

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

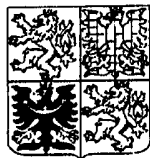
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2464-96

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **21. 02. 95**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **24.02.94**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **94/204015**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **16. 04. 97**
(Věstník č. 4/97)

(86) PCT číslo: **PCT/US95/01825**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 95/22986**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

A 61 K39/00
A 61 K39/395
A 61 K49/00
C 07 K16/18

(71) Přihlášovatel:

AMERICAN BIOGENETIC SCIENCES, INC.,
Copiague, NY, US;

(72) Původce:

Gargan Paul E., South Bend, IN, US;

(74) Zástupce:

Korejzová Zdeňka JUDr., Břehová 1, Praha
1, 11002;

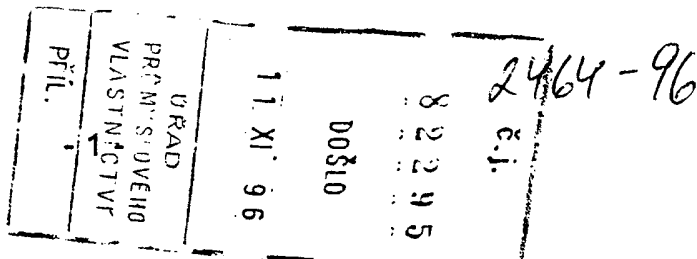
(54) Název přihlášky vynálezu:

Farmaceutický prostředek pro inhibici
tvorby trombu

(57) Anotace:

Farmaceutický prostředek pro inhibici tvorby trombu in vivo, stejně jako soupravy pro léčeni při potřebě inhibice tvorby trombu s jeho obsahem, na bázi protilátky, specifické proti fibrinu, jejích fragmentů nebo derivátů, a použití těchto látek pro výrobu farmaceutických prostředků pro inhibici tvorby trombu.

CZ 2464-96 A3



Farmaceutický prostředek pro inhibici tvorby trombu

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká farmaceutického prostředku na bázi protilátky proti fibrinu, který se používá pro inhibici tvorby trombu *in vivo*.

Podstata vynálezu

Krevní sraženiny neboli tromby se tvoří v místech poranění cévy. Klinické projevy patologické trombózy nebo trombotického onemocnění jsou nanejvýš rozmanité a zahrnují trombózu hlubokých žil (DVT) a trombózu tepen a cév. Tromboembolie a trombotické komplikace jiné cévní nemoci (např. aterosklerózy) mohou mít za následek ucpání velkých artérií, které vede k orgánové ischemii a průvodním život ohrožujícím stavům, jako jsou cerebrovaskulární příhoda (mrtvice), infarkt myokardu apod.

Navíc mohou tvorbu trombu spouštět invazivní chirurgické postupy, které zahrnují, ale nejsou omezeny na balónkovou angioplastiku a transplantaci orgánů (jak přirozených, tak i umělých). Např. balónková angioplastika, metoda, používaná pro vyčištění uzavřených arterií, může způsobit poranění stěny tepny, což spustí její znovuuzavírání nově usazeným trombem. V jedné ze zpráv se udává, že perkutánní transluminální koronární angioplastika je až ve 25 až 35 % případů následována znovuuzavřením cévy. Gimple, L.W., a další, Circulation, 86: 1536-46 (1992). Viz rovněž Sarembock, I.J. a další, Circulation, 80: 1029-40 (1989); a Ip, J.H., a další, JACC, 17:

- 77B-88B (1991). Jedna ze zpráv udává, že ve skutečnosti „mechanismus angioplastiky, která ve většině případů zahrnuje endoteliální poškození a polámání plátů nebo jejich oddělení, je velmi podobný procesu, který vede k akutním ischemickým syndromům“.
- 5 Tenaglia, A.N.. Ann. Rev. Med., 44: 465-79, 466 (1993).

Protože se ukázalo, že systémové ošetření antikoagulanty, jako je heparin a kumarin, má pro prevenci znovuzavření cévy po angioplastice malý nebo žádný účinek (Ip, J.H., a další, JACC, 17: 77B-88B (1991)), a protože takové ošetření antikoagulanty s sebou

10 často nese u pacientů riziko systémového krvácení (Physician's Desk Reference, 47. vydání, Medical Economics Data (1993)), bylo by užitečné mít nové místně specifické prostředky pro působení na inhibici nebo porušování tvorby trombů, jak pro již existující cévní onemocnění, tak pro invazivní chirurgické postupy.

15

Hemostatický systém

Hemostatický mechanismus, při kterém je vytvářen trombus, je mechanismus komplexní fyziologické odpovědi, který působí opravu poškození zraněné cévy. Viz Harker, L.A., a Mann, K.G., "Thrombosis and Fibrinolysis" v: Thrombosis and Cardiovascular Disorders, vyd.

20 Fuster, V. a Verstraete, M., W.B. Saunders Co. (1992), str. 1-16.

Zástavy krvácení se dosáhne interakcemi mezi stěnou poškozené cévy, krevními destičkami a koagulačním systémem Viz Furie, B. a Furie, B.C., Cell, 53: 505-18 (1988).

25 Úloha koagulačního systému spočívá v poskytnutí nerozpustné fibrinové matrix pro stabilizaci a zakotvení zátky tvořené destičkami, které se shromáždily na subendoteliální struktuře poškozené cévy v místě poranění. Koagulace je zesilující se proces, který zahrnuje řetězec enzymatických reakcí, ve kterých jsou proenzymy (srážecí

FPB je objevení se nových aminoterminálních konců na α a β řetězcích fibrinového monomeru. Viz W. Nieuwenhuizen, Blood Coagulation and Fibrinolysis, 4: 93-96, (1993). V Kroku 2 začínají fibrinové monomery samovolně tvořit mezimonomerní nekovalentní vazby (nezesíťené) za tvorby rozpustného polymeru. Na tento polymer působí faktor XIIIa tím, že enzymaticky přidá kovalentní zesíťení mezi jednotkami monomerního fibrinu. Zesíťený polymer může zůstat rozpustný, ale v určitém okamžiku během postupu polymerizace a zesíťení se stane fibrinový polymer nerozpustným a vytvoří fibrinovou sraženinu, jak je ukázáno v Kroku 3.

Rozpustné fibrinové polymery jsou bezprostředními prekurzory fibrinové sraženiny. Předpokládá se proto, že obsah rozpustných fibrinových polymerů v plazmě je u jedinců s hrozící nebo existující trombózou zvýšen. Detekce a měření množství těchto polymerů, zvláště rozpustných fibrinových polymerů DesAABB v krvi, se ukázala jako užitečná pro indikaci začínající tvorby krevní sraženiny. Viz Nieuwenhuizen, str. 94; a Marder a další, US patent č. 5,206,140.

Protilátky zaměřené na složky hemostatického systému

Při charakterizaci složek hemostatického systému a objasnění jejich funkcí sehrály roli jak v přírodě se vyskytující, tak i laboratorně připravené protilátky.

Marciniak, E., a Greenwood, M. F., Blood, 53; 81-92 (1979) popisují případ inhibitoru srážení krve v séru čtrnáctiletého pacienta s Downovou chorobou, který byl přítomen ve frakci IgG, a který inhiboval enzymatické uvolnění fibrinopeptidu A z fibrinogenu. Hoots, W.K., a další, New Eng. J. Med., 304: 857-61 (1981) popisují případ třináctiletého pacienta, trpícího chronickou agresivní hepatitidou a defektem koagulace, kde byl defekt určen jako přítomnost protilátek,

kteře měly vysokou afinitu jak k fibrinogenu, tak k fibrinu, v krvi pacienta, a kteře inhibovaly polymerizaci fibrinových monomerů, a tím zabraňovaly tvoření fibrinového gelu.

Sola, B., a další Thromb. Res., 29: 643-53 (1983) popisují
5 vytvoření hybridomové buněčné linie, která sekretovala monoklonální
protilátky, specifické jak proti lidskému fibrinogenu, tak i fibrinu. Elms,
M. J., a další, Thromb. Haemostas, 50: 591-94 (1983) popisují
přípravu hybridomové buněčné linie, která sekretovala monoklonální
protilátky, které rozpoznávají antigenní determinantu v D dimeru,
10 specifickém fragmentu, který vzniká degradací zesítěného fibrinu. Hui,
K. Y., a další, Science, 222: 1129-32 (1983) a Scheefers-Borchel. U.
a další, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 7091-95, (1985) popisují
použití antigenů ze syntetických hexapeptidů, představujících
aminokonce α nebo β řetězce lidského fibrinu k produkci
15 monoklonálních protilátek, které se váží k fibrinu dokonce i v
přítomnosti fibrinogenu. Kudryk, B., a další, Mol. Immunol., 21: 89-94
(1984) popisují přípravu hybridomové buněčné linie, sekretující
monoklonální protilátky proti části N-DSK fibrinogenu. Sobel, J. H. a
další, Thromb. and Haem., 60: 153-59 (1988), popisují použití dvou
20 rozdílných monoklonálních protilátek, které se vážou na CNBr $A\alpha$
řetězec fragmentů fibrinogenu při výzkumu časného zesítění α řetězce
mezi sousedními fibrinovými molekulami. Mirshahi, M., a další,
Fibrinogen, 4: 49-54 (1990), popisují přípravu hybridomové buněčné
linie, sekretující monoklonální protilátky proti fibrinogenu, které jsou
25 schopny inhibovat polymerizaci fibrinu. Cierniewski, C. S., a
Budzynski, A.Z., Biochemistry, 31: 4248-53 (1992) popisují přípravu a
použití polyklonálních a monoklonálních protilátek proti čistěnému
lidskému fibrinogenu, které inhibují polymerizační rychlost fibrinových
monomerů a interferují s působením trombinu na fibrinogen.
30 Tymkewycz, P. M., a další, Blood Coag. and Fibrinol. 4: 211-21
(1993), popisují produkci pěti monoklonálních protilátek s vysokou

afinitou k fibrinu, které však nereagují s fibrinogenem. Gargan, P. E. a další, Fibrinolysis, 7: 275-83 (1993), popisují vytvoření hybridomové buněčné linie MH - 1, která produkuje monoklonální protilátky, specifické jak k zesítěné, tak i nezesítěné polymerní struktuře fibrinu, která ale nemá detekovatelnou imunoreaktivitu k fibrinogenu ani k jakémukoliv z degradačních produktů fibrinu nebo fibrinogenu. Navíc protilátka MH-1 nereaguje s fibrinovými monomery DesAA nebo DesAABB a nebyla také detekována žádná aktivita vůči jednotlivým řetězcům α , β nebo γ fibrinogenu.

10 Materiál pro další diskusi o použití monoklonálních protilátek, specifických pro složky hemostatického systému viz Kudryk, B.J. a další, "Monoclonal Antibodies as Probes for Fibrin(ogen) Proteolysis" v: Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy, vyd. Chatal, J-F, CRC Press, Boca Raton, Fl. (1989), pp. 365-398.

15 Pro klinické použití jako prostředky pro zobrazení trombů *in situ* byly vyvinuty modifikované protilátky proti složkám hemostatického systému. Viz například Liau, C-S, a Su, C-T, J. Form. Med. Assoc., 88: 209-12 (1989); Wasser, M.N.J.M. a další, Blood, 74: 708-14 (1989); Walker, K.Z., a další, Eur. J. Nucl. Med., 16: 787-94 (1990); Alavi, A. a další, Radiology, 175: 79-85 (1990), Wasser, M.N.J.M. a další, Thromb. Res., Supp. X: 91-104 (1990); a Kanke, M. a další, J. Nucl. Med., 32: 1254-60 (1991).

Pro terapeutické použití byly vyvinuty protilátky proti fibrinu, konjugované ke trombolytickým enzymům. Viz například Bode, C. a další, Science, 229: 765-67 (1985). Podle této zprávy má místně specifická dávka trombolytického prostředku výrazně zvyšovat účinnost prostředku při rozpouštění sraženin.

Konečně bylo také uděleno několik U.S. patentů, zaměřených na přípravu a/nebo způsoby použití monoklonálních protilátek, 20 specifických proti fibrinu nebo jeho degradačním produktům. Viz

například U.S. patenty č. 4,722,903; 4,758,524; a 4,916,070, jejichž seznam není zamýšlen jako vyčerpávající.

Prostředky pro předcházení tvorbě trombů

5 Prostředky pro antitrombotickou terapii zahrnují typicky jeden nebo více antikoagulantů, jako je heparin nebo kumarin. Physician's Desk Reference, 47. vydání, Medical Economics Data (1993); The Merck Manual of Diagnostics and Therapy, 15. vydání, Merck Sharpe & Dohme Research Labs (1987).

10 Tyto antikoagulanty se často používají ve snaze zabránit recidivující trombóze u pacientů, kteří trpí cévním onemocněním, a pro zabránění akutnímu trombotickému zновуuzavření po angioplastice.

 Hlavní nevýhoda použití takovýchto systémových antikoagulantů je riziko systémového krvácení. Lékaři jsou varováni, že „v kterémkoli
15 místě organismu pacienta, jemuž je podáván heparin, se může vyskytnout krvácení“. Physician's Desk Reference, 47. vydání, Medical Economics Data (1993), str. 2568.

 Navíc se ukázalo, že účinnost takových antikoagulantů při prevenci zновуuzavření po angioplastice se buď neliší od účinnosti
20 placeba, nebo je nereprodukovatelná. (Ip, J.H., a další, JACC, 17: 77B-88B (1991)). Výhoda použití takových antikoagulantů je tedy vyvážena jak rizikem krvácení, tak i jejich spornou účinností při prevenci zновуuzavření.

 Ve snaze o snížení rychlosti zновуuzavírání po angioplastice
25 byly použity četné biologické a mechanické strategie, ale žádná taková terapie neměla spolehlivé pozitivní výsledky. Vyrůstá tedy zájem na „místně specifické“ nebo „přímé“ dodávce antitrombotických

prostředků na místo poranění cévy. Gimple, L.W., a další, Circulation, 86: 1536 - 46 (1992).

Místně specifická dávka antitrombotických prostředků, využívajících protilátek proti vhodným složkám hemostatického systému, by sloužila k lokalizaci takových prostředků na místo poranění cévy. Jednou z výhod této lokalizace je to, že by mohla být podávána nižší dávka. Druhou výhodou lokalizace by bylo snížení rizika systémového krvácení.

V několika případech se samotné protilátky proti specifickým složkám hemostatického systému ukázaly být schopny inhibovat polymerizaci fibrinu. Francis, S.E., a další, Am. J. Hem., 18: 111-19 (1985), popisují studie s monoklonální protilátkou proti fibrinogenu, která měla „mírnou“ antikoagulační aktivitu. Mirshahi, M., a další, Fibrinogen, 4: 49-54 (1990), popisují získání hybridomové buněčné linie, sekretující monoklonální protilátky, kde byl antigenem fragment D, a plasminový degradační produkt fibrinogenu. Tyto monoklonální protilátky silně reagovaly s fibrinogenu a inhibovaly polymerizaci fibrinu. Ciernewski, C.S., a Budzynski, A.Z., Biochemistry, 31: 4248-53 (1992), popisují získání tří různých hybridomových buněčných linií, kde antigenem byl nativní lidský fibrinogen, a které sekretovaly monoklonální protilátky, inhibující rychlost polymerizace fibrinu.

Při vývoji místně specifického terapeutického nebo profylaktického antitrombotického prostředku jsou všechny tři zprávy těžko použitelné nebo nejsou použitelné vůbec. Je tomu tak proto, že ve všech těchto případech protilátky křížově reagují buď s fibrinogenu nebo degradačními produkty fibrinogenu, které jsou v hemostatické systému všudypřítomné. Jakákoliv taková protilátka, podaná pacientovi, by se navázala na fibrinogen nebo degradační produkt fibrinogenu, a nebyla by dostupná pro inhibici polymerizace fibrinu nebo tvorby trombu na místě poranění cévy.

Předmětný vynález dovoluje úplně odlišný přístup k inhibici tvorby trombu použitím monoklonálních protilátek, které jsou specifické proti fibrinu (tj. bez významné křížové reaktivity k fibrinogenu nebo k plasminovým degradačním produktům fibrinogenu nebo fibrinu). Předmětný vynález poskytuje farmaceutické prostředky, obsahující monoklonální protilátky, specifické proti fibrinu, které překvapivě inhibují tvorbu trombu na místě poranění cévy.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález poskytuje farmaceutický prostředek pro inhibici tvorby trombu na místě poranění cévy u lidí, obsahující monoklonální protilátku, specifickou proti fibrinu. Předkládaný vynález dále poskytuje fragmenty nebo deriváty monoklonální protilátky, specifické proti fibrinu, kteréžto fragmenty a deriváty obsahují vazebné oblasti protilátky. Farmaceutické prostředky podle vynálezu obsahují monoklonální protilátku, specifickou proti fibrinu a farmaceuticky výhodný nosič v dostatečném množství pro účinnou inhibici tvorby trombu u lidí. Předkládaný vynález dále poskytuje farmaceutické soupravy, obsahující jednu nebo více složek farmaceutických prostředků podle vynálezu.

Přehled obrázků na výkresech

Obrázek 1: Přídavek monoklonální protilátky MH-1 do srážecí reakce fibrinogen/trombin inhibuje jak rychlost, tak absolutní míru srážení. „Fibrinogen“ a „45J“ jsou kontrolní reakce.

Obrázek 2: Přídavek stoupajícího množství monoklonálních protilátek MH-1 do srážecí reakce

fibrinogen/trombin má za následek vzrůstající úroveň inhibice srážení. „Fibrinogen“ je kontrolní reakce.

5 Použitelnost předkládaného vynálezu

Bylo překvapivě objeveno, že monoklonální protilátka specifická proti fibrinu může inhibovat polymerizaci fibrinu a tvorbu trombu. Monoklonální protilátky proti fibrinu mohou tedy být použity pro prevenci nebo léčbu takových stavů lidí, které jsou léčitelné inhibicí
10 polymerizace fibrinu nebo tvorby trombu. Monoklonální protilátky proti fibrinu jsou tedy použitelné při léčení lidí, trpících jakoukoliv cévní chorobou, u které je riziko patologické trombózy. Neomezujícími příklady takových cévních onemocnění jsou trombóza hlubokých cév (DVT), tepenná a žilní trombóza, mrtvice, tromboembólie, plicní
15 embólie a trombotické komplikace aterosklerózy.

Monoklonální protilátky proti fibrinu jsou rovněž užitečné například pro léčení pacientů, kteří se připravují, podstupují nebo se zotavují z invazivních chirurgických postupů. Pro účely předkládaného vynálezu označuje termín „invazivní chirurgické postupy“ jakýkoliv
20 chirurgický postup, který může vést k poranění tepny nebo cévy, což může vést k trombotickým komplikacím. Neomezující příklady takových postupů zahrnují balónkovou angioplastiku a transplantace orgánů (přirozených i umělých).

K monoklonálním protilátkám, specifickým proti fibrinu, mohou
25 být navíc rovněž známými metodami vytvořeny fragmenty protilátek, které obsahují idiotypy (vazebné domény) protilátky proti fibrinu. Takové fragmenty například zahrnují, ale nejsou omezeny na: (1) fragmenty $F(ab')_2$, získatelné štěpením molekuly protilátky pepsinem; (2) fragmenty Fab' , získatelné redukcí disulfidických můstků
30 fragmentu $F(ab')_2$; (3) fragmenty, získatelné působením papainu a

redukčního činidla na molekulu protilátky. Takovéto fragmenty protilátek jsou rovněž předmětem předkládaného vynálezu. Další příklady přípravy a použití fragmentů protilátek lze nalézt v: Parham, P., a další, J. Immunol. Meth., 53: 133 (1982); a Khaw, B-A, a další, J. Nucl. Med., 34: 2264-68 (1993).

Navíc mohou být známými metodami vytvořeny kromě monoklonálních protilátek a fragmentů protilátek jiné deriváty protilátek, které obsahují idiotyp (vazebnou doménu) protilátky specifické proti fibrinu. Například mohou být syntetizovány rekombinantní a syntetické oligopeptidy a jejich analogy, které vyvolávají stejný inhibiční efekt na vytváření trombu jako monoklonální protilátky proti fibrinu nebo jejich fragmenty. Takové deriváty jsou rovněž zahrnuty do rámce předkládaného vynálezu. Jiné příklady použití syntetických oligopeptidů se sekvencemi, založenými na primární vazebné oblasti monoklonální protilátky je možno nalézt v Knight, L., a další, J. Nucl. Med., 35: 282-88 (1994).

V rámci předkládaného vynálezu je konečně také jakýkoliv funkční ekvivalent monoklonální protilátky, specifické proti fibrinu, jeho fragment nebo jeho derivát. Pod termínem „funkční ekvivalent“ je třeba rozumět monoklonální protilátku, specifickou proti fibrinu, nebo její fragment nebo derivát, která je schopna v dostatečné míře inhibovat tvorbu trombu u člověka v případě potřeby takové inhibice navázáním na stejný epitop, ke kterému se váže protilátka MH-1.

25 Produkce a charakterizace monoklonální protilátky MH-1

Mnoho dřívějších postupů, upravených pro zvýšení koncentrace protilátek proti fibrinu, se zaměřilo na imunizaci zvířat rozpustnými fibrinovými fragmenty a syntetickými peptidy, které napodobují exponované neoantigenní místa na fibrinu. Viz Hui, K.Y., a další, Science 222: 1129-32 (1983); Scheefers-Borchel, U., a další, Proc.

Natl. Acad. Sci. USA, 82: 7091-95 (1985); Elms, M.J., a další, Thromb. Haemostas, 50: 591-94 (1983); a Kudryk, B., a další, Mol. Immunol., 21: 89-94 (1984). Předpokládá se ale, že vazebné místo takových protilátek je během odbourávání fibrinu konzervováno, a proto se tyto protilátky mohou rovněž vázat na degradační produkty fibrinu.

U.S. patent č. 5,120,834 (dále označován „patent 834“) (Gargan a další, zveřejněn 9. června 1992), který je zde uváděn jako referenční, se obecně týká způsobu výroby monoklonálních protilátek z bezmikrobních zvířat imunizací těchto zvířat vybraným antigenem. Předpokládá se, že výhoda použití bezmikrobního systému pro produkci monoklonálních protilátek je v tom, že takový systém bude mít silně zvýšenou imunitní odpověď na antigen, což zvyšuje pravděpodobnost lokalizace B-lymfocytů, které produkují protilátky schopné vazby na specifický epitop antigenu. Takový systém se ukázal jako zvláště užitečný pro vytvoření protilátky s vysokou specificitou proti fibrinu, která má malou nebo žádnou křížovou reaktivitu s fibrinogenem. Vytvoření takové rozlišující protilátky bylo problematické, protože strukturální a konformační podobnost mezi fibrinem a fibrinogenem se odhaduje na více než 98 %. (Plow, E.F., a další, Semin. Thromb. Haemostas, 8: 36 (1982)). Výsledkem je, že jenom malá část epitopů na molekule fibrinu je ve skutečnosti neoantigenní (tj. jedinečná pro fibrin).

Patent 834 se týká hybridomové buněčné linie ATCC č. HB 9739, která sekretuje monoklonální protilátku MH-1. Monoklonální protilátka MH-1 je specifická proti zesítěným a nezesítěným fibrinovým polymerům, ale nereaguje křížově s fibrinogenem nebo plasminovými degradačními produkty. MH-1 se čistí podle postupů uveřejněných v patentu 834. MH-1 se specificky váže na fibrin, a nereaguje v kompetičních testech křížově s fibrinogenem. MH-1 nereaguje křížově se žádnými plasminovými degradačními produkty fibrinogenu ani s

plasminovými degradačními produkty zesítěného fibrinu. Závěry mohou být shrnuty následujícím způsobem: (1) MH-1 rozpoznává epitop na intaktní fibrinové molekule, který není přítomen nebo dostupný na povrchu molekuly prekurzoru, tj. fibrinogenu; a (2) epitop
5 je zřejmě zničen štěpením zesítěného fibrinu plasminem.

MH-1 byla dále pro zjištění afinity k fibrinu charakterizována Scatchardovou analýzou (Frankel, a další, Mol. Immunol., 16: 101-6 (1979)) za použití protilátky MH-1, značené ^{125}I . Hodnota, získaná pro disociační konstantu K_D byla $6,7 \times 10^{-10}$ M, což je přibližně 5000krát
10 více, než hodnota pro tkáňový plasminogenový aktivátor fibrinu.

Analýza westernovými imunoblody ukázala, že MH-1 nereaguje křížově s $A\alpha$, $B\beta$ nebo γ řetězci fibrinogenu. Stejná metoda ukázala, že MH-1 nereaguje křížově s $A\alpha$ nebo $B\beta$ řetězci fibrinogenu, vystavených působení trombinu. Navíc analýza ELISA ukázala, že MH-
15 1 reaguje se zesítěným fibrinem i nezesítěným fibrinem, přičemž afinita k zesítěnému fibrinu je větší.

Způsoby podávání prostředku

Podle předkládaného vynálezu se podávají monoklonální
20 protilátky, jejich fragmenty nebo deriváty pacientům při potřebě zabránit tvorbě trombu. Protilátky, fragmenty nebo jejich deriváty se pacientům s výhodou podávají ve formě nespojené s radioaktivně značeným, trombolytickým nebo jiným prostředkem nebo jinou molekulou nebo její částí. Podle vynálezu je však možno použít
25 protilátek nebo jejich derivátů, které jsou spojené s radioaktivně značeným, trombolytickým nebo jiným prostředkem nebo jinou molekulou nebo její částí, a které jsou rovněž zamýšleny jako část předkládaného vynálezu. Termínem „nosič“ se označuje diluent,

pomocná nebo nosná látka, se kterou je monoklonální protilátka proti fibrinu, její fragment nebo derivát, podávána.

Termín „farmaceuticky přijatelný nosič“ znamená to, že nosič je schválen příslušnou federální nebo státní institucí nebo jmenován U.S. 5 lékopisem nebo jiným obecně uznávaným lékopisem pro použití u zvířat, a zvláště u lidí.

Termín „antitrombotický prostředek“ se v předkládaném vynálezu používá pro označení prostředku, který obsahuje monoklonální protilátku, specifickou proti fibrinu, nebo její fragment 10 nebo derivát, a farmaceuticky přijatelný nosič, který v dostatečném množství může u člověka inhibovat tvorbu trombu, pokud je takové inhibice zapotřebí.

Termínem „účinná látka“ v předkládaném vynálezu se označuje množství monoklonální protilátky, jejího fragmentu nebo derivátu, 15 které je dostatečně velké pro inhibici tvorby trombu u člověka, jestliže je takového léčení zapotřebí. Dávka by neměla být tak vysoká, aby způsobila nepříznivé vedlejší účinky, jako nežádoucí křížové reakce nebo anafylaktické reakce apod. Obecně se dávka bude měnit s věkem, kondicí, pohlavím a druhem nemoci pacienta, 20 kontraindikacemi, pokud jsou nějaké, imunotolerancí a jinými podobnými proměnnými a bude upravena příslušným lékařem. Ačkoliv se dávky budou lišit v závislosti na jednotlivých kombinacích okolností, ve většině chirurgických podmínek se dávka bude určovat podle tělesné váhy pacienta a bude se pohybovat od přibližně 1 µg/kg 25 tělesné hmotnosti do 50 µg/kg tělesné hmotnosti a s výhodou se bude pohybovat od přibližně 5 µg/kg tělesné hmotnosti do 10 µg/kg tělesné hmotnosti.

Monoklonální protilátky, specifické proti fibrinu, nebo jejich fragmenty nebo deriváty je možno podávat pacientům vhodným 30 způsobem, včetně parenterálního podávání jednorázovou injekcí,

průběžnou infuzí nebo kombinací těchto dvou způsobů. Prostředky mohou být také podávány přímou infuzí katetrem, jako například při intrakoronárním podávání.

Příprava prostředků pro parenterální podávání zahrnuje například rekonstituci lyofilizovaných monoklonálních protilátek proti 5 fibrinu nebo jejich fragmentů nebo derivátů ve sterilním fyziologickém roztoku bez endotoxinů nebo může obecněji zahrnovat rekonstituci nebo dispergaci monoklonálních protilátek proti fibrinu nebo jejich fragmentů nebo derivátů ve sterilních vodných nebo nevodných 10 roztocích, suspenzích a emulzích. Příklady nevodných roztoků jsou propylenglykol, polyethylenglykol, rostlinný olej jako olivový olej a injikovatelné organické estery jako ethyloleát. Vodné nosiče zahrnují vodu, roztoky alkohol/voda, emulze nebo suspenze včetně fyziologického roztoku a pufrovaného média. Parenterální nosné látky 15 zahrnují roztok chloridu sodného, Ringerovu dextrózu, dextrózu s chloridem sodným, Ringerův roztok s laktátem nebo stabilizované oleje. Intravenózní nosné látky zahrnují kapalné výživové náhražky založené například na Ringerově dextróze apod. Mohou být rovněž přítomny ochranné látky a jiné přídavné látky, jako jsou například 20 antimikrobiální, antioxidantní a chelatační prostředky, inertní plyny apod. Farmaceutické prostředky podle předkládaného vynálezu jsou s výhodou ve sterilní formě, takže vyhovují standardům sterility podle US zákonů o podávání potravin a léků.

Předkládaný vynález dále poskytuje soupravy farmaceutických 25 prostředků, které zahrnují jednu nebo více složek farmaceutických prostředků podle vynálezu, skladovaných ve společných nebo oddělených nádobkách. Nádobky mohou být případně doplněny návodem ve formě předepsané vládní organizací, která řídí výrobu, použití nebo prodej farmaceutických nebo biologických produktů. 30 Tento návod obsahuje doporučení pro výrobu, použití a nebo prodej pro humánní použití. Se soupravami, které obsahují pouze

lyofilizovanou protilátku, její fragmenty nebo deriváty, mohou být dodávány instrukce ohledně vhodných prostředků pro podávání pacientům v případě potřeby léčení.

5 Rozsah, trvání, časování a způsob léčby se bude lišit podle věku, hmotnosti, stavu a pohlaví pacienta, který potřebuje tuto léčbu, stejně jako podle druhu a rozsahu nemoci, která vyžaduje léčení, a bude upraven lékařem podle daných okolností. Prostředek může být podáván buď bezprostředně před, v průběhu nebo po chirurgickém výkonu, nebo jak před, tak i po výkonu, nebo před, v průběhu i po
10 výkonu v závislosti na okolnostech případu.

 Například při takovém chirurgickém výkonu, jako je balónková angioplastika, často nastane situace, že pacient již má velký počet široce rozvinutých krevních sraženin. Tehdy bude obecně výhodné podat antitrombotický prostředek bezprostředně po provedení
15 angioplastiky, s výhodou s využitím angioplastického katetru, který je stále na místě, aby se zraněná část cévy přímo propláchl antitrombotickým prostředkem, a tím se jeho působení soustředilo na dané místo. To zabrání ztrátě antitrombotického prostředku, která by například nastala vazbou protilátky na tromby mimo místo léčení.

20 V případech invazivních chirurgických postupů u pacientů bez předchozí patologické trombózy bude obecně výhodné podávat antitrombotický prostředek buď bezprostředně před nebo v průběhu výkonu, protože je menší riziko ztráty antitrombotického prostředku vazbou protilátky na tromby mimo místo léčení.

25 Dále ve většině případů invazivních chirurgických postupů existuje období, ve kterém je zvýšené nebezpečí tvorby sraženin, bezprostředně po ukončení výkonu. V důsledku toho může k účinné inhibici tvorby trombu stačit pouze omezený počet léčebných dávek, nebo dokonce jedna léčebná dávka s dostatečnou dobou trvání a tím

může být podstatně sníženo riziko srážení indukované chirurgickým zásahem s jeho návaznými riziky pro pacienta.

V případě chronického trombotického onemocnění závisí časování, trvání a počet antitrombotických kúr hlavně na vyšetření stavu pacienta před a po zákroku a odezvě na předběžnou antitrombotickou kúru, která musí být určena, sledována a vyhodnocena ošetřujícím lékařem.

Určení účinnosti léčby

Účinnost antitrombotické léčby monoklonální protilátkou MH-1 nebo jejím fragmentem nebo derivátem může být určena standardními postupy. Příklady takových postupů zahrnují, ale nejsou omezeny na: (1) angiografické monitorování zobrazením průtoku barviva žilou nebo tepnou, kde omezení průtoku barviva indikuje potřebu dalšího léčení; (2) použití scintigrafie s využitím protilátky proti trombu navázané na radioaktivní marker, kdy monitorováním velikosti a umístění trombu může být určena potřeba dalšího léčení; (3) monitorování výskytu a stupně klinických příznaků, kde zvýšením počtu nebo vážnosti příznaku může být indikována potřeba dalšího léčení; (4) měření úrovně obsahu fibrinogenu v krvi pacienta, neboť existuje inverzní vztah mezi obsahem fibrinogenu a fibrinu, přičemž pokles obsahu fibrinogenu může indikovat možný odpovídající vzestup obsahu fibrinu a polymerizaci fibrinu, což indikuje potřebu dalšího léčení.

Po obecném popisu předmětu vynálezu bude tento snáze pochopitelný použitím příkladů, které jsou zde zahrnuty pouze pro ilustraci, a které nejsou zamýšleny jako omezující.

Příklady provedení vynálezu

Inhibice srážení *in vitro*

Byla prováděna řada pokusů *in vitro* pro určení vlivu MH-1 na
5 srážení. Čištěný lidský fibrinogen (Kabi, Chromogenix Co, Ohio) byl
rozpuštěn ve 150 mM fyziologickém roztoku pufrovaném fosfátem při
fyziologickém pH v koncentraci 1 mg/ml a přibližně 100 μ l bylo
vneseno do všech jamek mikrotitrační destičky (Costar). Do každé
10 jamky bylo přidáno přibližně 50 μ l bovinního trombinu na konečnou
koncentraci 0,5 NIH jednotek/ml a tím byla vytvořena reakční směs.
Do reakční směsi bylo v čase nula přidáno přibližně 50 μ l každého z
následujících: (1) MH-1 monoklonální protilátka do konečné
koncentrace protilátky 100 μ g/ml; (2) monoklonální protilátka 45 J
(monoklonální protilátka 45 J, která křížově reaguje s fibrinem a
15 fibrinogenem, je sekretována hybridomovou buněčnou linií ATCC č.
HB 9740, která byla připravena běžnými technikami s použitím
konvenční myši Balb/c, přičemž myš byla imunizována fibrinem) na
konečnou koncentraci protilátky 200 μ g/ml; nebo (3) fyziologický
roztok. Reakce probíhala 60 minut při 37 °C. Srážení bylo měřeno
20 spektrofotometricky při 340 nm po 2 minutách. Přírůstek absorbance
indikoval postup srážení. Konec srážení byl zjistitelný jako zastavení
nárůstu na křivce závislosti absorbance na čase.

Obr. 1 ukazuje, že působení MH-1 inhibovalo rychlost srážení,
jak je zřejmé z nižší počáteční směrnice křivky absorbance/čas u
25 reakční směsi, vystavené působení MH-1 ve srovnání jak s kontrolní
reakční směsí 45J, tak s kontrolní reakční směsí s fyziologickým
roztokem (fibrinogen). Navíc MH-1 snížila absolutní míru srážení, jak
vyplývá z nižší hodnoty absorbance na křivce závislosti absorbance
na čase při zastavení nárůstu ve srovnání s kontrolními reakcemi.
30 Kontrolní reakční směs, která obsahovala protilátku 45J (ve dvakrát

vyšší koncentraci než MH-1), nevykazovala žádnou inhibici srážení ve srovnání s kontrolní reakcí s fyziologickým roztokem. Tato data podporují domněnku, že monoklonální protilátka MH-1 je schopna inhibovat tvorbu trombu.

5 Ve druhém pokusu byl testován účinek několika různých koncentrací MH-1 na dobu srážení ve srovnání s kontrolní reakcí s fibrinogenem. Obr. 2 ukazuje profily srážecí reakce (absorbance/čas), které ukazují vzrůstající inhibici srážecí reakce se stoupající koncentrací MH-1 v reakční směsi. (1:1000 = 1 µg/ml; 1:100 = 10
10 µg/ml; 1:50 = 20 µg/ml; 1:20 = 50 µg/ml; 1:10 = 100 µg/ml; fibrinogen = kontrola).

Uložení hybridomu

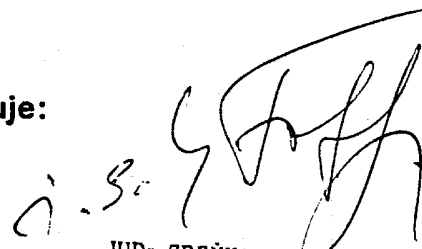
Hybridomové buněčné linie MH-1 a 45J byly uloženy v American
15 Type Culture Collection (ATCC) 9. června 1988 pod depozitním číslem HB 9739, popř. HB 9740. Adresa ATCC je 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD. 20852. Protilátka MH-1 je protilátka IgG₁ s kappa lehkým řetězcem a bylo pozorováno, že protilátka MH-1 křížově reaguje s lidským i králičím fibrinem. Není zamýšleno omezení
20 předkládaného vynálezu na uloženou hybridomovou buněčnou linii ATCC č. HB 9739 nebo na monoklonální protilátku MH-1, ale předkládaný vynález je zamýšlen jako ilustrace monoklonální protilátky proti fibrinu, která inhibuje tvorbu trombu. V rámci předkládaného vynálezu je jakýkoliv funkční ekvivalent monoklonální
25 protilátky specifické proti fibrinu nebo jeho fragment nebo derivát. Termín „funkční ekvivalent“ znamená, že monoklonální protilátka nebo její fragment nebo derivát je schopen inhibovat tvorbu trombu vazbou na stejný epitop, ke kterému se váže protilátka MH-1.

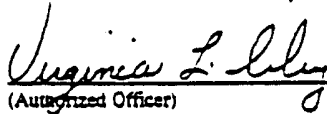
Předkládaný vynález může být také proveden v jiných
30 specifických formách, aniž bychom se vzdělili od jeho ducha nebo

nezbytných vlastností. Pro určení rozsahu vynálezu by tedy spíše mělo být přihlédnuto k následujícím nárokům než k předcházející specifikaci.

Všechny výše citované patenty a publikace jsou zde zahrnuty
5 jako reference.

Zastupuje:


JUDr. ZDENKA KOREJZOVÁ
ADVOKÁTKA

MICROORGANISMS	
Optional Sheet in connection with the microorganism referred to on page <u>21</u> , lines <u>20-35</u> of the description *	
A. IDENTIFICATION OF DEPOSIT * Further deposits are identified on an additional sheet *	
Name of depository institution * American Type Culture Collection	
Address of depository institution (including postal code and country) * 12301 Parklawn Drive Rockville, MD 20852 US	
Date of deposit * <u>June 9, 1988</u> Accession Number * <u>HB 9739</u>	
B. ADDITIONAL INDICATIONS * (leave blank if not applicable). This information is continued on a separate attached sheet	
C. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE * (if the indications are not as designated, specify)	
D. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS * (leave blank if not applicable) The indications listed below will be submitted to the International Bureau later * (Specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")	
E. <input checked="" type="checkbox"/> This sheet was received with the International application when filed (to be checked by the receiving Office) <div style="text-align: right;"> _____ (Authorized Officer)</div> <input type="checkbox"/> The date of receipt (from the applicant) by the International Bureau * was _____ <div style="text-align: right;">_____ (Authorized Officer)</div>	

International Application No: PCT/ /

Form PCT/RO/134 (cont.)

American Type Culture Collection

12301 Parklawn Drive
Rockville, MD 20852
US

Accession No.

HB 9740

Date of Deposit

June 9, 1988

JUDr. ZDEŇKA KOREJZOVÁ
ADVOKÁTKA

2464-96

č.j.	906300
DOŠLO	24. 1. 97
URAD PRŮMYSLOVÉHO VĚSTNÍCTVÍ PŘÍČ.	

PATENTOVÉ NÁROKY

- 5 1. Farmaceutický prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m ,
že obsahuje nekonjugovanou monoklonální protilátku,
specifickou proti fibrinu, a farmaceuticky přijatelný nosič,
příčemž uvedený prostředek je ve sterilní formě.

- 10 2. Farmaceutický prostředek podle nároku 1,
v y z n a č u j í c í s e t í m , že monoklonální
protilátkou, specifickou proti fibrinu, je MH-1.

- 15 3. Farmaceutický prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m ,
že obsahuje nekonjugovaný fragment nebo derivát
monoklonální protilátky, specifické proti fibrinu, kde
fragment nebo derivát obsahuje vazebnou doménu uvedené
protilátky a farmaceuticky přijatelný nosič, příčemž uvedený
prostředek je ve sterilní formě.

- 20 4. Farmaceutický prostředek podle nároku 3,
v y z n a č u j í c í s e t í m , že monoklonální
protilátkou, specifickou proti fibrinu, je MH-1.

- 25 5. Souprava pro léčení člověka v případě potřeby inhibice
trombu, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje
nekonjugovanou monoklonální protilátku, specifickou proti
fibrinu nebo její fragment nebo derivát, obsahující vazebnou
doménu uvedené protilátky, ve sterilní formě.

- 5
6. Souprava podle nároku 5, v y z n a č u j í c í s e t í m ,
ž e monoklonální protilátkou, specifickou proti fibrinu, je
MH-1.
7. Souprava podle nároku 5, v y z n a č u j í c í s e t í m ,
ž e dále obsahuje farmaceuticky přijatelný nosič ve sterilní
formě.
- 10
8. Souprava podle nároku 7, v y z n a č u j í c í s e t í m ,
ž e monoklonální protilátkou, specifickou proti fibrinu, je
MH-1.
- 15
9. Použití monoklonální protilátky, specifické proti fibrinu, pro
výrobu farmaceutického prostředku pro inhibici tvorby
trombu u člověka.
- 20
10. Použití podle nároku 9, v y z n a č u j í c í s e t í m ,
ž e monoklonální protilátkou, specifickou proti fibrinu, je
MH-1.
- 25
11. Použití fragmentu nebo derivátu proti fibrinu specifické
monoklonální protilátky, který obsahuje vazebnou doménu
uvedené protilátky, pro výrobu farmaceutického prostředku
pro inhibici tvorby trombu u člověka.

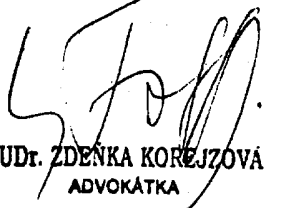
12. Použití podle nároku 11, vyznačující se tím, že monoklonální protilátkou, specifickou proti fibrinu, je MH-1.
- 5 13. Použití monoklonální protilátky, specifické proti fibrinu, pro výrobu farmaceutického prostředku pro snížení rizika postchirurgických trombotických komplikací u člověka.
- 10 14. Použití podle nároku 13, vyznačující se tím, že monoklonální protilátkou, specifickou proti fibrinu, je MH-1.
- 15 15. Použití monoklonální protilátky, specifické proti fibrinu, pro výrobu farmaceutického prostředku pro snížení rizika postchirurgických trombotických komplikací u člověka, které pocházejí z angioplastiky.
- 20 16. Použití monoklonální protilátky, specifické proti fibrinu, pro výrobu farmaceutického prostředku pro snížení rizika postchirurgických trombotických komplikací u člověka, které pocházejí z transplantace orgánů.
- 25 17. Použití fragmentu nebo derivátu proti fibrinu specifické monoklonální protilátky, který obsahuje vazebnou doménu uvedené protilátky, pro výrobu farmaceutického prostředku pro snížení rizika postchirurgických trombotických komplikací.

18. Použití podle nároku 17, v y z n a č u j í c í s e t í m ,
ž e monoklonální protilátkou, specifickou proti fibrinu, je
MH-1.
- 5 19. Použití fragmentu nebo derivátu proti fibrinu specifické
monoklonální protilátky, který obsahuje vazebnou doménu
uvedené protilátky, pro výrobu farmaceutického prostředku
pro snížení rizika postchirurgických trombotických
komplikací, které jsou následkem angioplastiky.
- 10 20. Použití fragmentu nebo derivátu proti fibrinu specifické
monoklonální protilátky, který obsahuje vazebnou doménu
uvedené protilátky, pro výrobu farmaceutického prostředku
pro snížení rizika postchirurgických trombotických
15 komplikací, které jsou následkem transplantace orgánů.
21. Použití monoklonální protilátky, specifické proti fibrinu, pro
výrobu farmaceutického prostředku pro léčení trombotického
cévního onemocnění u člověka.
- 20 22. Způsob podle nároku 21, v y z n a č u j í c í s e t í m ,
ž e monoklonální protilátkou, specifickou proti fibrinu, je
MH-1.
- 25 23. Použití monoklonální protilátky, specifické proti fibrinu, pro
výrobu farmaceutického prostředku pro léčení trombotického
cévního onemocnění u člověka, kterým je mrtvice.

24. Použití monoklonální protilátky, specifické proti fibrinu, pro výrobu farmaceutického prostředku pro léčení trombotického cévního onemocnění u člověka, kterým je plicní embólie.
- 5 25. Použití monoklonální protilátky, specifické proti fibrinu, pro výrobu farmaceutického prostředku pro léčení trombotického cévního onemocnění u člověka, kterým je trombóza hlubokých žil.
- 10 26. Použití monoklonální protilátky, specifické proti fibrinu, pro výrobu farmaceutického prostředku pro léčení trombotického cévního onemocnění u člověka, kterým je tepenná nebo žilní trombóza.
- 15 27. Použití monoklonální protilátky, specifické proti fibrinu, pro výrobu farmaceutického prostředku pro léčení trombotického cévního onemocnění u člověka, kterým je ateroskleróza.
- 20 28. Použití fragmentu nebo derivátu proti fibrinu specifické monoklonální protilátky, který obsahuje vazebnou doménu uvedené protilátky, pro výrobu farmaceutického prostředku pro léčení trombotického cévního onemocnění u člověka.
- 25 29. Použití podle nároku 28, v y z n a č u j í c í s e t í m ,
ž e monoklonální protilátkou, specifickou proti fibrinu, je MH-1.
30. Použití podle nároku 28, v y z n a č u j í c í s e t í m ,
ž e trombotickým cévním onemocněním je mrtvice.

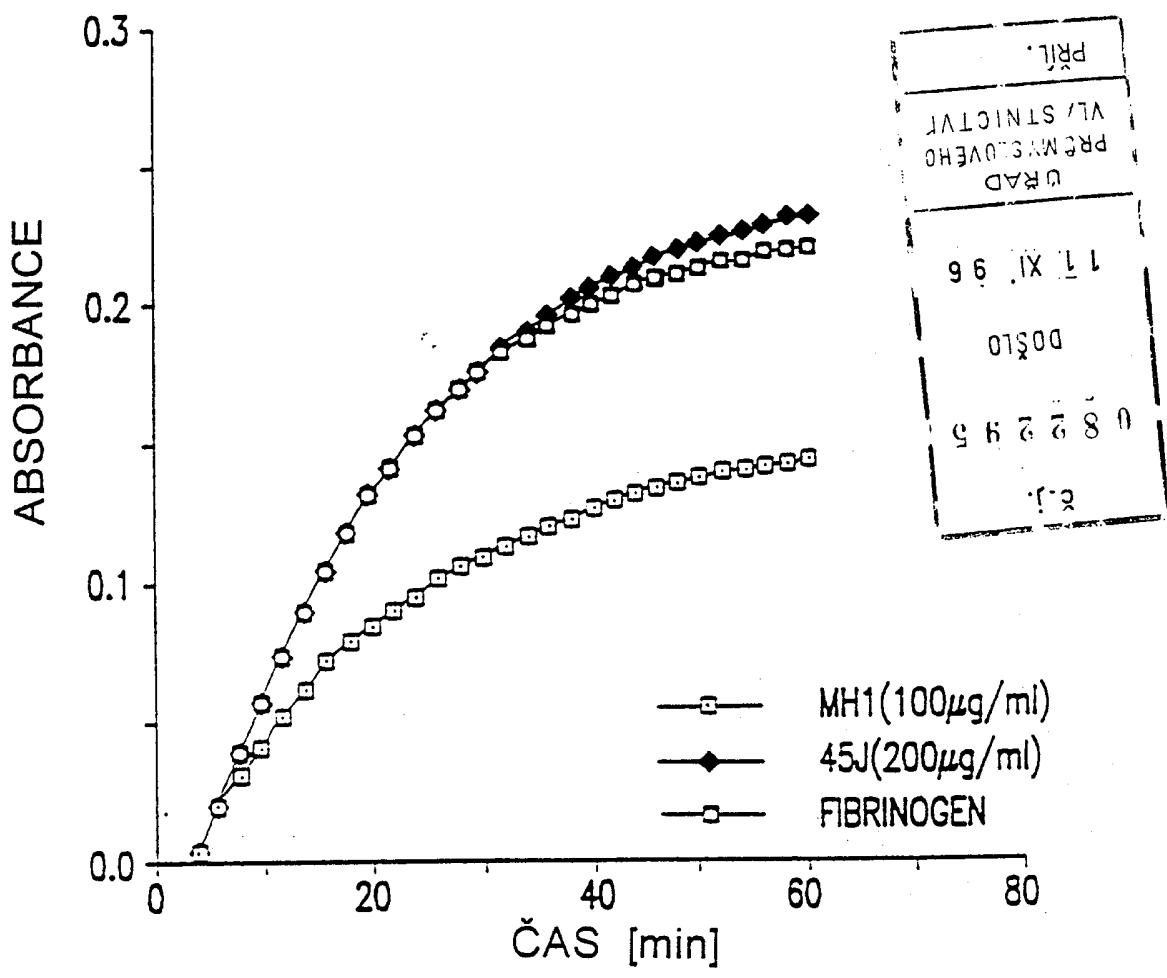
31. Použití podle nároku 28, vyznačující se tím,
že trombotickým cévním onemocněním je plicní embólie.
- 5 32. Použití podle nároku 28, vyznačující se tím,
že trombotickým cévním onemocněním je trombóza
hlubokých žil.
- 10 33. Použití podle nároku 28, vyznačující se tím,
že trombotickým cévním onemocněním je tepenná nebo
žilní trombóza.
- 15 34. Způsob podle nároku 28, vyznačující se tím,
že trombotickým cévním onemocněním je ateroskleróza.

Zastupuje:

1-5. 
JUDr. ZDENKA KOREJZOVÁ
ADVOKÁTKA

2464-96

1/2

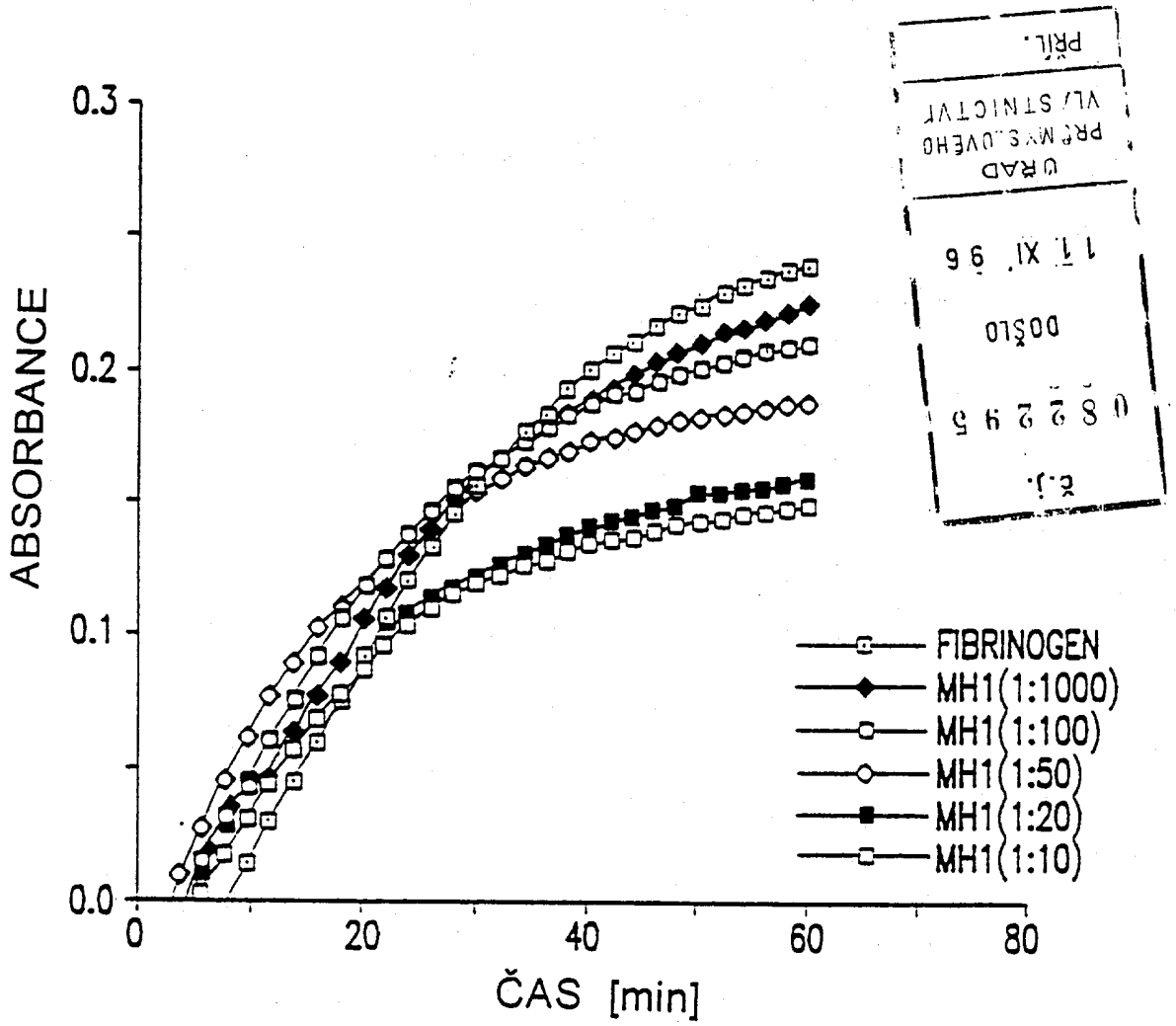


Obr. 1

1-3.
JUDr. ZDENKA KOREJZOVÁ
ADVOKÁTKA

2464-96

2/2



PRIL.
VLASTNICTVI
PREMISELOVHO
URAD
11 XI 96
00510
082245
z.j.

Obr. 2

9-5-
~~JUDr. ZDENKA KORBZOVA
ADVOKATKA~~