcatcgatgaagcccaggtggaacaagacgcccaggcactgttccaa
D P D A G I D E A Q V E Q D A Q A L F Q

gcaggggagctgaagtgggggaccgacgaggaaaagtttatcaccatctttggaactcgg
A G E L K W G T D E E K F I T I F G T R

agtgtgagccatctgcgcaaagtctttgacaagtatatgacaatttccggcttccaaatc
S V S H L R K V F D K Y M T I S G F Q I

gaggaaaccattgatcgagagactagcggcaatctggaacagctgctgctggctgtggtg
E E T I D R E T S G N L E Q L L L A V V

aaatcaatcagatcaattcctgcatatctggcagagacactgtattacgcaatgaaagga
K S I R S I P A Y L A E T L Y Y A M K G

gccggaaccgacgatcatactctgattagagtcatggtcagtcggtccgagatcgacctg
A G T D D H T L I R V M V S R S E I D L

tttaacattagaaaggagttccgcaagaattttgcaacttccctgtactcaatgatcaaa
F N I R K E F R K N F A T S L Y S M I K

ggcgatacctctggtgactacaagaaagctctgctgctgctgtgcggcgaggatgactaa
G D T S G D Y K K A L L L L C G E D D -

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция, содержащая апиразу и аннексин, который связывает фосфатидилсерин (PS) на поверхности активированных тромбоцитов, при этом указанные апираза и аннексин присутствуют в количествах, которые в совокупности эффективны для обеспечения подавления тромбоза без усиления кровотечения.

2. Композиция по п. 1, где апираза и аннексин присутствуют в эквимолярных количествах.

3. Композиция по п. 2, где апираза и аннексин ковалентно связаны.

4. Композиция по любому из пп. 1-3, где апираза представляет собой растворимую форму CD39L3 или ее модифицированную форму с усиленной АДФазной активностью.

5. Композиция по п. 4, где апираза представляет собой растворимую форму CD39L3, представленную в модифицированной форме, где указанная модификация предусматривает замены в аминокислотных положениях 67 и 69.

6. Композиция по п. 4, где указанные замены представляют собой R67G и T69R.

7. Композиция по п. 6, где апираза представляет собой APT102 (SEQ ID NO:2).

8. Композиция по любому из пп. 1-7, где аннексин представляет собой аннексин IV или V.

9. Композиция по любому из пп. 3-8, где апираза и аннексин ковалентно связаны посредством линкерного пептида с образованием слитого белка.

10. Композиция по п. 9, где линкерный пептид содержит 3-30 аминокислот.

11. Композиция по п. 10, где линкерный пептид содержит 15-25 аминокислот.

12. Композиция по любому из пп. 9-11, где линкерный пептид устойчив к гидролизу в плазме крови и/или в надосадочной жидкости культуры клеток.

13. Композиция по п. 12, где линкерный пептид характеризуется аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:6.

14. Композиция по п. 13, где слитый белок представляет собой APT 402 (SEQ ID NO:10).

15. Нуклеиновая кислота, кодирующая слитый белок, указанный в любом из пп. 3-14.

16. Нуклеиновая кислота по п. 15, дополнительно содержащая последовательности для контроля экспрессии.

17. Рекомбинантные клетки-хозяева или векторы, которые содержат нуклеиновую кислоту по п. 16.

18. Способ получения слитого белка, который содержит апиразу и аннексин, ковалентно связанные посредством линкерного пептида, при этом способ включает культивирование клеток-хозяев по п. 15 и выделение слитого белка из культуры.

19. Слитый белок, содержащий апиразу и аннексин, ковалентно связанные посредством линкерного пептида, полученный посредством способа по п. 18.

20. Способ лечения субъекта, страдающего тромбозом, или субъекта, подвергаемого хирургической операции, который подвержен риску чрезмерного кровотечения, при этом способ включает введение указанному субъекту эффективного количества композиции по любому из пп. 1-14 или слитого белка по п. 19.

21. Способ по п. 18, при этом способ включает введение указанному субъекту эффективного количества APT 402 (SEQ ID NO:10).

22. Способ по п. 21, где указанное введение является внутривенным (IV).

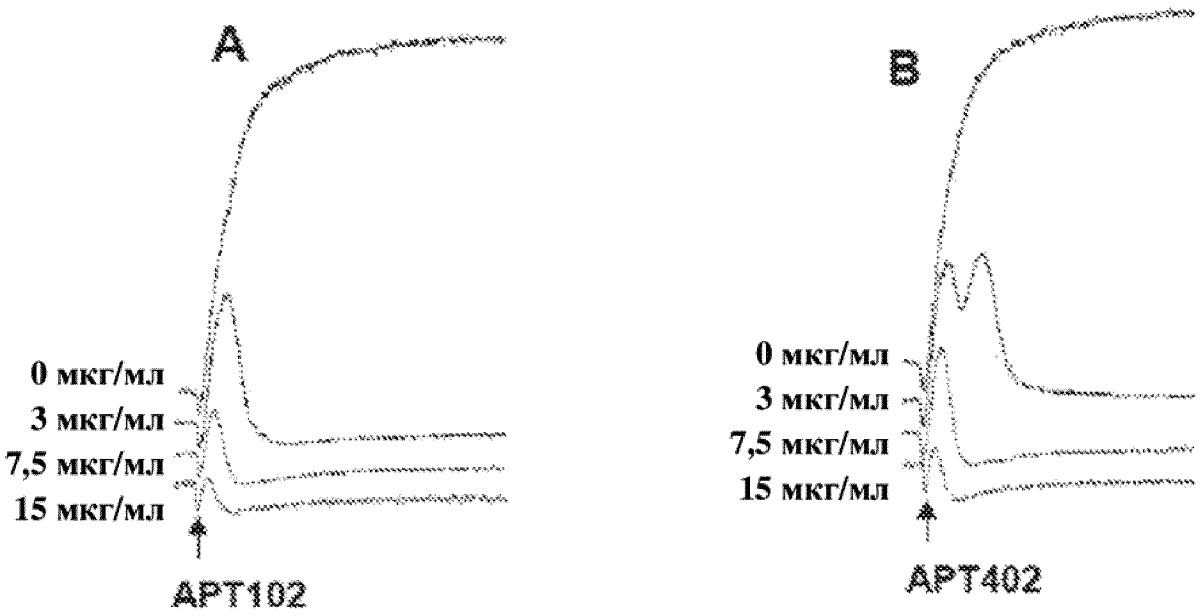
23. Способ по п. 22, где указанный способ предусматривает болюсную инъекцию с последующей IV инфузией.

24. Способ лечения субъекта, страдающего тромбозом, или субъекта, подвергаемого хирургической операции, который подвержен риску чрезмерного кровотечения, при этом способ включает введение указанному субъекту эффективного количества комбинации апиразы и аннексина, который связывает фосфатидилсерин (PS) на поверхности активированных тромбоцитов, при количествах указанных апиразы и аннексина, которые в совокупности эффективны для обеспечения подавления тромбоза без усиления кровотечения.

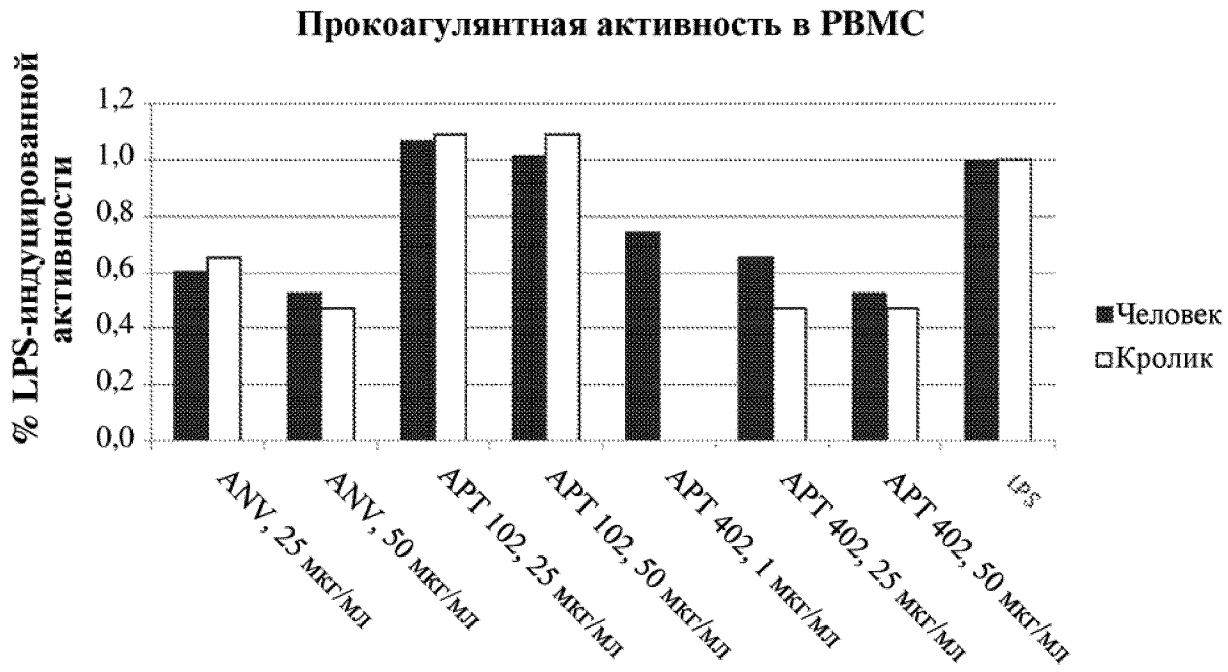
25. Способ по п. 24, где апираза представляет собой APT 102 (SEQ ID NO:2), а аннексин представляет собой аннексин V.

26. Способ по п. 24, где введение является одновременным.

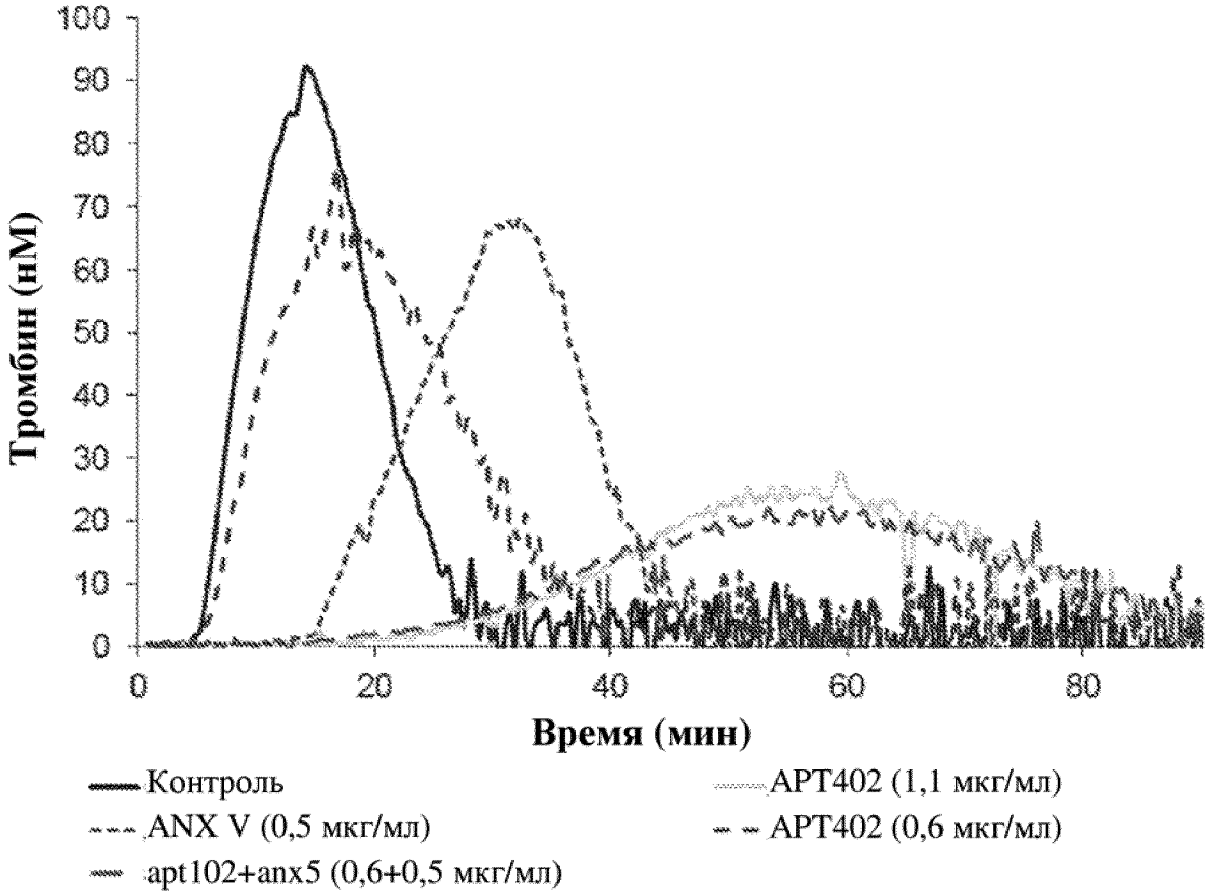
27. Способ по п. 24, где введение является последовательным.


A
0 мкг/мл
3 мкг/мл
7,5 мкг/мл
15 мкг/мл
APT102
B
0 мкг/мл
3 мкг/мл
7,5 мкг/мл
15 мкг/мл
APT402

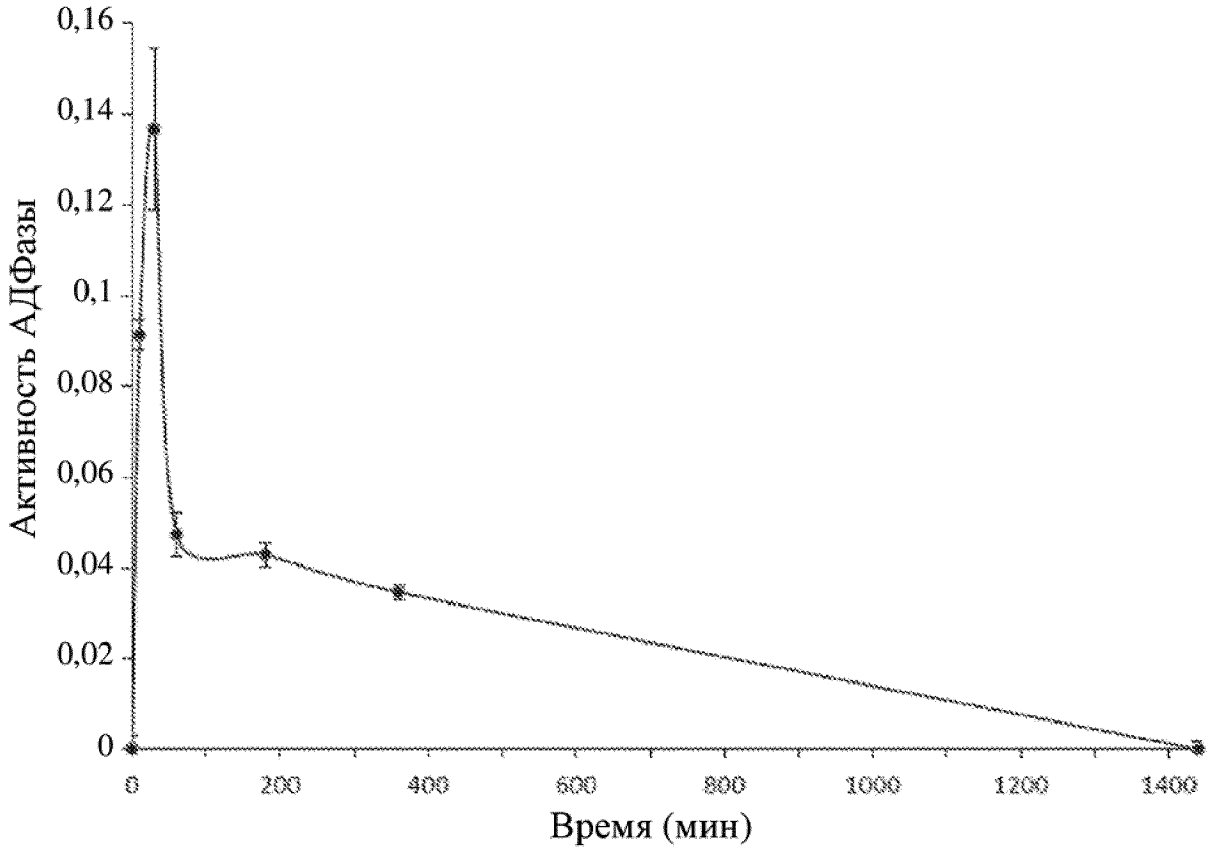
ФИГУРА 1


Прокоагулянтная активность в PBMC
% LPS-индуцированной активности
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
ANV, 25 мкг/мл
ANV, 50 мкг/мл
APT 102, 25 мкг/мл
APT 102, 50 мкг/мл
APT 402, 1 мкг/мл
APT 402, 25 мкг/мл
APT 402, 50 мкг/мл
LPS
Человек
Кролик

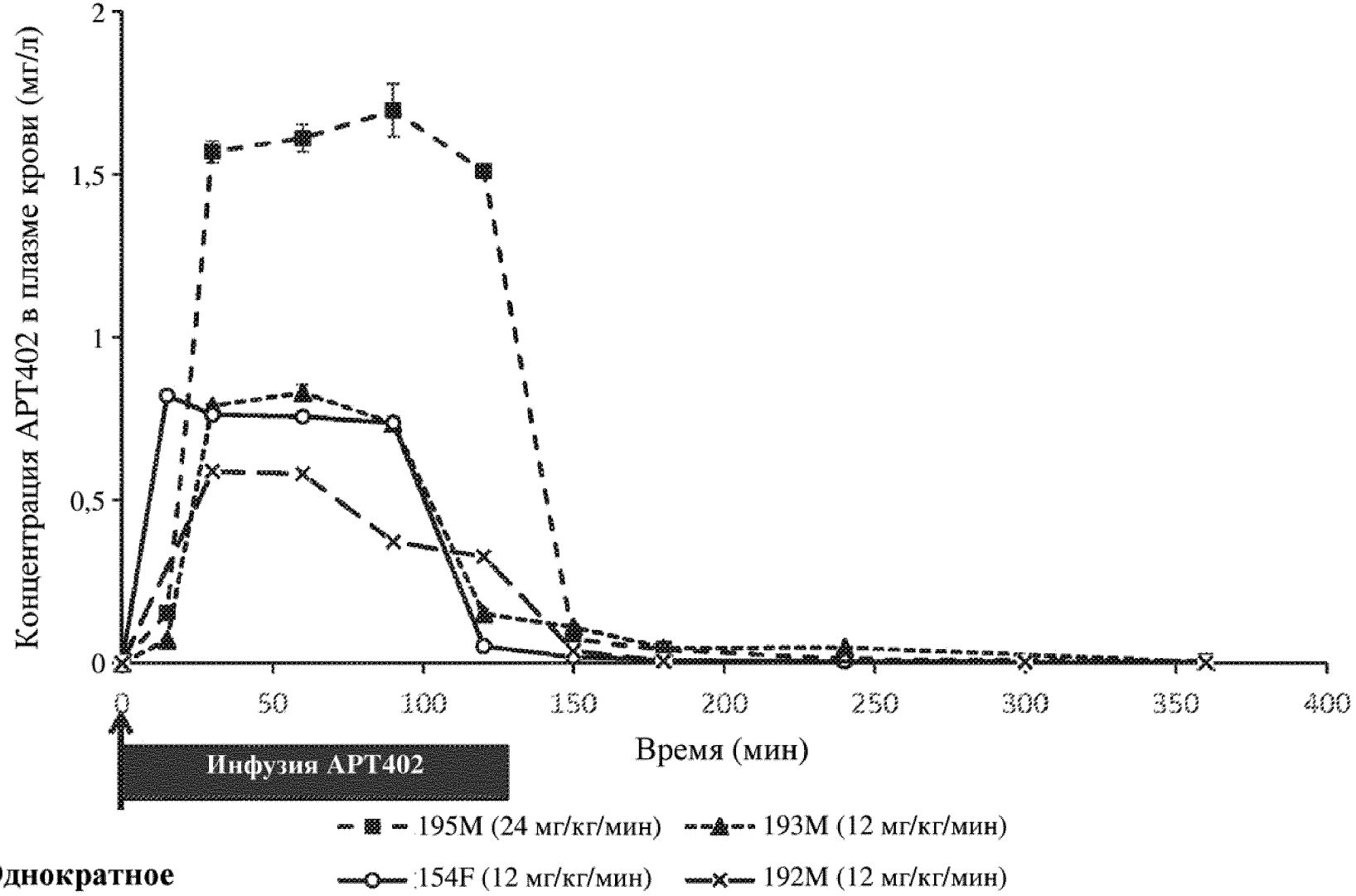
ФИГУРА 2


Тромбин (нМ)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
20
40
60
80
Время (мин)
Контроль
ANX V (0,5 мкг/мл)
apt102+anx5 (0,6+0,5 мкг/мл)
APT402 (1,1 мкг/мл)
APT402 (0,6 мкг/мл)

ФИГУРА 3

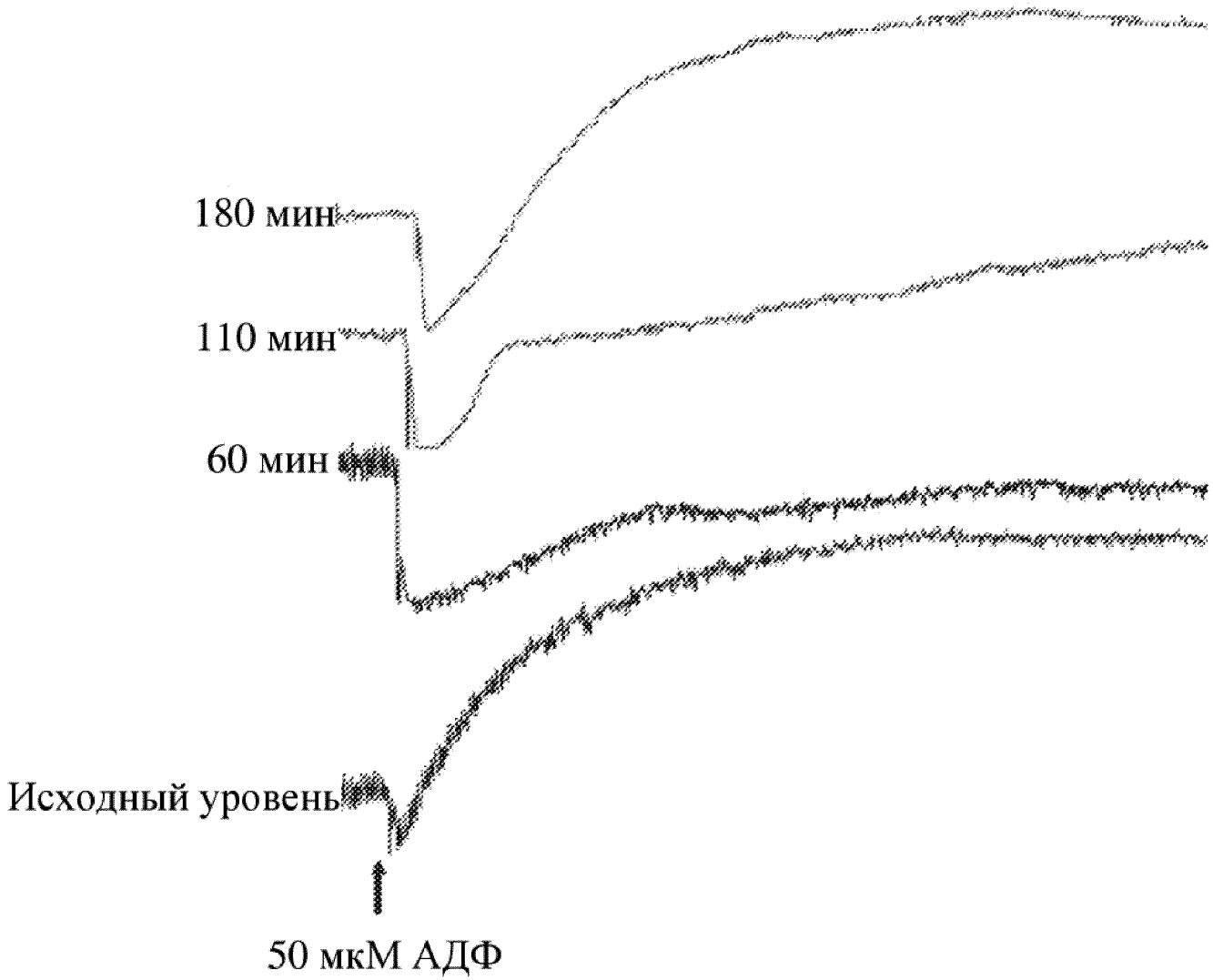

0,16
0,14
0,12
0,1
0,08
0,06
0,04
0,02
0
Активность АДФазы
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
Время (мин)

ФИГУРА 4

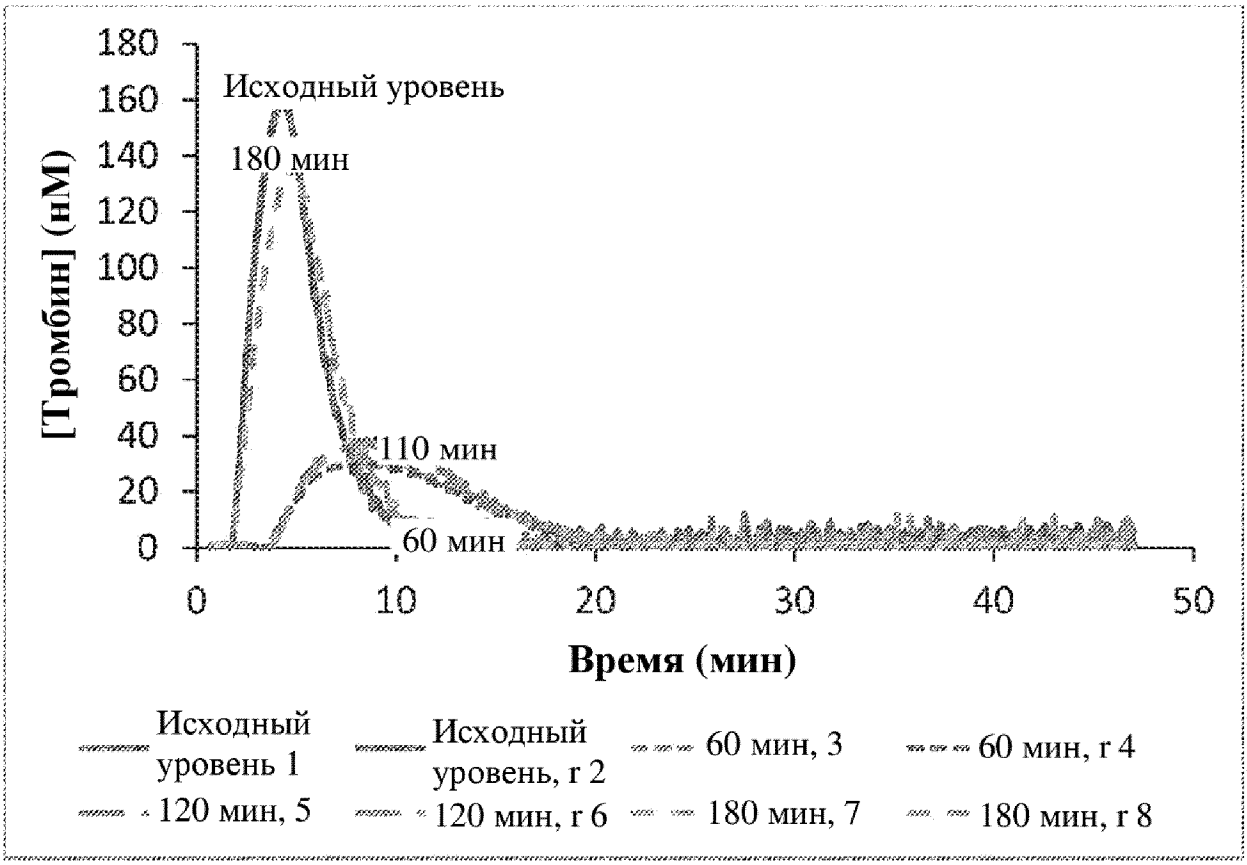


Однократное болюсное введение APT402 (0,2 мг/кг)

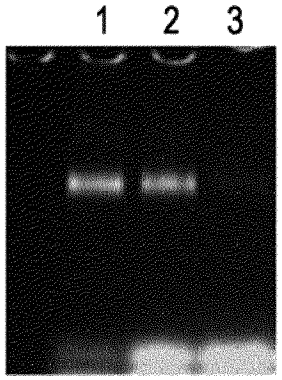
ФИГУРА 5



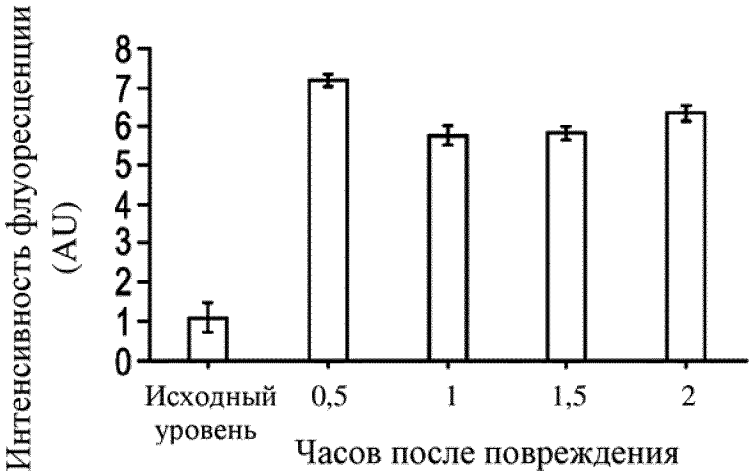
ФИГУРА 6


[Тромбин] (нМ)
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
Исходный уровень
180 мин
110 мин
60 мин
0
10
20
30
40
50
Время (мин)
Исходный уровень 1
Исходный уровень, г 2
60 мин, 3
60 мин, г 4
120 мин, 5
120 мин, г 6
180 мин, 7
180 мин, г 8

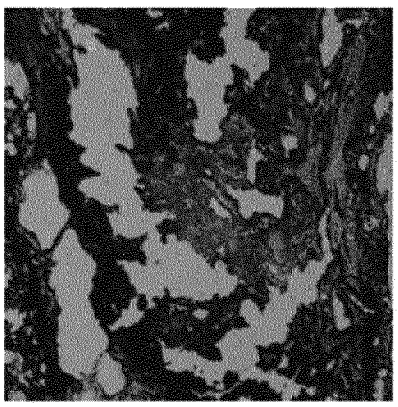
ФИГУРА 7



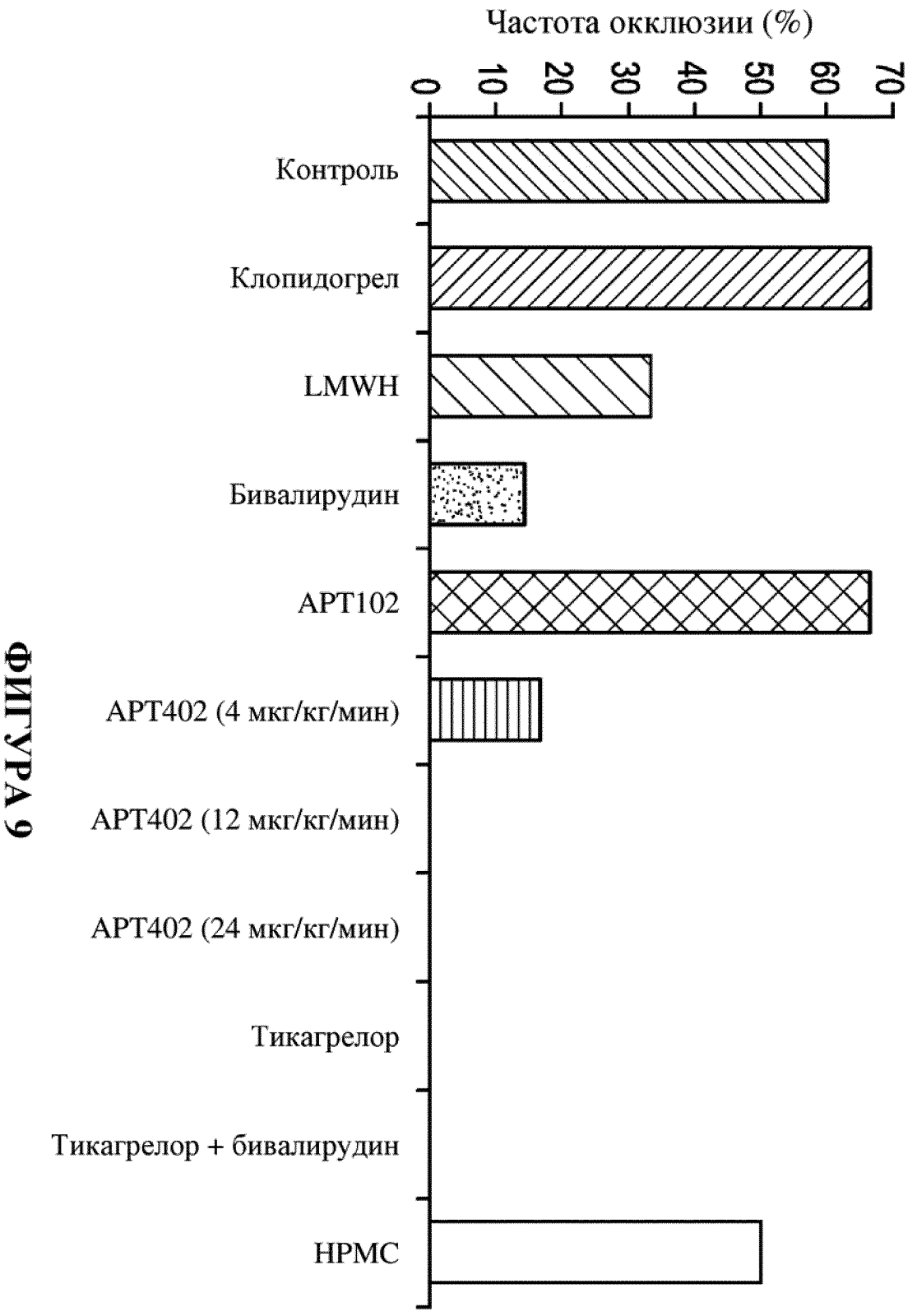
ФИГУРА 8A



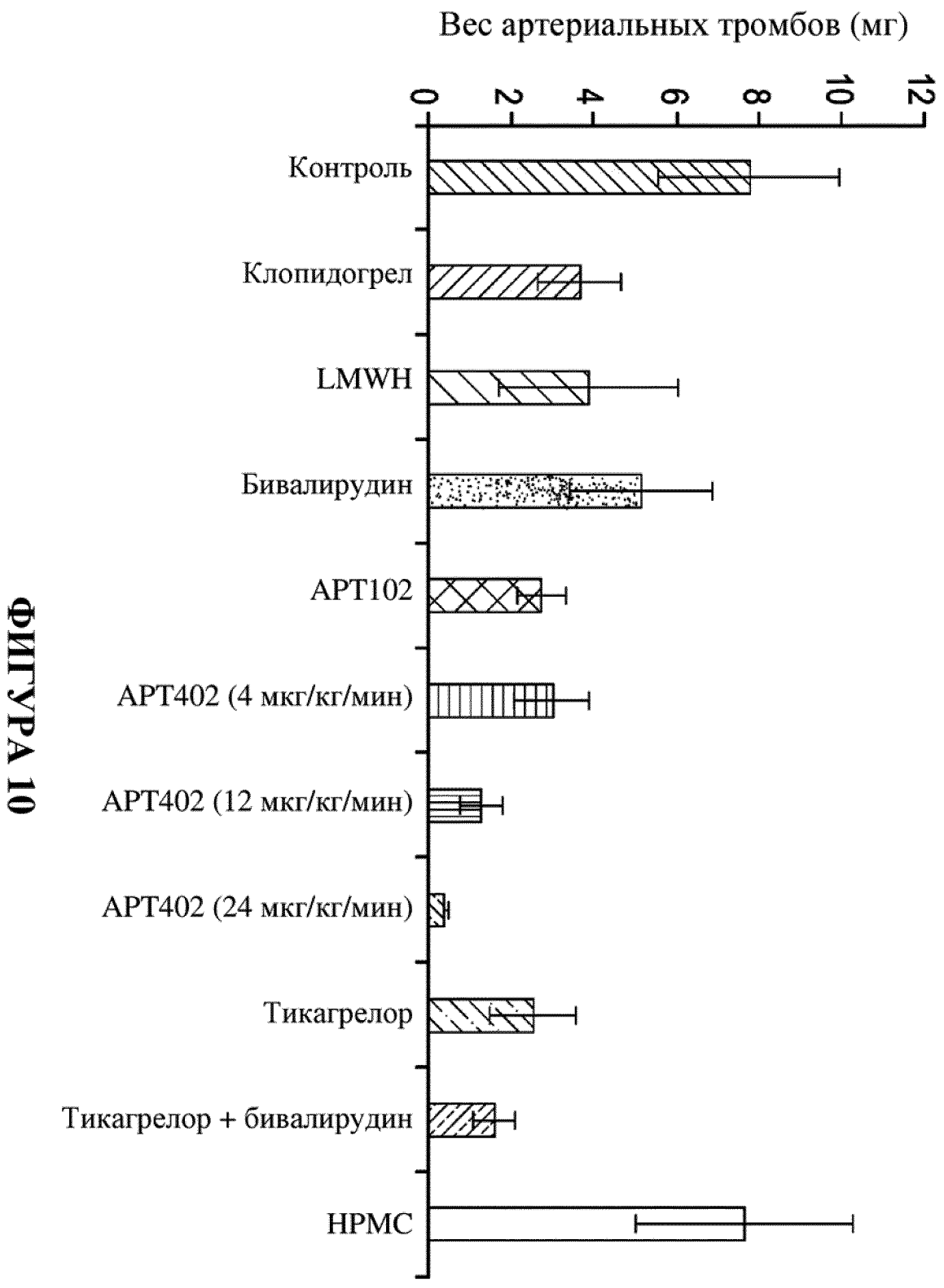
ФИГУРА 8B

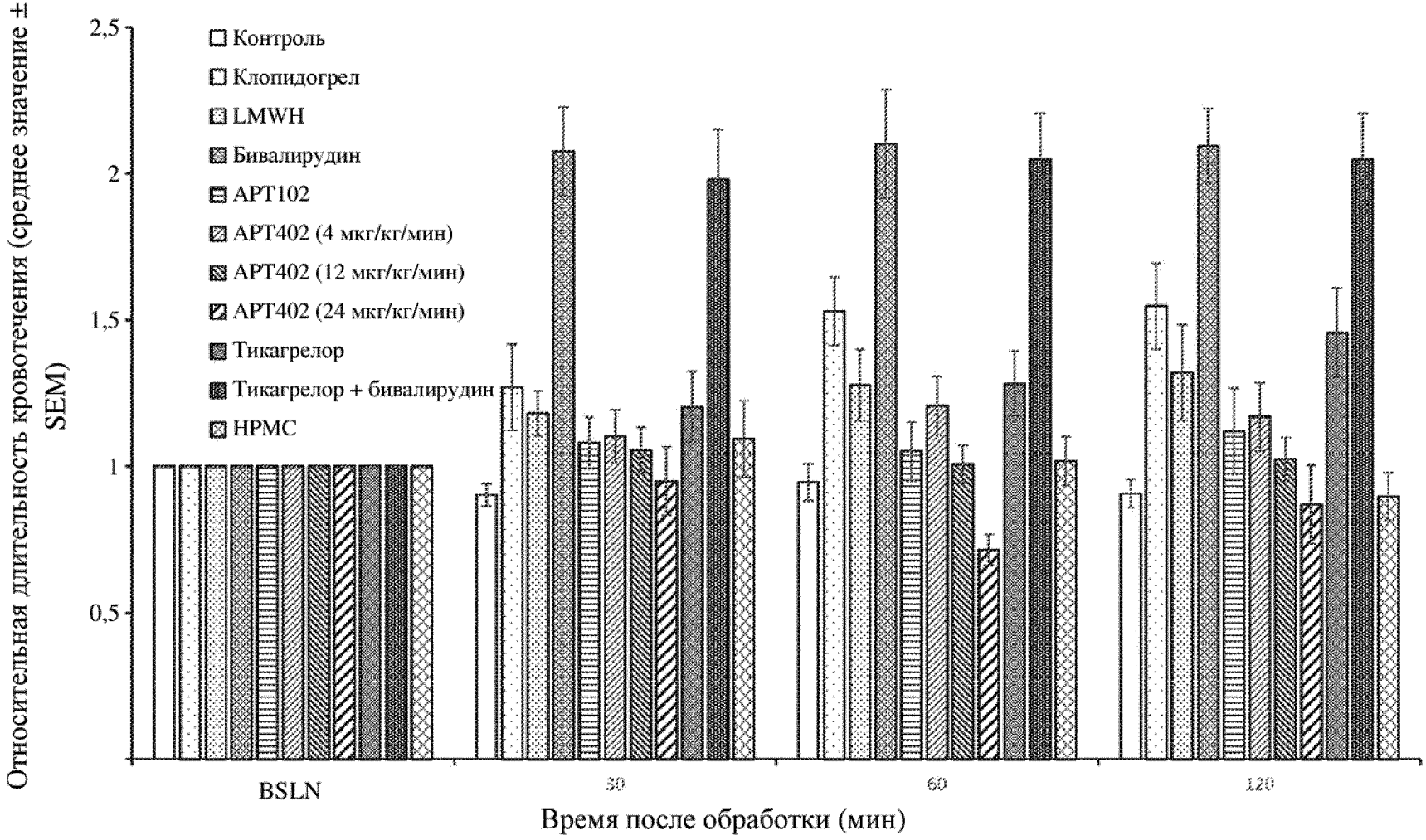


ФИГУРА 8C

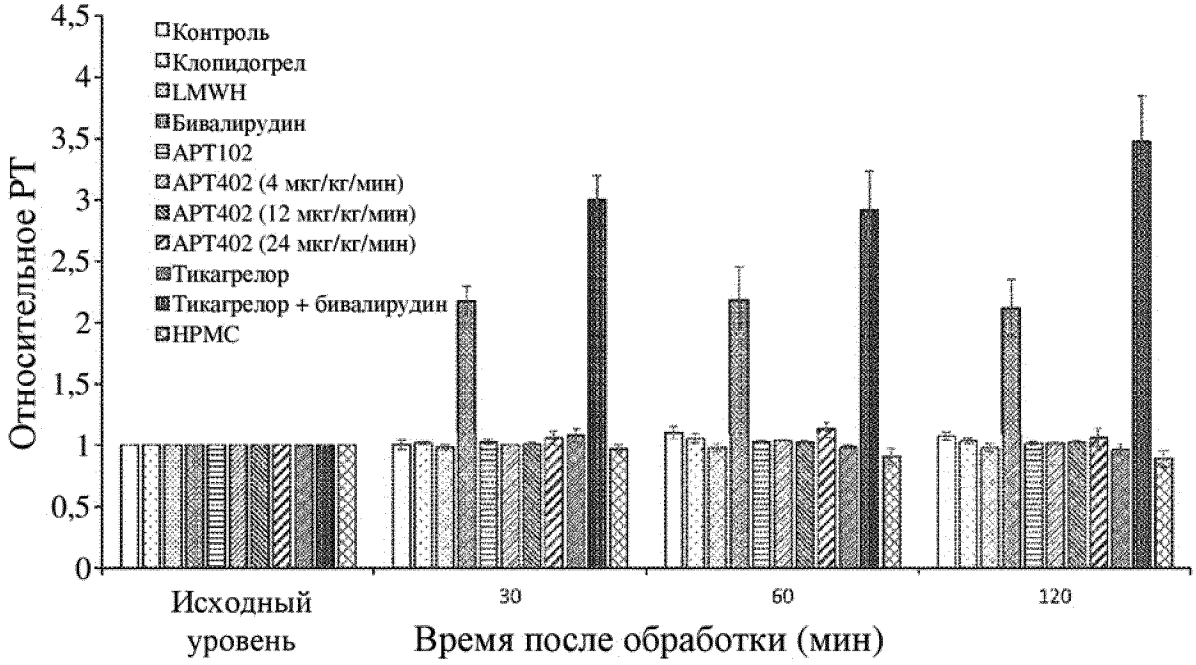

Частота окклюзии (%)
0
10
20
30
40
50
60
70
Контроль
Клопидогрел
LMWH
Бивалирудин
APT102
APT402 (4 мкг/кг/мин)
APT402 (12 мкг/кг/мин)
APT402 (24 мкг/кг/мин)
Тикагрелор
Тикагрелор + бивалирудин
HPMC

ФИГУРА 9

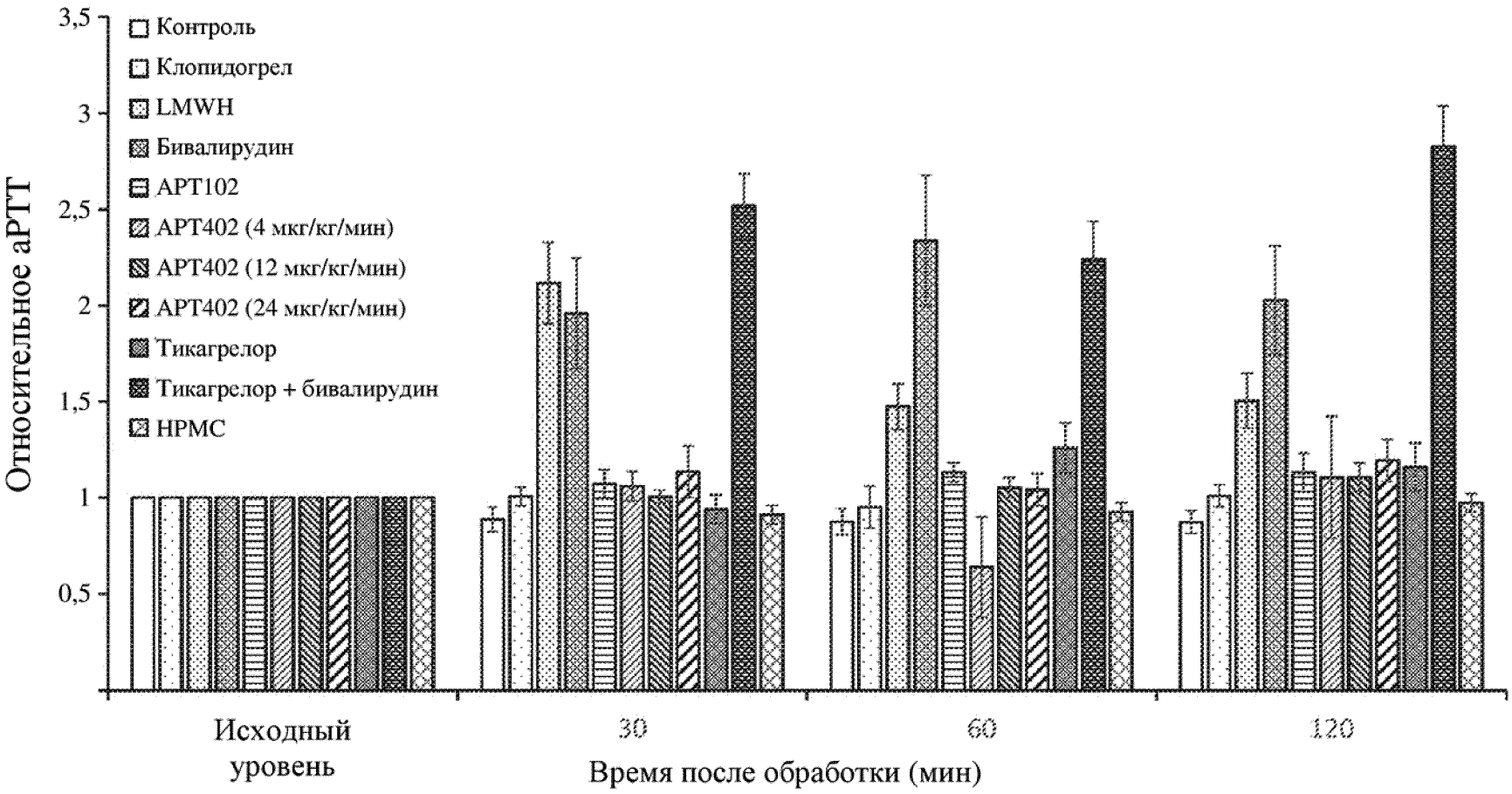

Вес артериальных тромбов (мг)
0
2
4
6
8
10
12
ФИЛУРА 10
Контроль
Клопидогрел
LMWH
Бивалирудин
APT102
APT402 (4 мкг/кг/мин)
APT402 (12 мкг/кг/мин)
APT402 (24 мкг/кг/мин)
Тикагрелор
Тикагрелор + бивалирудин
HPMC


Относительная длительность кровотечения (среднее значение ± SEM)
2,5
2
1,5
1
0,5
Контроль
Клопидогрел
LMWH
Бивалирудин
APT102
APT402 (4 мкг/кг/мин)
APT402 (12 мкг/кг/мин)
APT402 (24 мкг/кг/мин)
Тикагрелор
Тикагрелор + бивалирудин
HPMC
BSLN
30
60
120
Время после обработки (мин)

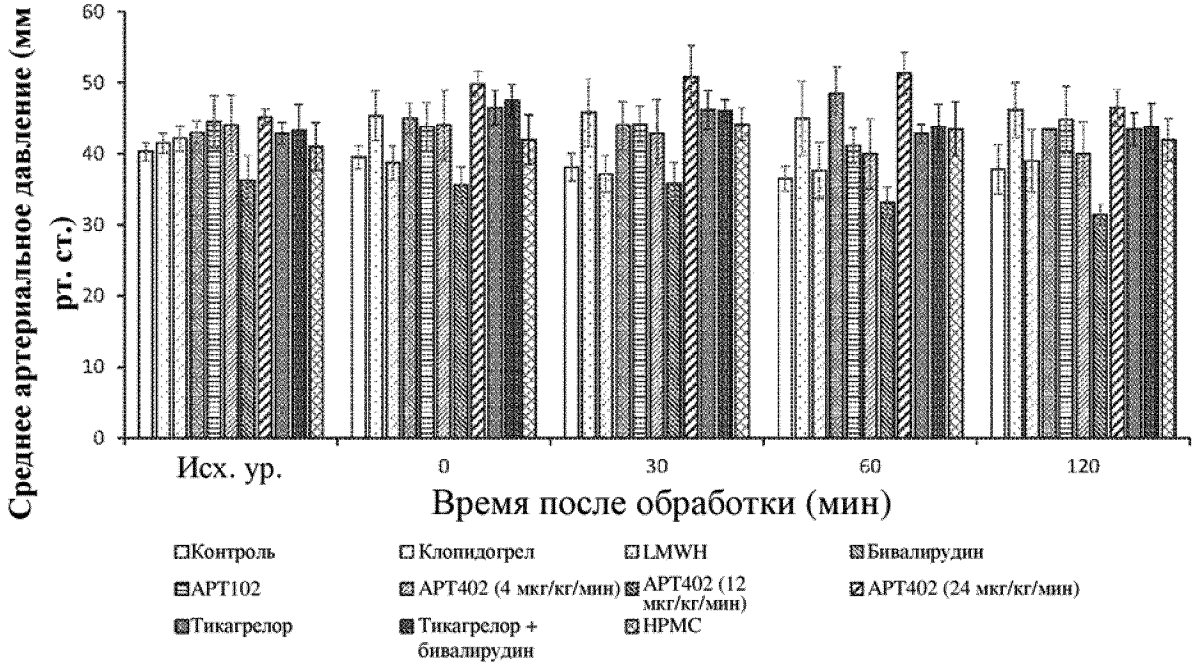
ФИГУРА 11


Относительное PT
4,5
4
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
Контроль
Клопидогрел
LMWH
Бивалирудин
APT102
APT402 (4 мкг/кг/мин)
APT402 (12 мкг/кг/мин)
APT402 (24 мкг/кг/мин)
Тикагрелор
Тикагрелор + бивалирудин
HPMC
Исходный уровень
30
60
120
Время после обработки (мин)

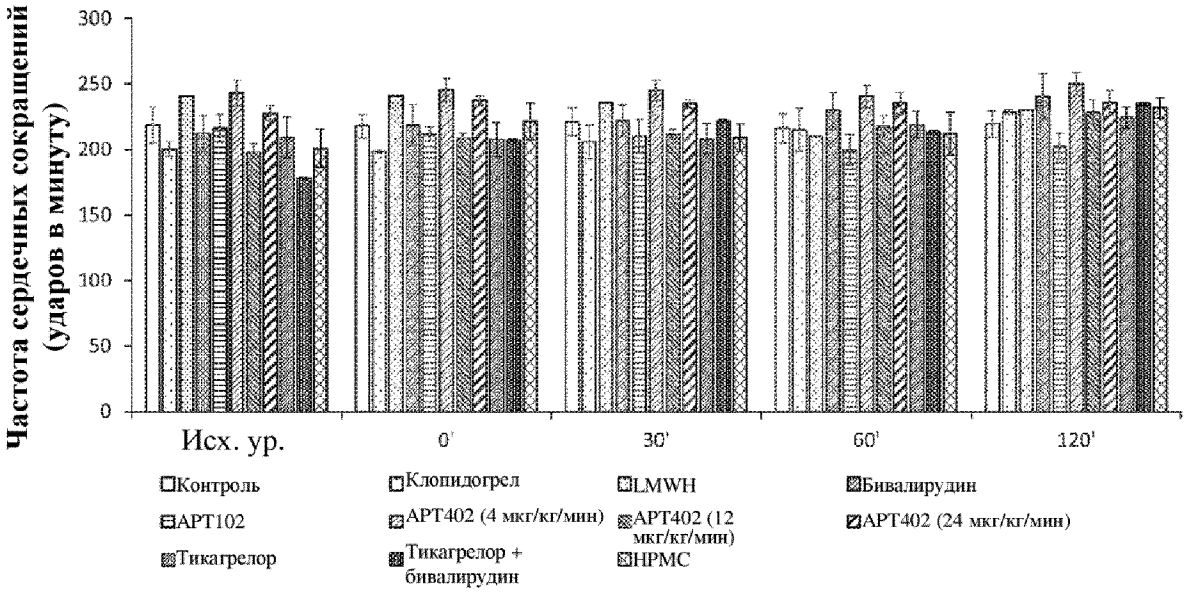
ФИГУРА 12


Относительное aPTT
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
Контроль
Клопидогрел
LMWH
Бивалирудин
APT102
APT402 (4 мкг/кг/мин)
APT402 (12 мкг/кг/мин)
APT402 (24 мкг/кг/мин)
Тикагрелор
Тикагрелор + бивалирудин
HPMC
Исходный уровень
30
60
120
Время после обработки (мин)

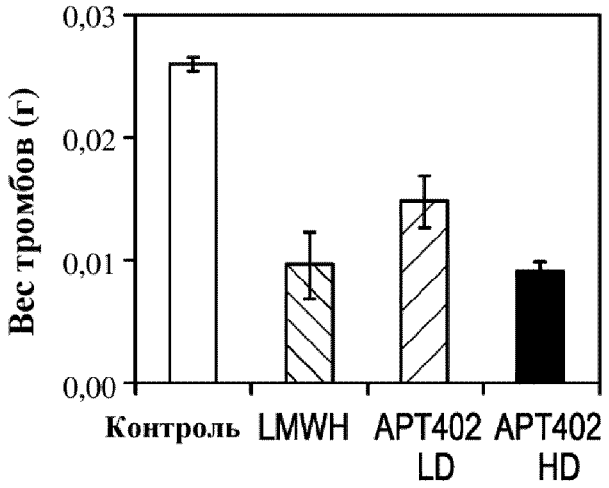
ФИГУРА 13


Среднее артериальное давление (мм рт. ст.)
60
50
40
30
20
10
0
Исх. ур.
0
30
60
120
Время после обработки (мин)
Контроль
Клопидогрел
LMWH
Бивалирудин
APT102
APT402 (4 мкг/кг/мин)
APT402 (12 мкг/кг/мин)
APT402 (24 мкг/кг/мин)
Тикагрелор
Тикагрелор + бивалирудин
HPMC

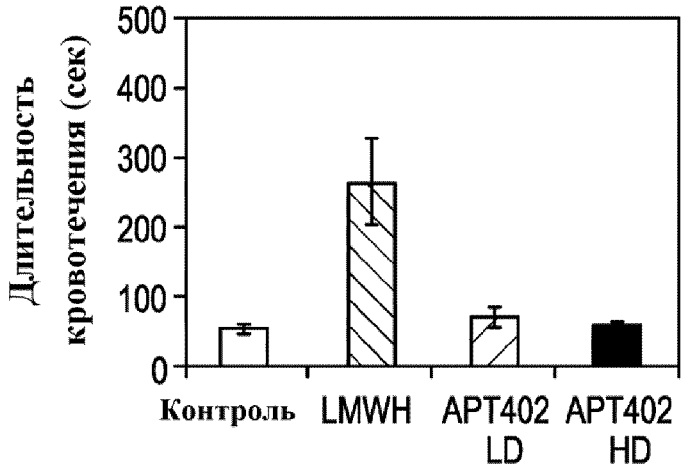
ФИГУРА 14


Частота сердечных сокращений (ударов в минуту)
300
250
200
150
100
50
0
Исх. ур.
0'
30'
60'
120'
Контроль
Клопидогрел
LMWH
Бивалирудин
APT102
APT402 (4 мкг/кг/мин)
APT402 (12 мкг/кг/мин)
APT402 (24 мкг/кг/мин)
Тикагрелор
Тикагрелор + бивалирудин
HPMC

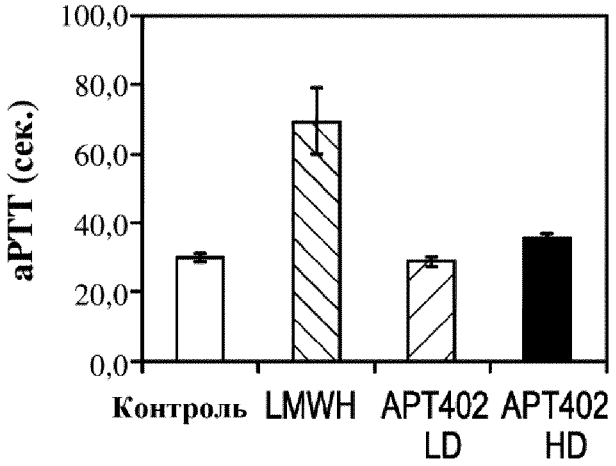
ФИГУРА 15



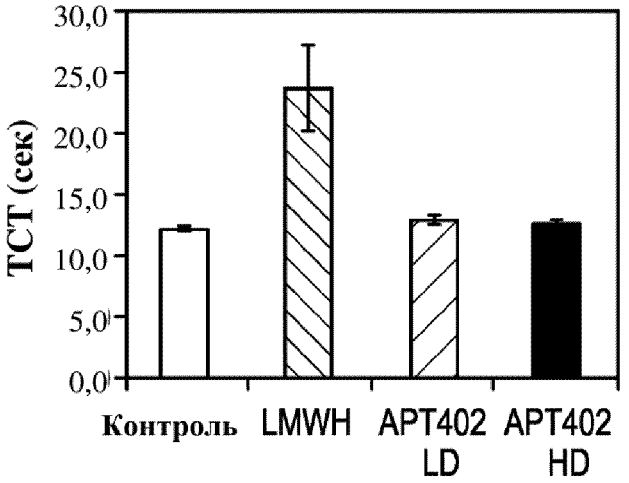
ФИГУРА 16A



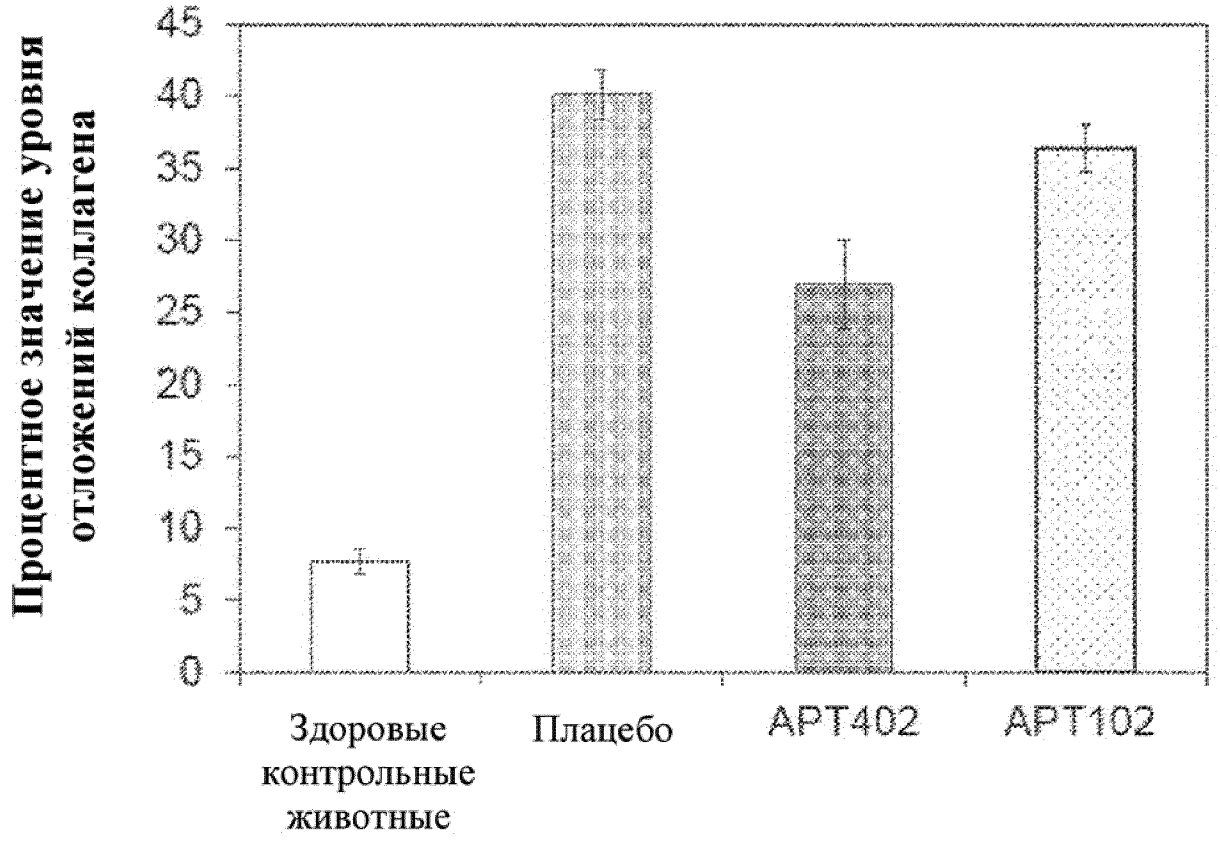
ФИГУРА 16B



ФИГУРА 16C



ФИГУРА 16D


Процентное значение уровня отложений коллагена
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
Здоровые контрольные животные
Плацебо
APT402
APT102

ФИГУРА 17