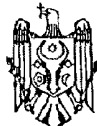


# REPUBLICA MOLDOVA



(19) **Agenția de Stat  
pentru Protecția Proprietății Industriale**

(11) 1521 (13) G2  
(51) **Int. Cl.<sup>7</sup>**: A 61 K 39/00, 39/395,  
49/00; C 07 K 16/18; A 61 P 3/00, 7/00

## (12) **BREVET DE INVENȚIE**

(21) <b>Nr. depozit:</b> 96-0334	(43) <b>Data publicării hotărârii de acordare a brevetului pe răspunderea solicitantului:</b> 2000.08.31
(22) <b>Data depozit:</b> 1995.02.21	(44) <b>Data publicării hotărârii de acordare a brevetului cu examinarea în fond:</b>
(31) <b>Nr.:</b> 204,015	(85) 1996.09.23
(32) <b>Data:</b> 1994.02.24	(86) PCT/US95/01825, 1995.02.21
(33) <b>Țara:</b> US	(87) WO 95/22986; 1995.08.31
(30)* <b>Nr.</b>	
(10)* <b>Brevet nr.</b>	
(41) 1997.09.30	
(71) <b>Solicitant:</b> AMERICAN BIOGENETIC SCIENCES, INC., US	
(72) <b>Inventatori:</b> GARGAN, Paul, E., US	
(73) <b>Titular:</b> AMERICAN BIOGENETIC SCIENCES, INC., US	
(74) <b>Mandatar:</b> Alexandr Babak, Biroul "BrevetMarcService"	

**(54) Metode de inhibare a formării de trombi, metode de tratament al stărilor trombotice, compoziții farmaceutice și trusă pentru tratamentul stărilor trombotice**

**(57) Rezumat:**

1  
Invenția se referă la medicină, și anume la terapie.

5  
Esența invenției constă în aceea că pentru inhibarea formării de trombi se administrează o doză eficientă de anticorp monoclonal fibrino-specific. De asemenea, se revendică compoziții farmaceutice și trusă ce

2  
conțin în calitate de agent activ anticorpul menționat.

Rezultatul constă în lărgirea arsenalului de remedii utilizate pentru tratamentul trombozelor și ameliorarea efectului curativ.

10

15

MD C2

## MD C2

3

**Descriere:** Prezenta invenție se referă la domeniul medicinei, în special la unele metode de inhibare a formării de trombi prin administrare de anticorp fibrino-specific, la metode de tratament al stărilor trombotice, compoziții farmaceutice și truse utilizate în astfel de metode.

5 Cheagurile de sânge sau trombii se formează în locurile traumatizării vaselor sanguine. Manifestările clinice ale trombozei patologice sau afecțiunii trombotice sunt extrem de diverse și includ tromboza venelor profunde (TVP), tromboza arterială și venoasă. Tromboembolia și complicațiile trombotice ale unei alte afecțiuni vasculare, de exemplu ateroscleroza, rezultă cu obstrucția arterelor principale, cauzând ischemia organelor

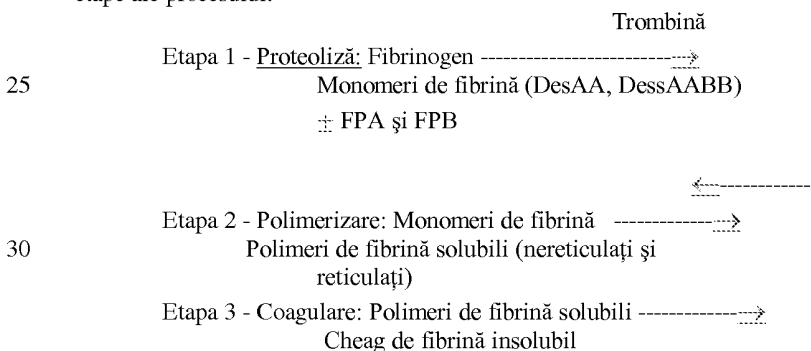
10 însoțită de stări critice iminente pentru viață, cum este accidentul vascular cerebral (ictusul), infarctul miocardic etc.

Rolul sistemului de coagulare este de a furniza o matrice insolubilă de fibrină pentru stabilizarea și fixarea dopului plachetar, care se assemblează pe structura subendotelială a leziunii vasului în locul traumei. Coagularea reprezintă un proces de amplificare, care

15 include un lanț de reacții enzimice consecutive în care proenzimele (factorii sistemului de coagulare a sângelui) se activează secvențial cu formare de enzime active. Formarea matricei de fibrină din fibrinogenul circulant este rezultatul acestei cascade de reacții enzimice consecutive, rezultând cu formarea imediată a unei enzime - trombina, care produce conversia fibrinogenului până la fibrină, reticulată apoi de Factorul XIIIa cu formare de

20 trombi.

Consecutivitatea reacțiilor poate fi reprezentată simplificat prin următoarele trei etape ale procesului:



35 Terapia antitrombotică tipică include administrarea unuia sau a mai multor anticoagulanți, cum este heparina sau cumarina [1]. Acești anticoagulanți se utilizează frecvent, în cazul în care se face încercarea de a preveni tromboza recurentă la pacienții cu afecțiuni vasculare și reocluzia trombotică acută după angioplastie.

Dezavantajul principal al utilizării acestor anticoagulanți sistemici este riscul unei hemoragii sistemice. Medicii curanți preîntâmpină că "la pacienții care administrează

40 heparină hemoragia poate să se producă, în general, în orice loc".

În plus, s-a constatat că eficacitatea acestor anticoagulanți în prevenirea reocluziei după angioplastie sau nu se deosebește de eficacitatea tratamentului placebo, sau este ireproductibilă. Astfel avantajul obținut la utilizarea acestor anticoagulanți este diminuat

45 atât de riscul unei hemoragii, cât și de eficacitatea lor problematică în prevenirea reocluziei.

Sunt cunoscute numeroase metode biologice și mecanice de reducere a gradului de reocluzie după angioplastie, însă ele nu au manifestat rezultate pozitive stabile. Astfel, un interes crescând se atestă față de livrarea "local-specifică" sau "directă" a agenților

50 antitrombotici în locurile deteriorării vasului [2].

Livrarea local-specifică a agenților antitrombotici, utilizând anticorpi direcționați pentru componentele potrivite ale sistemului hemostatic, trebuie să servească pentru

55 localizarea acestor agenți în locul deteriorării vasului. Un avantaj al acestei localizări constă în administrarea unei doze mai mici. Avantajul secund al localizării va fi reducerea riscului unei hemoragii sistemice.

## MD C2

4

Intr-un șir de cazuri s-a constatat că anticorpii pentru componentele specifice ale sistemului hemostatic inșiși inhibă polimerizarea fibrinei.

Sunt cunoscuți anticorpi modificați direcționați pentru componentele hemostatice, utilizați în clinică în calitate de agenți pentru scintigrafia trombilor *in situ* [3].

5 Pentru uz terapeutic au fost elaborați anticorpi la fibrină, conjugați cu enzime trombolitice [4]. Conform acestei comunicări, furnizarea local-specifică a agentului trombolitic pare să aibă o eficacitate semnificativ crescută la lizarea cheagurilor.

Sunt cunoscute cercetările cu un anticorp monoclonal generat împotriva fibrinogenului, care manifestă o activitate anticoagulantă "medie" [5].

10 Mai sunt cunoscute numeroase metode de preparare și/sau metode de utilizare a anticorpilor monoclonali specifici față de fibrinogen, fibrină sau față de produsele de degradare a acestora [6].

Cel mai apropiat de esența prezentei invenții este procedeul de inhibare a formării de trombi la om ce include administrarea unei doze eficiente de anticorp monoclonal antifibrinic [7].

15 Se mai descrie și o compoziție farmaceutică care conține anticorp monoclonal antifibrinic și suport farmaceutic acceptabil sau o trusă care include un anticorp monoclonal antifibrinic și un purtător farmaceutic acceptabil.

Însă pentru elaborarea terapiei local-specifice sau a profilacticii cu agenți antitrombotici toate aceste comunicări sunt de o utilitate redusă sau chiar inutile. În toate aceste cazuri anticorpii sunt transversal-reactivi fie cu fibrinogenul, fie cu produsele de degradare a fibrinogenului, toți manifestând ubicuitate în sistemul hemostatic. Oricare anticorp de acest fel, administrat pacientului, trebuie să se conjuge etanș cu fibrinogenul sau cu produsele de degradare a fibrinogenului și nu va mai fi capabil să inhibe polimerizarea fibrinei sau formarea de trombi în locul de deteriorare a vasului sanguin.

25 Metodele local-specifice de tratament sau profilaxie prin administrarea de astfel de agenți antitrombotici au o utilitate limitată.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție este extinderea sortimentului de agenți cu activitate trombolitică.

30 Prezenta invenție asigură o metodă complet diferită de inhibare a formării de trombi prin utilizarea de anticorpi monoclonali fibrino-specifici (adică, cu o reactivitate transversală nesemnificativă cu fibrinogenul sau cu produsele formate în urma degradării fibrinogenului sau fibrinei în prezența plasminei). Invenția se referă la o metodă de utilizare a anticorpilor monoclonali fibrino-specifici, care, prin surprindere, inhibă formarea de trombi în locul traumării vaselor sanguine.

Astfel, invenția propune o metodă de inhibare a formării de trombi la om ce include administrarea unei doze eficiente de anticorp monoclonal fibrino-specific, anticorpul monoclonal fiind MH-1 produs de hibridoma ATCC 9739 sau anticorpul care se conjugă cu același epitop, cu care se conjugă și anticorpul monoclonal MH-1.

40 Prezenta invenție mai asigură o metodă de inhibare a formării de trombi la om, care cuprinde administrarea unei doze eficiente de anticorp monoclonal fibrino-specific, administrându-se în acest caz o doză eficientă de un fragment sau derivat al anticorpului monoclonal fibrino-specific MH-1 produs de hibridoma ATCC 9739 sau de anticorp care se conjugă cu același epitop, cu care se conjugă și anticorpul MH-1, fragmentul sau derivatul căruia conțin domeniul de legătură al anticorpului menționat.

45 Metoda de tratament conform prezentei invenții reduce riscul uman de complicații trombotice postchirurgicale prin administrarea unei doze eficiente de anticorp monoclonal fibrino-specific, anticorpul monoclonal fiind MH-1 produs de hibridoma ATCC 9739 sau anticorpul care se conjugă cu același epitop, cu care se conjugă și anticorpul monoclonal MH-1, sau de fragment sau de derivat de anticorp monoclonal fibrino-specific MH-1 produs de hibridoma ATCC 9739 sau de anticorp care se conjugă cu același epitop, cu care se conjugă și anticorpul monoclonal MH-1, fragmentul sau derivatul căruia conțin domeniul de legătură al anticorpului menționat.

50

## MD C2

5

Complicațiile trombotice postchirurgicale sunt rezultatul angioplastiei sau al transplantului de organe.

Prezenta invenție mai propune o metodă de tratament al afecțiunilor trombotice vasculare la om, care include administrarea unei doze eficiente de anticorp monoclonal fibrino-specific, anticorpul monoclonal fiind MH-1 produs de hibridoma ATCC 9739 sau anticorpul care se conjugă cu același epitop, cu care se conjugă și anticorpul monoclonal MH-1, sau de fragment sau de derivat de anticorp monoclonal fibrino-specific MH-1 produs de hibridoma ATCC 9739 sau de anticorp care se conjugă cu același epitop, cu care se conjugă și anticorpul monoclonal MH-1, fragmentul sau derivatul căruia conțin domeniul de legătură al anticorpului menționat.

Exemplele de afecțiuni trombotice vasculare includ ictusul, embolia pulmonară, tromboza venelor profunde, tromboza arterială sau venoasă, ateroscleroza.

Invenția mai propune o compoziție farmaceutică care conține anticorp monoclonal fibrino-specific și un purtător farmaceutic acceptabil, anticorpul monoclonal fibrino-specific fiind MH-1 neconjugat produs de hibridoma ATCC 9739 sau anticorpul care se conjugă cu același epitop, cu care se conjugă și anticorpul MH-1, sau un fragment neconjugat sau derivat de anticorp monoclonal fibrino-specific MH-1 produs de hibridoma ATCC 9739 sau anticorp care se conjugă cu același epitop, cu care se conjugă și anticorpul monoclonal MH-1, fragmentul sau derivatul căruia conțin domeniul de legătură al anticorpului menționat.

Prezenta invenție asigură de asemenea o trusă pentru tratamentul omului, trusa menționată incluzând un anticorp monoclonal fibrino-specific și un purtător farmaceutic acceptabil, anticorpul monoclonal fibrino-specific fiind MH-1 neconjugat, produs de hibridoma ATCC 9739 sau anticorpul care se conjugă cu același epitop, cu care se conjugă și anticorpul monoclonal MH-1, sau fragmentul sau derivatul acestuia care conțin domeniul de legătură al anticorpului menționat.

Invenția se explică prin desenele din fig.1-2, care reprezintă:

– fig. 1, incluziunea anticorpului monoclonal MH-1 în amestecul de reacție fibrinogen/coagulare cu trombină inhibă atât gradul, cât și mărimea absolută a coagulării. "Fibrinogenul" și "45J" reprezintă reacții de control;

– fig. 2, incluziunea unei doze crescând de anticorp monoclonal MH-1 în amestecul de reacție fibrinogen/coagulare cu trombină rezultă cu creșterea nivelului de inhibare a coagulării. "Fibrinogenul" reprezintă reacția de control.

S-a determinat surprinzător că anticorpul monoclonal fibrino-specific poate inhiba polimerizarea fibrinei și formarea de trombi. Astfel, anticorpul monoclonal fibrino-specific pot fi utilizați pentru prevenirea sau tratamentul oricărei stări la om, evoluția căreia poate fi prevenită sau tratată prin inhibarea polimerizării fibrinei sau formării de trombi. De exemplu, anticorpul monoclonal fibrino-specific sunt utili la tratamentul oamenilor, care suferă de orice afecțiune ce include riscul unei tromboze patologice. Exemplele, care nu limitează lista afecțiunilor vasculare, includ tromboza venelor profunde (TVP), tromboza arterială și venoasă, ictusul, tromboembolia, embolia pulmonară și complicațiile trombotice ale aterosclerozei.

Anticorpul monoclonal fibrino-specific sunt utilizați de asemenea pentru tratamentul oamenilor în cadrul pregătirii pentru proceduri chirurgicale invazive, în timpul sau în perioada de vindecare după aceste proceduri. În descrierea prezentei invenții termenul de "procedură chirurgicală invazivă" definește orice procedură chirurgicală care poate rezulta cu deteriorarea vaselor sanguine, arteriale sau venoase, cauzând complicații trombotice. Exemplele, nelimitându-se la lista acestor proceduri, includ angioplastia cu balon și transplantul de organe (atât naturale, cât și artificiale).

Adițional la anticorpul monoclonal fibrino-specific, prin metode cunoscute pot fi generate fragmente de anticorpi, care conțin idiotipul (domeniul de legătură) anticorpului monoclonal fibrino-specific. De exemplu, așa fragmente includ, însă nu se limitează la acestea, (1) fragmente  $F(ab')_2$ , care pot fi obținute prin digerarea cu pepsină a moleculei de anticorp, (2) fragmente  $Fab'$ , care pot fi generate prin reducerea punții disulfide a fragmentului  $F(ab')_2$  și (3) fragmente  $Fab'$  care pot fi generate prin tratarea moleculei de

## MD C2

6

anticorp cu papaină și cu un agent de reducere. Prezenta invenție asigură și astfel de fragmente de anticorpi.

5           Adițional la anticorpii monoclonali fibrino-specifiți și fragmentele de anticorpi, prin metode cunoscute mai pot fi generați și alți derivați ai anticorpilor, care conțin idiotipul (domeniul de legătură) anticorpului monoclonal fibrino-specific. De exemplu, pot fi sintetizate oligopeptide recombinante și sintetice și analogi ai acestora, care manifestă același efect de inhibare a formării de trombi ca și anticorpii monoclonali fibrino-specifiți sau fragmentele lor. Prezenta invenție asigură și așa derivați. Alte exemple de utilizare a oligopeptidelor sintetice cu o consecutivitate bazată pe regiunea primară de conjugare a anticorpului monoclonal sunt descrise de Knight L. et al., in J. Nucl. Med., 35 : 282-88, 1994.

10           În sfârșit, invenția asigură orice echivalent funcțional al anticorpului monoclonal fibrino-specific, fragmentului sau derivatului acestora. Termenul "echivalent funcțional" definește orice anticorp monoclonal fibrino-specific, fragment sau derivat al acestora, care este capabil în cantități suficiente să inhibe formarea de trombi la omul care are nevoie de un astfel de tratament, prin conjugarea cu același epitop cu care se conjugă anticorpul MH-1.

15           Alte exemple de preparare și utilizare a fragmentelor de anticorpi sunt descrise de Parham P. et al. in J. Immunol. Meth., 53: 133, 1982 și Khaw B-A. et. al., in J. Nucl. Med., 34: 2264-68, 1993.

20           Numeroase din metodele examinate anterior, adoptate pentru obținerea anticorpilor fibrino-specifiți, erau concentrate asupra imunizării animalelor cu fragmente de fibrină solubile și peptide sintetice, care imită sectoarele neoantigenice accesibile ale fibrinei [Hui K.Y. et al., Science, 222: 1129-32, 1983; Scheefers-Borchel U. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 7091-95, 1985; Elms M.J. et al., Thromb. Haemostas, 50: 591-94, 1983; Kudryk B. et al., Mol. Immunol., 21: 89-94, 1984]. Însă se considera că locul de conjugare a acestor anticorpi este conservat în perioada procesului de degradare a fibrinei și de aceea așa anticorpi se pot conjuga de asemenea cu produsele de degradare a fibrinei.

25           Gargan et al. (US 5.120.834) descriu un procedeu de obținere a anticorpilor monoclonali din animale sterile prin imunizarea acestora cu antigenul selectat. Se consideră că avantajul utilizării sistemului steril, cu care se produc anticorpii monoclonali, constă în aceea că un astfel de sistem va manifesta un răspuns imun destul de accentuat, majorând probabilitatea determinării locului de aflare a limfocitului- B, care produce un anticorp capabil să se conjuge cu epitopul specific al antigenului. S-a determinat că un astfel de sistem este util, în special, pentru generarea anticorpului cu înaltă specificitate pentru fibrină, având o reactivitate transversală redusă sau nulă pentru fibrinogen. Obținerea unui așa anticorp discriminant este problematică, deoarece similaritatea structurală și conformațională dintre fibrină și fibrinogen este estimată ca depășind 98% [Plow E.F. et al., Semin. Thromb. Haemostas, 8: 36, 1982]. Astfel, numai un procent nesemnificativ de epitopi din molecula fibrinei sunt în realitate neoantigene (adică, unici pentru fibrină).

30           În US 5,120.834 se relatează despre o linie de celule hibridome ATCC Nr. HB 9739, secretoare de anticorp monoclonal MH-1. Anticorpul monoclonal MH-1 este specific pentru polimerii reticulați și nereticulați ai fibrinei, însă nu reacționează transversal cu fibrinogenul sau cu produsele de degradare plasmin- derivate ale fibrinogenului sau fibrinei.

35           MH-1 se purifică conform metodelor descrise în US 5,120.834. MH-1 se conjugă specific cu fibrină și nu reacționează transversal cu fibrinogenul într-o testare competitivă. MH-1 nu reacționează transversal nici cu un produs de degradare a fibrinogenului, generat de plasmină, și nici cu un produs de degradare a fibrinei reticulate derivat de plasmină. Astfel se poate conchide că: 1) MH-1 recunoaște epitopul moleculei de fibrină intacte, care nu este prezent sau care nu este expus pe suprafața moleculei precursora de fibrinogen, și 2) epitopul este aparent distrus prin digestia cu plasmină a fibrinei reticulate.

40           MH-1 a fost caracterizat ulterior prin testul Scatchard [Frankel et al., Mol. Immunol., 16: 101-6, 1979], utilizând anticorpi MH-1 marcați cu <sup>125</sup>I pentru determinarea afinității MH-1 pentru fibrină. Valoarea obținută pentru constanta de disociere K<sub>D</sub> a

## MD C2

7

constituit  $6.7 \times 10^{-10}$  M, valoare ce corespunde unei afinități de circa 5000 ori mai mare decât afinitatea activatorului tisular plasminogen pentru fibrină.

Imunoblottingul Western a relevat că MH-1 nu reacționează transversal cu catenele A $\alpha$ , B $\beta$  sau  $\gamma$  ale fibrinogenului. Aceeași metodă a arătat că MH-1 nu reacționează transversal cu catenele A $\alpha$  sau B $\beta$  ale fibrinogenului tratat cu trombină. În plus, testele ELISA au arătat că MH-1 interacționează atât cu fibrina reticulată, cât și cu cea nereticulată, afinitatea pentru fibrina reticulată fiind mai mare dintre aceste două măriri.

Conform prezentei invenții, anticorpii monoclonali fibrino-specifci sau fragmentele, sau derivații lor sunt administrați de oamenii care au nevoie de un tratament pentru inhibarea formării de trombi. Pentru uz uman anticorpii sau fragmentele, sau derivații lor sunt administrați, de preferință, într-o formă neconjugată cu un oarecare agent de marcarea cu izotopi radioactivi, trombolitic sau cu alt agent, sau cu o altă moleculă oarecare, sau cu o parte a ei. Însă metodele propuse de prezenta invenție pot fi de asemenea realizate prin utilizarea de anticorpi sau de derivați ai acestora, care se conjugă cu agenți de marcarea cu izotopi radioactivi, trombolitici sau alți agenți, sau cu o moleculă oarecare sau cu o parte a ei.

Termenul "suport " se referă la un diluant, excipient sau o umplutură cu care anticorpii monoclonali fibrino-specifci, fragmentele sau derivații lor sunt administrați.

Termenul "suport farmaceutic acceptabil" definește suportul care este confirmat de Agenția Federală de conducere sau de organele de conducere a statului, sau este inclus în lista farmacopecii SUA sau a altei farmacopecii recunoscute pentru uz în medicina veterinară și, mai concret, pentru uz uman.

Termenul "compoziție antitrombotică" utilizat în prezenta invenție se referă la o compoziție, ce conține anticorpii monoclonali fibrino-specifci sau fragmente, sau derivatul acestuia și un suport farmaceutic acceptabil, care într-o cantitate suficientă poate inhiba formarea de trombi la oamenii, care au nevoie de inhibarea menționată.

Termenul "doza eficientă" utilizat în prezenta invenție se referă la cantitatea de anticorpii monoclonali fibrino-specifci sau de fragmente sau de derivat al acestuia, care este suficientă pentru inhibarea formării de trombi la oamenii care au nevoie de un atare tratament. Doza nu trebuie să fie atât de mare ca să provoace diverse efecte secundare, cum sunt reacțiile transversale indezirabile sau reacțiile anafilactice și altele asemenea. În general, doza va varia în funcție de vârstă, stare, sex și gravitate a bolii pacientului, de contraindicații, dacă ele există, de toleranța imunologică și de alți factori similari, care sunt determinați de medicul curant. Cu toate că doza va varia în funcție de un set individual de circumstanțe, în majoritatea cazurilor de afecțiuni vasculare și în majoritatea cazurilor de intervenție chirurgicală, doza va fi determinată de masa corporală a pacientului, care necesită tratament, variind în intervalul de la circa 1  $\mu$ g/kg masă corporală până la circa 50  $\mu$ g/kg masă corporală, mai potrivită fiind de la circa 5  $\mu$ g/kg masă corporală până la circa 10  $\mu$ g/kg masă corporală.

Anticorpii monoclonali fibrino-specifci sau fragmentele lor, sau derivații lor pot fi administrați omului prin orice modalitate potrivită, inclusiv, parenteral într-o singură injecție a bolusului, perfuzie continuă sau prin combinarea acestor două metode. Administrarea poate fi prin infuzie directă cu un cateter, cum este administrarea intracoronariană, în cazul în care aceasta este indicată.

Pregătirea preparatelor pentru administrare parenterală include, de exemplu, reconstituirea anticorpilor monoclonali fibrino-specifci liofilizați sau a fragmentelor, sau a derivaților lor în soluție fiziologică salină sterilă și fără endotoxine, sau, în linii mai generale, poate include reconstituirea sau dispersarea anticorpilor monoclonali fibrino-specifci, fragmentelor sau derivaților acestora în soluții sterile apoase sau neapoase, suspensii sau dispersii. Exemplele de solvenți neapoși includ propilenglicol, polietilenglicol, ulei vegetal, cum este uleiul de măsline, și esteri organici injectabili, cum este oleatul de etil. Suporturile apoase includ apa, soluții alcoolice/apoase, emulsii sau suspensii, inclusiv soluție salină și tampon. Suporturile parenterale includ soluție de clorură

## MD C2

8

de sodiu, dextroză Ringer, dextroză și clorură de sodiu, dextroză Ringer lactată sau uleiuri nevolatile. Suporturile intravenoase includ componente suplimentare lichide și nutritive, cum sunt cele bazate pe dextroza Ringer și altele similare. Pot fi prezenți de asemenea conservanți și alți aditivi, de exemplu, agenți antimicrobieni, antioxidanți, agenți de chelare, gaze inerte și alții similari. Este preferată forma sterilă a compoziției farmaceutice, conform prezentei invenții, care să corespundă setului de standarde ale sterilității, acceptate de United States Food and Drug Administration.

Prezenta invenție se referă de asemenea la o trusă farmaceutică, care conține unul sau mai multe ingrediente ale compoziției farmaceutice, conform invenției, stocate pentru păstrare în același container sau în containere separate. La astfel de container (e) opțional se anexează o notiță, după forma prescrisă de o agenție guvernamentală, care reglează producerea, utilizarea și comercializarea produselor farmaceutice sau biologice și în această notiță se reflectă permisiunea agenției pentru fabricare, utilizare sau comercializare pentru administrare umană. Opțional la trusele, care conțin numai anticorpi liofilizați, sau fragmentele, sau derivații acestora, pot fi anexate instrucțiunii privind suporturile potrivite pentru administrare umană, pacienților care au nevoie de un astfel de tratament.

Volumul, durata, regimul și metoda de tratament vor varia în funcție de vârstă, masa corporală și sexul persoanei, care necesită tratament, cât și de tipul și gravitatea bolii, care trebuie vindecată și se prescrie de medicul curant în conformitate cu circumstanțele concrete. Tratamentul poate fi administrat fie imediat înainte, în timpul sau după oricare procedură chirurgicală, sau atât înainte, cât și în timpul procedurii, sau atât în timpul, cât și după procedură, sau înainte, în timpul și după procedură în funcție de circumstanțe.

De exemplu, în cazul unei proceduri chirurgicale, cum este angioplastia cu balon, deseori se întâmplă că la omul bolnav să fie prezentă deja o mare cantitate de cheag de sânge dispersat. În această situație, în general, va fi potrivită administrarea unei compoziții antitrombotice imediat după efectuarea angioplastiei, utilizând de preferință o sondă în angioplastie pentru a spăla direct partea deteriorată a vasului sanguin cu compoziția antitrombotică focalizând astfel tratamentul numai în acest loc. Aceasta previne pierderea de compoziție antitrombotică, care poate avea loc, de exemplu, ca rezultat al conjugării anticorpului cu trombul în locurile neantrenate.

În cazurile în care procedurile chirurgicale invazive se efectuează la pacienții care nu prezintă un istoric de tromboze patologice, în general, este potrivită administrarea compoziției antitrombotice fie imediat înainte, fie în timpul procedurii, deoarece există un risc mai redus de pierdere a compoziției antitrombotice prin conjugarea în locurile neatrinse.

În plus, în majoritatea cazurilor în care se prevăd proceduri chirurgicale, timpul, în care există un risc înalt de formare de trombi, are tendința să se limiteze cu finalul procedurii. Așadar, suficient pentru inhibarea eficientă a formării de trombi poate fi numai un număr limitat de tratări, sau doar o tratare de durată suficientă, reducând astfel cu mult riscul coagulării indus prin intervenția chirurgicală, cu toate riscurile ei pentru pacient.

În cazul unor afecțiuni trombotice cronice regimul de timp, durata și numărul de tratamente antitrombotice depind, în mare măsură, de diagnosticul stării pacientului până și după tratament și de răspunsul lui la tratamentul antitrombotic preliminar, care se determină, se controlează și se evaluează de către medicul curant.

Eficacitatea tratamentului antitrombotic cu anticorpi monoclonali MH-1 sau cu un fragment, sau cu un derivat al acestuia poate fi determinată prin metode standard. Exemplele de astfel de metode includ, dar nu se limitează la cele enumerate: (1) monitoringul angiografic imagistic al fluxului arterial sau venos, respectiv, în cadrul căruia apariția obstrucției fluxului respectiv indică necesitatea unui tratament ulterior; (2) scintigrafia cu utilizarea anticorpului antitrombotic conjugat cu un izotop radioactiv, cu care se monitorizează mărimea și localizarea trombului pentru tratament ulterior; (3) monitoringul apariției sau gradului de manifestare a simptomelor clinice, când o amplificare a numărului sau a gravității simptomelor poate indica necesitatea administrării unui tratament ulterior, și (4) măsurarea conținutului de fibrinogen în sângele persoanei, deoarece există o proporționalitate inversă între nivelele de fibrinogen și fibrină, când reducerea conținutului de fibrinogen poate indica la o posibilă creștere corespunzătoare a

## MD C2

9

conținutului de fibrină și a polimerizării fibrinei, astfel indicând necesitatea unui tratament ulterior.

Așadar, având descrierea generală a prezentei invenții, ea va fi mai ușor de înțeles, luând cunoștință de exemplul specific, inclus în invenția prezentă numai în scopuri ilustrative, dar nu pentru anumite restricții.

### EXEMPLU DE INHIBARE A COAGULĂRII *IN VITRO*

Pentru determinarea influenței anticorpului MH-1 asupra coagulării s-au efectuat numeroase experiențe *in vitro*. Fibrinogenul uman purificat (Kabi, Chromogenix Co, Ohio) se dizolvă în 150 mM soluție salină de tampon fosfat, pH fiziologic, cu concentrația de 1 mg/ml și circa 100  $\mu$ l se plasează în fiecare alveolă din planșeta pentru microtitrare (Costar). Pentru formarea amestecului de reacție, în fiecare alveolă se adaugă circa 50  $\mu$ l trombină de bovină cu o concentrație finală de 0.5 NIH unități/ml. La amestecul de reacție, în momentul zero, se adaugă circa 50  $\mu$ l de: (1) anticorp monoclonal MH-1, până la o concentrație finală de anticorp de 100  $\mu$ g/ml; (2) anticorp monoclonal 45J (anticorp monoclonal 45J reacționează transversal cu fibrina și fibrinogenul, este secretat de linia de celule hibridome ATCC nr. HB 9740, care a fost obținut prin procedee convenționale, utilizând convențional șoareci Balb/c, în care șoarecii se imunizează cu fibrină) până la o concentrație finală de anticorp de 200  $\mu$ g/ml, sau (3) soluție fiziologică salină. Reacția s-a efectuat la 37°C timp de 60 minute. Coagularea s-a determinat spectrofotometric la 340 nm, fiecare 2 minute. O creștere a absorbției indică la progresarea coagulării. Sfârșitul procesului de coagulare se observă sub formă de platou pe curba "absorbție/ timp".

Din fig. 1 se constată că tratarea cu MH-1 inhibă viteza de coagulare, ce se evidențiază prin înclinarea mai mică a sectorului inițial al curbei de absorbție/timp pentru amestecul de reacție tratat cu MH-1, comparativ cu amestecul de reacție de control sau cu 45J, sau salin (fibrinogen). În plus, MH-1 reduce mărimea absolută a coagulării care se produce, ceea ce se determină după nivelul inferior al platoului curbei pentru MH-1, comparativ cu reacțiile de control. Amestecul de reacție de control cu conținut de anticorp 45J (la o concentrație dublă de MH-1) nu exercită vreo oarecare inhibare a coagulării, comparativ cu reacția de control cu soluție salină. Aceste date confirmă presupunerea că anticorpul monoclonal MH-1 este capabil să inhibe formarea de trombi.

În experiența a doua s-a testat efectul diferitelor concentrații de anticorp monoclonal MH-1 asupra timpului de coagulare, comparativ cu reacția de control cu fibrinogen. Fig. 2 reprezintă profilul reacției de coagulare (absorbție/timp), care indică o amplificare a inhibării reacției de coagulare cu creșterea concentrației de MH-1 în amestecul de reacție (1:1000  $\equiv$  1  $\mu$ g/ml; 1:100  $\equiv$  10  $\mu$ g/ml; 1:50  $\equiv$  20  $\mu$ g/ml; 1:20  $\equiv$  50  $\mu$ g/ml; 1:10  $\equiv$  100  $\mu$ g/ml; Control  $\equiv$  Fibrinogen).

### DEPOZITAREA HIBRIDOMEI

Liniile de celule hibridome MH-1 și 45J au fost depozitate în American Type Culture Collection (ATCC) la 9 iunie 1988 cu numerele de acces HB 9739 și 9740, respectiv. Sediul ATCC: 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD. 20852. Anticorpul MH-1 reprezintă un anticorp IgG<sub>1</sub> cu o catenă kappa mică, interacționează transversal atât cu fibrina umană, cât și cu fibrina iepurelui.

Obiectul invenției nu intenționează să se limiteze numai la scopul depozitării liniilor de celule hibridome ATCC nr. HB 9739 sau de anticorp monoclonal MH-1, însă se subînțelege că aceasta este o singură ilustrare de anticorp monoclonal fibrino-specific, care inhibă formarea de trombi. Oricare echivalent funcțional de anticorp monoclonal fibrino-specific, sau de fragment, sau de derivat al acestuia se include în esența prezentei invenții. Prin termenul "echivalent funcțional" se subînțelege un anticorp monoclonal, un fragment sau un derivat al acestuia, care este capabil să inhibe formarea de trombi prin conjugarea cu același epitop, cu care se conjugă anticorpul MH-1.

Prezenta invenție poate fi realizată în alte forme specifice, fără a se abate de la atributele esențiale ale ei, deci referința trebuie făcută la revendicările anexate la descrierea invenției.

## MD C2

10

- (57) **Revendicare (ări):** 1. Metodă de inhibare a formării de trombi, ce include administrarea unei doze eficiente de anticorp monoclonal, **caracterizată prin aceea că** in calitate de anticorp monoclonal se administrează anticorpul monoclonal fibrino-specific.
- 5 2. Metodă, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** anticorpul monoclonal fibrino-specific este MH-1.
3. Metodă de inhibare a formării de trombi, ce include administrarea unei doze eficiente de anticorp monoclonal, **caracterizată prin aceea că** in calitate de anticorp monoclonal se administrează un fragment sau derivat al anticorpului monoclonal fibrino-specific, fragmentul sau derivatul conținând domeniul de legătură al anticorpului menționat.
- 10 4. Metodă, conform revendicării 3, **caracterizată prin aceea că** anticorpul monoclonal fibrino-specific este MH-1.
5. Metodă de tratament al omului pentru reducerea riscului uman de complicații trombotice postchirurgicale, ce include administrarea unei doze eficiente de anticorp monoclonal, **caracterizată prin aceea că** in calitate de anticorp monoclonal se administrează anticorpul monoclonal fibrino-specific.
- 15 6. Metodă, conform revendicării 5, **caracterizată prin aceea că** anticorpul monoclonal fibrino-specific este MH-1.
7. Metodă, conform revendicării 5, **caracterizată prin aceea că** complicațiile trombotice postchirurgicale constituie o urmare a angioplastiei.
- 20 8. Metodă, conform revendicării 5, **caracterizată prin aceea că** complicațiile trombotice postchirurgicale constituie o urmare a transplantării de organe.
9. Metodă de tratament al omului pentru reducerea riscului uman de complicații trombotice postchirurgicale, ce include administrarea unei doze eficiente de anticorp monoclonal, **caracterizată prin aceea că** in calitate de anticorp monoclonal se administrează un fragment sau derivat de anticorp monoclonal fibrino-specific, fragmentul sau derivatul conținând domeniul de legătură al anticorpului menționat.
- 25 10. Metodă, conform revendicării 9, **caracterizată prin aceea că** anticorpul monoclonal fibrino-specific este MH-1.
- 30 11. Metodă, conform revendicării 9, **caracterizată prin aceea că** complicațiile trombotice postchirurgicale constituie rezultatul angioplastiei.
12. Metodă, conform revendicării 9, **caracterizată prin aceea că** complicațiile trombotice postchirurgicale constituie rezultatul transplantării de organe.
13. Metodă de tratament al afecțiunilor trombotice vasculare, ce include administrarea unei doze eficiente de anticorp monoclonal, **caracterizată prin aceea că** in calitate de anticorp monoclonal se administrează anticorpul monoclonal fibrino-specific.
- 35 14. Metodă, conform revendicării 13, **caracterizată prin aceea că** anticorpul monoclonal fibrino-specific este MH-1.
- 40 15. Metodă, conform revendicării 13, **caracterizată prin aceea că** afecțiunea trombotică vasculară este ictusul.
16. Metodă, conform revendicării 13, **caracterizată prin aceea că** afecțiunea trombotică vasculară este embolia pulmonară.
17. Metodă, conform revendicării 13, **caracterizată prin aceea că** afecțiunea trombotică vasculară este tromboza venelor profunde.
- 45 18. Metodă, conform revendicării 13, **caracterizată prin aceea că** afecțiunea trombotică vasculară este tromboza arterială sau venoasă.
19. Metodă, conform revendicării 13, **caracterizată prin aceea că** afecțiunea trombotică vasculară este ateroscleroza.
- 50 20. Metodă de tratament al afecțiunilor trombotice vasculare, ce include administrarea unei doze eficiente de anticorp monoclonal, **caracterizată prin aceea că** in calitate de anticorp monoclonal se administrează un fragment sau derivat de anticorp monoclonal fibrino-specific, fragmentul sau derivatul conținând domeniul de legătură al anticorpului menționat.

## MD C2

11

21. Metodă, conform revendicării 20, **caracterizată prin aceea că** anticorpul monoclonal fibrino-specific este MH-1.

22. Metodă, conform revendicării 20, **caracterizată prin aceea că** afecțiunea trombotică vasculară este ictusul.

5 23. Metodă, conform revendicării 20, **caracterizată prin aceea că** afecțiunea trombotică vasculară este embolia pulmonară.

24. Metodă, conform revendicării 20, **caracterizată prin aceea că** afecțiunea trombotică vasculară este tromboza venelor profunde.

10 25. Metodă, conform revendicării 20, **caracterizată prin aceea că** afecțiunea trombotică vasculară este tromboza arterială sau venoasă.

26. Metodă, conform revendicării 20, **caracterizată prin aceea că** afecțiunea trombotică vasculară este ateroscleroza.

15 27. Compoziție farmaceutică, care conține anticorp monoclonal și purtător farmaceutic acceptabil, **caracterizată prin aceea că** în calitate de anticorp monoclonal se folosește anticorpul fibrino-specific neconjugat, iar compoziția menționată este în formă sterilă.

28. Compoziție farmaceutică, conform revendicării 27, **caracterizată prin aceea că** anticorpul monoclonal fibrino-specific este MH-1.

20 29. Compoziție farmaceutică, care conține anticorp monoclonal și purtător farmaceutic acceptabil, **caracterizată prin aceea că** în calitate de anticorp se folosește un fragment neconjugat sau un derivat de anticorp monoclonal fibrino-specific, fragmentul sau derivatul conținând domeniul de legătură al anticorpului menționat, compoziția menționată fiind în formă sterilă.

25 30. Compoziție farmaceutică, conform revendicării 29, **caracterizată prin aceea că** anticorpul monoclonal fibrino-specific este MH-1.

30 31. Trusă pentru tratarea omului, care necesită o inhibare a formării de trombi, ce include un anticorp monoclonal, **caracterizată prin aceea că** în calitate de anticorp monoclonal se folosește anticorp monoclonal fibrino-specific sau un fragment al acestuia, sau un derivat al acestuia, care conține domeniul de legătură al anticorpului menționat, fiind în formă sterilă.

32. Trusă, conform revendicării 31, **caracterizată prin aceea că** anticorpul monoclonal fibrino-specific este MH-1.

33. Trusă, conform revendicării 31, **caracterizată prin aceea că** opțional conține un purtător farmaceutic acceptabil și este în formă sterilă.

35 34. Trusă, conform revendicării 33, **caracterizată prin aceea că** anticorpul monoclonal fibrino-specific este MH-1.

40

**(56) Referințe bibliografice:** 1. The Merck Manual of Diagnostics and Therapy, 15<sup>th</sup> Ed., Merck Sharpe & Dohme Research Labs, 1987.

2. Gimple L. W. et al. Circulation, 1992, vol. 86, p. 1536-46.

3. ~~Wolfe A.P. et al. Eur. J. Nucl. Med., 1990, vol. 16, p. 887-91~~  
**Șef secție:** GREGORY Vesnelav

4. Bode C. et al. Science, 1985, vol. 229, 765-67.

**Examinator:** 5. Francis S.E. et al. Am. J Hem., 1985, vol. 18, p. 111-19.

6. US 4722903 A

**Redactor:** 7. US 4758524 A

## RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: 96-0334	(85) Data fazei naționale PCT: 21.02.1995
(22) Data depozit: 21.02.1995	(86) Cerere internațională PCT: PCT/US95/01825, 21.02.1995
(30) Priorități recunoscute :	
(31) nr.: 204,015 32) data : 24.02.1994 33) țara: :US	
(54) <b>Titlul</b> : Metode de inhibare a formării de trombi, metode de tratament al stărilor trombotice, compoziții farmaceutice și trusă pentru tratarea lor.	
Termeni caracteristici în limba română: anticorp monoclonal fibrino-specific	
II. D O C U M E N T A R E ÎN LITERATURA DE BREVETE DE INVENȚII	
Indicii clasificărilor de brevete :	
(51) Int. Cl. : A 61 K 39/00, 39/395, 49/00; C 07 K 16/18	
MD Perioada 1994-1999	Brevete: n-a fost selectat
	Cereri publicate: n-a fost selectat
	Cereri nepublicate: n-a fost selectat
	Certificate MU: n-a fost selectat
BEA Perioada:1996-1999	Brevete: n-a fost selectat
	Cereri: n-a fost selectat
	Rapoarte de documentare: n-a fost selectat
Data 23.09.1999	Examinator Timonin Alexandr