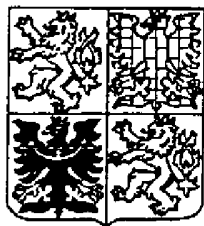


ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(21) 6-96

(13) A3

6(51)

G 01 N 33/53

(22) 22.06.94

(32) 02.07.93

(31) 93/086423

(33) US

(40) 17.07.96

(71) AMERICAN BIOGENETIC SCIENCES, INC., Copiague,
NY, US;

(72) Gargan Paul E., Southbend, IN, US;
Ploplis Victoria A., Leuven, BE;
Pleasants Julian R., Granger, IN, US;

(54) Způsob a souprava pro in vitro detekci
přítomnosti nebo množství polymerů
rozpustného síťovaného fibrinu.

(57) Způsob zahrnuje kontakt daného vzorku s protilátkou nebo jejím imunoreaktivním fragmentem, které se specificky vážou na DesAABB polymery rozpustného-síťovaného fibrinu a DesAABB polymery rozpustného nesíťovaného fibrinu za vzniku imunokomplexu, přičemž se tato protilátka nebo její imunoreaktivní fragment neváže specificky na: (a) fibrinogen, (b) produkty degradace fibrinogenu, (c) monomery DesAA fibrinu, (d) polymery DesAA fibrinu, (e) monomery DesAABB fibrinu, (f) kovalentní fibrinogen, (g) komplex monomer DesAA fibrin-fibrinogen a (h) produkty degradace fibrinu, a která dále zjišťuje přítomnost nebo množství takového imunokomplexu s použitím sekundární protilátky značené zpravodajskou molekulou indukující detekovatelný signál za účelem vyhodnocení predispozic pro trombotickou příhodu diagnostiku trombotické příhody a jejího monitorování u skupin pacientů s podezřením na infarkt myokardu, trombozu hlubokých žil, pulmonální embolii, diseminovanou intravaskulární koagulaci, mrtvici a intrakardiální trombus vzniklý v důsledku síťové fibrinace. Souprava zahrnuje standardy, obsahující polymery rozpustného síťovaného a nesíťovaného fibrinu, prostředky pro vytvoření imunokomplexu s těmito polymery a prostředky pro detekci množství imunokomplexu.

Č.j.	1021932
D0310	
25. III 96	
URAD PRŮMYŠLOVÉHO VLASTNICTVÍ	
PŘÍL.	

Název vynálezu:

Metoda a souprava pro *in vitro* detekci přítomnosti nebo množství polymerů rozpustného síťovaného fibrinu DesAABB a polymerů rozpustného nesíťovaného fibrinu DesAABB v savcích vzorcích, zahrnující kontakt daného vzorku s protilátkou nebo jejím imunoreaktivním fragmentem, které se specificky vážou na DesAABB polymery rozpustného síťovaného fibrinu a DesAABB polymery rozpustného nesíťovaného fibrinu za vzniku imunokomplexu, přičemž se tato protilátka nebo její imunoreaktivní fragment neváže specificky na: (a) fibrinogen, (b) produkty degradace fibrinogenu, (c) monomery DesAA fibrinu, (d) polymery DesAA fibrinu, (e) monomery DesAABB fibrinu, (f) kovalentní fibrinogen, (g) komplex monomer DesAA fibrin-fibrinogen a (h) produkty degradace fibrinu, a která dále zjišťuje přítomnost nebo množství takového imunokomplexu s použitím sekundární protilátky značené zpravodajskou molekulou indukující detekovatelný signál za účelem vyhodnocení predispozic pro trombotickou příhodu, diagnostiku trombotické příhody a jejího monitorování u skupin pacientů s podezřením na infarkt myokardu, trombózu hlubokých žil, pulmonální embolii, diseminovanou intravaskulární koagulaci, mrtvici a intrakardiální trombus vzniklý v důsledku síňové fibrilace.

Oblast techniky

Předmět tohoto vynálezu se vztahuje k metodě výroby monoklonálních protilátek. Tato metoda používá imunizovaná bezmikrobní živočichy. Tento vynález rovněž popisuje metodu využití těchto monoklonálních i polyklonálních protilátek získaných z imunizovaných bezmikrobních zvířat pro klinickou diagnostiku a terapii při použití *in vitro* a *in vivo*. Tento vynález rovněž popisuje monoklonální protilátky specifické proti fibrinu.

Dosavadní stav techniky

Kohler a Milstein byli první, kteří vypracovali takové techniky, které vedly k vytvoření hybridomů produkujících první monoklonální protilátky (G. Kohler a C. Milstein, 1975, Nature 256, 495-497; 1976, Eur. J. Immunol. 6, 511-519). Fúzí buněk produkujících protilátky (slezinné B-lymfocyty) s myelomovými buňkami (maligní buňky primárních nádorů kostní dřeně) vytvořili hybridomové buněčné linie odvozené od jediné hybridní fúzované buňky (nazývané hybridom nebo klon). Takovýto hybridom zdědil určité vlastnosti jak lymfocytové buněčné linie, tak i myelomové. Podobně jako lymfocyty i hybridom produkoval jednoduchý typ imunoglobulinu a navíc, stejně jako myelomové buňky měl takovýto hybridom rovněž potenciál neomezeného dělení. Kombinace těchto dvou vlastností poskytovala výrazné vylepšení v porovnání s konvenčními antiséry.

Antiséra získaná z imunizovaných zvířat jsou různorodou směsí polyklonálních protilátek, kterou nelze nikdy opětovně vytvořit tak, aby byla zcela identická s předchozí šarží. Monoklonální protilátky jsou vysoce specifické imunoglobuliny jednoduchého typu. Jednoduchý typ imunoglobulinů produkovaných hybridomem je specifický pro jednu jedinou antigenní determinantu nebo epitop na daném antigenu, tj. na složité molekule mající četné antigenní determinanty. Na příklad je-li antigenem protein, může být antigenní determinantou v celé molekule proteinu jen jedna z jeho mnoha peptidových sekvencí (obecně v délce 6-7mi aminokyselin; M.Z. Atassi, 1980, Molec. Cell. Biochem. 32: 21-43). Tudíž se mohou monoklonální protilátky vytvořené proti jedinému antigenu výrazně lišit jedna od druhé v závislosti na determinantě, která indukovala jejich tvorbu; avšak u jakéhokoli hybridomu jsou protilátky, které produkuje, naprosto identické. Navíc se hybridomová buněčná linie snadno množí *in vitro* nebo *in vivo* a poskytuje výtěžek monoklonálních protilátek o vysoké koncentraci.

Monoklonální protilátka může být použita jako sonda pro detekci jejího antigenu. Proto jsou monoklonální protilátky používány rovněž pro *in vitro* diagnostiku, na příklad v imunologických testech využívajících izotopy, nebo v enzymových imunosorpčních testech (ELISA), a v *in vivo* diagnostice, např. *in vivo* zobrazování s použitím radioaktivně značených monoklonálních protilátek. Monoklonální protilátky

mohou být rovněž použity jako prostředek pro transport léku k antigenu dané protilátky.

Nicméně, dříve než může být monoklonální protilátka použita pro takovéto účely, musí být tato monoklonální protilátka schopná vazby na svůj antigen, tj. na cílový antigen. Proto se provádí vyšetřením vytvořených hybridomů za účelem zjištění, které hybridomy, pokud takové jsou, produkují monoklonální protilátku, která je schopná vázat se na cílový antigen. Takováto vyšetřovací metoda může být velice pracná při obvykle velkém počtu monoklonálních protilátek, neboť někdy je třeba vyšetřit i několik tisíc monoklonálních protilátek než se najde hybridom, který produkuje protilátku schopnou se vázat na určitý antigen. Je tedy velice zapotřebí takové metody výroby monoklonálních protilátek, která zvyšuje pravděpodobnost, že hybridom bude produkovat protilátku pro určitý cílový antigen.

Podstata vynálezu

Předmětem tohoto vynálezu je poskytnout metodu pro výrobu monoklonálních protilátek proti antigenu. Tato metoda zahrnuje:

- (a) imunizaci bezmikrobních zvířat daným antigenem, která umožní buňkám produkujícím protilátky vytvářet protilátky proti použitému antigenu,
- (b) odebrání alespoň části těchto buněk produkujících protilátky z uvedených zvířat,

(c) vytvoření hybridomu pomocí fúze daných buněk produkujících protilátky s nesmrtelnými buňkami, přičemž vzniklý hybridom musí mít schopnost tvorby protilátky na daný antigen,

(d) množení tohoto hybridomu a

(e) sklizeň monoklonálních protilátek vyprodukovaných daným hybridomem.

Tento vynález rovněž popisuje metodu využití monoklonální nebo polyklonální protilátky získané z bezmikrobních zvířat. Dále tento vynález popisuje monoklonální protilátku specifickou proti fibrinu a metody využití těchto monoklonálních protilátek.

Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1(A)

Určení imunoreaktivity MH1 s monomerem fibrinu DesAABB pomocí afinitní chromatografie.

Obr. 1(B)

Kontrolní pokus pro potvrzení vazebné kapacity Sepharosového matrixu DesAABB monomeru fibrinu s použitím protilátky 45J specifické proti fibrinu.

Obr. 2

Imunoreaktivita nesíťovaných DesAABB polymerů fibrinu a síťovaných DesAABB polymerů fibrinu v *in vitro* testu pro rozpustné DesAABB polymery fibrinu s použitím MH1.

Obr. 3

Tvorba fibrinu DesAA reakcí plazmového fibrinogenu s batroxobinem.

Obr. 4

Imunoreaktivita rozpustných DesAABB polymerů fibrinu v testovacím systému *in vitro* pro rozpustné DesAABB polymery fibrinu s použitím MH1.

Obr. 5

Imunoreaktivita protilátky MH1 s fibrinogenem aktivovaným faktorem XIII (faktor XIIIa).

Obr. 6

Měření tvorby rozpustného polymeru fibrinu DesAABB *in vitro* s použitím testu na rozpustný fibrinu pomocí MH1 protilátky.

Obr. 7

Purifikace rozpustného fibrinu z plazmy pomocí kolony s Sepharosou - MH1.

Obr. 8

Měření rozpustných polymerů fibrinu DesAABB v krvi pacientů s bolestmi na prsou a potvrzeným infarktem myokardu.

4. PŘÍKLADY PROVEDENÍ VYNÁLEZU

4.1. Bezmikrobní zvířata

Předmět tohoto vynálezu se vztahuje na použití bezmikrobních zvířat pro výrobu monoklonálních protilátek. Bezmikrobní zvířata byla poprvé vyvinuta v druhé polovině 19. stol. a od té doby jsou v hojné míře využívána dodnes.

Bezmikrobní živočich je gnotobiot, který v sobě nemá žádné zjištěné spolužijící formy života, včetně bakterií, virů, plísní, prvoků a dalších saprofytických či parazitických forem. Gnotobiot je zvíře nebo kmen získané aseptickým císařským řezem nebo sterilním líhnutím vajíček, a které je chováno pomocí sterilních technik a neustále udržováno ve sterilní izolaci a u kterého je jeho případná fauna nebo flora přesně určena pomocí současných a přijatelných metodik. (Je třeba uvést, že všechny myši přenášejí latentní leukemický virus a tudíž myš, která by byla bez mikrobů a měla tento virus, je stále považována za bezmikrobní pro účely tohoto vynálezu).

Základem bezmikrobního systému je vytvoření bariér proti vstupu nechtěných mikrobiálních vetřelců. Kromě fyzikálních překážek z plastiku, kovu, gumy a skla, které dané zvíře uzavírají, vyžaduje tento systém i filtraci vzduchu, sterilizaci vody a potravy a manipulaci v rukavicích, což je nedílnou součástí takového bariérového systému. Rovněž přísun potřeb do izolátoru by měl probíhat ve sterilních podmínkách.

Věříme, že pro účely tohoto vynálezu mohou být použita jakákoli bezmikrobní zvířata. Nejběžnějšími bezmikrobními zvířaty jsou myši, prasata, potkani, králíci, morčata, kozy, ovce,

primáti a drůběž, přičemž nejpoužívanějšími jsou myši, především typu Balb/c.

4.2 Produkce, ošetřování a chov bezmikrobních zvířat.

Bylo vydáno mnoho publikací na téma produkce, ošetřování a chování bezmikrobních zvířat. Na příklad Wostmann, B.S., vyd. Gnotobiotics: Standards and Guidelines for the Breeding, Care and Management of Laboratory Animals, National Research Council, National Academy of Sciences, Washington, D.C. 1970; Coates, M.E., se sp., The Germfree Animal in Research, Academic Press London, 1968, a Pleasants, J.R., Gnotobiotics, v Handbook of Laboratory Animal Science, vol. 1, Melby, E.C. se sp., vyd. CRC Press, Boca Raton, Fla., 117, (1974). Na tyto objevy je dále odkazováno v textu.

Následuje souhrn odvozený z článku Wostmanna, B.S. vyd. Gnotobiotics Standards and Guidelines for the Breeding, Care and Management of Laboratory Animals (1970), National Research Council, National Academy of Sciences, Washington, D.C., ve kterém je popsána produkce, ošetřování a chování bezmikrobních potkanů a myši. Je třeba podotknout, že takováto produkce, ošetřování a chování jsou podobné pro všechna další zvířata.

LABORATORNÍ PROSTŘEDÍ

Prostory, vybavení a chovné postupy by měly být navrženy a provozovány tak, aby poskytovaly maximální

kontrolu prostředí a optimální pohodlí a zabezpečení pro daná zvířata. Klece, krmítka a pitítka by měla být navržena a sestrojena tak, aby poskytovala zvířatům maximální pohodlí, aby byla potrava i pití snadno dostupné a zároveň aby mohly být čištění a sterilizace prováděny praktickým a účinným způsobem.

Vhodné rozvržení pracovního prostoru pro rozsáhlou práci s bezmikrobními zvířaty by mělo sestávat z:

1. pracovní oblasti pro sestavování a sterilizaci izolátorů,
2. pracovní oblast pro provoz izolátorů se zvířaty
3. laboratorní část pro rutinní sledování gnotobiotického prostředí.

Takovýto plán může zahrnovat rovněž kancelář a oblast pro přípravu krmení.

Laboratorní prostředí pro provoz gnotobiotických izolátorů by mělo vyhovovat normám stanoveným pro ustájení konvenčních laboratorních hlodavců. Stavba by měla být zabezpečena proti hmyzu a stěny i podlahy by měly být chráněny před vlhkem. Osvětlení by mělo být jednotné se stejným cyklem světlo-tma v průběhu roku. Ventilace by měla rychle odstraňovat jakékoli výpary způsobené sterilizací a klima by mělo být kontrolováno následujícím způsobem.

TEPLOTA. Teploty místností 21°-27°C (70°-80°F) obecně používané pro prostory se zvířaty bude možná potřeba snížit, aby se udržela teplota izolátorů mezi 22°C a 26°C (72° a 78°F).

VLHKOST. Relativní vlhkost (RH) by se měla udržovat na pro člověka přijatelné hladině 40-60%. Avšak tam, kde se

vzduch používá pro větrání izolátorů, se doporučuje relativní vlhkost 40-50%.

VENTILACE. Pohyb vzduchu by měl být dostatečný, aby rychle odstranil jakékoli výpary vniklé během chemické sterilizace. Doporučuje se výměna vzduchu desetkrát až patnáctkrát za hodinu. Pro pracovníky vystavované nebezpečným hladinám chemických výparů by měly být k dispozici obličejové masky.

BEZMIKROBNÍ ZAŘÍZENÍ (viz Sacquiet, E. 1968, *Equipment design and management: General technique of maintaining germ-free animals*, str. 1-22 v M.E. Coates [vyd.]. *The germfree animal in research*. Academic Press, London).

Kompletní vyloučení mikrobů z prostředí vyžaduje absolutní bariery. Úspěšný provoz izolátorů je závislý na zajišťování této bariery po celý čas. V současné době se používají dva typy izolátorů - kovové a z plastů. Některé kovové části jsou konstruované tak, aby vydržely vnitřní tlak páry 20 psi (1,406g/cm²). (viz Reyniers, J.A. 1959. Design and operation of apparatus for rearing germ-free animals. Ann. N.Y. Acad. Sci. 78:47; Miyakawa, M. 1959. The Miyakawa remote-control germfree rearing unit. Ann. N.Y. Acad. Sci. 78:37). Ostatní jsou sterilizovány ve velkém autoklávu určeném pro počáteční sterilizaci (viz Gustafsson, B.E. 1959. Lightweight stainless steel systems for rearing germfree animals. Ann. N.Y. Acad. Sci. 78:17).

Izolátor z pružné folie (viz Trexler, P.C., a L.I. Reynolds. 1957. Flexible film apparatus for the rearing and use of

germfree animals. Appl. Microbiol. 5:406) je v současné době nejvíce používanou jednotkou. Je většinou vyroben z pružného laminovaného vinylu, musí být chemicky sterilizován a je snadno přizpůsobitelný specifickým požadavkům. Další typ, který je vyroben z velkého nylonového válce uzavřeného na obou koncích, může být sterilizován v autoklávu. (viz Lev, M. 1962. An autoclave plastic unit for rearing animals under germfree conditions. J. Appl. Bacteriol 25:30). Byly rovněž sestrojeny izolátory z plexiskla s odnímatelnými částmi z pružné folie. Často jsou dostatečně lehké, aby se mohly dva nebo tři umístit na jeden stojan, což je výhodné pro ušetření podlahové plochy.

Pro izolátory citlivé na vyšší teploty se většinou používají speciální válce pro sterilizaci potravy a pomůcek. Pro vysokovakuové autoklávy je zapotřebí zabezpečit rozsáhlou filtrační část, aby mohlo probíhat odčerpání vzduchu (viz Trexler, P.C. 1963. An isolator system for control of contamination. Lab. Anim. Care. 13:572). Nebo může být tento válec napojen na odpadovou rouru vyvedenou do atmosféry za účelem odvedení vzduchu a kondenzačních par během sterilizace bez vakua. (viz Jaworski, N.E., a C. Miller. 1963. Refinement of the cylinder technique for supplying germfree isolators. Lab. Animal. Care. 13:591).

STERILIZACE

Veškeré vybavení, potrava, podestýlka, voda a vzduch používané v takovém izolátoru musí být absolutně sterilní.

Používané metody a podmínky jsou dány vlastnostmi jednotlivých součástí.

Nejlepší známou metodou sterilizace je sterilizace párou pod tlakem. Tento typ sterilizace je obzvláště vhodný pro porézní předměty, které jsou stabilní ve vysokých teplotách. Veškeré plochy, které by se mohly stát úkrytem mikrobů, musí být vystaveny přímému působení páry. Doba působení závisí na použité teplotě. Doporučuje se, aby se na nejhůře přístupné části sterilizovaného materiálu (střed balíku) nechala pára působit po maximální dobu, tj. 15 minut při teplotě 121°C (250°F). Po vyzkoušení zajištění sterility mohou být použity vyšší teploty a kratší časy. Standardní velikost balení a hustota potravy, podestýlky a dalších materiálů je velice důležitým faktorem při zabezpečování konstantního a předvídatelného času potřebného pro dostatečný průnik páry sterilizovaným materiálem.

Pro sterilizaci vzduchovacích součástí izolátorů se používá suchý horký vzduch (viz Miyakawa, M. 1959. Thy Miyakawa remote-control germfree rearing unit. Ann. N.Y. Acad. Sci. 78:37; Gustafsson, B.E. 1959. Lightweight stainless steel systems for rearing germfree animals. Ann. N.Y. Acad. Sci. 78:17).

Na neporézní materiály citlivé na vysoké teploty, především na části z pružné folie, se používá kyselina peroctová (CH_3COOOH). Tato kyselina se používá v dvouprocentním roztoku se smáčecí složkou (detergentem). (viz Trexler, P.C., a L.I. Reynolds. 1957. Flexible film apparatus for the rearing and

use of germfree animals. Appl. Microbiol. 5:406). Ve zvláštních případech lze používat i další chemikálie jako chlornany, sloučeniny uvolňující jód nebo kvarterní amoniové sloučeniny pro tekuté lázně při zavádění mláďat získaných hysterektomií, či HgCl_2 pro ošetření vajec ve sterilních podmínkách před líhnutím.

Součásti, které jsou citlivé na vysoké teploty a nesmáčitelné, se používá ethylenoxid (ETO). Doba sterilizace závisí na teplotě, vlhkosti, tlaku a koncentraci ETO. ETO může chemicky reagovat s podestýlkou nebo potravinovými složkami za vzniku nežádoucích sloučenin. Vzhledem k hořlavosti a nebezpečí vzniku toxických produktů by mělo být rutinní používání ETO pro sterilizaci omezeno na použití komerčně dodávaných plynových směsí, které neobsahují více než 20% ETO.

Fiberglass filtry se běžně používají, pro sterilizaci vzduchových součástí izolátorů. Měly by fungovat jako absolutní filtry.

Membránovou filtraci tekutin lze použít, chceme-li se vyhnout vysokým teplotám, ovšem za předpokladu, že jsou tyto membrány dokonalými filtry, např. filtrem, který nepropouští částice větší než 0,22 mikrometrů v průměru.

Ozařování gama paprsky nebo svazkem elektronů lze použít pro sterilizaci potravy nebo jiných speciálních položek. Použité dávky se pohybují v rozmezí od $2,5$ do 6×10^6 rad.

VNITŘNÍ PROSTŘEDÍ

TEPLOTA. Vnitřní teplota izolátoru je funkcí laboratorního prostředí a měla by se udržovat na hodnotách mezi 22°C a 26°C (72°F-78°F).

VLHKOST. Izolátor je vystaven kondenzaci vlhkosti v případech přeplnění, nevhodného větrání, či obojího. Vzduch přicházející do izolátoru by měl mít relativní vlhkost pod 50% a nejlépe nad 40% relativní vlhkosti.

PŘÍVOD VZDUCHU. Izolátor by měl mít výměnu vzduchu dvanáctkrát až dvacetkrát za hodinu a pozitivní tlak vody 3-5 in (8-13 cm). Vzduch může být přiváděn z centrálního zdroje vzduchovacího systému nebo z výtlačných ventilátorů pro jednotlivé jednotky. Doporučuje se vzduchový kompresor turbínového typu, protože systémy s olejovými písty mají tendenci rozprašovat olej do trubek vzduchovacího systému.

U vzduchového difuzního izolátoru (viz Trexler, P.C. 1968. Equipment design and management: Transport of germ-free animal and current developments in equipment design, str. 23-35, v M.E. Coates [vyd.]. The germfree animals in research. Academic Press, London) nedochází ke ztrátě ventilace v případě výpadku elektrického proudu. Tento typ izolátoru má však nevýhodu nižšího počtu výměn vzduchu za hodinu a nedostatek ochranného kladného tlaku, který zabraňuje kontaminaci v případě malých porušení nebo výpadků bariery.

BEZPEČNOSTNÍ HLÁSIČE. V případě výpadku elektrického proudu nebo v případě mechanické poruchy by mělo vhodné zařízení zabezpečit, aby takovýto výpadek netrval

déle než pouze několik minut. Selhání nezabezpečených foliových izolátorů může v takových případech vést k udušení zvířat, ale častějším nebezpečím je možnost, že by se zvířata mohla dostat do blízkosti folie a poškodit ji. Tomu lze zabránit dočasným uzavřením vzduchového přívodu gumovými zátkami. Provoz jednotlivých vzduchovacích zařízení izolátoru vyžaduje pouze zdroj pro případ výpadku. Centrální vzduchovací systém by měl mít druhý turbinový kompresor jako rezervní zásobovač vzduchem.

Doporučuje se grafický záznam teploty a tlaku. Do vzduchovacího systému by měl být rovněž začleněn audiovizuální bezpečnostní systém, který by se spouštěl při poklesu tlaku v důsledku výpadku elektrického proudu nebo v případě mechanické závady. Podobné alarmové systémy by měly hlásit nežádoucí výkyvy teploty přívodu vzduchu. Doporučuje se grafický záznam laboratorního prostředí pro vzduchovací systémy jednotlivých izolátorů.

KLECE A VNITŘNÍ VYBAVENÍ.

VYBAVENÍ. Základní seznam vybavení izolátoru může zahrnovat klece s bezpečnostními uzávěry, láhve na vodu a násypky na krmení, ochranné plátěné rukavice pod gumové rukavice, speciální těsnění nebo uzávěr dveří, dlouhé kleště s gumou chráněnými konci, hemostaty, nůžky, ručník, gázové polštářky, čtvrtlitrové nádoby na instrumenty, čtvrtlitrové nádoby na krmení, lžice, kultivační zkumavky, papírové sáčky a vlhkuvzorné sáčky na znečištěnou podestýlku.

Klece by měly být vyrobeny z hladkého nerezového materiálu. Měly by být odolné proti tekutinám a snadno sterilizovatelné. Mezi vhodné materiály patří umělé hmoty, nerezavějící ocel a sklo. Galvanizované kovy korodují a tudíž se nedoporučují, protože i nepatrná kontaminace kovy může ovlivnit experimentální výsledky.

Rozměry klece jsou většinou omezeny rozměry vstupu do izolátoru. Minimální plocha pro myši samici a litr je 50 in² (970cm²). V mnoha případech může být zapotřebí pro jednotlivá zvířata více místa.

Tabulka 1 uvádí seznam doporučené podlažní plochy na jednu myš a potkana podle váhy skupin.

TABULKA 1

Velikost podlažní plochy doporučené na jednu myš a potkana v zajetí.

Číslo kategorie	Hmotnost (g)	Prostor zvíře (in ² /cm ²)	na Maximální počet v kleci
Myši			
1	do 10	6/40	40
2	10-15	8/50	30
3	15-25	12/75	20
4	nad 25	15/95	16

Potkani			
1	do 50	15/95	50
2	50-100	17/110	50
3	100-150	19/125	40
4	150-200	23/150	40
5	200-300	29/185	30
6	nad 300	40/260	25

RÚZNÁ DOPORUČENÍ

K zajištění integrity barierového systému se doporučují freonové testy pro zjištění malých trhlin.

Každá jednotka by měla být vybavena samostatným provozním deníkem, do kterého se chronologicky zaznamenávají veškeré procedury týkající se dané jednotky od chvíle, kdy byla sestavena a sterilizována. Tyto záznamy lze snadno připevnit do nemocničních kovových držáků označených podle čísel jednotlivých izolátorů. Tyto záznamy by rovněž měly obsahovat poznámky ohledně běžné údržby, např. o výměně rukavic. Chovatelské záznamy mohou být umístěny ve stejném držáku.

Vzhledem k nedostatku místa uvnitř izolátoru doporučujeme používat pro krmení a podestýlku a pro transport zvířat mezi jednotlivými izolátory spojenými sterilním průchodem papír a skládací zásobníky.

Uvnitř izolátoru by se nikdy neměl používat ether, protože by mohl v případě jiskry statické elektřiny explodovat. Jako tekavé nehořlavé anestetikum se doporučuje fluothan (bromochlorotrifluorethan).

KRMIVO, PODESTÝLKA A VODA. OBECNÁ DOPORUČENÍ

Měl by být k dispozici kompletní předpis komerčně vyráběného krmiva, ve kterém jsou sepsány veškeré ingredience a jejich koncentrace, ochranné látky, antioxidanty a další přísady. Mělo by být jasné vyznačeno datum výroby. Výrobce by měl zaručit, že krmivo je:

1. v rozmezí normálně přijatelných limitů přirozeně se vyskytující hormonální aktivity,
2. bez přísad obsahujících léčiva, hormony, antibiotika nebo jiné látky, které by způsobovaly abnormální fyziologické stavy nebo by narušovaly experimentální postupy,
3. bez salmonely na základě statistiky vybraných vzorků,
4. bez kontaminace hlodavci nebo hmyzem,
5. bez veškerých nevyjádřených masových zbytků nebo rybího masa, které by mohly obsahovat patogeny.

OBOHACOVÁNÍ KRMIVA

Krmivo bezmikrobních zvířat musí obsahovat více určitých živin, aby se kompenzovala ztráta vitamínů v průběhu teplotní sterilizace (zvláště určité B vitamíny a vitamíny A a D)

a nutriční hodnota proteinů (redukce dostupného lysinu, methioninu, argininu a tryptofanu). Musí rovněž poskytovat požadované živiny, které by pro běžná zvířata byly dostupné přes mikrobiální syntézu v gastrointestinálním traktu (viz Reddy, B.S., B.S. Wostmann, a J.R. Pleasants. 1968 Nutritionally adequate diets for germ-free animals, str. 87-111 v M.E. Coates [vyd.]. The germ-free animal in research. Academic Press, London). Příkladem takové výživy je L-485, levná dieta, která byla podrobena rozsáhlým testům (viz Kellogg, T.F., a B.S. Wostmann. 1969. Rat and mouse stock diet L-485. Lab. Anim. Care.) a může být komerčně vyráběna (viz Tabulka 2).

Kompenzace snížení kvality proteinů by měla být řešena spíše přidavkem specifických aminokyselin než zvýšením celkových proteinů. Zvyšování obsahu proteinů v krmivu by vedlo ke zvýšené spotřebě a vylučování vody, což by způsobovalo vyšší vlhkost a tudíž i omezenější počet zvířat, která by mohla být v izolátoru dané velikosti ustájena.

TABULKA 2

Složení diety L-485 pro potkany a myši

Ingredience	Množství v 1 kg
-------------	-----------------

DIETA

mletá žlutá kukuřice	590 g
sojové boby (syrový protein 50%)	300
alfalfa moučka (dehydratovaná, 7% protein)	35
kukuřičný olej (jednou rafinovaný)	30
NaCl	10
CaHPO ₄ ·2H ₂ O	10
CaCO ₃	5
Lysin (pro krmné účely)	5
Methionin (pro krmné účely)	5
B.H.T. (butylovaný hydroxytoluen)	0,125
směs stopových minerálů	0,25

SMĚS VITAMÍNŮ

A	26 000 IU
D ₃	1 000 IU
E (acetát tokoferolu)	225 mg
K ₃ (menadion)	90
Riboflavin	30
Kyselina panthotenová	285
Niacin	65
Chlorid cholinu	2 000

B ₁₂ (0,1 % rozmělněný v mannitolu)	2
Thiamin HCl	65
Pyridoxin HCl	20
Kyselina listová	10
Kyselina para-aminobenzoová	50

SMĚS STOPOVÝCH MINERÁLŮ (komerčních)

Mn jako oxid manganatý	65	mg
Fe jako uhličitan železnatý	20	
Cu jako měďnaté oxidy	2	
Zn jako oxid zinečnatý	15	
I jako jodid vápenatý	1,5	
Co jako uhličitan kobaltnatý	0,6	

STERILIZACE PÁROU (viz Reddy, B.S., B.S. Wostmann, a J.R. Pleasants. 1968 Nutritionally adequate diets for germ-free animals, str. 87-111 v M.E. Coates [vyd.]. The germ-free animal in research. Academic Press, London).

Použité postupy budou záviset na dostupném zařízení. Obecně jsou důležité tři faktory:

1. Předsterilizační vakuum, je-li to možné, o nejméně 50 cm.Hg, které tak pomáhá průniku páry krmivem v autoklávu nebo ve válci vyvedeném do atmosféry. Vakuum 70 cm.Hg nebo více se doporučuje tam, kde není pomocný válec vyveden do atmosféry.

2. Využití nejkratší sterilizační fáze, která zaručí absolutní sterilitu, s dalšími bezpečnostními omezeními danými

zařízením a zkušenostmi. Teploty měřené uprostřed krmiva by měly dosáhnout nejméně 121°C (250°F). Při této teplotě by měla fáze skutečné sterilizace trvat nejméně 15 minut. S vyššími teplotami sterilizace se bude doba sterilizace zkracovat.

3. Posterilizační vakuum urychlí snižování teploty krmiva. Tím se zamezí zbytečnému tepelnému poškození živin. Nicméně konstrukce a výkon přístroje musí být takového druhu, aby nedocházelo k únikům během této fáze provozu.

Při parové sterilizaci krmiva je cílem vyhnout se neúplné sterilizaci a zbytečným poškozením živin způsobeným nadměrně prodlouženým zahříváním. I když jsou některé nutriční ztráty nevyhnutelné, poměrně přijatelných výsledků může být dosaženo při správném využití:

(a) technických postupů jako je teplota, doba předsterilizačního a posterilizačního vakua a velikost pelet.

(b) obsahu vody v krmivu. Zvýšení obsahu vody vede k lepší obnově vitamínů B po sterilizaci (viz Zimmerman, D.R., a B.S. Wostmann. 1963. Vitamin stability in diets sterilized for germfree animals. J. Nutr. 79:318). U pevného krmiva se doporučuje obsah vody do 25% nebo až do výše, která se ukázala jako vyhovující pro skladovací podmínky a kvalitu krmiva. Po změnách obsahu vody v krmivu by měly následovat testy na rychlost, za jakou dosáhne krmivo sterilizační teploty.

STERILIZACE RADIACÍ (viz Reddy, B.S., B.S. Wostman, a J.R. Pleasants. 1968. Nutritionally adequate diets for germ-free animals, str. 87-111 v M.E. Coates [vyd.]. The

germfree animals in research. Academic Press, London; Ley, F.J., J. Bleby, M.E. Coates, a J.S. Paterson. 1969. Sterilization of laboratory animal diets using gamma radiation. Lab. Anim. 3:221).

Techniky a dozimetrie budou záviset na zařízení a typu záření. I když se obecně předpokládá, že sterilizace radiací vede k menšímu poškození živin, přesto se v současné době doporučuje sterilizovat krmivo parou.

TESTY NA STERILITU.

Pro sledování sterility dosažené kteroukoli specifickou sterilizační technikou se doporučuje použití testovacích proužků obsahujících spory *Bacillus stearothermophilus*. Tyto proužky by měly být umístěny uvnitř krmiva. Rovněž izolátor a jeho zvířata by měla být pravidelně podrobována mikrobiologickým testům. Takovéto monitorování je nezbytné pro zjištění náhodných kontaminací způsobených prolomením bariéry izolátoru nebo nedostatečnou sterilizací izolátoru a jeho obsahu.

Tato vyšetření se mohou provádět podle popisu ve Wostmann, B.S., vyd., Gnotobiotics: Standards and Guidelines for the Breeding Care and Management of Laboratory Animals, National Research Council, National Academy of Sciences, Washington, D.C., 1970, str. 28-39.

ODHAD NUTRIČNÍCH ZTRÁT BĚHEM STERILIZACE

Jako užitečná kontrola ztrát životně důležitých živin se doporučuje určení thiaminu extrahovatelného kyselinou jako

ukazatele obnovy thiaminu přidaného do krmiva (viz Wostmann, B.S. a P.L. Knight. 1960. The effect of methyl alcohol on the conversion of thiamine to thiochrome. Experimentia 16:50). Obnova méně než 25% ukazuje na výrazné snížení nutriční kvality krmiva. Při správném zacházení a vhodném zařízení by se mělo dosáhnout obnovy 50% a více.

USKLADNĚNÍ PEVNÉHO KRMIVA

Protože experimenty s bezmikrobními zvířaty jsou obecně velice nákladné, nemělo by se nikdy používat krmivo, u kterého se výrazně snížila jeho nutriční hodnota. Doporučuje se, aby se (a) nesterilizované krmivo přechovávalo vždy v chladnicích a nikdy ne déle než jeden měsíc, a aby (b) byla doba skladování krmiva uvnitř izolátoru jeden týden nebo méně, nikdy však aby nepřekročila deset dnů.

PODESTÝLKA

Podestýlka by se měla vyměňovat nejméně jednou týdně. Jako podestýlka se doporučuje materiál, který lze snadno sterilizovat a který není zvířaty ochotně konzumován. Sterilizací takového materiálu by neměly vznikat toxické sloučeniny. Doporučují se hobliny a piliny borovice vejmutovky. Rovněž jsou přijatelné lipové a topolové piliny nebo drcené kukuřičné klasy. Rozsivkové výrobky, cedrové pryskyřičné dřevo a tvrdé dřevo se nedoporučují. Sterilizace ethylen-oxidem by se neměla používat, dokud nejsou vyřešeny otázky ohledně možností vzniku škodlivých sloučenin.

VODA

Pitná voda musí být sterilizována. Může být autoklávována ve čtvrtlitrových láhvích, Masonových láhvích nebo nádržkách připevněných k izolační jednotce. V každé nádobě musí být ponecháno trochu vzduchu.

PRINCIPY ZÍSKÁVÁNÍ GNOTOBIOTŮ CÍSAŘSKÝM ŘEZEM

Úspěch každého císařského řezu částečně závisí na dodržení plné doby březosti. Toto platí částečně pro zvířata s krátkým obdobím březosti, kdy může plod nabýt 20% své hmotnosti v průběhu posledních 24 hodin před porodem. Dobré výsledky dává načasování páření, ale u zvířat, která mívají početné vrhy (potkani a myši), bývá užitečné počkat na narození prvního mláděte a teprve pak začít s císařským řezem. U morčat je nejúspěšnější metodou výběr samic vhodných pro operaci a měření rozestupu jejich stydkých kostí (viz Philips, B.P., P.A. Wolfe, a H.A. Gordon. 1959. Studies on rearing the guinea pig germfree. Ann. N.Y. Acad. Sci. 78:183).

Mláďata získaná císařským řezem musí být umístěna do bezmikrobního prostředí ještě před tím, než se poprvé nadechnou. Mohou být převzaty přímo z matky hysterotomií přes sterilní ohraničenou barierovou membránu do sterilního izolátoru nebo hysterektomií přes germicidní lázeň do sterilního izolátoru. Obvyklá předoperační příprava samice předcházející císařskému řezu zahrnuje odstranění abdominálního osrstění a desinfekci operačního místa. Anestezie se u potkanů a myši

provádí nejčastěji dislokací krčních obratlů, i když lze použít i lokální anestetikum do abdominální linie nebo celková anestezie bez vzniku nebezpečí vážnějšího ohrožení plodu a úmrtí. U morčat se chirurgický zákrok provádí po podání uklidňujících prostředků a při lokální anestezii.

Porod mláďat hysterotomií přes barierovou membránu vyžaduje speciální vybavení izolátoru. Reynierova chirurgická jednotka z nerezavějící oceli (viz Reyniers, J.A. 1965. Germfree life methodology (gnotobiotics) and experimental nutrition. p. 458-466 v Proc. 3rd Internat. Congr. Biochem., Bruxelles) má vestavěný horizontální kovovou přepáž, která odděluje horní a dolní část jednotky. Přepážka obsahuje i kruhový otvor pokrytý mylarovou plastikovou folií, která udržuje integritu horního kompartmentu. Samice připravená k operaci se umístí do dolní části tak, že její abdominální část je natlačena na folii. Veškeré chirurgické nástroje jsou v horním kompartmentu a operace se provádí ve sterilním prostředí. Incize se provede skrz plastik a kůži skalpelem nebo elektrokauterem. Pro řez kůží je lepší samosterilizující elektrokauter. Okraje kůže a mylaru jsou sesvorkovány a odhrnuty. Abdomen je pak překryt sterilní rouškou, aby se zakryly okraje řezu, a na odkryté svalstvo se aplikuje teplý dezinfekční prostředek (benzalkonium chlorid v ředění 1:1 000) před vlastním otevřením břišní dutiny. Operátor musí dát velký pozor především na to, aby neprořízl střeva. Může být užitečné vložit svorky nebo hemostaty mezi peritoneální stěnu a vnitřnosti. Po té je otevřena děloha a mláďata vyjmuta.

Plodové obaly se odstraní, pupeční šňůra zaškrtí a přestřihne. Mláďata jsou jemně osušena a masírována, aby se stimulovalo dýchání. Pak jsou mláďata přenesena do chovné jednotky, kde jsou krmena náhradní matkou nebo ručně. Operační otvor může být opět překryt novým plátkem mylaru a postup se může opakovat. Tímto způsobem může být odoperováno 5 až 6 samic bez vážnějšího nebezpečí kontaminace. Císařský řez může být rovněž proveden s použitím plastického izolátoru nebo rukavicového sáčku jako chirurgické jednotky. Vnější povrch podlahy izolátoru je předsterilizován a abdomen zvířete je na něj přitlačen, takže slouží ke stejnému účelu jako arch mylaru v předchozím případě. Po operaci může být naříznutá plastická bariéra uzavřena sterilní lepicí páskou a operace opakována na dalších březích samicích.

Při používání plastických izolátorů je běžnější získávání mláďat hysterektomií (viz Foster, H. 1959. A procedure for obtaining nucleus stock for a pathogen-free animal colony. Lab. Anim. Care 9:135). Děloha je asepticky vytažena a zasvorkována přesně před děložním hrdlem. Vyříznutá děloha je přenesena do bezzárodkové jednotky přes tekutou germicidní lázeň. Jakmile je již v izolátoru, jsou mláďata vyjmuta co nejrychleji, aby se zabránilo vdechnutí plodových tekutin. Za normálních okolností jsou osušena a dýchají ještě před zaškrcením a odstřížením pupeční šňůry. Pak jsou mláďata předána náhradní matce nebo krmena ručně.

Hysterektomii lze úspěšně provádět u myší, potkanů a prasnic. U morčat se však dává přednost hysterotomii, protože

dochází k častému úhynu mláďat, pokud uplynou dvě a více minut mezi oddělením mláďat od krevního řečiště matky a porodem v izolátoru.

CHOVNÉ SYSTÉMY PRO GNOTOBIOTICKÉ KOLONIE INBREDNÍ KMENY

Obvyklé páření bratr x sestra, které se používá pro konvenční chovné kolonie, může být použito rovněž pro kolonie gnotobiotické.

NEINBREDNÍ PLEMENA

Pravé nahodilé množení zahrnuje i páření sourozenců a prvních bratranců a sester. Ačkoli se takovému páření snažíme za normálních okolností vyhnout u neimbredních chovných kolonií, nesnižuje výsledný systém páření míru inbridingu na maximum. Může být použit jakýkoli systém minimálního inbridingu. (viz Falconer, D.C. 1967. Genetic aspects of breeding methods. str. 72-96 v The UFAQ handbook on the care and management of laboratory animals, 3. vyd., E. a S. Livingstone, Ltd., London; National Research Council, Institute for Laboratory Animal Resources. 1969. A guide to genetic standards for laboratory animals. National Academy of Sciences, Washington, D.C.).

SROVNATELNÉ KONVENČNÍ A GNOTOBIOTICKÉ KOLONIE.

Je vhodné udržovat jak konvenční, tak gnotobiotické kolonie, a to za účelem srovnání. Jejich podobná genetická konstituce

může být udržována zaváděním vrhů získaných císařským řezem v efektivní chovné populaci konvenční kolonie do kolonie gnotobiotické. To je zjevně vhodná metoda pro ty výrobce, kteří dávají přednost produkci negnotobiotických potkanů a myši, ale mají tu nevýhodu, že musí zabránit vytvoření mikrobiálního rodokmene, který by zjednodušoval mikrobiologické monitorování. V ideálním případě by se mohly jako chovná zásoba pro konvenční kolonii používat vrhy ze specifických páření a každý další vrh z každého takového páření by sloužil jako chovná zásoba pro gnotobiotickou kolonii. Jestliže se tento postup dodržuje každou druhou nebo třetí generací, neměla by se genetická konstituce obou kolonií příliš lišit, pochopitelně za předpokladu, že se v obou koloniích používá stejný systém páření.

Vrhy z efektivní chovné zásoby gnotobiotické kolonie mohou být popřípadě použity k založení nebo doplnění konvenční kolonie. Genetické důsledky budou totožné za předpokladu, že budou dodržovány stejné postupy.

VEDENÍ ZÁZNAMŮ (viz Wolff, G.L. 1967. Practical mating systems and record-keeping in a breeding colony, str. 97-113 v UFAW handbook on the care and management of laboratory animals, 3.vyd. E. a S. Livingstone, Ltd., London).

O chovu zvířat a provozu izolátoru by měly být vedeny řádné záznamy. Záznamy o zvířatech by měly uvádět efektivitu provozu a biologický výkon zvířat. Záznamy o izolátoru by měly obsahovat chronologické pořadí událostí týkajících se

izolátoru, čímž se usnadní vyhledávání příčin porušení bariéry v případě kontaminace.

4.3. Bezantigenní zvířata

V hlavním provedení tohoto vynálezu se vyžaduje, aby byla bezmikrobní zvířata živena chemicky definovanou (CD), nízkomolekulární, ve vodě rozpustnou a ultrafiltrovanou potravou. Předpokládá se, že takovéto krmení umožňuje získat absolutní kontrolu příjmu živin a antigenů zvířaty. Takové krmivo je většinou vyrobeno tak, že veškeré jeho ingredience lze chemicky určit, např. aminokyseliny, jednoduché cukry, lipidy, vitamíny a minerály. Pro účely tohoto vynálezu obsahuje takovéto chemicky definované krmivo aminokyseliny, jednoduché cukry, lipidy, vitamíny a minerály a neobsahuje žádné další složky o molekulové hmotnosti vyšší než 10 000 daltonů. Takže veškeré složky CD krmiva mají nízkou molekulovou hmotnost a jsou živinami přirozeně obíhajícími ve zvířatech a tudíž se má za to, že takovéto složky nebudou stimulovat imunitní odpověď. Literatura z poslední doby uvádí bezmikrobní zvířata krmená CD krmivem jako "bezantigenní zvířata".

Rovněž se doporučuje používat filtrační papír jako podestýlku, protože by bezmikrobní zvířata mohla jíst podestýlku, což vede k vyvolání imunitní odpovědi.

Určité CD krmivo pro daný druh využívá tyto složky v takových poměrech a množstvích, aby vyhovovaly nutričním

požadavkům známým pro daný druh. Složení a příprava vhodného CD krmení pro bezmikrobní myši je následující:

Složení a příprava chemicky definovaného krmení L489E14Se

Složka	Množství (gramy/100 g složky)
--------	-------------------------------

K 192 ml Milli-Q vody o teplotě 70°C se přidá následující:

Leucin	1,9
Fenylalanin	0,74
Izoleucin	1,08
Methionin	1,06
Tryptofan	0,37
Valin	1,23
Asparagin	0,91
Arginin HCl	0,81
Threonin	0,74
Lyzin HCl	1,77
Histidin HCl	0,74

Roztok se ochladí na 45°C a přidá se následující:

Glycin	0,59
Prolin	1,48
Serin	1,33
Alanin	0,59
Glutamát sodný	3,40
L-tyrozin ethylester HCl	0,62

Glukonát železnatý	0,05
Soli 35D ¹	0,105
Selenit sodný ²	0,074

Roztok se dále ochladí na 5°C a přidá se následující:

Glycerofosfát vápenatý	5,22
Glycerofosfát hořečnatý	1,43
Chlorid vápenatý 2H ₂ O	0,185
(KI) směs (obsahující 680 mg KI)	0,086
Vitamin B směs 111E5 ³	0,09
Vitamin B12 ⁴	1,20 mg
Cholinchlorid	0,31
Octan sodný	1,85

Ke 108 ml Milli-Q vody o teplotě 70°C byla přidána bezvodá
D-Dextrosa 71,28

Roztok byl ochlazen na 5°C a oba byly smíchány a
ultrafiltrovány.

¹Složení solí směsi 35D je uvedeno v tabulce 3

²Přidáno jako přídavek k selenanu sodnému v solích 35D

³Složení směsi 111E5 vitaminů B je uvedeno v tabulce 4

⁴Přidáno jako přídavek k vitamínu B-12 ve směsi 111E5
vitaminů B

Touto směsí jsou myši nebo potkani krmeni *ad libitum*.

Složení lipidového přídatku LADEK 69E6

Složka	Denní dávka pro dospělého jedince* (0,385ml)
--------	---

Purifikované sojové triglyceridy	0,33g
Retinylpalmitát	6,45 (11.7 I.U.)
Cholekalciferol	0,0288mg(1.15 I.U.)
2ambo-alfa-tokoferol	3,3mg
2ambo-alfa-tokoferol acetát	6,6mg
Fyllochinon	72mg

*Kojící samice obdrží dvojnásobek normální dospělé dávky.

¹Skládající se z: 12% palmitátu

1,5% stearátu

24% oleátu

55% linoelátu

8% linoleátu

Podrobný popis krmiva CD viz Pleasant, J.R., se sp., J. Nutr., **116**: 1949-1964 (1986), Pleasant, J., se sp., Germfree Research: Microflora Control and Its Application to the Biomedical Sciences, B.S. Wostmann, vyd., str. 87, Liss, New York (1985); Wostmann, B.S., se sp., J. Nutr. **112**: 552 (1982); a Pleasant, J.R., se sp., J. Nutr. **100**: 498 (1970), jejich poznatky jsou zde uvedeny v odkazech.

4.4. Produkce monoklonální protilátky

Takovýto bezmikrobní živočich je potom použit pro výrobu monoklonální protilátky. Bezmikrobní systém může být použit k výrobě monoklonální protilátky proti jakémukoli antigenu, který by takový živočich v bezmikrobním stavu mohl produkovat. Seznam příkladů antigenů se objevuje v U.S. patentu č. 3,935,074. Nicméně lze předpokládat, že u takového bezmikrobního zvířete vyvolává antigen mnohem silnější imunitní odpověď. Proto lze zvýšit pravděpodobnost vypátrání B-lymfocyty, který produkuje protilátku schopnou vazby na specifický epitop daného antigenu. To je hlavní výhodou tohoto vynálezu. Navíc se věří, že takovýto bezmikrobní systém je zvláště užitečný při tvorbě vysoce specifických protilátek proti těm antigenům, které mají četné epitopy.

Bezmikrobní živočich může být imunizován standardními technikami. Nicméně je lepší, aby bylo bezmikrobní zvíře imunizováno třikrát s nejméně třítýdenními přestávkami mezi jednotlivými injekcemi, po kterých následuje přeočkování posilovací dávkou. Věří se, že tato zvýšená hladina imunizace je zřejmě nezbytná, protože bylo pozorováno, že po dvou imunizacích, které jsou běžné, lze nalézt stále většinou B-lymfocyty sekretující IgM spíše než požadované B-lymfocyty se sekrecí IgG.

4.5 Somatické buňky

Somatické buňky bezmikrobních zvířat, které mají potenciál pro produkci protilátek a které, zvláště pak B lymfocyty, jsou

vhodnými buňkami pro fúzi s myelomovou linií B buněk. Nejlépe fúzí ty buňky produkující protilátky, které jsou ve stadiu dělení. Somatické buňky mohou být získány z lymfatických uzlin, sleziny a periferní krve vybraných bezmikrobních zvířat. Výběr lymfatických buněk závisí ve velké míře na jejich empirické užitečnosti v určitém fúzním systému. Většinou jsou však používány somatické buňky získané ze sleziny. Jakmile je bezmikrobní zvíře imunizováno nebo hyperimunizováno, může být zdrojem lymfocytů produkujících protilátky. Myší lymfocyty poskytují vyšší procento stabilních fúzí s myšími myelomovými buňkami. Je však možno použít protilátky produkující buňky z jiných živočichů. Výběr typu bezmikrobního zvířete záleží na volbě antigenu, protože je důležité, aby dané bezmikrobní zvíře mělo ve svém repertoáru B lymfocyty, které by byly schopny produkovat protilátky proti danému antigenu.

4.6. Nesmrtelné buňky

Z lymfatických národů byla vypěstována speciální linie buněk, které se používají při přípravě hybridomů pomocí fúze buněk (G. Kohler a C. Milstein, 1976, Eur. J. Immunol. 6:511-519); M. Schulman se sp., 1978, Nature 276:269-270). Tato buněčná linie byla vypěstována nejméně ze tří důvodů. Prvním důvodem je provádění selekce fúzovaných myelomových buněk. Ta se obvykle provádí pomocí myelomů deficientních na enzym, takže nejsou schopny přežít na určitých selektivních mediích, která podporují růst hybridomů. Druhý důvod vyplývá z dědičné

vlastnosti buněk lymfatických nádorů produkovat své vlastní protilátky. Účelem použití monoklonálních technik je získání nesmrtelné fúzované hybridní buněčné linie, která produkuje požadovanou samostatnou specifickou protilátku geneticky řízenou tou složkou hybridomu, která pochází ze somatické buňky. Aby se vyloučila produkce protilátek nádorových buněk hybridomy, používají se myelomové buněčné linie bez schopnosti produkce lehkých nebo těžkých imunoglobulinových řetězců nebo buňky, které jsou deficientní na sekreční mechanismy. Třetím důvodem výběru těchto buněčných linií je jejich vhodnost a účinnost při fúzích.

Pro přípravu fúzovaných buněčných hybridů může být použito několik linií myelomových buněk včetně NS-1, X63-Ag8, NIS-Ag4/1, MPC11-45.6TG1.7, X63-Ag8.653, Sp2/0-Ag14, FO a S194/5XX0.Bu.1. Všechny tyto buněčné linie byly získány z myši a buňky 210 -RCY3.Agl.2.3 byly získány z potkanů (G.J. Hammerling, U. Hammerling a J.F. Kearny, 6.vyd., 1981, Monoclonal antibodies and hybridomas v J.L. Turk, vyd. Research Monographs in Immunology, vol. 3., Elsevier/North Holland Biomedical Press, New York).

4.7. FÚZE

Metoda přípravy hybridomů ze slezinných buněk produkujících protilátky nebo buněk lymfatických žláz a nesmrtelných buněk obvykle zahrnuje smíchání somatických buněk s nesmrtelnými buňkami v poměru, který se může měnit od 20:1 až k okolo 1:1 v přítomnosti činidla nebo činidel (chemických, virových nebo

elektrických), která podporují fúzi buněčných membrán. Je lepší, aby jako zdroj somatických a nesmrtelných buněk použitých pro fúzi byl stejný živočišný druh. Metody fúze byly popsány Kohlerem a Milsteinem (1975, Nature 256: 495-497; 1976, Eur. J. Immunol. 6: 511-519), dále Gefterem se sp. (1977, Somatic Cell Genet. 3: 231-236) a Kozborem se sp., (1983, Immunology Today 4: 72). Jako činidla podporující fúzi používali tito vědci Sendai virus a polyethylenglykol (PEG).

Lze rovněž použít nedávno vyvinutou EBV-transformační techniku (Cole se sp., 1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., str. 77-96).

4.8. IZOLACE KLONŮ A DETEKCE PROTILÁTKY

Fúze většinou poskytují životaschopné hybridy ve velice nízkém počtu kolem 1×10^{-6} až 1×10^{-8} . Vzhledem k této nízké četnosti získaných přežívajících hybridů je užitečné mít metodu, jak fúzované hybridomy vyselektovat ze zbývajících nefúzovaných myelomových buněk. Je rovněž nezbytné mít způsob, jak mezi ostatními fúzovanými buněčnými hybridy určit hybridomy, které produkují požadovanou protilátku.

Fúzované buňky jsou obvykle pěstovány na selekčním mediu, jakým je na příklad HAT medium, které obsahuje hypoxantin, aminopterin a thymidin. HAT medium umožňuje proliferaci hybridních buněk a zabraňuje růstu nefúzovaných myelomových buněk, které by se jinak dále neomezeně dělily. Aminopterin blokuje syntézu purinu a pyrimidinu *de novo* inhibicí produkce tetrahydrofolátu. Přídavek thymidinu

způsobuje překlenutí zablokované syntézy pyrimidinu a hypoxantin je do media přidáván, aby mohly inhibované buňky syntetizovat purin při použití alternativní dráhy syntézy nukleotidů. Používané myelomové buňky jsou mutanti postrádající hypoxantin-fosforibosyl transferázu (HPRT) a tudíž nemohou využívat tuto alternativní dráhu. V přežívajících hybridech poskytuje B lymfocyt genetickou informaci potřebnou pro produkci tohoto enzymu. Protože samotné B lymfocyty mají omezenou životnost v kultuře (přibližně dva týdny), jsou jedinými buňkami, které se mohou v HAT mediu množit, hybridní buňky vytvořené z myelomových a slezinných buněk.

Směs fúzovaných myelomových buněk a B lymfocytů je naředěna v HAT mediu a pěstována na vícejamkových mikrotitračních destičkách, aby bylo možno testovat protilátky produkované hybridními buňkami a aby se zabránilo přerůstání některých hybridních buněk přes druhé. Za dva až tři týdny jsou hybridní klony pozorovatelné v mikroskopu a může být z jednotlivých jamek odebrán tekutý supernatant, aby se otestovaly specifické protilátky vyprodukované jednotlivými hybridomy.

Test musí být citlivý, jednoduchý a rychlý. Testovací techniky zahrnují imunologické testy využívající izotopy, enzymy, testy cytotoxicity, a plakové testy.

4.9. Dělení buněk a produkce protilátky

Jakmile jsou požadované hybridní buňky vybrány a vyklonovány do jednotlivých buněčných linií produkujících

protilátky, může se každá buněčná linie množit jedním ze dvou standardních způsobů. Vzorek hybridomu může být injikován do histokompatibilního zvířete stejného druhu, jaký byl použit pro získání somatických a myelomových buněk pro počáteční fúzi. U naočkovanych zvířat se vyvinou nádory produkující dané specifické monoklonální protilátky produkované fúzovaným buněčným hybridem. Od takového zvířete mohou být odebírány tělesné tekutiny jako sérum a ascitová tekutina, ze kterých lze získat dané protilátky ve vysokých koncentracích. Alternativním způsobem je množení těchto jednotlivých buněčných linií *in vitro* v laboratorních kultivačních miskách. Z kultivačního media obsahujícího vysoké koncentrace samotné specifické monoklonální protilátky se může tato protilátka sklízet buď dekantací, filtrací nebo centrifugací.

4.10. Využití monoklonálních protilátek

Tyto monoklonální protilátky vyrobené postupem, který je předmětem tohoto vynálezu, mohou být využity jakoukoli dosud známou nebo v budoucnosti vyvinutou technikou, která využívá monoklonální protilátky.

Hlavní využití monoklonálních protilátek je v imunotestech, které měří reakci antigenu s protilátkou. Takové testy jsou obvykle heterogenní nebo homogenní. V homogenním testu zahrnuje imunologická reakce obvykle specifickou protilátku, značený antigen a zkoumaný vzorek. Signál vzniklý na značeném antigenu je přímo či nepřímo

upraven podle vazby protilátky na značený antigen. Jak imunologická reakce, tak i její detekce v uvedeném rozsahu, jsou prováděny v homogenním roztoku. Imunologické značení používané pro takovéto testy zahrnuje volné radikály, fluoreskující barvy, enzymy, bakteriofágy, koenzymy, a podobně. Hlavní výhodou imunoanalýzy je, že není třeba separovat specifické protilátky od značených antigenů.

V heterogenních imunotestech jsou reagujícími látkami obvykle testovaný vzorek, specifická protilátka a prostředek pro tvorbu určovatelného signálu. Vzorek se obvykle umístí na nějaký povrch jako třeba laboratorní misku nebo sklíčko a buď tato pevná podpůrná fáze, nebo tekutá fáze jsou poté testovány na přítomnost signálu pomocí prostředků, které takový signál měří. Tento signál vzniká v závislosti na přítomnosti značené látky ve vzorku. Mezi prostředky produkující detekovatelný signál patří využitelné radioaktivního značení, fluoreskující činidla, enzymy, a podobně. Příkladem heterogenních imunoanalýz jsou radioimunoanalýzy, imunofluorescenční metody, imunosorpční testy využívající enzymy, a další.

Podrobnější informace o imunoanalytických technikách lze vyhledat v "Enzyme-Immunoassay", Edward T. Maggio, CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla., 1980. Dále rovněž v U.S. Pat. Nos. 3, 690, 834; 3, 891, 932; 3, 817, 837; 3, 850, 578; 3, 853, 987; 3, 867, 517; 3, 901, 654; 3, 935, 074; 3, 984, 533; 3, 996,345; a 4, 098, 876, přičemž tento seznam nevyčerpává všechny možnosti.

Dalším hlavním využitím monoklonálních protilátek je *in vivo* zobrazování a terapie. Monoklonální protilátky mohou být značeny radioaktivní složkou, na příklad radioaktivním jodem, a pacientovi aplikovány nitrožilně. Takové protilátky mohou být rovněž značeny magnetickou sondou. Pak může být pro detekci antigenu použito zařízení NMR. Po navázání protilátek na antigen může být antigen detekován emisními tomografickými nebo radionukleárními vyšetřovacími technikami, které vyhledají umístění antigenu.

Pro znázornění je purifikovaná monoklonální protilátka navázána na vhodný nosič, např. fyziologický roztok obsahující lidský albumin nebo bez něj ve vhodných dávkách a pacientovi se aplikuje nitrožilně na příklad nepřetržitou nitrožilní infúzí po několik hodin, jak bylo popsáno Millerem se sp. v *Hybridomas in Cancer Diagnosis and Therapy* (1982), které zde uvádíme v odkazech.

Monoklonální protilátky, které jsou předmětem tohoto vynálezu, mohou být používány pro léčebné účely. Protilátky s vhodnými biologickými vlastnostmi jsou použitelné přímo jako terapeutická agens. Tyto protilátky mohou být rovněž navázány na toxin za vzniku imunotoxinu nebo na radioaktivní materiál nebo lék, a tak vytvořit radiofarmaka nebo farmaka. Metody přípravy imunotoxinů a radiofarmak s využitím protilátek jsou dostatečně známy (viz na příklad, Cancer Treatment Reports (1984) 68:317-328).

Má se rovněž za to, že polyklonální protilátky získané z bezmikrobních zvířat mohou být rovněž využity v imunotestech

a poskytovat lepší výsledky v porovnání s polyklonálními protilátkami získanými od konvenčních laboratorních živočichů. Polyklonální protilátky získané z bezmikrobních zvířat mohou být vytvořeny, jak zde již bylo popsáno, s použitím bezmikrobních laboratorních živočichů a imunizačních technik, po kterých následuje separace polyklonálních protilátek z daných živočichů konvenčními technikami, tj. získáním séra z těchto zvířat.

FIBRIN-SPECIFICKÁ MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKA

5.1. Předpoklady

Hemostatický mechanismus je složitý fyziologický proces, který se spouští jako odpověď na poškození krevního řečiště. Rovnováhy je dosaženo pomocí spřažených reakcí mezi stěnou poškozené cévy, krevních destiček a koagulačního systému. Úlohou koagulačního systému je vytvořit rozsáhlou fibrinovou síť, která má stabilizovat a ukotvit zátka složenou z krevních destiček. Tato zátka se vytváří na subendoteliální struktuře poškozené cévy. Tvorba nerozpustného fibrinového matrixu z kolujícího fibrinogenu je výsledkem složitého komplexu reakcí, který vrcholí výraznou produkcí trombinu v poškozeném místě. Koagulace je další proces a zahrnuje řetězové enzymatické reakce, ve kterých jsou proenzymy (koagulační faktory) postupně aktivovány až na aktivní enzymy. Existuje mnoho fyziologických mechanismů, které ovládají proces polymerizace fibrinu zapojený do tvorby trombu. Sem patří inhibitor trombinu antitrombin III (ATIII), C protein, prostacyklin a

různé složky fibrinolytického systému, jako jsou aktivátory tkáňového plasminogenu (t-PA) a jeho rychle působící inhibitor (PAI).

Hypotéza homeostázy navržená Astrupem v roce 1956 (Astrup, T., Blood 11: 781-806, 1956) uvádí, že mezi tvorbou fibrinu (koagulací) a jeho rozpouštěním (fibrinolýzou) existuje rovnováha. U normálního zdravého jedince jsou tyto funkce v rovnováze. Jakmile je však tento rovnovážný stav porušen, koagulace a fibrinolýza se projeví patologicky jako trombóza nebo hemoragie. Klinické projevy patologické trombózy nebo trombotického onemocnění jsou velmi různorodé a zahrnují diseminovanou intravaskulární koagulaci (DIC), trombózu hlubokých žil (DVT), arteriální a venózní trombózu. Tromboembolie a trombotické komplikace jiných vaskulárních onemocnění (např. atherosklerózy) mohou vést k okluzi hlavních arterií, která vede k ischemii orgánu a k životu nebezpečným stavům, jako je cerebrovaskulární příhoda (mrtvice), infarkt myokardu, apod.

Fibrinolytický proces zahrnuje konverzi inaktivního zymogenu, plasminogenu, na proteolytický enzym plasmin pomocí účinku látek známých jako aktivátory plasminogenu. Molekulární mechanismus fyziologické fibrinolýzy ještě není zcela objasněn, ale ví se, že během tvorby fibrinu se na fibrin váže plasminogen, který pak může být aktivován aktivátory plasminogenu, tj. t-PA. Tímto způsobem postupuje tvorba plasminu v trombu, kde je od inaktivace chráněn hlavním fyziologickým inhibitorem plasminu, α_2 -antiplasminem.

Při setkání s plasminem jsou fibrinogen a fibrin štěpeny na své degradační produkty. Fibrinogen se dělí na své fragmenty X a Y a po dalším působení plasminu dále na fragmenty D a E. Fibrin se rozděluje na fragmenty X, Y, D a E u nesíťovaného fibrinu, a fibrin propojený v síti se láme na fragmenty D-dimer, komplex D-D/E, dimer Y, Y-D-dimer a X oligomer.

Až do nedávné doby byly testy na známky trombotických onemocnění prováděny s použitím radioimunotestů a testů s latexovou aglutinací. Ukázalo se, že tyto testy jsou zcela nespolehlivé (Gaffney, P.J., Ann. N.Y. Acad. Sci., **408**, 407-423 (1983)). Citlivější a specifitější imunoanalýzy (jako ELISA testy) využívající monoklonální protilátky se stávají běžnou metodou v klinických laboratořích. Limitujícím faktorem těchto diagnostických testů je specifita a afinita určité použité monoklonální protilátky. Tvorba vysoce specifických protilátek proti jakémukoli potenciálnímu ukazateli na porušení hemostázy je znesnadněna jak nízkými hladinami takovýchto ukazatelů, tak antigenní příbuzností toho určitého znaku s jeho prekurzorem, který je za normálních okolností v plazmě přítomen v mnohem vyšších hladinách. Příkladem je tvorba komplexů enzymů a jejich inhibitorů, např. trombin-antitrombin III, plazmin-alfa2-antiplazmin, T-PA-PAI-1. Počet nových antigenních míst vytvořených vznikem takového komplexu je extrémně nízký a je tedy příčinou extrémně obtížné výroby imunologických sond (jako jsou monoklonální protilátky).

Podobně je i hlavním problémem spojeným se získáním monoklonální protilátky proti fibrinu strukturní a konformační

podobnost mezi fibrinem a jeho fyziologickým prekurzorem fibrinogenem. Bylo odhadováno, že konzervace kovalentní struktury po přeměně fibrinogenu ve fibrin je větší než 98% (Plow, E.F., se sp., Semin. Thromb. Haemostas 8:36 (1982)), a tudíž pouze malý počet epitopů na molekule fibrinu jsou ve skutečnosti neoantigeny (a unikátní pro fibrin). Mnoho postupů, které byly vyvinuty pro získání protilátek proti fibrinu, se zaměřilo na imunizaci zvířat rozpustnými fragmenty fibrinu a syntetickými peptidy, které napodobovaly obnažená neoantigenní místa na fibrinu. Viz Hui, K.Y., se sp., Science 22: 1129-32 (1983), Scheerers-Borchel, V., se sp., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 7091-95 (1985), Elms, M.J., se sp., Thromb. Haemostas 50: 591-94 (1983) a Kundryk, B., se sp., Mol. Immunol. 21: 89-94 (1984). Nicméně se věří, že vazebné místo takových protilátek je v průběhu degradačního procesu fibrinu konzervováno, a tudíž se tyto protilátky mohou vázat i na produkty vzniklé degradací fibrinu.

Předmět tohoto vynálezu umožňuje použít zcela odlišný přístup a využít intaktní fibrinový antigen ve spojení se zvýšenou imunologickou citlivostí bezmikrobních živočichů (AF) pro přípravu monoklonálních protilátek proti fibrinu. Pro účely tohoto vynálezu se fibrin-specifické protilátky vážou na fibrin a ne na fibrinogen nebo produkty vzniklé degradací fibrinu či fibrinogenu.

5.2. MATERIÁL A METODY

5.2.1. Zvířata

Bezmikrobní myši BALB/cAnN byly získány z bezmikrobní kolonie (GF) chované na univerzitě ve Wisconsinu. Zvířata byla do našich laboratoří transportována v bezmikrobních podmínkách. Bezantigenní kolonie (AF) byla založena přenesením březích GF samic krmených přírodní dietou L-485 (viz Pleasants, J.P., se sp., *J. Nutr.* 116: 1949-1964 (1986)) do AF izolátoru, kde byly tyto myši okamžitě převedeny na chemicky definované krmení (CD) AF. Jejich mláďata, která nikdy nepřišla do přímého styku s přírodním krmivem (NI), byla odstavena od mateřského mléka na CD krmení a byla označena jako první AF generace. Tyto AF myši byly pářeny po párech dokud samice pozitivně nezabřezla; pak byli samci odstraněni, aby se samicím zajistila plná dávka lipidových přísad. Mláďata byla odstavena ve věku 24 dnů.

5.2.2. Ustájení

AF chovní jedinci byly ustájeny v párech v jedné polovině standardních polykarbonátových myších klecí o rozměrech 28x17,8x12,7 cm. Dno bylo odříznuto a nahrazeno falešným dnem z ocelového nerezavějícího síta. Podélné rozdělení bylo provedeno plátem nerezavějící oceli, který byl na koncích plastické klece zahnut tak, aby přečníval nad i pod klec a upevňoval víko z nerezavějícího drátu. Toto zapuštěné víko, které se normálně vejde dovnitř klece, bylo převráceno tak, aby poskytovalo více místa nad falešným dnem. Sloupky vhodné

velikosti a z nerezavějící oceli byly přivařeny k hornímu víku, aby držely 60ml láhve na krmení. Ke stranám podélné přepážky v polovině její výšky mezi dnem a víkem byly na jejích koncích přivařeny nádoby z nerezavějící oceli. (Obrázek těchto klecí je uveden v Pleasants, J.R., The germfree system for aging and immunity V: CRC Handbook of Immunology in Aging, (Kay, M.M. B.S. Makinodan, T., vyd.), str. 257-297, CRC Press, Boca Raton, Fl. (1981)). Krmné láhve byly z hnědého skla. Láhve na krmení i vodu měly plastická víčka s vyvrtanými otvory ve středu. Láhve byly naplněny a obráceny dnem vzhůru ve svých držácích. Lipidový přídatek byl denně odměřován do nerezových nádobek. Pod každou klecí byl umístěn plastický tálc na zachycování odpadu.

Jako stelivo a stravitelná vláknina byl použit bezpopelnatý filtrační papír Whatman č.41, prodáváný jako ústřížky (Sargent Welch). Pro podestýlku byl papír nastříhán na proužky. Nerozstříhané čtverce papíru byly použity pro čištění vnitřního prostoru izolátoru. Papír byl autoklávován po dobu 25 minut při 121°C nebo byl v plastických sáčcích ozařován (4,5 Mrad). Všechny myši dostaly dostatek papíru, který by pokryl jeden konec klece. Papír byl vyměněn, jakmile byl vlhký, žlutý nebo špinavý.

Klece byly udržovány uvnitř pružného izolátoru typu Trexler o rozměrech 1,37x0,6x0,6m (Trexler, P.C., Lab. Anim. Care 13: 572-581 (1963)), při použití standardní gnotobiotické technologie (viz Wostmann, B.S., vyd., Gnotobiotics Standards and Guide Lines for the Breeding, Care and Management of

Laboratory Animals, National Research Council, National Academy of Sciences, Washington, D.C.). Izolátory byly provozovány v laboratoři při teplotě 21°C a 12ti hodinovém světelném režimu.

Válec Tygon o průměru 2,5 cm a délce 7,55 cm byl připevněn ke stropu izolátoru a na obou koncích uzavřen vinylovými zátkami. Tento válec byl vstupem pro sterilní filtraci krmení, vody a oleje.

5.2.3. Krmení

Tabulka 1 ukazuje složení krmiva a postup při rozpouštění jednotlivých složek v ultrafiltrované vodě Milli-Q (Millipore, MA). Aminokyseliny a dextrosa byly od firmy Sigma v kvalitě pro tkáňové kultury. Vitamíny byly rovněž od Sigmy kromě čistého retinylpalmitátu, které nám laskavě dodaly Hoffman-La Roche, Inc. (Nutley, NJ). Ostatní látky byly od firmy Fisher nebo jejich ekvivalenty. Kompletní ve vodě rozpuštěné krmení bylo filtrováno za chladu přes ultrafiltr Amicon Diaflo TC3 při použití membrán Pm10 s průměrem 150 mm (Amicon).

Ultrafiltrační membrány měly propustnost do 10 000 daltonů. Seřízený ultrafiltrační přístroj byl před použitím sterilizován 0,15% roztokem chlornanu sodného a důkladným promytím. Ultrafiltrované krmení bylo skladováno ve sterilních nádobách při teplotě 4°C až do jeho použití. Krmení bylo do AF izolátorů zavedeno s použitím 0,2µm nylonových filtrů (MSI) v autoklávaném držáku tlakového filtru, který měl svou výpusť vloženou do neoprenového (No 6) uzávěru. Pro tyto účely byl

horní uzávěr Tygonového sloupce neprodyšně upevněného ve stropu izolátoru odstraněn a vnitřní povrch válce byl vystříkán sterilizačním roztokem 2% kyseliny peroctové obsahující 0,1% alkyl-aryl sulfonát. Uzávěr držáku filtru byl vložen místo horního uzávěru. Po dvaceti minutách byl odstraněn dolní uzávěr (uvnitř izolátoru) a krmení nebo voda byly filtrovány do izolátoru při 20 psi dusíku.

Složení lipidového přídatku je uvedeno v tabulce 2. Sojevé triglyceridy byly ve formě přípravku vyrobeného vakuovou destilací methylesterů v teplotním rozmezí odpovídajícím esterům kyseliny palmitové až linoleové. Tyto estery pak byly transesterifikovány glycerolem za vzniku smíšených triglyceridů. (Nu-Chek Prep, Elysian, MN). Ke směsi triglyceridů byly před její filtrací do izolátoru přidány vitamíny rozpustné v tucích a v té době byla směs zahřáta na 50°C a filtrována do izolátoru stejným způsobem používaným pro ve vodě rozpustnou část krmení.

Příděl lipidů byl odměřen na 0,375 ml/den. Zvýšení lipidového přídatku značně snížilo úmrtnost novorozených myší. Průměrná četnost vrhu se rovněž zvýšila na úroveň konvenčně pěstovaných zvířat. Kojící samice dostávaly dvojnásobnou dávku lipidového přídatku.

Tabulka 1

Složení a příprava chemicky definovaného krmení L489E1Se

Složka	Množství (gramy/100 g složky)
--------	-------------------------------

K 192 ml Milli-Q vody o teplotě 70°C se přidá následující:

Leucin	1,9
Fenylalanin	0,74
Izoleucin	1,08
Methionin	1,06
Tryptofan	0,37
Valin	1,23
Asparagin	0,91
Arginin HCl	0,81
Threonin	0,74
Lyzin HCl	1,77
Histidin HCl	0,74

Roztok se ochladí na 45°C a přidá se následující:

Glycin	0,59
Prolin	1,48
Serin	1,33
Alanin	0,59
Glutamát sodný	3,40
L-tyrozin ethylester HCl	0,62
Glukonát železnatý	0,05
Soli 35D ¹	0,105

Selenit sodný ²	0,074
----------------------------	-------

Roztok se dále ochladí na 5°C a přidá se následující:

Glycerolfosfát vápenatý	5,22
Glycerolfosfát hořečnatý	1,43
Chlorid vápenatý 2H ₂ O	0,185
(KI) směs (obsahující 680 mg KI)	0,086
Vitamín B směs 111E5 ³	0,09
Vitamín B12 ⁴	1,20 mg
Cholinchlorid	0,31
Octan sodný	1,85

Ke 108 ml Milli-Q vody o teplotě 70°C byla přidána bezvodá D-Dextrosa	71,28
---	-------

Oba roztoky byly ochlazeny na 50°C, smíchány a ultrafiltrovány.

Složení lipidového přídatku LADEK 69E6

Složka	Denní dávka pro dospělého jedince* (0,385ml)
Purifikované sojové triglyceridy	0,33g
Retinylpalmitát	6,45 (11.7 I.U.)
Cholekalciferol	0,0288mg(1.15 I.U.)
2ambo-alfa-tokoferol	3,3mg
2ambo-alfa-tokoferol acetát	6,6mg
Fyllochinon	72mg

*Kojící samice obdrží dvojnásobek normální dospělé dávky.

¹Skládající se z: 12% palmitátu

1,5% stearátu

24% oleátu

55% linoelátu

8% linoleátu

TABULKA 3

Složení směsi solí 35D

Sůl	Množství (na 300 ml krmení)	mg
Mn (octan) ₂ 4H ₂ O	55,4	
ZnSO ₄ H ₂ O	40,6	
Cu (octan) ₂ H ₂ O	3,7	
Cr (octan) ₃ H ₂ O	2,5	
NaF	2,1	
SnSO ₄ 2H ₂ O	0,37	
(NH ₄) ₅ Mo ₇ O ₂₄ 4H ₂ O	0,37	
NiCl ₂ 3H ₂ O	0,37	
Co (octan) ₂ 4H ₂ O	0,11	
Na ₃ VO ₄	0,22	
Na ₂ SeO ₃	0,096	

TABULKA 4
Složení směsi vitamínů B 111E5

Složka	Množství (mg) / 300 ml krmení
Thiamin HCl	1,23
Pyridoxin HCl	1,54
Biotin	0,25
Kyselina listová	0,37
Vitamín B12	0,37
Riboflavin	1,85
Niacinamid	9,2
i-inositol	61,9
Pantothenát vápenatý	12,3

Použitá voda Milli-Q byla ultrafiltrovaná a do izolátoru byla filtrována stejným způsobem jako krmení.

5.2.4. Mikrobiologické monitorování

Bezantigenní systém byl testován na kontaminaci mikroby podle návodu uvedeného v Westmann, B.S. vyd. (1970) Gnotobiotics Standards and guidelines for the breeding care and management of laboratory animals, National Research Council, National Academy of Sciences, Washington, D.C. Stručně, tampony namočené do krmení a vody uvnitř izolátoru byly použity na provedení roztěrů fekálií získaných čerstvě od myši a z nahromaděných výkalů pod každou klecí. Stěry byly rovněž odebrány ze stěn izolátoru, především v okolí vstupního otvoru

izolátoru. Byly rovněž odebrány duplikované stěry. Jedna sada stěrů byla zkoumána přímo pod mikroskopem na přítomnost bakterií a plísní při použití gram barvení. Druhá sada roztěrů byla použita pro detekci mikroorganismů. Každá kultura byla prohlášena za negativní až po uplynutí třítýdenní kultivace.

Testování na přítomnost mikroorganismů bylo prováděno přibližně každé dva týdny nebo několik dnů po novém vstupu do izolátoru.

5.3. Produkce monoklonálních protilátek s použitím bezantigenních myši

Bezantigenní myši podle zde uváděného popisu byly při výrobě monoklonálních protilátek použity jako dárce lymfocytů. Roztoky veškerých antigenů byly připraveny ve sterilních podmínkách v laminárním boxu.

Následující protokol byl upraven pro imunizaci AF myši. Daný antigen (25-30 μ g) byl rozpuštěn ve sterilním fyziologickém roztoku (100 μ l) a emulgován stejným množstvím Freundova kompletního adjuvans (FCA). K roztoku antigenu byl přidán interferon (1000 jednotek) před vlastní přípravou emulze. Pro veškerá očkování byly použity sterilní stříkačky a jehly. Stříkačky byly přeneseny do AF izolátoru přes vstupní otvor, a tam sterilizovány přestříkáním 2% roztokem kyseliny peroctové. Přeočkovávací injekce byly aplikovány se stejným množstvím antigenu, FCA však bylo nahrazeno Freundovým nekompletním adjuvans. Celkově byly provedeny tři podpůrné imunizace každá v intervalu tří týdnů. Poslední ze tří imunizací

(bez adjuvans) byla provedena 4-7 dní před fúzí. Všechny injekce byly aplikovány nitrobřišně. Myši byly odebrány z izolátoru v den fúze a byly okamžitě usmrceny udušením CO₂. Byly jim odebrány sleziny a slezinné buňky byly fúzovány s myšími myelomovými buňkami (NS1) při použití standardních hybridomových technik.

5.4. Využití systému bezantigenních laboratorních zvířat pro výrobu fibrin-specifické monoklonální protilátky.

Tento bezantigenní systém byl použit při výrobě fibrin-specifické monoklonální protilátky. Tato protilátka je vysoce specifická a nerozeznává fibrinogen, ani produkty degradace fibrinu či fibrinogenu. Linie hybridomových buněk byly vytvořeny fúzí slezinných buněk získaných z bezantigenních myši BALB/c imunizovaných lidským fibrinem a myelomových myších buněk NS1.

5.4.1. Rozvrh imunizace

Tři týdny staré samice bezantigenních myši byly imunizovány 33 mikrogramy přípravku lidského fibrinu. Přípravek byl zmraženou frakcí vzorku fibrinu, který byl připraven následujícím způsobem:

Lidský fibrinogen byl převeden na fibrin působením trombinu a faktoru XIIIa. Fibrinová sraženina pak byla zmražena v tekutém dusíku a mechanicky rozdrcena na velmi jemný prášek. Disperze tohoto mrazem frakturovaného fibrinu

byla provedena ve fyziologickém roztoku, čímž vznikl čistý roztok síťovaného fibrinu XL-Fn o konečné koncentraci 1mg/ml. Pro imunizaci zmíněných zvířat byly použity 33 μ l tohoto fibrinového antigenu. Toto množství roztoku antigenu bylo upraveno na 100 μ l sterilním fyziologickým roztokem a roztok byl pak emulgován FCA výše uvedeným postupem. V intervalu tří týdnů byly aplikovány dvě podpůrné imunizace při použití stejných hladin antigenu ve Freundově nekompletním adjuvans. Poslední očkování bylo provedeno 4 dny před fúzí. Byla použita stejná hladina antigenu a adjuvans bylo nahrazeno fyziologickým roztokem.

5.4.2. Detekce a určení protilátky

Kvalitativní a kvantitativní určení monoklonální protilátky bylo provedeno použitím enzymatického imunosorpčního testu ELISA. ELISA testy byly provedeny s použitím lidského fibrinu imobilizovaného v 96ti jamkových mikrotitračních destičkách z PVC (značka Costar). Testovací mikrotitrační destičky potažené fibrinem byly připraveny inkubací 100 μ l roztoku fibrinu (Kabi, stupeň L) v pufru s boritanem (50 μ g boritanu/ml fyziologického roztoku) přes noc při teplotě 4°C. Nenavázaný fibrinogen byl odstraněn opláchnutím PBS obsahujícím 0,05% Tween 80 (PBS-Tween). Fibrinogen, kterým byla potažena dna komůrek, byl přeměněn na fibrin inkubací s 100 μ l roztoku trombinu (10 NIH jednotek/ml) obsahujícím 2 mM CaCl_2 po dobu jedné hodiny při 37°C. Byla sestrojena standardní kalibrační křivka pro danou protilátku při

použití přípravku protilátky, který byl zhomogenizován pomocí SDS-PAGE.

Aby se zabránilo nespecifickým vazbám, byly fibrinem potažené mikrotitrační destičky inkubovány s 1% roztokem BSA v PBS o pH7,4. Poté byly přidány roztoky obsahující protilátky (100 μ l) a misky byly inkubovány při 37°C po dobu 90 minut. Po každém kroku tohoto postupu byly jamky důkladně omyty PBS-Tween. Navázané protilátky byly detekovány přidáním tisícinásobku králičí anti-myší protilátky konjugované s alkalickou fosfatázou (Sigma) rozpuštěnou v PBS, 1% BSA pH8,0.

5.4.3. Příprava hybridomů-fúze.

Myši byly utraceny udušením CO₂ a okamžitě jim byly odebrány sleziny. Slezinné buňky z těchto imunizovaných myší byly fúzovány s polyethylen glykolem 4000 (3000-7000). Tyto buňky byly inkubovány v HAT selekčním mediu v T lahvích po dobu jednoho týdne. Po této době byly buňky rozmístěny do jamek destiček 5 X 96. V 93 jamkách byl zaznamenán růst buněk, z těchto 93 jamek bylo 19 pozitivních na antigen fibrinu. Jeden z těchto klonů, F492D8 (později přejmenován na MH1), produkoval protilátku, která rozpoznávala fibrinový antigen, ale v křížové reakci nereagovala s fibrinogenem. Tento určitý klon MH1 byl třikrát opětovně klonován mezním ředěním až do dosažení jedné buňky na jamku při třetí klonovací fázi. Jakmile byla buněčná linie stabilizována, byla převedena na bezsérové

medium. Tato buněčná linie produkuje protilátku v množství přibližně 7,5 mg/litr.

5.4.4. Purifikace monoklonální protilátky

Před purifikací (4litrové dávky) byly supernatanty tkáňových kultur cetrifugovány, aby se odstranily zbytky buněk, a filtrovány přes 0,8 μ m nylonové membrány, které zadržely veškeré zbytkové částice. Supernatant z hybridomů byl koncentrován při 4°C na objem 500 ml při použití spirálového ultrafiltračního systému využívajícího membrány typu YM (Amicon) s propustností částic do molekulární hmotnosti 30000. Výměna pufru za 20mM (N-morfolin) kyselina ethansulfonová (MES), pH6,0 (pufr A) byla provedena podle návodu dodavatele. Po dalším zahušťování na konečný objem 100 ml byl roztok s protilátkou filtrován přes 0,451 μ m nylonovou membránu před další purifikací. Koncentrovaný roztok protilátky byl purifikován tekutou chromatografií na chromatografu Waters HPLC při použití kolony 7,75mm x 10cm AB x sloupec (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ). Kolona byla ekvilibrována pufrém A, protilátka byla z kolony eluována gradientem od pufru A do 100% pufru B (1M octan sodný pH7,4) při průtoku 1 ml/min. Byly odebírány frakce (2 ml) a ty, které obsahovaly monoklonální protilátku (určenou ELISA testem) byly sbírány a dialyzovány proti fyziologickému roztoku tlumenému fosfátem (PBS) (20 mM fosfát sodný, 150mM chlorid sodný, pH7,4) a skladovány v -20°C v koncentraci >1mg/ml. ABx kolona byla regenerována promýváním 100% B.

pufrem po dobu 5 minut, po kterém následovala nová ekvilibrace 15ti násobkem objemu sloupce pufrem A.

5.5. Určení specifity na fibrin.

Prvního určení specifity na fibrin bylo dosaženo vyšetřením supernatantů z hybridomů zvlášť na fibrinen potažených mikrotitračních destičkách a zvlášť na destičkách potažených fibrinogenem. Jako přijatelné byly vybrány ty buněčné linie produkující protilátky, které v křížové reakci nereagovaly s fibrinogenem.

Dalším určením specifity na fibrin byl kompetiční test s fibrinogenem v roztoku, ve kterém se potvrdilo, že protilátka nerozpoznává fibrinogen v roztoku.

Použitý kompetiční test k potvrzení specifity protilátky na fibrin byl proveden podle návodu pro ELISA test, přičemž tato protilátka byla předem inkubována s fibrinogenem v roztoku. Stručně řečeno, supernatant z hybridomů byl inkubován při 37°C po dobu 30 minut s roztokem fibrinogenu ve fyziologické koncentraci (4mg/ml) za přítomnosti BSA (10mg/ml), který má zabránit nespecifické vazby protilátky na fibrinogen. Roztok fibrinogen/protilátka byl poté přenesen do jamek mikrotitračních destiček, které byly předem potaženy fibrinem. K inhibitoru fibrinogenu byl přidán GlyProArgPro (GPRP), aby se zabránilo možné polymerizaci fibrinogenu prostřednictvím zbytkového trombinu ve fibrinových komůrkách. Pak byl již test prováděn jako konvenční ELISA test pro protilátku vázanou na imobilizovaný antigen. Jako kontrola byla u všech testů na

specifitu protilátky MH1 na fibrinu použita druhá protilátka 45J. Protilátka 45J reaguje v křížové reakci s fibrinem i fibrinogenem.

5.5.1. URČENÍ KŘÍŽOVÉ REAKTIVITY NA FIBRINOGEN.

5.5.1.1. Imobilizovaný fibrin a fibrinogen.

Buněčná linie MH1 produkuje myši protilátky, které reagují v křížové reakci s fibrinem, je-li tento imobilizován na povrchu PVC mikrotitračních testovacích destiček (tabulka 5). V tom samém testu tato protilátka nerozpoznává fibrinogen imobilizovaný na daných destičkách. Jak ukazují údaje v tabulce 5, dochází k výraznému zvýšení imunoreaktivity, jakmile je fibrinogen trombinem přeměněn na fibrin, čímž se zjevně vytvoří nový epitop na molekule fibrinu. Kontrolní protilátka 45J však jasně rozpoznává neoepitop, který je konzervován, když se fibrinogen přemění na fibrin.

5.5.1.2. Kompetiční test s fibrinem a fibrinogenem.

Specifita protilátky MH1 proti fibrinu byla dále prokázána kompetičním testem, ve kterém byl supernatant z hybridomů před vlastním testem inkubován s roztokem fibrinogenu (o konečné koncentraci 4mg/ml). Protože v tomto kompetičním testu byly použity vysoké koncentrace fibrinogenu (500x vyšší koncentrace fibrinogenu než protilátky), byl ke směsi přidán BSA (konečná koncentrace 10 mg/ml). Peptid GPRP byl přidán, aby se zabránilo polymerizaci fibrinu zbytkovým

trombinem v jamkách pokrytých fibrinem. Výsledky tohoto testu ukazují, že protilátka MH1 nerozpoznává fibrinogen v roztoku (tabulka 6).

Za předpokladu, že se na každou komůrku mikrotitrační destičky naváže 400 ng fibrinu, pak hladina fibrinogenu použitá v tomto kompetičním testu představuje tisícinásobný nadbytek vzhledem k vázanému fibrinovému antigenu. Navíc to představuje 400ti násobný nadbytek antigenu v tkáňovém supernatantu.

Tabulka 5

Schopnost křížové reakce protilátky MH1 s fibrinogenem a antigenem fibrinu.

MAb	A _{405nm} /30 min	
	Fibrin	Fibrinogen
MH1	0,90	0,025
45J	1,65	1,50

TABULKA 6

Schopnost křížové reakce protilátky MH1 s fibrinem v
přítomnosti fibrinogenu

MAb	$A_{405nm}/30 \text{ min}$	
	<u>+fibrinogen</u>	<u>-fibrinogen</u>
MH1	1,24	1,27
45J	0,438	1,74

5.5.2. Určení schopnosti křížové reakce s produkty
degradace fibrinu (fibrinogenu).

Produkty degradace fibrinogenu (FDPs) byly připraveny inkubací fibrinogenu s plasminem při teplotě 37°C po dobu v rozmezí od 10 minut do 3 hodin. Fibrinogenolýza byla po požadované době zastavena přidáním trasyolu (100 jednotek inhibitoru kalikreinu/ml) a 20mM kyseliny ϵ -aminokapronové (EACA).

Produkty degradace fibrinu (XLFPDs) byly připraveny přidáním trombinu (4 NIH jednotky/ml) k roztoku fibrinogenu (5 mg/ml) ve fyziologickém roztoku tlumeném Trisem (TBS, pH7,4, 50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl) obsahujícím 10 mM CaCl_2 , plasminogen (0,25 mg/ml) a urokinázu (50 IU/ml). Směs byla inkubována při 37°C a štěpení plasminem bylo ukončeno po různých časových intervalech pomocí FDPs výše uvedeným způsobem.

Pro určení křížové reakce s produkty degradace fibrinu a s produkty degradace fibrinogenu byly příslušnými degradačními produkty potaženy jamky mikrotitračních destiček a byly provedeny enzymové imunisorpční testy běžným postupem. Výsledky uvedené v Tabulce 7 ukazují, že protilátka MH1 nereaguje křížovou reakcí s žádným produktem vzniklým degradací fibrinu plasminem. Tabulka 8 ukazuje, že tato protilátka nereaguje s produkty degradace XL-fibrinu. Tohoto závěru bylo dosaženo použitím technik analýzy Western blottingu.

Můžeme tudíž vyslovit závěr, že tato protilátka rozpoznává takový epitop intaktní molekuly fibrinu, který není přítomen nebo obnažen na povrchu molekuly prekurzoru fibrinu, tj. fibrinogenu. Tento epitop je zjevně zničen degradací fibrinu plasminem, což potvrzují údaje uvedené v tabulce 8.

Na základě těchto poznatků je MH1 fibrin-specifická monoklonální protilátka takovou protilátkou, která může být definována takto:

Pro účely tohoto vynálezu je fibrin-specifická monoklonální protilátka taková monoklonální protilátka, která:

1. má v kompetičním testu na měření křížové reakce s fibrinem a fibrinogenem podle výše uvedeného postupu méně než 75%ní, v lepším případě méně než 10%ní, schopnost křížové reakce s fibrinogenem, ve které je fibrinogen použit v množství 1 000 násobně vyšším v porovnání s fibrinem,

2. má v testu měření křížové reakce se síťovaným fibrinem a s produkty degradace fibrinu podle výše uvedeného postupu schopnost křížové reakce s fibrinem, který byl štěpen plasminem po dobu přibližně 3 hodin, méně než 50%ní a v lepším případě méně než 40%ní v reakci této protilátky s fibrinem v čase nula, a
3. nemá v testu na měření křížové reakce s fibrinogenem a produkty degradace fibrinogenu (podle výše uvedeného postupu) takováto monoklonální protilátka v reakci s fibrinogenem, který byl štěpen plasminem po dobu přibližně 4 hodin, o nic vyšší reaktivitu než jakou má tato monoklonální protilátka v reakci s fibrinogenem v čase nula.

MH1 monoklonální protilátka byla dále charakterizována určením její afinity k fibrinu. Tato afinita byla určena Scatchardovým výnosem (Frankel se sp., Molecular Immunology 16: 101-106 (1979)) při použití MH1 protilátky značené ^{125}I . Hodnoty získané pro disociační konstantu K_D byly $6,7 \times 10^{-10}$. Takováto afinita je přibližně 5000 násobek afinity t-PA k fibrinu.

Pomocí analýzy Western imunoblottingu bylo rovněž určeno, že tato MH1 protilátka nereaguje v křížové reakci s $\text{A}\alpha$, $\text{B}\beta$ nebo γ řetězci fibrinogenu. Stejnou metodou bylo zjištěno, že tato protilátka MH1 nereaguje v křížové reakci s $\text{A}\alpha$ nebo $\text{B}\beta$ řetězci fibrinogenu po reakci s trombinem. (Reakce fibrinogenu s trombinem vede k uvolnění fibrinopeptidu A a

fibrinopeptidu B z řetězce A α a B β , čímž vznikají α a β řetězce fibrinu.

TABULKA 7
Křížová reakce protilátky MH1 s produkty degradace
fibrinogenu

Doba štěpení plasminem v min.	A _{405 nm} /30 min	
	MH1	45J
0	0,15	1,037
10	0,10	nm
20	0,11	1,02
40	0,11	0,410
60	0,10	0,330
240	0,09	0,300

TABULKA 8
Křížová reakce MH1 protilátky s produkty degradace fibrinu

Doba štěpení plasminem v hod.	A _{405 nm} /30 min	
	MH1	45J
0	0,890	1,40
3	0,354	1,0
5	0,310	0,77

Výsledky Tabulky 7 navíc ukazují, že kontrolní protilátka 45J se váže na fibrinogen, ale v křížové reakci nereaguje s produkty degradace fibrinogenu. Na základě toho je taková monoklonální protilátka specifická proti fibrinogenu a představuje jeden z dalších aspektů tohoto vynálezu. Tato fibrinogen-specifická monoklonální protilátka může být využita pro jakékoli imunoanalýzy k určení hladin fibrinogenu *in vitro*. Daná protilátka 45J byla dále určena v tom smyslu, že epitop 45J je na α řetězci fibrinogenu přibližně v oblasti mezi aminokyselinami 206 a 424 a s největší pravděpodobností v oblasti mezi aminokyselinami 207 a 231. Pro účely tohoto vynálezu je fibrinogen-specifická monoklonální protilátka jakákoli monoklonální protilátka, která v testu na schopnost křížové reakce s produkty degradace fibrinu a degradace fibrinogenu podle výše uvedeného postupu vykazuje reaktivitu s fibrinogenem, který byl štěpen plasminem po dobu přibližně 40 minut, nižší než 50% reaktivity této protilátky s fibrinogenem v čase nula.

Hybridom 45J byl připraven konvenčním způsobem využívajícím běžně používané myši Balb/c, které byly v tomto případě imunizovány fibrinem. Jako antigen však může být použit i fibrinogen.

5.5.3. Určení křížové reakce s nesíťovaným fibrinem a nesíťovanými fibrinovými sraženinami.

Pomocí enzymových imunosorpčních testů ELISA se dokázalo, že protilátka MH1 reaguje v křížové reakci nejen se síťovaným

fibrinem (XLFn), ale rovněž s nesíťovaným fibrinem (NONXLFn). ELISA test byl proveden následujícím způsobem:

1. 96ti jamkové mikrotitrační destičky byly potaženy 100 μ l roztoku fibrinogenu (50 μ g/ml ve fyziologickém roztoku tlumeném boritanem, pH8,5) a ponechány při teplotě 4°C přes noc.
2. Síťovaný fibrin se vytvořil v komůrkách potažených fibrinogenem inkubací s roztokem trombinu po dobu jedné hodiny při teplotě 37°C (10NIH jednotek/ml) ve fyziologickém roztoku tlumeném Trisem (TBS, pH7,4, 50mM Tris HCl, 150mM NaCl) obsahujícím 2mM CaCl_2 a 10mM cystein.
3. Nesíťovaný fibrin se vytvořil v komůrkách potažených fibrinogenem inkubací s roztokem trombinu po dobu jedné hodiny při teplotě 37°C (10NIH jednotek/ml) ve fosfátovém pufru (pH6,1) obsahujícím EDTA v konečné koncentraci 0,0125M.
4. Navázaná protilátka byla určena inkubací s konjugátem antimyší alkalické fosfatázy. Navázaný konjugát byl určen přidáním substrátu alkalické fosfatázy a výsledná kolorimetrická reakce byla odečítána v automatické čtečce mikrotitračních destiček při 405 nm.

Výsledky tohoto testu jsou uvedeny v Tabulce 9 a je z nich zřejmé, že křížová reaktivita této protilátky se síťovaným fibrinem je větší než s nesíťovaným fibrinem. Nejjednodušším

vysvětlením je, že kovalentní síťování přítomné v síťované polymerní struktuře slouží k uzamčení nebo zamrznutí té konformace, kterou daná protilátka rozpoznává. V nesíťovaných druzích není konformace, i když je vytvořena, stabilizována kovalentními vazbami daného polymeru.

Rovněž bylo dokázáno, že tato protilátka reaguje v křížové reakci jak se síťovanými tak s nesíťovanými sraženinami vytvořenými *in vitro*. Síťovaný fibrin byl připraven inkubací roztoku fibrinogenu (ve fyziologickém roztoku tlumeném Trisem 50mM, pH7,4, obsahujícím CaCl_2 (2mM) a cystein (10mM)) s trombinem po dobu tří hodin při teplotě 37°C. Nesíťovaný fibrin se vytvořil inkubací roztoku fibrinogenu (3 mg/ml) ve fosfátovém pufru (pH6,1) obsahujícím EDTA v konečné koncentraci 0,0125M s roztokem trombinu (10 NIH jednotek/ml) po dobu tří hodin při teplotě 37°C. Po vytvoření sraženin byly tyto shluky omyty a inkubovány s 400 μ l 1% roztoku BSA obsahujícím MH1 protilátku značenou ^{125}I při teplotě 37°C. Malé alikvotní části roztoku byly odebírány v různých časech a množství protilátky bylo určeno odečtem plazmy v přístroji měřícím γ záření.

Tabulka 10 ukazuje množství navázané protilátky jak na síťované tak na nesíťované sraženiny.

TABULKA 9

Křížová reakce protilátky MH1 se síťovaným a nesíťovaným
fibrinem

Koncentrace <u>protilátky</u> (ng/ml)	Síťovaný <u>fibrin</u> (absorbance při 405 nm)	Nesíťovaný <u>fibrin</u>
100 000	0,764	0,409
50 000	0,460	0,319
25 000	0,305	0,154
12 500	0,174	0,074
6 250	0,069	0,000

TABULKA 10

Křížová reakce protilátky MH1 se síťovanými a nesíťovanými
fibrinovými sraženinami

Fibrinová sraženina	% vazby značené protilátky po 8 hodinách
síťovaný	79%
nesíťovaný	76%

5.6. Uložení hybridomů

Protilátky MH1 a 45J byly uloženy v ATCC (American Type Culture Collection) dne 9. června 1988 a byla jim přidělena

registrační čísla HB 9739 a HB 9740. American Type Culture Collection je na adrese 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, 20852. Protilátka MH1 je IgG1 protilátkou s lehkým řetězcem kappa a bylo zjištěno, že tato MH1 protilátka reaguje v křížové reakci nejen s lidským, ale i s králičím fibrinem.

Předmět tohoto vynálezu se neomezuje pouze na tyto uložené hybridomy. Uvedené hybridomy byly použity jako ilustrační příklady hybridomů, které produkují fibrin-specifické monoklonální protilátky zde uváděným způsobem. Termínem "funkční ekvivalent" se míní, že protilátka je schopná kompetice s protilátkou MH1 nebo 45J ve vazbě na epitop fibrinu, na který se váže protilátka MH1, nebo na epitop fibrinogenu, na který se váže protilátka 45J. Takovýto termín navíc zahrnuje fibrin-specifické monoklonální protilátky, podle výše popsaného postupu, které se váží na epitop odlišný od epitopu, na který se váže protilátka MH1 nebo 45J.

5.7. Diagnostika *in vivo* a terapeutické využití fibrin-specifických monoklonálních protilátek.

Fibrin-specifické monoklonální protilátky, které jsou předmětem tohoto vynálezu, mají schopnost zaměřit chomáče fibrinu nebo jeho shluky *in vivo*. Tyto monoklonální protilátky mohou být tudíž použity pro lokalizaci možných tkáňových nebo vaskulárních poškození u člověka nebo pro sledování vaskulárních onemocnění. Pro tyto účely je obzvlášť vhodná fibrin-specifická monoklonální protilátka, protože takováto monoklonální protilátka se nebude vázat ani na fibrinogen, ani

na produkty degradace fibrinogenu nebo fibrinu, čímž snižuje pozadí takového vyšetření, které pak umožňuje daleko přesnější lokalizaci fibrinových sraženin nebo shluků fibrinu.

Pro takové použití je lépe používat purifikované monoklonální protilátky. Purifikace monoklonálních protilátek pro použití u lidí může být rovněž provedena síranem amonným nebo síranem sodným a dialýzou proti fyziologickému roztoku, po které následuje sterilizace filtrací. K purifikaci monoklonálních protilátek mohou být rovněž použity chromatografické techniky.

Takto purifikované monoklonální protilátky mohou být označeny radioaktivními sloučeninami, jako na příklad ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , a pacientovi pak aplikovány nitrožilně. Tyto protilátky mohou být rovněž značeny magnetickou sondou. Pak je k vyhledání sraženiny použita technika NMR. Po usídlení těchto protilátek na sraženině nebo shluku fibrinu mohou být tyto lokalizovány pomocí emisní tomografie nebo radionukleárními vyšetřovacími metodami a tak ukázat na polohu například trombu nebo zapouzdřeného nádoru.

Pro lepší viditelnost je taková purifikovaná protilátka rozpuštěna ve vhodném nosiči, např. fyziologickém roztoku s lidským albuminem nebo bez něj, a pacientovi je podána ve vhodné dávce. Monoklonální protilátky se obvykle aplikují nitrožilně, např. kontinuální nitrožilní infuzí po dobu několika hodin.

5.7.2. Léčba vaskulárních onemocnění konjugáty monoklonálních protilátek.

Monoklonální protilátky popsané v tomto vynálezu mohou být použity ve spojení s širokou škálou farmaceutických látek jakou jsou cytotoxické reagensie a trombolytické reagensie, např. t-PA, urokináza streptokináza, a s dalšími proteázami, které mají schopnost lyzovat fibrin. Využití monoklonálních protilátek tímto způsobem je obzvlášť výhodné, protože fibrin-specifické monoklonální protilátky tohoto vynálezu umožňují ~~velice účinné využití takových reagensií, protože~~ nedojde ke ztrátám žádného z těchto činidel vazbou na fibrinogen nebo produkty degradace fibrinogenu či produkce degradace fibrinu.

Další informace k tomuto tématu lze nalézt v Bale se sp., 1980, Cancer Research, **40**: 2965-297; Ghose a Blair, 1978, J. Natl. Cancer Inst., **61**(3): 657-676; Gregoriadis, 1977, Nature, **265**:407-411; Gregoriadis, 1980 Pharmac. Ther., **10**:103-108; a Trouet se sp., 1980, Recent Results Cancer Res., **75**:229-235.

Metody použité k navázání těchto agens na molekuly monoklonální protilátky mohou zahrnovat buď kovalentní nebo nekovalentní vazby. Protože je pravděpodobnější, že nekovalentní vazby budou snáze přerušeny ještě před tím, než takový komplex protilátek dosáhne svého cílového místa, dává se přednost kovalentním vazbám. Může být například vytvořena karbodiimidová vazba mezi karboxylovými skupinami farmaceutického činidla a aminoskupinami molekuly protilátky. Bifunkční činidla jako jsou dialdehydy nebo imidoestery mohou

být použity k navázání aminoskupiny takového činidla na aminoskupiny molekuly protilátky. K vazbě léků na molekuly protilátek může být využito reakce Shiffových bází. Tato metoda sestává z oxidace léku nebo cytotoxického činidla, který obsahuje glykol nebo hydroxyskupinu, jodistanem, čímž vzniká aldehyd, který pak reaguje s molekulou protilátky. Připojení probíhá přes vytvoření Shiffovy báze s aminoskupinou molekuly protilátky. Rovněž byly s molekulami protilátek spárovány léky s reaktivními sulfhydrylovými skupinami.

6. DETEKCE *IN VITRO* A MĚŘENÍ ROZBUSTNÉHO FIBRINU.

6.1. Základní informace

Jak jsem uvedli již v oddíle 5.1., zahrnuje hemostatický mechanismus složitý komplex reakcí, ve kterých je nakonec fibrinogen působením trombinu převeden na fibrin. Výsledkem těchto reakcí je vznik trombu (krevní sraženiny). Sekvence reakcí může být jednoduše představována následujícím třístupňovým procesem:

trombin

krok 1 - Proteolýza: fibrinogen
monomery fibrinu + fibrinopeptidy A a B

krok 2 - Polymerizace: monomery fibrinu
rozpustné polymery fibrinu

krok 3 - Srážení: rozpustné polymery fibrinu
fibrinová sraženina

Fibrinogen se skládá ze tří párů různých polypeptidových řetězců: $A\alpha$, $B\beta$ a γ . Viz L. Stryer, Biochemistry, 3.vyd. str. 249, W.H. Freeman a Company New York (1988). V prvním kroce, kde je fibrinogen přeměňován na fibrin (viz výše jako krok 1), je fibrinogen štěpen trombinem, přičemž se ze dvou $A\alpha$ řetězců fibrinu odštěpuje fibrinopeptid A z aminokonců této molekuly. Výsledný monomer je fibrinový monomer DesAA. Jak je rovněž uvedeno v kroku 1, trombin rovněž odštěpuje z aminokonců obou $B\beta$ řetězců fibrinu fibrinopeptid B. Výsledkem uvolnění fibrinopeptidu dochází na α a β řetězcích fibrinu k expozici nových aminokonců. V prvním kroku tedy dochází ke vzniku fibrinopeptidu A, fibrinopeptidu B a fibrinových monomerů DesAA a DesBB, které jsou výše uvedeny pouze jako fibrinové monomery. Viz W. Nieuwenhuizen, Blood Coagulation and Fibrinolysis, 4:93-96 (1993). Podle kroku 2 pak fibrinové monomery vytváří nekovalentní (nesíťované) a kovalentní (síťované) polymery, čímž vznikají rozpustné polymery fibrinu. Jak vidíme v kroku 3, rozpustné polymery fibrinu pak vytváří fibrinovou sraženinu.

Rozpustný fibrin je definován jako jakýkoli druh molekuly pocházející z fibrinogenu nebo fibrinu, který může vést k tvorbě polymeru fibrinu nebo jakýkoli druh molekuly odvozený od fibrinogenu nebo fibrinu, který má molekulovou hmotnost vyšší než je molekulová hmotnost nativního fibrinogenu a udržuje s v

krvi v roztoku. Nesíťované a síťované DesAABB polymery fibrinu, vytvořené podle kroku 2 výše, představují dva z několika druhů rozpustného fibrinu a jsou rovněž dvěma druhy rozpustných polymerů fibrinu. Termín rozpustný fibrin navíc zahrnuje další různé druhy; např. polymery fibrinu DesAA, tj. komplexy vytvořené interakcemi mezi monomery fibrinu (buď monomery fibrinu DesAA nebo DesAABB) a X, Y, D a E produkty degradace fibrinogenu (viz oddíl 5.1. výše, kde jsou popsány produkty těchto degradací) a rovněž na příklad DesAA a DesAABB monomery v komplexu s fibrinogenem, viz Nieuwenhuizen, str. 93-94.

Polymery rozpustného fibrinu jsou bezprostřední prekurzory nerozpustného fibrinu, to znamená, že sraženina a následně hladiny rozpustných fibrinových polymerů v plazmě se u jednotlivce zřejmě zvyšují při ohrožení trombózou nebo při její existenci (tvorba intravaskulárních krevních sraženin). Zjišťování a měření množství těchto polymerů v krvi, zvláště pak polymerů DesAABB rozpustného fibrinu, by tak poskytovalo užitečný ukazatel počínající tvorby krevních sraženin. Viz Bang a Chang, str. 119-121, a Nieuwenhuizen, str. 94, Marder se sp., patent Spojených států amerických č. 5,206,140.

Určité druhy rozpustného fibrinu byly dříve zjišťovány a měřeny pomocí různých metod včetně měření fibrinopeptidu A při použití protilátek proti epitopům A α a γ exponovaným při přeměně fibrinogenu na fibrin, Nieuwenhuizen, 94-96, a měření D-dimerů, Marder se sp., patent Spojených států amerických

č.5,206,140. Další metody používané ke zjišťování a měření rozpustného fibrinu zahrnují například měření aglutinace erytrocytů potažených fibrinem v přítomnosti rozpustného fibrinu, gelovou chromatografií, míru zvýšení aktivace plasminogenu t-PA aktivátorem plasminogenu, viz Nieuwenhuizen, str. 94, ethanolové nebo protaminové síranové gelování, analýzu N-konců frakcí fibrinogenu purifikovaných z plazmy, inkorporaci glycin-ethylesteru značeného ^{14}C a agarózovou gelovou chromatografií, viz Bang a Chang, str. 11-118. Žádný z těchto testů specificky neurčuje a neměří jak rozpustné kovalentní tak nekovalentní polymery fibrinu.

6.2. In vitro analýza rozpustných síťovaných polymerů fibrinu a rozpustných nesíťovaných polymerů fibrinu.

Tento vynález je založen na objevu, že je možné provádět takovou *in vitro* analýzu vedoucí ke zjištění a měření množství rozpustných síťovaných polymerů DesAABB fibrinu a rozpustných nesíťovaných DesAABB polymerů fibrinu, kde jsou tyto polymery složeny z monomerů fibrinu DesAABB, a která neobsahuje žádnou detekci (a) fibrinogenu, (b) produktů degradace fibrinogenu, (c) monomerů fibrinu DesAA, (d) DesAA fibrinových polymerů, (e) DesAABB fibrinových monomerů, (f) síťovaného fibrinogenu (fibrinogen po reakci s faktorem XIIIa), (g) komplexů fibrinogen-DesAA monomer fibrinu a (h) produktů degradace fibrinu ("druhy (a) - (h)"). Produkty degradace fibrinogenu a produkty degradace fibrinu

jsou ty produkty, které vznikají štěpením fibrinogenu nebo fibrinu plasminem tak, jak bylo popsáno v oddíle 5.5.2. výše.

Věříme, že výše popsaná analýza je zvláště užitečná pro klinickou diagnostiku stavů charakterizovaných trombózou.

Tato analýza může být prováděna při použití jakéhokoli vhodného vzorku tělesné tekutiny, ale je obvykle prováděna s použitím savčí krve jako vzorku. Vhodnými savci jsou pro tyto účely například králíci, opice a lidé, kteří jsou pro diagnostiku lidských nemocí nejvhodnější.

V takovémto testu mohou být použity jakékoli dosud známé či v budoucnosti vyvinuté prostředky pro zjišťování polymerů DesAABB síťovaného rozpustného fibrinu a polymerů DesAABB nesíťovaného rozpustného fibrinu, a které nedetekují druhy (a) - (h).

Jakmile je zjištěna jejich přítomnost, mohou být DesAABB polymery rozpustného síťovaného fibrinu a DesAABB polymery rozpustného nesíťovaného fibrinu ve vzorku měřeny buď srovnáním s kontrolním vzorkem, nebo použitím standardů majících známé množství DesAABB polymerů rozpustného síťovaného fibrinu a DesAABB polymerů rozpustného nesíťovaného fibrinu ve vzorku, přičemž tyto standardy neobsahují žádný z druhů (a) - (h).

Podotýkáme, že prostředek pro zjištění přítomnosti určité látky je jakýkoli prostředek, jehož pomocí může být určena přítomnost požadovaného materiálu v testovaném vzorku. Vhodnějším takovýmto prostředkem je protilátka proti DesAABB polymerům síťovaného rozpustného fibrinu a

DesAABB polymerům nesíťovaného rozpustného fibrinu, přičemž tato protilátka nereaguje v křížové reakci s (a) fibrinogenem, (b) produkty degradace fibrinogenu, (c) DesAA monomery fibrinu, (d) DesAA polymery fibrinu, (e) DesAABB monomery fibrinu, (f) síťovaným fibrinem, (g) komplexy fibrinogen-DesAA monomer fibrinu a (h) produkty degradace fibrinu. Zmíněná protilátka může být použita ke zjištění přítomnosti a měření množství DesAABB polymerů rozpustného síťovaného fibrinu a ke zjištění přítomnosti a měření množství

DesAABB polymerů rozpustného nesíťovaného fibrinu v testovaném vzorku. Mezi takové protilátky patří polyklonální nebo monoklonální protilátky, častěji však monoklonální. Taková protilátka může být odvozena od jakéhokoli živočišného druhu. Je však lépe, je-li původu lidského, myšího nebo králíčího. Tyto protilátky navíc zahrnují i chimerické protilátky, jednoduché řetězce protilátek a Fab fragmenty, tento výčet však není konečný.

Příkladem takové protilátky je monoklonální protilátka MH1 popsaná v oddíle 5.5.1. - 5.5.3. a v oddíle 5.6 výše. Věříme, že MH1 protilátka nemá kromě výše uvedených vazebných charakteristik schopnost vázat se na komplexy produktů degradace fibrin-fibrinogen. Tato vazebná vlastnost této MH1 protilátky může zvyšovat její účinnost jako prostředku pro zjišťování a měření rozpustných síťovaných a nesíťovaných DesAABB fibrinových polymerů.

Jako prostředek k detekci mohou být použity dvě nebo více protilátek. Tak mohou být použity kombinace protilátek s

odlišnou specifitou pro zjišťování a měření rozpustných síťovaných DesAABB fibrinových polymerů a rozpustných nesíťovaných DesAABB fibrinových polymerů ve vzorku, kde například ani jedna z protilátek není schopna sama o sobě tvořit komplex ani s DesAABB polymery síťovaného rozpustného fibrinu, ani s DesAABB polymery nesíťovaného rozpustného fibrinu, a kde takové komplexy mohou vytvořit dvě nebo více těchto protilátek. Samozřejmě nesmí žádná z těchto protilátek reagovat v křížové reakci s druhy (a) - (h).

Rovněž podotýkáme, že při použití protilátek může být nezbytné použít protilátky specifické pro daný živočišný druh.

Pro výrobu protilátek mohou být použita různá zvířata imunizací injekcí s DesAABB polymery rozpustného síťovaného fibrinu a DesAABB polymery rozpustného nesíťovaného fibrinu jako antigenu, přičemž mezi tato zvířata patří králíci, myši, potkani, a další. Takové polymery mohou být selektivně izolovány při použití např. MH1 protilátky spolu s afinitní chromatografií na koloně se Sepharózou a navázanou protilátkou MH1. Tyto polymery mohou být připraveny následujícím způsobem: rozpustný fibrin může být nejdříve připraven *in vitro* přidáním nízkých hladin trombinu do plazmy s citrátem. Po potlačení aktivity trombinu některým z inhibitorů trombinu jako např. hirudinem se mohou vzorky plazmy nanést na kolonu Sepharosa-MH1 protilátka. Takováto MH1 kolona může být připravena známou metodou navázání protilátky MH1 na Sepharosu 4B (Pharmacia) aktivovanou bromidem kyanovodíku (viz příloha výrobků Pharmacia pro metody

přípravy kolony protilátka-Sepharosa 4B využívající předem aktivovanou Sepharosu 4B). Rozpustný fibrin je nejdříve aplikován na kolonu Sepharosa-MH1 za přítomnosti fyziologického roztoku tlumeného fosfátem (PBS). Po navázání na sloupec Sepharosy-MH1 může být fibrin eluován roztokem thiokyanátu sodného. Po dialýze proti PBS může být izolovaný polymer fibrinu skladován při -70°C .

Za účelem zvýšení imunitní odpovědi mohou být spolu s izolovanými polymery použita různá adjuvans v závislost na živočišném druhu. Mezi tato adjuvans patří mimo jiné Freundovo kompletní i nekompletní adjuvans, anorganické gely jako hydroxid hliníku, povrch aktivující látky jako lysolecitin, pluronové polyoly, polyaniony, peptidy, olejové emulze, hemocyanin, dinitrofenol, a potenciálně vhodná lidská adjuvans jako BCG (bacil Calmette-Guerin) a *Corynebacterium parvum*.

Monoklonální protilátky specifické na DesAABB polymery rozpustného síťovaného a rozpustného nesíťovaného fibrinu, přičemž tyto protilátky nereagují v křížové reakci s druhy (a) - (g), mohou být připraveny jakýmkoli technikami používanými pro přípravu molekul protilátek pomocí kontinuálního pěstování buněčné linie v kultuře. Mezi tyto techniky mimo jiné patří hybridomové techniky původně popsané Kohlerem a Milsteinem, (*Nature*, 1975, 256:495-497), v poslední době rovněž techniky pro hybridomý lidských B buněk (Kosbor se sp., 1983, *Immunology Today*, 4:72) a techniky EBV-hybridomů (Cole se sp., 1985, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss., Inc., str. 77-96).

V dalším provedení tohoto vynálezu mohou být monoklonální protilátky vyráběny pomocí gnotobiotických laboratorních zvířat při použití současné technologie, viz oddíl 5.2.-5.4. Příkladem výroby takové protilátky je protilátka MH1 popsaná v oddíle 5.3-5.6.

Podle tohoto vynálezu mohou být lidské protilátky vyráběny a získávány s použitím lidských hybridomů (Cote se sp., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. 80:2026-2030) nebo transformací lidských B buněk virem EBV *in vitro* (Cole se sp., 1985, v *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, str. 77-96). Ve skutečnosti mohou být podle tohoto vynálezu použity techniky vyvinuté pro výrobu "chimerických protilátek" (Morrison se sp., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 6851-6855; Neuberger se sp., 1984, Nature 312:604-608; Takeda se sp. 1985, Nature 314:452-454) sestřihem genů pro specifitu molekuly myši protilátky proti příslušnému antigenu spolu s geny molekuly lidské protilátky o příslušné biologické aktivitě. Takové protilátky spadají do rozsahu tohoto vynálezu.

Podle tohoto vynálezu mohou být zde popsané metody přípravy protilátek s jednoduchým řetězcem (patent Spojených států amerických, č. 4,946,778) upraveny pro přípravu protilátek se specifickým řetězcem.

V dalším provedení tohoto vynálezu jsou použity techniky popsané pro konstrukci expresivních knihoven Fab (Huse se sp., Science, 246:1275-1281), které umožňují snadnou identifikaci monoklonálních Fab fragmentů s požadovanou specifikou na

rozpustné síťované a rozpustné nesíťované polymery DesAABB fibrinu.

Fragmenty protilátky, které obsahují specifická vazebná místa pro rozpustné síťované a rozpustné nesíťované DesAABB fibrinové polymery, mohou být připravovány známými metodami. Mezi takové fragmenty patří na příklad fragmenty $F(ab^1)_2$, které mohou být připravovány štěpením molekuly protilátky pepsinem, a fragmenty Fab, které mohou být připravovány redukcí disulfidových můstků fragmentů $F(ab^1)_2$.

Protilátky, které jsou předmětem tohoto vynálezu, mohou být používány v systému imunoanalýz, které jsou pracovníkům v oboru dostatečně známy. Mezi tyto imunologické testy mimo jiné patří radioimunoanalýza, enzymový imunosorpční test, "sendvičový" test, analýza imunodifuze na gelu, aglutinační test, fluorescenční imunoanalýza, imunoanalýza proteinem A, imunoelektroforéza, a jiné. Patent Spojených států amerických č. 4,629,783 a zde citové patenty rovněž uvádějí použitelné způsoby testování.

Daná protilátka může být použita jako základní reagensie v řadě různých imunoanalýz k určování přítomnosti rozpustných síťovaných a rozpustných nesíťovaných DesAABB fibrinových polymerů ve vzorku krve nebo jiné tělesné tekutiny. Obecně řečeno může být tato protilátka využita v jakémkoli typu imunoanalýzy ať již kvantitativní, nebo kvalitativní. Tyto imunoanalýzy zahrnují jak oboustranný sendvičový test, tak jednostrannou imunoanalýzu nekompetičního typu a tradiční kompetiční test.

Nejčastěji používaným testem je pro snadnou detekci a jeho kvantitativní povahu sandvičový test nebo test s dvojí protilátkou mající mnoho variant, které jsou všechny použitelné pro tento vynález.

Na příklad v typickém sandvičovém testu je protilátka imobilizována na pevném substrátu, např. na mikrotitrační destičce, a testovaný vzorek je aplikován na navázanou protilátku. Po určité době potřebné pro inkubaci, to jest po době dostatečné pro vytvoření binárního komplexu antigen-protilátka, je přidána druhá protilátka značená skupinou schopnou indukovat detekovatelný signál a inkubace pokračuje po další dostatečný čas potřebný pro vytvoření vazby na antigen v různých místech a pro tvorbu ternárního komplexu protilátka-antigen-značená protilátka. Veškerý nezreagovaný materiál je odmyt a přítomnost antigenu je určena pozorováním signálu, který může být vyhodnocen srovnáním s kontrolním vzorkem (standardem) obsahujícím známé množství antigenu. Různé obměny sendvičového testu zahrnují simultánní analýzu, ve které jsou jak vzorek tak protilátka současně přidány k navázané protilátce, nebo obrácený sendvičový test, ve kterém jsou značená protilátka a testovaný vzorek nejdříve smíchány, inkubovány, a pak přidány k neznačené protilátce navázané na povrchu. Tyto techniky jsou pracovníkům v oboru dostatečně známy a možnosti drobných obměn těchto metod jsou zřejmé. "Sendvičový test" zde zahrnuje všechny obměny základních dvoustranných technik.

Jako specifitější příklad uvádíme typický sendvičový test, ve kterém je primární protilátka buď kovalentně nebo pasivně navázána na pevný podklad. Pevným podkladem je obvykle sklo nebo nějaký polymer, přičemž nejpoužívanějšími polymery jsou celulóza, polyakrylamid, nylon, polystyren, polyvinylchlorid nebo polypropylen. Pevný podklad může být ve formě zkuševky, lázně, desek nebo mikrodestiček, nebo v jakékoli další formě vhodné k provádění imunoanalýzy. Pracovníkům v oboru jsou vazebné procesy dostatečně známy.

Po navázání protilátky je pevná fáze komplexu protilátky omyta a připravena pro testovaný vzorek. Alikvót testované tělesné tekutiny je pak přidán k pevné fázi komplexu a inkubován po dostatečnou dobu, aby došlo k navázání veškerých přítomných rozpustných nesíťovaných DesAABB polymerů fibrinu a rozpustných síťovaných DesAABB polymerů fibrinu na protilátku specifickou na tyto proteiny. Pak je k pevné fázi komplexu přidána druhá protilátka a je inkubována po další dobu nezbytnou pro navázání druhé protilátky na pevnou fázi komplexu primární protilátka-antigen. Druhá protilátka je navázána na zpravodajskou molekulu poskytující viditelný signál, který je použit jako ukazatel vazby druhé protilátky na kterýkoli antigen testovaného vzorku. "Zpravodajskou molekulou" je pro tuto specifikaci míněna molekula, která svou chemickou povahou poskytuje analyticky zjistitelný signál, který umožňuje detekci protilátky navázané na antigen. Detekce musí být alespoň poměrně kvantifikovatelná, aby bylo možno určit množství antigenu ve vzorku, které může být

vypočteno v absolutních hodnotách nebo jako porovnání se standardem (nebo několika standardy) obsahujícím známou normální hladinu antigenu.

Nejběžněji používanou zpravodajskou molekulou v tomto typu testů jsou buď enzymy nebo fluorofory. V případě imunoanalýzy je enzym konjugován s druhou protilátkou často pomocí glutaraldehydu nebo jodistanu. Je ovšem jasné, že existuje celá řada různých konjugačních technik a pracovníci v oboru je jistě dobře znají. Běžně používaným enzymem je mimo jiné křenová peroxidáza, glukosaoxidáza, β -galaktosidáza a alkalická fosfatáza. Substráty používané s těmito specifickými enzymy se obvykle volí podle jejich schopnosti měnit barvu při hydrolýze příslušným enzymem. Tak na příklad p-nitrofenylfosfát je vhodný pro použití s konjugáty alkalické fosfatázy, pro konjugáty peroxidázy se obvykle používají 1,2-fenylendiamin nebo toluidin. Je rovněž možné použít fluorogenní substráty, které dávají vznik fluoreskujícím produktům. V každém případě je enzymem značená protilátka přidána ke komplexu první protilátky a ponechána, aby se navázala na tento komplex, a pak je přebývajících značená protilátka odmyta. Poté je k ternárnímu komplexu protilátka-antigen-značená protilátka přidán roztok obsahující vhodný substrát. Tento substrát reaguje s enzymem navázaným na druhou protilátku, čímž dává kvalitativní viditelný signál, který může být dále kvantifikován, obvykle spektrofotometricky, a tím poskytnout vyhodnocení množství antigenu přítomného v séru vzorku.

Nebo mohou být použity fluoreskující sloučeniny jako fluorescein nebo rhodamin, které jsou chemicky navázány na protilátky, aniž by nějak změnily vazebnou kapacitu těchto protilátek. Po aktivaci osvětlením nebo určitou vlnovou délkou absorbuje protilátka značená fluoreskující látkou světelnou energii, čímž v molekule dochází k excitovanému stavu, který má za následek emisi světla o určité charakteristické vlnové délce. Emise se objeví jako charakteristická barva pozorovatelná ve světelném mikroskopu. Stejně jako v enzymové imunoanalýze (EIA) je protilátka značená fluoreskující látkou ponechána, aby se navázala na komplex prvního protilátky a antigenu. Po odmytí nenavázané složky je zbývající ternární komplex vystaven světlu o příslušné vlnové délce a pozorování fluorescence vypovídá o přítomnosti antigenu. Techniky imunofluorescence i EIA jsou obě dobře odzkoušené a známé, a pro účely této metody obzvlášť vhodné. Nicméně mohou být použity i další zpravodajské molekuly jako jsou radioizotopy, chemiluminiscentní nebo bioluminiscentní molekuly. Pracovníci v oboru budou již sami vědět, jakou variantu této metody pro své potřeby zvolit.

Další možností u testovaného vzorku, ať už jím je savčí krev nebo jiná tělesná tekutina obsahující rozpustné DesAABB polymery nesíťovaného fibrinu a rozpustné DesAABB polymery síťovaného fibrinu, je použití jednostranné imunoanalýzy, ve které je tento vzorek kovalentně nebo nekovalentně připoután k pevnému substrátu. Neznačená protilátka je uvedena do kontaktu s vzorkem vázaným na pevný substrát. Po vhodné

době inkubace, která poskytuje dostatek času pro tvorbu binárních komplexů protilátka-antigen, je přidána druhá protilátka značená zpravodajskou molekulou schopnou indukovat zjititelný signál a inkubace pokračuje dále po dobu potřebnou pro vytvoření ternárního komplexu antigen-protilátka-značená protilátka. Pro jednostrannou imunoanalýzu může být druhou protilátkou obecná protilátka (tj. zenogeneická protilátka proti imunoglobulinu, zvláště anti-IgM a anti-IgG navázaná na zpravodajskou molekulu), která je schopná vázat protilátku specifickou na rozpustný polymer kovalentního fibrinu a na rozpustný polymer nekovalentního fibrinu.

Zjišťování a měření rozpustných DesAABB polymerů síťovaného fibrinu a rozpustných DesAABB polymerů nesíťovaného fibrinu je obzvláště užitečné v případech, kdy je tento test prováděn na plazmě pacientů, aby se zjistila začínající nebo již existující trombotická příhoda, která je důsledkem začínající nebo již existující trombózy. Viz. např. W. Nieuwenhuizen, str. 94, Bang a Chang, str. 109-122, a Marder se sp., patent Spojených států amerických č. 5,206,140. Takové příhody zahrnují například trombózu hlubokých žil (DVT), stav, který vzniká, jestliže se trombus (krevní sraženina) uvolní z hlubokých žil a embolizuje pulmonární vaskulaturu; diseminovanou intravaskulární koagulaci, která vzniká jako výsledek systémové aktivace kaskády srážení krve (např. při bakteriální infekci); infarkt myokardu (MI), který vzniká při ucpání koronární arterie, která zásobuje srdeční sval krví,

trombem; mrtvice; a intrakardiálního trombu vzniklého v důsledku síňové fibrilace. Typ trombotické příhody může být diagnostikován s použitím testu pro zjišťování a měření rozpustných DesAABB polymerů síťovaného fibrinu a rozpustných DesAABB polymerů nesíťovaného fibrinu v kombinaci s pozorování dalších symptomů pacienta. Jedná se o ty symptomy, které by byly běžně využity pro klinickou diagnózu počínající nebo již existující trombotické příhody. Uvedené zjišťování a měření rozpustných DesAABB polymerů fibrinu je zvláště užitečné jako prostředek pro diferenciační diagnostiku pro odlišení pacientů s bolestmi na prsou v důsledku počínajícího infarktu myokardu od pacientů s bolestmi na prsou z jiných důvodů.

6.3. PŘÍKLADY MATERIÁLŮ A METOD

6.3.1. Proteiny

Hovězí serumalbumin a trombin byly zakoupeny od ICN (Costa Mesa, CA). Hirudin, křenová peroxidáza a tablety substrátu o-fenylendiamindichloridu byly nakoupeny od Sigma Chemical Co. (St. Luis, MO). Lidský fibrinogen (stupeň L) byl nakoupen od Helena Laboratories (Beaumont, TX). Fibrinogen byl dále purifikován precipitací síranem amonným podle Holma se sp., Thromb. Res. 37: 165-176 (1985). Monoklonální protilátka proti fibrinu, MH1, používaná v systému testů byla provedena výše popsáním způsobem, viz oddíl 5. Monoklonální protilátka proti fibrinogenu, 45J, byla rovněž připravena postupem podle oddílu 5.

DesAABB monomer fibrinu byl připraven rozpuštěním polymeru nesíťovaného fibrinu v pufovacím roztoku 50 mM octanu sodného (pH5,3) obsahujícím bromid sodný.

Polymery DesAABB síťovaného rozpustného fibrinu byly vyrobeny inkubací fibrinogenu nebo plazmy s citrátem s nízkými hladinami trombinu (0,025 jednotek/ml) po dobu 7-8 minut. Reakční směs rovněž obsahovala faktor XIIIa. Reakce byla zastavena přidáním hirudinu k reakční směsi (do konečné koncentrace 10 ATU/ml).

Polymery DesAABB nesíťovaného rozpustného fibrinu byly připraveny inkubací plazmy s přidavkem citrátu nebo fibrinogenu s roztokem trombinu obsahujícím EDTA (konečná koncentrace 12 mM) po dobu 7-8 minut při teplotě 37°C. Reakce byla zastavena přidavkem nadbytku hirudinu k reakční směsi (konečná koncentrace 10 ATU/ml).

6.3.2. Konjugáty MH1 a 45J křenové peroxidázy

(upraveno podle Wilsona a Nakane,

Imunofluorescence and Related Staining Techniques,

Knapp se sp. (vyd.), str. 215.224, Elsevier/North

Holland Biomedical Press, Amsterdam (1978))

Křenová peroxidáza (HRP) (RZ > 3) (10 mg) byla rozpuštěna v 1 ml destilované vody. Byl přidán čerstvě připravený 0,1M roztok jodistanu sodného (0,4 ml) a za mírného míchání ponecháno po dobu 20 minut. Poté byl roztok přenesen do pufru octanu sodného (1% mM, pH4,4) při teplotě 4°C a s použitím mikrokonzentrátoru Centricon 10.

Bylo zvýšeno pH roztoku na 9,5 přidáním 40 ml 0,2M uhličitanového pufru s hydrogenuhličitanem sodným (pH9,5). Pak byla okamžitě přidána protilátka MH1 (20 mg) v objemu 2,0 ml 0,01M uhličitanového pufru (pH9,5). Tento roztok byl mírně promícháván při laboratorní teplotě po dobu 2 hodin, po kterých byl přidány 0,2 ml čerstvě připraveného roztoku boritanu sodného (4 mg/ml). Směs byla ponechána v klidu 2 hodiny při teplotě 4°C.

Nakonec byl konjugát protilátka HRP dialyzován proti 5x4 litrům PBS při teplotě 2-8°C.

Konjugát byl uskladněn v hnědém kontejneru při teplotě 2-8°C.

6.3.4. Vzorky krve

Vzorky krve byly získány jak od zdravých dobrovolníků, tak od pacientů na pohotovosti s klinickými příznaky MI jako např. ostrými bolestmi na prsou, na základě jejich souhlasu. Krevní vzorky byly shromažďovány do vacutainerů, tj. jednorázových odběrek, (Becton Dickinson) s použitím citrátu sodného. Plazma byla oddělena centrifugací při 2400 rpm po dobu 15 minut. Pak byla plazma okamžitě použita nebo uskladněna při -70°C.

6.3.4. ELISA test pro měření rozpustného fibrinu

Rozpustný fibrin byl zjišťován v čerstvých nebo zmrzlých vzorcích plazmy s použitím enzymového imunosorpčního testu sendvičového typu. Imobilizovanou protilátkou byla protilátka

MH1 proti fibrinu, která je předmětem tohoto vynálezu. Zjišťovací (nebo označovací) protilátkou byl HRP konjugát té samé protilátky. Jako označovací protilátka může být rovněž použit HRP konjugát antifibrinové protilátky 45J.

Polyvinylchloridové (PVC) 96ti jamkové mikrotitrační destičky (Costar Cambridge, MA) byly potaženy monoklonální protilátkou MH1 inkubací 100 μ l roztoku Mab (v 50 mg/ml) v inkubačním pufru (borát sodný, pH8,5) po dobu 12-16 hodin při teplotě 4°C. Nenavázaná protilátka byla z mikrotitračních destiček odstraněna trojím omytím jamek roztokem PBS-Tween. Jamky potažené MH1 byly dále potaženy BSA inkubací 200 μ l roztoku BSA (1%) v PBS (PBS-BSA) po dobu 1 hodiny při teplotě 37°C. Nenavázaný BSA odstraněn překlopením destiček dnem vzhůru a jejich ponechání na papírovém ručníku, aby odkapaly. Vzorky s citrátem (50 μ l) obsahující rozpustný fibrin byly inkubovány v jamkách s blokovými MH1-BSA po dobu 30 minut při teplotě 37°C. Nenavázaný materiál byl odstraněn překlopením destiček a jejich jemným odkapáním. Jamky pak byly třikrát omyty PBS-Tween. Navázaný rozpustný fibrin byl v jamkách zjišťován nejdříve inkubací se 100 μ l roztoku PBS-BSA konjugátu MH1-HRP (nebo HRP konjugátu protilátky proti fibrinu [fibrinogenu] 45J) po dobu 30 minut při 37°C. Nenavázaný konjugát byl odstraněn překlopením mikrotitrační destičky a trojím omytím jamek PBS-Tween. Navázaný konjugát byl zjišťován přidáním 100 μ l roztoku O-fenylendiamin dichloridu, který byl v jamkách ponechán po dobu 10 minut při laboratorní teplotě. Roztok substrátu byl připraven rozpuštěním

tabulky 0-fenylendiamin dichloridu v roztoku citrátu sodného obsahujícím H_2O_2 .

Kolorimetrická reakce byla zastavena po 10 minutách přidáním 25 μl roztoku H_2SO_4 (1M). Absorbance roztoku v každé jamce byla určována při 490 nm ve čtecím zařízení pro mikrotitrační destičky Thermomax (Molecular Devices, Menlo Park, CA).

6.3.5. Příprava kolon pro afinitní chromatografii.

Kolony Sepharosy MH1 byly připraveny následujícím způsobem:

Zmrzlá vysušená Sepharosa 4B (Pharmacia) aktivovaná bromkyanem byla odvážena v množství 1 g a rozmíchána v 1mM HCl. Nabobtnalý gel byl 15 minut promýván 1 mM HCl na sintrovaném skleněném filtru.

Protilátka MH1 (20 mg) byla rozpuštěna ve spojovacím pufru (0,1 M NaHCO_3 , pH8,3 obsahujícím 0,5M NaCl) a jemně vmíchána do nabobtnalého gelu v uzavřené nádobě a ponechána při laboratorní teplotě 2 hodiny nebo při 4°C přes noc.

Po promýchání byl gel promyt spojovacím puftrem, aby se odstranila nadbytečná protilátka. Nezablokovaná aktivní místa byla zablokována reakcí s 0,1M Tris HCl, pH8,0 (nebo ethanolaminem, pH9,0) trvajícím 2 hodiny při laboratorní teplotě. Gel s navázanou protilátkou pak byl třikrát promyt 0,1M octanovým puftrem (pH4,0 obsahujícím 0,5M NaCl), po kterém následoval Trisový pufr (0,1M, pH8,0 obsahující NaCl 0,5M).

Spárovaná protilátka byla uskladněna při 4°C v 0,05% roztoku s azidem sodným.

Kolony Sepharosy s DesAABB monomerem fibrinu byly připraveny takto:

DesAABB monomery fibrinu byly navázány na Sepharosu 4B aktivovanou bromkyanem za přítomnosti 1M NaBr v 0,1M borátovém pufru (pH8,2) při použití stejného postupu jako při přípravě Sepharosy 4B s MH1 protilátkou.

6.3.6 Charakterizace jednotky rozpustného fibrinu rozpoznávané *in vitro* testem pro polymery rozpustného fibrinu používajícího pro detekci rozpustného fibrinu protilátku MH1.

Jak již bylo dříve uvedeno v oddíle 5.5, protilátka MH1 nerozpoznává fibrinogen, plazmový prekurzor polymeru fibrinu. V oddíle 5.5 jsme rovněž ukázali, že tato protilátka rozpoznává polymery jak síťovaného tak nesíťovaného fibrinu. Navíc jsme v tom samém oddíle 5.5 poukázali na to, že degradace fibrinu plasminem (nebo kterýkoli proces, který vede k destrukci struktury fibrinových polymerů) způsobuje ztrátu imunitního rozpoznávání fibrinu takovouto protilátkou. Následně tato MH1 protilátka nerozeznává žádný ze známých produktů degradace kovalentního fibrinu plasminem.

Důkazy, že tato MH1 protilátka rozpoznává pouze polymerní strukturu fibrinu DesAABB a nerozpoznává monomerní jednotky DesAABB fibrinu, poskytla afinitní chromatografie. Stručně řečeno, 0,5 mg MH1 protilátky bylo

pasážováno přes 5 ml kolonu Sepharosy-desAABB fibrinového monomeru. Kolona byla promyta ekvilibračním pufrém (0,1M Trisem pufovaný fyziologický roztok [TBS], pH8,5). Nebylo pozorováno žádné výrazné vázání protilátky na kolonu. Jak ukazuje obrázek 1A, byla tato protilátka z kolony vylučována. Elucí 6M guanidinhydrochloridem bylo z kolony získáno malé množství navázaného proteinu. Protein byl zjištěn vyšetřením všech frakcí při 280 nm. Protilátka pak byla určena testováním imunoreaktivity daného proteinu pomocí ELISA testu na pevné fázi s použitím mikrotitračních destiček potažených fibrinem. Použitý ELISA test je popsán v oddíle 5.4.2 výše. Protein navázaný na kolonu je výsledkem přítomnosti malého množství kontaminujícího rozpustného polymeru DesAABB fibrinu spárovaného s monomerem DesAABB fibrinu v koloně. Tato kontaminující složka je přítomna v počátečním materiálu použitém pro přípravu kolony monomeru fibrinu DesAABB. Pro demonstraci, že Sepharosová kolona desAABB monomeru fibrinu má schopnost vázat protilátku, byla kolonou v kontrolním experimentu pasážována monoklonální protilátka (Mab) specifická proti fibrinu. Jak je vidět na obrázku 1B, kolona vázala kontrolní Mab, tj. protilátku proti fibrinogenu 45J, a tato protilátka byla opět získána z kolony elucí guanidinhydrochloridem (6M).

Důkazy, že výše popsaná MH1 protilátka rozpoznává polymery jak síťovaného, tak nesíťovaného rozpustného DesAABB fibrinu, byly získány v experimentu, ve kterém byly DesAABB polymery rozpustného fibrinu vytvořeny přidávkem

trombinu do plazmy s citrátem za přítomnosti EDTA a bez EDTA (EDTA zabráňuje faktoru XIIIa vytvořit kovalentní vazby s polymery DesAABB fibrinu). DesAABB polymery síťovaného a nesíťovaného rozpustného fibrinu byly připraveny podle postupu popsaného v oddíle 6.3.1 a jejich příslušná imunoreaktivita byla měřena pomocí ELISA testu podle popisu uvedeného v oddíle 6.3.4. Jak ukazuje obrázek 2, neexistuje v tomto testovacím systému žádný výrazný rozdíl mezi imunoreaktivitou polymerů síťovaného (B) a nesíťovaného (A) fibrinu.

Důkaz, že MH1 protilátka nerozeznává DesAA polymer rozpustného fibrinu, byl získán v experimentu, ve kterém byl polymer DesAA fibrinu připraven reakcí fibrinogenu nebo plazmy s enzymem batroxobinem odvozeným od hadího jedu z *Bathrops atrox*, který selektivně odštěpuje z molekuly fibrinogenu fibrinopeptid A (FPA). Batroxobin neštěpí fibrinopeptid B (FPB) na rozdíl od trombinu, který štěpí jak FPA, tak FPB. Odstranění FPA vede k polymerizaci monomerních jednotek desAA fibrinu a k vytvoření fibrinové sraženiny DesAA. Obrázek 3 ukazuje tvorbu sraženiny, jak byla měřena absorbancí reakční směsi při 340 nm při inkubaci vzorku fibrinogenu s roztokem batroxobinu po dobu 15 minut při laboratorní teplotě. Absorbance se s časem zvyšovala tak, jak se zvyšovala délka a koncentrace polymerů DesAA rozpustného fibrinu, dokud se nevytvořila konečná sraženina. V experimentu na otestování schopnosti MH1 protilátky rozpoznávat desAA fibrin byl polymer desAA fibrinu vytvořen

in vitro inkubací vzorku fibrinogenu s batroxobinem (konečná koncentrace 0,5 jednotek/ml) při 37°C. Ze vzorku byla po reakci s batroxobinem odebírána alikvotní část každých 7 minut a testována ELISA testem podle oddílu 6.3.4. U tohoto vzorku, tj. vzorku C podle obrázku 4, nebyla zjištěna žádná reaktivita. Z tohoto experimentu můžeme rovněž vydedukovat, že tento testovací systém nerozpoznává komplex fibrinogen-desAA fibrin, který je dalším zdrojem rozpustného fibrinu. Je zřejmé, že reakční směs vytvořená v tomto experimentu obsahovala takové jednotky "rozpustného fibrinu", protože batroxobin vytváří monomery desAA fibrinu, které jsou volné pro interakce s dalšími desAA monomery nebo s neštěpenými molekulami fibrinogenu. Protože v tomto testu nebyla po přidání batroxobinu pozorována žádná reaktivita, můžeme vyslovit závěr, že tento test nedetekuje tyto fibrinogen-desAA fibrinové jednotky. Vzorek B, který byl pozitivní kontrolou, se skládal z polymerů DesAABB fibrinu vytvořených reakcí vzorku plazmy s trombinem a hirudinem. Jako negativní kontrola byl přidán nezreagovaný fibrinogen, tj. vzorek A.

Rozpustný fibrinový komplex může rovněž vzniknout působením faktoru XIIIa, který spojuje molekuly nativního fibrinogenu za vzniku dimerů fibrinogenu (Kanaide se sp., 8J. Lab. Clin. Med. 86: 574-579 (1975)). Tento test nedetekuje fibrinogen po reakci s faktorem XIIIa (FXIIIa). V tomto experimentu byl do jamek mikrotitrační destičky nejdříve přidán trombin aktivovaný faktorem XIIIa a inkubace probíhala po dobu 30 minut při 37°C. Po zastavení aktivity zbytkového

trombinu byla protilátka MH1 inkubována v jamkách po reakci s FXIIIa a navázaná protilátka MH1 byla zjišťována použitím konjugátu myší alkalické fosfatázy. Navázaná antimyší protilátka byla zjišťována přidavkem substrátu alkalické fosfatázy. Hladina MH1 protilátky navázané v jamkách mikrotitrační destičky byla měřena odečítáním optické density při 490 nm. Obrázek 5 ukazuje, že u značeného vzorku Fg + FXIIIa nebyla zjištěna žádná protilátka MH1 navázaná na jamky mikrotitrační destičky, což ukazuje, že tato protilátka nerozpoznává kovalentní struktury fibrinogenu. Jako pozitivní kontrola byly jamky potažené fibrinogenem uvedeny v kontakt s trombinem, čímž se vytvořily polymery fibrinu desAABB. Tyto pak byly na vzorku značeného Fg + trombin testovány na imunoreaktivitu s protilátkou MH1, viz obrázek 5.

6.3.7 Měření tvorby rozpustného DesAABB polymeru fibrinu in vitro.

Rozpustné polymery fibrinu DesAABB byly *in vitro* vytvořeny přidáním nízkých hladin trombinu (0.025 NIH jednotek/ml) ke vzorku plazmy s citrátem. Vzorek byl inkubován při teplotě 37°C. V jednodominutových intervalech byly ze vzorku odebírány alikvoty a aktivita trombinu byla zastavena přidavkem silného inhibitoru trombinu hirudin (do konečné koncentrace 2-ATU/ml). Množství polymeru rozpustného fibrinu DesAABB bylo měřeno v každém alikvotním vzorku ELISA testem popsaným v oddíle 6.3.4.

Obrázek 6 ukazuje, jak množství rozpustného polymeru fibrinu určené absorbcí při 490 nm prudce vzrůstá po první lag fázi trvající 4-5 minut po přidání trombinu do plazmy. Hladina polymerů rozpustného fibrinu dosahuje svého vrcholu po přibližně 7,5 minutách po přidání trombinu do plazmy. Strmost křivky hladiny rozpustného fibrinu pozorované po 9-10 minutách se shoduje s gelováním a tvorbou nerozpustných fibrinových polymerů (tvorba sraženiny).

6.3.8 Purifikace polymerů rozpustného fibrinu z plazmy afinitní chromatografií využívající Sepharosu-MH1.

Vzorek plazmy byl inkubován s trombinem (0,025 jednotek/ml) po dobu 7 minut při teplotě 37°C. Aktivita trombinu byla zastavena přidáním nadbytku hirudinu. Reakční směs byla pasážována přes kolonu Sepharosa-MH1. Počáteční materiál, výtok z kolony (nenavázaný materiál), navázaný protein (purifikovaný protein), který byl eluován s použitím NaSCN (3) a dialyzován proti PBS, byly testovány na imunoreaktivitu s MH1 protilátkou pomocí ELISA testu podle sekce 6.3.4. Imunoreaktivita plazmy po přidání trombinu a po zastavení reakce hirudinem (počáteční materiál); navázaného proteinu po odebrání z kolony a dialýze (eluce), a nevázaného materiálu (nevázaný) je uvedena na obrázku 7. Počáteční materiál a vázaný protein po dialýze byly imunoreaktivní s MH1, zatímco nevázaný materiál nebyl.

6.3.9 In vitro zjišťování a měření polymerů rozpustného kovalentního a rozpustného nekovalentního fibrinu pro diagnostiku MI

Třicetšest různých vzorků plazmy bylo testováno na hladiny polymerů rozpustného nesíťovaného a rozpustného síťovaného DesAABB fibrinu pomocí ELISA testů popsanych výše v oddíle 6.3.4 s MH1 jako imobilizovanou protilátkou. Po sebrání byl do vzorků plazmy přidán antikoagulant a vzorky byly zamrazeny. Rozmražené vzorky byly testovány na polymery rozpustného síťovaného a nesíťovaného DesAABB fibrinu. Deset z těchto 36 vzorků bylo odebráno od zdravých lidských jedinců pro kontrolu. Zdravé kontroly byly získány od dobrovolníků z řad zdravotnického personálu, kteří se těšili plnému zdraví a kteří nikdy po námaze necítili bolesti na prsou. Všechny ostatní vzorky byly odebrány pacientům na oddělení intenzivní péče v místní nemocnici. Všichni tito pacienti z oddělení intenzivní péče měli klinické příznaky (bolest pod prsní kostí) ukazující na infarkt myokardu (MI); u 15 pacientů byl potvrzen infarkt myokardu; u ostatních 11 pacientů bylo prokázáno, že infarktem myokardu netrpí. U druhé skupiny pacientů byly vysloveny různé diagnózy včetně anginy pectoris, úzkosti, pulmonální edemy. Vzorky krve byly od pacientů odebírány okamžitě po jejich přijetí na oddělení intenzivní péče. U většiny pacientů byly vedeny záznamy o průběhu symptomů. V této studii všichni pacienti zaznamenali bolest pod hrudní kostí 1-3 hodiny před přijetím na oddělení intenzivní péče. Obrázek 8 ukazuje, že všichni pacienti s potvrzeným infarktem myokardu měli

výrazně vyšší hladiny polymerů rozpustného DesAABB fibrinu než zdravé kontroly (rozdíly byly 3-30tinásobné). U pacientů, kteří měli bolesti na prsou, ale nebyl u nich potvrzen infarkt myokardu, nebyly rozdíly mezi hladinami polymerů rozpustného fibrinu DesAABB. (Hladiny polymerů síťovaného rozpustného a rozpustného nesíťovaného DesAABB fibrinu jsou uvedeny jako "Hladina rozpustných fibrinových Elisa jednotek [x 1000]).

Citlivost tohoto testu byla tudíž 100% (pro $n=36$) a specifita tohoto testu byla rovněž 100%, tj. test neposkytoval žádné falešné kladné nebo záporné hodnoty. Můžeme tudíž vyslovit závěr, že tento systém testu má vysokou hladinu přesnosti diagnózy případů infarktu myokardu.

6.4 SOUPRAVY PRO *IN VITRO* DETEKCI POLYMERŮ ROZPUSTNÉHO SÍŤOVANÉHO FIBRINU A POLYMERŮ ROZPUSTNÉHO NESÍŤOVANÉHO FIBRINU.

Je potřeba si u vědomit, že tento vynález se neomezuje pouze na využití monoklonálních protilátek v testech. Avšak tam, kde jsou tyto protilátky použity v testovacích soupravách zde uváděných, obsahují tyto soupravy sadu standard, první protilátku (tj. imobilizovanou protilátku, na příklad MH1), která může být imobilizována na nějakém povrchu, a druhou protilátku značenou tvůrcem signálu, jak bylo popsáno výše. Tyto soupravy obsahují standardy se známým množstvím polymeru rozpustného síťovaného DesAABB fibrinu a rozpustného nesíťovaného DesAABB fibrinu. Takové standardy

mohou být připraveny izolací rozpustných síťovaných a nesíťovaných DesAABB fibrinových polymerů pomocí MHI Sepharosové afinitní kolony podle výše popsaného postupu. Tyto soupravy mohou rovněž obsahovat soubor pomůcek nebo chemikálií potřebných pro reakce s testovanými vzorky.

Veškeré citované publikace a patenty jsou uvedeny v přehledu literatury.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Metoda pro *in vitro* detekci přítomnosti nebo množství polymerů rozpustného síťovaného fibrinu DesAABB a polymerů rozpustného nesíťovaného fibrinu DesAABB v savčích vzorcích, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje kontakt daného vzorku s protilátkou nebo jejím imunoreaktivním fragmentem, která se specificky váže na polymery rozpustného síťovaného fibrinu DesAABB a polymery rozpustného nesíťovaného fibrinu DesAABB za vzniku imunokomplexu, přičemž se tato protilátka nebo její imunoreaktivní fragment neváže specificky na: (a) fibrinogen, (b) produkty degradace fibrinogenu, (c) monomery DesAA fibrinu, (d) polymery DesAA fibrinu, (e) monomery DesAABB fibrinu, (f) kovalentní fibrinogen, (g) komplex monomer DesAA fibrin-fibrinogen a (h) produkty degradace fibrinu, a která dále zjišťuje přítomnost nebo množství takového imunokomplexu.

2. Metoda podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e v ní používaná protilátka se specificky váže na epitop rozpoznávaný monoklonální protilátkou označenou MH1 produkovanou hybridomem ATCC HB 9739.

3. Metoda podle nároku 2 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e v ní používaná protilátka je monoklonální protilátka označená MH1 a produkovaná hybridomem ATCC HB 9739.

4. Metoda podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, že savčím vzorkem je lidský vzorek.

5. Metoda podle nároku 4 v y z n a č u j í c í s e t í m, že lidský vzorek je tělesná tekutina.

6. Metoda podle nároku 5 v y z n a č u j í c í s e t í m, že tělesnou tekutinou je krev.

7. Metoda podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, že je v ní imunokomplex detekován nebo kvantifikován pomocí sekundární protilátky nebo jejím imunoreaktivním fragmentem, která se specificky váže na tento imunokomplex, a ve které je zmíněná sekundární protilátka (nebo její imunoreaktivní fragment) značena zpravodajskou molekulou, která vydává detekovatelný signál, který je měřen a koreluje s přítomností nebo množstvím daného imunokomplexu.

8. Metoda podle nároku 7 v y z n a č u j í c í s e t í m, že v ní používanou sekundární protilátkou je protilátka, která se váže na epitop rozpoznávaný monoklonální protilátkou označenou 45J a produkovanou hybridomem ATCC HB 9740.

9. Metoda podle nároku 8 v y z n a č u j í c í s e t í m, že v ní používanou sekundární protilátkou je monoklonální protilátka označená 45J a produkovaná hybridomem ATCC HB 9740.

10. Metoda v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e vyhodnocuje predispozice pro trombotickou příhodu, napomáhá diagnostice výskytu trombotické příhody u savců, zahrnuje detekci množství polymerů rozpustného síťovaného fibrinu DesAABB a polymerů rozpustného nesíťovaného fibrinu DesAABB ve vzorku ze zmíněného savce, zahrnuje reakci zmíněného vzorku s protilátkou nebo jejím imunoreaktivním fragmentem za vzniku imunokomplexu, přičemž se tato protilátka nebo její imunoreaktivní fragment specificky neváže na: (a) fibrinogen, (b) produkty degradace fibrinogenu, (c) monomery DesAA fibrinu, (d) polymery DesAA fibrinu, (e) monomery DesAABB fibrinu, (f) kovalentní fibrinogen, (g) komplex monomer DesAA fibrin-fibrinogen, a (h) produkty degradace fibrinu za vzniku jejich imunokomplexu, a která detekuje množství zmíněného imunokomplexu a porovnává dané množství s kontrolním vzorkem za účelem vyhodnocení predispozic pro trombotickou příhodu nebo za účelem monitorování trombotické příhody u daného savce.

11. Metoda podle nároku 10 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e v ní používaná protilátka se specificky váže na epitop rozpoznávaný monoklonální protilátkou označenou MH1 a produkovanou hybridomem ATCC HB 9739.

12. Metoda podle nároku 11 v y z n a č u j í c í s e t í m,

ž e v ní používaná protilátka je označena MH1 a produkována hybridomem ATCC HB 9739.

13. Metoda podle nároku 10 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e je její pomocí trombotická příhoda vybrána ze skupiny obsahující infarkt myokardu, trombózu hlubokých žil, pulmonální embolii, diseminovanou intravaskulární koagulaci, mrtvici a intrakardiální trombus vzniklý v důsledku síňové fibrilace.

14. Metoda podle nároku 10 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e v ní používaným savčím vzorkem je vzorek lidský.

15. Metoda podle nároku 14 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e v ní používaným lidským vzorkem je tělesná tekutina.

16. Metoda podle nároku 15 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e v ní používanou tělesnou tekutinou je krev.

17. Metoda podle nároku 10 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e je v ní množství imunokomplexu detekováno pomocí sekundární protilátky nebo jejího imunoreaktivního fragmentu, která se specificky váže na tento imunokomplex, a ve které je tato sekundární protilátka nebo její imunoreaktivní fragment značena zpravodajskou molekulou, která produkuje detekovatelný signál, který je měřen a koreluje s množstvím daného imunokomplexu.

18. Metoda podle nároku 17 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e v n í p o u ž í v a n o u s e k u n d á r n í p r o t i l á t k o u j e p r o t i l á t k a, k t e r á s e v á ž e n a e p i t o p r o z p o z n á v a n ý m o n o k l o n á l n í p r o t i l á t k o u o z n a č e n o u 45J a p r o d u k o v a n o u h y b r i d o m e m A T C C H B 9740.

19. Metoda podle nároku 18 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e v n í p o u ž í v a n o u s e k u n d á r n í p r o t i l á t k o u j e m o n o k l o n á l n í p r o t i l á t k a o z n a č e n á 45J a p r o d u k o v a n á h y b r i d o m e m A T C C H B 9740.

20. Souprava pro *in vitro* detekci přítomnosti nebo množství polymerů rozpustného síťovaného fibrinu DesAABB a polymerů rozpustného nesíťovaného fibrinu DesAABB ve vzorku ze savce, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e z a h r n u j e:

(a) měřená množství standardů obsahujících zmíněné polymery rozpustného síťovaného DesAABB fibrinu a polymery zmíněného rozpustného nesíťovaného DesAABB fibrinu;

(b) prostředky pro vytvoření imunokomplexu s uvedenými polymery rozpustného síťovaného DesAABB fibrinu a polymery uvedeného rozpustného nesíťovaného DesAABB fibrinu, přičemž tyto prostředky zahrnují protilátku nebo její imunoreaktivní fragment, která se neváže specificky na: (i) fibrinogen, (ii) produkty degradace fibrinogenu, (iii) monomery DesAA fibrinu, (iv) polymery DesAA fibrinu, (v) monomery DesAABB fibrinu, (vi) kovalentní fibrin, (vii) komplex monomer DesAA fibrinu-fibrinogen a (viii) produkty degradace fibrinu; a

(c) prostředky pro detekci množství uvedeného imunokomplexu.

21. Souprava podle nároku 20 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e v n í používaným prostředkem pro tvorbu imunokomplexu se zmíněnými polymery rozpustného síťovaného DesAABB fibrinu a zmíněného rozpustného nesíťovaného DesAABB fibrinu je protilátka nebo její imunoreaktivní fragment, která se specificky váže na epitop rozpoznávaný monoklonální protilátkou označenou MH1 a produkovanou hybridomem ATCC HB 9739.

22. Souprava podle nároku 21 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e v n í používaná protilátka je monoklonální protilátka označená MH1 a produkovaná hybridomem ATCC HB 9739.

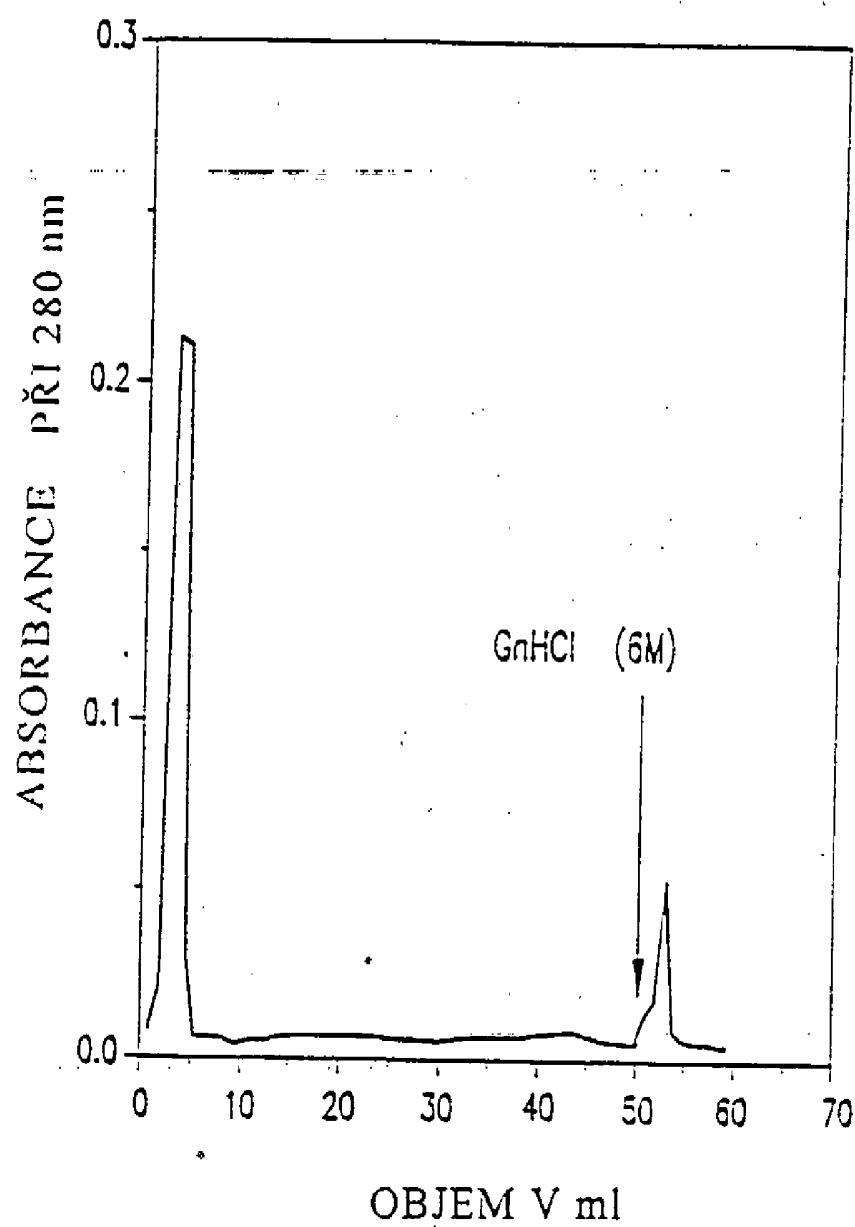
23. Souprava podle nároku 20 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e v n í používaným prostředkem pro detekci množství uvedeného imunokomplexu je sekundární protilátka nebo její imunoreaktivní fragment značená zpravodajskou molekulou, která produkuje detekovatelný signál, který je měřen a který koreluje s množstvím uvedeného imunokomplexu.

24. Souprava podle nároku 23 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e v n í používaná sekundární protilátka se specificky váže na epitop rozpoznávaný monoklonální protilátkou označenou 45J a produkovanou hybridomem ATCC HB 9740.

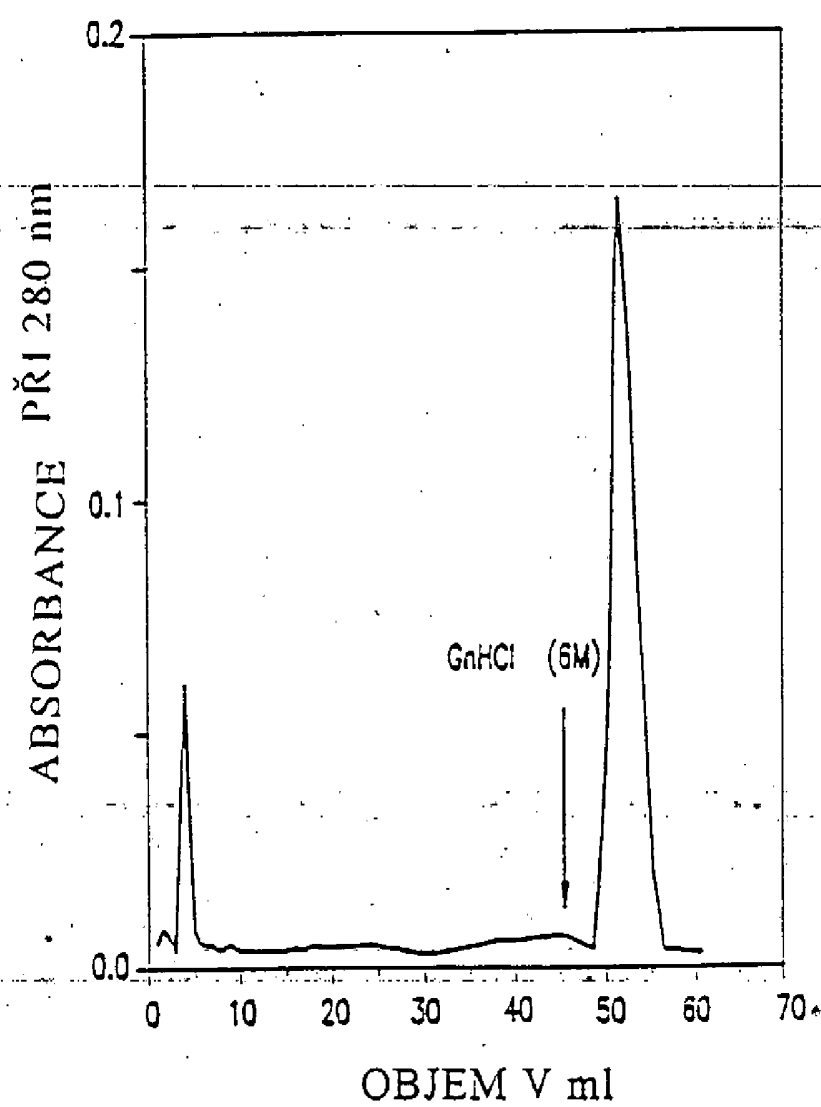
25. Souprava podle nároku 24 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e v n í p o u ž í v a n o u s e k u n d á r n í p r o t i l á t k o u j e m o n o k l o n á l n í p r o t i l á t k a o z n a č e n á 45J a p r o d u k o v a n á h y b r i d o m e m A T C C H B 9740.

26. Souprava podle nároku 20 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e d á l e o b s a h u j e k o n t r o l n í v z o r e k u ž í t e č n ý p ř i u ř č o v á n í p r e d i s p o z i c e p r o t r o m b o t i c k o u p ř í h o d u, v ý s k y t t r o m b o t i c k é p ř í h o d y n e b o p ř í s l e d o v á n í t r o m b o t i c k é p ř í h o d y u s a v c ů.

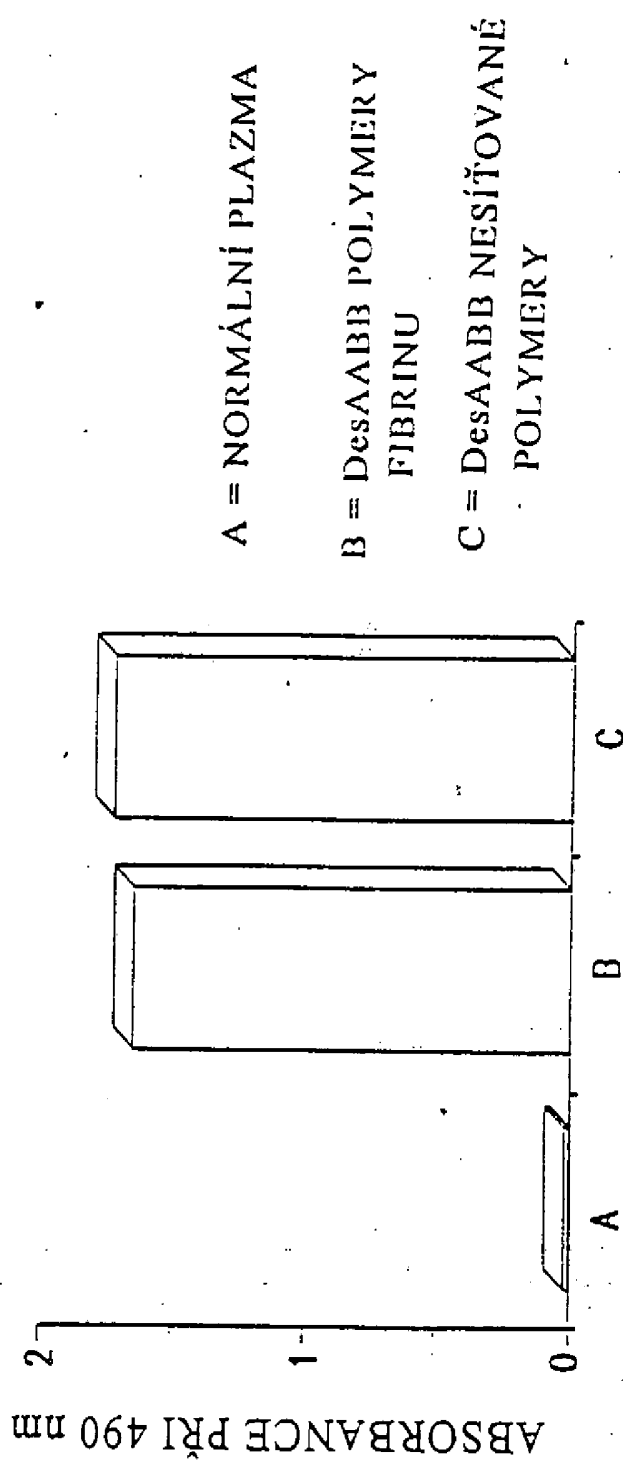
Zastupuje:



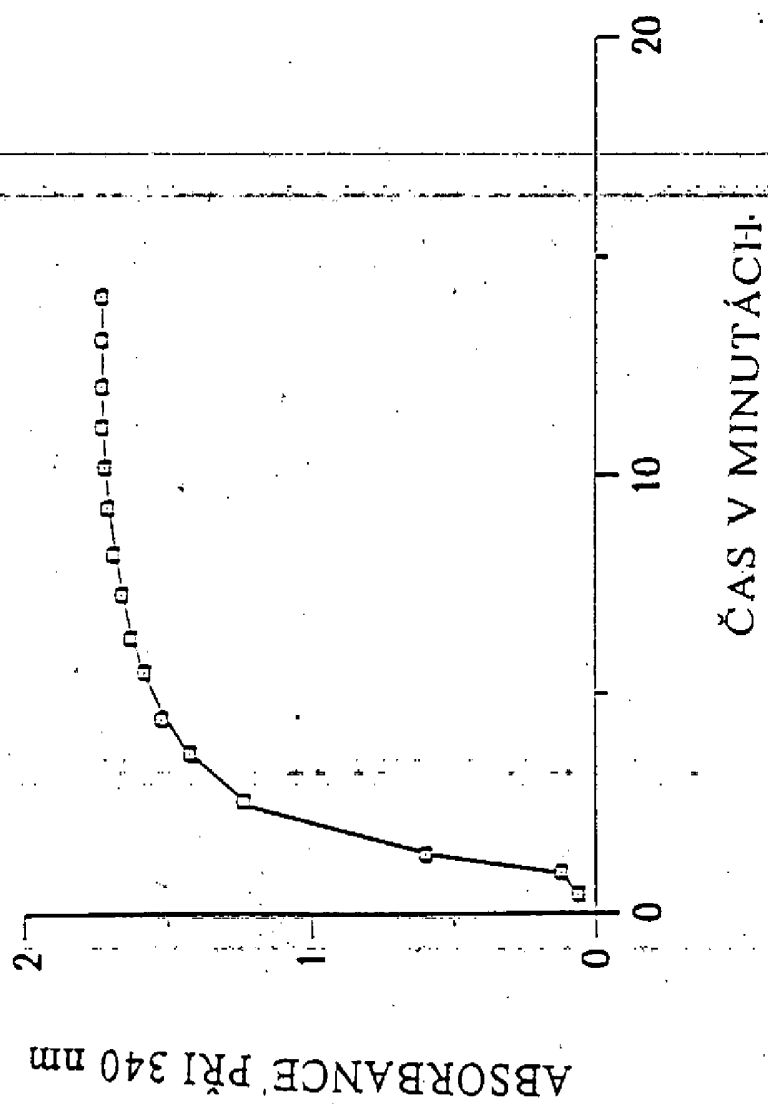
Obr.1A



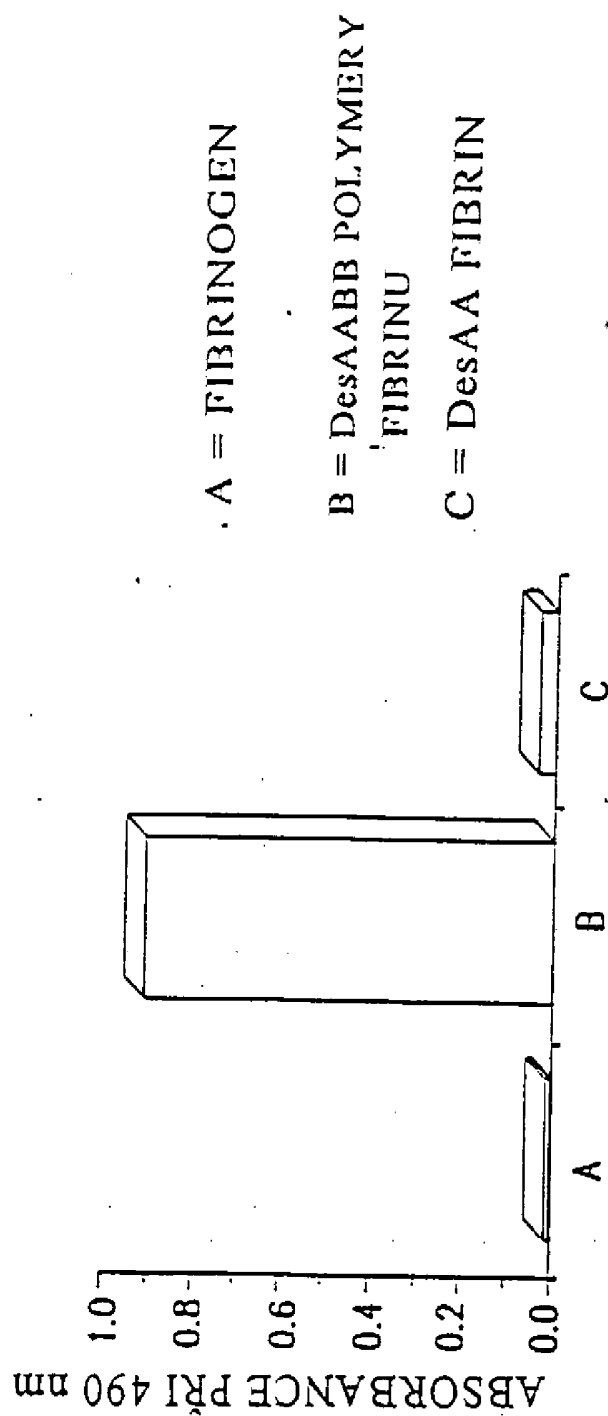
Obr.1B



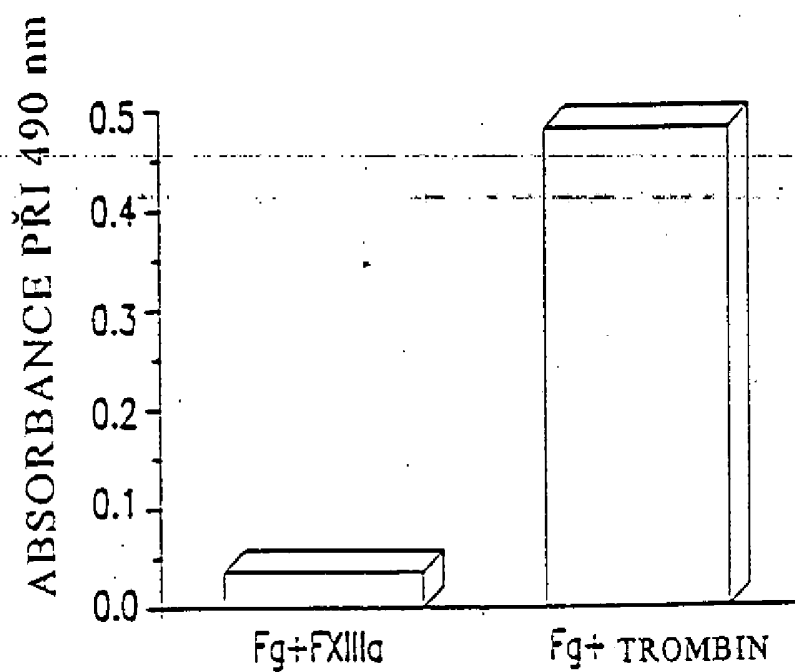
Obr. 2



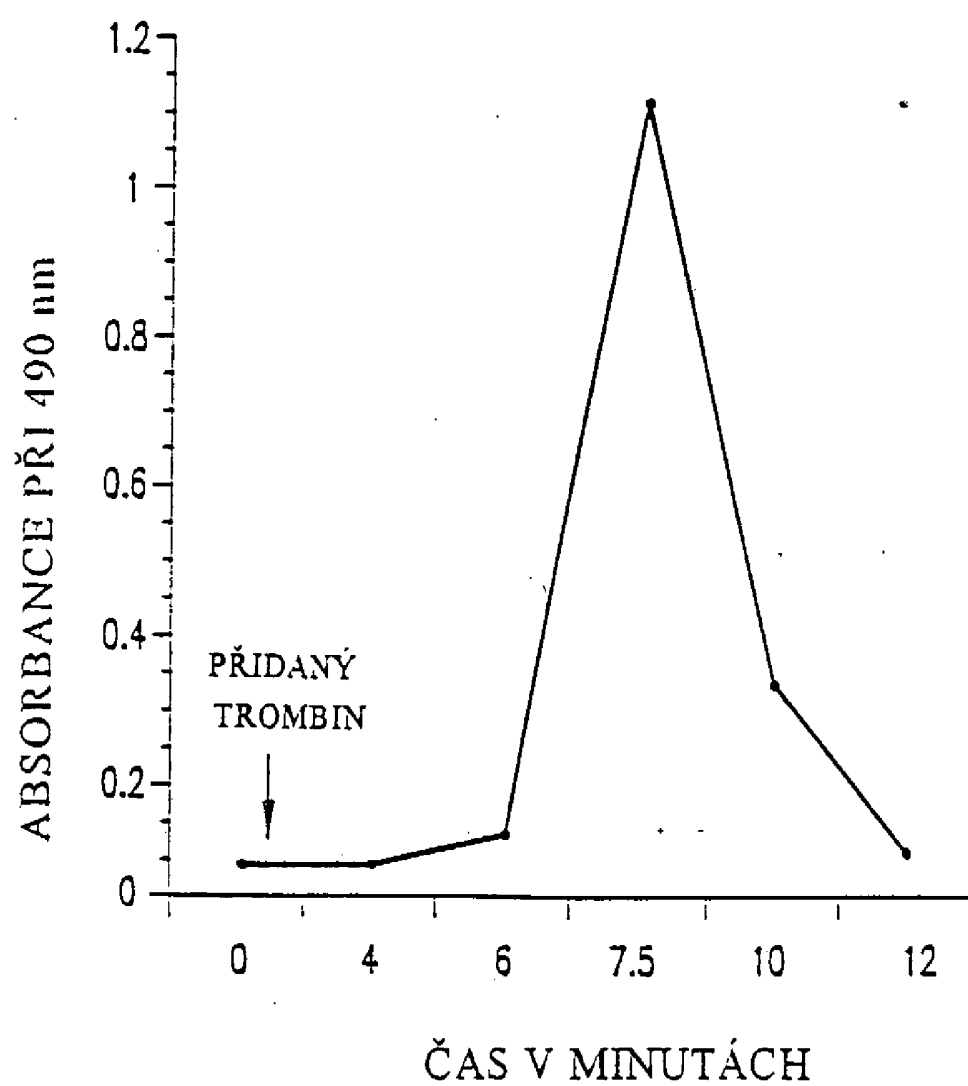
Obr. 3



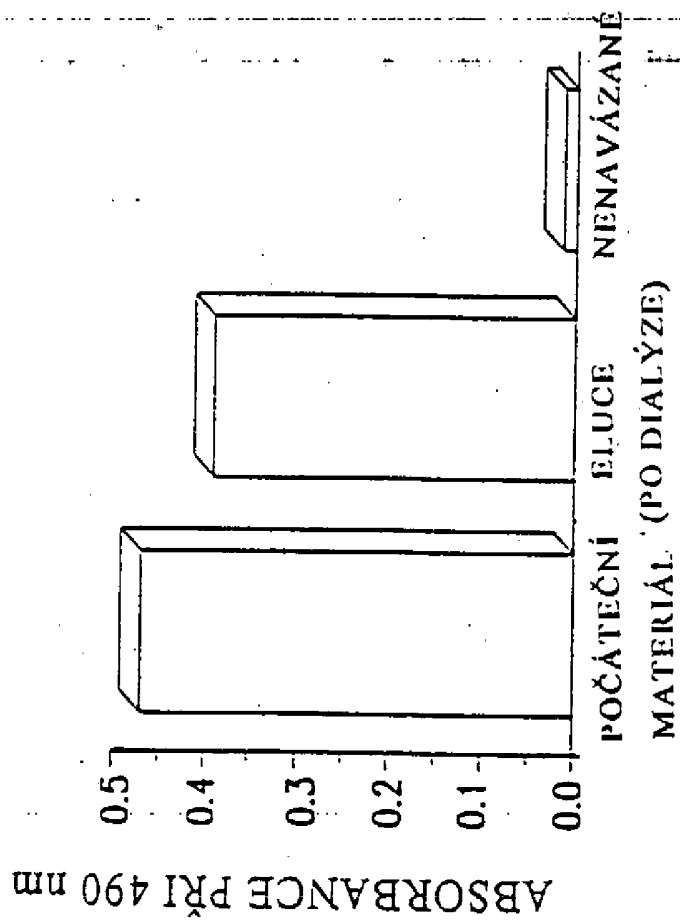
Obr. 4



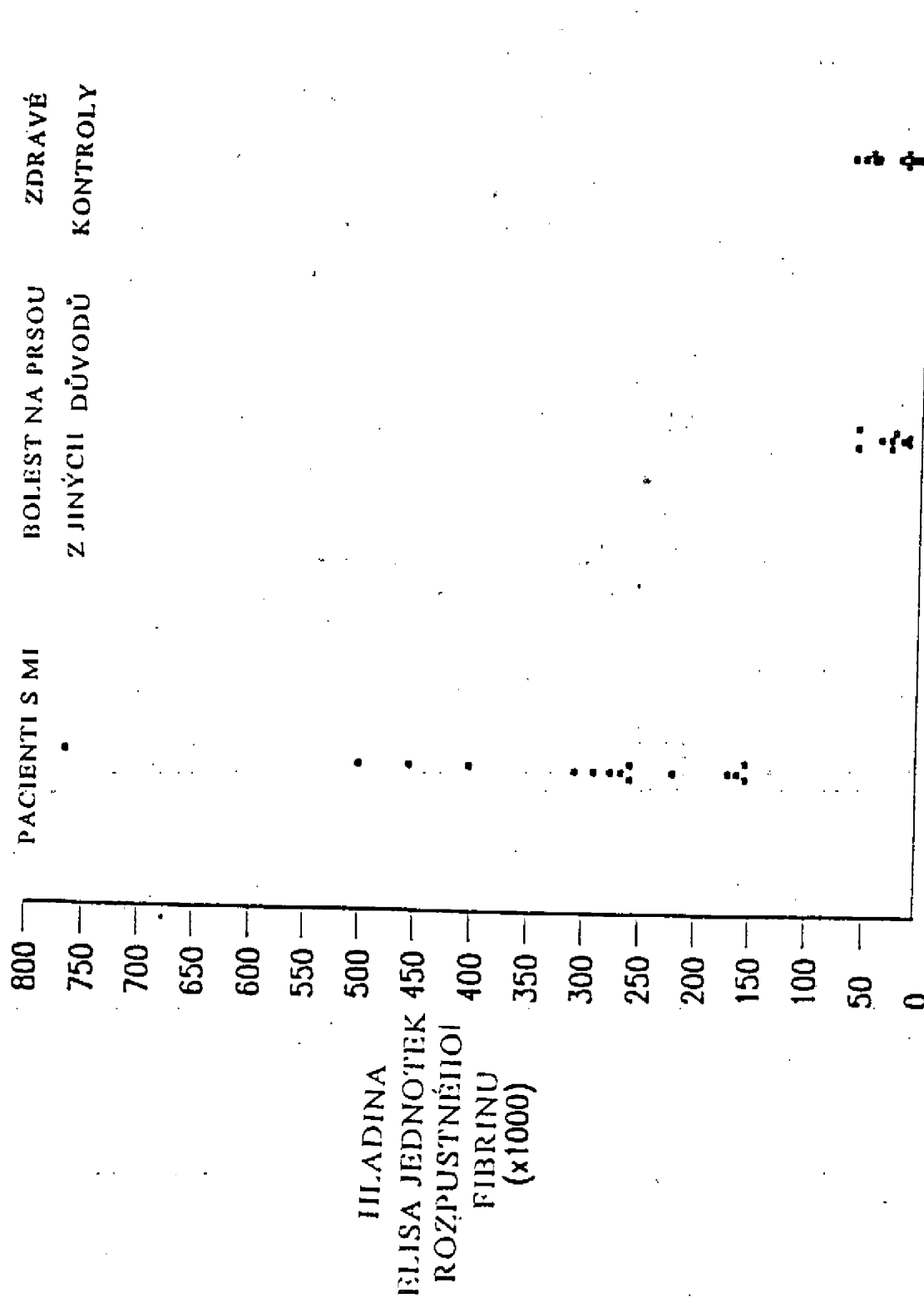
Obr.5



Obr.6



Obr. 7



Obr. 8