

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2000 -57

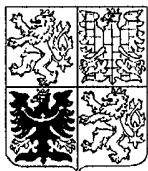
(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 07 K 16/00

A 61 P 7/02

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **23.06.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **10.07.1997**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/19729544**

(33) Země priority: **DE**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17.05.2000**
(Věstník č. 5/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/EP98/03834**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/02564**

(71) Přihlašovatel:

BASF AKTIENGESELLSCHAFT,
Ludwigshafen, DE;

(72) Původce:

Subkowski Thomas, Mutterstadt, DE;
Hornberger Wilfried, Neustadt, DE;

(74) Zástupce:

Kalenský Petr JUDr., Hálkova 2, Praha 2,
120 00;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Monoklonální protilátky, fragmenty
protilátek, jejich směsi nebo deriváty a jejich
použití a buňky pro jejich exprimaci**

(57) Anotace:

Monoklonální protilátky, fragmenty protilátek, jejich směsi nebo deriváty, které se váží na ankrod a inhibují jeho aktivitu, mají vazební aktivitu v oblasti 1×10^{-7} až 1×10^{-12} M a zlepšený neutralizační účinek oproti polyklonálním protilátkám z koz o minimálně 100 %. Jsou tvořeny protilátkou typu IgG, výhodně protilátkou MAK 1-2, MAK 2-29/3 nebo MAK. 3-27 nebo jejich směsemi. Buňky, které experimentují monoklonální protilátek, fragmenty protilátek, jejich směsi nebo deriváty jsou přednostně tvořeny hybridomovými buňkami, zejména buňkami DSM ACC2317, DSM ACC2318 a DSM ACC2319. Použití těchto protilátek k léčení poruch srážlivosti krve.

Monoklonální protilátky, fragmenty protilátek, jejich směsi nebo deriváty a jejich použití a buňky pro jejich exprimaci

Oblast techniky

Vynález se týká monoklonálních protilátek, fragmentů protilátek, jejich směsí nebo derivátů a jejich použití ve farmaceutických přípravcích nebo v diagnostice a rovněž farmaceutických přípravků, které obsahují tyto protilátky, fragmenty protilátky, jejich směsi nebo deriváty.

Dále se vynález týká buněk, které tyto protilátky, fragmenty protilátek, jejich směsi nebo deriváty exprimují.

Dosavadní stav techniky

Ankrod (obchodní označení Arwin^R, Arvin^R) je enzym z jedu malajské zmiže (agkistrodon rhodostoma). Je vysoko glykolizovanou serinovou proteazou se střední MW 38000, která má antikoagulační vlastnosti a rovněž schopnost k rozpouštění krevních sraženin.

Běžná krevní sraženina nastává vlivem thrombinu tím, že thrombin štěpí z fibrinogenových molekul fibrinopeptidy A a B a tak vede ke vzniku fibrinu (EP-B-0 556 906), hlavní složce thrombenu vedle například červených krevních tělísek nebo destiček. Ankrod štěpí v protikladu k thrombinu jen arginin-glycinové vazby v α -("A")-řetězci fibrinogenní molekuly a uvolňuje přitom fibrinopeptidy A, AP a AY (Cole a kolektiv, J. Vascular. Surgery, svazek 17, 1993, str. 288 až 292). β -("B")-řetězec fibrinogenní molekuly není ankrodem napadán a tím se nerozpadá. Úlomky (des-"A"-fibrinové monomery) vznikající po štěpení fibrinopeptidů, způsobeném ankrodem, mohou následně polymerizovat na tenké filamenty. Vznikající atypický, rozpustný fibrin se lyseruje pomocí tělesného plasminu a/nebo

se oddělí pomocí retikuloendotheliálního systému (=RES). Další štěpení des-"A"-fibrinogenní molekuly thrombinem na přírodní fibrin nenastává, poněvadž vznikající molekula není substrát thrombinu.

Ankrod snižuje v závislosti na dávkování koncentraci fibrinogenu v krvi. Therapeuticky indukovanou a řízenou hypofibrinogenemií se zmenšuje plasmová viskozita a agregační sklony erythrocytenu tak, že se zlepšuje tekutost krve. Tím se vytvoří předpoklad pro silnější prokrvení zúžených cév.

Ankrodem se v současnosti léčí například chronická periferní arteriální poškození prokrvení a rovněž se provádí studie klinické fáze III u záchvatu mrtvice.

Ankrod se výhodně subkutánně injektuje. Léčení se může provádět stacionárně nebo, jestliže je zajištěna pravidelná kontrola koncentrace fibrinogenu, potřebná ke kontrole terapie, také ambulantně. Intravenózní dávka ankrodu je možná, může však nastat jen ve vyjimečných případech za stacionárního ošetřování.

Ankrod se zásadně dává individuálně. Rozhodující je poměr koncentrace fibrinogenu v závislosti na dávce ankrodu. Je snížena pomalu na 70 až 100 mg/100 ml plasmy (= terapeutický rozsah). Během celé doby léčení je koncentrace fibrinogenů nastavena na hodnotu uvnitř tohoto rozsahu. Tekutost krve je za těchto podmínek dostatečně dobrá. Doba terapie činí zpravidla 3 až 4 týdny, může se však, pokud je to potřeba, prodloužit přes tento interval.

Při subkutánním použití se podává v prvních 4 dnech denně 70 I.E. (=mezinárodní jednotky, 1 ml) a od pátého dne se podle poměru koncentrace fibrinogenu podává 70 až 140 I.E. Jestliže leží koncentrace fibrinogenu v terapeutickém rozsahu,

vstřikuje se najednou 2 až 3 krát týdně 210 až 280 I.E.

Intravenosně se zpočátku vstřikují 2 až 3 I.E./kg tělesné hmotnosti během 8 hodin. Následně se ankrod dodatečně dává v závislosti na docílené koncentraci fibrinogenu. Zpravidla dostačuje pomalu vstříknout každých 12 hodin další 1 I.E./kg tělesné hmotnosti.

Počáteční poločas rozpadu ankrodu při cirkulaci činí 3 až 5 hodin, zpomaluje se ale s klesající koncentrací, takže po 4 dnech se během této doby eliminuje zpravidla 90 % vstříknutého ankrodu, poločas rozpadu se prodlouží na 9 až 12 dní.

Jelikož se s ankrodem v protikladu například k heparinu a warfarinu objeví malé problémy s nespecifickými krváceními během ošetřování (viz Z.S. Latallo, "Retrospective Study on Complications and Asverse Effect of Treatment with Thrombin-Like Enzymes - A Multicenter Trial", Thromb. Haemostasis, 50, str. 604 až 609, 1983), je potřebné a žádoucí cílené ošetřování takovýchto krvácení.

Kontraindikace při léčení ankrodem jsou například hemoragická diathese, nebezpečí krvácení při zraněních, po operacích a porodech, při ulcerosních intestinálních onemocněních, neoplasmy, špatně nastavitelný vysoký tlak, akutní infarkt mozku a aktivní tuberkulóza plic, funkční porušení RES, poruchy vstřebávání sraženin, například při stavech s vysokými horečkami, těžká onemocnění jater, při zjevných nebo hrozících šokových stavech nebo těhotenství.

Jak je shora popsáno, je riziko krvácení s ankrodem relativně malé, když koncentrace fibrinogenu pomalu klesá a v průběhu terapie se nastaví na 70 až 100 mg/100 ml. Pacienti, u nichž existují latentní sklony ke krvácení,

například při ledvinových kamenech nebo nedostatečnosti ledvin, se musí zvláště pečlivě kontrolovat. Je třeba zamezit tepenným punkcím a intramuskulárním injekcím jiných léčiv. Je třeba vyvarovat se současného podávání RES blokujících a rovněž ulcerosních léčiv, antikoagulantů, antifibrinolytika, thrombolytika a medikamentů, které inhibují agregaci destiček a rovněž intramuskulárního podávání ankrodu. Resorpce ze svalů nastává zpravidla velmi rychle, takže odchází mnoho monomerů des-"A"-fibrinu a existuje nebezpečí thromboembolických komplikací.

Ve studii se 429 pacienty (Crit. Rev. Oncol. Hematol. 15 (1993), 22-23), kterým byl bez předchozí thrombolytické terapie aplikován ankrod, se krvácení projevuje u 9,8 % (4,2 % interní krvácení, 5,6 % externí krvácení).

V současné době se používá k neutralizaci enzymatické aktivity ankrodu antidot, který je založen na imunoglobulinovém přípravku z kozího séra (firemní materiál Knoll AG, červen 1983, označení Arwin^R). Tento z polyklonálních látek sestávající antidot se používá při těžkých krvácivých komplikacích nebo zvýšeném nebezpečí krvácení, například při poraněních úrazem nebo z důvodu náhlé indikace k operaci. V návaznosti na neutralizaci ankrodu se musí podat 4 až 5 g humánních fibrinogenů. Jestliže se humánní fibrinogen, plasma nebo krev aplikují bez předchozí neutralizace ankrodu antidotem, existuje nebezpečí akutního rozšířeného srážení.

Stocker a kolektiv (Thrombosis Research, svazek 6, 1975: 189-194) prozkoumali tvorbu thrombenu v přítomnosti samotného Arwinu^R a v přítomnosti polyklonálního antidotu a mohou doložit působení antidotu.

Vedle tohoto použití polyklonálních protilátek z koz jsou popsány v EP-B-0 395 375, EP-B-0 556 906 a Burkhardtem a

kolektivem (FEBS, svazek 297, č. 3, 1992, str. 297 až 301) monoklonální nebo polyklonální protilátky k detekci exprese ankrodoových genů, k průkazu fibrinogenů v krvi pomocí ankrodu a ankrodoových protilátek nebo čištění ankrodu pomocí protilátek.

Nevýhodou u jako ankrodoový antidot použitých polyklonálních protilátek z koz například je, že sestávají ze směsi protilátek, z nichž mnoho nemá žádný účinek z hlediska neutralizace ankrodu. Toto velké množství různých protilátek může vést k rychlé imunitní reakci a kromě toho vede k relativně nízké kapacitě neutralizace ankrodu. Vedle toho jsou v antidotu obsaženy protilátky s různou afinitou vzhledem k ankrodu. Polyklonální protilátky lze, protože se získávají ze zvířat, jen těžko standardisovat, to znamená existují výkyvy v různých výrobních šaržích.

Podstata vynálezu

Úkolem předloženého vynálezu je vyvinout antidot proti ankrodu, která nemá shora uvedené nevýhody a lze ho jednoduše technicky produkovat.

Tento úkol je vyřešen monoklonálními protilátkami podle vynálezu, fragmenty protilátek, jejich směsami nebo deriváty, které vážou ankrod a inhibují jeho aktivitu, přičemž vazební afinita leží v oblasti 1×10^{-7} až 1×10^{-12} M a neutralizační účinek ve srovnání s polyklonálními protilátkami z koz se zlepší o alespoň 100 %.

Protilátky použité podle vynálezu jako antidot ankrodu se s výhodou vyznačují řadou zlepšených vlastností. Tvoří například homogenní, dobře charakterizovatelný produkt z protilátky nebo subtřídy protilátky, který nemá žádné výkyvy uvnitř různých produkčních šarží. Jsou vyrobitelné v libovolném množství a při jejich produkci, poněvadž se nepřipravují ve

zvířeti, nexistuje riziko virových nebo bakteriálních kontaminací. Protilátky podle vynálezu, fragmenty protilátek, jejich směsi nebo deriváty jsou specifické epitopem a mají vysokou vazební a neutralizační aktivitu. Mohou se proto při léčení podávat v malých množstvích. Homogenita produktu spolu s malými použitými množstvími vedou vlivem vysoké vazební a neutralizační aktivity k tomu, že se zřetelně redukuje riziko imunitní reakce v pacientech. Ve vazební a neutralizační aktivitě se nevyskytují uvnitř různých protilátek, fragmentů protilátek nebo derivátů výkyvy jako u polyklonálních protilátek. Smícháním různých monoklonálních protilátek, fragmentů protilátek nebo derivátů s vazební aktivitou proti různým epitopům ankrodu, ho lze velmi efektivně neutralizovat.

Protilátky podle vynálezu, fragmenty protilátky, jejich směsi nebo deriváty mají výhodně vazební afinitu vzhledem k ankrodu v rozsahu 1×10^{-7} až 1×10^{-12} M, přednostně 1×10^{-8} až 1×10^{-11} , zvláště přednostně 1×10^{-9} až 5×10^{-10} M.

Antidot podle vynálezu má oproti polyklonálním protilátkám z koz o minimálně 100 % zlepšenou účinnost neutralizace ankrodu, přednostně o 250 %, zvláště o 500 % zlepšenou účinnost. Také in vitro vykazují monoklonální protilátky značně lepší účinek než polyklonální protilátky.

Pod monoklonálními látkami nebo jejich fragmenty se v principu rozumí všechny imoglobulinové třídy jako IgM, IgG, IgD, IgE, IgA nebo jejich subtrídy jako subtrídy IgG nebo jejich směsi. Přednostní jsou IgG a jeho subtrídy jako například IgG₁, IgG₂, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃ nebo IgG_M. Zvláště přednostní jsou IgG subtypy IgG₁/κ nebo IgG_{2b}/κ. Jako fragmenty se uvádí všechny zkrácené nebo změněné fragmenty protilátky s jedním nebo dvěma vazebními místy komplementárními s antigenem, které mají vysokou vazební a neutralizační

aktivitu vzhledem k ankeru, jako části protilátky s vazebními místy tvořenými podle protilátek lehkým a těžkým řetězcem jako Fv-, Fab- nebo F(ab')₂. Tyto fragmenty se mohou získat například enzymatickou cestou odštěpením Fc části protilátky enzymem jako papain nebo pepsin, chemickou oxidací nebo genovou manipulací s geny protilátky. Výhodně se mohou použít také genově manipulované nezkrácené fragmenty.

Protilátky nebo fragmenty se mohou použít samostatně nebo ve směsích.

Geny protilátky lze pro genové manipulace izolovat pro odborníka známým způsobem například z hybridomových buněk. K tomu se odeberou buňky produkované protilátkou a mRNA se z buněk izoluje známým způsobem při dostatečné optické tloušťce buněk pomocí buněčné analýzy thiokyanatanem guanidinu, okyselením octanem sodným, extrakcí fenolem, chloroform/isoamylalkoholem, vysrážením isopropanolem a praním ethanolem. Následně se pomocí reversní transkripce syntetizuje z mRNA cDNA. Syntetizovaná cDNA se může přímo nebo po genetické manipulaci, například pomocí "site directed matagenesis", zavedením inzerce, inverze, deletace nebo výměnou bází inzerovat na vhodné zvířecí, houbové, bakteriální nebo virové vektory a exprimovat na příslušné organismy. Přednostní jsou ke klonování genů bakteriální nebo kvasinkové vektory jako pBR322, pUC18/19, pACYC184, lambda nebo kvasinkové mu-vektory a exprese na bakteriích jako *e. coli*, respektive na kvasinkách jako *saccharomyces cerevisiae*.

Dalším předmětem podle vynálezu jsou buňky, které syntetizují protilátky podle vynálezu. Těmi mohou být po transformaci, jak je shora uvedeno, zvířecí, houbové a bakteriální buňky nebo buňky kvasinek. Výhodně se jedná o hybridomové buňky nebo triomové buňky, přednostně se jedná o hybridomové buňky. Tyto hybridomové buňky lze připravit

například známou cestou ze zvířat imunizovaných ankrodem a izolací jejich B-buněk produkujících protilátku, selekcí těchto buněk na ankrod vazající protilátku a následnou syntézou těchto buněk s například lidskými nebo zvířecími, například myšími myelomovými buňkami, humanními lymfoblastoidovými buňkami nebo heterohybridomovými buňkami (Koehler a kolektiv, Nature 256, 1975, 496) nebo infekcí těchto buněk příslušnými viry na nesmrtelné buňky. Přednostní jsou hybridomové buňky připravené syntézou, zvláště přednostní jsou myší hybridomové buňky, zcela přednostní jsou hybridomové buňky, které sezerují protilátky MAK 1-2, MAK 2-29/3 nebo MAK 3-27 a byly uloženy u DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen v Braunschweigu) pod čísly DSM ACC2317, DSM ACC2318 a DSM ACC2319.

Shora uvedené hybridomové buňky sezerují zvláště přednostně protilátky IgG typu. U vytvořených protilátek MAK 1-2, MAK 2-29/3 a MAK 3-27 se jedná o následující IgG subtypy IgG₁/κ, IgG_{2b}/κ a IgG₁/κ. Tyto přednostní protilátky se váží na různých epitopech molekuly ankrodu, jaké ukazuje test na kompetitivní vazbu protilátek. Vazba zvláště přednostní protilátky MAK 1-2 na její epitop vede k silnější neutralizaci molekuly ankrodu, tím jsou pro neutralizaci enzymatického účinku potřebná menší množství protilátky. Monoklonální protilátka vykazují zřetelně vyšší neutralizační účinek než obvyklý při ošetřování krvácení použitý antidot na bázi polyklonálních protilátek, které se získaly z koz a jsou jako antidot prodávány firmou Knoll AG (Ludwigshafen).

Jako deriváty monoklonálních protilátek podle vynálezu se uvádí peptidy, peptidomimetika, která se odeberou z oblastí protilátek, vazajících antigen, na pevných nebo tekutých nosičích jako polyethylenglykol, sklo, syntetické polymery jako polyakrylamid, polystyren, polypropylen, polyethylen nebo přírodní polymery jako celuloza, separoza nebo agarosa vazající

protilátku, fragmenty nebo peptidy nebo koaguláty s enzymy, toxiny nebo radioaktivními nebo neradioaktivními označeními jako ^3H , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C , ^{51}Cr , ^{36}Cl , ^{57}Co , ^{55}Fe , ^{59}Fe , ^{90}Y , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{75}Se , fluorescenčními/chemiluminiscenčními označeními jako rhodamin, fluorescein, isothiokyanatan, fykoerythrin, fykokyanin, fluoreskamin, kovové cheláty, avidin, streptavidin nebo biotin kovalentně vazající protilátku, fragmenty, nebo peptidy.

Protilátky podle vynálezu, fragmenty protilátky, jejich směsi a deriváty se mohou použít přímo, po sušení, například sušením vymrazováním, po vazbě na shora uvedené nosiče nebo po formulování jinými farmaceutickými účinnými a pomocnými látkami k výrobě farmaceutických přípravků. Jako účinné a pomocné látky se uvádí například další protilátky, antimikrobiologicky účinné látky, které působí mikrobiocidně nebo mikrobiostaticky, jako antibiotika obecně nebo sulfonamidy, antitumorové prostředky, voda, pufr, solanka, alkoholy, tuky, vosky, inertní nosiče nebo obdobné parenterálně obvyklé látky jako aminokyseliny, zahušřovače nebo cukr. Tyto farmaceutické přípravky se používají při léčení nemocí, zejména při léčení poruch srážlivosti, výhodně poruch periferního krevního systému nebo při mrtvici.

Protilátky podle vynálezu, fragmenty protilátky, jejich směsi nebo deriváty se mohou použít přímo nebo po vazbě na pevných nebo tekutých nosičích, enzymech, toxinech, radioaktivních nebo neradioaktivních označeních nebo na fluorescenčních/chemiluminiscenčních označeních, které jsou popsány shora, v diagnostice. Přitom ankrod se může prokázat v nejrůznějších tělesných tekutinách z nejrůznějších orgánů jak člověka nebo zvířete nebo v nejrůznějších tekutinách například kulturních médiích kvasinek, bakterií, hub nebo humanních nebo zvířecích buněčných kultur.

Příklady provedení vynálezu

1. Výroba hybridomových buněk

Imunizace, syntéza, selekce a charakterizace byly provedeny technikami popsanými v literatuře (například J.H. Peters, Monoklonální protilátky, výroba a charakterizace, Springer Verlag, A.M. Campbell, Monoclonal Antibody and Immunosensor Technology, Verlag Elsevier, kapitola 2 až 7 a 8, 1991).

Myší samičí balb/c byl intraperitoneálně imunizován 100 μ m ankrodu, který byl příčným zesíťováním inaktivován z hlediska enzymatické aktivity, ve 2 až 3 týdenním rytmu podle následujícího schématu:

1. ve 100 μ l PBS + 100 μ l kompletního Freundschova adjuvans,
2. ve 100 μ l PBS + 100 μ l nekompletního Freundschova adjuvans,
- 3.-5. ve 200 μ l PBS.

Tři dny po poslední aplikaci antigenu byla odebrána slezina, buňky byly prány a provedena syntéza lymfocytů s myelomovými buňkami SPA/O-Ag14 (= ATCC CRL 1581). K tomu byly smíchány v poměru 5:1, inkubovány 1 min při 37 °C 1,5 ml roztokem PEG (polyethylenglykolu), zředěno PBS (fosforečnanem pufrovaná solanka), 1 ml během 30 s, 3 ml během 30 s, 16 ml během 60 s. Po praní byly buňky při 37 °C/7,5 % CO₂ kultivovávány v selekčním médiu (DMEM (= dulbecco's modified eagle medium), 10 % FCS (= telecí sérum), 10 % condimed H1 (Boehringer Mannheim), HAT přídavek (= hypoxanthin, aminopterin, přídavek thymidinu), ITS přídavek (= insulin, transferrin, přídavek selenitu), pyruvat, glutamin, streptomycin/penicilin).

Identifikace hybridomenu, který sezernuje specifické antiankrodové protilátky, nastává v mikrotitrační desce následně:

- mikrotitrační desky se převrství 0,1 ml/well ankrodu, případně referenčních proteinů ke stanovení specifity (1 µg/ml 0,05 M NaHCO₃ pH 9,2) během 16 h/4 °C,
- nasycení 0,3 ml/well 1 % BSA/PBS během 0,5 až 1 h/23 °C (h = hodina),
- 3x praní pomocí PBS/0,05 % Tween^R 20,
- inkubace přebytkem buněčných kultur (50 µl zředěno 50 µl PBS/0,1 % BSA (= albumin hovězího séra)/ 0,05 % Tween^R 20) během 2 až 4 h/23 °C,
- praní jako shora,
- inkubace pomocí 0,1 ml/well biotinylické antimyší IgG protilátky v 0,1 % BSA/PBS během 2 až 4 h/23 °C,
- praní jako shora,
- inkubace pomocí 0,1 ml/well streptavidin-peroxidasového komplexu v 0,1 % BSA/PBS během 2 až 4 h/23 °C,
- praní jako shora,
- 0,1 ml/well peroxidasového substrátu,
- reakce se zastaví 0,1 ml/well 2 M H₂SO₄,
- měření absorpce při 450 nm.

Peroxidasový substrát: smíchá se 0,1 ml roztoku TMB (42 mM tetramethylbenzidinu v DMSO) a 10 ml substrátového pufru (0,1 M octanu sodného, pH 4,9), potom přidavek 14,7 μ l H_2O_2 .

Hybridomy s pozitivní reakcí protilátky byly izolovány subklonováním a jednotlivé klony byly znovu testovány. Protilátky s nejvyšší reaktivitou byly použity v neutralizační zkoušce. Touto cestou může být izolováno množství pozitivních hybridomů, to znamená buňky tvoří protilátky proti ankrodu.

2. Produkce a charakterizace monoklonálních protilátek

Čištění monoklonálních protilátek se provádělo z bezsérových přebytků buněčné kultury. Proto byly postupně převáděny z DMEM/HAT/10 % FCS přes DMEM/HT/10 % FCS a DMEM/10 % FCS na bezsérové médium buněčné kultury (HT = hypoxanthin, aminopterin), jako například SF-3 (Cytogen), PFHM-II (Gibco), HL-1 (Bio Whittaker), Ultra Doma PF (Bio Whittaker) nebo podobně. Pro následné čištění prostřednictvím afinitní chromatografie byly použity protein A-sepharosy, respektive protein G-sepharosy.

Po nanesení přebytků buněčné kultury na chromatografický sloupec byly nespecificky vázané proteiny prány 3 M NaCl/1,5 glycinu, pH 8,9, aktivita anitankrodové protilátky byla eluována 500 mM NaCl/0,59 % kyseliny octové.

Stanovení subtypu protilátky bylo provedeno analogicky, jak je popsáno shora v postupu ELISA, přičemž však na místo biotinylické protilátky proti myší IgM byl použit následující biotinylický subtyp - specifická protilátka: IgM₁ proti myší, IgM proti myší, IgG_{2a} proti myší, κ -proti myší, IgG_{2b} proti myší, lambda proti myší, IgG₃ proti myší.

Typy a supertypy protilátek izolovaných hybridomových

buněk MAK 1-2, MAK 2-29/3 a MAK 3-27 (viz příklad 1) byly stanoveny IgG₁/κ, IgG₁b/κ a IgG₁/κ.

Konstanty afinity monoklonálních protilátek byly zjištěny různými z literatury známými technikami, jako například rovnovážnou dialýzou, imunitní precipitací nebo postupem ELISA (například J.H. Peters, Monoklonale Antikörper, Herstellung und Charakterisierung, Springer Verlag, A.M. Cambell, Monoclonal Antibody and Immunosensor Technologie, Verlag Elsevier, kapitola 11, 1991).

Podle postupu ELISA (J. Immunol. Methods 77 (1985) 305 až 319) se obdrží následující afinity vzhledem k přírodnímu ankródu (tabulka I):

Tabulka I: Afinity monoklonálních protilátek vzhledem k ankródu

hybridom/protilátka	K _D
MAK 1-2	1,7 * 10 ⁻⁹
MAK 2-29/3	3,1 * 10 ⁻⁹
MAK 3-27	4,4 * 10 ⁻¹⁰

3. Neutralizace ankródu monoklonální protilátkou (=MAK) - přebytek buněčné kultury

Neutralizační kapacita protilátky byla kvantifikována pomocí ankródem indikovaným fibrinovým zákalem. K tomu byly v mikrotitračních destičkách nasycených BSA inkubovány při 37 °C různé koncentrační poměry ankródu k protilátce a následně byl přidán humánní fibrinogen (1,5 mg). Po inkubaci při 37 °C byl při 340 nm kvantifikován vznikající fibrin (optická hustota OD).

S narůstajícím množstvím neutralizujících protilátek

se může neutralizovat aktivita ankrodu. Toto se ukázalo na snižujících se optických hustotách.

Zvláště efektivně působila protilátka MAK 1-2, která také při vyšších koncentracích ankrodu vedla k úplné neutralizaci. Prázdná hodnota v tabulce II obsahovala všechny součásti kromě ankrodu. Nejvyšší hodnoty optické hustoty byly změřeny s různými dávkami ankrodu (50, 25 a 12,5 ng/ml ankrodu) bez přidavku různých monoklonálních protilátek (tabulka II).

MAK 2-29 a 3-27 mají podobně dobrou nebo lepší afinitu k ankrodu jako MAK 1-2 (tabulka I), vazba protilátky antigen však vedla k neutralizaci enzymatické aktivity teprve při vyšších dávkách protilátky vztaženo na množství ankrodu.

Tabulka II: Neutralizace ankrodu přebytkem buněčné kultury MAK

vsázka	optická hustota
prázdná hodnota	0,268
ankrod 50 ng/ml	1,45
ankrod 50 ng/ml + MAK 1-2	0,254
ankrod 50 ng/ml + MAK 2-29	1,354
ankrod 50 ng/ml + MAK 3-27	1,133
ankrod 25 ng/ml	0,939
ankrod 25 ng/ml + MAK 1-2	0,238
ankrod 25 ng/ml + MAK 2-29	0,333
ankrod 25 ng/ml + MAK 3-27	0,422
ankrod 12,5 ng/ml	0,67
ankrod 12,5 ng/ml + MAK 1-2	0,229
ankrod 12,5 ng/ml + MAK 2-29	0,281
ankrod 12,5 ng/ml + MAK 3-27	0,261

4. Neutralizace ankrodu pomocí vyčištěných monoklonálních protilátek in vitro

Vyhodnocení efektivity neutralizace vyčištěných monoklonálních protilátek in vitro bylo provedeno porovnáním 50 % ní hodnoty neutralizace ve zkoušce fibrinovým zákallem.

50 %ní neutralizační hodnota se obdrží následně:

$OD \text{ negativní kontroly} + (OD \text{ pozitivní kontroly} - OD \text{ negativní kontroly})/2$

Negativní kontrola: žádný přídavek ankrodu (žádný vznik fibrinu)

Positivní kontrola: ankrod + fibrinogen (maximální vznik fibrinu)

Vlivem různých poměrů protilátka/ankrod se obdrží variující OD hodnoty, přičemž 50 %ní neutralizace byla při následujících koncentracích protilátky:

	MAK 1-2	polyklonální protilátka	poměr polyklon. protilátka/MAK
1 h předinkubace			
1,25 ng ankrodu	310 ng	625 ng	2,0
2,5 ng ankrodu	350 ng	800 ng	2,3
2 h předinkubace			
1,25 ng ankrodu	80 ng	310 ng	3,9
2,5 ng ankrodu	150 ng	650 ng	4,3

Z poměrů množství protilátky potřebné k 50 % neutralizaci bylo možné odvodit, že za zvolených in vitro podmínek byla monoklonální protilátka MAK 1-2 při 1 hodině předinkubace alespoň o faktor 2, při 2 hodinách předinkubace

alespoň o faktor 4 lepší než antidot na bázi polyklonálních protilátek z koz.

5. Kvantifikace ankrodu pomocí postupu "sandwich-ELISA"

Stanovení ankrodu ve zkouškách k diagnostickým účelům, například různých tekutin, bylo provedeno kombinací dvou protilátek pomocí postupu sandwich-ELISA podle následujícího schématu:

- převrstvení mikrotitračních desek 5 µg/ml MAK 1-2, případně MAK 3-27 ve 100 µl/well, zředěno v 0,05 M NaHCO₃, pH 9,2, přes noc/4 °C,
- praní mikrotitračních desek pomocí PBS/0,05 % Tween^R 20, 200 µl/well,
- nasycení 300 µl/well 1 % BSA/PBS, 0,5 h/23 °C,
- praní jako shora,
- 11 standardních zředění ve dvou krocích ankrodem, vysráženo 50 ng/ml v PBS/0,1 % BSA/0,05 % Tween^R 20, 100 µl/well, zkoušky se prováděly souběžně s tím v různých zředěních, inkubace 2 h/23 °C,
- praní jako shora,
- inkubace pomocí MAK 2-29, 1 µg/ml zředěno v PBS/0,1 % BSA/0,05 % Tween^R 20, 100 µl/well, 2 h/23 °C,
- praní jako shora,
- inkubace pomocí biotinylické antimyší IgG_{2b}, zředěno 1:10000 v PBS/0,1 % BSA/0,05 % Tween^R 20, 100 µl/well, 2 h/23 °C,

- praní jako shora,
- inkubace pomocí streptavidin-peroxidasového komplexu, zředěno 1:10000 v PBS/0,1 % BSA/0,05 % Tween^R 20, 100 µl/well, 0,5 h/23 °C,
- praní jako shora,
- přidavek 100 µl/well peroxidasového substrátu: (10 ml substrátového pufru (0,1 M octanu sodného pH 4,9) smíchano se 100 µl roztoku TMB (42 mM tetramethylbenzidinu v DMSO) a přidavek 14,7 µl H₂O₂ 3%),
- reakce se zastaví 100 µl/well 2 M H₂SO₄,
- měření absorpce při 450 nm.

Pro obě monoklonální protilátky MAK 1-2, respektive MAK 3-27 a použité kombinace se ukazuje, že ankrod lze kvantifikovat a prokázat v rozsahu koncentrací 3000 až 100 pg/ml. Absolutní prokazatelná hranice leží ještě pod těmito kvantifikovatelnými hodnotami (obr. 1).

6. Kompetitivní ELISA

K charakterizaci relativní polohy epitopu MAK vazacího se na ankrod byla provedena kompetitivní ELISA:

- převrstvení mikrotitračních desek 1 µg/ml ankrodu 100 µl/well, zředěno v 0,05 M NaHCO₃, pH 9,2, přes noc/4 °C,
- praní mikrotitračních desek pomocí PBS/0,05 % Tween^R 20, 200 µl/well,
- nasycení 300 µl/well 1 % BSA/PBS, 0,5 h/23 °C,

- praní jako shora,

- Na takto připravené mikrotitrační desky byly dány různé vsázky 10 ng/ml monoklonálních biotinylických protilátek MAK 1-2-biotin, MAK 2-29/3-biotin a MAK 3-27-biotin a vázány na ankrod, následně byly k vsázkám přidány podle použitých protilátek variabilní koncentrace (1 µg/ml - 1 ng/ml) každé z dalších protilátek (MAK 1-2, MAK 2-29/3 nebo MAK 3-27), takže byly testovány všechny možné kombinace protilátek ve vztahu k jejich možným překrývajícím se vazebním místům. Vsázky s různými kombinacemi protilátek byly inkubovány v PBS/0,1 % BSA/0,05 % Tween^R 20 dvě hodiny při 23 °C a následně byly ošetřeny, jak je dále uvedeno:

- praní jako shora,

- přidavek 100 µl/well peroxidasevého substrátu: (10 ml substrátového pufru (0,1 M octanu sodného pH 4,9) smícháno se 100 µl roztoku TMB,

(42 mM tetramethylbenzidinu v DMSO) a přidavek 14,7 µl H₂O₂ 3%),

- reakce se zastaví 100 µl/well 2 M H₂SO₄,

- měření absorpce při 450 nm.

V žádné z použitých kombinací protilátek nebyl pozorován úbytek OD, to znamená různé monoklonální protilátky se nevytlačují při vazbě na ankrod. Váží se na různé epitopy molekuly ankrodu. Může proto s ankrodem působit současně více protilátek. Pro rychlou optimální neutralizaci účinku ankrodu se proto mohou různé monoklonální protilátky použít, jestliže je to potřebné a žádoucí, v kombinaci.

4. Neutralizace ankrodu in vivo

Ankrod byl aplikován anestetizovaným krysám po 30 minut jako infuze 10 IU/kg tělesné hmotnosti do ocasní žíly. 10 minut po zahájení infuze ankrodu byly aplikovány různé testované substance - monoklonální, polyklonální protilátky nebo placebo - jako intravenozní bolus v množství 1 ml/kg tělesné hmotnosti. Krevní zkoušky (8 objemových dílů krev + 2 objemové díly 0,11 M citranu) byly z krční tepny před, případně 30 a 60 minut po zahájení infuze ankrodu. Odstředěním byla získána plasma a podle Claussgerinnungova postupu byl stanoven obsah fibrinogenu (kalibrační křivka přídatkem definovaných množství krysích fibrinogenů k defibrinogenované plasmě krys).

Ve skupině pro testovací substanci bylo použito 6 krys (tabulka III).

Tabulka III: Použitá množství testovací substance

MAK 1-2	(1,435 mg/kg tělesné hmotnosti)
polyklonální protilátka	(8,6 mg/kg tělesné hmotnosti, šarže antidotu A009)
polyklonální protilátka	(1,5 mg/kg tělesné hmotnosti, šarže antidotu A009)

Tabulka IV: Měření koncentrace fibrinogenu při různých protilátkách

čas (min)	koncentrace fibrinogenu (mg/dl)			
	ankrod + kontrola	ankrod + MAK 1-2	ankrod + polykl. AK 8,6 mg/kg	ankrod + polykl. AK 1,5 mg/kg
0	289,7	263,4	292,4	281,8
30	63,8	155,9	129,0	91,5
60	32,1	152,7	164,0	55,8

Ukazuje se, že MAK 1-2 byl v použité koncentraci 1,435 mg/kg tělesné hmotnosti schopen 30 min po zahájení infuze ankrodu zastavit další snížení hladiny fibrinogenu. Polyklonální protilátky z koz vyžadují pro stejný efekt 8,6 mg/kg tělesné hmotnosti. V koncentraci 1,5 mg/kg tělesné hmotnosti, tedy koncentraci srovnatelné s koncentrací MAK 1-2 nevykazuje antidot na bázi polyklonální protilátky žádný efekt (viz kontrola tabulka IV).

Na základě koncentrace fibrinogenu, výsledné po 60 minutách, bylo možné odvodit, že in vivo MAK 1-2 za podmínek testu neutralizuje lépe o faktor 6, než polyklonální antidot. Jak se zdá, je neutralizační účinek MAK 1-2 ještě zřetelně vyšší.

PETR KALENSKÝ
ATTORNEY AT LAW

PROSTĚJOVSKÝ ÚSTAV PRO
VÝZKUM A VÝROBU
KROVOKOAGULAČNÍCH
Faktorů
170 01 Prostějov 2, Hlávkova 2
Česká republika

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Monoklonální protilátky, fragmenty protilátek, jejich směsi nebo deriváty, které se váží na ankrod a inhibují jeho aktivitu, přičemž vazební aktivita leží v oblasti 1×10^{-7} až 1×10^{-12} M a je zlepšený neutralizační účinek oproti polyklonálním protilátkám z koz o minimálně 100 %.
2. Monoklonální protilátky, fragmenty protilátek, jejich směsi nebo deriváty podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že jsou tvořeny protilátkou typu IgG.
3. Monoklonální protilátky, fragmenty protilátek, jejich směsi nebo deriváty podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že jsou tvořeny protilátkou MAK 1-2, MAK 2-29/3 nebo MAK 3-27 nebo jejich směsemi.
4. Buňky, které exprimují monoklonální protilátek, fragmenty protilátky, jejich směsi nebo deriváty podle jednoho z nároků 1 až 3.
5. Buňky podle nároku 4, **vyznačující se tím**, že jsou tvořeny hybridomovými buňkami.
6. Buňky podle nároku 4 nebo 5, **vyznačující se tím**, že jsou tvořeny hybridomovými buňkami DSM ACC2317, DSM ACC2318 a DSM ACC2319.
7. Farmaceutické přípravky, obsahující monoklonální protilátky, fragmenty protilátek, jejich směsi nebo deriváty podle nároků 1 až 3.
8. Použití monoklonální protilátky, fragmentu protilátky, jejich směsí nebo derivátů podle nároků 1 až 3 ve farmaceutických přípravcích.

9. Použití monoklonální protilátky, fragmentu protilátky, jejich směsí nebo derivátů podle nároků 1. až 3 k výrobě prostředků k léčení poruch srážlivosti.
10. Použití monoklonální protilátky, fragmentu protilátky, jejich směsí nebo derivátů podle nároků 1 až 3 v diagnostice.

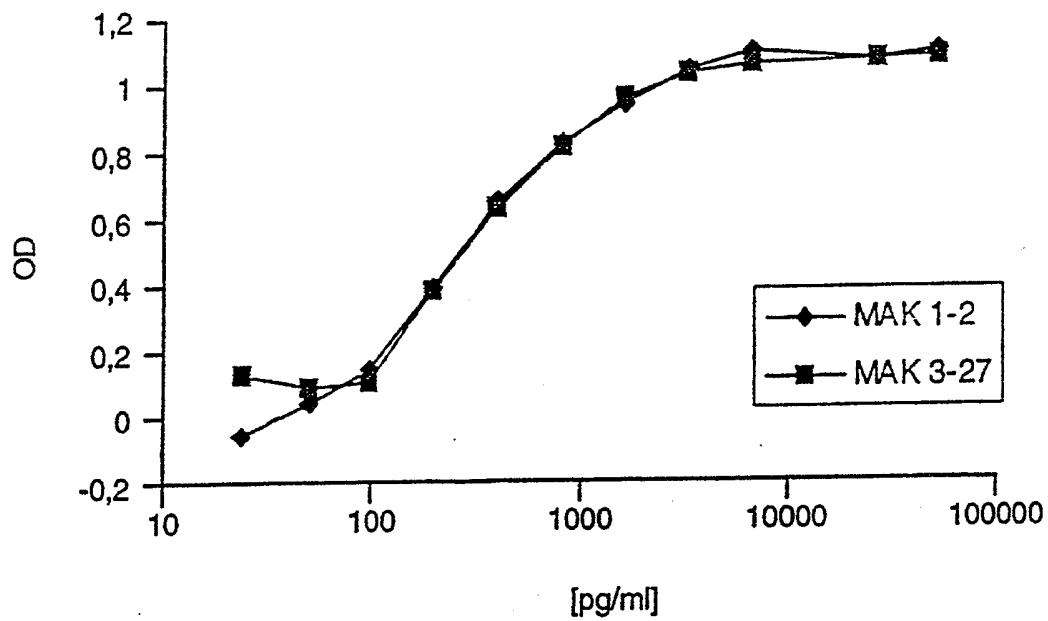
PETR KALENSKÝ
ATTORNEY AT LAW

Česká republika
Všeobecný soud
Praha
120 00 Praha 2, Pohořelá 2
Česká republika

07.01.00

PV 2000-57

1/1



PETR KALENSKÝ
ATTORNEY AT LAW