



Республика Таджикистан

(19) **TJ** (11) **301**

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПАТЕНТНОЕ
ВЕДОМСТВО

(51) **7 A61K 39/395, C07K 16/18,**
A61P 9/10

(12) **Описание изобретения**

К ПАТЕНТУ

1

2

(21) 96000411

(22) 21.02.95

(31) 204,015

(32) 24.02.94

(33) US

(46) 06.08.2001, Бюл.№2 (22)

(86) PCT/US 95/01825, 21.02.95

(72) Пол И. ГАРГАН (US)

(71)(73) АМЕРИКАН БИОГЕНЕТИК САЙЕНСИЗ.,
ИНК., (US)

(56) EP 0235805 A2, 09.09.87.

WO 88/04936 A1, 14.07.88.

Harker L.A. and Mann K.G. Thrombosis and fibrinolysis in: Thrombosis and cardiovascular disorders, 1992, pp.1-16.

(54) АНТИФИБРИНОВОЕ АНТИТЕЛО ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В КАЧЕСТВЕ ПРОТИВОТРОМБОТИЧЕСКОГО СРЕДСТВА

(57) Настоящее изобретение относится к способам применения антифибринового антитела для ингибирования образования тромбов. Оно также относится к фармацевтическим композициям, а также к наборам, для применения в таких способах.

1. Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к способам применения антифибринового антитела для ингибирования *in vivo* образования тромбов. Оно также относится к фармацевтическим композициям для применения в таких способах.

2. Предпосылки создания изобретения

2.1. Образование тромбов при заболевании или хирургическом вмешательстве

Сгустки крови, или тромбы, образуются в местах повреждения кровеносных сосудов. Клинические проявления патологического тромбообразования или тромботического заболевания являются исключительно разнообразными, и включают тромбоз глубоких вен (DVT) и артериальный и венозный тромбоз. Тромбоэмболия и тромботические осложнения иного сосудистого заболевания (например, атеросклероза) могут привести в результате к закупорке основных артерий, что ведет к ишемии органов и сопутствующим опасным для жизни состояниям, таким как инсульт (удар), инфаркт миокарда, и т.п.

Кроме того, инвазивные хирургические процедуры, включая, но не ограничиваясь ею, баллонную ангиопластику, и пересадка органов (как естественных, так и искусственных) могут вызывать образование тромбов. Например, при баллонной ангиопластике - процедуре, применяемой для очистки закупоренных артерий, действительно может быть повреждена стенка артерии, что вызывает реокклюзию посредством осаждения нового тромба. Сообщается, что чрез кожная транслюминальная коронарная ангиопластика оставляет сосуд пораженным за счет реокклюзии с частотой 25-35%. (Gimple, L. w., et al., *Circulation*, 86: 1536-46 (1992). См. также Sarembock, I. J. et al., *Circulation*, 80: 1029-40 (1989); и Ip J.H., et al., *JACC* 17: 77B-88B (1991). Действительно, в одном сообщении утверждается, что "механизм ангиопластики, включающий, в большинстве случаев, эндотелиальное повреждение и разрушение тромбоцитов или расслоение, весьма подобен процессу, который ведет к острым ишемическим синдромам". Tenaglia, A.N., *Ann. Rev. Med.*, 44: 465-79, 466 (1993).

Так как показано, что системное лечение антикоагулянтами, такими как гепарин и кумарин, для предотвращения постангиопластической реокклюзии (Ip, J.H. et al., *JACC*, 17: 77B-88B (1991)), имеет небольшой эффект или вовсе его не имеет, и так как такое лечение антикоагулянтами часто несет опасность общего кровотечения у пациентов (*Physicians' Desk Reference*, 47th Ed., *Medical Economics Data* (1993)), были бы полезны новые сайт-специфические способы лечения, когда образование тромбов ингибируется или их образованию ставится препятствие, как в случае доклинического сосудистого заболевания, так и в случае инвазивных хирургических процедур.

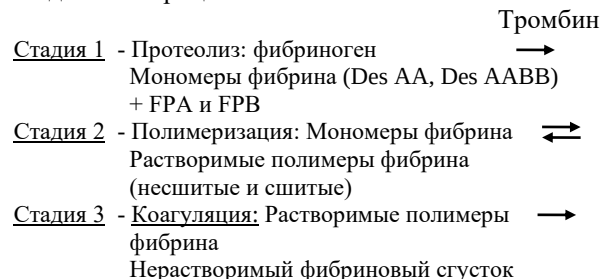
2.2. Система гемостаза

Механизм гемостаза, посредством которого образуется тромб, представляет собой комплексный физиологический реактивный механизм, включаемый при восстановлении повреждения травмированного кровеносного сосуда. См. Harker, L.A., and Mann, K.G., "Thrombosis and Fibrinolysis" b *Thrombosis in Cardiovascular Disorders*, Euster, v. and verstraete, M. (eds), W.B. Saunders Co. (1992), pp.1-16.

Гемостаз достигается при совместном взаимодействии стенки поврежденного кровеносного сосуда, тромбоцитов и коагуляционной системы. см. Furil, B. and Furil, B.C., *Cell*, 53: 505-18 (1988).

Роль коагуляционной системы состоит в предоставлении нерастворимой фибриновой матрицы для стабилизации и закрепления тромбоцитарной пробки, которая собирается на субэндотелиальной структуре поврежденного сосуда в месте повреждения. Коагуляция является процессом амплификации, включающим последовательность ферментных реакций, в которых проферменты (факторы свертывающей системы крови) последовательно активируются с образованием активных ферментов. Образование фибриновой матрицы из циркулирующего фибриногена является результатом этой каскадной последовательности ферментных реакций, в результате которых в требуемом месте быстро образуется фермент тромбин, с помощью которого происходит конверсия фибриногена до фибрина, и фибрин сшивается фактором XIIIa, за счет чего образуется тромб.

Последовательность реакций можно упрощенно представить с помощью следующего трехстадийного процесса.



Фибриноген состоит из трех пар неидентичных полипептидных цепей $\alpha\alpha$, $\beta\beta$ и γ . См. L. Stryer, *Biochemistry*, 3rd Ed., W.H. Freeman and Company New York (1988) p.249. На начальной стадии, когда фибриноген превращается в фибрин, что показано выше на стадии 1, фибриноген расщепляется тромбином с выделением фибринопептида A (FPA) из amino-концевых окончаний двух фибриногенных $\alpha\alpha$ -цепей. Остающаяся часть молекулы фибриногена представляет собой "мономер фибрина", обозначаемый DES AA. Как также показано на стадии 1, тромбин одновременно (но не медленнее) также отщепляет фибринопептид B (FPB) от amino-концевых окончаний двух фибриногенных $\beta\beta$ -цепей. Остающаяся часть молекулы фибриногена после второго отщепления также представляет собой мономер фибрина, обозначаемый DesAABF. В результате выделения FPA и FPB на α - и β -цепях мономера фибрина выявляют-

ся новые аминоконцевые окончания. См. W. Nieuwenhuizen, *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 4:93-96 (1993). На стадии 2 мономеры фибрина самопроизвольно начинают образовывать межмономерные нековалентные связи (несшитые) с образованием растворимого полимера. Фактор XIIIa действует на этот полимер посредством ферментативного добавления ковалентных поперечных связей между звеньями мономера фибрина. Сшитый полимер может оставаться растворимым, но в определенный момент в процессе полимеризации и сшивания фибриновый полимер становится нерастворимым, образуя фибриновый сгусток, как указывается на стадии 3.

Растворимые полимеры фибрина являются промежуточными предшественниками фибринового сгустка. В результате, полагают, у индивидуумов с надвигающимся или существующим тромбозом уровень растворимых полимеров фибрина в плазме повышается. Показано, что обнаружение и измерение количества этих полимеров в крови, в частности, растворимых полимеров фибрина Des AABV полезно в качестве указания на начинающееся образование сгустка крови. См. Nieuwenhuizen, p.94; и Marder et al., патент США № 5206140.

2.3. Антитела для компонентов гемостатической системы

Как встречающиеся в природе, так и выращенные в лаборатории антитела играют некоторую роль в характеристике компонентов гемостатической системы и в разъяснении их функций.

Marciniak, E, and Greenwood, M.F., *Blood*, 53: 81-82 (1979) описывают пример ингибитора свертывания крови в сыворотке 14-летнего пациента с синдромом Дауна, который присутствовал в IgG - фракции, и который ингибировал ферментное выделение фибринопептида A из фибриногена. Hoofs, W.K., et al, *New Eng. J. Med.*, 304: 857-61 (1981), описывают случай 13-летнего пациента, страдающего от активного гепатита, а также от нарушения коагуляции, при котором нарушение обнаруживалось по присутствию антител в крови пациента, что отражает высокую аффинность как к фибриногену, так и к фибрину, и которые ингибировали полимеризацию мономеров фибрина, предотвращая, таким образом, образование фибринового геля.

Sola, B, et al., *Thromb Res.*, 29: 643-53 (1983), описывают создание линии гибридомных клеток, секретирующих моноклональные антитела, специфические как для фибриногена человека, так и для фибрина. Elms, M.J., et al., *Thromb Haemostas*, 50: 591-94 (1983), описывают получение линии гибридомных клеток, секретирующих моноклональные антитела, которые распознают антигенную детерминанту в D-димере - специфический фрагмент, являющийся результатом разрушения сшитого фибрина, Hui, K.Y., et al., *Science*, 222: 1129-32 (1983), и Sheefers - Borchel, U. et al., *Proc, Natl Acad, Sci. USA.*, 82: 7091-95 (1985), описывают применение антигенов синтетических гексапептидов, представляющих собой аминоконцы α -

и β - цепи, соответственно, человеческого фибрина, для получения моноклональных антител, которые связываются с фибрином даже в присутствии фибриногена. Kudryk, B et al., *Mol. Immunol.*, 21: 89-94 (1984), описывают получение линии гибридомных клеток, секретирующих моноклональные антитела для N - DSK - части фибриногена. Sobel, J.H., et al., *Thromb and Haem.*, 60: 153-59 (1988), описывают применение двух различных моноклональных антител, которые связываются с фрагментами CNBr A α - цепи фибриногена, для исследования одних из первых событий перекрестного связывания между соседними молекулами фибрина. Mirshaahi, et al., *Fibrinogen*, 4: 49-54 (1990), описывают получение линии гибридомных клеток, которые секретируют моноклональные антитела для фибриногена, которые способны ингибировать полимеризацию фибрина. Cierniewski, C.S., and Budrynski, A.Z., *Biochemistry*, 31: 4248-53 (1992), описывают получение и применение поликлональных и моноклональных антител, направленных против очищенного человеческого фибриногена, которые тормозят интенсивность полимеризации мономеров фибрина, и также препятствуют воздействию тромбина на фибриноген. Tymkewycz, P.M., et al., *Blood Coag and Fibrinol.*, 4: 211-21 (1993), описывают получение пяти моноклональных антител с высокой аффинностью к фибрину, которые не реагируют с фибриногеном. Gargan, P.E., et al., *Fibrinolysis*, 7: 275-83 (1993), описывают создание линии гибридомных клеток - MH-1, которая продуцирует моноклональные антитела, специфические как к сшитой, так и к несшитой полимерной структуре фибрина, но не обнаруживающие иммунореактивности ни к фибриногену, ни к каким-либо продуктам разложения фибрина или фибриногена. Кроме того, антитело MH-1 не реагирует с мономерами фибрина Des AA или Des AABV, и не является сколько-нибудь реактивным в отношении отдельных α -, β -или γ - цепей фибриногена.

Для дальнейшего обсуждения применения моноклональных антител, специфических к компонентам системы гемостаза, см. Kudryk, B. J., et al., "Monoclonal Antibodies as Probes for Fibrin (ogen) Proteolysis" b Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy, Chatal, J-F (ed), CRC Press, Boca Raton, FL (1989), pp. 365-398.

Разработаны модифицированные антитела для гемостатических компонентов для клинического применения в качестве средств для скинтиграфии тромбов in situ. См., например, Liao, C-S, and Su, C-T, *J. Form Med Assoc*, 88: 209-12 (1989); Wasser, 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 (1990); u kanke, M., et al., *J. Nucl. Med.*, 32: 1254-60 (1991).

Разработаны для терапевтического применения антитела к фибрину, конъюгированному с тромболитическими ферментами. См., например, Bode, C., et al., *Science*, 229: 765-67 (1985). Согласно этому сообщению, сайт-специфическая достав-

ка тромболитического средства обладает значительно возросшей эффективностью средства при разрушении сгустков.

Наконец, опубликовано несколько патентов США, относящихся к получению и/или способам применения моноклональных антител, специфических к фибриногену, или к продуктам его разрушения. См. Патенты США №№ 4722903, 4758524 и 4916070 - перечень, не являющийся исчерпывающим.

2.4. Способы предупреждения образования тромбов

Противотромботическое лечение обычно включает введение одного или нескольких антикоагулянтов, таких как гепарин или кумарин. Physicians' Desk Reference, 47th Ed., Medical Economics Data (1993); The Merk Manual of Diagnostics and Therapy, 15th Ed., Merk Sharpe & Dohme Research Labs (1987). Такие антикоагулянты часто применяются при попытке предотвратить рецидивирующий тромбоз у пациентов, страдающих от сосудистого заболевания, и при попытке предупредить острую тромботическую реокклюзию после ангиопластики.

Основным недостатком применения таких системных антикоагулянтов является опасность системного кровотечения. Лечащие врачи предупреждают, что "у пациентов, получающих гепарин, кровотечение может произойти фактически в любом месте". Physicians' Desk Reference, 47th Ed., Medical Economics Data (1993), p.2568.

Кроме того, показано, что эффективность таких антикоагулянтов при предупреждении реокклюзии после ангиопластики либо не отличается от эффективности обработки плацебо, либо является невоспроизводимой. (Ip, J.H., et al., JACC, 17: 77B-88B (1991)). Соответственно, преимущества при применении таких антикоагулянтов нейтрализуются как опасностью кровотечения, так и их сомнительной эффективностью в предупреждении реокклюзии.

Многие биологические и механические подходы использовались при попытках уменьшить степень реокклюзии после ангиопластики, но лечение не показывало устойчивых положительных результатов. Соответственно, имеется возрастающий интерес к "сайт-специфической" или "направленной" доставке противотромботических средств к местам повреждения сосудов. Gimple, L. W., et al., Circulation, 86: 1536-46 (1992).

Сайт-специфическая доставка противотромботических средств с использованием антител для соответствующих компонентов гемостатической системы должна служить локализации таких средств в месте повреждения сосуда. Одно из преимуществ такой локализации состоит в том, что потребуется меньшая вводимая доза. Другим преимуществом локализации должно быть уменьшение опасности системного кровотечения.

В ряде случаев показано, что антитела для специфических компонентов гемостатической системы сами ингибируют полимеризацию фибрина. Francis, S.E., et al., Am. J. Hem., 18: 111-19

(1985), описывают исследования моноклонального антитела, созданного против фибриногена, которое обладало "умеренной" антикоагулирующей активностью. Mirshahi, M., et al., Fibrinogen, 4: 49-54 (1990), описывают получение линии гибридомных клеток, секретирующих моноклональные антитела, в которых антиген представлял собой фрагмент D-продукт плазминного разрушения фибриногена. Эти моноклональные антитела энергично реагировали с фибриногеном и ингибировали полимеризацию фибрина. Ciernewski, C.S., and Budrynski, A.Z., Biochemistry, 31: 4248-53 (1992), описывают получение трех различных линий гибридомных клеток, в которых антиген является естественным человеческим фибриногеном, и которые секретируют моноклональные антитела, подавляющие интенсивность полимеризации фибрина.

Однако, при разработке сайт-специфического лечебного или профилактического противотромботического средства все эти три сообщения являются малополезными или вовсе бесполезными. Это действительно так, поскольку во всех упомянутых случаях антитела являются перекрестно-взаимодействующими либо с фибриногеном, либо с продуктами разложения фибриногена, которые все являются убиквитарными для гемостатической системы. Любое такое антитело, введенное пациенту, должно тесно связываться с фибриногеном или с продуктами разрушения фибриногена, и не будет способно ингибировать полимеризацию фибрина или образование тромбов в месте повреждения кровеносного сосуда.

Настоящее изобретение дает возможность совершенно иного подхода к проблеме ингибирования образования тромбов, используя моноклональные антитела, которые являются фибрин-специфическими (антифибриновыми) (т.е., без существенного перекрестного взаимодействия с фибриногеном или с продуктами, образованными при плазминном разрушении фибриногена или фибрина). Настоящее изобретение относится к способу применения упомянутых антифибриновых моноклональных антител, при котором, на удивление, ингибируется образование тромбов в месте повреждения кровеносного сосуда.

3. Краткое изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение относится к способу ингибирования образования тромба в месте повреждения кровеносного сосуда у человека, нуждающегося в таком ингибировании, посредством введения антифибринового моноклонального антитела. Настоящее изобретение также относится к фрагментам или производным антифибринового моноклонального антитела, и упомянутые фрагменты и производные содержат связывающий домен антитела. Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей антифибриновое моноклональное антитело, или его фрагмент, или его производное, и фармацевтически эффективный носитель, которая, в достаточном количестве, является эффективной при ингибировании образования тромба у челове-

ка. Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим наборам, содержащим один или несколько ингредиентов фармацевтической композиции изобретения.

4. Краткое описание рисунков

Рисунок 1. Включение моноклонального антитела МН-1 в реакционную смесь фибриноген-тромбинной коагуляции ингибирует как степень, так и абсолютную величину коагуляции. Контрольными реакционными смесями являются реакционные смеси “фибриноген” и “45J”.

Рисунок 2. Включение увеличивающегося количества моноклонального антитела МН-1 в реакционную смесь фибриноген-тромбинной коагуляции приводит в результате к возрастающему уровню ингибирования коагуляции. Контрольной реакционной смесью является “фибриноген”.

5. Подробное описание изобретения

5.1. Полезность настоящего

Как ни удивительно, но обнаружено, что антифибриновое моноклональное антитело может ингибировать полимеризацию фибрина и образование тромбов. Таким образом, антифибриновые моноклональные антитела могут использоваться для предупреждения или лечения любого состояния у человека, которое поддается профилактике или лечению посредством ингибирования полимеризации фибрина или образования тромбов. Например, антифибриновые моноклональные антитела являются полезными при лечении людей, страдающих от какого-либо сосудистого заболевания, которое несет с собой опасность патологического тромбоза. Примерами, которыми не ограничивается перечень таких сосудистых заболеваний, являются тромбоз глубоких вен (DVT), артериальный и венозный тромбозы, удар, тромбоэмболия, эмболия легких и тромботические осложнения при атеросклерозе.

Антифибриновые моноклональные антитела также полезны, например, при лечении людей, которых готовят к инвазивным хирургическим процедурам, во время или при восстановлении после этих процедур. В описании настоящего изобретения термин “инвазивная хирургическая процедура” относится к любой хирургической процедуре, которая может привести в результате к повреждению артериального или венозного кровеносного сосуда, что может привести к тромботическим осложнениям. Примерами, которые не ограничиваются такие процедуры, являются баллонная ангиопластика и пересадка органов (как природных, так и искусственных).

Кроме антифибриновых моноклональных антител, могут быть созданы известными техническими приемами фрагменты антител, которые содержат идиотип (связывающий домен) антифибринового антитела. Например, такие фрагменты включают, но не ограничиваются ими, (1) F(ав')₂-фрагменты, которые могут быть получены пепсиновым перевариванием молекулы антитела; (2) Fав'-фрагменты, которые могут быть получены восстановлением дисульфидных мостиков F(ав')₂-

фрагментов; и (3) Fав-фрагменты, которые могут быть получены путем обработки молекулы антитела лапанном и восстановителем. Такие фрагменты антител входят в объем настоящего изобретения. Для ознакомления с другими примерами получения и применения фрагментов антител см. Parham, P., et al., J. Immunol. Meth, 53: 133 (1982); и Khaw, B-A, et al., J. Nucl. Med, 34: 2264-68 (1993).

Кроме антифибриновых моноклональных антител и фрагментов антител, могут быть получены известными техническими приемами другие производные антител, которые содержат идиотип (связывающий домен) антифибринового антитела. Например, могут быть синтезированы рекомбинантные и синтетические олигопептиды и их аналоги, которые оказывают такое же ингибирующее действие на образование тромбов, как антифибриновое моноклональное антитело или его фрагменты. Такие производные включаются в объем настоящего изобретения. По поводу других примеров применения синтетических олигопептидов с последовательностями на основе области первичного связывания моноклонального антитела см. Knight, L., et al., J. Nucl. Med, 35: 282-88 (1994).

Наконец, в объем настоящего изобретения входит любое функционально эквивалентное антифибриновое антитело, его фрагмент или производное. Термином “функционально эквивалентное” обозначается любое антифибриновое антитело, или его фрагмент, или его производное, которые способны в достаточной степени ингибировать образование тромбов у человека, нуждающегося в таком воздействии, посредством связывания с тем же эпитопом, с которым связывается антитело МН-1.

5.2. Получение и характеристика моноклонального антитела МН-1

Многие из прежних подходов, принятых для выращивания антифибриновых антител, сосредоточивались на иммунизации животных растворимыми фрагментами фибрина и синтетическими пептидами, которые имитируют доступные неоантигенные участки на фибрине. См. Hui, K.Y., et al., Science, 222: 1129-32 (1983); Sheefers - Borchel, V., et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA, 82: 7091-95 (1985); Elms, et al., Thromb Haemostas, 50: 591-94 (1983), и Kudryk, B., et al., Mol. Immunol, 21: 89-94 (1984). Однако, предполагается, что связывающий сайт таких антител сохраняется во время процесса разрушения фибрина, и, следовательно, такие антитела также могут связываться с продуктами разрушения фибрина.

Патент США № 5120834 (далее обозначаемый здесь “патент '834”), Gargan et al., выданный 9 июня 1992, который включается в настоящее в качестве ссылки, относится, главным образом, к способу получения моноклональных антител от стерильных животных посредством иммунизации упомянутых животных выбранным антигеном. Полагают, что преимущество использования стерильной системы, с которой получают моноклональные антитела, состоит в том, что такая систе-

ма будет проявлять весьма усиленный иммунный отклик на антиген, увеличивая вероятность определения местонахождения лимфоцита, который продуцирует антитело, способное к связыванию со специфическим эпитопом антигена. Установлено, что такая система является особенно пригодной для создания высоко специфического антитела к фибрину, которое имеет небольшое перекрестное взаимодействие с фибриногеном или не имеет его. Вырашивание такого выбирающего антитела являлось проблематичным, так как имеется оценка, что структурные и конформационные подобию между фибрином и фибриногеном превышают 98% (Plow, E.F., et al., *Semin Thromb Haemostas*, 8: 36 (1982)). В результате, только небольшой процент эпитопов на молекуле фибрина в действительности являются неоантигенами (т.е., единственно для фибрина).

Патент '834 относится к линии гибридных клеток АТСС №. НВ 9739, секретирующих моноклональное антитело МН-1. Моноклональное антитело МН-1 является специфическим к сшитым и несшитым полимерам фибрина, но не реагирует перекрестно с фибриногеном или с продуктами плазминного разрушения фибриногена или фибрина.

МН-1 очищают в соответствии с процедурами, описанными в патенте '834. МН-1 специфически связывается с фибрином и не реагирует перекрестно с фибриногеном при конкурентном анализе. МН-1 не реагирует перекрестно ни с какими-либо продуктами, образовавшимися при плазминном разрушении фибриногена, ни с какими-либо продуктами, образовавшимися при плазминном разрушении фибрина. В результате, можно заключить, что (1) МН-1 распознает эпитоп интактной молекулы фибрина, который не присутствует или не открывается на поверхности молекулы предшественника - фибриногена; и (2) эпитоп явно разрушается за счет переваривания плазмином сшитого фибрина.

Кроме того, МН-1, для определения аффинности МН-1 к фибрину, описывается с помощью анализа Scatchard (Frankel, et al., *Mol Immunol*, 16: 101-6 (1979)) с применением меченого ^{125}I антитела МН-1. Величина, полученная для константы диссоциации K_D , составляет $6,7 \times 10^{-10}$ М, что соответствует аффинности в 5000 крат от аффинности тканевого плазменного активатора для фибрина.

Вестерн-иммуноблоттинг-анализ показывает, что МН-1 не реагирует перекрестно с $\text{A}\alpha$ -, $\text{B}\beta$ - или γ -цепями фибриногена. Тот же метод показывает, что МН-1 реагирует как со сшитым фибрином, так и с несшитым фибрином, причем аффинность к сшитому фибрину является большей из этих двух величин.

5.3. Способы введения

Согласно настоящему изобретению, антифибриновые моноклональные антитела, или их фрагменты, или их производные, вводят человеку, нуждающемуся в лечении с ингибированием тромбообразования. Антитела, или их фрагменты,

или их производные, вводят человеку, предпочтительно, в форме, которая является неконъюгированной с каким-либо агентом мечения радиоактивным изотопом, тромболитическим или иным агентом, или какой-либо иной молекулой или ее частью. Однако, способы изобретения могут быть также осуществлены с использованием антител или их производных, которые конъюгируются с радиоизотопными метками, тромболитическими или иными агентами, или с какой-либо молекулой или ее частью, и охватываются объемом настоящего изобретения.

Термин "носитель" относится к разбавителю, эксципиенту или наполнителю, с которыми вводят антифибриновое антитело или его фрагмент или его производное.

Термин "фармацевтически приемлемый носитель" означает, что носитель одобрен федеральными органами управления или органами управления штата, или внесены в перечень фармакопеи США или другой общепризнанной фармакопеи для применения на животных и, конкретнее, на людях.

Термин "противотромботическая композиция", который используется в настоящем изобретении, относится к композиции, содержащей антифибриновое моноклональное антитело, или его фрагмент, или его производное, и фармацевтически приемлемый носитель, которая, в достаточном количестве, может ингибировать образование тромбов у человека, нуждающегося в упомянутом ингибировании.

Термин "эффективная доза", который используется в настоящем изобретении, относится к количеству моноклонального антитела, или его фрагмента, или его производного, которое является достаточно большим, чтобы ингибировать образование тромбов у человека, нуждающегося в таком лечении. Дозировка не должна быть настолько большой, чтобы вызывать вредное побочное действие, такое как нежелательные перекрестные реакции, и подобное. Вообще, дозировка будет изменяться в зависимости от возраста, состояния, пола и тяжести заболевания пациента, противопоказаний, если они имеются, иммунной толерантности, и других подобных переменных факторов, которые устанавливаются лечащим врачом. Хотя дозировки будут изменяться в зависимости от индивидуального набора условий, в большинстве случаев сосудистых заболеваний и в большинстве случаев хирургических вмешательств доза будет определяться массой тела человека, нуждающегося в лечении, находясь в интервале от 1 мкг/кг массы тела до 50 мкг/кг, предпочтительно - в интервале от 5 мкг/кг до 10 мкг/кг массы тела.

5.4. Способы введения

Антифибриновые моноклональные антитела, или их фрагменты, или их производные, могут вводиться человеку любым подходящим способом, в том числе, парентерально, в виде однократной инъекции ударной дозы вещества, непрерывного вливания, или посредством сочетания этих двух способов. Введение также может быть осу-

ществлено посредством прямой инфузии катетером, такой как внутрикороонарное введение, когда это показано.

Приготовление препаратов для парентерального введения включает, например, восстановление лиофилизированных антифибриновых моноклональных антител, или их фрагментов, или их производных, в стерильном, свободном от эндотоксинов, физиологическом растворе, или, более обобщенно, может включать восстановление или диспергирование антифибриновых моноклональных антител, или их фрагментов, или их производных, в стерильных водных или неводных растворах, суспензиях или эмульсиях. Примерами неводных растворителей являются пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительное масло, такое как оливковое масло, инъеклируемые органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Водными носителями являются вода, спиртоводные растворы, эмульсии или суспензии, в том числе, солевые и буферные среды. Парентеральные носители включают раствор хлорида натрия, декстрозу Рингера, декстрозу и хлорид натрия, лактированную декстрозу Рингера, или нелетучие масла. Внутривенные носители включают жидкие и питательные дополнительные вещества, такие как на основе декстрозы Рингера, и подобные. Также могут присутствовать консерванты и другие добавки, такие как, например, противомикробные агенты, антиокислители, хелатирующие средства, и инертные газы, и подобные добавки. Предпочтительно, чтобы фармацевтические композиции настоящего изобретения находились в стерильной форме, которая удовлетворяет стандартам стерильности, установленным управлением питания и лекарственных препаратов Соединенных Штатов.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим наборам, содержащим один или несколько ингредиентов фармацевтических композиций изобретения, хранящихся в одном и том же или в разных контейнерах. Может быть приложена листовка, необязательно в самом таком контейнере (контейнерах), по форме, предписанной правительственным органом, контролирующим производство, применение или продажу фармацевтических или биологических продуктов, и в этой листовке отражается разрешение органа на производство, применение или продажу для применения человеком. Могут прилагаться инструкции, необязательно привязанные к наборам, которые содержат только лиофилизованное антитело, или его фрагменты, или его производные, о носителях, которые являются подходящими для введения человеку, нуждающемуся в лечении.

Объем, продолжительность, временной режим и способ лечения будут изменяться в зависимости от возраста, массы, состояния и пола человека, нуждающегося в лечении, а также в зависимости от типа и степени заболевания, которое требуется лечить, и регулируются назначениями лечащего врача в соответствии с каждым набором условий. Лечение может назначаться непосредственно перед, во время или после любой хирургической процедуры, или как перед, так и во время

процедуры, или как во время, так и после процедуры, в зависимости от конкретного набора условий при данном случае.

Например, при хирургической процедуре, такой как баллонная ангиопластика, часто случается, что у больного человека уже имеется большое количество значительно рассеянных кровяных сгустков. В такой ситуации, вообще, будет выгодно ввести противотромботические композиции непосредственно после осуществления процедуры ангиопластики, используя, предпочтительно, катетер, пока он еще на месте, с тем, чтобы прямо промыть поврежденную часть кровеносного сосуда противотромботической композицией, сосредоточивая, посредством этого, лечение в одном этом месте. Это предотвращает потерю противотромботической композиции, которая может происходить в результате, например, связывания антитела с тромбами в незатронутых местах.

В ситуациях, включающих инвазивные хирургические процедуры для пациентов, не болеющих патологическими тромбозами, вообще, будет предпочтительно вводить противотромботическую композицию либо непосредственно перед процедурой, либо во время процедуры, так как существует меньший риск потери противотромботической композиции за счет связывания в незатронутых местах.

Кроме того, в большинстве случаев, включающих хирургические процедуры, время, в течение которого существует повышенная опасность образования тромбов, имеет тенденцию ограничиваться моментом завершения процедуры. В результате, достаточным для эффективного ингибирования образования тромбов может быть только ограниченное количество обработок, или даже одна обработка достаточной длительности, посредством чего значительно уменьшается опасность коагуляции, индуцированной хирургическим вмешательством, со всеми присущими ей опасностями для пациента.

В случае хронического тромботического заболевания временной режим, продолжительность и число противотромботических обработок зависят, в значительной степени, от диагностики состояния пациента до и после лечения и его реакции на предварительное противотромботическое лечение, что должно определяться, контролироваться и оцениваться лечащим врачом.

5.5. Определение эффективности лечения

Эффективность противотромботического лечения моноклональным антителом МН-1, или его фрагментом, или его производным, может быть определена стандартными способами. Примерами таких способов являются, но не ограничиваются перечисленным, (1) ангиопластический мониторинг посредством отображения прохождения контрастного вещества по артерии или вене, когда появление преграды на пути контрастного вещества указывает на необходимость дальнейшего лечения; (2) использование сцинтиграфии с применением антитромбового антитела, конъюгированного с радиоизотопной меткой, когда могут

быть отслежены размер и местоположение тромба, чтобы установить необходимость дальнейшего лечения; (3) контроль за появлением и степенью клинических симптомов, когда возрастание числа или тяжести симптомов может указать на необходимость дальнейшего лечения; (4) измерение уровня тромбина в крови пациента, так как существует обратное соотношение между уровнями фибриногена и фибрина, когда падение уровня фибриногена может указать на возможное соответствующее увеличение уровня фибрина и полимеризацию фибрина, указывающие на необходимость дальнейшего лечения.

Теперь, имея общее описание настоящего изобретения, его будет легче понять, обратившись к характерному примеру, включенному в настоящее описание только с целью иллюстрации, и не предназначенному для каких-либо ограничений.

5. 6. Пример: ингибирование коагуляции in vitro.

Проводят ряд экспериментов in vitro, чтобы определить влияние МН-1 на коагуляцию. Очищенный человеческий фибриноген (Kabi, Chromogenix Co, Ohio) растворяют в 150 мМ забуференном фосфатом солевом растворе, при физиологическом значении рН, с концентрацией 1 мг/мл, и помещают приблизительно по 100 мкл в каждую лунку титрационного микропланшета (Costar). В каждую лунку, для образования реакционной смеси, добавляют приблизительно по 50 мкл бычьего тромбина до конечной концентрации 0,5 единиц NIH на мл. К реакционной смеси, в нулевой момент времени, добавляют приблизительно 50 мкл либо (1) моноклонального антитела МН-1, чтобы получить конечную концентрацию антитела 100 мкг/мл; либо (2) моноклонального антитела 45J (моноклональное антитело 45J, которое реагирует перекрестно с фибрином и фибриногеном, секретируется линией гибридомных клеток ATCC № HB 9740, которую получают обычными техническими приемами, используя традиционных мышей Bal b/c, когда мышей иммунизируют фибрином), чтобы получить конечную концентрацию антитела 200 мкг/мл; либо (3) физиологического раствора. Дают возможность реакции протекать в течение 60 минут при 37°C. Коагуляцию определяют спектрометрически при 340 нм каждые 2 минуты. Увеличение поглощения указывает, что коагуляция прогрессирует. Окончание процесса свертывания можно наблюдать как плато на кривой “поглощение - время”.

Рис.1 показывает, что обработка МН-1 подавляет скорость коагуляции, что очевидно из меньшего наклона начального участка кривой “поглощение - время” для реакционной смеси, обработанной МН-1, по сравнению либо с контрольной реакционной смесью с 45J, либо с контрольной смесью с соевым раствором (фибриноген). Кроме того, МН-1 уменьшает абсолютную величину

коагуляции, которая имеет место, что определяется по более низкому уровню пологого участка кривой для МН-1 при сравнении с кривыми для контрольных реакционных смесей. Контрольная реакционная смесь, содержащая антитело 45J (при удвоенной концентрации против МН-1), не обнаруживает какого-либо ингибирования коагуляции при сравнении с контрольной реакционной смесью с соевым раствором. Эти данные подтверждают предположение о том, что моноклональное антитело МН-1 способно ингибировать образование тромбов.

Во втором эксперименте проверяют действие МН-1 при нескольких различных концентрациях на время свертывания по сравнению с контрольной реакционной смесью с фибриногеном. На рис.2 приводятся профили реакции коагуляции (поглощение - время) при увеличении концентрации МН-1 в реакционной смеси. (1:1000 = 1 мкг/мл; 1:100 = 10 мкг/мл; 1:50 = 20 мкг/мл; 1:20 = 50 мкг/мл; 1:10 = 100 мкг/мл; фибриноген = контроль).

5.7. Депонирование гибридомы

Линии гибридомных клеток МН-1 и 45J депонированы в Американской коллекции типовых культур (ATCC) 9 июня 1988 под инвентарными номерами HE 9739 и HI 9740, соответственно. ATCC находится по адресу; 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852. Антитело МН-1 представляет собой антитело IgG, с легкой каппа-цепью, и наблюдалось, что МН-1 реагирует перекрестно как с человеческим фибрином, так и с кроличьим фибрином.

Настоящее изобретение не ограничивается в объеме депонированной линией гибридомных клеток ATCC № HB 9739 или моноклональным антителом МН-1, но предполагается, что они являются отдельными иллюстрациями антифибринового моноклонального антитела, которое ингибирует образование тромбов. Любое функционально эквивалентное антифибриновое моноклональное антитело, или его фрагмент, или его производное, входят в объем настоящего изобретения. Термином “функционально эквивалентное” отмечается, что моноклональное антитело, или его фрагмент, или его производное, способно ингибировать образование тромбов посредством связывания с тем же эпитопом, с которым связывается антитело МН-1.

Настоящее изобретение может быть осуществлено в иных специфических формах без отхода от его сущности или его существенных особенностей, и, соответственно, следует скорее обратиться к прилагаемой формуле изобретения, чем к приведенному выше описанию, как к заявлению об объеме изобретения.

Все публикации и патенты, цитированные выше, включаются в настоящее в качестве ссылок.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ ингибирования образования тромбов у человека, включающий в себя введение человеку, нуждающемуся в упомянутом ингибировании, эффективного количества антифибринового моноклонального антитела МН-1, продуцируемого гибридомой АТСС 9739, или антитела, которое связывается с тем же эпитопом, что и моноклональное антитело МН-1.

2. Способ ингибирования образования тромбов у человека, включающий в себя введение человеку, нуждающемуся в упомянутом ингибировании, эффективного количества фрагмента или производного антифибринового моноклонального антитела МН-1, продуцируемого гибридомой АТСС 9739, или антитела, которое связывается с тем же эпитопом, что и моноклональное антитело МН-1, фрагмент или производное которого содержит связывающий домен указанного антитела.

3. Способ лечения человека для снижения у человека опасности постхирургических тромботических осложнений, включающий в себя введение человеку, нуждающемуся в упомянутом лечении, эффективного количества антифибринового моноклонального антитела МН-1, продуцируемого гибридомой АТСС 9739, или антитела, которое связывается с тем же эпитопом, что и моноклональное антитело МН-1.

4. Способ по п.3, **отличающийся** тем, что постхирургические тромботические осложнения являются результатом ангиопластики.

5. Способ по п.3, **отличающийся** тем, что постхирургические тромботические осложнения являются результатом трансплантации органов.

6. Способ лечения человека для снижения у человека опасности постхирургических тромботических осложнений, включающий в себя введение человеку, нуждающемуся в упомянутом лечении, эффективного количества фрагмента или производного антифибринового моноклонального антитела МН-1, продуцируемого гибридомой АТСС 9739, или антитела, которое связывается с тем же эпитопом, что и моноклональное антитело МН-1, фрагмент или производное которого содержит связывающий домен указанного антитела.

7. Способ по п.6, **отличающийся** тем, что постхирургические тромботические осложнения являются результатом ангиопластики.

8. Способ по п.6, **отличающийся** тем, что постхирургические тромботические осложнения являются результатом трансплантации органов.

9. Способ лечения тромботического сосудистого заболевания у человека, включающий в себя введение человеку, нуждающемуся в упомянутом лечении, эффективного количества антифибринового моноклонального антитела МН-1, продуцируемого гибридомой АТСС 9739, или антитела, которое связывается с тем же эпитопом, что и моноклональное антитело МН-1.

10. Способ по п.9, **отличающийся** тем, что тромботическое сосудистое заболевание представляет собой удар.

11. Способ по п.9, **отличающийся** тем, что тромботическое сосудистое заболевание представляет собой эмболию легких.

12. Способ по п.9, **отличающийся** тем, что тромботическое сосудистое заболевание представляет собой тромбоз глубоких вен.

13. Способ по п.9, **отличающийся** тем, что тромботическое сосудистое заболевание представляет собой артериальный или венозный тромбоз.

14. Способ по п.9, **отличающийся** тем, что тромботическое сосудистое заболевание представляет собой атеросклероз.

15. Способ лечения тромботического сосудистого заболевания у человека, включающий в себя введение человеку, нуждающемуся в упомянутом лечении, эффективного количества фрагмента или производного антифибринового моноклонального антитела МН-1, продуцируемого гибридомой АТСС 9739, или антитела, которое связывается с тем же эпитопом, что и моноклональное антитело МН-1, фрагмент или производное которого содержит связывающий домен указанного антитела.

16. Способ по п.15, **отличающийся** тем, что тромботическое сосудистое заболевание представляет собой удар.

17. Способ по п.15, **отличающийся** тем, что тромботическое сосудистое заболевание представляет собой эмболию легких.

18. Способ по п.15, **отличающийся** тем, что тромботическое сосудистое заболевание представляет собой тромбоз глубоких вен.

19. Способ по п.15, **отличающийся** тем, что тромботическое сосудистое заболевание представляет собой артериальный или венозный тромбоз.

20. Способ по п.15, **отличающийся** тем, что тромботическое сосудистое заболевание представляет собой атеросклероз.

21. Фармацевтическая композиция, содержащая неконъюгированное антифибриновое моноклональное антитело МН-1, продуцируемое гибридомой АТСС 9739, или антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и моноклональное антитело МН-1, и фармацевтически приемлемый носитель, при этом упомянутая композиция находится в стерильной форме.

22. Фармацевтическая композиция, содержащая неконъюгированный фрагмент или производное антифибринового моноклонального антитела МН-1, продуцируемого гибридомой АТСС 9739, или антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и моноклональное антитело МН-1, фрагмент или производное которого содержит связывающий домен указанного антитела, и фармацевтически приемлемый носитель, при этом

упомянутая композиция находится в стерильной форме.

23. Набор для лечения человека, нуждающегося в ингибировании образования тромба, при этом упомянутый набор включает в себя неконъюгированное антифибриновое моноклональное антитело МН-1, продуцируемое гибридомой АТСС 9739, или антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и моноклональное антитело

МН-1, или его фрагмент или производное, содержащее связывающий домен указанного антитела, и фармацевтически приемлемый носитель, при этом упомянутый набор находится в стерильной форме.

24. Набор по п.23, отличающийся тем, что содержит также фармацевтически приемлемый носитель, который находится в стерильной форме.

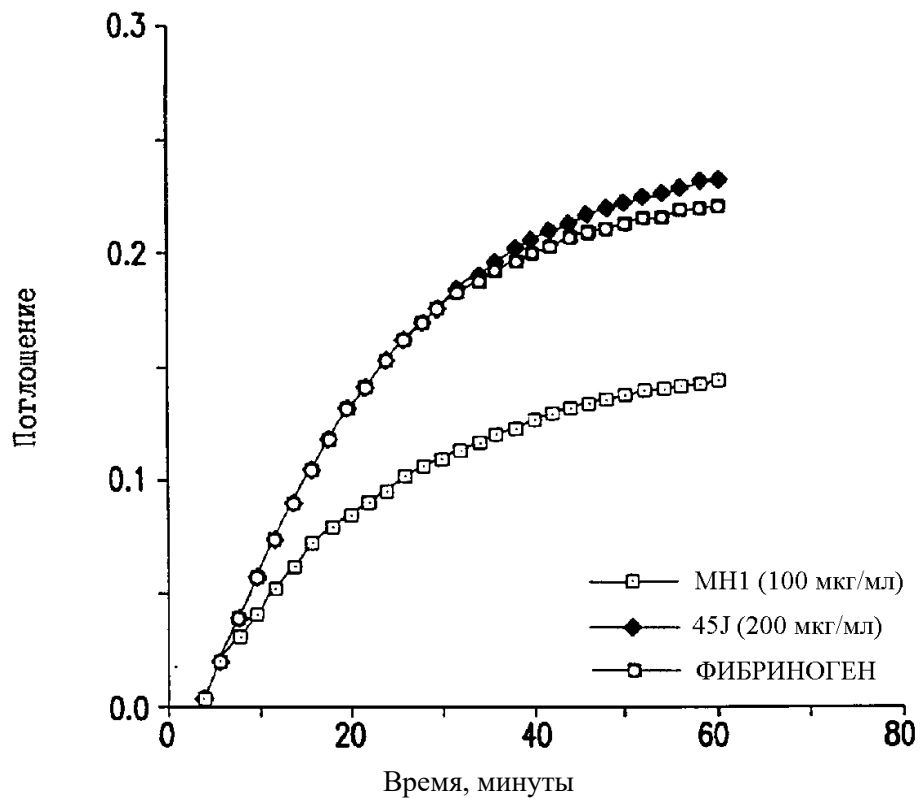


Рис. 1

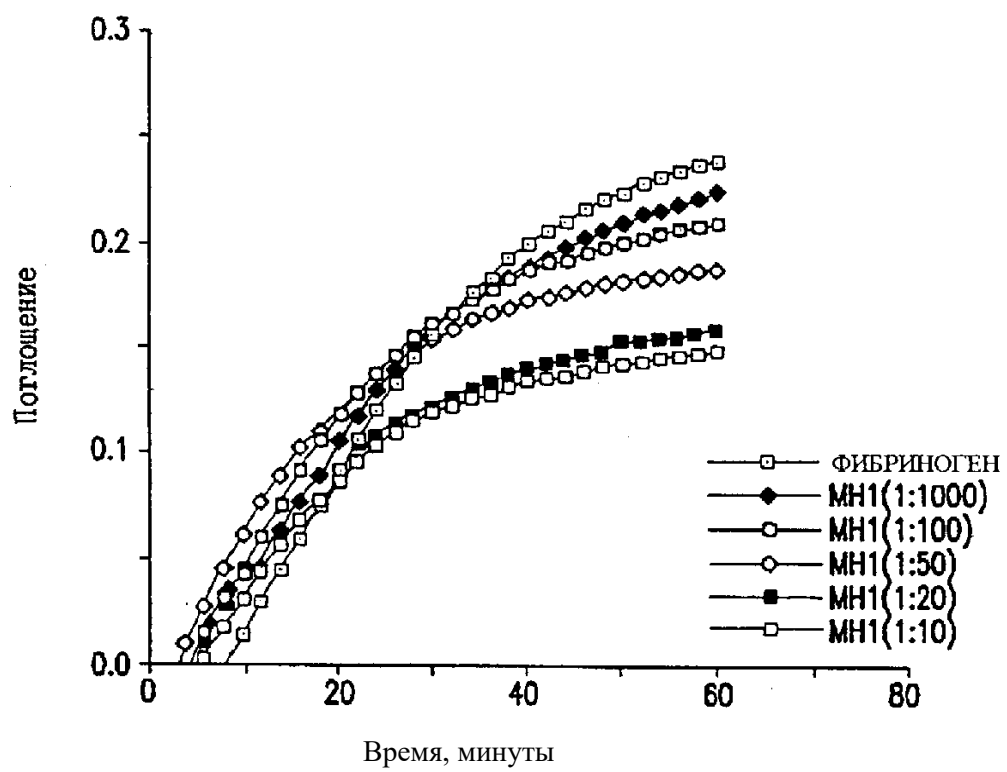


Рис. 2