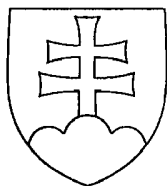


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

- (22) Dátum podania: 22.06.94
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 086 423
(32) Dátum priority: 02.07.93
(33) Krajina priority: US
(43) Dátum zverejnenia: 08.05.1996
(86) Číslo PCT: PCT/US94/07087, 22.06.94

(21) Číslo dokumentu:

5-96

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶ :

G 01N 33/53

(71) Prihlasovateľ: American Biogenetic Sciences, Inc., Copiague, NY, US;

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

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Spôsob in vitro dôkazu prítomnosti alebo stanovenia množstva rozpustných zosieťovaných De-sAABB fibrínových polymérov a súprava na uskutočnenie tohto spôsobu**

(57) Anotácia:
Spôsob prípravy monoklonálnych protilátok využíva imunizované sterilné zviera. Opísané sú tiež spôsoby použitia uvedených monoklonálnych protilátok, ako aj spôsoby použitia polyklonálnych protilátok, odvodených od imunizovaných sterilných zvierat, na klinickú diagnostiku in vitro a in vivo a na terapiu. Ďalej je opísaná monoklonálna protilátka, špecifická k fibrínu.

Spôsob in vitro dôkazu prítomnosti alebo stanovenia množstva rozpustných zosieťovaných DesAABB fibrínových polymérov a súprava na uskutočnenie tohto spôsobu

Oblasť vynálezu

Vynález sa týka spôsobu prípravy monoklonových protilátok. Spôsob využíva imunizované sterilné zviera. Vynález tiež zahrňuje spôsoby použitia uvedených monoklonových protilátok, ako aj spôsoby použitia polyklonových protilátok, odvodených od imunizovaných sterilných zvierat, na klinickú diagnostiku in vitro a in vivo a na terapiu. Vynález ďalej zahrňuje monoklonovú protilátku, špecifickú k fibrínu.

Doterajší stav techniky

Köhler a Milstein sa uznávajú za pôvodcov techník, ktoré úspešne viedli k vzniku prvých hybridómov, produkujúcich monoklonové protilátky (G. Köhler a C. Milstein, 1975, Nature 256, 495 až 497; 1976, Eur. J. Immunol., 6, 511 až 519). Fúziou buniek, vytvárajúcich protilátky (B-lymfocyty sleziny) s myelómovými bunkami (malignantné bunky primárnych nádorov kostnej drene) sa vytvára hybridná bunečná línia, vznikajúca z jedného fúzovaného bunkového hybridu (nazývaného hybridóm alebo klon). Podobne ako lymfocyty, aj hybridómy majú schopnosť sekretovať jeden druh imunoglobulínu; podobne ako myelómové bunky majú hybridómy schopnosť neobmedzeného delenia buniek. Spojenie týchto dvoch znakov ponúka určité výhody v porovnaní s bežnými antisérami.

Antiséra, odvodené od vakcinovaných zvierat sú rôzne zmesi polyklonových protilátok, ktoré sú neopakovateľné, nemôžu sa pripraviť vždy v tej istej kvalite. Monoklonové protilátky sú vysoko špecifické imunoglobulíny jedného typu. Jeden typ imunoglobulínov, sekretovaný hybridómom je špecifický k jednému, a len k jednému antigénovému determinantu alebo epitopu na antigene, čo je zložitá molekula, ktorá má viacej antigénnych determinantov. Ak je napríklad antigénom

proteín, antigénový determinant môže byť jedna z mnohých peptidových sekvencií (všeobecne v dĺžke 6 až 7 aminokyselín ; M.Z.Atassi, 1980, Molec. Cell. Biochem., 32, 21 až 43) z celej molekuly proteínu. Monoklonové protilátky, vznikajúce proti jednému antigénu sa potom môžu odlišovať jedna od druhej v závislosti od determinanta, ktorý vyvolal ich vznik; ale u ktoréhokoľvek daného hybridómu sú však všetky ním produkované protilátky rovnaké. Ďalej, bunková línia hybridómu sa ľahko množí in vitro alebo in vivo a poskytuje vynímočne vysoké koncentrácie protilátok.

Monoklonová protilátka sa môže použiť ako sonda na dôkaz jej antigénu. Tak sa monoklonové protilátky používajú v in vitro diagnostike, napríklad v rádioimunoanalýze a v enzýmovej adsorbentovej analýze (ELISA) a v in vivo diagnostike, napríklad v in vivo zobrazovaní s rádioktívne značenou monoklonovou protilátkou. Monoklonová protilátka sa môže využiť tiež ako nosič na zacielené dodanie liečiva k antigénu protilátky.

Avšak pred tým, ako sa monoklonová protilátka môže použiť na uvedené účely, je nevyhnutné zabezpečiť, aby monoklonová protilátka mala schopnosť väzby na vyžadovaný antigén, to znamená na terčový antigén. Dosiahne sa to triedením a výberom pripravených hybridómov, aby sa určilo, ktoré hybridómy, a či vôbec niektoré hybridómy, vytvárajú monoklonovú protilátku, ktorá je schopná väzby na terčový antigén. Tento postup vytriedovania je veľmi obťažný tým, že sa napríklad musia triediť možno tisícky monoklonových protilátok, kým sa zistí hybridóm, ktorý vytvára protilátku, schopnú väzby na terčový antigén. Z uvedeného vyplýva potreba takého spôsobu prípravy monoklonových protilátok, ktorý zvyšuje pravdepodobnosť, že určitý hybridóm bude vytvárať protilátku k terčovému antigénu.

Podstata vynálezu

V tomto vynáleze sa predkladá spôsob prípravy monoklonových protilátok k antigénu, zahrnujúci:

(a) imunizáciu sterilného zvieraťa uvedeným antigénom, čo dovoľí bunkám vytvárajúcim protilátku produkovať protilátku k uvedenému antigénu,

(b) odstránenie najmenej časti uvedených buniek, vytvárajúcich protilátku, z uvedeného sterilného zvieraťa,

(c) vytvorenie hybridómu fúziou jednej z uvedených buniek, vytvárajúcich protilátku, s nesmrteľnou bunkou, pričom uvedený hybridóm je schopný vytvárať monoklonovú protilátku k uvedenému antigénu,

(d) rozmnoženie uvedeného hybridómu a

(e) získanie monoklonovej protilátky, vytvorenej uvedeným hybridómom.

Vynález tiež zahŕňa spôsoby použitia monoklonovej protilátky alebo polyklonovej protilátky, získanej zo sterilného zvieraťa. Vynález tiež zahŕňa monoklonovú protilátku, špecifickú k fibrínu, a spôsoby využitia uvedenej monoklonovej protilátky.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Obrázok 1(A)

Stanovenie imunoreaktivity MH1 s DesAABB fibrínovým monomérom afinitnou chromatografiou.

Obrázok 1(B)

Porovnávací pokus na potvrdenie väzbovej schopnosti matrixu Sepharose - DesAABB fibrínový monomér za použitia fibrínogénovej špecifickej protilátky 45J.

Obrázok 2

Imunoreaktivita nezosieťovaných DesAABB fibrínových polymérov a zosieťovaných fibrínových polymérov v postupe in vitro s rozpustnými DesAABB fibrínovými polymérmi za použitia MH1.

Obrázok 3

Vznik DesAA fibrínu pôsobením batroxobínu na plazmový fibrinogén.

Obrázok 4

Imunoreaktivita rozpustných DesAA fibrínových polymérov v pokuse in vitro s rozpustnými DesAABB fibrínovými polymérmi za použitia MH1.

Obrázok 5

Imunoreaktivita MH1 protilátky s fibrinogénom, po jeho aktivovaní faktorom XIII (faktor XIIIa).

Obrázok 6

Sledovanie postupu vzniku rozpustného DesAABB fibrínového polyméru in vitro za použitia skúšky s rozpustným fibrínom - MH1.

Obrázok 7

Znázornenie čistenia rozpustného fibrínu z plazmy použitím kolóny Sepharose - MH1.

Obrázok 8

Stanovenie rozpustných DesAABB fibrínových polymérov v krvi pacientov s bolesťami v hrudníku a s potvrdeným infarktom myokardu.

Príklady uskutočnenia

Sterilné zviera

Tento vynález sa vzťahuje na použitie sterilného zvieraťa na prípravu monoklonových protilátok. Sterilné zvieratá sa po prvý raz vyvinuli na sklonku 19. storočia a široko sa používajú dodnes.

Sterilné zviera je gnotobiot, ktorý žije v prostredí bez akýchkoľvek predstaviteľných sprevádzajúcich foriem ži-

vota, vrátane baktérií, vírusov, húb, prvkov a ďalších saprofytických alebo parazitických foriem. Gnotobiot je zviera alebo kmeň odvodený aseptickým cisárskym rezom, alebo sterilným vysedením vajec, ktoré sú znášané a stále udržiavané sterilnou technikou v sterilných podmienkach izolátora a v ktorých zloženie sprevádzajúcej fauny a flóry, ak sú prítomné, je celkom definované v súčasnosti uznávanou metodológiou. (Treba poznamenať, že všetky myši sú nositeľkami latentných leukemogénových vírusov a preto sa myši v tomto vynáleze môžu považovať za sterilné napriek prítomnosti uvedených vírusov).

Úlohou sterilného systému je v zabezpečení zábran bariér proti vniknutiu nežiadúcej mikrobiálnej kontaminácie. Popri mechanických bariérach z plastov, kovu, gumy a skla, ktoré uzatvárajú zvieratá, systém vyžaduje pracovné bariéry filtrácie vzduchu, sterilizácie potravy a vody, manipuláciu v rukaviciach, čo tvorí neoddeliteľnú súčasť celej sústavy zábran. Vkladanie materiálov do izolátora sa tiež musí vykonávať za sterilných podmienok.

Je zrejmé, že podľa tohto vynálezu možno využiť akékoľvek sterilné zviera. Najbežnejšie sterilné zvieratá sú myš, ošípaná, krysa, králik, morča, kačka, ovca, primát a hydina. Uprednostňuje sa myš, osobitne myš Balb/C.

Príprava, ošetrovanie a chov sterilných zvierat

Príprave, ošetrovaniu a chovu sterilných zvierat sa venuje veľký počet publikácií. Napríklad Wostmann, B.S., Ed., Gnotobiotics Standards and Guidelines for the Breeding, Care and Management of Laboratory Animals, National Research Council, National Academy of Sciences, Washington, D.C. 1970); Coates, M.E., et al., The Germfree Animal in Research, Academic Press, London, 1968; a Pleasants, J.R., Gnotobiotics, in: Handbook of Laboratory Animals Science, Vol. 1, Melby, E.C., et al., Eds., CRC Press, Boca Raton, Fla., 117, (1974), ktorých zverejnenie je v tomto vynáleze zahrnuté odkazmi.

Nasleduje súhrn, odvodený z článku Wostmanna B.S., Ed.,

Gnobiotes: Standards and Guidelines for the Breeding, Care and Management of Laboratory Animals, National Research Council, National Academy of Sciences, Washington, D.C., ktorý opisuje prípravu, opateru a chov sterilných krýs a myší. Treba poznamenať, že uvedená príprava, chov a ošetrovanie sú podobné aj u iných druhov zvierat.

Prostredie v miestnosti

Vybavenie, zariadenie a chovateľské postupy treba tak navrhovať a vykonávať, aby sa zabezpečilo čo najlepšie ovládanie prostredia a pre zvieratá optimálne pohodlie a pohoda. Klietky, krmidla a napájadlá musia byť tak navrhnuté a zhotovené, aby potrava a voda boli ľahko dostupné a aby čistenie a sterilizácia boli ľahko prístupné a účinné.

Na extenzívnu sterilnú činnosť sú potrebné plochy:

1. pracovná plocha na zostavovanie a sterilizáciu izolátorov,
2. plocha na uchovávanie zvierat v izolátoroch a
3. laboratórna plocha na stálu kontrolu gnotobiotického prostredia.

Pracovňa a plocha na dietetickú prípravu by mali byť tiež zahrnuté v tejto zostave.

Prostredie miestnosti, v ktorej sú gnotobiotické izolátory, musí spĺňať normy stanovené na chov bežných laboratórnych hlodavcov. Stavba musí byť bez hmyzu, steny a dlážky musia byť chránené proti vlhkosti. Osvetlenie musí byť rovnomerné a s rovnakým cyklom svetlo - tma, ako sa mení v období dňa a roka. Vetrание musí odstrániť akékoľvek výpary, spôsobené chemickou sterilizáciou a klimatické podmienky sa musia kontrolovať tak, ako je uvedené ďalej.

Teplota. Všeobecne prípustná teplota miestnosti pre zvieratá 21 až 27°C môže vyžadovať malé zúženie intervalu tak, aby sa teplota izolátorov udržiavala medzi 22 až 26 °C.

Vlhkosť. Relatívna vlhkosť (RH) sa musí udržiavať na úrovni 40 až 60 %, vhodnej pre pohodu človeka. Ak sa však vzduch z miestnosti používa na vetranie izolátorov, odporúča sa relatívna vlhkosť 40 až 50 %.

Vetranie. Výmena vzduchu v miestnosti musí byť dostatočná na odstránenie akýchkoľvek výparov, vznikajúcich pri chemickej sterilizácii. Odporúča sa desať až pätnásť násobná výmena vzduchu za hodinu. V priestoroch musia byť dostupné celohlavové masky s vetraním čerstvým vzduchom na ochranu obsluhujúcich pracovníkov proti expozícii nebezpečnou hladinou koncentrácie chemických výparov.

Sterilné zariadenia

(Pozri Sacquiet, E., 1968, Equipment, Design and Management: General Technique of Maintaining Germ-free Animals, str. 1 až 22, in: M.E. Coates, Ed., The Germfree Animals in Research, Academic Press, London; Trexler, P.C., 1968, Equipment Design and Management: Transport of Germ-free Animals and Current Developments in Equipment Design, str. 23 až 35, in: M.E. Coates, Ed., The Germfree Animals in Research, Academic Press, London).

Úplné vylúčenie mikróbov z prostredia vyžaduje absolútne zábrany bariéry. Úspešná činnosť izolátora závisí od nepretržitého udržiavania bariéry. Všeobecne sú dostupné dva typy izolátorov, kovové a plastové. Niektoré kovové jednotky sa stavajú tak, aby vydržali vnútorný tlak vodnej pary 0,1406 MPa (20 psi). (Pozri Reyniers, J. A., 1959, Konštrukcia a činnosť na chov sterilných zvierat, Ann.N.Y. Acad. Sci., 78:47; Miyakawa, M., 1959: The Miyakawa Remote-control Germfree Rearing Unit, Ann. N.Y. Acad.Sci. 78:37). Iné sterilizátory sa vo všeobecnosti umiestňujú do veľkého autoklávu na počiatočnú sterilizáciu (pozri Gustafsson, B.E., 1959, Lightweight Stainless Systems for Rearing Germ-free Animals, Ann. N.Y. Acad.Sci., 78:17).

V súčasnosti najviac používanou jednotkou je izolátor z pružnej fólie (pozri Trexler, P.,C., L.I. Reynolds, 1957, Flexible Film Apparatus for the Rearing and Use of Germfree Animals, Appl. Microbiol., 5:406). Zvyčajne je vyrobený z pružného laminovaného vinylu, musí sa chemicky sterilizovať a je snadno prispôsobiteľný na určitý účel. Iný typ, vyrobený z veľkých nylonových rukávco, uzavretých na oboch

koncoch, možno sterilizovať v autokláve. (Pozri Lev, M., 1962, An Autoclavable Plastic Unit for Rearing Animals under Germfree Conditions, J.Appl.Bacteriol. 25:30). Vyvinuli sa tiež izolátory z plexi skla a jednorázové izolačné jednotky z pružnej fólie. Mnohé z nich sú také ľahké, že sa môžu ukladať dva alebo tri na policu, čo znamená úsporu priestorov.

Na sterilizáciu potravy a doplnkov do izolátorov citlivých na teplo sa všeobecne používa špeciálny valec. Musí sa konštruovať s veľkou filtračnou plochou, aby umožňoval odťah vzduchu vo vysokovákuovom sterilizátore (Pozri Trexler, P.C., 1963, An Isolator System for control of contamination, Lab. Anim. Care 13:572). Na valec sa môže alternatívne pripojiť odvodná hadica, vetraná do atmosféry; slúži na odstránenie vzduchu a kondenzácie v priebehu sterilizácie bez výhody použitia vákua (Pozri Jaworski, N.E., a C.E. Miller, 1963, Refinement of The Cylinder Techniques for Supplying Germfree Isolators, Lab. Anim. Care 13:591).

Sterilizácia

Všetky zariadenia, potrava, podstielka, voda a vzduch použitý do izolátorov musia byť absolútne sterilné. Spôsob a použité podmienky sú určované charakterom jednotlivých prípadov.

Tlaková para je najlepší známy spôsob sterilizácie. Je osobitne vhodná na pórovité predmety, ktoré sú tepelne stáله. Každá plocha, na ktorej sa môžu kotviť mikróby, sa musí priviesť do priameho styku s parou. Expozičný čas je vo vzťahu k teplote použitej pary. Odporúča sa, aby najhoršie prístupná časť vsádzky (stred balenia) bola vystavená účinku vodnej pary minimálne po dobu 15 minút pri 121°C. Vyššie teploty a kratšie expozície sa môžu použiť až po starostlivom vyskúšaní a zabezpečení sterilnosti. Štandardné veľkosti balenia a hustota diét, podstielky a ďalších látok majú základný význam pre nadobudnutie istoty, že preniknutie parou bude vždy rovnaké a predpokladateľné.

Na sterilizáciu vzduchu, dodávaného do izolátora sa

používa suché teplo (pozri: Miyakawa, M., 1959, The Miyakawa Remote-control Germfree Rearing Unit, Ann. N.Y. Acad.Sci. 78:37; pozri Gustafsson, B.E., 1959, Lighweight Stainless Systems for Rearing Germ-free Animals, Ann. N.Y. Acad.Sci., 78:17).

Na sterilizáciu nepórovitých materiálov, citlivých na teplo, osobitne na pružné fóliové jednotky sa používa najmä kyselina peroctová (CH_3COOOH). Uvedená kyselina sa používa vo forme 2 %-ného roztoku spolu so zmáčadlom (tenzidom) (pozri Trexler, L.I. Reynolds, 1957, Flexible Film Apparatus for the Rearing and Use of Germfree Animals, Appl. Microbiol., 5:406). V určitých situáciách možno použiť iné chemikálie, napríklad chlórnaný, jódoform, alebo kvartérne amóniové zlúčeniny v tekutom stave na novorodencov privedených hysterektómiou, alebo chlorid ortuťnatý, na uloženie vajec za sterilných podmienok pred vysedením.

Na sterilizáciu nezmáčateľných a na teplo citlivých predmetov sa môže použiť etylénoxid (ETO). Sterilizačná doba závisí od teploty, vlhkosti, tlaku a koncentrácie ETO. ETO môže chemicky reagovať s podstielkou a dietetickými zložkami za vzniku jedovatých alebo nežiadúcich zlúčenín. Pre horľavosť ETO a jeho jedovatosť sa používanie ETO na sterilizáciu obmedzuje na komerčne dostupné plynné zmesi, ktoré obsahujú nie viac ako 20 % ETO.

Na sterilizáciu dodávaného vzduchu sa bežne používajú filtre zo sklenených vlákien. Musia účinkovať ako absolútne filtre.

Aby sa mohla vynechať tepelná expozícia kvapalín, môže sa používať membránová filtrácia, ale za predpokladu, že membrány sú absolútne filtre, napríklad také filtre, ktoré oddelujú častice s priemerom väčším ako 0,22 mikrometra.

Na sterilizáciu diét a v ďalších špeciálnych prípadoch možno použiť ožiarenie gamma lúčmi alebo elektrónovými lúčmi. Používajú sa rôzne dávky od 2,5 do $6 \cdot 10^6$ rad.

Vnútorne prostredie

Teplota. Vnútorne teplota izolátora je funkciou teploty

miestnosti a musí sa udržiavať medzi 22 a 26°C.

Vlhkosť. Pri preťažení izolátora a/alebo pri nezodpovedajúcej ventilácii môže v izolátore nastať kondenzácia vlhkosti. Do izolátora vstupujúci vzduch musí mať menej ako 50 % RH a prednostne viac ako 40 % RH.

Prívod vzduchu. Výmena vzduchu v izolátore sa musí uskutočniť 12 až 20 krát za hodinu a vzduch musí mať pretlak 80 až 130 mm (3 až 5 palcov) vodného stĺpca. Vzduch sa môže privádzať z centrálného zdroja, alebo z jednotlivých dúchadiel každej jednotky. Pre centrálny systém dodávky vzduchu sa odporúča vzduchový kompresor turbínového typu, pretože systémy s olejovým piestom spravidla spôsobujú rozprašovanie oleja do vzduchových rozvodov.

Vzduchový difúzny izolátor (pozri Trexler, P.C., 1968, Equipment design and management: Transport of germ-free animals and current developments in equipment design, str. 23 až 35, in: M.E. Coates, Ed., The germfree animals in research, Academic Press, London) neprerušuje ventiláciu ani pri výpadku elektrickej energie. Tento typ však má nevýhodu nižšieho počtu výmen vzduchu za hodinu a neprítomnosti ochranného pretlaku, ktorý by napomáhal zabrániť kontaminácii pri malých poškodeniach bariér.

Ochrana v nebezpečí. V priebehu nie viac ako niekoľkých minút musí byť v izolátore vhodne zabezpečený tlak vzduchu v prípade výpadku elektrickej siete, alebo mechanickej poruchy. Splasnutie nevystužených fóliových izolátorov môže prípadne vyústiť do udusenia zvierat, ale okamžité nebezpečie je viac v tom, že zvieratá sú schopné dosiahnuť a poškodiť fóliu alebo rukavice. Tomu sa môže dočasne zabrániť zatvorením vzduchovodov gumennými zátkami. Prevádzka zdrojov vzduchu jednotlivých izolátorov vyžaduje havarijný náhradný zdroj energie. Centrálny vzduchový systém musí mať druhý turbínový kompresor ako náhradný zdroj vzduchu.

Odporúča sa grafické zaznamenávanie teploty a tlaku. V centrálnom vzduchovom systéme musí byť vstavaný audiovizuálny poplachový systém, ktorý sa uvedie do činnosti pri poklese tlaku vzduchu v dôsledku prerušenia prívodu energie

alebo pri mechanickej poruche. Podobné výstražné systémy musia signalizovať nežiadúce zmeny teploty dodávaného vzduchu. V systéme izolátorov s jednotlivými zdrojmi vzduchu sa odporúča vybavenie s nepretržitým grafickým záznamom stavu prostredia v miestnosti.

Klietka a vnútorné vybavenie

Vybavenie. Základný zoznam vybavenia izolátora môže zahŕňať klietku s bezpečnostným príklopom, nádobu na vodu a nádobu na potravu, ochranné textilné rukavice, čo sa týka gumenných rukavíc, osobitný košík na dvierka alebo uzatvárací prstenec, dlhé lekárske kliešte s gumennými hrotmi, hemostaty, nožnice a uterák, gázový tampón, asi dvojlitrovú nádobu na veterinárne náradie, zakrytú asi 4 litrovú nádobu na diétu, lyžicu, kultivačné trubičky, papierové sáčky a vlhkosti odolné sáčky na použitú podstielku.

Klietky musia byť vyrobené z hladkého a korózii odolného materiálu. Nesmú prepúšťať tekutiny a musia sa ľahko sterilizovať. Za prípustné materiály sa považujú plasty, nehrdzavejúca oceľ a sklo. Galvanizované kovy časom korodujú a neodporúčajú sa, nakoľko stopové kontaminácie kovmi môžu ovplyvniť výsledky pokusov.

Rozmery klietok sú zvyčajne obmedzené veľkosťou vchodu. Najmenšia plocha pre samičku myši a odpadky je 970 cm^2 (50 in^2). Za rôznych okolností bude na jedno zviera treba väčšiu plochu.

V Tabuľke 1 sa uvádza odporúčaná pôdorysná plocha na zviera u myši a krýs podľa hmotnostných skupín.

Tabuľka 1

Veľkosť podlahovej plochy, odporúčanej na 1 zviera pri chovaní myši a krýs v kletke

Kategória číslo	Hmotnosť (g)	Plocha na zviera cm ²	Max. populácia v 1 kletke
Myši			
1	do 10	40	40
2	10 až 15	50	30
3	15 až 25	75	20
4	nad 25	95	16
Krasy			
1	do 50	95	50
2	50 až 100	110	50
3	100 až 150	125	40
4	150 až 200	150	40
5	200 až 300	185	30
6	nad 300	260	25

Rôzne odporúčania

Na zabezpečenie tesnosti bariérového systému sa odporúčajú kontrolné skúšky s použitím freónu.

Každá jednotka má byť vybavená vlastným pracovným záznamom na chronologický záznam každého postupu, vykonaného v tejto jednotke, počínajúc zostavením jednotky a sterilizáciou. Takéto záznamy sa pohodlne uchovávajú na známych nemocničných kovových držiakoch, označených číslom príslušnej jednotky. Mali by tiež obsahovať poznámky o bežnej údržbe, napríklad o výmene rukavíc. V rovnakom držiaku sa môžu uchovávať aj záznamy o množení.

V dôsledku obmedzeného vnútorného priestoru izolátorov sa na stravu a podstielku odporúčajú papierové a skladacie nádoby. Rovnaký materiál sa odporúča na premiestňovanie zvierat medzi izolátormi, spojenými sterilným priechodom.

Vo vnútri izolátora sa nesmie používať éter, pretože účinkom statickej iskry môže vybuchnúť.

Ako prchavé a nehorľavé anestetikum sa odporúča Fluothan (brómchlórtrifluóretán).

Výživa, podstielka a voda

Pri komerčne vyrábanej potrave sa musí udávať jej úplné zloženie, v ktorom sú uvedené všetky prísady a ich koncentrácie, vrátane konzervačných látok, antioxidantov a ďalších prísad. Vyznačenie dátumu výroby musí byť zreteľné. Výrobca musí zaručovať, že potrava:

1. má prirodzene sa vyskytujúcu aktivitu hormónov iba v rámci bežných prípustných obmedzení,
2. neobsahuje prísady obsahujúce liečiva, hormóny, antibiotika, alebo iné látky, ktoré môžu vytvárať nenormálne fyziologické podmienky, alebo ktoré môžu ovplyvňovať výskumné postupy,
3. neobsahuje salmonely, čo sa preukazuje na základe štatisticky vybraných vzoriek,
4. nie je kontaminovaná hlodavcami a hmyzom,
5. neobsahuje neupravené kúsky mäsa, alebo mäso rýb, ktoré môže obsahovať patogény.

Obohatenie výživy

Výživa sterilných zvierat musí obsahovať viac ako sú bežné nároky určitých nutrientov preto, aby sa vyrovnali straty vitamínov sterilizovaním (osobitne určité vitamíny B, A a D) a pokles nutričnej hodnoty proteínu (zníženie dostupného lyzínu, metionínu, arginínu a tryptofánu). Potrava musí tiež obsahovať zložky, ktoré sú v bežných zvieratách vytvárané mikrobiálnou syntézou v gastrointestinálnom trakte (pozri Reddy, B.S., B.S. Vostmann a J.R. Pleasants, 1968, Nutritionally adequate Diets for Germ-free Animals, str. 87 až 111, in: M. E. Coates (Ed.), The Germfree Animal in Research, Academic Press, London). Príkladom uvedených diét je L-485, nie drahá diéta, ktorá sa široko skúšala (pozri Kellog, T.F., a B.S. Vostmann, 1969, Rat and Mouse Stock Diet L-485, Lab. Anim. Care) a môže sa komerčne vyrábať (pozri Tabuľku 2).

Na vyrovnanie poklesu kvality proteínov je vhodnejšie dopĺňovanie určitými aminokyselinami, ako zvyšovanie celkového obsahu proteínov. Zvýšenie celkového obsahu proteínov

v potrave vedie k väčšiemu príjmu potravy a vylučovaniu vody, čo spôsobuje navlhnutie prostredia a potom možno v izolátore určitej veľkosti chovať iba obmedzený počet zvierat.

Tabuľka 2

Zloženie diety L - 485 pre krysy a myši

Zložka diety	Množstvo na 1 kg
Diéta	
mleté žlté zrná kukurice	590 g
sojová múka (50 % surových proteínov)	300
Vojtešková (Alfalfa) múka	35
Kukuričný olej (raz rafinovaný)	30
NaCl	10
CaHPO ₄ · 2 H ₂ O	10
CaCO ₃	5
Lyzín (v potravinárskej kvalite)	5
Metionín (v potravinárskej kvalite)	5
BHT (butylovaný hydroxytoluén)	0,125
zmes stopových minerálov	0,25
Vitamínová zmes	
A	26.000 IU
D ₃	1.000 IU
E (tokoferolacetát)	225 mg
K ₃ (menadión)	90
Riboflavín	30
Kyselina pantoténová	285
Niacín	65
Chlorid cholínu	2.000
B ₁₂ (0,1 %-ný, rozotretý v manitole)	2
Hydrochlorid tiamínu	65
Hydrochlorid pyridoxínu	20
Kyselina listová	10
Kyselina p-aminobenzoová	50
Zmes stopových minerálov (komerčná)	
Mn ako oxid mangánatý	65 mg
Fe ako uhličitan železnatý	20
Cu ako oxidy medi	2
Zn ako oxid zinočnatý	15
I ako jodid draselný	1,5
Co ako uhličitan kobaltnatý	0,6

Sterilizácia vodnou parou

(Pozri Reddy, B.S., B.S. Wostmann a J.R. Pleasants, 1968, Nutritionally adequate Diets for Germ-free Animals, str. 87 až 111, in: M. E. Coates (Ed.), The Germfree Animal in Research, Academic Press, London). Použitý postup bude závisieť od prístrojového vybavenia. Všeobecnú dôležitosť majú tri faktory:

1. Pre-sterilizačné vákuum najmenej asi 510 mm Hg (20 in. Hg) všade, kde je to možné. Pre-sterilizačné vákuum napomáha prenikaniu pary k potrave vo valci, vyústenom do atmosféry. Ak valec s potravou nie je vyvedený do atmosféry, odporúča sa použiť vákuum asi 710 mm Hg (28 in. Hg), alebo ešte väčšie.

2. Použitie čo najkratšej fázy sterilizácie, ktorá zabezpečí úplnú sterilnosť spolu s bezpečnosťou, určenou zariadením a skúsenosťou obsluhy. Teploty sa merajú vo vnútri potravy a musia dosiahnuť najmenej 121 °C. Pri tejto teplote bude skutočná sterilizačná fáza trvať minimálne 15 minút. Pri vyšších sterilizačných teplotách bude doba sterilizácie úmerne kratšia.

3. Po-sterilizačné vákuum urýchli pokles teploty potravy. Tým sa predíde zbytočnému tepelnému znehodnoteniu zložiek potravy. Konštrukcia a činnosť zariadenia musia byť primerané tak, aby sa zabránilo netesnostiam v priebehu tejto pracovnej operácie.

Pri sterilizácii potravy je cieľom predísť neúplnej sterilizácii, ale aj súčasne zbytočnému znehodnoteniu, spôsobovanému neúmerne predĺženým ohrevom. Hoci sa určitému poklesu nutričných zložiek nedá zabrániť, celkom dobré výsledky sa môžu dosiahnuť nastavením podmienok:

(a) nastavenie technických parametrov ako je teplota, doba a vákuum pre-sterilizácie a po-sterilizácie, veľkosť tabliet.

(b) obsahu vody v potrave. Zvýšenie obsahu vody vedie k lepšiemu využitiu B vitamínov po sterilizácii (pozri Zimmerman, D.R. a B.S. Wostmann, 1963, Vitamin Stability in Diets Sterilized for Germfree Animals, J. Nutr. 79:318).

U tuhých diét sa odporúča obsah vody do 25 %, alebo tak vysoký, aký sa skúsmo určí, aby neovplyvňoval akosť potravy pri skladovaní. Zmeny obsahu vody v potrave vyžadujú vykonanie nových skúšok rýchlosti ohrevu, pri ktorej potrava dosiahne sterilizačnú teplotu.

Radiačná sterilizácia

(Pozri Reddy, B.S., B.S. Wostmann a J.R. Pleasants, 1968, Nutritionally adequate diets for germ-free animals, str. 87 až 111, in: M. E. Coates (Ed.), The germfree animal in research, Academic Press, London); Ley, F.J., J. Bleby, M.E. Coates a J.S. Peterson, 1969, Sterilization of laboratory animals diets using gamma radiation, Lab. Anim. 3:221).

Techniky sterilizácie a dozimetria závisia od zariadenia a druhu rediácie. Napriek tomu, že sa radiačná sterilizácia vo všeobecnosti považuje za menej deštrukčnú voči zložkám výživy ako sterilizácia teplom, v súčasnosti sa odporúča aby sa potrava sterilizovala vodnou parou.

Skúšky sterilnosti

Na sústavnú kontrolu sterilnosti pri použití ktoréhokoľvek sterilizačného postupu sa odporúča použitie prúžkov so spórmi *Bacillus stearothermophilus*. Prúžky sa vložia do vnútra potravy. Potom sa izolátor a v ňom umiestené zvieratá mikrobiologicky kontrolujú. Takáto sústavná kontrola je nutná na kontrolu prípadnej havárijnej kontaminácie, spôsobenej porušením bariér izolátora, alebo nesprávne vedenou sterilizáciou izolátora a jeho obsahu. Kontrola sa môže vykonávať tak, ako sa opisuje v Wostmann, B.S., Ed., Gnotobiotics: Standards and Guidelines for the Breeding Care and Management of Laboratory Animals, National Research Council, National Academy of Sciences, Washington, D.C., 1970, str. 28 až 39).

Určenie nutričných strát sterilizáciou

Ako zvyčajná skúška na straty životne dôležitých nu-

tričných zložiek sa odporúča stanovenie kyselinou extrahovateľného tiamínu, ako indikátora využitia tiamínu, pridaného k potrave (pozri Wostmann, B.S. a P.L. Knight, 1960, The effect of methyl alcohol on the conversion of thiamine to thiochrome, *Experientia* 16:500). Zachovanie menej ako 25 % extrahovateľného tiamínu poukazuje na vážne zníženie nutričnej hodnoty potravy. S vhodným zariadením a starostlivosťou sa môže dosiahnuť zachovanie 50 % a vyššie.

Skladovanie tuhej výživy

Pokusy so sterilnými zvieratami sú vo všeobecnosti veľmi drahé a preto sa musí zabezpečiť, aby sa nikdy nepoužila výživa s významne zníženou nutričnou hodnotou. Odporúča sa, aby (a) nesterilizovaná potrava sa vždy uchovávala v mrazničke a nikdy nie dlhšie ako 1 mesiac, a aby (b) doba uchovávanía sterilizovanej potravy vo vnútri izolátora bola jeden týždeň, alebo menej, a nesmie byť nikdy dlhšia ako 10 dní.

Podstielka

Podstielka sa má meniť najmenej raz za týždeň. Odporúča sa, aby podstielkový materiál bol ľahko sterilizovateľný a aby ho zvieratá veľmi nepojedali. Pri sterilizácii podstielkového materiálu sa nesmú vytvárať jedovaté zlúčeniny. Odporúča sa podstielka z borovicových (*Pinus strobus*) pilín a hoblín; prípustné sú aj lipové a topoľové hobliny, alebo drvené kukuričné palice. Kremelinové výrobky, céder, živičné a tvrdé dreva sa neodporúčajú. Sterilizácia etylénoxidom by sa nemala používať, kým sa nevyjasní otázka možného vzniku škodlivých zlúčenín.

Voda

Pitná voda sa musí sterilizovať. Môže sa autoklávovať v štvorhranných fľašiach, Masonových nádobách alebo v nádržiach, spojených s jednotkou. V každom zásobníku sa má nechať malý priestor pre vzduch.

Základy oddelenia gnotobiontov cisárskym rezom

Úspešnosť každej operácie cisárskym rezom je čiastočne založená na tom, aby tehotenstvo pokročilo k záverečnému termínu. To je osobitne významné u zvierat s krátkym gestačným obdobím, kde plod môže pribrať v posledných 24 hodinách pred pôrodom až 20 % svojej hmotnosti. Časované párenie je zväčša úspešné, ale u zvierat s veľkými vrhmi (krysy a myši) môže byť užitočné pred zahájením uvedenej operácie počkať, až samica donesie prvého potomka. U morčiat je najvýhodnejší spôsob vybrať pre operáciu samice meraním rozšírenia, rozostupu panvových kostí (pozri Philips, B.P., P.A. Wolfe a H.A. Gordon, 1959, Studies on rearing the guinea pig germfree, Ann. N.Y. Acad. Sci., 78:183).

Cisárskym rezom privedené mláďa sa musí pred prvým nádychnutím vložiť do sterilného prostredia. Môžu sa priamo vybrať z matky hysteroktómiou cez rozrezanú sterilnú bariérovú fóliu a dať do sterilného izolátora, alebo hysteroktómiou cez germicidný uzáver sterilného izolátora. Zvyčajná chirurgická príprava samičky pred cisárskym rezom zahrňuje odstránenie obdominálneho ochlpenia a vyčistenie a dezinfekciu operovaného miesta. Znecitlivenie sa prednostne vykonáva dislokáciou krčných stavcov u krys a myší, hoci sa môže bez spôsobenia vážnej úrovne smrteľnej depresie a úmrtnosti použiť tiež celková alebo miestna abdominálna stredná anestézia. U morčiat sa zásah všeobecne vykonáva po podaní utišujúcich liekov a s miestnym znecitlivením.

Privedenie mláďaťa hysteroktómiou cez beriérovú membránu vyžaduje špeciálne vybavenie izolátora. Reyniersova chirurgická jednotka z nehrdzavejúcej ocele (pozri Reyniers, J.A., 1965, Germfree Life methodology (gnotobiotics) and experimental nutrition, str. 458 až 466, in: Proc. 3rd Internat. Congr. Biochem., Bruxelles) má vstavanú horizontálnu kovovú prepážku, ktorá oddeluje vrchný a spodný oddiel jednotky. Prepážka má kruhový otvor, prekrytý mylarovou plastovou fóliou na udržanie integrity horného oddielu. Samička, pripravená na chirurgický zákrok sa umiestni do spodného oddielu s abdomenom tlačným proti mylarovej fólii.

Všetky chirurgické nástroje sú v hornom oddieli a zákrok sa vykoná v tomto sterilnom poli. Rez sa vedie cez plast a kožu elektrokauteriou alebo skalpelom. Na rez kože sa uprednostňuje samosterilizujúci sa elektrokauteriový nož. Okraje kože a mylaru sa spolu zovrú svorkami. Sterilná gáza sa položí na obdomen tak, aby zakryla okraje rezu kože a použije sa teplý dezinfektant (chlorid benzalkónia 1:1 000) na exponovaný pruh pred otvorením zadnej dutiny. Osobitná pozornosť a opatrnosť sa musí venovať tomu, aby sa rezom nepoškodili vnútornosti. Môže byť užitočné vloženie lekárskeho kliešti alebo hemostatu medzi peritoneálnu stenu a vnútornosti. Potom sa otvorí maternica a vyjme sa mláďa. Plodové blany sa odstránia a pupočná šnúra sa zasvorkuje a oddelí. Mláďa sa rýchlo osuší a masíruje sa, aby sa podnietilo dýchanie. Potom sa premiestni do zadnej jednotky na opateru. Ďalšia časť mylaru sa môže upevniť cez kruhový chirurgický otvor a postup so samičkami sa môže opakovať 5 až 6 krát bez vážneho rizika kontaminácie. Cisársky rez sa môže tiež vykonať s použitím plastového izolátora alebo rukávu ako chirurgickej jednotky. Vonkajší povrch dlážky izolátora sa pre-sterilizuje a pritlačí sa na brucho zvieraťa a teda slúži na rovnaký účel ako fólia mylaru, ako je uvedené hore. Po operácii sa štrbina v plastovej bariére uzatvorí sterilnou páskou a chirurgický zákrok sa opakuje na ďalšej gravidnej samičke.

Na privedenie mláďaťa hysteroktómiou sa bežnejšie využívajú plastové izolátory (pozri Foster, H., 1959, A Procedure for obtaining nucleus stock for a pathogen-free animal colony, Lab. Anim. Care 9:135). Asepticky sa obnaží maternica a tesne pri krčku sa ventrálne zovrie svorkami. Vybraná maternica sa preniesie do sterilnej jednotky cez kvapalinový germicídny uzáver. Ihneď po prenesení do izolátora sa mláďa vyjme tak rýchlo ako je to len možné, aby sa zabránilo vdychnutiu plodovej vody. Bežne sa osuší a dýcha pred zasvorkovaním a oddelením pupočnej šnúry. Mláďa sa potom dá na krmenie matke alebo sa chová ručne.

Histeroectómia sa môže úspešne použiť u myší, krýs

a ošípaných. U morčiat sa však uprednostňuje hysterektómia, nakoľko nastáva veľká úmrtnosť, ak uplynie viac ako dve minúty medzi oddelením krvného obehu matky a vyňatím vo vnútri izolátora.

Systémy rozmnožovania gnotobiotických kolónií

Pokrvné rody

Rozmnožovanie systémom kríženia brat - sestra, používané pri bežnom rozmnožovaní, sa môže využívať aj v gnotobiotických kolóniách.

Nepokrvný chov

Pravé ľubovoľné kríženie zahrňuje aj niekoľko krížení nevlastných súrodencov a prvých príbuzných. Hoci sa v nepokrvných chovoch takému kríženiu vyhýbame, výsledný systém kríženia neznižuje podiel príbuzenského kríženia na minimum. Môže sa využiť akýkoľvek systém s minimálnou pokrvnosťou (pozri Falconer, D.C., 1967, Genetic aspects of breeding methods, str. 72 až 76, in: The UFAQ handbook on the care and management of laboratory animals, 3rd ed., E. a S. Livingstone, Ltd., London; National Research Council, Institute for Laboratory Animal Resources, 1969, A guide to genetic standards for laboratory animals, National Academy of Science, Washington, D.C.).

Porovnávateľné bežné a gnotobiotické kolónie

Ak sa vyžaduje chovať bežné a gnotobiotické kolónie za účelom ich porovnávania, potom sa môže zabezpečiť ich vzájomne podobná genetická skladba používaním cisárskeho rezu pri vrhoch zo skutočne rozmnožovanej populácie bežnej kolónie aj do gnotobiotickej kolónie. Tento spôsob sa javí ako vhodný pre takých chovateľov, ktorí kladú dôraz viac na ne-gnotobiotické krysy a myši, ale majú nevýhodu, že sa zabráňuje vytvoreniu mikrobiologickému rodokmeňu, ktorý by zjednodušoval mikrobiologické priebežné sledovania. Ideálne by sa toto mohlo urobiť použitím vrhov z určitých krížení

ako chovateľského základu pre bežnú kolóniu, a použitím ďalších vrhov z každého z uvedených krížení, ako chovateľského základu pre gnotobiotickú kolóniu. Ak sa tento postup vykonáva v každej druhej alebo tretej generácii, potom sa genetická skladba oboch kolónií stáva veľmi podobná, samozrejme za predpokladu, že sa použije rovnaký systém kríženia v každej z kolónií.

Alternatívne sa môžu použiť vrhy z určitej množenej populácie gnotobiotickej kolónie na vytvorenie alebo náhradu bežnej kolónie. Genetické dôsledky budú rovnaké za predpokladu, že sa použijú rovnaké postupy.

Vedenie záznamu

(Pozri Wolff, G.L., 1967, Practical mating systems and record-keeping in a breeding colony, str. 97 až 113, in: The UFAW Handbook on the care and management of laboratory animals, 3rd. ed., E. and S. Livingstone, Ltd., London).

O zvieratách a údržbe izolátora sa musia viesť vhodné záznamy. Záznamy o zvieratách musia vyjadrovať účinnosť operácie a biologický stav zvierat. Zo záznamov o izolátoroch musí byť zrejmá časová postupnosť skutočností, ktoré sa vzťahujú k izolátoru, aby napomáhali pri hľadaní porušenia bariéry, ak sa zistí kontaminácia.

Bezantigénové zviera

V prednostnom uskutočnení tohto vynálezu sa uprednostňuje chov sterilného zvieraťa na chemicky definovanej (CD), vo vode rozpustnej, ultrafiltrovannej diéte s nízkou molekulovou hmotnosťou. Taká diéta je považovaná za diétu, ktorá umožňuje dosiahnuť plnú kontrolu príjmu výživy a príjmu antigénu zvieraťom. Uvedená diéta sa vo všeobecnosti vyrába celá zo zložiek, ktoré možno chemicky definovať, napríklad z aminokyselín, jednoduchých cukrov, tukov, vitamínov a minerálov. Na účely podľa tohto vynálezu chemicky definovaná diéta obsahuje aminokyseliny, jednoduché cukry, tuky, vitamíny a minerálne látky a nijaké iné zložky s molekulovou hmotnosťou väčšou ako 10.000 Daltonov. Potom všetky zložky

chemicky definovateľnej diéty majú nízku molekulovú hmotnosť a sú prirodzene cirkulujúcimi zložkami výživy zvierata. Preto sa predpokladá, že uvedené zložky CD diéty neprispievajú k imunitnej odozve. Súčasná literatúra označuje zviera, ktoré je chované na CD diéte ako "bezantigénové zviera".

Uprednostňuje sa tiež použitie filtračného papiera na podstielku, lebo ináč sterilné zvieratá konzumujú podstielku, čo by mohlo vyústiť do imunitnej odozvy. Konzumácia podstielky z filtračného papiera sa nepovažuje za príčinu imunitnej odozvy.

V osobitných CD diétach pre určité druhy sa použijú uvedené zložky v takých pomeroch a množstvách, aby spĺňali známe nutričné potreby týchto druhov. Zloženie a príprava uprednostnených diét pre sterilné zvieratá sa uvádza v ďalšom texte.

Tabuľka 3

Zloženie a príprava chemicky definovanej diéty
L 489E14Se

Zložka	Množstvo zložky v gramoch v 100 g prísad
K 192 ml Milli-Q vody pri 70 °C sa pridá:	
Leucín	1,9
Fenylalanín	0,74
Izoleucín	1,08
Metionín	1,06
Tryptofán	0,37
Valín	1,23
Asparagín	0,91
Hydrochlorid araganínu	0,81
Treonín	0,74
Hydrochlorid lyzínu	1,77
Hydrochlorid histidínu	0,74
Roztok sa ochladí na 45 °C a pridá sa:	
Glycín	0,59
Prolín	1,48
Serín	1,33
Alanín	0,59
Glutamát sodný	3,40
Hydrochlorid etylesteru L-tyrozínu	0,62
Glukonát železnatý	0,05
Soli 35D ¹	0,105
Seleničitan sodný	0,074
Roztok sa ochladí na 5 °C a pridá sa:	
Glycerofosfát vápenatý	5,22
Glycerofosfát horečnatý	1,43
CaCl ₂ .2 H ₂ O	0,185
Zmes chloridu sodného a jodidu draselného (obsahujúca 680 mg KI)	0,086
Vitamínová zmes vitamínu B, zmes 111E5 ³	0,09
Vitamín B12 ⁴	1,20 mg
Octan draselný	1,85
K 108 ml Milli-Q vody sa pridá pri 70 °C	
D-dextróza, bezvodá	71,28
Roztoky sa ochladia na 5 °C a spoja sa na ultrafiltráciu.	

¹Zloženie zmesi solí 35D je uvedené v Tabuľke 7

²Pridané navyiac k prídavku seleničitanu sodného v zmesi solí 35D

³Zloženie vitamínovej zmesi B 111E5 sa uvádza v Tabuľke 8

⁴Pridané navyiac k vitamínu B-12, obsiahnutom vo vitamínovej zmesi 111E5 (pozri ďalej uvedenú časť príklady).

Touto zmesou sa krmili myši alebo krysy ad libitum.

Tabuľka 4

Zloženie tukového doplnku LADEK 69E6

Zložka	Množstvo na dennú dávku dospelého* (0,385 ml)
Čistený sójový triglycerid ¹	0,33 g
Retinylpalmitát	6,45 mg (11,7 I.U.)
Cholekalciferol	0,0288 mg (1,15 I.U.)
2-amboalfatokoferol	3,3 mg
2-amboalfatokoferol acetát	6,6 mg
Fylochinón	72 mg

*Myši v laktácii obdržia dvojnásobok normálnej dávky pre dospelých

¹Zložený z: 12 % palmitanu

1,5 % stearanu

24 % oleanu

55 % linolanu

8 % linoleanu

Podrobnejší opis CD diét pozri Pleasants, J.R., et al., J. Nutr., 116, 1949 až 1964 (1986), Pleasants, J., et al., Germfree Research: Microflora Control and Its Application to the Biomedical Sciences, B.S. Wostmann, Ed., str. 87, Liss, New York (1985); Wostmann, B.S., et al., J. Nutr., 112, 552 (1982); a Pleasants, J.R., et al., J. Nutr., 100, 498 (1970), ktorých zverejnenie sa tu zahrňuje odkazom.

Príprava monoklonovej protilátky

Sterilné zviera sa potom použije na prípravu monoklonových protilátok. Sterilný systém sa môže využiť na prípravu monoklonovej protilátky ku ktorémukoľvek antigénu, ktorý zviera môže produkovať v nesterilnom stave. Súpis príkladov antigénov obsahuje U.S. Patent 3 935 074. Predpokladá sa však, že sterilné zviera preukazuje oveľa vyššiu imunitnú odpoveď k antigénu ako nesterilné. Tak možno zvýšiť pravdepodobnosť zachytenia B-lymfocyту, ktorý produkuje protilátku, ktorá je schopná väzby k špecifickému epitopu antigénu. Toto je hlavná prednosť tohto vynálezu. Navyiac sa sterilný systém považuje za osobitne vhodný na vznik vysoko špecifických protilátok pre také antigény, ktoré majú väčší počet epitopov.

Sterilné zviera sa môže imunizovať bežnou technikou. Uprednostňuje sa však najmenej trojnásobná imunizácia sterilného zvieraťa s najmenej trojtýždňovou prestávkou medzi každou imunizáciou a následnou prevakcináciou. Táto zvýšená úroveň imunizácie sa považuje za potrebnú, pretože sa pozorovalo, že po dvoch imunizáciách, čo je bežné, ešte stále prevládajú IgM sekretujúce B-lymfocyty nad uprednostňovanými IgG sekretujúcimi B-lymfocytmi.

Somatické bunky

Somatické bunky, osobitne B-lymfocyty, sterilného zvieraťa, ktoré je schopné vytvárať protilátku, sú vhodné na fúziu s B-bunkovým myelómovým radom. Takéto bunky, ktoré vytvárajú protilátku a sú v štádiu delenia plazmových blastov, sa prednostne fúzujú. Somatické bunky sa môžu odvodiť z lymfatických uzlín, sleziny a periférálnej krvi najlepších zvierat, pričom výber lymfatických buniek závisí do značnej miery od ich skúškou zistenej upotrebitelnosti v systéme určitej fúzie. Všeobecne sa uprednostňujú somatické bunky, získané zo sleziny. Po hyperimunizovaní sa sterilné zvieraťa môžu použiť ako zdroj lymfocytov, produkujúcich protilátky. Lymfocyty myši dávajú vyššie percento stálych fúzií s myšacími myelómovými líniami, opísanými ďalej. Možno použiť bun-

ky, vytvárajúce protilátku, aj z iných sterilných zvierat. Výber určitého sterilného zvieraťa závisí od voľby antigénu; je nezbytné, aby sterilné zviera malo B-lymfocyt z jeho vybavenia B-lymfocytmi, ktorý môže vytvárať protilátku k danému antigénu.

Nesmrtelné bunky

Na použitie na prípravu hybridómov sa vyvinuli špecializované myelómové bunkové línie z lymfocytových nádorov (G. Köhler a C. Milstein, 1976, Eur. J. Immunol., 6:269 až 270). Bunkové línie sa vyvinuly najmenej z troch dôvodov. Prvým dôvodom je uľahčiť výber fúzovaných myelómových buniek. Zvyčajne sa to vykoná použitím myelómov s enzýmovou nedostatočnosťou, ktorá spôsobuje neschopnosť ich rastu v určitom selektívnom médiu, čo podporuje rast hybridómov. Druhý dôvod vznikol z inherentnej schopnosti lymfocytových nádorových buniek vytvárať ich vlastné protilátky. Účelom použitia monoklonových techník je získať nesmrtelné fúzované hybridné bunkové línie, ktoré produkujú vyžadovanú samotnú špecifickú protilátku, geneticky usmernenú somatickou bunkovou zložkou hybridómu. Na potlačenie produkcie nádorových bunkových protilátok hybridómom, sa použijú myelómové bunkové línie, neschopné produkovať ľahké alebo ťažké imunoglobulínové reťazce, alebo také, ktoré majú nedostatočný mechanizmus protilátkovej sekrécie. Tretí dôvod výberu týchto bunkových línií je ich vhodnosť a účinnosť pri fúzii.

Na prípravu fúzovaných bunkových hybridov sa môže použiť niekoľko myelómových bunkových línií, vrátane NS-1, X63-Ag8, NIS-Ag4/1, MPC11-45.6TG1.7, X63-Ag8.653, Sp2/O-Agf14, FO a 194/5XX0.Bu.1, všetky získané z myši a 210-RCY3.Ag1.2.3, získaný z krysy (G.J.Hanmerling a J.F. Kernly, eds., 1981, Monoclonal antibodies and hybridomas, in: J.L. Turk, ed., Research Monographs in Immunology, Vol.3, Elsevier/North Holland Biomedical Press, New York).

Fúzia

Spôsob prípravy hybridov, produkujúcich protilátku,

z buniek sleziny alebo lymfatických uzlín a z nesmrteľných buniek zahŕňa vo všeobecnosti zmiešanie somatických buniek s nesmrteľnými bunkami v pomere, ktorý sa môže meniť od asi 20:1 do asi 1:1 za prítomnosti činidla alebo činidiel (chemické, vírusové alebo elektrické), ktoré podporujú fúziu bunkových membrán. Často sa uprednostňuje, že sa ako zdroj somatických a nesmrteľných buniek na fúziu použijú rovnaké druhy zvierat. Spôsoby fúzie sa opisujú autormi Köhlerom a Milsteinom, 1975, Nature, 256:495 až 497; 1976, Eur. J. Immunol., 6:511- 519), ďalej Gefterom et al. (1977, Somatic Calls Genet., 3:231 až 236) a Kozborom et al. (1983, Immunology Today, 4, 72). Horeuvedení výskumníci použili na podporu fúzie činidlá: vírus Sendai a polyetylénglykol (PEG).

Možno tiež využiť nedávno vyvinutú transformačnú techniku EBV (Cole et al., 1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., strany 77 až 96).

Izolácia klonov a detekcia protilátky

Fúziami sa pripravia životaschopné hybridy zvyčajne s malou frekvenciou, asi $1 \cdot 10^{-6}$ až $12 \cdot 10^{-8}$. Pretože je frekvencia výskytu životaschopných hybridov nízka, treba mať spôsob, ako oddeliť fúzované bunkové hybridy od ostatných nefúzovaných buniek, osobitne od myelómových nefúzovaných buniek. Tiež je potrebný spôsob na detekciu hybridómov, produkujúcich vyžadovanú protilátku, medzi ostatnými fúzovanými bunkovými hybridmi.

Fúzované bunky sa všeobecne kultivujú v selektívnych prostrediach, napríklad v HAT médiu, ktoré obsahuje hypoxantín, aminopterín a tymidín. Prostredie HAT umožňuje množenie hybridných buniek a zabraňuje rastu nefúzovaných myelómových buniek, ktoré by sa normálne nedefinované delili. Aminopterín blokuje de novo syntézu purínu a pyrimidínu cez inhibíciu produkcie tetrahydrofoliátu. Prísada tymidínu obchádza prekážku v syntéze pyrimidínu, zatiaľ čo hypoxantín je obsiahnutý v médiu a má za úlohu, aby inhibované bunky mohli syntetizovať purín využitím nukleotidovej reakčnej dráhy.

Použité myelómové bunky sú mutantmi, ochudobnenými transferrázou fosforibozylhypoxantínu (HPRT) a tak nemôžu využiť uvedenú reakčnú dráhu. Hybridom, ktoré prežijú, B-lymfocyty dodávajú genetickú informáciu na vytváranie uvedeného enzýmu. Pretože samotné B-lymfocyty majú v kultúre iba obmedzenú životnosť (približne dva týždne), jediné bunky, ktoré sa môžu rozmnožovať v HAT prostredí sú hybridy, vytvorené z myelómových a slezinových buniek.

Zmes fúzovaných myelómov a B-lymfocytov sa zriedi prostredím HAT a kultivuje v násobných jamkách mikrotitračných platní. Uľahčí sa tak vytriedenie protilátok vylučovaných hybridmi a zabráni sa jednotlivým hybridom, aby prerástli ostatné. Za dva až tri týždne, keď sa hybridné klony stanú rozoznateľnými mikroskopom, tekutina z prostredia z jednotlivých jamiek, obsahujúca hybridné klony, sa skúša na produkciu špecifickej protilátky.

Skúška musí byť citlivá, jednoduchá a rýchla. Skúšobné techniky zahŕňujú rádioimunoanalýzy, enzymatické imunoanalýzy, skúšky cytotoxicity a plakové skúšky.

Množenie buniek a produkcia protilátky

Keď sa vyžadované fúzované bunkové hybridy oddelia a klonujú na jednotlivé bunkové línie produkujúce protilátky, každá bunková línia sa môže množiť niektorým z dvoch bežných postupov. Vzorka hybridómov sa môže injekciou preniesť do histokompatibilného zvieraťa rovnakého druhu ako bol darca somatických a myelómových buniek v pôvodnej fúzii. Zviera po injekcii vyvíja tumory, vylučujúce špecifickú monoklonovú protilátku, ktorá vzniká z fúzovaných bunkových hybridov. Telové tekutiny zvieraťa, ako je sérum alebo ascitová kvapalina, môžu slúžiť na získanie monoklonových protilátok vo vysokých koncentráciách. Jednotlivé bunkové línie sa alternatívne môžu rozmnožovať *in vitro* v laboratórnych kultivačných nádobách. Kultivačné prostredie, ktoré má vysokú koncentráciu jednotlivcej špecifickej monoklonovej protilátky sa môže spracovať dekantáciou, filtráciou alebo odstredením.

Použitie monoklonovej protilátky

Monoklonové protilátky, vyrobené spôsobom podľa tohto vynálezu sa môžu použiť v ktorejkoľvek známej technike, alebo v technike, ktorá bude vyvinutá v budúcnosti, ktorá využíva alebo bude využívať monoklonovú protilátku.

Hlavné použitie monoklonových protilátok je v imunoanalýze, čo je meranie interakcie protilátky a antigénom. Imunoanalýza všeobecne môže byť heterogénna alebo homogénna. V homogénnej imunoanalýze vyžaduje imunologická reakcia zvyčajne špecifickú protilátku, značené analytické činidlo a hodnotenú vzorku. Signál vznikajúci zo značky sa upravuje, priamo alebo nepriamo, podľa väzby protilátky na značené činidlo. Imunologická reakcia a detekcia sa vykonávajú v homogénnom roztoku. Imunochemické značky, ktoré sa môžu použiť, zahŕňujú voľné radikály, fluorescenčné farbivá, enzýmy, baktériofágy, koenzýmy a tak ďalej. Hlavnou výhodou homogénnej imunoanalýzy je, že špecifická protilátka sa nemusí oddelovať zo značeného prostredia analytického činidla.

V heterogénnej rádioimunoanalýze sú reagentmi zvyčajne vzorka, špecifická protilátka a prostriedok na vznik zaznamenateľného signálu. Všeobecne sa vzorka umiestni na podložke, napríklad na platni alebo sklíčku a privedie sa do styku s protilátkou v tekutej fáze. Podložka sa potom oddelí od tekutej fázy a buď nosič alebo tekutá fáza sa analyzuje pomocou signálu z prostriedku, ktorý tento signál vytvára. Signál je vo vzťahu k prítomnosti činidla vo vzorke. Prostriedok na vytváranie zaznamenateľného signálu zahŕňa použitie rádioaktívne značených látok, fluorescentov, enzýmov a podobných látok. Príkladmi heterogénnych imunoanalýz sú rádioimunoanalýza, imuno fluorescenčné metódy, enzýmová imunoanalýza a podobne.

Na podrobnejšie zoznámenie a diskusiu horeuvedených imunoanalytických techník pozri "Enzyme - Immunoassay", od Edwarda T. Maggio, CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla., 1980. Pozri tiež napríklad U.S. Patent 3 690 834; 3 791 932; 3 817 837; 3 850 578; 3 853 987; 3 867 517; 3 901 654; 3 935 074; 3 984 533; 3 996 345 a 4 098 876. Tento výber nemá sna-

hu byť úplný.

Iné hlavné použitie monoklonových protilátok je in-vivo zobrazovanie a terapia. Monoklonové protilátky sa môžu značiť rádioaktívnymi zlúčeninami, napríklad rádioaktívnym jódom, intravenózne podávanými pacientovi. Protilátka sa tiež môže označiť magnetickou značkou. Na zisťovanie antigénu sa potom môže použiť NMR. Po lokalizácii protilátky na antigéne, sa môže antigén detegovať emisne tomograficky a jadrovou skenovacou technikou, pričom sa stanoví poloha antigénu.

Ako príklad na objasnenie sa uvádza spôsob použitia tak, že vyčistená monoklonová protilátka sa suspenduje vo vhodnom nosiči, napríklad soli, s alebo bez ľudského albumínu, a vo vhodných dávkach sa podáva intravenózne, napríklad kontinuálnou intravenóznou infúziou počas niekoľkých hodín, ako uvádza Miller et al., in: Hybridomas in Cancer Diagnosis and Therapy (1982), čo sa tu zahrňuje týmto odkazom.

Monoklonové protilátky podľa tohto vynálezu sa môžu použiť v terapii. Protilátky s vhodnými biologickými vlastnosťami sú použiteľné priamo ako terapeutické prostriedky. Alternatívne sa protilátky môžu viazať na toxíny a tvoriť imunotoxín, alebo na rádioaktívny materiál alebo liečivo a tvoriť tak rádioliečivo alebo liečivo. Spôsoby prípravy imunotoxínov a rádioliečiv z protilátok sú široko známe (pozri, napríklad, Cancer Treatment Reports (1984), 68:317 až 328).

Polyklonové protilátky odvodené zo sterilných zvierat sa tiež môžu využívať na imunoanalýzu a poskytujú lepšie výsledky v porovnaní s polyklonovými protilátkami, získanými z bežných zvierat. Polyklonové protilátky, odvodené zo sterilného zvieraťa sa môžu pripraviť využitím sterilného zvieraťa, ako je uvedené hore, a imunizačnou technikou, ako je uvedená hore, a následným oddelením polyklonovej protilátky zo zvieraťa bežnou technikou, napríklad oddelením séra zo zvieraťa.

Monoklonová protilátka, špecifická k fibrínu

Homeostatický mechanizmus je zložitý fyziologický mechanizmus odozvy, vyvolaný na vyhojenie poškodenia prasknutých ciev. Homeostáza sa dosahuje kooperatívnymi interakciami medzi stenou poškodenej cievy, doštičkami a koagulačným systémom. Úlohou koagulačného systému je vytvoriť rozsiahlu fibrínovú sieť na stabilizáciu a ukotvenie doštičkovej zátky, ktorá sa má vytvoriť na subendoteliálnej štruktúre poškodenej cievy. Vznik nerozpustného fibrínového matrixu z cirkulujúceho fibrinogénu je výsledkom zložitých následných reakcií, ktorých vyvrcholením je explozívna tvorba trombínu na vyžadovanom mieste. Koagulácia je zosilnený proces reťaze enzymatických reakcií, v ktorých sú proenzýmy (zrážacie faktory) následne aktivované na aktívne enzýmy. Existuje niekoľko fyziologických mechanizmov, ktoré ovládajú proces fibrínovej polymerizácie, pri ktorom vzniká trombus. Tieto mechanizmy zahŕňujú trombínový inhibitor antitrombín III (ATIII), proteín C, prostacyklín a rôzne zložky fibrinolytického systému ako je tkanivový plazminogénový aktivátor (t-PA) a jeho rýchlo účinkujúci inhibitor (PAI).

Hypotéza homeostázy, navrhnutá Astrupom v roku 1956 (Astrup, T., Blood, 11, 781 až 806 (1956)), tvrdí, že jestvuje rovnováha medzi vznikom fibrínu (koagulácia) a rozpúšťaním fibrínu (fibrinolýzou). V normálnom, zdravom stave sú tieto funkcie vyvážené. Ak je však homeostatický proces narušený, koagulácia a fibrinolýza sa patologicky prejavujú ako trombóza a krvácanie. Klinické prejavy patologickej trombózy alebo trombotického ochorenia sú mimoriadne rôznorodé a zahŕňujú rozptýlenú intravaskulárnu koaguláciu (DIC), hĺbkovú trombózu žíl (DVT), arteriálnu a venálnu trombózu.

Tromboembolizmus a trombotické komplikácie iných vaskulárnych chorôb (napríklad aterosklerózy) môžu mať za následok vznik oklúzií hlavných tepien, ktoré vedú k ischémii orgánov a sprievodným, život ohrozujúcim, okolnostiam, ako je cerebrovaskulárna príhoda (porážka), infarkt myokardu a podobne.

Fibrinolytický proces je premena neaktívneho zymogénu, plazminogénu na proteolytický enzým, plazmín, pomocou účinku činidiel, známych ako plazminogenné aktivátory. Molekulový mechanizmus fyziologickej fibrinolýzy nie je celkom vyriešený, ale je známe, že v priebehu tvorby fibrínu sa plazminogén viaže na fibrín, kde sa môže aktivovať plazminogénovým aktivátorom, napríklad t-PA. Týmto spôsobom nastáva vznik plazmínu v trombuse, kde je chránený od inaktivácie hlavným fyziologickým inhibitorom plazmínu, alfa₂-antiplazmínom.

Účinkom plazmínu sa fibrinogén a fibrín rozpadajú na ich degradačné produkty. Fibrinogén degraduje na fragmenty X a Y, a po ďalšej expozícii plazmínom, na fragmenty D a E. Fibrín sa degraduje na fragmenty X, Y, D a E z nezosieťovaného fibrínu a na zosieťovaný D-dimér, D-D/E komplex, Y dimér, Y-D-dimér a X oligomér zo zosieťovaného fibrínu.

Skúšky značkovačov trombotických ochorení sa donedávna vykonávali s použitím polyklonových protilátok aj postupom rádioimunoanalýzy aj latexovým aglutinačným typom analýzy. Gaffney ukázal, že uvedené skúšky sú mimoriadne nespoľahlivé (Gaffney, P.J., Ann. N.Y. Acad. Sci., 408, 407-423, (1983)). Oveľa špecifickejšia a citlivejšia je imunoanalýza (ako je napríklad ELISA), ktorá využíva monoklonovú protilátku a stáva sa bežnou praxou v klinických laboratóriách. Obmedzujúcim prvkom týchto diagnostických skúšok je špecifickosť a afinita použitej určitej monoklonovej protilátky. Vznik vysokošpecifických protilátok ku ktorémukoľvek z potenciálnych indikátorov poškodenia homeostázy je brzdený nízkou úrovňou obsahu indikátorov a aj antigénovou príbuznosťou osobitného značkovača s jeho prekursorom, ktorý je v plazme normálne prítomný v oveľa vyšších koncentráciách ako vlastný značkovač. Príkladom je vznik komplexov medzi enzýmami a ich inhibítormi napríklad trombín - antitrombín III, plazmín - alfa₂-antiplazmín, t-PA - PAI-1. Počet nových antigenových miest, vznikajúcich uvedenou tvorbou komplexu je veľmi malý a tým sa stáva príprava imunologických sond (ako sú monoklonové protilátky) veľmi obťažnou.

Podobne, hlavný problém spojený so získaním monoklono-

vej protilátky k fibrínu sa javí v tom, že fibrín a jeho fyziologický prekursor fibrinogén sú štruktúrálné a konformačne veľmi podobné. Zistilo sa, že pri premene fibrinogénu na fibrín sa kovalentná štruktúra zachováva na viac ako 98 % (Plow, E.F., et al., Semin. Thromb. Haemostat, 8, 36, (1982)) a preto v skutočnosti len malé percentá epitopov na molekule fibrínu tvoria neoantigény (jedinečné k fibrínu). Mnohé z prístupov, ktoré sa prispôsobili na získanie fibrínových protilátok, sa sústredili na imunizované zvieratá s rozpustnými fragmentami fibrínu a syntetické peptidy, ktoré napodobňujú ovplyvňované neoantigénne miesta fibrínu. Pozri Hui, K.Y., et al., Science, 22, 1129 až 32 (1983), Scheefers-Borchel, V., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 7091-95 (1985), Elms, M.J., et al., Thromb. Haemostat, 50, 591-94 (1983) a Kurdryk, B., et al., Mol. Immunol., 21, 89-94 (1984). Predpokladá sa, že väzbové miesta uvedených protilátok sa zachovávajú aj v priebehu rozkladného procesu fibrínu a preto sa uvedené látky môžu tiež viazať na produkty rozkladu fibrínu.

Tento vynález predstavuje celkom iný prístup a umožňuje využiť neporušený fibrínový antigén v spojení s vyššou imunologickou citlivosťou bezantigénového (AF - antigen free) zvierata na prípravu monoklonovej protilátky, špecifickej k fibrínu. Na účely podľa tohto vynálezu sa monoklonová protilátka, špecifická k fibrínu, viaže na fibrín a neviaže sa na fibrinogén, ani na produkty rozkladu fibrinogénu alebo na produkty rozkladu fibrínu.

Materiály a postupy

Zvieratá

Z chovu sterilných kolónií (GF - germfree) myší na University of Wisconsin sa získali sterilné myši BALB/cAnN. Pri preprave zvierat do výskumného zariadenia sa zabezpečili GF podmienky. Bezantigénový (AF - antigen free) chov sa zahájil premiestnením pregnantných GF myší do izolátorov a zámenou pôvodnej výživy L 485 s prírodnými zložkami (pozri

Pleasants, J.P., et al., J. Nutr. 116, 1949-1964 (1986)) za chemicky definovanú (CD) AF diétu. Ich potomstvo, ktoré nikdy neprišlo do styku s prirodzenou potravou s prísadami (NI - natural ingredient diet) sa odstavilo od materského mlieka zámenou za CD diétu a označilo sa ako prvá AF generácia. AF myši sa krížili v pároch, kým samička nebola s určitou istotou gravidná; potom sa samec odstránil, aby sa zabezpečilo, že samička obdrží jej plnú dennú doplnkovú tukovú dávku. Mláďatá boli na materskom mlieku do 24. dňa veku.

Umiestnenie zvierat

AF zvieratá chovu sa umiestnili v pároch v jednej polovici bežnej polykarbonátovej myšacej klietke 28 x 17,8 x 12,7 cm³. Dno bolo odrezané a nahradené falošným tkaninovým dnom z nehrdzavejúcej ocele. Na koncoch plastovej klietky sa upevnila plochá priehradka z nehrdzavejúcej ocele. Priehradka dostatočne prečnievala nad a za klietku tak, aby vhodne upevňovala poklop z nehrdzavejúceho drôtu. Prehĺbený poklop, ktorý bežne dosadá vo vnútri klietky sa obrátil, aby umožnil vznik vhodného horného priestoru nad falošným dnom. Na hornú časť poklopu sa navarili objímky z nehrdzavejúcej ocele vhodnej veľkosti, aby slúžili ako držiaky 60 ml fliaš s potravou. Na boky prepážky, pri jej koncoch sa privarili štyri nádoby z nehrdzavejúcej ocele tak, aby boli v polovici medzi falošným dnom a vrchom. (Obraz klietok je uverejnený v Pleasants, J.R., The germfree system for aging and immunity, v: CRC Handbook of Immunology in Aging, (Kay, M.M., B.S. Makinodan, T., eds.), str. 257 až 297, CRC Press, Boca Raton, Fl, (1981)). Fľaše s diétou boli z hnedého skla. Diéta a aj fľaša s vodou mali uzávery z plastu s dierkami v ich stredoch. Fľaše sa naplnili, obrátili a vložili do držiakov. Tukový doplnok sa odmeriaval každý deň do nádobiek z nehrdzavejúcej ocele. Pod každú klietku sa podkladala misa z plastu na zachytenie odpadov.

Ako podstielka a súčasne ako nestraviteľné vlákno slúžil filtračný papier v kvalite Whatman - bezpopoľový filtračný papier číslo 41, zakúpený ako odrezky (Sargent

Welch). Na podstielku sa papier rezal na prúžky. Na vnútorné čistenie izolátora sa použili nerozrezané štvorce papiera. Papier sa autoklávoval 25 minút pri 121 °C, alebo sa ožiaril (4,5 Mrad) v plastových sáčkoch. Všetky myši obdržali dostatok papiera na zakrytie jedného konca klietky. Po navlhnutí, zožltnutí alebo zašpinení sa papier vymenil.

Klietky sa umiestnili vo vnútri 1,37 x 0,6 x 0,6 m³ pružného izolátora podľa Trexlera (Trexler, P.C., Lab. Animal Care, 13, 572-581 (1963)), za použitia bežnej gnotobiotickej technológie (pozri Wostmann, B.S., Ed., Gnotobiotics Standards and Guide Lines for the Breeding, Care a Management of Laboratory Animals, National Research Council, National Academy of Sciences, Washington, D.C. 1970). Izolátory sa udržiavali v miestnosti pri 21 °C s 12 hodinovým rozvrhom svetlo/tma.

Na hornú časť izolátora sa utesnili tygonové trubičky s priemerom 25 mm a dlhé 75,5 mm a na oboch koncoch sa uzavreli vinylovými zátkami. To umožňovalo sterilnú filtráciu diéty, vody a oleja.

Diéta

V tabuľke 5 je uvedené zloženie diéty a následnosť rozpúšťania prísad v ultrafiltrovanej Mill-Q vode (Millipore, MA, USA). Aminokyseliny a dextróza sa použili v kvalite pre tkanivové kultúry od firmy Sigma. Vitamíny boli tiež od firmy Sigma s výnimkou čistého palmitanu retinylu, poskytnutého firmou Hoffman-La Roche, Inc. (Nutley, NJ, USA). Ostatné činidlá boli certifikované od Fischera, alebo v kvalite im zodpovedajúcej. Vo vode celkom rozpustná výživa sa filtrovala za chladu ultrafiltrom Amicon Diaflo TC3 za použitia troch Pm10 membrán s priemerom 150 mm (Amicon).

Ultrafiltračné membrány mali molekulovú hmotnosť obmedzenú do 10 000 Daltonov. Zostavené ultrafiltračné zariadenia sa vopred sterilizovali premytím 0,15 %-ným roztokom chlórnanu sodného a potom dôkladným premytím vodou. Ultrafiltrovaná výživa sa uchovávala pri 4 °C v sterilných zásobníkoch až do jej použitia. Diéta sa uvádzala do AF izolátorov pou-

žitím 0,2 μ m nylonového (MSI) filtra, uchyteného v autoklávovanom tlakovom filtračnom držiaku, ktorý mal prírodnú hadičku vloženú do neoprénovej zátky číslo 6. Na uvedený účel sa horná vinylová zátka z tygónovej trubice, utesnenej na vrchnej časti izolátora odstránila. Vnútrajšok trubice sa sprejoval sterilizačným 2 %-ným roztokom kyseliny peroctovej, obsahujúcej 0,1 % alkylaryl sulfonátu. Na miesto hornej zátky sa vložila zátka filtračného držiaka. Po 20 minútach sa odstránila spodná zátka (vo vnútri izolátora) a roztok výživy alebo voda sa filtrovala do izolátora pod tlakom 0,14 MPa (20 psi) dusíka.

Zloženie tukového doplnku sa udáva v tabuľke 4. Sójové triglyceridy sa pripravili z ich metylesterov, ktoré sa destilovali za vákua v teplotnej oblasti, poskytujúcej estery od palmitanu po linoleáty. Uvedené estery sa potom preesterifikovali glycerolom za vzniku zmiešaných triglyceridov. (Nu-Chek Prep., Elysian, MN, USA). K zmesným triglyceridom sa pridali v tuku rozpustné vitamíny pred ich filtráciou do izolátora. Na filtráciu do izolátora sa tukový doplnok predhrial na teplotu 50°C, filtroval rovnakým postupom ako sa filtrovala vo vode rozpustná časť výživy. Príjem tukov sa dávkoval v množstve 0,375 ml na deň. Zvýšená dávka tukového doplnku značne znížila podiel úmrtnosti novorodených myší. Zvýšila sa tiež priemerná početnosť vrhu v porovnaní s bežne chovanými zvieratami. Samičky v laktácii obdržali dvojnásobok bežného množstva tukového doplnku.

Tabuľka 5

Zloženie a príprava chemicky definovanej diéty
L 489E1Se

Zložka	Množstvo v gramoch v 100 g prísad
K 192 ml Milli-Q vody pri 70 °C sa pridá:	
Leucín	1,9
Fenylalanín	0,74
Izoleucín	1,08
Metionín	1,06
Tryptofán	0,37
Valín	1,23
Asparagin	0,91
Hydrochlorid arganinu	0,81
Treonín	0,74
Hydrochlorid lyzínu	1,77
Hydrochlorid histidínu	0,74
Roztok sa ochladí na 45 °C a pridá sa:	
Glycín	0,59
Prolín	1,48
Serín	1,33
Alanín	0,59
Glutamát sodný	3,40
Hydrochlorid etylesteru L-tyrozínu	0,62
Glukonát železnatý	0,05
Soli 35D ¹	0,105
Seleničitan sodný ²	0,074
Roztok sa ochladí na 5 °C a pridá sa:	
Glycerofosfát vápenatý	5,22
Glycerofosfát horečnatý	1,43
CaCl ₂ .2 H ₂ O	0,185
Zmes chloridu sodného a jodidu draselného (obsahujúca 680 mg KI)	0,086
Vitamínová zmes vitamínu B, zmes 111E5 ³	0,09
Vitamín B12 ⁴	1,20 mg
Chlorid cholínu	0,31
Octan draselný	1,85
K 108 ml Milli-Q vody sa pridá pri 70 °C:	
D-dextróza, bezvodá	71,28
Roztoky sa ochladia na 5 °C a spoja sa pred ultrafiltráciou	

- ¹Zloženie zmesi solí 35D je uvedené v tabuľke 7
²Pridané navyiac k prídavku seleničitanu sodného, obsiahnutom v zmesi solí 35D
³Zloženie vitamínovej zmesi B 111E5 sa uvádza v tabuľke 8
⁴Pridané navyiac k vitamínu B-12, obsiahnutom vo vitamínovej zmesi 111E5 (pozri ďalej uvedenú časť príklady).

Tabuľka 6

Zloženie tukového doplnku LADEK 69E6

Zložka	Množstvo na dennú dávku dospelého* (0,375 ml)
Čistený sójový triglycerid ¹	0,33 g
Retinylpalmitát	6,45 mg (11,7 I.U.)
Cholekalciferol	0,0288 mg (1,15 I.U.)
2-amboalfatokoferol	3,3 mg
2-amboalfatokoferol acetát	6,6 mg
Fylochinón	72 mg

*Myši v laktácii obdržia dvojnásobok normálnej dávky pre dospelých

- ¹ Zložený z: 12 % palmitanu
1,5 % stearanu
24 % oleanu
55 % linolanu
8 % linolenanu

Tabuľka 7

Zloženie zmesi solí 35D

Sol'	Množstvo (na 300 ml diety (mg))
$\text{Mn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	55,4
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	40,6
$\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	3,7
$\text{Cr}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2,5
NaF	2,1
$\text{SnSO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,37
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0,37
$\text{NiCl}_2 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$	0,37
$\text{Co}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0,11
Na_3VO_4	0,22
Na_2SeO_3	0,096

Tabuľka 8

Zloženie B-vitamínovej zmesi 111E5

Prísada	Množstvo (na 300 ml diety (mg))
Hydrochlorid tiamínu	1,23
Hydrochlorid pyridoxínu	1,54
Biotín	0,25
Kyselina listová	0,37
Vitamín B 12	0,37
Riboflavín	1,85
Niacínamid	9,2
i-inozitol	61,9
Pantotenát vápenatý	12,3

Voda bola ultrafiltrovaná do stupňa Milli-Q a bola pre-filtrovaná do izolátora tým istým spôsobom ako diéta.

Priebežné mikrobiologické hodnotenie (Monitoring)

Bezantigénový systém sa kontroloval na mikrobiologickú kontamináciu podľa odporúčaní, uvedených v Vostmann, B.S., Ed., Gnotobiotics Standards and Guidelines for the Breeding,

Care a Management of Laboratory Animals, National Research Council, National Academy of Sciences, Washington, D.C. 1970. V krátkosti, na získanie čerstvých vzoriek fekálií priamo od myší sa použili diétou a vodou zvlhčené tampóny z vnútra izolátora. Rovnako sa odobrali vzorky z mís, umiestených pod klietkami. Stery sa odobrali tiež zo stien izolátora, osobitne z okolia vstupných otvorov. Vždy sa odobrali dva stery. Jeden súbor sa skúšal priamym hodnotením pod mikroskopom na baktérie a huby s použitím Gramovho farbenia. Druhý súbor tampónov sa použil na detekciu mikroorganizmov. Vzorky sa kultivovali tri týždne pred tým, ako sa vyhodnotili ako negatívne.

Mikrobiologické hodnotenie sa vykonávalo približne každé dva týždne, alebo vždy po niekoľkých dňoch pri nových vstupoch do izolátorov.

Príprava monoklonových protilátok použitím myší bez antigénov

Ako donory lymfocytov pri príprave monoklonových protilátok sa použili hore opísané bezantigénové myši. Roztoky všetkých antigénov sa pripravovali v sterilných podmienkach pod krytom s laminárnym prúdením.

Na imunizáciu AF myší sa použil nasledujúci postup. Príslušný antigén (25-50 mikrogramov) sa rozpustil v sterilnom roztoku soli (100 mikrolitrov) a emulgoval sa s rovnakým objemom úplného Freundovho adjuvans (FCA). Pred prípravou emulzie sa do roztoku antigénu pridal interferon (1000 jednotiek). Pri každej imunizácii sa použila sterilná injekčná striekačka a ihla. Injekčné striekačky sa preniesli do AF izolátora cez vstupný otvor, kde sa sterilizovali sprejovaním roztokom kyseliny peroctovej (2 %-nej). Opakované injekcie sa podávali s použitím rovnakého množstva antigénu a náhradou FCA s neúplným Freundových adjuvantom. Celkove sa podali tri imunizácie, každá v intervale troch týždňov. Posledná injekcia (bez adjuvanta) sa podala 4 až 7 dní pred fúziou. Všetky injekcie sa podávali intraperitonálne. V deň fúzie sa myši vybrali z izolátora a ihneď boli utratené

asphyxiáciou s CO₂. Odobrali sa sleziny a splenocyty sa fúzovali myelómovými bunkami myši (NS1), použitím bežnej hybridómovej technológie.

Použitie systému bezantigénových zvierat na prípravu monoklonovej protilátky, špecifickej k fibrínu

Bezantigénový systém sa použil na vyvolanie vzniku monoklonovej protilátky, špecifickej k fibrínu. Protilátka je vysoko špecifická a nerozoznáva ani fibrinogén, ani produkty rozkladu fibrínu alebo produkty rozkladu fibrinogénu. Hybridómová bunková línia sa pripravila fúziou splenocytov z bezantigénovej BALB/c myši, imunizovanej ľudským fibrínom a NS1 myelómovými bunkami.

Imunizačný rozvrh

Tri, osem týždňov staré samičky bezantigénových myši sa imunizovali s 33 mikrogramami preparátu ľudského fibrínu. Preparát pozostával zo zmrazenej vzorky fibrínu, ktorá sa pripravila nasledovne:

Ľudský fibrinogén sa previedol na fibrín pomocou trombínu a faktora XIIa. Zrazenina fibrínu sa potom zmrazila v tekutom dusíku a mechanicky sa zdrobnila na vynímočne jemný prášok. Pripravila sa disperzia tohto za mrazu zdrobňovaného fibrínu v roztoku soli. Vznikol číry roztok zosieťovaného fibrínu XL-Fn s výslednou koncentráciou 1 mg v 1 ml. Na imunizáciu zvierat sa použilo 33 mikrolitrov tohto fibrínového antigénu. Objem roztoku antigénu sa upravil na 100 mikrolitrov sterilným roztokom soli a potom sa emulgoval s FCA, ako sa opisuje v predchádzajúcej časti. Podávali sa 2 posilňujúce imunizácie v intervale troch týždňov, pričom sa použila rovnaká hladina koncentrácie antigénu v neúplnom Freundovom adjuvante, ako už bolo uvedené skôr. Posledná imunizácia sa podala 4 dni pred fúziou. Použila sa rovnaká hladina koncentrácie antigénu, ale adjuvant sa nahradil roztokom soli.

Dôkaz prítomnosti a stanovenie protilátky

Kvalitatívne a kvantitatívne stanovenia monoklonovej protilátky sa vykonali s využitím enzýmovej imunoabsorbentovej analýzy (ELISA). Tieto analýzy sa vykonali s využitím ľudského fibrínu, imobilizovaného na 96 jamkovej PVC platni (Costar). Fibrínom pokryté skúšobné platne sa pripravili inkubáciou 100 mikrolitrov roztoku fibrinogénu (Kabi, v kvalite L) (50 mikrogramov v 1 ml boritanového/solného pufra) cez noc pri teplote 4 °C. Neviazaný fibrinogén sa odstránil premývaním s PBS, obsahujúcim 0,05 % Tweenu 80 (PBS-Tween). Povlak fibrinogénu na každej jamke plastovej platne sa previedol na fibrín inkubáciou so 100 mikrolitrami roztoku trombínu (10 NIH jednotiek v ml), obsahujúcim 2 mM CaCl_2 počas 1 hodiny pri 37 °C. Na vyhodnotenie protilátky sa bežným spôsobom zostrojili kalibračné grafy za použitia preparátu protilátky, ktorý bol homogénny s SDS-PAGE.

Aby sa zabránilo nešpecifickej väzbe, fibrínom pokryté platne sa inkubovali s 1 %-ným roztokom BSA v PBS s pH 7,4. Potom sa pridal roztok obsahujúci protilátku (100 mikrolitrov) a inkubovalo sa pri 37 °C počas 90 minút. Po každom kroku postupu sa jamky účinne premývali s roztokom PBS-Tween. Viazaná protilátka sa detegovala prídavkom 1000 násobne zriedeného roztoku protimýšacej protilátky z kráľika, konjugovanej s alkalickou fosfatázou (Sigma), riedenou PBS s 1 % BSA, pH 8,0.

Príprava hybridómov - fúzia

Myši po utratení zadusením s CO_2 boli ihneď podrobené splenektómii. Slezinové bunky z imunizovaných myší sa fúzovali s fúzoagentovým polyetylén glykolom 4000 (3000 až 3700). Bunky sa inkubovali v HAT selekčnom prostredí v T fľašiach počas 1 týždňa. Po tomto čase sa bunky naniesli na platne do 5 x 96 jamiek. Z nich 93 jamiek vykázalo rast. Z týchto bolo 19 pozitívnych na fibrínový antigén. Jeden z týchto klonov, F492D8 (neskoršie premenovaný na MH1), produkoval protilátku, ktorá rozoznávala fibrínový antigén a nedávala krížovú reakciu s fibrinogénom. Tento osobitný

klon MH1 sa trikrát znova klonoval (reklonoval) s obmedzeným riedením tak, že tretia klonovacia fáza sa vykonala pri riedení 1 bunka na 1 jamku. Po stabilizácii bunky sa bunka vyživovala v bezsérovom prostredí a bunčná línia vytvárala protilátku na úrovni približne 7,5 mg/liter.

Čistenie monoklonovej protilátky

Prostredie tkanivovej kultúry (4 litre násady) sa pred čistením odstredilo na odstránenie poškodených buniek a filtrovalo 0,8 mikrometrovou nylonovou membránou na odstránenie všetkých zvyškov častíc. Hybridómové kvapalné prostredie (supernatant) sa skoncentrovalo pri 4 °C na objem 50 ml použitím vinutého ultrafiltračného systému s YM typom membrány (Amicon) s hornou hranicou molekulovej hmotnosti 30 000. Pufer sa diafiltráciou zamenil za 20 mM 2(N-morfolín)etánsulfónovú kyselinu (MES) pH 6 (pufer A) podľa návodu výrobcu. Po ďalšom skoncentrovaní na výsledný objem 100 ml sa roztok protilátky pred ďalším čistením filtroval cez 0,451 mikrometrovú nylonovú membránu. Skoncentrovaný roztok protilátky sa čistil kvapalinovou chromatografiou na chromatografe Waters HPLC Chromatograph s použitím ABx kolóny 7,75 mm x 10 cm (J.T.Baker, Phillipsburg, NJ, USA). Naplnená kolóna s pufrom A sa nechala až do dosiahnutia rovnováhy. Potom sa privádzala vzorka (100 ml) s prietokom 1,0 ml za minútu. Po účinnom premytí kolóny pufrom A sa protilátka eluovala z kolóny gradientovým systémom od pufra A až po 100 % pufra B (1M roztok octanu sodného, pH 7) s prietokom 1 ml/min. Odoberali sa podiely (po 2 ml); tie, ktoré obsahovali MAb (čo bolo stanovené pomocou ELISA) sa združovali a dialyzovali sa proti fosfátom pufrovanému roztoku soli (PBS) (20 mM fosforečnan sodný, 150 mM chloridu sodného, pH 7,4) a uchovávali pri -20 °C pri koncentráciách > 1 mg/ml. ABx kolóna sa regenerovala 5 minútovým premývaním so 100 %-ným pufrom B, potom sa znova uviedla do rovnováhy s pufrom A. Objem použitého pufra bol 15 násobný, ako bol objem kolóny.

Stanovenie špecifickosti k fibrínu

Prvotné určenie fibrínovej špecifickosti sa dosiahlo systematickým skúšaním hybridómových supernatantov, oddelene na fibrínom a fibrinogénom pokrytých mikrotitračných platniach. Vybrali sa len tie bunkové línie, ktoré vytvárali protilátku a ktoré nedávali krížovú reakciu s fibrinogénom.

Ďalšie potvrdenie fibrínovej špecifickosti sa vykonalo porovnávacou skúškou s fibrinogénom v roztoku, čím sa potvrdilo, že protilátka nerozoznáva fibrinogén v roztoku.

Kontrolná skúška použitá na potvrdenie špecifickosti protilátky sa vykonala podľa už hore opísanej metodiky ELISA s pre-inkubáciou protilátky s fibrinogénom v roztoku. Stručne, hybridómový supernatant sa inkuboval pri 37 °C počas 30 minút s roztokmi fibrinogénu s fyziologickou koncentráciou (4 mg/ml), obsahujúcimi BSA (10 mg/ml) na zabránenie nešpecifických väzieb protilátky k fibrinogénu. Roztok fibrinogénu/protilátky sa potom preniesol do jamiek mikrotitračnej platne, ktorá už bola pokrytá fibrínom. Aby sa zabránilo nožnej polymerizácii fibrinogénu zvyškovým trombínom v jamkách s fibrínom, k fibrinogénovému inhibitoru sa pridal GlyProArgPro (GPRP). Skúška sa potom vykonala ako bežná ELISA na protilátku viazanú k imobilizovanému antigénu. Pri všetkých pokusoch, v ktorých sa skúšala fibrínová špecifickosť protilátky MH1, používala sa na kontrolu aj druhá protilátka 45J. Protilátka 45J krížovo reaguje s fibrínom aj fibrinogénom.

Stanovenie krížovej reaktivity s fibrinogénom

Imobilizovaný fibrín a fibrinogén

Bunková línia MH1 produkuje monoklonovú protilátku z myší, ktorá dáva krížovú reakciu s fibrínom, ak je imobilizovaná na povrchu PVC mikrotitračnej skúšobnej platne (tabuľka 9). Uvedená protilátka pri rovnakej skúške nerozoznáva fibrinogén, imobilizovaný na platni. Ako je zrejmé z údajov v tabuľke 9, nastalo veľmi výrazné zvýšenie imunoreaktivity, ak sa fibrinogén pomocou trombíny premenil na fibrín. To

zreteľne ukazuje na prejav alebo vznik neoepitopu na molekule fibrínu. Kontrolná protilátka 45J však celkom jasne rozoznáva epitop, ktorý sa pri premene fibrinogénu na fibrín zachováva.

Porovnávacia skúška s fibrínom a fibrinogénom

Fibrínová špecifickosť protilátky MH1 sa ďalej ukázala pri porovnávacej skúške, pri ktorej sa hybridómový supernatant pre-inkuboval s roztokom fibrinogénu (výsledná koncentrácia 4 mg/ml) pred ELISAnalýzou na fibrínom pokrytých jamkách. Pretože sa v tejto skúške použila vysoká hladina fibrinogénu (500x vyššia ako koncentrácia protilátky), pridal sa k zmesi BSA (10 mg/ml výsledná koncentrácia). Na zabránenie polymerizácie fibrínu zvyškovým trombínom na fibrínom pokrytých platniach sa k zmesi pridal peptid GPRP. Výsledky tejto analýzy ukazujú, že protilátka MH1 nerozoznáva fibrinogén v roztoku (Tabuľka 12).

Za predpokladu, že v každej jamke mikrotitračnej skúšobnej platne je viazané 400 ng fibrínu, potom použitá hladina fibrinogénu v tejto osobitnej porovnávacej skúške znamená 1000 násobný nadbytok v porobnaní s hladinou viazaného fibrínového antigénu. Navyiac to znamená 400 násobný nadbytok hladiny protilátky v tkanivovom supernatante.

Tabuľka 9

Krížová reaktivita protilátky MH1
s fibrinogénom a fibrínovým antigénom

MAb	A _{405 nm} /30 min	
	<u>fibrín</u>	<u>fibrinogén</u>
MH 1	0,90	0,025
45 J	1,65	1,50

Tabuľka 10

Krížová reaktivita protilátky MH1
s fibrínom za prítomnosti fibrinogénu

MAb	A _{405 nm} /30 min	
	+ fibrinogén	- fibrinogén
MH 1	1,24	1,27
45 J	0,438	1,74

Určenie krížovej reaktivity s fibrín(ogen)ovými produktami rozkladu

Rozkladné produkty fibrinogénu (FDPs = fibrinogen degradation products) sa pripravili inkubáciou fibrinogénu s plazmínom pri 37 °C v časoch od 10 minút do 3 hodín. Fibrinogenolýza sa po zvolenom čase prerušila prídavkom Trasylolu (100 Kallikreinových inhibičných jednotiek/ml) a 20 ml epsilon-aminokaprylovej kyseliny (EACA).

Rozkladné produkty zosieťovaného fibrínu (XLFPDs = crosslinked fibrin degradation products) sa pripravili pridaním trombínu (4 NIH jednotky/ml) k roztoku fibrinogénu (5 mg/ml) v pufrovanom roztoku soli (TBS pH 7,4, 50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl), obsahujúcom 10 mM CaCl₂, plazminogén (0,25 mg/ml) a urokinázu (50 IU/ml). Zmes sa inkubovala rôzne dlhé časové intervaly, ako je uvedené hore pre FDPs.

Na stanovenie krížovej reaktivity protilátok s fibrínovými rozkladnými produktami a s fibrinogénovými rozkladnými produktami sa príslušné rozkladné produkty naniesli na mikrotitračné platne a bežným spôsobom sa vykonala ELISA. Výsledky v tabuľke 11 poukazujú na to, že protilátka MH1 nedáva krížovú reakciu so žiadnym (plazmínom generovaným) rozkladným produktom fibrínu. Ako ukazuje tabuľka 12, protilátka nereaguje s produktami rozkladu XL-fibrínu. Rovnaké zistenie sa dosiahlo, ak sa vykonalo "imunopijakovanie" (Western immunoblotting analysis - WIBA).

Z uvedeného možno vyvodiť závery, že uvedená protilátka rozoznáva epitop neporušenej fibrínovej molekuly, ktorý nie je prítomný alebo dosažiteľný na povrchu prekurzorovej molekuly, fibrinogénu. Epitop je skutočne odbúraný účinkom plazmínu na zosieťovaný fibrín, čo možno predpokladať z výsledkov v tabuľke 12.

Podľa uvedeného je protilátka MH1 protilátkou špecifickou na fibrín, ktorá sa môže definovať nasledovne:

V tomto vynáleze je monoklonová protilátka, špecifická k fibrínu taká monoklonová protilátka, ktorá:

1. v porovnávacích skúškach krížovej reaktivity s fibrínom a fibrinogénom, ako sa opisujú hore, má reaktivitu menšiu ako 75 %, prednostne menšiu ako asi 10 % krížovej reaktivity s fibrinogénom, ak sa fibrinogén použije v množstve 1000 násobne väčšom v porovnaní s fibrínom,
2. v skúške krížovej reaktivity so zosieťovaným fibrínom a v skúške s produktami rozkladu fibrínu, ako je opísané hore, je reaktivita monoklonovej protilátky s fibrínom, na ktorý pôsobil plazmín počas asi 3 hodín, menšia ako 50 %, a prednostne menšia ako 40 %, reaktivity monoklonovej protilátky s fibrínom v čase nula, a
3. v skúške krížovej reaktivity s fibrinogénom a v skúške s rozkladnými produktami fibrinogénu, ako je opísané hore, je reaktivita monoklonovej protilátky s fibrinogénom, na ktorý pôsobil plazmín počas asi štyroch hodín nie väčšia, ako reaktivita monoklonovej protilátky s fibrinogénom v čase nula.

Protilátka MH1 sa ďalej charakterizovala stanovením jej afinity k fibrínu. Afinity sa stanovila Scatchardovou analýzou (Frankel et al., Molecular Immunology 16, 101 až 106 (1979)) za použitia ^{125}I - značenej protilátky MH1. Získaná hodnota disociačnej konštanty K_D bola $6,7 \cdot 10^{-10}$ M. Uvedená afinity je asi 5 000 násobná ako afinity t-PA k fibrínu.

Pomocou WIBA sa tiež stanovilo, že protilátka MH1 nedáva krížovú reakciu s $\text{A}\alpha$, $\text{B}\beta$ alebo gama reťazcami fibrinogénu. Rovnakým analytickým spôsobom sa tiež stanovilo, že pro-

tilátka MH1 nedáva krížovú reakciu s reťazcami A α alebo B β fibrinogénu, ani vtedy, ak na nich pred tým pôsobil trombín. (Pôsobenie trombínu na fibrinogén spôsobuje uvoľňovanie fibrinopeptidu A z reťazca A α a fibrinopeptidu B z B β reťazca, čím vznikajú α reťazec a β reťazec fibrínu).

Tabuľka 11

Krížová reaktivita protilátky MH1
s rozkladnými produktami fibrinogénu

Doba reakcie s plazmínom (min)	A _{405 nm/30 min}	
	MH 1	45 J
0	0,15	1,037
10	0,10	nm
20	0,11	1,02
40	0,11	0,410
60	0,10	0,330
240	0,09	0,300

Pozn.: nm = nemerané

Tabuľka 12

Krížová reaktivita protilátky MH 1
s rozkladnými produktami fibrínu

Doba reakcie s plazmínom (hodiny)	A _{405 nm/30 min}	
	MH 1	45 J
0	0,890	1,40
3	0,354	1,0
5	0,310	0,77

Výsledky v tabuľke 11 navyiac ukazujú, že kontrolná protilátka 45J sa viaže k fibrinogénu a nedáva krížovú reakciu s produktami rozkladu fibrinogénu. Podľa toho je uvedená monoklonová protilátka špecifická k fibrinogénu a predstavuje ďalší aspekt tohto vynálezu. Monoklonová protilátka, špecifická k fibrinogénu sa môže imunoanalyticky využiť na stanovenie úrovni plazmového fibrinogénu in vitro. Protilátka 45J sa ďalej charakterizovala tým, že sa stanovilo, že epitop 45J je na α reťazci fibrinogénu v oblasti od aminokyseliny 206 do asi 424, s najväčšou pravdepodobnosťou v oblasti od aminokyseliny 207 do 231. V tomto vynáleze je monoklonová protilátka, špecifická k fibrinogénu taká protilátka, ktorá pri stanovení krížovej reaktivity s fibrinogénom a s rozkladnými produktami fibrinogénu, ako je opísané hore, dáva reaktivitu monoklonovej protilátky s fibrinogénom, na ktorý pôsobil plazmín počas asi 40 minút, menšiu ako 50 % v porovnaní s reaktivitou monoklonovej protilátky s fibrinogénom v čase nula.

Uvedený hybridóm 45J sa pripravil bežnou technikou s využitím bežných Balb/c myší, ktoré sa imunizovali fibrinogénom. Ako antigén sa však tiež môže využiť fibrinogén.

Stanovenie krížovej reaktivity s nezosieťovaným fibrínom a nezosieťovanými fibrínovými zrazeninami

ELISAnalýzou sa preukázalo, že protilátka MH1 dáva krížovú reakciu nielen s zosieťovaným fibrínom (XLFn), ale tiež s nezosieťovaným fibrínom (NONXLFn). ELISA sa vykonala nasledovne:

1. 96-jamkové mikrotitračné skúšobné platne sa pokryli 100 μ l roztoku fibrinogénu (50 μ g/ml v boritanovom (pH 8,5) soľnom pufri) pri 4 °C cez noc.

2. V jamkách, pokrytých fibrinogénom sa vytvoril zosieťovaný fibrín inkubáciou s roztokom trombínu (10 NIH jednotiek/ml) v pufrovanom (Tris) soľnom roztoku (TBS, pH 7,4, 50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl), obsahujúcom 2 mM CaCl_2 a 10 mM cysteinu, počas 1 hodiny pri 37 °C.

3. Nezosieťovaný fibrín sa vytvoril v jamkách pokrytým

fibrinogénom inkubáciou počas 1 hodiny pri 37 °C s roztokom trombínu (10 NIH jednotiek/ml) v fosforečnanovom pufri (pH 6,1), obsahujúcom EDTA s výslednou koncentráciou 0,0125 M.

4. Viazaná protilátka sa stanovila inkubáciou s proti-myšacím zásaditým fosfatázovým konjugátom. Viazaný konjugát sa stanovil prídavkom alkalického substrátu fosfatázy a kolorimetrická reakcia sa monitorovala pri 405 nM pomocou automatického snímača platní.

Výsledky skúšky sa uvádzajú v tabuľke 13; môže sa z nich usúdiť, že protilátková krížová reaktivita s zosieťovaným fibrínom je väčšia ako s nezosieťovaným fibrínom. Najjednoduchšie vysvetlenie je, že kovalentné zosieťovanie, ktoré je prítomné v zosieťovanej polymérnej štruktúre slúži ako uzáver alebo zmrazenie konformácie, ktorú protilátka rozoznáva. Nezosieťované typy konformácie, hoci vznikajú, nie sú stabilizované kovalentnou väzbou polyméru.

Preukázalo sa tiež, že protilátka dáva krížovú reakciu s zosieťovanými aj s nezosieťovanými zrazeninami in vitro. Zosieťovaný fibrín sa pripravil inkubáciou fibrínového roztoku (v Tris (50 mM, pH 7,4) roztoku soli, obsahujúcom CaCl_2 (2 mM) a cystein (10 mM)) s trombínom (10 NIH jednotiek/ml) počas 3 hodín pri 37 °C. Nezosieťovaný fibrín vznikol inkubáciou roztoku fibrinogénu (3 mg/ml) v fosforečnanovom pufri (pH 6,1), obsahujúcom EDTA s výslednou koncentráciou 0,0125 M s roztokom trombínu (10 NIH jednotiek/ml) počas 3 hodín pri 37 °C. Vytvorené zrazeniny sa premyli a inkubovali pri 37°C s 400 μl 1 %-ného roztoku BSA, obsahujúcom s ^{125}I značenú protilátku MH1. V rôznych časoch sa odoberali malé alikvótne podiely roztoku a v plazme sa gamma-snímačom stanovilo spotrebované množstvo protilátky.

V tabuľke 14 sa uvádza spotreba protilátky v oboch zrazeninách, v nezosieťovanej aj v zosieťovanej.

Tabuľka 13

Krížová reaktivita protilátky MH1
so zosieťovaným a nezosieťovaným fibrínom

Koncentrácia protilátky ng / ml	Zosieťovaný fibrín (Absorbancie pri 405 nm)	Nezosieťovaný fibrín
100 000	0,764	0,409
50 000	0,460	0,319
25 000	0,305	0,154
12 500	0,174	0,074
6 250	0,069	0,000

Tabuľka 14

Krížová reaktivita protilátky MH1
so zosieťovanou a nezosieťovanou zrazeninou fibrínu

Zrazenina fibrínu	% spotreby značkovanej protilátky po 8 hodinách
Zosieťovaná	79 %
Nezosieťovaná	76 %

Uloženie hybridómov

MH1 a 45J sa uložili v American Type Culture Collection (ATCC) dňa 9. júna 1988 a boli im pridelené prístupové čísla HB 9739 a HB 9740. ATCC má adresu 12 301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852, USA. Protilátka MH1 je IgG₁ protilátka s kappa ľahkým reťazcom a zistilo sa, že dáva krížovú reakciu nielen s ľudským fibrínom, ale aj s fibrínom kráľi-
ka.

Tento vynález nie je obmedzovaný uloženými hybridómami, ktorými sa len predkladá príklad hybridóm, ktoré vytvárajú

monoklonovú protilátku, špecifickú k fibrínu a monoklonovú protilátku, špecifickú k fibrinogénu, ako sa už uviedlo hore. Akákoľvek bunková línia, ktorá je funkčne rovnocenná, zahrňuje sa do rámca tohto vynálezu. Výrazom "funkčne" sa rozumie, že protilátka je schopná súťažiť s protilátkou MH1 alebo 45J pri väzbe k epitopu fibrínu, ku ktorému sa protilátka MH1 viaže, lebo k epitopu fibrinogénu, ku ktorému sa viaže protilátka 45J. Uvedený výraz navyše zahrňuje monoklonové protilátky, špecifické k fibrínu a monoklonové protilátky, špecifické k fibrinogénu, ako sú tu definované, ktoré sa viažu k odlišnému epitopu od toho, ku ktorému sa viaže protilátka MH1 alebo ku ktorému sa viaže protilátka 45J.

In vivo diagnostika a terapia, ktoré využívajú monoklonové protilátky, špecifické k fibrínu

Krvná zrazenina/lokalizácia cievnych chorôb

Monoklonové protilátky, špecifické k fibrínu podľa tohto vynálezu sú schopné zacielenia na fibrínové zrazeniny alebo agregovaný fibrín in vivo. Preto sa môžu u ľudí použiť na lokalizáciu možných tkanív alebo cievnych porúch a na monitorovanie cievnych chorôb. Na tento účel sa osobitne uprednostňuje k fibrínu špecifická monoklonová protilátka, nakoľko uvedená monoklonová protilátka sa neviaže k fibrinogénu, k produktom rozkladu fibrínu ani k produktom rozkladu fibrinogénu. Tým sa pri skúške znižuje úroveň pozadia, čo dovoľuje oveľa presnejšie lokalizovať fibrínovú zrazeninu alebo agregovaný fibrín.

K uvedenému sa prednostne využijú čistené monoklonové protilátky. Čistenie sa prednostne môže urobiť spôsobmi HPLC. Čistenie monoklonových protilátok na podávanie v ľudskej medicíne sa môže uskutočniť zrážaním síranom amónnym, alebo síranom sodným, potom dialýzou proti roztoku soli a filtračnou sterilizáciou. Na čistenie monoklonových protilátok sa môže voliteľne použiť technika imunoafinitnej chromatografie.

Po vyčistení sa monoklonové protilátky môžu značkovať rádioaktívnymi zlúčeninami, napríklad zlúčeninami ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{99}Tc , ^{111}In a intravenózne podávať pacientovi. Protilátka sa môže značkovať tiež magnetickou sondou. Na zistenie zrazeniny sa potom môže využiť NMR. Po lokalizácii protilátok v krvnej zrazenine alebo v agregovanom fibríne sa tieto látky môžu detegovať emisnou tomografiou a rádio-nukleárnymi skenovacími technikami, čím možno zistiť miesto, napríklad, trombusu alebo obalom z fibrínu uzavretého nádoru.

Po vyčistení sa monoklonová protilátka suspenduje vo vhodnom nosiči, napríklad v roztoku soli, s alebo bez ľudského albumínu. Vo vhodnej dávke sa podá pacientovi. Monoklonové protilátky sa prednostne podávajú intravenózne, napríklad plynulou infúziou do žíl počas niekoľkých hodín.

Liečenie cievnych chorôb konjugátmi monoklonových protilátok

Monoklonové protilátky podľa tohto vynálezu sa môžu použiť v spojení s mnohými farmaceutickými látkami, ako sú cytotoxické činidlá a trombolytické činidlá, napríklad t-PA, urokináza streptokináza a iné proteázy, ktoré sú schopné štepiť fibrín. Toto použitie sa osobitne uprednostňuje, nakoľko k fibrínu špecifické monoklonové protilátky podľa tohto vynálezu umožňujú účinné využitie uvedených činidiel. Žiadne z uvedených činidiel sa potom nespotrebuje na väzbu s fibrinogénom, s rozkladnými produktami fibrínu, alebo s rozkladnými produktami fibrinogénu. O tomto predmete podávajú prehľad napríklad Bale, et al., 1980, Cancer Research, 40:2965 až 2970; Ghose a Blair, 1978, J. Natl. Cancer Inst., 61(3):657 až 676; Gregoriadis, 1977, Nature, 265:407 až 411, Gregoriadis, 1980, Pharmac. Ther., 10:103 až 108; a Trouet et al., 1980, Recent Results Cancer Res., 75:229 až 235.

Spôsoby, ako použité činidlá viazať na molekuly monoklonovej protilátky, zahŕňujú vytvorenie nekovalentnej alebo kovalentnej väzby. Pretože sa nekovalentné väzby ľahko prerušujú ešte pred tým, ako protilátkový komplex dosiahne cie-

lové miesto, uprednostňujú sa kovalentné väzby. Napríklad sa môže vytvoriť karbodiimidová väzba medzi karboxy skupinami farmaceutického činidla a aminoskupinami molekuly protilátky. Na spojenie aminoskupiny liečiva s aminovými skupinami molekuly protilátky sa môžu použiť dvojfunkčné činidlá ako sú dialdehydy alebo imidoestery. Na spojenie liečiva s molekulou protilátky sa môžu použiť reakcie Schiffovej zásady. Tento spôsob vyžaduje použitie jodistanu na oxidáciu liečiva alebo cytostatickej látky, ktorá obsahuje glykolovú alebo hydroxylovú skupinu. Vytvára sa aldehyd, ktorý potom reaguje s molekulou protilátky. Pripojenie vzniká cez tvorbu Schiffovej zásady s aminoskupinami molekuly protilátky. Liečiva s reaktívnymi sulfhydrylovými skupinami môžu navyše kopulovať s molekulami protilátky.

Detekcia a stanovenie rozpustného fibrínu in vitro

Ako už bolo uvedené vyššie, hemostatické mechanizmy vyžadujú zložitú následnosť reakcií, ktorými sa fibrinogén s pomocou trombínu celkom premení na fibrín. Konečným výsledkom týchto reakcií je vznik trombusu (krvná zrazenina). Následnosť reakcií sa zjednodušene môže znázorniť trojstupňovým procesom:

- Stupeň 1 - Proteolýza: Fibrinogén (+ trombín) -> monoméry fibrínu + fibrínopeptidy A a B
- Stupeň 2 - Polymerizácia: Monoméry fibrínu <===> rozpustné fibrínové polyméry
- Stupeň 3 - Zrážanie: Rozpustný fibrínový polymér -> fibrínová zrazenina.

Fibrinogén pozostáva z troch párov neidentických polypeptidových reťazcov: $\text{A}\alpha$, $\text{B}\beta$ a γ . Pozri L. Stryer, Biochemistry, 3. vydanie, str. 249, W.H. Freeman and Company, New York (1988). V počiatočnom stupni, v ktorom sa fibrinogén mení na fibrín, hore označenom ako stupeň 1, sa fibrinogén štiepi trombínom, pričom z aminoskupinou zakončených

koncov dvoch fibrinogénových $A\alpha$ -reťazco vzniká fibrinopeptid A. Výsledný monomér je DesAA fibrínový monomér. Ako je tiež znázornené v stupni 1, súčasne, ale oveľa pomalšie trombín odštiepi z aminoskupinami zakončených koncov dvoch fibrinogénových $B\beta$ -reťazcov aj fibrinopeptid B. Výsledkom uvoľňovania fibrinopeptidu je, že sa na β a α reťazcoch fibrínu obnažujú a vystavujú na reakciu nové koncové aminoskupiny. V stupni 1 vznikajúce molekuly sú fibrinopeptid A, fibrinopeptid B a fibrínové monoméry DesAA a DesAABB, v hore uvedenej schéme vyznačené ako "monoméry fibrínu". Pozri W. Nieuweizen, Blood Coagulation and Fibrinolysis, 4:93 až 96 (1993). Ako je znázornené v stupni 2, monoméry fibrínu potom tvoria nekovalentné (nezosieťované) a kovalentné (zosieťované) väzby za vzniku rozpustných fibrínových polymérov. Rozpustné fibrínové polyméry potom tvoria fibrínovú zrazeninu, ako v schéme znázorňuje stupeň 3.

Rozpustný fibrín je definovaný ako akýkoľvek druh molekúl, vznikajúci z fibrinogénu alebo z fibrínu, ktorý môže viesť k vzniku fibrínových polymérov, alebo od fibrin(ogén)u odvodený druh molekúl, ktorý má molekulovú hmotnosť väčšiu ako je molekulová hmotnosť prírodného fibrinogénu, pričom sa zachováva vo forme roztoku v krvi. Nezosieťované a zosieťované polyméry DesAABB fibrínu, ktoré sa vytvorili v horeuvedenom druhom stupni sú dva druhy z viacerých druhov rozpustného fibrínu. Výraz rozpustný fibrín zahŕňa navyše rôzne iné druhy, napríklad polyméry DesAA fibrínu, komplexy tvorené interakciou medzi monomérmi fibrínu (buď DesAA alebo DesAABB fibrínovými monomérmi) a produktami rozkladu fibrinogénu X, Y, D a R (opis uvedených rozkladných produktov pozri v časti Monoklónová protilátka, špecifiká k fibrínu) a tiež, napríklad, DesAA a DesAABB monomérmi v komplexe s fibrinogénom, pozri Nieuwenhuizen, strany 93 až 94.

Rozpustné polyméry fibrínu sú prechodnými prekurzormi nerozpustného fibrínu, to znamená krvnej zrazeniny. S tým spojené zvýšenie hladiny rozpustných polymérov fibrínu v plazmách sa považuje za prejav ohrozenia alebo postihnutia

jednotlivcov trombózou (vznik vnútrocievnych krvných zrazenín). Dôkaz a stanovenie množstva týchto polymérov v krvi, osobitne rozpustných DesAABB fibrínových polymérov, bude preto užitočné ako ukazovateľ začínajúcej tvorby krvných zrazenín. Pozri Bang et al., Patent USA číslo 5 206 140.

Niektoré druhy rozpustného fibrínu sa v minulosti detegovali alebo stanovovali rôznymi spôsobmi, vrátane, napríklad stanovenia fibrinopeptidu A použitím protilátky k A α a gama epitopom, vystaveným na premenu fibrinogénu na fibrín, Nieuwehuizen, 94 až 96, a stanovenia D-dimérov, Marder et al., Patent USA číslo 5 206 140. Iné, už použité spôsoby na určenie prítomnosti alebo stanovenia množstva rozpustného fibrínu zahrnujú stanovenie aglutinácie erytrocytov, obalených fibrínom v prítomnosti rozpustného fibrínu, gélovú chromatografiu, zvýšenie aktivácie plazminogénu plazminogénovým aktivátorom t-PA, pozri Nieuwenhuizen na strane 94, geláciu etanolom alebo síranom protamínu, N-terminálnu analýzu fibrinogénových zvyškov, čistených z plazmy, zabudovanie ^{14}C značeného glycín-etyl esteru a agarózovú gélovú chromatografiu, pozri Bang a Chang na stranách 111 až 118. Ani jeden z týchto spôsobov však neumožňuje špecificky dokázať alebo stanoviť obsah oboch uvedených druhov polymérov, teda rozpustných zosieťovaných polymérov a rozpustných nezosieťovaných polymérov fibrínu.

In vitro stanovenie rozpustných zosieťovaných polymérov fibrínu a rozpustných nezosieťovaných polymérov fibrínu.

Tento vynález je založený na zistení, že možno uskutočniť in vitro určenie prítomnosti a stanovenie množstva rozpustných zosieťovaných DesAABB fibrínových polymérov a rozpustných nezosieťovaných DesAABB fibrínových polymérov. Uvedené polyméry obsahujú DesAABB polyméry fibrínu. Pri uvedenej analýze sa nezachytávajú (a) fibrinogén, (b) rozkladné produkty fibrinogénu, (c) DesAA fibrínové monoméry, (d) DesAA fibrínové polyméry, (e) DesAABB fibrínové monoméry, (f) zosieťovaný fibrinogén (fibrinogén po pôsobení faktora XIIIa) (g) komplex DesAA monoméru fibrínu a fibrino-

génu a (h) rozkladné produkty fibrínu ("druhy (a) až (h)"). Produkty rozkladu fibrinogénu a produkty rozkladu fibrínu sú také produkty, ktoré vznikajú účinkom plazmínu na fibrinogén alebo fibrín, ako sa opisuje v časti "Určenie krížovej reaktivity s fibrín(ogen)ovými produktami rozkladu".

Je pochopiteľné, že hore uvedená skúška je osobitne vhodná pri klinickej diagnostike stavov, vyznačujúcich sa trombózou.

Skúška sa môže vykonať s použitím vhodnej vzorky telových tekutín, ale prednostne sa vykoná s použitím vzorky krvi cicavcov. Vhodné cicavce zahŕňujú napríklad králiky, opice a ľudia, z čoho sa najviac uprednostňujú ľudia.

V uvedených analýzach sa môžu použiť známe, alebo v budúcnosti vyvinuté prostriedky na určenie rozpustných zosieťovaných DesAABB fibrínových polymérov a rozpustných nezosieťovaných DesAABB fibrínových polymérov, prostriedky, ktoré nezachytávajú druhy (a) až (h). Po detekcii sa vo vzorke stanoví množstvo rozpustných nezosieťovaných DesAABB fibrínových polymérov a rozpustných DesAABB nezosieťovaných polymérov buď porovnaním s kontrolnou vzorkou, alebo s použitím štandardných roztokov, ktoré obsahujú známe množstvá rozpustných zosieťovaných DesAABB fibrínových polymérov a rozpustných nezosieťovaných DesAABB fibrínových polymérov. Štandardy neobsahujú druhy (a) až (h).

Treba poznamenať, že prostriedok na určenie je akýkoľvek prostriedok, ktorým sa dá stanoviť prítomnosť dokazovateľného materiálu vo vzorke. Prednostným prostriedkom na určenie je protilátka k rozpustným zosieťovaným DesAABB fibrínovým polymérom a rozpustným nezosieťovaným DesAABB fibrínovým polymérom. Uvedená protilátka nedáva krížovú reakciu s (a) fibrinogénom (b) rozkladnými produktami fibrinogénu, (c) DesAA fibrínovými monomérmi, (d) DesAA fibrínovými polymérmi, (e) DesAABB fibrínovými monomérmi, (f) zosieťovaným fibrinogénom (fibrinogén po pôsobení faktora XIIIa), (g) komplexom DesAA monoméru fibrínu a fibrinogénu a (h) rozkladnými produktami fibrínu. Na určenie prítomnosti a stanovenie množstva rozpustného nezosieťovaného DesAABB

fibrínového polyméru a rozpustného nezosieťovaného DesAABB fibrínového polyméru vo vzorke sa môže použiť v tomto odseku uvedená protilátka. Takéto protilátky zahrnujú polyklonové a monoklonové protilátky, prednostne monoklonové. Protilátka sa môže odvodiť z ktoréhokoľvek druhu. Prednostne je však protilátka pôvodu ľudského, myšacieho alebo králičieho. Takéto protilátky ďalej zahrnujú chimérové protilátky, jednoreťazcové protilátky a fragmenty Fab, pričom protilátky nie sú uvedenými látkami obmedzené.

Príkladom uvedených protilátok je monoklonová protilátka MH1, ktorá je už opísaná v častiach "Stanovenie krížovej reaktivity s fibrinogenom" až "Stanovenie krížovej reaktivity s nezosieťovaným fibrínom a nezosieťovanými fibrínovými zrazeninami" a tiež v časti "Uloženie hybridómov". V uvedených častiach sa opisuje charakteristika spôsobu väzby uvedenej protilátky MH1 a navyš sa táto protilátka neviaže s komplexom rozkladných produktov fibrinogén-fibrínu. Táto vlastnosť protilátky MH1 môže zvýšiť jej účinnosť ako prostriedku na určenie prítomnosti a stanovenie množstva rozpustných zosieťovaných a rozpustných nezosieťovaných DesAABB fibrínových polymérov.

Treba poznamenať, že sa môžu použiť dve alebo viac protilátok v tom istom prostriedku na určenie a stanovenie. Na určenie prítomnosti a stanovenie množstva rozpustných zosieťovaných a rozpustných nezosieťovaných DesAABB fibrínových polymérov sa potom môžu v kombinácii použiť protilátky s rozdielnou špecifickosťou, napríklad vo vzorkách, kde ani jedna samotná protilátka nie je schopná tvoriť komplex s obidvoma druhmi polymérov: s rozpustnými DesAABB zosieťovanými a rozpustnými nezosieťovanými DesAABB fibrínovými polymérmi, zatiaľ čo kombinácia dvoch alebo viac protilátok môže takéto komplexy vytvoriť. Samozrejme, že žiadna z protilátok nemôže dávať krížovú reakciu s druhmi (a) až (h).

Treba poznamenať, že pri použití protilátok môže byť nevyhnutné použiť druhovo špecifické protilátky.

Na výrobu protilátok sa môžu imunizovať rôzne hostiteľské zvieratá injekciou rozpustných zosieťovaných DesAABB

fibrínových polymérov a rozpustných nezosieťovaných DesAABB fibrínových polymérov ako antigénov. Hostiteľské zvieratá môžu byť králiky, myši, krysy a tak ďalej, ale ich výber nie je týmto obmedzený. Uvedené polyméry sa môžu selektívne izolovať za použitia napríklad MH1 protilátky, viazanej na afinitnej kolóne Sepharose-proti látka MH1. Polyméry sa môžu pripraviť nasledovne: najprv sa môže pripraviť rozpustný fibrín in vitro pridaním nízkej hladiny trombínu do citrátovanej plazmy. Po poklese aktivity trombínu pridaním silného trombínového inhibitora ako je hirudín sa vzorky plazmy prenesú na stĺpec Sepharose - MH1. Táto kolóna Sepharose-MH1 sa môže pripraviť väzbou protilátky MH1 na bromidom kyanogénu aktivovanú Sepharosu 4B (Pharmacia) tak, ako je v tejto oblasti bežné. Pozri Pharmacia Products, vložku so spôsobmi prípravy kolóny protilátka-Sepharosa 4B za použitia predaktivovanej Sepharosy 4B. Spočiatku sa rozpustný fibrín preniesie na kolónu Sepharose-MH1 za prítomnosti fosforečnanom pufrovaného roztoku soli (PBS). Po naviazaní na stĺpec Sepharose-MH1, sa za prítomnosti PBS môže rozpustný fibrín, viazaný na kolóne Sepharose-MH1 eluovať použitím roztoku tiokyanátu sodného. Po dialýze proti PBS sa izolovaný rozpustný fibrínový polymér môže uchovávať pri -70°C .

Na zvýšenie imunitnej odozvy sa môžu v spojení s izolovanými polymermi použiť rôzne adjuvantá, v závislosti od druhu hostiteľa. Môžu sa použiť ďalej uvedené adjuvantá, ktorých výber však nie týmto obmedzený, vrátane Freundových adjuvant (úplných aj neúplných), minerálnych gélov ako je hydroxid hlinitý, povrchovo aktívnych látok ako je lyzolecitín, plurónové polyóly, polyanióny, peptidy, olejové emulzie, pohotový prísavný hemokyanín, dinitrofenol a potenciálne užitočné ľudské adjuvantá ako je BCG (bacille Calmette-Guerin) a corynebacterium parvum.

Monoklonové protilátky, špecifické k rozpustným zosieťovaným a rozpustným nezosieťovaným DesAABB fibrínovým polymérom, ktoré nedávajú krížovú reakciu s druhmi (a) až (g), sa môžu pripraviť využitím ktorejkoľvek techniky, ktorá umožňuje prípravu molekúl protilátky v kultúre s nepretrži-

tou bunkovou líniou. Uvedené techniky zahrnujú, ale ich zoznam nie je týmto vyčerpaný, hybridómovú techniku, pôvodne opísanú Köhlerom a Milsteinom, (Nature, 1975, 256:495 až 497), oveľa neskoršiu hybridómovú techniku s ľudskými B-bunkami (Kosbor et al., 1983, Immunology Today 4:72) a EBV-hybridómovú techniku (Cole et al., 1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., strany 77 až 96). Podľa ďalšieho uskutočnenia tohto vynálezu sa monoklonové protilátky môžu pripraviť v sterilných zvieratách s použitím súčasnej technológie, pozri časti "Materiály a postupy" až "Použitie systému bezantigénových zvierat na prípravu monoklonovej protilátky, špecifickej k fibrínu". Príkladom takejto prípravy protilátky je príprava MH1, opísaná hore v častiach "Príprava monoklonových protilátok použitím myši bez antigénov" až "Uloženie hybridómov".

Podľa tohto vynálezu sa ľudské protilátky môžu použiť alebo sa môžu získať použitím ľudských hybridómov (Cote et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci., 80:2026 až 2030), alebo transformovaním ľudských B-buniek s EBV vírusom in vitro (Cole et al., 1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., strany 77 až 96). Podľa tohto vynálezu sa môžu v skutočnosti použiť techniky, vyvinuté na prípravu "chimérových protilátok" (Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci., 81, 6851 až 6855; Neuberger et al., 1984, Nature, 312:604 až 608; Takeda et al., 1985, Nature, 314:452 až 454) štepením génov z molekuly protilátky z myši s vhodnou antigénovou špecifickosťou spolu s génmi z molekuly ľudskej protilátky s vhodnou biologickou aktivitou; takéto protilátky sú v rámci tohto vynálezu.

Podľa tohto vynálezu sa môže na prípravu špecifických jednoreťazcových protilátok prispôsobiť technika, opísaná na prípravu jednoreťazcových protilátok (Patent USA číslo 4 946 778).

Ďalšie uskutočnenie tohto vynálezu využíva techniku, opísanú na výstavbu Fab expresových knižníc (Huse et al., 1989, Science, 246:1275 až 1281). Tým sa umožní rýchla a ľahká identifikácia monoklonových Fab fragmentov s vyžado-

vanou špecifickosťou k rozpustným zosieťovaným a rozpustným nezosieťovaným DesAABB fibrínovým polymérom.

Fragmenty protilátky, ktoré obsahujú špecifické väzbové miesta k rozpustným zosieťovaným a rozpustným nezosieťovaným DesAABB fibrínovým polymérom sa môžu pripraviť známymi technikami. Fragmenty napríklad zahŕňujú, ale nie sú obmedzené na: $F(ab)_2$ fragmenty, ktoré sa môžu vyrábať pepsínovou digestiou molekuly protilátky a Fab fragmenty, ktoré môžu vzniknúť redukciou disulfidových mostíkov $F(ab)_2$ fragmentov.

Protilátky podľa tohto vynálezu sa môžu použiť v ktoromkoľvek z imunoanalytických systémov, známych v tomto odbore, zahrňujúcich, ale neobmedzujúcich sa na rádioimunoanalýzu, enzýmovú imunoabsorbentovú analýzu, "sendvičovú" analýzu, precipitačné reakcie, gélovú difúziu imunodifúziu analýzu, aglutinačné analýzy, fluorescenčné imunoanalýzy, proteínovú (A) imunoanalýzu a imunoelektroforézu analýzu, ako príklady niektorých z možných spôsobov. Patent USA číslo 4 629 783 a v ňom citované patenty tiež opisujú vhodné analytické spôsoby.

Protilátky sa môžu použiť ako základné činidlá v mnohých spôsoboch rôznych imunoanalýz na stanovenie prítomnosti rozpustných zosieťovaných a rozpustných nezosieťovaných DesAABB fibrínových polymérov vo vzorke krvi, alebo v iných telových tekutinách. Vo všeobecnosti sa protilátky môžu použiť v akomkoľvek type imunoanalýzy, kvalitatívnej ako aj kvantitatívnej. Toto zahŕňa dvojité sendvičovú analýzu, aj jednomiestnu sendvičovú imunoanalýzu nekonkurenčného typu, ako aj tradičné konkurenčné väzbové analýzy.

Sendvičová analýza, alebo inak skúška s dvojicou protilátok sa osobitne uprednostňuje vzhľadom na ľahkosť detekcie a kvantitatívnu podstatu tejto skúšky. Existuje značný počet rôznych úprav tejto skúšky. Všetky tieto úpravy sú zahrnuté do tohto vynálezu.

Napríklad v typickom postupe sendvičovej skúšky sa neznačkováná protilátka imobilizuje na tuhom substráte, napríklad v jamke kultivačnej platne a skúšaná vzorka sa privedie do styku s väzbovou molekulou. Po vhodnej dobe in-

kubácie, ktorej dĺžka je dostatočná na to, aby sa umožnil vznik binárneho komplexu protilátka-antigén sa pridá druhá protilátka, ktorá je značkováaná spravodajskou molekulou, schopnou vyvolávať detegovateľný signál. Inkubácia pokračuje, poskytujúc dostatočný čas na viazanie s antigénom na odlišnom mieste molekuly a na vznik ternárneho komplexu protilátka-antigén značená protilátka. Nezreagovaný podiel sa odstráni premývaním, prítomnosť antigénu sa stanoví sledovaním signálu, ktorý sa môže kvantifikovať porovnaním s kontrolnými vzorkami (štandardmi), obsahujúcimi známe množstvá antigénu. Rôzne úpravy sendvičovej skúšky zahrnujú simultánnu skúšku, pri ktorej sa vzorka a protilátka simultánne pridajú k väzbovej protilátke, alebo obrátenú (reverznú) sendvičovú skúšku, v ktorej sa najprv značená protilátka a skúšaná vzorka spoja, inkubujú a pridajú sa na povrch neoznačenej viazanej protilátky. Tieto techniky sú dobre známe odborníkom, skúseným v danom odbore a je zrejmé, že ľahko vznikajú malé úpravy postupov. Pri použití výrazu "sendvičová skúška" sa v tomto vynáleze rozumie, že zahrňuje všetky úpravy základnej dvojitej techniky.

Podrobnejší príklad typickej sendvičovej skúšky. Prvá protilátka je buď kovalentne alebo pasívne viazaná na tuhý nosič. Tuhý povrch je zvyčajne sklo alebo polymér, najčastejšie používanými polymérmi sú celulóza, polyakrylamid, nylon, polystyrén, polyvinylchlorid, alebo polypropylén. Tuhé nosiče majú byť v tvare trubičiek, perličiek, diskov alebo mikroplatničiek, alebo s akýmkoľvek iným tvarom povrchu, ktorý je vhodný na vykonanie imunoanalýzy. Väzbové postupy sú v odbore dobre známe. Príprava na vykonanie skúšky pokračuje premytím naviazaného komplexu tuhá fáza-protilátka. Potom sa k tuhému komplexu pridá alikvotná časť skúšanej telovej tekutiny a inkubuje sa tak dlhý čas, aby bol dostatočný na umožnenie väzby akéhokoľvek prítomného rozpustného nezosieťovaného DesAABB fibrínového polyméru a rozpustného zosieťovaného DesAABB fibrínového polyméru k protilátke, špecifickej k horeuvedeným proteínom. Potom sa k tuhému komplexu pridá druhá protilátka a inkubuje sa ďalej takú dobu,

ktorá je dostatočná na to, aby sa umožnila väzba druhej protilátky k primárnemu komplexu protilátka-antigén. Druhá protilátka sa viaže k spravodajskej molekule, ktorej viditeľný signál sa využije na indikáciu väzby druhej protilátky ku ktorémukoľvek antigénu vzorky. Výraz "spravodajská molekula" v tomto podrobnom opise znamená molekulu, ktorá svojou chemickou povahou poskytuje analyticky zistiteľný signál, ktorý umožňuje detekciu antigénom viazanej protilátky. Detekcia musí byť kvantifikovateľná, pri najmenšom aspoň porovnávaním so známymi vzorkami, aby umožňovala stanovenie množstva antigénu vo vzorke. Uvedené množstvo sa môže vypočítať absolútne, alebo sa môže určiť pomocou porovnania so štandardami (alebo sériami štandardov), obsahujúcimi známu hladinu obsahu antigénu.

Najbežnejšie používané spravodajské molekuly pre tento typ imunoanalýzy sú buď enzýmy alebo fluorofóry. Pri použití enzýmovej imunoanalýzy sa enzým spája s druhou protilátkou, často pomocou glutaraldehydu alebo jodistanu. Skúseným odborníkom v danej oblasti je dobre známe, že na pripojenie enzýmu k protilátke je známych veľa druhov rôznych konjugáčnych techník. Bežne používané enzýmy, medzi inými, zahŕňujú chrenovú peroxidázu, glukózovú oxidázu, β -galaktozidázu a alkalickú fosfatázu. Substráty, užívané so špecifickými enzýmami sa vo všeobecnosti vyberú tak, aby po hydrolýze zodpovedajúcim enzýmom poskytovali zistiteľnú zmenu farby. Napríklad, na použitie s konjugátom alkalickéj fosfatázy je vhodný p-nitrofenylfosfát; pre peroxidázový konjugát sa zvyčajne používa 1,2-fenyléndiamín alebo toluidín. Môžno tiež využiť fluorogenné substráty, ktoré poskytujú fluorescenčný produkt miesto chrómogenného substrátu, ako je uvedený vyššie. Vo všetkých prípadoch sa pridá enzýmovo značená protilátka, aby sa viazala ku komplexu. Prebytok činidla sa odstráni premývaním. Potom sa k trojnásobnému komplexu protilátky, antigénu a značenej protilátky pridá roztok obsahujúci príslušný substrát. Substrát reaguje s enzýmom viazaným na druhú protilátku, čím vzniká vizuálne zistiteľný kvalitatívny signál, ktorý sa môže ďalej kvantifikovať, zvyčajne

spektrofotometricky, čím sa získa údaj o množstve antigénu, ktoré je prítomné vo vzorke séra.

K protilátkam sa voliteľne môžu chemicky viazať (bez toho, že by to zmenilo ich schopnosť väzby) fluorescenčné zlúčeniny, ako je fluorescein alebo rodamín. Aktiváciou osvetlením svetlom určitej vlnovej dĺžky, fluorochrómom značená protilátka absorbuje svetelnú energiu, vyvoláva nabudený stav molekuly, nasledovaný emisiou svetla s charakteristickou vlnovou dĺžkou, ktorá je väčšia ako pôvodná vlnová dĺžka. Emisia sa prejavuje ako charakteristická farba, vizuálne zistiteľná optickým mikroskopom. Podobne ako v enzýmovej imunoanalýze (EIA), fluorescenčne značená protilátka sa môže viazať k prvému antigénovému komplexu. Po odstránení nadbytočného činidla premytím sa zostávajúci trojnásobný komplex vystaví svetlu príslušnej vlnovej dĺžky a pozoruje sa fluorescencia, ktorá poukazuje na prítomnosť antigénu. Obidva spôsoby, imunofluorescenčná analýza a EIA, sú veľmi zaužívané v odbore a sú osobitne uprednostňované. Môžu sa však použiť tiež iné spravodajské molekuly, ako sú rádioizotopy, chemiluminiscenčné alebo bioluminiscenčné molekuly. Skúseným odborníkom v danom odbore je zrejmé, ako možno upraviť postup, aby presne vyhovoval na vyžadované špecifické použitie.

Voliteľne sa môže použiť skúšaná vzorka, buď krv cicavca alebo telová tekutina, obsahujúca rozpustný nezosieťovaný fibrínový DesAABB polymér a rozpustný zosieťovaný DesAABB fibrínový polymér, na jednomiestnu imunoanalýzu, pri ktorej je vzorka zachytená na tuhý substrát, buď kovalentne alebo nekovalentne. Neznačená protilátka sa privedie do styku so vzorkou, viazanou k tuhému substrátu. Po vhodne dlhej dobe inkubácie, tak dlhej, aby doba bola dostatočná na umožnenie vzniku binárneho komplexu protilátka-antigén, pridá sa druhá protilátka, ktorá je značená spravodajskou molekulou, schopnou vyvolať detegovateľný signál. Inkubácia pokračuje vhodný čas na umožnenie vzniku trojnásobného komplexu antigénu, protilátky a značenej protilátky. Pri jednomiestnej imunoanalýze môže byť druhá protilátka všeobecnou protilátkou (to znamená zenogénová protilátka k imunoglobulínu, osobitne

anti-(IgM a IgG) viazaná k spravodajskej molekule), ktorá je schopná viazať protilátku, ktorá je špecifická k rozpustnému zosieťovanému fibrínovému polyméru a k rozpustnému nezosieťovanému fibrínovému polyméru.

Detekcia a stanovenie množstva rozpustných nezosieťovaných DesAABB fibrínových polymérov a rozpustných zosieťovaných DesAABB fibrínových polymérov in vitro sú osobitne užitočné tam, kde sa detekcia a stanovenie vykonajú s použitím plazmy pacientov s cieľom získať indikáciu nastávajúcej alebo už existujúcej trombotickej príhody, spôsobenej nastávajúcou alebo už existujúcou trombózou. Pozri napríklad W. Nieuwenhuizen, str. 94, Bang and Chang, strany 109 až 122 a Marder et al., Patent USA číslo 5 206 140. Uvedené príhody zahŕňajú napríklad trombózu hlbokých žíl ("DVT"), stav, ktorý nastáva ako následok krvnej zrazeniny v hlbokých žilách nôh; pľúcny embolizmus (PE), ktorý vzniká, keď sa trombus (krvná zrazenina) odpútava z hlbokých žíl a embolizuje do pľúcneho cievneho zväzku; rozptýlená vnútrocievna koagulácia, ktorá vzniká ako následok sústavnej aktivácie kaskády zrážania krvi (napríklad pri bakteriálnych nákazách); infarkt myokardu (MI-myocardial infarction), ktorý vzniká ako výsledok trombusu, okludovaného na srdcových tepnách, ktoré dodávajú krv do srdcového svalu; porážka a vnútro srdcové tromby, vytvorené ako následok artálnej fibrilácie. Použitím skúšky na detekciu a stanovenie rozpustných nezosieťovaných DesAABB fibrínových polymérov a rozpustných zosieťovaných DesAABB fibrínových polymérov v kombinácii s pozorovaním ďalších symptómov pacienta možno diagnostikovať typ trombotickej príhody. Uvedené symptómy pacienta sú také, ktoré sa bežne využívajú pri klinickej diagnóze nastávajúcich alebo existujúcich trombotických príhod. Uvedená detekcia a stanovenie rozpustných nezosieťovaných DesAABB fibrínových polymérov a rozpustných zosieťovaných DesAABB fibrínových polymérov sú osobitne užitočné ako prostriedok na diferenciálne diagnostikovanie pacientov s bolesťou v hrudi v dôsledku začínajúceho MI od pacientov, ktorí majú bolesti v hrudi v dôsledku iných stavov.

Príklady materiálov a spôsobov

Proteíny

Albumín a trombín bovinného séra sa získali od ICN (Costa Mesa, CA, USA). Hirudín, chrenová peroxidáza a dihydrochloridové o-fenyléndiamínové substrátové tablety boli dodané Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Ľudský fibrinogén (čistota L) sa zakúpil od Helena Laboratories (Beaumont, TX, USA). Fibrinogén sa ďalej čistil zrážaním síranom amónnym podľa údajov Holm et al., Thromb. Res., 37, 165-176 (1985). V systéme skúšok použitá anti-fibrínová monoklonová protilátka MH1 sa pripravila spôsobom, ktorý sa opisuje hore v časti "Monoklónová protilátka, špecifiká fibrínu". Antifibrinogénová monoklonová protilátka 45J sa pripravila spôsobom, ktorý sa opisuje v časti "Monoklónová protilátka, špecifiká fibrínu" tohto textu.

DesAABB fibrínový monomér sa pripravil rozpustením nezosieťovaného fibrínového polyméru v roztoku 50 mM pufru z octanu sodného (pH 5,3), ktorý obsahoval bromid sodný.

Rozpustné zosieťované DesAABB polyméry sa pripravili inkubáciou fibrinogénu alebo citrátovanej plazmy s nízkou hladinou trombínu (0,025 jednotiek/ml) po dobu 5 až 7 minút. Reakčná zmes tiež obsahovala faktor XIIIa. Reakcia sa prerušila prídavkom hirudínu do reakčnej zmesi, výsledná koncentrácia 10 ATU/ml).

Nezosieťované rozpustné DesAABB fibrínové polyméry sa pripravili inkubáciou citrátovanej plazmy alebo fibrinogénu roztokom trombínu, obsahujúcim EDTA (12 mM, výsledná koncentrácia) počas 7 až 8 minút pri 37 °C. Reakcia sa zastavila prídavkom prebytku hirudínu do reakčnej zmesi, (výsledná koncentrácia 10 ATU/ml).

Konjugáty MH1 a 45J s chrenovou peroxidázou

(Prevzaté z: Wilson a Nakane, Immunofluorescence and Related Staining Techniques, Knapp, et al. (eds.), strany 215 až 224, Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam (1978)).

Chrenová peroxidáza (HRP) (RZ >3) (10 mg) sa rozpustila v 1 ml destilovanej vody. Pridal sa čerstvo pripravený 0,1 M roztok jodistanu sodného (0,4 ml) a zmes sa silno miešala 20 minút. S použitím mikrokonzentrátoru Centricon 10 sa potom roztok preniesol do pufru z octanu sodného (1 mM, pH 4,4) pri 4 °C.

Pridaním 40 µl 0,2 M pufru z uhličitanu a hydrogenuhličitanu sodného (pH 9,5) sa pH roztoku zvýšilo na 9,5. Ihneď po zvýšení pH sa pridala protilátka MH1 (20 mg) v 2,0 ml 0,01 M pufru z uhličitanu-hydrogenuhličitanu sodného (pH 9,5). Roztok sa mierne miešal pri teplote miestnosti počas 2 hodín. Potom sa pridalo 0,2 ml čerstvo pripraveného roztoku bórhydridu sodného (4 mg/ml). Zmes sa ponechala stať dve hodiny pri 4 °C.

Nakoniec sa konjugát protilátky s HRP dialyzoval proti 5 x 4 litrom PBS pri 2 až 8 °C.

Konjugát sa uchovával v hnedej nádobe pri 2 až 8 °C.

Vzorky krvi

Vzorky krvi sa odobrali so súhlasom zdravých dobrovoľníkov a od pacientov z jednotiek intenzívnej starostlivosti so symptómami MI, napríklad s výraznými bolesťami v hrudi. Vzorky krvi sa vložili do citranu sodného s použitím Vacutainer-ov (Becton Dickinson). 15 - minútovým odstredením pri 2400 otáčok za minútu sa oddelila plazma. Plazma sa buď ihneď použila alebo sa zmrazená uložila pri -70 °C.

Stanovenie rozpustného fibrínu spôsobom ELISA

Rozpustný fibrín sa určoval vo vzorkách čerstvej alebo mrazenej plazmy s použitím sendvičového typu enzýmového imunoabsorbentového systému. Viazanou protilátkou v tomto súčasnom vynáleze bola antifibrínová protilátka MH1. Detekčnou (alebo značkovou) protilátkou bol HRP konjugát rovnakej protilátky. Alternatívne sa ako detekčná protilátka použil konjugát antifibrinogénovej protilátky 45J.

Polyvinylchloridové 96-jamkové mikrotitračné platne sa pokryli monoklonovou protilátkou MH1 tak, že sa v povlaku

pufra (boritan sodný, pH 8,5) počas 12 až 16 hodín inkubovalo 100 μ l roztoku Mab (pri 50 μ g/ml) pri teplote 4 °C. Premývaním jamiek sa z platní odstránila neviazaná protilátka. Premývalo sa trikrát roztokom PBS-Tween. S MH1 pokryté jamky sa prekryli s BSA prostredníctvom inkubácie s 200 μ l roztoku BSA (1 %-ný) v PBS (PBS-BSA) počas 1. hodiny pri teplote 37 °C. Neviazaná BSA sa odstránila po obrátení platní miernym osušením papierovou osuškou. V jamkách obsadených s MH1-BSA sa inkubovali citrátované vzorky (50 μ l), ktoré obsahovali rozpustný fibrín. Inkubácia sa viedla 30 minút pri 37 °C. Neviazané látky sa odstránili otočením kultivačných platní a miernym osušením papierovou osuškou. Jamky sa potom trikrát premyli s PBS-Tween. Viazaný rozpustný fibrín sa v jamkách detegoval najprv inkubáciou s 100 μ l PBS-BSA roztoku konjugátu MH1-HRP (alebo HRP konjugátu s antifibrín(ogén)ovou protilátkou 45J) počas 30 minút pri teplote 37 °C. Neviazaný konjugát sa odstránil obrátením platní a trojnásobným premytím jamiek s roztokom PBS-Tween. Viazaný konjugát sa detegoval prídavkom 100 μ l roztoku dihydrochloridu O-fenyléndiamínu pri teplote miestnosti po dobu 10 minút. Roztok substrátu sa pripravil rozpustením tabľety dihydrochloridu O-fenyléndiamínu v roztoku citranu sodného, obsahujúcom H_2O_2 .

Vývoj sfarbenia sa prerušil po 10 minútach prídavkom 25 μ l 1 M roztoku kyseliny sírovej. Pri 490 nm sa stanovila absorbanca roztokov v každej jamke s použitím snímača mikrotitračných platní Thermomax (Molecular Device, Menlo Park, CA, USA).

Príprava kolón na afinitnú chromatografiu

Kolóny Sepharose-MH1 sa pripravili nasledovne:

Odvážil sa 1 g vymrazovaním vysušenej a bromidom kyano génu aktivovanej Sepharosy 4 B (Pharmacia) a látka sa suspendovala v 1 mM roztoku HCl. Vylúčený gél sa premýval 15 minút 1 mM roztokom HCl na filtri so sklenou fritou.

Vo väzbovom pufri (0,1 M roztok $NaHCO_3$, pH 8,3, obsahujúcom 0,5 M NaCl) sa rozpustila protilátka MH1 (20 mg)

a opatrne sa zmiešala s vylúčeným gélom. Miešanie sa vykonalo v uzavretej nádobe počas 2 hodín pri teplote miestnosti alebo pri 4 °C cez noc.

Po zmiešaní sa gél premyl väzbovým pufrom na odstránenie nadbytku protilátky. Neobsadené aktívne miesta sa obsadili pôsobením 0,1 M roztoku Tris HCl, pH 8,0 (alebo 1 M roztoku etanolamínu, pH 9,0) počas 2 hodín pri teplote miestnosti. Potom sa gél s viazanou protilátkou trikrát premyl s 0,1 M octanovým pufrom (pH 4,0, obsahujúcim 0,5 M NaCl), potom Tris-pufrom (0,1 M roztokom, pH 8, obsahujúcim 0,5 M NaCl). Viazaná protilátka sa uchovávala pri 4 °C v roztoku azidu sodného (1 %-ný roztok).

Kolóny Sepharose-DesAABB fibrínový monomér sa pripravili nasledovne: DesAABB fibrínové monoméry sa viazali na Sepharosu 4B, aktivovanú bromidom kyanogénu v prítomnosti 1 M NaBr v 0,1 M boritanovom pufri (pH 8,2) rovnakým spôsobom, aký sa použil pri príprave kolóny Sepharose-MH1.

Charakter rozpustného fibrínu, skúmaný in vitro analýzou rozpustných fibrínových polymérov s použitím MH1 na detekciu rozpustného fibrínu

V časti "Stanovenie špecifickosti k fibrínu" sa už uviedlo, že protilátka MH1 nerozoznáva fibrinogén, ktorý je v plazme prekursorom fibrínového polyméru. V uvedenej časti sa tiež uviedlo, že použitá protilátka rozoznáva obidva fibrínové polyméry, aj zosieťovaný aj nezosieťovaný fibrínový polymér. Navyše sa v tejto časti ukázalo, že rozklad fibrínu plazmínom, (alebo ktorýkoľvek proces, ktorý vedie k rozkladu fibrínovej polymérnej štruktúry) spôsobuje pokles imunitného rozoznávania fibrínu uvedenou protilátkou. Z toho vyplýva, že protilátka MH1 nerozoznáva nijaký zo známych, pôsobením plazmínu vzniknutých, rozkladných produktov zosieťovaného fibrínu.

Dôkaz, že protilátka MH1 rozoznáva iba polymérne štruktúry DesAABB fibrínu a nerozoznáva monomérne desAABB fibrínové jednotky sa získal afinitnou chromatografiou. Stručne, 0,5 mg protilátky MH1 sa prelialo 5 mililitrovou

kolónou Sepharose-desAABB fibrínový monomér. Kolóna sa premyla vyrovnávacím pufrom (0,1 M tris pufrovaný roztok soli (TBS), pH 8,5). Nezistila sa žiadna významná väzba protilátky na kolóne. Na obrázkuku 1A je znázornené ako sa protilátka eluuje pri priechode kolónou. Ak sa kolóna eluovala 6 M roztokom hydrochloridu guanidínu, tak sa uvoľnil a získal malý podiel viazaného proteínu. Proteín sa dokazoval pri monitorovaní všetkých frakcií pri 280 nm. Protilátka sa stanovila skúšaním imunoreaktivity proteínu spôsobom ELISA s tuhým adsorbentom s použitím mikrotitračných jamiek, pokrytých fibrínom. Pozri časť "Dôkaz prítomnosti a stanovenie protilátky" na opis použitého spôsobu ELISA. Na kolóne viazaný proteín je dôsledkom prítomnosti malého množstva znečisťujúceho rozpustného DesAABB fibrínového polyméru, zachyteného na kolóne s DesAABB fibrínovým monomérom. Toto znečistenie pochádza z východiskového materiálu, ktorý sa použil pri príprave DesAABB fibrínovej monomérovej kolóny. Aby sa preukázalo, že kolóna Sepharose-DesAABB fibrínový monomér je schopná viazať protilátku, v kontrolnom pokuse sa kolónou preliala fibrinogénová špecifická monoklonová protilátka (Mab). Z obrázkuku 1B je zrejmé, že elúcia protilátky 45J vyžaduje kolónou viazaný kontrolný Mab, antifibrinogénovú protilátku 45J a pôsobenie hydrochloridu guanidínu (6 M).

Horeuvedený dôkaz, že protilátka MH1 rozoznáva aj zosieťované, aj nezosieťované rozpustné DesAABB fibrínové polyméry sa získal pokusom, v ktorom rozpustné DesAABB fibrínové polyméry vznikali účinkom trombínu na citrátovanú plazmu v prítomnosti a v neprítomnosti EDTA (EDTA zabraňuje faktoru XIIIa zosieťovať DesAABB fibrínové polyméry). Uvedené zosieťované a nezosieťované DesAABB fibrínové polyméry sa pripravili spôsobom, opísaným v časti "Proteíny" a ich príslušné imunoreaktivity sa stanovili použitím ELISAnalýzy, ako sa uvádza v časti "Stanovenie rozpustného fibrínu spôsobom ELISA". Ako je znázornené na obrázku 2, použitým skúšobným systémom sa nezistil nijaký významný rozdiel imunoreaktivity medzi zosieťovanými (B) a nezosieťovanými (C) fibrínovými polymérmi.

Dôkaz, že protilátka MH1 nerozoznáva rozpustný desAA fibrínový polymér sa získal pokusom, v ktorom sa DesAA fibrínový polymér pripravil z fibrinogénu alebo plazmy pôsobením z hadieho jedu odvodeného enzýmu batroxobínu z Bothrops atrox, ktorý z molekuly fibrinogénu selektívne odštiepuje fibrinopeptid A (FPA). Batroxobín neodštiepuje fibrinopeptid B (FPB), na rozdiel od trombínu, ktorý odštiepuje obidva, FPA a FPB. Výsledkom odstránenia FPA je polymerizácia desAA fibrínovej monomérskej jednotky a vznik DesAA fibrínovej zrazeniny. Obrázok 3 predstavuje vznik zrazeniny meraním absorbancie reakčnej zmesi pri 340 nm, keď sa vzorka fibrinogénu inkubovala s roztokom batroxobínu. Inkubácia prebiehala 15 minút pri teplote miestnosti. Absorbancia sa s časom postupne zvyšovala tak, ako sa zvyšovala dĺžka a koncentrácia rozpustných DesAA fibrínových polymérov až sa nakoniec vytvorila zrazenina. V pokuse, v ktorom sa skúšala MH1 na rozoznávanie desAA fibrínu sa desAA fibrínový polymér pripravil in vitro inkubáciou vzorky fibrinogénu s batroxobínom (výsledná koncentrácia 0,5 jednotiek/ml) pri 37 °C. Zo vzorky, spracovanej s batroxobínom sa po siedmych minútach odobrala alikvótna časť a skúšala sa spôsobom ELISA, opísanom v časti "Stanovenie rozpustného fibrínu spôsobom ELISA". V tejto vzorke sa nezaznamenala nijaká reaktivita (vzorka C), čo je znázornené na obrázku 4. Z tohto experimentu možno ďalej usúdiť, že systém skúšky nerozoznáva komplex fibrinogénu s DesAA fibrínom, ktorý je ďalším zdrojom rozpustného fibrínu. Reakčná zmes, získaná v tomto experimente by zreteľne obsahovala takéto "rozpustné fibrínové" prvky, pretože batroxobín produkuje desAA fibrínové monoméry, ktoré môžu bez zábran vstupovať do interakcie s inými desAA monomérmi, alebo s digesciou neovplyvnenými fibrinogénovými molekulami.

Pretože sa po prídavku batroxobínu systémom skúšky nepreukázala nijaká reakcia, môže sa vysloviť uzáver, že sa tieto fibrinogénové-desAA fibrínové jednotky pri skúške nedetegujú. Vzorka B, ktorá je pozitívnou kontrolou, pozostávala z DesAABB fibrínových polymérov, vzniknutých spracovaním vzorky plazmy s trombínom a hirudínom. Neovplyvnený fib-

rinogén - vzorka A - sa zvolil ako negatívna kontrolná vzorka.

Rozpustný fibrínový komplex môže tiež vzniknúť účinkom faktoru XIIIa zosieťovaním pôvodných molekúl fibrinogénu na molekuly fibrinogénových dimérov (Kanaide et al., J. Lab. Clin. Med., 86, : 574 až 579 (1975). Použitým postupom skúšky sa nedeteguje fibrinogén, ovplyvnený faktorom XIIIa (FXIIIa). V tomto pokuse sa na fibrinogén v jamkách mikrotitračných platní najprv pôsobilo trombínom, aktivovaným faktorom XIIIa po dobu 1,5 hodiny pri 37 °C. Po prerušení ostávajúcej trombínovej aktivity sa protilátka MH1 inkubovala v jamkách spracovaných s FXIIIa a na detekciu viazanej protilátky MH1 sa použil konjugát protimýšacej alkalické fosfatázy. Detekcia viazanej myšacej protilátky sa vykonala pridaním substrátu alkalické fosfatázy. Hladina viazanej MH1 v bunkách sa stanovila odčítaním absorbancie pri 490 nm. Výsledok zo vzorky, na obrázku 5 označenej ako Fg+FXIIIa ukazuje, že sa v jamkách neviazala nijaká MH1, čo naznačuje, že protilátka nerozoznáva zosieťované fibrinogénne štruktúry. Ako pozitívna kontrolná vzorka sa jamky s fibrinogénom spracovali trombínom, čím vznikli desAABB fibrínové polyméry, ktoré sa skúšali na imunoreaktivitu s protilátkou MH1 - na obrázku 5 je to vzorka označená ako Fg+Trombín.

Stanovenie priebehu vzniku rozpustného DESAABB fibrínového polyméru

Rozpustné DesAABB fibrínové polyméry sa pripravili *in vitro* pridaním nízkej hladiny obsahu trombínu (0,025 NIH jednotiek/ml) k vzorke citrátovanej plazmy. Vzorka sa inkubovala pri 37 °C. Zo vzorky sa v 1 minútových intervaloch odoberali alikvótne podiely. V odobratom podieli sa vždy prerušila aktivita trombínu pridaním účinného trombínového inhibitora, hirudínu (výsledná koncentrácia 2 ATU/ml). Množstvo rozpustného DesAABB fibrínového polyméru v každej alikvótnej časti sa stanovilo spôsobom ELISA, ktorý sa opisuje v časti "Stanovenie rozpustného fibrínu spôsobom ELISA".

Po pridání trombínu ku plazme po počiatočnej indukčnej perióde v trvaní 4 až 5 minút vzrastá množstvo rozpustného fibrínového polyméru, ako je znázornené na obrázku 6 závislosťou absorbancie pri 490 nm od času. Hladina obsahu rozpustných fibrínových polymérov vrcholí približne v 7,5 minúte po pridání trombínu k plazme. Náhlý pokles hladiny rozpustného fibrínu, pozorovaný po 9 až 10 minútach koinciduje s želatináciou a vznikom nerozpustných fibrínových polymérov (vznik zrazeniny).

Čistenie rozpustných fibrínových polymérov z plazmy pomocou afinitnej chromatografie na sepharose - MH1

Vzorka plazmy sa inkubovala s trombínom (0,025 jednotiek/ml) počas 7 minút pri 37 °C. Aktivita trombínu sa preušíla prídavkom nadbytku hirudínu. Reakčná zmes sa nechala prejsť kolónou. Pomocou spôsobu ELISA, opísanom v časti "Stanovenie rozpustného fibrínu spôsobom ELISA" sa hodnotila imunoreaktivita s MH1 z východiskového materiálu, z prejdenej kvapaliny (neviazaný materiál), z viazaného proteínu (čistený proteín), ktorý sa eluoval s použitím NaSCN a dialyzoval proti PBS. Imunoreaktivity trombínom ovplyvnenej plazmy po prerušení aktivity trombínu hirudínom (východiskového materiálu - v obrázkue: Starting material), viazaného proteínu po vymytí z kolóny a dialýze (eluátu - v obrázkue: Elution) a neviazaného materiálu (neviazaného - v obrázkue: Nonbound) sú znázornené na obrázku 7. Východiskový materiál a viazaný proteín po dialýze boli imunoreaktívne s MH1, zatiaľčo neviazaný materiál imunoreaktivitu nemal.

In vitro určenie a stanovenie rozpustných zosieťovaných a rozpustných nezosieťovaných fibrínových polymérov na účely diagnostiky MI

Skúšalo sa 36 vzoriek rôznej plazmy. Stanovovala sa hladina rozpustného zosieťovaného a rozpustného nezosieťovaného DesAABB fibrínového polyméru s využitím skúšky ELISA, opísanej v časti "Stanovenie rozpustného fibrínu spôsobom

ELISA" s protilátkou MH1 ako kotviacou protilátkou. Vzorky plazmy sa po odobratí zmiešali s antikoagulantom a zmrazili. Rozmrazené vzorky sa skúšali na rozpustný zosieťovaný a rozpustný nezosieťovaný DesAABB fibrínový polymér. Desať z uvedených 36 vzoriek sa získalo od pracovníkov laboratória, ktorí boli vo výbornom zdravotnom stave a ktorí sa nestretli s bolesťou v hrudníku ani po únave. Všetky ostatné vzorky sa odobrali od pacientov miestnej verejnej nemocnice. Všetci pacienti z miestností pre náhle prípady mali klinické symptómy (bolesť v hrudi), poukazujúce na infarkt myokardu (MI); u 15 pacientoch sa potvrdilo, že trpia MI; u všetkých ostatných 11 pacientov sa potvrdilo, že nie sú ohrození MI. Posledne uvedená skupina pacientov bola diagnostikovaná s rôznymi klinickými stavmi vrátane angíny pectoris, anxiety alebo pľúcneho edému. Vzorky krvi sa odobrali pacientom ihneď po ich prijatí do miestnosti pre náhle prípady. Vo väčšine prípadov sa zaznamenal údaj o dĺžke trvania symptómov. V tejto štúdii všetci pacienti udávali, že bolesť v hrudi nastala pred 1 až 3 hodinami pred prijatím do nemocnice. Ako je znázornené na obrázku 8, vo všetkých prípadoch pacienti s potvrdenou diagnózou MI mali vyššiu hladinu obsahu rozpustných fibrínových DesAABB polymérov ako kontrolní zdraví pacienti (3 až 30 násobný rozdiel). U pacientov, ktorí pociťovali bolesť v hrudi, ale bez diagnózy MI, nebola hladina rozpustných DesAABB fibrínových polymérov významne odlišná od zdravých pacientov. (Hladiny rozpustných zosieťovaných a rozpustných nezosieťovaných DesAABB fibrínových polymérov sú znázornené ako: Hladina rozpustného fibrínu v ELISA jednotkách ($\times 1000$) [v obrázku: Level of Soluble Fibrin Elisa Units ($\times 1000$)].

Z uvedeného vyplýva, že citlivosť uvedeného systému skúšky bola 100 % (pre $n = 36$) a špecifickosť bola tiež 100 % (pre $n = 36$), to znamená, že nebol ani jeden negatívny ani jeden pozitívny nesprávny prípad. Preto možno tvrdiť, že pre infarkt myokardu má tento systém skúšky vysokú hladinu diagnostickej presnosti.

Suprava na in vitro detekciu zosieťovaných rozpustných fibrínových polymérov a rozpustných nezosieťovaných fibrínových polymérov

Je zrejmé, že tento vynález sa neobmedzuje iba na použitie monoklonovej protilátky pri skúške. Ak sa ale taká protilátka použije v súvislosti so súpravou, opísanou v ďalšom texte, potom súpravy obsahujú sadu štandardov, prvú protilátku (to znamená väzbovú protilátku, napríklad MH1), ktorá sa môže imobilizovať na tuhom povrchu, a druhú protilátku, značenú zdrojom signálu, ako sa opisuje hore. Takéto súpravy obsahujú štandardy vo forme známych množstiev rozpustného zosieťovaného DesAABB fibrínového polyméru a rozpustného nezosieťovaného DesAABB fibrínového polyméru. Uvedené štandardy sa môžu pripraviť izoláciou rozpustných zosieťovaných a rozpustných nezosieťovaných DesAABB fibrínových polymérov za použitia MH1 - Sepharose-ovej afinitnej kolóny, ako sa opisuje hore. Súpravy môžu tiež obsahovať špecifické pufre, separačné činidlá a kontrolné vzorky. Súpravy môžu obsahovať pomôcky a chemikálie na spracovanie hodnotených vzoriek.

Všetky hore citované publikácie a patenty sú tu zahrnuté odkazmi.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Spôsob in vitro dôkazu prítomnosti alebo stanovenia množstva rozpustných zosieťovaných DesAABB fibrínových polymérov a rozpustných nezosieťovaných DesAABB fibrínových polymérov vo vzorkách cicavcov, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že zahrňuje privedenie uvedených vzoriek do styku s protilátkou alebo s jej imunoreaktívnym fragmentom, ktorá sa špecificky viaže k rozpustným zosieťovaným DesAABB fibrínovým polymérom a rozpustným nezosieťovaným DesAABB fibrínovým polymérom za vzniku ich imunokomplexu, ktorého protilátka alebo jej imunoreaktívny fragment sa špecificky neviaže k: (a) fibrinogénu, (b) rozkladným produktom fibrinogénu, (c) DesAA fibrínovým monomérom, (d) DesAA fibrínovým polymérom, (e) DesAABB fibrínovým monomérom, (f) zosieťovanému fibrinogénu, (g) komplexu DesAA fibrinového monoméru - fibrinogénu a (h) rozkladným produktom fibrínu, a deteguje prítomnosť alebo množstvo imunokomplexu.

2. Spôsob podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že protilátka sa špecificky viaže k epitopu, rozoznávanému monoklonovou protilátkou označenou MH1, produkovanou hybridómom ATCC HB 9739.

3. Spôsob podľa nároku 2, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že v uvedenej protilátkou je monoklonová protilátka, označená MH1, produkovaná hybridómom ATCC HB 9739.

4. Spôsob podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že vzorka cicavca je ľudskou vzorkou.

5. Spôsob podľa nároku 4, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že ľudská vzorka je telovou tekutinou.

6. Spôsob podľa nároku 5, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že telová tekutina je krv.

7. Spôsob podľa nároku 1, v ktorom sa uvedený imunokomplex deteguje alebo kvantifikuje použitím sekundárnej protilátky alebo jej imunoreaktívneho fragmentu, ktorý sa špecificky viaže k uvedenému imunokomplexu, v ktorom je uvedená sekundárna protilátka alebo jej imunoreaktívny fragment značený spravodajskou molekulou, ktorá poskytuje detegovateľný signál, ktorý sa meria a ktorý je v korelácii s prítomnosťou, alebo s množstvom uvedeného imunokomplexu.

8. Spôsob podľa nároku 7, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sekundárnou protilátkou je protilátka, ktorá sa viaže k epitopu, rozoznávanému monoklonovou protilátkou, označenou 45J, produkovanou hybridómom ATCC HB 9740.

9. Spôsob podľa nároku 8, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že ktorom sekundárnou protilátkou je monoklonová protilátka, označená 45J, produkovaná hybridómom ATCC HB 9740.

10. Spôsob vyhodnotenia predispozície k trombotickej príhode, podporujúci diagnózu vzniku trombotickej príhody, alebo monitorujúci trombotickú príhodu u cicavcov, zahrnujúci určenie množstva rozpustných zosieťovaných DesAABB fibrínových polymérov a rozpustných nezosieťovaných DesAABB fibrínových polymérov vo vzorke z uvedených cicavcov, zahrnujúci privedenie uvedenej vzorky do styku s protilátkou, alebo jej imunoreaktívnym fragmentom za vzniku ich imunokomplexu, ktorého protilátka, alebo jej imunoreaktívny fragment, sa špecificky neviaže k: (a) fibrinogénu, (b) rozkladným produktom fibrinogénu, (c) DesAA fibrínovým monomérom, (d) DesAA fibrínovým polymérom, (e) DesAABB fibrínovým monomérom, (f) zosieťovanému fibrinogénu, (g) komplexu DesAA fibrínového monoméru - fibrinogénu a (h) rozkladným produktom fibrínu aby s nimi vytváral imunokomplex, a zahrnujúci detekciu podielu uvedeného imunokomplexu a porovnanie uvedeného podielu s kontrolnou vzorkou umožnil vyhodnotiť predispozíciu k trombotickej príhode, alebo vznik trombotickej príhody, alebo monitorovanie trombotickej príhody cicavca.

11. Spôsob podľa nároku 10, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že uvedená protilátka sa špecificky viaže k epitopu, rozoznávanom monoklonovou protilátkou, označenou MH1, produkovanou hybridómom ATCC HB 9739.

12. Spôsob podľa nároku 11, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že uvedenou protilátkou je monoklonová protilátka, označená MH1, produkovaná hybridómom ATCC HB 9739.

13. Spôsob podľa nároku 10, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že trombotická príhoda je zo skupiny, zahrnujúcej infarkt myokardu, trombózu hlbokých ciev, pľúcny embolizmus, rozsiate vnútrocievne koagulácie, porážku a vnútrošrdcový trombus, vzniknutý ako následok fibrilácie srdca.

14. Spôsob podľa nároku 10, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že vzorkou cicavca je ľudská vzorka.

15. Spôsob podľa nároku 14, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že ľudská vzorka je telová tekutina.

16. Spôsob podľa nároku 15, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že telová tekutina je krv.

17. Spôsob podľa nároku 10, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa množstvo imunokomplexu stanoví použitím sekundárnej protilátky alebo jej imunoreaktívneho fragmentu, ktorá sa špecificky viaže k imunokomplexu, v ktorom je sekundárna protilátka alebo jej imunoreaktívny fragment značená spravodajskou molekulou, ktorá poskytuje detegovateľný signál, ktorý sa meria a ktorý je v korelácii s množstvom uvedeného imunokomplexu.

18. Spôsob podľa nároku 17, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sekundárnou protilátkou je protilátka, ktorá sa viaže k epitopu, rozoznávanému monoklonovou protilátkou označenou 45J, produkovanou hybridómom ATCC HB 9740.

19. Spôsob podľa nároku 18, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sekundárnou protilátkou je monoklonová protilátka, označená 45J, produkovaná hybridómom ATCC 9740.

20. Súprava na in vitro detekciu prítomnosti alebo stanovenie množstva rozpustných zosieťovaných DesAABB fibrínových polymérov a rozpustných nezosieťovaných DesAABB fibrínových polymérov vo vzorke cicavca, pričom súprava obsahuje:

(a) odmerané množstvá štandardov, obsahujúcich uvedené rozpustné zosieťované DesAABB fibrínové a rozpustné nezosieťované DesAABB fibrínové polyméry;

(b) prostriedky na vytvorenie imunokomplexu s uvedenými rozpustnými zosieťovanými DesAABB fibrínovými polymérmi a uvedenými rozpustnými nezosieťovanými DesAABB fibrínovými polymérmi, pričom uvedené prostriedky obsahujú protilátku alebo jej imunoreaktívny fragment, ktorá protilátka alebo imunoreaktívny fragment sa špecificky neviaže k: (i) fibrinogénu, (ii) rozkladným produktom fibrinogénu, (iii) DesAA fibrínovým monomérom,, (iv) DesAA fibrínovým polymérom, (v) DesAABB fibrínovým monomérom, (vi) zosieťovanému fibrinogénu, (vii) komplexu DesAA fibrínového monoméru - fibrinogénu a (viii) rozkladným produktom fibrínu; a

(c) prostriedky na určenie množstva uvedeného imunokomplexu.

21. Súprava podľa nároku 20, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že ktorej prostriedkom na vytvorenie imunokomplexu s uvedenými rozpustnými zosieťovanými DesAABB fibrínovými polymérmi a uvedenými rozpustnými nezosieťovanými DesAABB fibrínovými polymérmi je protilátka, alebo jej imunoreaktívny fragment, ktorá sa špecificky viaže k epitopu, rozoznávanému monoklonovou protilátkou, označenou MH1, produkovanou hybridómom ATCC HB 9739.

22. Súprava podľa nároku 21, v ý z n a č u j ú c a s a t ý m, že ktorej protilátkou je monoklonová protilátka, označená MH1, produkovaná hybridómom ATCC HB 9739.

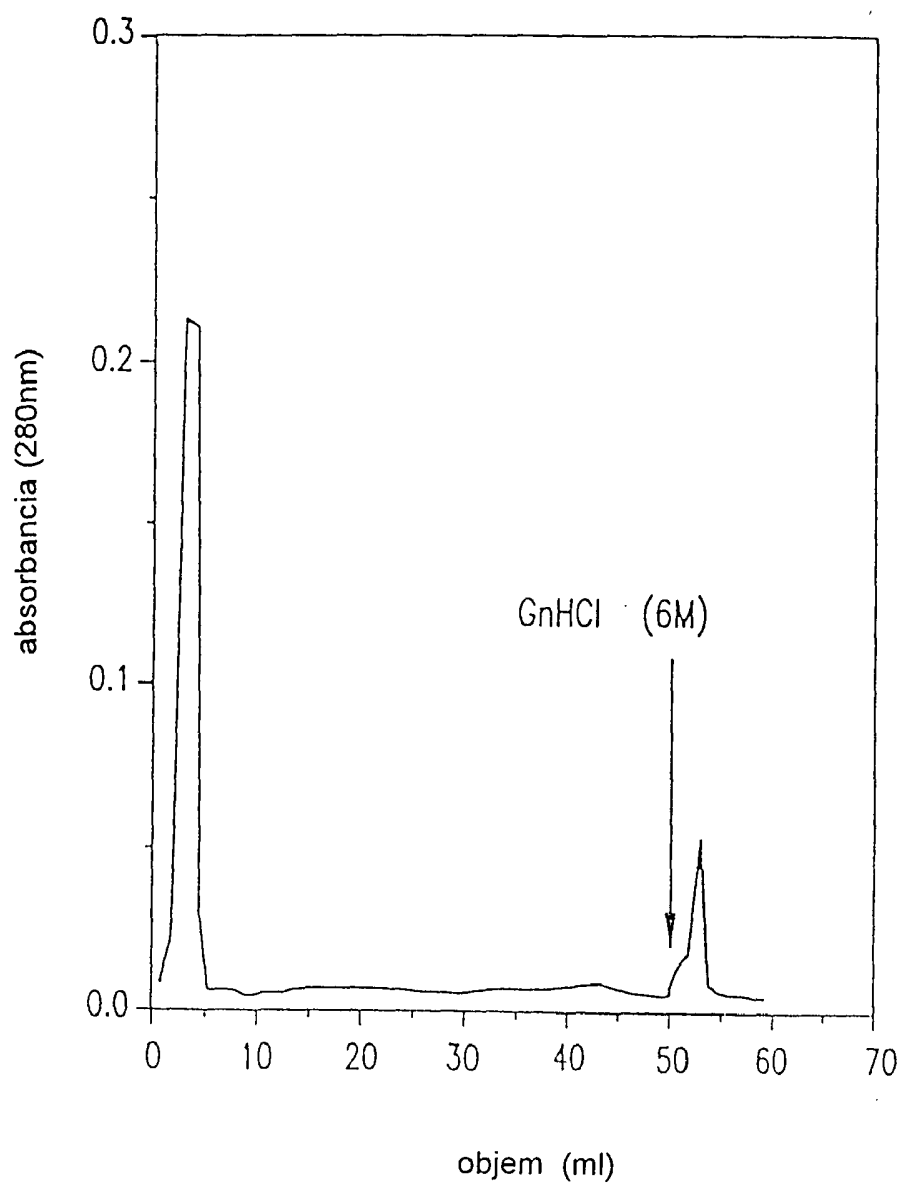
23. Súprava podľa nároku 20, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že prostriedkom na určenie podielu uvedeného imuno-komplexu je sekundárna protilátka, alebo jej imunoreaktívny fragment, značený spravodajskou molekulou, ktorá poskytuje detegovateľný signál, ktorý sa meria a ktorý je v korelácii s množstvom uvedeného imunokomplexu.

24. Súprava podľa nároku 23, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že sekundárna protilátka sa špecificky viaže k epito-pu, rozoznávanému monoklonovou protilátkou, označenou 45J, produkovanou hybridómom ATCC HB 9740.

25. Súprava podľa nároku 24, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že ktorej sekundárnou protilátkou je monoklonová protilátka 45J, produkovaná hybridómom ATCC HB 9740.

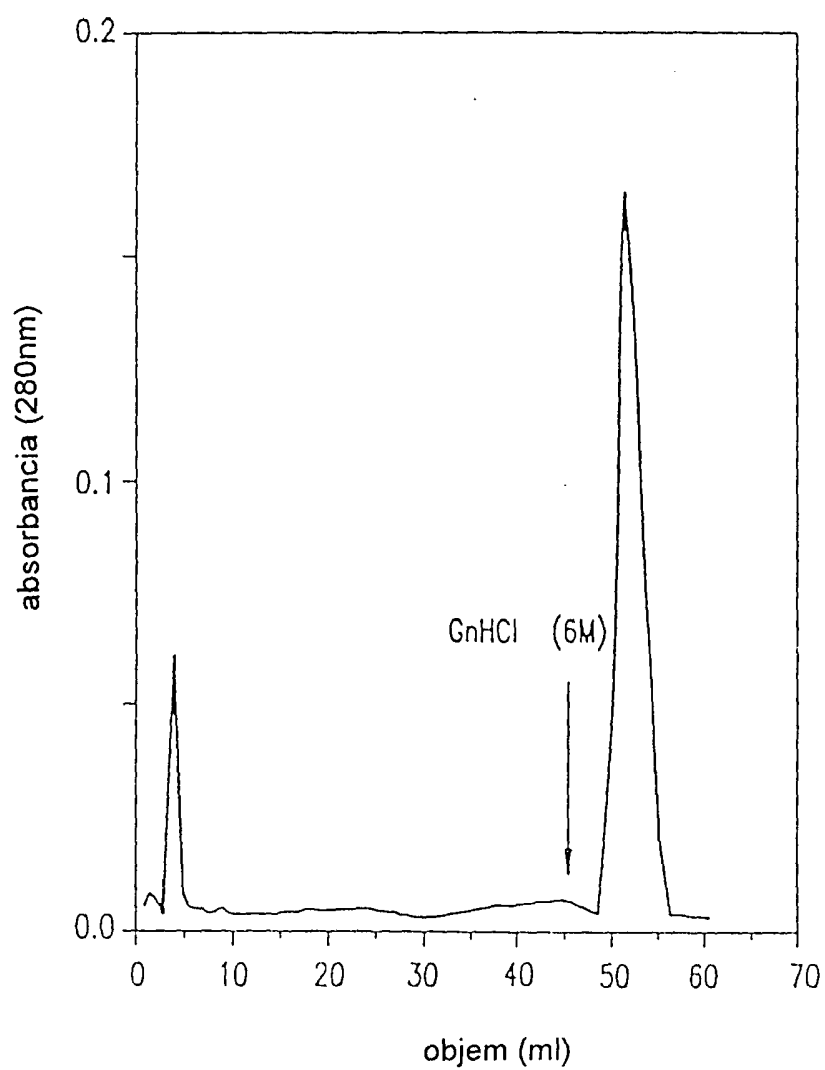
26. Súprava podľa nároku 20, ďalej obsahujúca kontrolnú vzorku, využiteľnú pri určovaní predispozície k trombotickej príhode, pri vzniku trombotickej príhody, alebo počas stavu trombotickej príhody cicavcov.

1/9

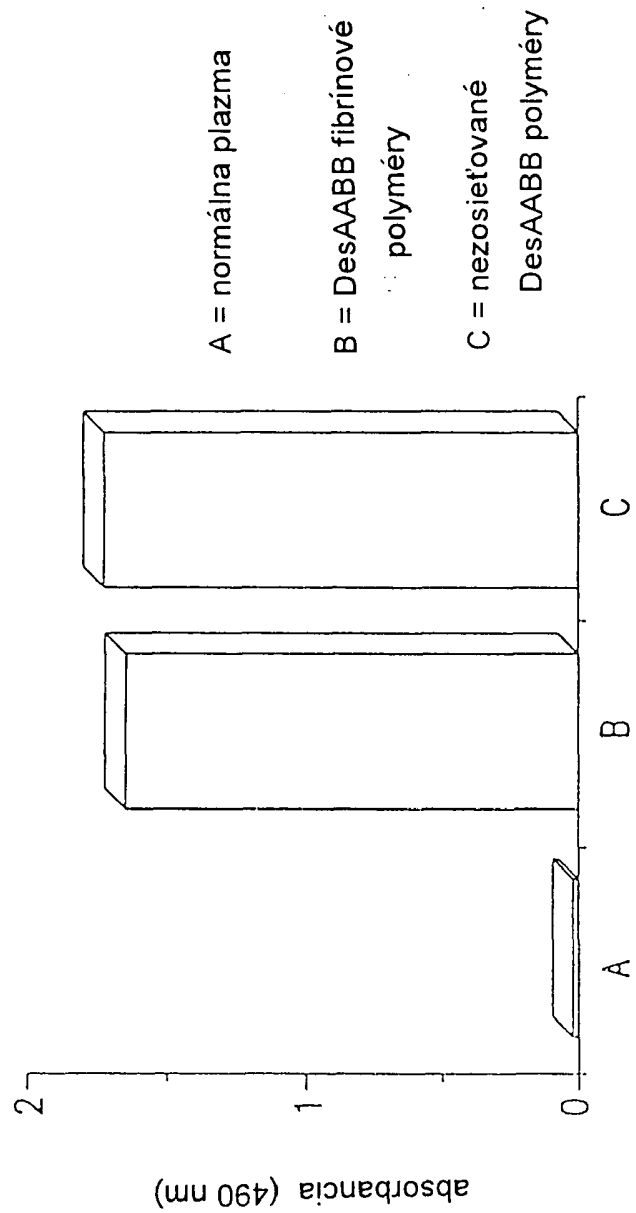


Obr. 1A

2/9

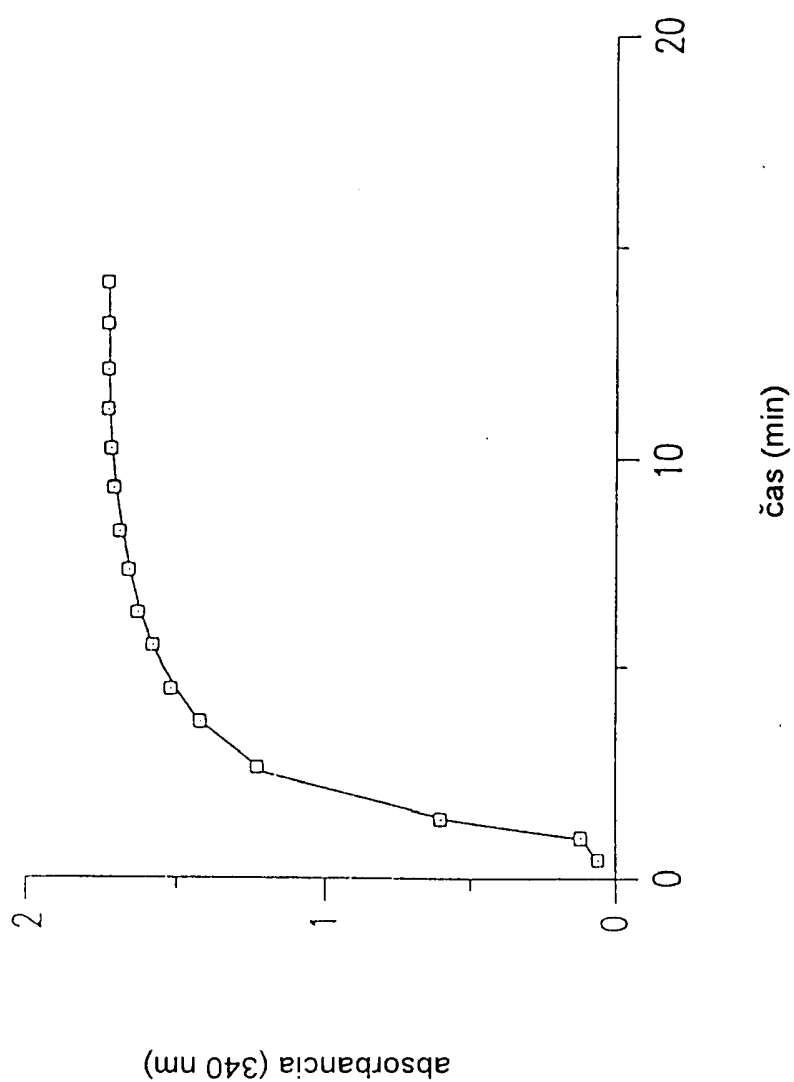


Obr. 1B

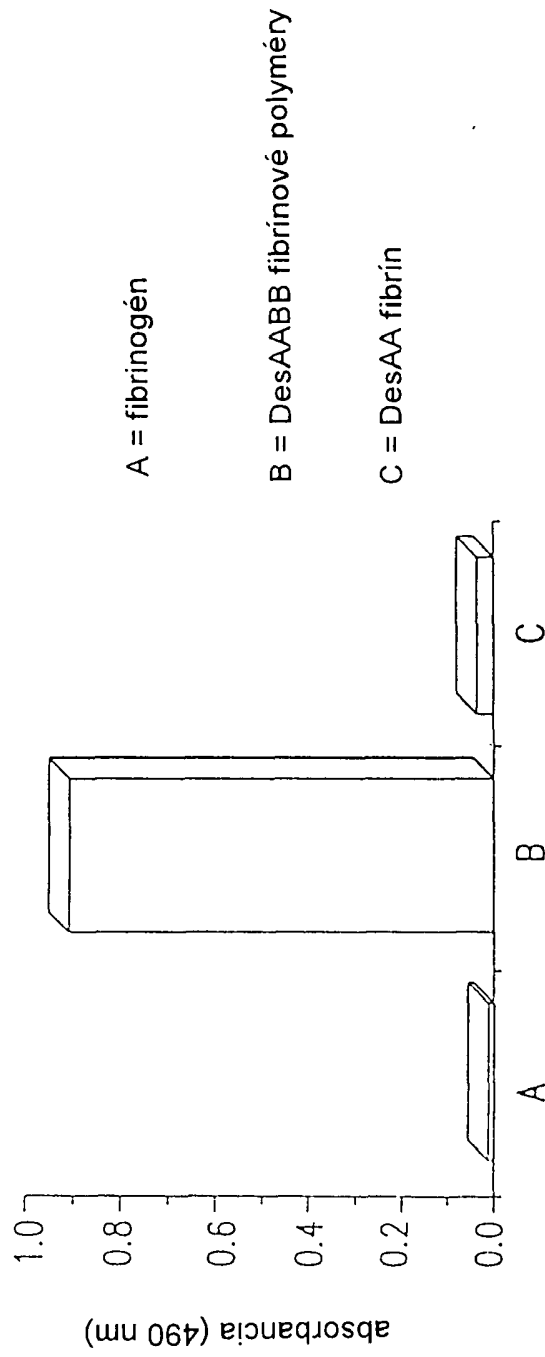


Obr. 2

4/9

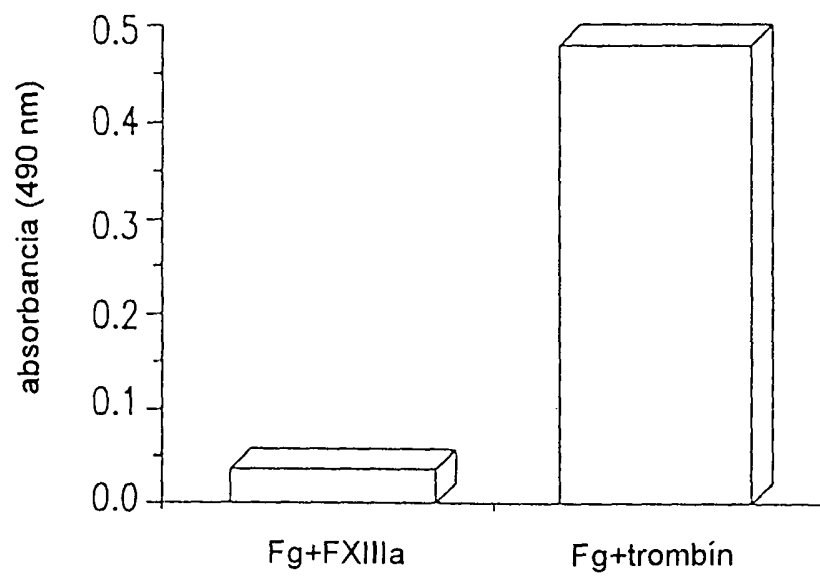


Obr. 3



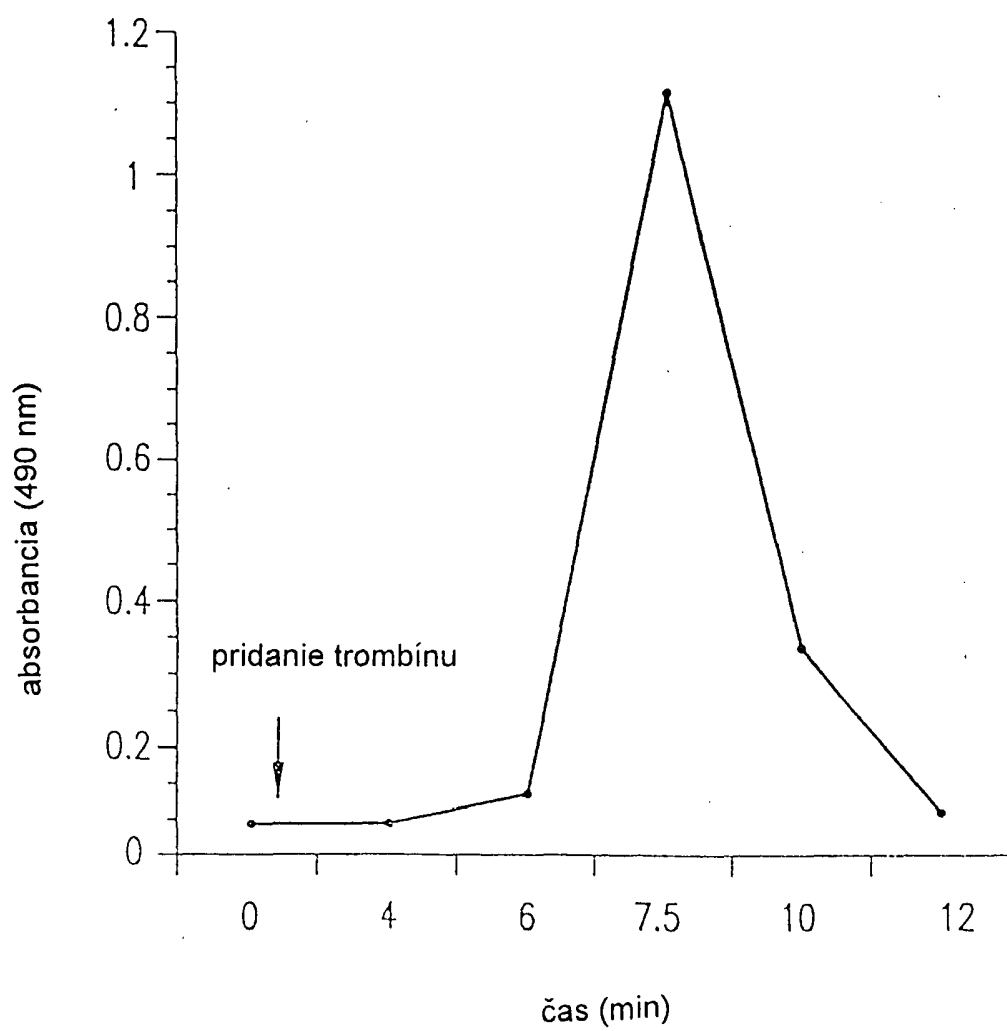
Obr. 4

6/9

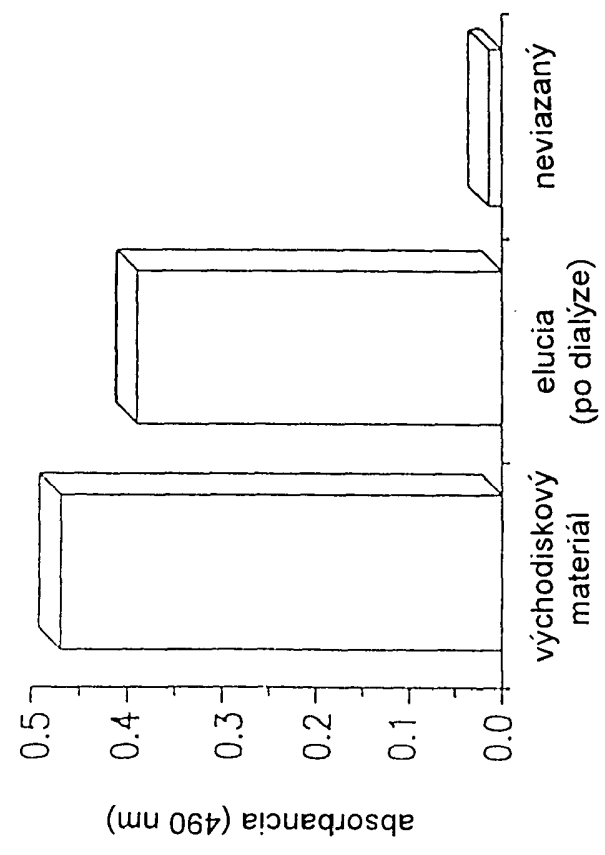


Obr. 5

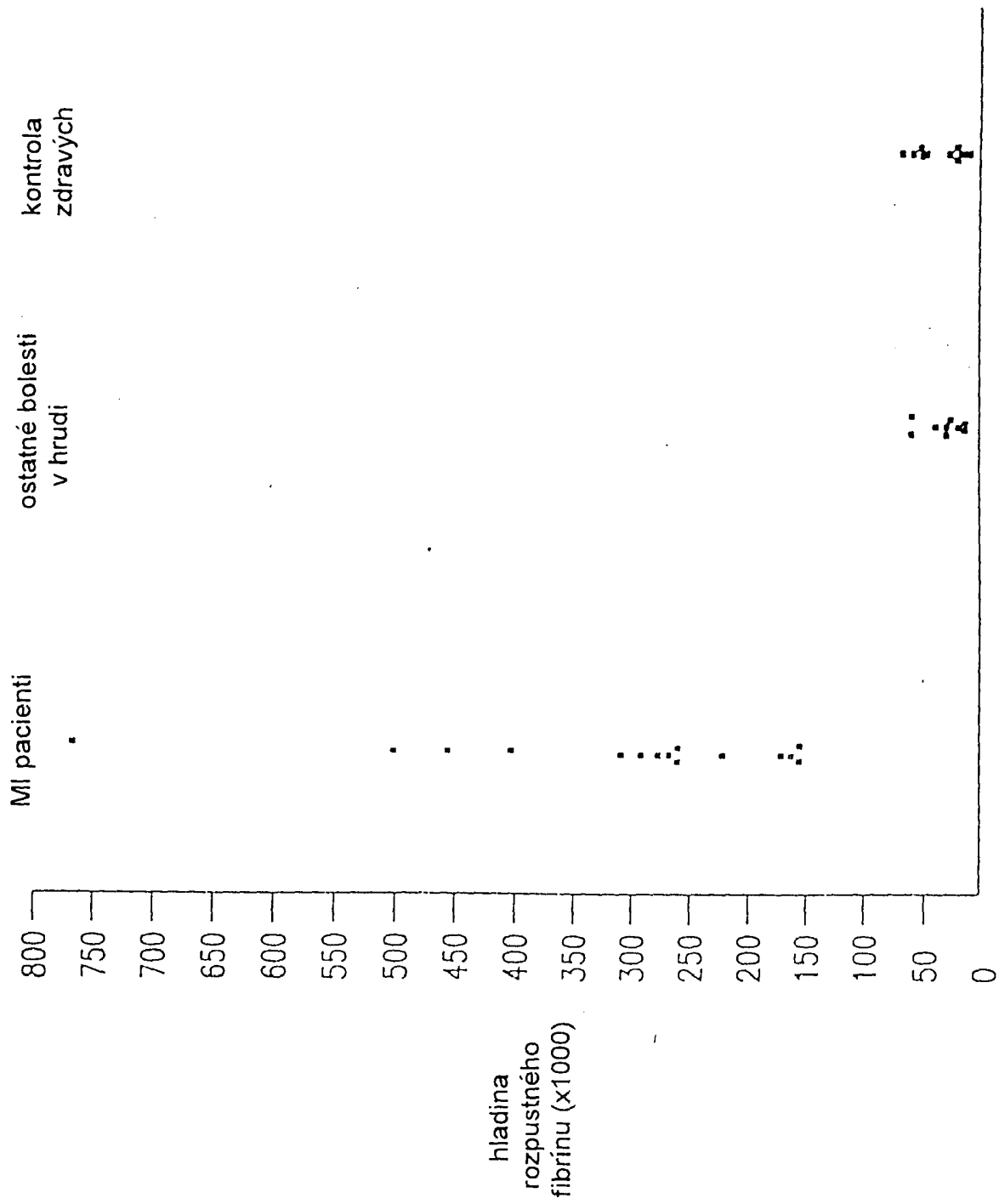
7/9



Obr. 6



Obr. 7



Obr. 8