

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 963288 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **963288**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
**A61K 39/395
A61K 49/00
C07K 16/18**

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **21.02.1995**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **23.08.1996**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **23.08.1996**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - **21.02.1995 PCT/US1995/001825**
Internationell ansökan - International
application

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

24.02.1994 US 204015

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • American Biogenetic Sciences Inc., 1375 Akron Street, Copiague NY 11726, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Gargan, Paul E., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

**Fibriinispesifinen vasta-aine käytettäväksi veritulppia estävänä aineena
Fibrinspecifik antikropp för användning som antitrombotiskt ämne**

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism - Deposit of microorganism

ATCCHB9739 ATCC

ATCCHB9740 ATCC

Fibriinispesifinen vasta-aine käytettäväksi veritulppia estävänä aineena - Fibrinspecifik antikropp för användning som antitrombotiskt ämne

5

1. Keksinnön ala

Esillä oleva keksintö kohdistuu menetelmiin fibriinispesifisen vasta-aineen käyttämiseksi veritulpan muodostumisen inhibointiin in vivo. Saadaan aikaan myös farmaseuttisia koostumuksia tällaisissa menetelmissä käytettäväksi.

2. Keksinnön tausta

2.1. Veritulpan muodostuminen sairaudesta tai kirurgiasta
Verihyytymät, tai veritulpat, muodostuvat paikkoihin, joissa verisuonet ovat vaurioituneet. Patologisen verisuonitukoksen tai veritulppasairauden kliiniset ilmenemismuodot ovat erittäin monenlaisia ja käsittävät syvälaskimotulpan (DVT) ja valtimo- ja laskimotulpan. Muiden verisuonisairauksien (esim. valtimonkovetushauraustauti) veritukkotulppauma tai tulppakomplikaatiot voivat aiheuttaa päävaltimoiden tukkeuman johtaen elimen iskemiaan ja siihen liittyviin hengenvaarallisiin tiloihin, kuten aivoverisuonikohtaukseen (halvaus), sydäninfarktiin jne.

25 Lisäksi invasiiviset kirurgiset menetelmät mukaan lukien, muttei niihin rajoittuen, verisuonen pallomuovaus ja elinsiirto (sekä luonnollinen että keinotekoinen), voivat laukaista veritulpan muodostumisen. Esimerkiksi verisuonen pallomuovaus, menetelmä, jota käytetään tukkeutuneiden valtimoiden avaamiseksi, voi itse asiassa vahingoittaa valtimosuonen seinää, jolloin uusi veritulpan kerrostuminen voi laukaista uudelleen tukkeutumisen. Eräässä raportissa todetaan, että ihon kautta tapahtuvasta aukon läpi tapahtuvasta sepelvaltion muovauksesta on seurauksena 25-35 %:n tiheydellä suonen uudelleentukkeutuminen. Gimple, L.W., et al., Circulation, 86: 1536-46 (1992). Katso myös Sarembock, I.J. et al., Circulation, 80: 1029-40 (1989) ja Ip, J.H. et al., JACC, 17: 77B-88B (1991). Itse asiassa eräässä raportissa todetaan, että verisuonenmuovausmekanismi, johon

liittyy useimmissa tapauksissa endoteelivaurio ja täplän murtuma tai leikkaus, on hyvin samanlainen kuin se prosessi, joka johtaa akuutteihin iskeemisiin oireisiin. Tenaglia, A.N., Ann. Rev. Med., 44:465-79, 466 (1993).

5

Koska systeemisellä hoidolla hyytymisenestoaineilla, kuten hepariineilla ja kumariinilla, on osoittautunut olevan vähän tai ei ollenkaan vaikutusta estettäessä verisuonen muovausleikkauksen jälkeistä uudelleentukkeutumista (Ip, J.H. et al., JACC, 17: 77B-88B (1991)) ja koska tällaisten hyytymisenestoaineilla hoitamisen uhkana on usein potilaiden systeeminen verenvuoto (Physicians' Desk Reference, 47. painos. Medical Economics Data (1993)), olisivat uudet paikkaspesifiset hoitomenetelmät veritulpan muodostumisen
10 inhiboimiseksi tai häiritsemiseksi käyttökelpoisia sekä ennen muuta olemassa olevan verisuonisairauden että invasiivisten kirurgisten menetelmien tapauksessa.
15

2.2 Hemostaattinen järjestelmä

20 Hemostaattinen mekanismi, jolloin veritulppa muodostuu, on monimutkainen fysiologinen reaktiomekanismi, joka osallistuu vaurioituneen verisuonen vaurion korjaamiseen. Katso Harker, L.A. ja Mann, K.G., "Thrombosis and Fibrinolysis", Thrombosis in Cardiovascular Disorders, Fuster, V. ja Verstraete, M. (toim.), W.B. Saunders Co. (1992), s. 1-16.
25

Hemostaasi saavutetaan vaurioituneen verisuonen seinän, verihiutaleiden ja hyytymisjärjestelmän välisellä yhteisvuorovaikutuksella. Katso, Furie B. ja Furie, B.C., Cell,
30 53: 505-18 (1988).

Hyytymisjärjestelmän tehtävänä on aikaansaada liukenematon fibriinimatriisi verihiutaletukoksen, joka on kokoontunut vaurioituneen suonen subendoteelirakenteelle vauriokohdassa, stabiloimiseksi ja ankkuroimiseksi. Hyytyminen on vahvennusprosessi, johon kuuluu entsyymaattisten reaktioiden ketju, jossa proentsyymit (hyytymistekijät) aktivoituvat jaksoittain muodostaen aktiivisia entsyymeitä. Fibriinimatriisin muodostuminen verenkierrossa olevasta fibrinogenis-

tä on tulosta entsyymaattisten reaktioiden kaskadisekvenssistä, joka johtaa entsyymitrombiinin räjähdysmäiseen tuotantoon tarvittavassa kohdassa, trombiinin aiheuttamaan fibrinogeenin muuttumiseen fibriiniksi ja tekijän XIIIa aiheuttamaan fibriinin ristikytkeytymiseen, jolloin muodostuu veritulppa.

Reaktioiden sekvenssi voidaan esittää yksinkertaisesti seuraavana kolmivaiheisena prosessina:

- 10 Trombiini
- Vaihe 1 - Proteolyysi: Fibrinogeeni ->
 Fibriinimonomeerit (DesAA, DessAABB)
 + FPA ja FPB
- 15 ->
- Vaihe 2 - Polymerisaatio: Fibriinimonomeerit <-
 Liukenevat fibriinipolymeerit
 (ei-ristikytkeytyneet ja ristikytkeytyneet)
- 20 Vaihe 3: - Hyytyminen: Liukenevat fibriinipolymeerit ->
 Liukenematon fibriinihyytymä

Fibrinogeeni koostuu kolmesta parista ei-identtisiä polypeptidiketjuja: A-alfa, B-beeta ja gamma. Katso L. Stryer, 25 Biochemistry, 3. painos, W.H. Freeman and Company New York (1988), s. 249. Alkuvaiheessa, jossa fibrinogeeni muuttuu fibriiniksi ja joka on esitetty vaiheessa 1, trombiini pilkkoo fibrinogeenin vapauttaen fibrinopeptidin A (FPA) kahden fibrinogeeni A-alfa -ketjun aminoterminaalista 30 päistä. Jäljelle jäänyt fibrinogeenimolekyylin osa on "fibriinimonomeeri", jota nimitetään DesAA:ksi. Kuten myös esitetään vaiheessa 1, trombiini pilkkoo myös samanaikaisesti (mutta hitaammin) fibrinopeptidin B (FPB) kahden fibrinogeeni B β -ketjun aminoterminaalista päistä. Tämän toisen 35 pilkkomistapahtuman jälkeen jäänyt fibrinogeenimolekyylin osa on myös fibriinimonomeeri, jota nimitetään DesAABB:ksi. FPA:n ja FPB:n vapautumisen tuloksena uudet aminoterminaaliset päät tulevat esille fibriinimonomeerin alfa- ja beetaketjuihin. Katso W. Nieuwenhuizen, Blood Coagulation and

Fibrinolysis, 4:93-96 (1993). Vaiheessa 2 fibriinimonomeerit alkavat muodostaa spontaanisti monomeerin välisiä ei-kovalenttisia sidoksia (ei-ristikytkeytyneitä) muodostaen liukenevan polymeerin. Tekijä XIIIa vaikuttaa tähän polymeeriin lisäten entsyymaattisesti kovalenttisia ristisidoksia fibriinimonomeeriyksikköjen väliin. Ristikytkeytynyt polymeeri voi jäädä liukenevaksi mutta jossakin kohdassa polymerisaatio- ja ristikytkeytymisen aikana fibriinipolymeeristä tulee liukenematon, jolloin se muodostaa fibriinihiyytymän, kuten vaiheessa 3 esitetään.

Liukenevat fibriinipolymeerit ovat fibriinihiyytymän välittämiä prekursoreita. Näin ollen liukenevien fibriinipolymeerien plasmatasojen uskotaan olevan kohonneita henkilöissä, joissa kehittyy tai on veritulppa. Näiden polymeerien, erityisesti DesAABB-liukenevien fibriinipolymeerien, määrän havaitsemisen ja mittaamisen verestä on havaittu olevan käyttökelpoista alkavan veritulpan muodostuksen osoituksena. Katso Nieuwenhuizen, s. 94, ja Marder et al., US-patentti 5 206 140.

2.3 Hemostaattisen järjestelmään suunnatut vasta-aineet

Sekä luontaisesti esiintyvillä että laboratoriossa herätyillä vasta-aineilla on ollut merkitystä karakterisoidussa hemostaattisen järjestelmän komponentteja ja niiden toimintojen selvittämisessä.

Marciniak E. ja Greenwood M.F., Blood, 53:81-92 (1979) kuvaavat tapausta, jossa 14 vuotta vanhan Downin syndroomaa sairastavan potilaan veressä oli verenhiyytymisen inhibiittori, joka oli läsnä IgG-fraktiossa ja joka inhiboi fibriinopeptidin A entsyymaattisen vapautumisen fibrinogeenistä. Hoots, W.K. et al., New Eng. J. Med., 304:857-61 (1981), kuvaavat tapausta, jossa 13 vuotta vanha potilas, joka sairastaa kroonista aggressiivista hepatiittia sekä hiyytymisvajavuutta ja jossa vajavuus jäljitettiin vasta-aineiden läsnäoloon potilaan veressä, joilla vasta-aineilla oli suuri affiniteetti sekä fibrinogeeniin että fibriiniin ja jot-

ka inhiboivat fibriinimonomeerien polymerisaation estäen siten fibriinigeelin muodostumisen.

Sola, B et al., Thromb. Res., 29:643-53 (1982), kuvaavat
5 sekä ihmisen fibrinogeenille että fibriinille spesifisiä monoklonaalisia vasta-aineita erittävän hybridoomasolun perustamista. Elms, M.J. et al., Thromb. Haemostas, 50:591-94 (1983), kuvaavat hybridoomasolulinjan valmistamista, joka erittää monoklonaalisia vasta-aineita, jotka
10 tunnistavat antigeenisen determinantin D-dimeerissä, spesifisen fragmentin, joka on tulosta ristikytkeytyneen fibriinin hajoamisesta. Hui, K.Y. et al., Science, 222:1129-32 (1983) ja Scheefers-Borchel, U. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:7091-95 (1985), kuvaavat synteettisten heksa-
15 peptidien, jotka edustavat vastaavasti ihmisen fibriinin alfa- tai beeta-ketjun aminoterminaalia, käyttöä antigeeninä monoklonaalisten vasta-aineiden valmistamiseksi, jotka sitoutuvat fibriiniin jopa fibrinogeenin läsnäollessa. Kudryk, B. et al., Mol. Immunol., 21:89-94 (1984), kuvaavat
20 fibrinogeenin N-DSK-osaan suunnattuja monoklonaalisia vasta-aineita erittävän hybridoomasolulinjan valmistamista. Sobel, J.H. et al., Thromb. Haem., 60:153-59 (1988), kuvaavat kahden erilaisen vasta-aineen käyttöä, jotka sitoutuvat fibrinogeenin CNBr A-alfa -ketjufragmentteihin, lähekkäin
25 toisiaan olevien fibriinimolekyylien välisten varhaisten alfa-ristikytkeentätapahtumien tutkimiseen. Mirshahi, M. et al., Fibrinogen, 4:49-64 (1990), kuvaavat hybridoomasolulinjan valmistamista, joka linja erittää fibrinogeeniin suunnattuja monoklonaalisia vasta-aineita, jotka kykenevät
30 myös inhiboimaan fibriinin polymeroitumista. Cierniewski, C.S ja Budzynski, A.Z., Biochemistry, 31:4248-53 (1992), kuvaavat puhdistettua ihmisen fibrinogeeniä vastaan suunnattujen polyklonaalisten ja monoklonaalisten vasta-aineiden, jotka inhiboivat fibriinimonomeerien polymeroitumismäärää ja häiritsevät trombiinin vaikutusta fibrinogeeniin,
35 käyttöä ja valmistusta. Tymkewycz, P.M. et al., Blood Coag. and Fibrinol., 4:211-21 (1993), kuvaavat viiden monoklonaalisen vasta-aineen valmistusta, joilla on suuri fibriiniaffiniteetti ja jotka eivät reagoi fibrinogeenin kanssa. Gar-

gan, P.E. et al., Fibrinolysis, 7:275-83 (1993), kuvaavat hybridomasolinjan MH-1 perustamista, joka tuottaa monoklonaalisia vasta-aineita, jotka ovat spesifisiä sekä ristikytkeytyneelle että ei-ristikytkeytyneelle fibriinipolymerirakenteelle, mutta joissa ei ole havaittavaa immuunireaktiivisuutta fibrinogeeniin tai mihinkään fibriinin tai fibrinogeenin hajoamistuotteisiin. Lisäksi MH-1-vasta-aine ei reagoi DesAA- tai DesAABB-fibriinimonomeerin kanssa eikä mitään reaktiivisuutta fibrinogeenin yksittäisten alfa-, beeta- tai gamma-ketjujen kanssa havaittu.

Hemostaattisen järjestelmän komponenteille spesifisten monoklonaalisten vasta-aineiden käytön lisäselostuksen osalta katso Kudryk, B.J. et al., "Monoclonal Antibodies as Probes for Fibrin(ogen) Proteolysis", Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy, Chatal J.F. (toim.), CRC Press, Boca Raton, Fl. (1989), s. 365-398.

Hemostaattisiin komponentteihin suunnattuja modifioituja vasta-aineita on kehitetty kliiniseen käyttöön aineina veritulpan kuvantamiseksi in situ. Katso esimerkiksi Liau, C-S ja Su, C-T, J. Form. Med. Assoc., 88:209-12 (1989), Wasset, M.N.J.M. et al, Blood, 74:708-14 (1989), Walker, K.Z. et al., Eur. J. Nucl. Med., 16:787-94 (1990), Alavi, A. et al., Radiology, 175:79-85 (1990), Wasser, M.N.J.M. et al., Thromb. Res., Supp. X:91-104 (1980) ja Kanke, M. et al., J. Nucl. Med., 32:1254-60 (1991).

Terapeuttiseen käyttöön on kehitetty fibriinin vasta-aineita, jotka on konjugoitu trombolyttisiin entsyymeihin. Katso esim. Bode, C. et al., Science, 229:765-67 (1985). Tässä raportissa trombolyttisen aineen paikkaspesifisellä välittämisellä näyttää olevan merkittävästi lisääntynyt aineen teho liukenevissa hyytymissä.

Lisäksi on myönnetty US-patentteja, jotka kohdistuvat fibrinogeenille, fibriinille tai niiden hajoamistuotteille spesifisten monoklonaalisten vasta-aineiden valmistamiseen ja/tai niiden käyttömenetelmiin. Katso US-patentit 4 722

903, 4 758 524 ja 4 916 070, joskaan luettelon ei ole tarkoitettu olevan täydellinen.

2.4 Menetelmät veritulpan muodostumisen estämiseksi

- 5 Veritulpan vastainen hoito käsittää tyypillisesti yhden tai useamman hyytymisenestoaineen, kuten hepariinin tai kumariinin, antamisen. Physicians' Desk Reference, 47. painos. Medical Economics Data (1993), Merck Manual of Diagnostics and Therapy, 15. painos, Merck Sharpe & Dohme Research Labs
- 10 (1987). Näitä hyytymisenestoaineita käytetään usein yrityksenä estää verisuonisairaudesta kärsivien potilaiden uusiutuva veritulppa ja yrityksenä estää akuutti veritulpan uudelleentulppautuminen verisuonimuovauksen jälkeen.
- 15 Tällaisten systeemisten hyytymistä estävien aineiden käytön pääasiallisena haittana on systeemisen verenvuodon riski. Antavia lääkäreitä varoitetaan, että verenvuotoa voi esiintyä käytännöllisesti katsoen missä kohdassa tahansa potilaissa, jotka saavat hepariinia. Physicians' Desk Reference,
- 20 ce, 47. painos, Medical Economics Data (1993), s.. 2568.

Lisäksi tällaisten hyytymistä estävien aineiden teho estetäessä uudelleentukkeutumista verisuonimuovauksen jälkeen on osoittautunut olevan joko eroamaton plasebohoitojen tehosta tai ei-toistettavissa. (Ip, J.H., et al., JACC, 17: 77B-88B (1991)). Näin ollen tällaisten hyytymistä estävien aineiden käytön edun vastaisena on sekä verenvuoron vaara ja niiden kyseenalainen teho estetäessä uudelleentukkeutumista.

- 30 Lukuisia biologisia ja mekaanisia strategioita on käytetty yrityksenä vähentää uudelleentulppautumiseen määrää verisuonimuovauksen jälkeen mutta missään terapiassa ei ole esiintynyt pysyviä positiivisia tuloksia. Näin ollen mielenkiinto kohdistuu lisääntyvästi "paikkaspesifiseen" tai
- 35 "suoraan" veritulppia estävien aineiden välittämiseen kohtiin, jossa verisuoni on vaurioitunut. Gimple, L.W. et al., Circulation, 86:1536-46 (1992).

Veritulppia estävien aineiden, joissa käytetään hemostaattisen järjestelmän sopiviin komponentteihin suunnattuja vasta-aineita, välittäminen paikkaspesifisesti toimisi tällaisten aineiden sijoittamiseksi verisuonivauriokohtaan.

5 Tämän sijoittamisen yhtenä etuna on se, että tarvitaan pienempiä annettuja annoksia. Toisena sijoittamisen etuna olisi systeemisen verenvuodon riskin väheneminen.

Useissa tapauksissa hemostaattisen järjestelmän spesifisiin komponentteihin suunnattujen vasta-aineiden on osoitettu

10 itsensä inhiboivan fibriinin polymeroitumista. Francis, S.E. et al., Am. J. Hem., 18:111-19 (1985), kuvaavat tutkimuksia monoklonaalisella vasta-aineella, joka on generoitu fibrinogeeniä vastaan ja jolla on "lievä" hyytymistä

15 estävä aktiivisuus. Mirshahi, M. et al., Fibrinogen, 4:49-64 (1990), kuvaavat monoklonaalisia vasta-aineita erittävän hybridoomasolulinjan saamista, jossa antigeeni oli fragmentti D, fibrinogeenin plasmiinihajoamistuote. Nämä monoklonaaliset vasta-aineet reagoivat voimakkaasti

20 fibrinogeenin kanssa ja inhiboivat fibriinin polymeroitumista. Cierniewski, C.S ja Budzynski A.Z., Biochemistry, 31:4248-53 (1992), kuvaavat kolmen erilaisen hybridoomasolulinjan saamista, joissa antigeeni oli luontainen ihmisen fibrinogeeni ja jotka erittivät monoklonaalisia vasta-

25 aineita, jotka inhiboivat fibriinipolymerisaation määrää.

Kaikilla kolmella raportilla on kuitenkin vähän tai ei ollenkaan käyttöä kehitettäessä paikkaspesifistä terapeutista tai profylaktista veritulppia estävää ainetta. Tämä johtuu siitä, että kaikissa näissä kolmessa tapauksessa vasta-aineet ovat ristireaktiivisia joko fibrinogeenin tai fibrinogeenin hajoamistuotteiden kanssa, jotka kaikki ovat levinneet kaikkialle hemostaattiseen järjestelmään. Mikä tahansa tällainen vasta-aine potilaalle annettuna sitoutuisi fibrinogeenin tai fibrinogeenin hajoamistuotteiden kanssa eikä olisi käytettävissä fibriinin polymeroitumisen estämiseen tai veritulpan muodostumisen estämiseen verisuonivaurion kohdassa.

35

Esillä oleva keksintö sallii täysin erilaisen lähestymistavan ottamisen veritulpan muodostumisen inhiboinnissa käyttämällä monoklonaalisia vasta-aineita, jotka ovat fibrinispesifisiä (so. joissa ei ole mitään merkittävää ristireaktiivisuutta fibrinogeenin tai fibrinogeenistä tai fibriniinistä peräisin olevien hajoamistuotteiden kanssa). Esillä oleva keksintö saa aikaan menetelmän, jossa käytetään mainittuja fibrinispesifisiä monoklonaalisia vasta-aineita, jotka inhiboivat yllättäen veritulpan muodostumista verisuonivauriokohdassa.

3. Keksinnön yhteenveto

Esillä oleva keksintö saa aikaan menetelmän veritulpan muodostumisen inhiboimiseksi verisuonivauriokohdassa ihmisessä, joka on mainitun inhibition tarpeessa, antamalla fibrinispesifistä monoklonaalista vasta-ainetta. Esillä oleva keksintö saa lisäksi aikaan fibrinispesifisen monoklonaalisen vasta-aineen fragmentteja tai johdannaisia, jotka fragmentit ja johdannaiset sisältävät vasta-aineen sitoutuvan domeenin. Esillä oleva keksintö saa lisäksi aikaan farmaseuttisen koostumuksen, joka käsittää fibrinispesifistä monoklonaalista vasta-ainetta tai sen fragmenttia tai johdannaista ja farmaseuttisesti tehokasta kantoainetta, joka määränä on tehokas inhiboimaan veritulppien muodostumista ihmisessä. Esillä oleva keksintö saa lisäksi aikaan farmaseuttisia välinesarjoja, jotka käsittävät yhtä tai useampaa keksinnön mukaisen farmaseuttisen koostumuksen aineosaa.

4. Kuvioiden lyhyt selostus

30 Kuvio 1. monoklonaalisen vasta-aineen MH-1 sisällyttäminen fibrinogeeni/trombiinihytyimisreaktioseokseen inhiboi hytyymisen nopeutta ja absoluuttista määrää. "Fibrinogeeni" ja "45J" ovat verrokkireaktioita.

35 Kuvio 2. Monoklonaalisen vasta-aineen MH-1 lisääntyvän määrän sisällyttäminen fibrinogeeni/trombiinihytyimisreaktioseokseen saa aikaan hytyymisen inhibition nousevan tason. "Fibrinogeeni" on verrokkireaktio.

5. Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

5.1 Esillä olevan keksinnön hyödyllisyys

On yllättäen havaittu, että fibriinispesifinen monoklonaalinen vasta-aine voi inhiboida fibriinin polymeroitumista ja veritulppien muodostumista. Täten fibriinispesifisiä monoklonaalisia vasta-aineita voidaan käyttää ihmisen minkä tahansa tilan estämiseen, joka on estettävissä tai hoidettavissa inhiboimalla fibriinin polymeroituminen tai veritulppien muodostuminen. Fibriinispesifiset monoklonaaliset vasta-aineet ovat käyttökelpoisia hoidettaessa ihmisiä, jotka sairastavat mitä tahansa verisuonisairautta, johon liittyy patologisen verisuonitukoksen riski. Ei-rajoittavat esimerkit tällaisista sairauksista käsittävät syvälaskimotukoksen (DVT), valtimo- ja laskimotulpan, halvauksen, veritukkotulppauman, keuhkotulpan ja valtimonhaurauskove- tustaudin veritulppakomplikaatiot.

Fibriinispesifiset monoklonaaliset vasta-aineet ovat myös käyttökelpoisia hoidettaessa ihmisiä, joita valmistellaan invasiivisiin kirurgisiin menettelyihin, jotka joutuvat niihin tai jotka toipuvat niistä. Esillä olevassa keksinnössä "invasiivinen kirurginen menettely" tarkoittaa mitä tahansa kirurgista menettelyä, joka voi aiheuttaa vaurion valtimo- tai laskimosuoneen, mikä voi johtaa tromboottisiin komplikaatioihin. Ei-rajoittavat esimerkit tällaisista menettelyistä käsittävät, mutteivät rajoitu niihin, verisuonen pallomuovauksen ja elinsiirron (sekä luonnollisen että keinotekoisien).

Fibriinispesifisten monoklonaalisten vasta-aineiden lisäksi voidaan tunnetuilla tekniikoilla generoida vasta-ainefragmentteja, jotka sisältävät fibriinispesifisen vasta-aineen idiotyyppin (sitoutuva domeeni). Tällaiset fragmentit käsittävät esimerkiksi, mutteivät rajoitu niihin, (1) $F(a')_2$ -fragmentit, joita voidaan valmistaa hajottamalla vasta-ainemolekyylillä pepsiinillä, (2) Fab' -fragmentit, jotka voidaan generoida pelkistämällä $F(ab')_2$ -fragmentin disulfidisillat, ja (3) Fab -fragmentit, jotka voidaan generoida käsittelemällä vasta-ainemolekyylillä papaiinilla ja pelkistys-

aineella. Tällaiset vasta-ainefragmentit kuuluvat esillä olevan keksinnön piiriin. Vasta-ainefragmenttien muiden valmistus- ja käyttöesimerkkien osalta katso Parham, P. et al., J. Immunol. Meth., 53:133 (1982) ja Khaw, B-A et al.,
 5 J. Nucl. Med., 34:2264-68 (1993).

Fibriinispesifisten monoklonaalisten vasta-aineiden ja vasta-ainefragmenttien lisäksi voidaan tunnetuilla tekniikoilla generoida muita vasta-ainejohdannaisia, jotka sisältävät
 10 fibriinispesifisen vasta-aineen idiotyyppin (sitoutuva domeeni). Voidaan syntetoida esimerkiksi rekombinanttisia ja synteettisiä oligopeptidejä ja niiden analogeja, joissa on sama inhiboiva vaikutus verituppien muodostumiseen kuin fibriinispesifisellä monoklonaalisella vasta-aineella tai
 15 sen fragmenteilla. Tällaiset johdannaiset kuuluvat esillä olevan keksinnön piiriin. Esimerkkien synteettisten oligopeptidien käytöstä monoklonaalisen vasta-aineen primaarisesti sitoutuvaan alueeseen perustuvien sekvenssien kanssa osalta katso Knight, L. et al., J. Nucl. Med., 35:282-88
 20 (1994).

Lisäksi mikä tahansa funktionaalisesti ekvivalenttinen fibriinispesifinen monoklonaalinen vasta-aine, sen fragmentti tai johdannainen kuuluu esillä olevan keksinnön piiriin.
 25 Termillä "funktionaalinen ekvivalentti" tarkoitetaan mitä tahansa fibriinispesifistä monoklonaalista vasta-ainetta tai sen fragmenttia tai johdannaista, joka kykenee inhiboimaan riittävänä määränä veritulpan muodostumista tällaisen hoidon tarpeessa olevassa ihmisessä sitoutumalla samaan
 30 epitooppiin kuin mihin MH-1-vasta-aine sitoutuu.

5.2 Monoklonaalisen vasta-aineen MH-1 valmistus ja karakterisointi

Monet aiemmista yrityksistä, jotka on tehty fibriinispesifisten vasta-aineiden herättämiseksi, jotka ovat konsentroituneet immunisoiviin eläimiin liukenevien fibriinifragmenttien kanssa, ja synteettisiin peptideihin, jotka mimi-
 35 koivat paljastuneita neoantigeenisä kohtia fibriinissä. Katso Hui, K.Y. et al., Science, 222:1129-32 (1983),

Scheefers-Borchel, U. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:7091-95 (1985), Elms, M.J. et al., Thromb. Haemostas, 50:591-94 (1983) ja Kudryk, B et al., Mol. Immunol., 21:89-94 (1984). Uskotaan kuitenkin, että tällaisten vasta-aineiden sitoutumiskohta säilyy fibriinin hajoamisprosessin aikana ja siten tällaiset vasta-aineet voivat sitoutua myös fibriinin hajoamistuotteisiin.

US-patentti 5 120 834 (tämän jälkeen "'834-patentti"), Gargan et al., myönnetty 9.6.1992, joka sisällytetään tähän viitteeksi, kohdistuu yleisesti menetelmään monoklonaalisten vasta-aineiden valmistamiseksi taudinsiemenettömistä eläimistä immunisoimalla mainitut taudinsiemenettömät eläimet valitulla antigeenillä. Uskotaan, että taudinsiemenettömän järjestelmän etuna käytettäessä sitä monoklonaalisten vasta-aineiden valmistamiseen on se, että tällaisessa järjestelmässä esiintyy suuresti parantunut immuunivaste antigeeniin, mikä lisää A-lymfosyytin sijoittamisen todennäköisyyttä, joka tuottaa vasta-ainetta, joka kykenee sitoutumaan antigeenin spesifiseen epitooppiin. Tällaisen järjestelmän on määritetty olevan erityisen käyttökelpoinen generoitaessa fibriinille spesifistä vasta-ainetta, jossa on vähän tai ei ollenkaan ristireaktiivisuutta fibrinogeenin kanssa. Tällaisen diskriminoivan vasta-aineen herättäminen on ollut ongelmallista, koska fibriinin ja fibrinogeenin rakenteellisten ja ulkomuodollisten yhtäläisyyksien on arvioitu olevan yli 98 % (Plow, E.F., et al., Semin. Throb. Haemostas, 8:36 (1982). Tuloksena vain pieni epitooppiprosentti fibriinimolekyylissä on itseasiassa neoantigenejä (so. yhtäläisiä fibriinin kanssa).

'834-patentti kohdistuu hybridoomasolulinjaan ATCC nro HB 9739, joka erittää monoklonaalista vasta-ainetta MH-1. Monoklonaalinen vasta-aine MH-1 on ristikytkeytyneille ja ei-ristikytkeytyneille fibriinipolymeereille spesifinen mutta se ei ristireagoi fibrinogeenin tai fibrinogeenin tai fibriinin plasmiinista johdettujen hajoamistuotteiden kanssa.

MH-1 puhdistetaan '834-patentissa selostettujen menetelmien mukaisesti. MH-1 sitoutuu spesifisesti fibriiniin eikä se ristireagoi fibrinogeenin kanssa kilpailutesteissä. MH-1 ei ristireagoi minkään plasmiinista generoituneeseen fibriinogeenihajoamistuotteen kanssa eikä minkään plasmiinista johdetun ristikytkeytyneen fibriinihajoamistuotteen kanssa. Tämän tuloksena voidaan tehdä johtopäätös, että (1) MH-1 tunnistaa intaktin fibriinimolekyylin epitoopin, jota ei ole läsnä tai paljastuneena prekursorimolekyylin, fibrinogeenin, pinnalla, ja (2) epitoopin tuhoaa ilmeisesti ristikytkeytyneen fibriinin plasmiinihajotus.

MH-1 on lisäksi karakterisoitu Scathard-analyysillä (Frankel, et al., Mol. Immunol., 16: 101-6 (1979)) käyttämällä ^{125}I -merkittyä vasta-ainetta MH-1 MH-1:n fibriiniaffiniteetin määrittämiseksi. Dissosiaatiovakioille saatu arvo K_D oli $6,7 \times 10^{-10}$ M, joka affiniteetti on noin 5000 kertaa fibriinin kudospasminogeeniaktivaattorille saatu.

Western-immunoblottausanalyysi osoitti, että MH-1 ei ristireagoi fibrinogeenin A-alfa-, B β - tai gamma-ketjujen kanssa. Sama menetelmä osoitti, että MH-1 ei ristireagoi fibrinogeenin trombiinilla käsiteltyjen A-alfa- tai B β -ketjujen kanssa. Lisäksi ELISA-analyysi osoitti, että MH-1 reagoi sekä ristikytkeytyneen fibriinin että ei-ristikytkeytyneen fibriinin kanssa affiniteetin ristikytkeytyneeseen fibriiniin ollessa yli kaksi.

5.3 Antomenetelmät

Esillä olevan keksinnön mukaisesti fibriinispesifiset vasta-aineet tai niiden fragmentit tai johdannaiset annetaan hoidon tarpeessa olevalle ihmiselle veritulpan muodostumisen inhiboimiseksi. Vasta-aineet tai niiden fragmentit tai johdannaiset annetaan ihmiselle muodossa, jota ei ole konjugoitu mihinkään radioaktiiviseen merkkiaineeseen, trombolyyttiseen tai muuhun aineeseen tai mihinkään muuhun molekyyliin tai sen osaan. Kuitenkin keksinnön mukaiset menetelmät voidaan myös suorittaa käyttäen vasta-aineita tai johdannaisia, jotka on konjugoitu radioaktiivisiin merkki-

aineisiin, trombolyyttisiin tai muihin aineisiin tai mihin tahansa molekyyliin tai sen osaan, ja niiden on tarkoitettu kuuluvan esillä olevan keksinnön piiriin.

5 Termi "kantoaine" tarkoittaa laimenninta, täyteainetta tai kuljetusainetta, jonka kanssa fibriinispesifinen monoklonaalinen vasta-aine tai sen fragmentti tai johdannainen annetaan.

10 Termi "farmaseuttisesti hyväksyttävä kantoaine" tarkoittaa, että kantoaine on liittovaltion tai osavaltion hallituksen tarkastusviraston hyväksymä tai mainittu U.S. Pharmacopeiassa tai muussa yleisesti tunnustetussa farmakopeiassa käytettäväksi eläimissä ja erityisesti ihmisissä.

15

Termi "veritulppia estävä koostumus" tarkoittaa esillä olevassa keksinnössä käytettynä koostumusta, joka käsittää fibriinispesifistä monoklonaalista vasta-ainetta tai sen fragmenttia tai sen johdannaista ja farmaseuttisesti hyväksyttävää kantoainetta ja joka riittävänä määränä voi inhiboida veritulppien muodostumista mainittua inhibitiota tarvitsevassa ihmisessä.

Termin "tehokas annos" on tarkoitettu tarkoittavan esillä
25 olevassa keksinnössä sitä määrää monoklonaalista vasta-ainetta tai sen fragmenttia tai johdannaista, joka on riittävän suuri inhiboimaan veritulpan muodostumista tällaisen hoidon tarpeessa olevassa ihmisessä. Annoksen ei tulisi olla niin suuri, että se ei aiheuta haitallisia sivuvaikutuksia, kuten ei-toivottuja ristireaktioita tai anafylaktisia reaktioita ja niiden kaltaisia. Yleensä annos vaihtelee potilaan iän, kunnon, sukupuolen ja sairauden laajuuden mukaan, jos vastaindikaatioita esiintyy, immuunitoleranssi ja muut tällaiset muuttujat on kunkin lääkärin määritettävä.
30
35 Vaikka annokset vaihtelevat olosuhteiden yksilöllisistä sarjoista riippuen, useimmissa verisuonisairauttapauksissa ja useimmissa kirurgisissa tiloissa annos määritetään hoidon tarpeessa olevan ihmisen painosta, ja se on alueella noin 1 µg/kg ruumiinpainoa - noin 50 µg/kg ruu-

miinpainoa ja edullisesti se on alueella noin 5 µg/kg ruumiinpainoa - noin 10 µg/kg ruumiinpainoa.

5.4 Antomenetelmät

5 Fibriinispesifiset monoklonaaliset vasta-aineet tai niiden fragmentit tai johdannaiset voidaan antaa ihmiselle millä tahansa sopivalla tavalla mukaan lukien parenteraalisesti yhtenä bolus-injektiona, jatkuvana infuusiona tai näiden kahden menetelmän yhdistelmänä. Antaminen voi myös olla
10 suora infuusio katetrilla, kuten sepelvaltimon sisäisenä, jos se on aiheellista.

Parenteraaliseen antamiseen tarkoitettut valmisteet käsittelevät esimerkiksi lyofilisoitujen fibriinispesifisten monoklonaalisten vasta-aineiden tai niiden fragmenttien tai johdannaisten rekonstituoinnin steriiliin endotoksiinittomaan fysikaaliseen suolaliuokseen tai yleisemmin ne voivat käsitellä fibriinispesifisten monoklonaalisten vasta-aineiden tai niiden fragmenttien tai johdannaisten rekonstituoinnin tai dispergoinnin steriileiksi vesipitoisiksi tai vedettömiksi liuoksiksi, suspensioiksi ja emulsioiksi. Esimerkkejä vedettömistä liuottimista ovat propyleeniglykoli, polyetyleeniglykoli, kasviöljy, kuten oliiviöljy, ja injektoidtavat orgaaniset esterit, kuten etyylioleaatti. Vesipitoiset kantoaineet käsittelevät veden, alkoholi/vesipitoiset liuokset, emulsiot tai suspensiot mukaan lukien suolaliuos ja puskuroidut väliaineet. Parenteraaliset välitysaaineet käsittelevät natriumkloridiliuoksen, Ringerin dekstroosin, dekstroosin ja natriumkloridin, laktatoidun Ringerin tai kiinteät öljyt. Suonensisäiset välitysaaineet käsittelevät neste- ja ravintoainetäydennykset, kuten ne, jotka perustuvat Ringerin dekstroosiin, ja niiden kaltaiset. Säilöntäaineita tai muita lisäaineita voi olla myös läsnä, kuten esimerkiksi mikrobeja tappavia aineita, hapettumisenestoaineita, kelatointiaineita ja inerttejä kaasuja ja niiden kaltaisia. On edullista, että esillä olevan keksinnön mukaiset farmaseuttiset koostumukset ovat steriilissä muodossa siten, että ne täyttävät United States Food and Drug Administrationin asettamat steriiliysstandardit.

Esillä oleva keksintö saa lisäksi aikaan farmaseuttisia välinesarjoja, jotka käsittävät yhtä tai useampaa keksinnön mukaisen farmaseuttisen koostumuksen aineosaa varastoituna samaan säiliöön tai erillisiin säiliöihin. Tällaiseen säiliöön tai tällaisiin säiliöihin voi liittyä optionaalisesti huomautus muodossa, jonka on määrännyt valtion valmistusta säättävä virasto farmaseuttisten tai biologisten tuotteiden käytöstä tai myynnistä, joka huomautus ilmaisee viraston hyväksynnän valmistukseen, käyttöön tai myytäväksi ihmisille annettavaksi. Vain lyofilisoitua vasta-ainetta tai sen fragmentteja tai johdannaisia sisältäviin välinesarjoihin voidaan liittää optionaalisesti ohjeet, mitkä kantoaineet ovat sopivia hoidon tarpeessa olevalle ihmiselle.

Hoidon laajuus, kesto, ajoitus ja menetelmä vaihtelee hoidon tarpeessa olevan ihmisen iän, painon, tilan ja sukupuolen mukaan sekä sairauden, johon hoitoa tarvitaan, tyyppin ja laajuuden mukaan, jotka säättää antava lääkäri kunkin olosuhteen mukaan. Hoito voidaan antaa joko välittömästi ennen mitä tahansa kirurgista menettelyä tai sen aikana tai jälkeen tai sekä ennen että jälkeen menettelyn tai sekä menettelyn aikana että sen jälkeen tai menettelyä ennen, sen aikana ja sen jälkeen riippuen tapauksen spesifisistä olosuhteista.

25

Esimerkiksi kirurgisen menettelyn, kuten verisuonten pallomuovauksen, tapauksessa on usein tapauksena, että ihmispotilaassa on jo läsnä suuri määrä laajalle levinneitä verihyytymiä. Tässä tilanteessa on edullista antaa veritulppia estävää koostumusta välittömästi sen jälkeen kun verisuonimuovausmenettely on suoritettu, edullisesti käyttämällä verisuonimuovauskatetria, kun se on vielä paikallaan huuhtomalla verisuonen vaurioitunut osa suoraan veritulppia estävällä koostumuksella kohdistuen hoito siten tähän yhteen kohtaan. Tämä estää veritulppia estävän koostumuksen kadon, joka voisi seurata esimerkiksi vasta-aineen sitoutumisesta veritulppiin, jotka eivät ole asiaankuuluvissa kohdissa.

Tilanteissa, joihin liittyy invasiivisia kirurgisia menettelyitä potilaille, joilla ei ole patologisen veritulppautumisen historiaa, on yleensä edullista antaa veritulppia estävää koostumusta joko välittömästi ennen menettelyä tai
5 sen aikana, koska on pienempi riski, että veritulppia estävä koostumus katoaa sitoutumalla asiaankuulumattomiin kohtiin.

Lisäksi useimmissa tilanteissa, jotka liittyvät invasiivisiin kirurgisiin menettelyihin, ajalla, jona vaara on lisääntynyt, että muodostuu hyytymiä, on taipumus olla välittömästi sen jälkeen kun menettely on suoritettu. Tämän tuloksena vain rajoitettu määrä hoitoja tai jopa yksi riittävän pituinen hoito voi olla riittävä inhiboimaan tehokkaasti veritulpan muodostuminen vähentäen siten oleellisesti riskiä kirurgian aiheuttamasta hyytymisestä siihen liittyvinen uhkineen potilaalle.
10
15

Kroonisen tromboottisen sairauden tapauksessa veritulppia estävien hoitojen ajoitus, kesto ja lukumäärä riippuu suuresti potilaan tilan diagnoosia edeltävästä ja sen jälkeisestä hoidosta sekä vasteesta alustavaan veritulppia estävään hoitoon, jotka antavan lääkärin on määritettävä, tarkkailtava ja arvioitava.
20

25

5.5 Hoidon tehon määrittäminen

Veritulppia estävän hoidon monoklonalisella vasta-aineella MH-1 tai sen fragmentilla tai johdannaisella teho voidaan määrittää standardimenetelmillä. Esimerkit tällaisista
30 menetelmistä käsittävät, mutteivät rajoitu niihin, (1) verisuonten tarkkailun kuvantamalla valtimon tai laskimon värivirtaus, jossa estyneen värivirtauksen esiintyminen osoittaa lisähoidon tarpeen, (2) käyttämällä skintigrafiaa, jossa käytetään veritulppalle spesifistä vasta-ainetta, joka
35 on konjugoitu radioaktiiviseen merkkiaineeseen, jolloin veritulpan kokoa ja sijaintia voidaan tarkkailla merkkien saamiseksi, että lisähoidoa tarvitaan, (3) tarkkailemalla kliinisten oireiden esiintymistä ja astetta, jolloin oireiden määrän tai vakavuuden lisäys voi osoittaa lisähoidon

tarpeen, ja (4) mittaamalla fibrinogeenin tasot potilaan verestä, koska fibrinogeeni- ja fibriinitasojen välillä on käänteissuhde, jolloin fibrinogeenitason lasku voi osoittaa mahdollisen fibriinitason ja fibriinipolymeroitumisen vastaavan nousun, joka osoittaa lisähoidon tarpeen.

Kun esillä olevaa keksintöä on nyt kuvattu yksityiskohtaisesti, se tulee helpommin ymmärrettäväksi viittaamalla spesifiseen esimerkkiin, joka on sisällytetty tähän pelkästään kuvauksena ja jonka ei ole tarkoitettu olevan keksintöä rajoittava.

5.6 Esimerkki: Hyytymisen in vitro -inhibointi

Suoritettiin sarja in vitro -kokeita MH-1:n vaikutuksen hyytymiseen määrittämiseksi. Puhdistettua ihmisen fibrinogeeniä (Kabi, Chromogenix Co, Ohio) liuotettiin 150 mM:iin fosfaatilla puskuroitua suolaliuosta fysiologisessa pH:ssa 1 mg/ml:n konsentraatiossa ja suunnilleen 100 μ l sijoitettiin mikrotiitterilevyn (Costar) jokaiseen koloon. Jokaiseen koloon lisättiin suunnilleen 50 μ l naudan trombiinia lopullisessa konsentraatiossa 0,5 NIH-yksikköä/ml reaktioseoksen muodostamiseksi. Reaktioseokseen lisättiin aikana nolla suunnilleen 50 μ l jompaakumpaa: (1) monoklonaalista vasta-ainetta MH-1 lopullisen konsentraation 100 μ g/ml saamiseksi, (2) monoklonaalista vasta-ainetta 45J, joka ristireagoi fibriinin ja fibrinogeenin kanssa ja jota erittää hybridoomasolulinja ATCC nro HB 9740 ja joka tehtiin konventionaalisilla tekniikoilla käyttäen konventionaalista Balb/c-hiirtä, jolloin hiiri immunisoitiin fibriinillä lopullisen vasta-ainekonsentraation 200 μ g/ml saamiseksi, tai (3) fysiologista suolaliuosta. Reaktioon annettiin edistystä 60 min 37 °C:ssa. Hyytyminen mitattiin spektrofotometrisesti 340 nm:ssä joka toinen minuutti. Absorbanssin lisäys osoitti, että hyytyminen edistyi. Hyytymisprosessin päättymisen oli havaittavissa käyrän absorbanssi versus aika tasantena.

Kuvio 1 osoittaa, että MH-1-hoito inhiboi hyytymisen määrää, mikä ilmenee MH-1:llä käsitellyn reaktioseoksen absor-

banssi/aikakäyrän alempana alkujyrkkyytenä verrattuna joko 45J-verrokkireaktioseokseen tai suolaliuosverrokkireaktio-
seokseen (Fibrinogen). Lisäksi MH-1 vähensi hyytymisen ab-
soluuttista määrää, mikä ilmeni mitattuna käyrätasanteen
5 alemmalla tasolla verrattuna verrokkireaktioihin. 45J-vas-
ta-ainetta sisältävällä verrokkireaktioseoksella (kaksi
kertaa MH-1:n konsentraatio) ei ollut mitään hyytymisen
inhibitiota verrattuna suolaliuosverrokkireaktioon. Tämä
tieto tukee oletusta, että monoklonaalinen vasta-aine MH-1
10 kykenee inhiboimaan veritulpan muodostumista.

Toisessa kokeessa testattiin useiden erilaisten MH-1-kon-
sentraatioiden vaikutus hyytymisaikaan verrattuna fibrino-
geeniverrokkireaktioon. Kuviossa 2 esitetään hyytymisreak-
15 tioprofiilit (absorbanssi/aika), jotka osoittavat hyytymis-
reaktion lisääntyvää inhibitiota MH-1-konsentraation li-
sääntyessä reaktioseoksessa. (1:1000 = 1 µg/ml, 1:100 = 10
µg/ml, 1:50 = 20 µg/ml, 1:20 = 50 µg/ml, 1:10 = 100 µg/ml,
Fibrinogeeni = verrokki).

20

5.7 Hybridooman tallentaminen

Hybridoomasolulinjat MH-1 ja 45J talletettiin American Type
Culture Collectioniin (ATCC) 9.6.1988 ja niille annettiin
talletusnumerot HB 9739 ja vastaavasti HB 9740. ATCC si-
25 jaitsee osoitteessa 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD
20852. MH-1-vasta-aine on IgG₁-vasta-aine, jossa on kappa-
-kevytketju, ja on havaittu, että MH-1-vasta-aine ristirea-
goi sekä ihmisen fibriinin että kanin fibriinin kanssa.

30 Esillä olevan keksinnön ei ole tarkoitettu rajoittuvan tal-
letun hybridoomasolulinjan ATCC nro HB 9739 tai monoklonaa-
lisen vasta-aineen MH-1 piiriin vaan se on tarkoitettu yk-
sinkertaiseksi kuvaukseksi fibriinispesifisestä monoklonaa-
lisesta vasta-aineesta, joka inhiboi veritulpan muodostu-
35 mista. Mikä tahansa funktionaalisesti ekvivalenttinen fib-
riinispesifinen monoklonaalinen vasta-aine tai sen frag-
mentti tai johdannainen kuuluu esillä olevan keksinnön pii-
riin. Termillä "funktionaalinen ekvivalentti" tarkoitetaan,
että monoklonaalinen vasta-aine tai sen fragmentti tai joh-

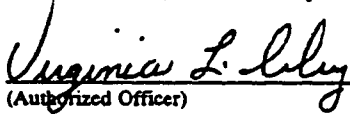
dannainen kykenee inhiboimaan veritulpan muodostumista sitoutumalla samaan epitooppiin, johon MH-1-vasta-aine sitoutuu.

- 5 Esillä oleva keksintö voidaan toteuttaa muissa spesifisissä muodoissa poikkeamatta sen hengestä tai oleellisista tunnusmerkeistä ja näin ollen on viitattava oheisiin patenttivaatimuksiin eikä edellä olevaan selitykseen osoitettaessa keksinnön piiri.

10

Kaikki edellä mainitut julkaisut ja patentit sisällytetään tähän viitteeksi.

International Application No: PCT/

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

(Authorized Officer)	

International Application No: PCT/ /

Form PCT/RO/134 (cont.)

American Type Culture Collection

**12301 Parklawn Drive
Rockville, MD 20852
US**

Accession No.

HB 9740

Date of Deposit

June 9, 1988

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä veritulpan muodostumisen inhiboimiseksi ihmisessä, t u n n e t t u siitä, että se käsittää tehokkaan annoksen fibriinispesifistä monoklonaalista vasta-ainetta antamisen mainitun inhibition tarpeessa olevalle ihmiselle.
5
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että fibriinispesifinen monoklonaalinen vasta-aine on MH-1.
10
3. Menetelmä veritulpan muodostumisen inhiboimiseksi ihmisessä, t u n n e t t u siitä, että se käsittää tehokkaan annoksen fibriinispesifisen monoklonaalisen vasta-aineen fragmenttia tai johdannaista antamisen mainitun inhibition tarpeessa olevalle ihmiselle, joka fragmentti tai johdannainen sisältää mainitun vasta-aineen sitoutuvan domeenin.
15
4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että fibriinispesifinen monoklonaalinen vasta-aine on MH-1.
20
5. Menetelmä ihmisen hoitamiseksi kirurgian jälkeisten tromboottisten komplikaatioiden riskin vähentämiseksi, t u n n e t t u siitä, että se käsittää tehokkaan annoksen fibriinispesifistä monoklonaalista vasta-ainetta antamisen tällaisen hoidon tarpeessa olevalle ihmiselle.
25
6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että fibriinispesifinen monoklonaalinen vasta-aine on MH-1.
30
7. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainitut kirurgian jälkeiset komplikaatiot aiheutuvat verisuonimuovauksesta.
35
8. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että se käsittää tehokkaan annoksen fibriinispesifistä monoklonaalista vasta-ainetta antamisen mainitun inhibition tarpeessa olevalle ihmiselle, joka fragmentti tai johdannainen sisältää mainitun vasta-aineen sitoutuvan domeenin.
40

n e t t u siitä, että mainitut kirurgian jälkeiset komplikaatiot aiheutuvat elinsiirrosta.

9. Menetelmä ihmisen hoitamiseksi kirurgian jälkeisten
5 tromboottisten komplikaatioiden riskin vähentämiseksi,
t u n n e t t u siitä, että se käsittää tehokkaan annoksen
fibriinispesifisen monoklonaalisen vasta-aineen fragmenttia
tai johdannaista antamisen tällaisen hoidon tarpeessa ole-
valle ihmiselle, joka fragmentti tai johdannainen sisältää
10 mainitun vasta-aineen sitoutuvan alueen.

10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen menetelmä, t u n-
n e t t u siitä, että fibriinispesifinen monoklonaalinen
vasta-aine on MH-1.

15

11. Patenttivaatimuksen 9 mukainen menetelmä, t u n-
n e t t u siitä, että mainitut kirurgian jälkeiset kompli-
kaatiot aiheutuvat verisuonimuovauksesta.

20 12. Patenttivaatimuksen 9 mukainen menetelmä, t u n-
n e t t u siitä, että mainitut kirurgian jälkeiset kompli-
kaatiot aiheutuvat elinsiirrosta.

25 13. Menetelmä ihmisen tromboottisen verisuonitaudin hoita-
miseksi, t u n n e t t u siitä, että se käsittää tehok-
kaan annoksen fibriinispesifistä monoklonaalista vasta-ai-
netta antamisen mainitun hoidon tarpeessa olevalle ihmisel-
le.

30 14. Patenttivaatimuksen 13 mukainen menetelmä, t u n-
n e t t u siitä, että fibriinispesifinen monoklonaalinen
vasta-aine on MH-1.

35 15. Patenttivaatimuksen 13 mukainen menetelmä, t u n-
n e t t u siitä, että mainittu tromboottinen verisuonitau-
ti on halvaus.

16. Patenttivaatimuksen 13 mukainen menetelmä, t u n-

n e t t u siitä, että mainittu tromboottinen verisuonitauti on keuhkotulppa.

17. Patenttivaatimuksen 13 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu tromboottinen verisuonitauti on syvälaskimotukos.

18. Patenttivaatimuksen 13 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu tromboottinen verisuonitauti on valtimo- tai laskimotukos.

19. Patenttivaatimuksen 13 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu tromboottinen verisuonitauti on valtimonhaurauskovetustauti.

15

20. Menetelmä ihmisen tromboottisen verisuonitaudin hoitamiseksi, t u n n e t t u siitä, että se käsittää tehokkaan annoksen fibriinispesifisen monoklonaalisen vasta-aineen fragmenttia tai johdannaista antamisen mainitun hoidon tarpeessa olevalle ihmiselle, joka fragmentti tai johdannainen sisältää mainitun vasta-aineen sitoutuvan domeenin.

21. Patenttivaatimuksen 20 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että fibriinispesifinen molekyylimonoklonaalinen vasta-aine on MH-1.

22. Patenttivaatimuksen 20 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että tromboottinen verisuonitauti on halvaus.

30

23. Patenttivaatimuksen 20 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että tromboottinen verisuonitauti on keuhkotulppa.

24. Patenttivaatimuksen 20 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että tromboottinen verisuonitauti on syvälaskimotukos.

35

25. Patenttivaatimuksen 20 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että tromboottinen verisuonitauti on valtimo- tai laskimotukos.
- 5 26. Patenttivaatimuksen 20 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että tromboottinen verisuonitauti on valtimonhaurauskovetustauti.
- 10 27. Farmaseuttinen koostumus, t u n n e t t u siitä, että se käsittää konjugoimatonta fibriinispesifistä monoklonaalista vasta-ainetta ja farmaseuttisesti hyväksyttävää kantoainetta, jolloin mainittu koostumus on steriilissä muodossa.
- 15 28. Patenttivaatimuksen 27 mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että fibriinispesifinen monoklonaalinen vasta-aine on MH-1.
- 20 29. Farmaseuttinen koostumus, t u n n e t t u siitä, että se käsittää fibriinispesifisen monoklonaalisen vasta-aineen konjugoimatonta fragmenttia tai johdannaista, joka fragmentti tai johdannainen sisältää mainitun vasta-aineen sitoutuvan domeenin, ja farmaseuttisesti hyväksyttävää kantoainetta, jolloin mainittu koostumus on steriilissä muo-
- 25 dossa.
30. Patenttivaatimuksen 29 mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että fibriinispesifinen monoklonaalinen vasta-aine on MH-1.
- 30 31. Välinesarja veritulpan muodostumisen inhiboinnin tarpeessa olevan ihmisen hoitamiseksi, t u n n e t t u siitä, että mainittu välinesarja käsittää konjugoimatonta fibriinispesifistä monoklonaalista vasta-ainetta tai sen fragmenttia tai johdannaista, joka sisältää mainitun vasta-aineen sitoutuvan domeenin, joka on steriilissä muodossa.
- 35 32. Patenttivaatimuksen 31 mukainen välinesarja, t u n n e t t u siitä, että mainittu välinesarja käsittää konjugoimatonta fibriinispesifistä monoklonaalista vasta-ainetta tai sen fragmenttia tai johdannaista, joka sisältää mainitun vasta-aineen sitoutuvan domeenin, joka on steriilissä muodossa.

n e t t u siitä, että fibriinispesifinen monoklonaalinen
vasta-aine on MH-1.

33. Patenttivaatimuksen 31 mukainen välinesarja, t u n-
5 n e t t u siitä, että se käsittää lisäksi farmaseuttisesti
hyväksyttävää kantoainetta, joka on steriilissä muodossa.

34. Patenttivaatimuksen 33 mukainen välinesarja, t u n-
n e t t u siitä, että fibriinispesifinen monoklonaalinen
10 vasta-aine on MH-1.

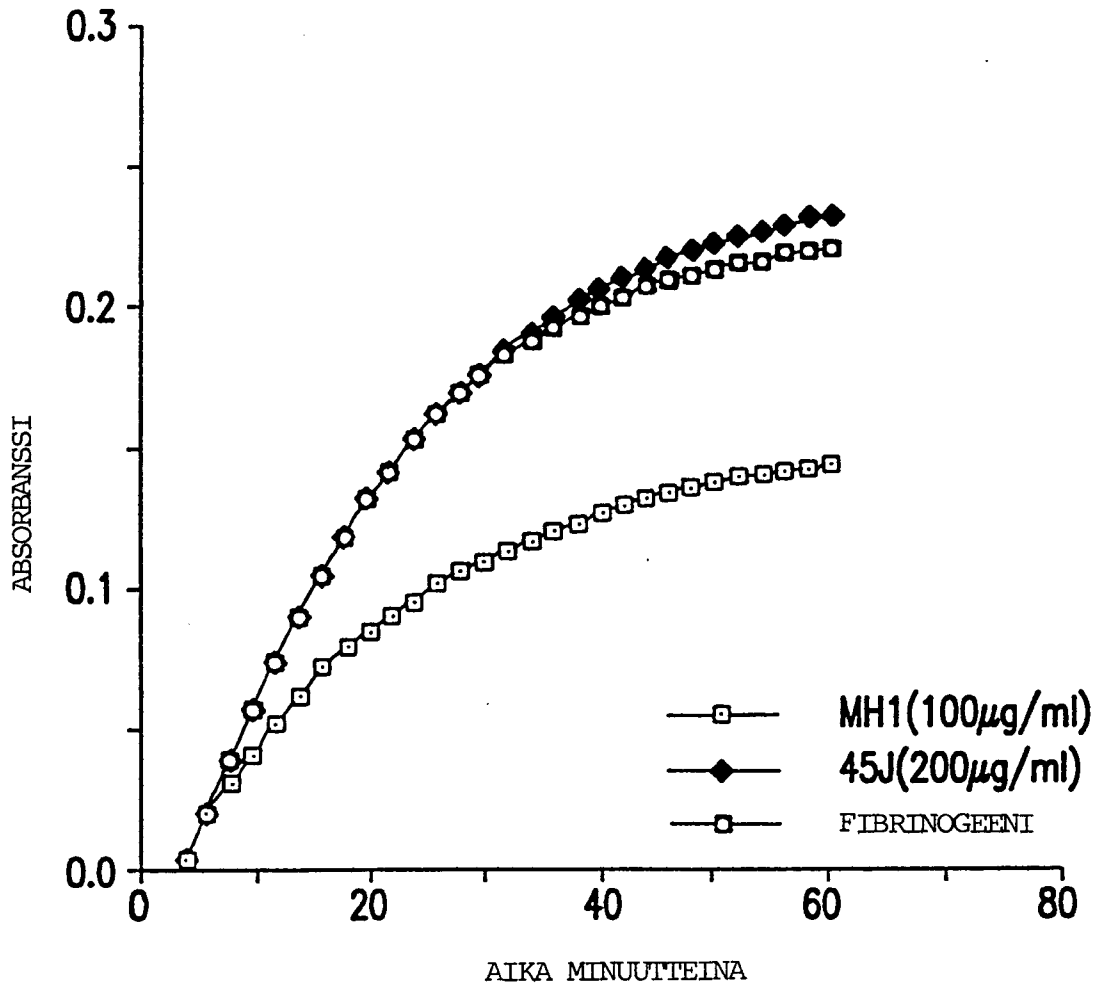


FIG.1

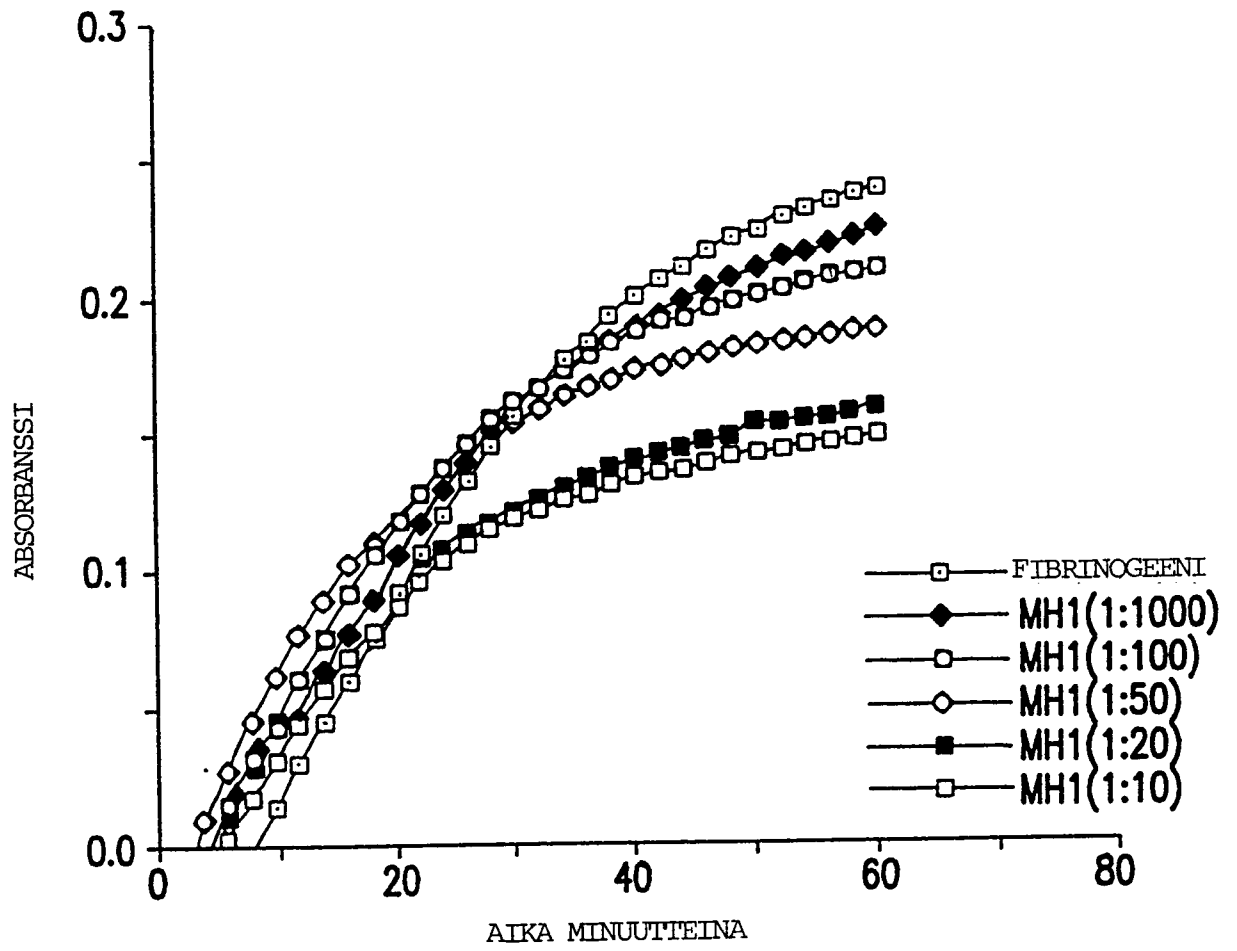


FIG.2