

(19)



(10) **LT 4192 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patent numeris: **4192**

(51) Int. Cl.⁶: **A61K 39/00**
A61K 39/395
A61K 49/00
C07K 16/18

(21) Paraiškos numeris: **96-140**

(22) Paraiškos padavimo data: **1996 09 24**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1997 03 25**

(45) Patent paskelbimo data: **1997 07 25**

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/US95/01825**

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **1995 02 21**

(85) Nacionalinės procedūros pradžia: **1996 09 24**

(31, 32, 33) Prioritetas: **204015, 1994 02 24, US**

(72) Išradėjas:

Paul E. Gargan, US

(73) Patent savininkas:

**American Biogenetic Sciences, Inc., 1375 Akron Street, Copiague,
NY 11726, US**

(74) Patentinis patikėtinis:

Reda Žabolienė, 7, UAB "Metida", Pilies g. 8/1-2, 2600 MTP Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Specifinio fibrino antikūno panaudojimas antitrombiniu agentu

(57) Referatas:

Išradime aprašomas specifinio fibrinui antikūno panaudojimas trombų susidarymo *in vivo* inhibavimui. Taip pat duotos farmacinės kompozicijos ir rinkiniai, skirti minėtai inhibicijai.

Šis išradimas susijęs su su specifinio fibrinui antikūno panaudojimo būdais trombo susidarymo *in vivo* inhibicijai. Taip pat pateikiamos farmacinės kompozicijos, skirtos naudoti tokiuose būduose.

Trombo susidarymas dėl ligos arba chirurginės intervencijos

Kraujo krešuliai arba trombai susidaro kraujagyslių pažeidimo vietose. Patologinės trombozės arba trombinės ligos klinikiniai pasireiškimai yra labai įvairūs. Jiems priklauso giluminių venų trombozė (DVT) ir arterinė ir veninė trombozė. Tromboembolija ir kitos kraujagyslių ligos trombinės komplikacijos (pavyzdžiui, aterosklerozė) gali pasireikšti didžiųjų arterijų užsikimšimu, sukeliančiu organo išemiją, ir lydėti gyvybei pavojingas būsenas, tokias kaip kardiovaskuliarinis priepuolis (insultas), miokardo infarktas ir t.t.

Be to, invazinės chirurginės procedūros, įskaitant, bet neapsiribojant, kraujagyslių rekonstrukciją, panaudojant balionus (balionų angioplastiką), ir organų (tiek natūralių, tiek ir dirbtinių) transplantaciją, gali paskatinti trombo susidarymą. Pavyzdžiui, balionų angioplastika (procedūra, naudojama užsikimšusioms arterijoms valyti) faktiškai gali pažeisti arterijos sienelę, ir sukelti naują užsikimšimą, nusėdus naujam trombui. Vienoje publikacijoje konstatuojama, kad perkutaninėje transluminalinėje koronarinėje angioplastikoje išlieka 25-35 % tikimybė, kad kraujagyslės vėl užsikimš. (Gimple, L.W., et al., *Circulation*, 86, 1536-46 (1992)). Žr taip pat Sarembock., I.J., et al., *Circulation*, 80, 1029-40 (1989) ir Ip, J.H., et al., *JACC*, 17, 77B-88B (1991). Iš tiesų, vienoje publikacijoje pažymima, kad "angioplastikos mechanizmas, apimantis daugeliu atvejų endotelio pažeidimą ir trombocitų įtrūkimą arba suskilimą [ref.], yra labai panašus į procesą, kuris sukelia ūmų išemijos sindromą" (Tenaglia, A.N., *Ann. Rev. Med.*, 44, 465-79, 466 (1993)).

Kadangi buvo parodyta, kad sisteminis gydymas antikoagulantais, tokiais kaip heparinas ir kumarinas, yra mažai veiksmingas arba ir visai neefektyvus poangioplastinio naujo užsikimšimo profilaktikoje (Ip, J.H., et al., *JACC*, 17, 77B-88B (1991)), ir kadangi gydymas tokiais antikoagulantais dažnai pacientams sukelia sisteminės hemoragijos grėsmę (*Physician's Desk Reference*, 47th Ed., Medical Economic Data (1993)), todėl turėtų būti naudingi nauji, specifiniai pažeistos vietos atžvilgiu, gydymo būdai, kuriuose

būtų inhibuojamas arba sutrukdomas trombo susidarymas tiek prieš atsirandant kraujagyslių ligai, tiek ir invazinių chirurginių procedūrų atveju.

Hemostatinė sistema

Hemostatinis mechanizmas, pagal kurį susidaro trombas, yra sudėtingas fiziologinio atsako mechanizmas, apimantis pažeistos kraujagyslės ištaisymą. (Žr. Harker, L.A., and Mann, K.G., "Thrombosis and Fibrinolysis" in: *Thrombosis in Cardiovascular Disorders*, Fuster, V. and Verstraete, M. (eds), W.B. Saunders Co. (1992), pp.1-16).

Hemostazė pasiekama, esant koopreatyvinėms sąveikoms tarp pažeistos kraujagyslės sienelių, trombocitų ir koaguliacijos sistemos. (Žr. Furie, B. and Furie, B.C., *Cell*, 53, 505-18 (1988)).

Koaguliacinės sistemos vaidmuo yra sukurti netirpią fibrino matricą, kuri stabilizuotų ir sulaikytų trombocitų kamštį, kuris susirinko ant pažeistos kraujagyslės subendotelinės struktūros pažeidimo vietoje. Koaguliacija yra gausinimo procesas, apimantis fermentinių reakcijų grandinę, kurioje profermentai (krešėjimo faktoriai) nuosekliai aktyvuojami, susidarant aktyviems fermentams. Fibrino matricos susidarymas iš cirkuliuojančio fibrinogeno yra šios fermentinių reakcijų kaskadinės sekos rezultatas, pasireiškiantis labai staigiu fermento trombino susidarymu reikiamoje vietoje, fibrinogeno virsmu į fibriną trombino poveikyje ir fibrino susiuvimu, veikiant faktoriui XIIIa, ir taip susidarant trombui.

Reakcijų seką galima paprastai atvaizduoti trijų stadijų procesu:

1 stadija - proteolizė:

Trombinas

Fibrinogenas $\xrightarrow{\hspace{1cm}}$ Fibrino monomerai (DesAA, DesAABB) + FPA ir FPB

2 stadija - polimerizacija:

Fibrino monomerai $\longleftrightarrow$ Tirpūs fibrino polimerai (nesusiūti ir susiūti)

3 stadija - krešėjimas:

Tirpūs fibrino polimerai $\longrightarrow$ Netirpus fibrino krešulys

Fibrinogenas yra sudarytas iš trijų nevienodų polipeptidų grandinių porų: A α , B β ir γ . (Žr. L. Stryer, *Biochemistry*, 3rd Ed., W.H. Freeman and Company New York (1988), p. 249). Pradinėje stadijoje, kurioje fibrinogenas paverčiamas fibrinu, kaip parodyta aukščiau (1 stadija), veikiant trombinui, skaldomas fibrinogenas, išsiskiriant fibrinopeptidui A

(FPA) iš dviejų fibrinogeno A α -grandinių amino-galų. Likusi fibrinogeno molekulės dalis yra "fibrino monomeras", pažymėtas DesAA. Kaip dar parodyta 1 stadijoje, tuo pačiu metu (bet lėčiau) trombinas atskelia ir fibrinopeptidą B (FPB) nuo dviejų fibrinogeno B β -grandinių amino-galų. Likusi fibrinogeno molekulės dalis po šio antrojo skaldymo taip pat yra fibrino monomeras, pavadintas DesAABB. Atskilus FPA ir FPB, fibrino monomero α ir β grandinėse atsiranda nauji amino-galai. (Žr. W. Nieuwenhuizen, *Blood Coagulation and Fybrinolysis*, 4, 93-93 (1993)). Antrojoje stadijoje fibrino monomerai savaime pradeda sudaryti tarpmonomerines nekovalentines jungtis (nestruktūruotas), ir susidaro tirpus polimeras. Šį polimerą veikia faktorius XIIIa, susidarant fermento poveikyje kovalentinėms skersinėms jungtims tarp atskirų fibrino monomerų. Susiūtas polimeras gali išlikti tirpus, bet tam tikru polimerizacijos ir susisiuvimo proceso momentu fibrino polimeras pasidaro netirpus, ir susidaro krešulys (kaip parodyta 3 stadijoje).

Tirpūs fibrino polimerai yra betarpiški fibrino krešulio pirmtakai. Taigi, manoma, kad tirpių fibrino polimerų kiekiai plazmoje turi būti padidinti asmenims, kuriems gresia, arba kurie jau serga tromboze. Buvo parodyta, kad tokių polimerų suradimas ir jų kiekio nustatymas kraujyje, ypač DesAABB tirpių fibrino polimerų, yra naudingas kaip prasidedančio kraujo krešulio susidarymo indikacija. (Žr. Nieuwenhuizen, p.94; ir Marder et al., United States Patent No. 5,206,140).

Antikūnai prieš hemostatinės sistemos komponentus

Tiek natūraliai atsirandantys, tiek ir laboratoriskai iššaukti antikūnai suvaidino savo vaidmenį, charakterizuojant hemostatinės sistemos komponentus ir išaiškinant jų funkcijas.

Marciniak, E., ir Greenwood, M.F., *Blood*, 53, 81-92 (1979) aprašo kraujo krešėjimo inhibicijos atvejį 14 metų paciento su Dauno sindromu serume, kuris buvo IgG frakcijoje ir kuris inhibavo fibrinopeptido A fermentinį atskėlimą nuo fibrinogeno. Hoots, W.K., et al., *New Eng. J. Med.*, 304, 857-61 (1981) aprašo 13 metų paciento, sergančio chronišku agresyviu hepatitu bei koaguliacijos defektu, atvejį, kuriam šis defektas buvo susijęs su buvimu paciento kraujyje antikūnų, labai gimininių tiek fibrinogenui, tiek ir fibrinui ir kurie inhibuoja fibrino monomerų polimerizaciją, o tuo pačiu ir apsaugo nuo fibrino gelio susidarymo.

Sola, B., ir kt., *Thromb. Res.*, 29, 643-53 (1983) aprašo hibridomos ląstelių linijos, išskiriančios monokloninius antikūnus, specifinius žmogaus fibrinogenui ir fibrinui, nustatymą. Elms, M.J., et al., *Thromb. Haemostas*, 50, 591-94 (1983) aprašo hibridomos ląstelių linijos, išskiriančios monokloninius antikūnus, kurie atpažįsta antigeninę determinantę D dimere (specifiniame fragmente, susidariusiame susiūto fibrino degradacijos metu), gavimą. Hui, K.Y., et al., *Science*, 222, 1129-32 (1983) ir Scheefers-Borchel, U., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 7091-95 (1985) aprašo sintetinių heksapeptidų, atitinkančių žmogaus fibrino α ir β grandinių amino-galus, kaip antigenų, panaudojimą monokloniniams antikūnams, kurie jungiasi su fibrinu net ir esant fibrinogenui, gauti. Kudryk, B., et al., *Mol. Immunol.*, 21, 89-94 (1984) aprašo hibridomos ląstelių linijos, išskiriančios monokloninius antikūnus prieš fibrinogeno N-DSK dalį, gavimą. Sobel, J.H., et al., *Thromb. and Haem.*, 60, 153-59 (1988) aprašo dviejų skirtingų monokloninių antikūnų, kurie jungiasi su CNBr fibrinogeno $A\alpha$ grandinės fragmentais, panaudojimą, tiriant pradinius α grandinės susiuvimo vyksmus tarp kaimyninių fibrino molekulių. Mirshahi, M., et al., *Fibrinogen*, 4, 49-54 (1990) aprašo hibridomos ląstelių linijos, kuri išskiria monokloninius antikūnus prieš fibrinogeną, galinčius inhibuoti fibrino polimerizaciją, gavimą. Cierniewski, C.S., and Budzynski, A.Z., *Biochemistry*, 31, 4248-53 (1992) aprašo polikloninių ir monokloninių antikūnų prieš išvalytą žmogaus fibrinogeną, kurie inhibuoja fibrino monomerų polimerizacijos greitį bei trukdo trombinui veikti fibrinogeną, panaudojimą. Tymkiewicz, P.M., et al., *Blood Coag. and Fibrinol.*, 4, 211-21 (1993) aprašo penkių monokloninių antikūnų, kurie yra labai giminingi fibrinui ir kurie nereaguoja su fibrinogenu, gavimą. Gargan, P.E., et al., *Fibrinolysis*, 7, 275-83 (1993) aprašo hibridomos ląstelių linijos (MH-1), kuri produkuoja monokloninius antikūnus, specifinius tiek susiūtiems, tiek ir nesusiūtiems fibrino polimerams, bet neturinčius pastebimo imunoreaktingumo su fibrinogenu arba kokiu nors fibrino arba fibrinogeno degradacijos produktu, nustatymą. Be to, MH-1 antikūnas nereaguoja su DesAA arba DesAABB fibrino monomeru, o taip pat nebuvo rasta jo reakingumo su fibrinogeno atskiromis α , β arba γ grandinėmis.

Kitus monokloninių antikūnų, kurie yra specifiški hemostatinės sistemos komponentams, panaudojimo atvejus galima rasti Kudryk, B.J., et al., "Monoclonal

Antibodies as Probes for Fibrin(ogen) Proteolysis” in: *Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy*, Chatal, J-F (ed), CRC Press, Boca Raton, FL (1989), pp. 365-398.

Buvo sukurti modifikuoti antikūnai prieš hemostatinius komponentus klinikiniam panaudojimui kaip trombo imitavimui *in situ*. Žr., pavyzdžiui, 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); ir Kanke, M., et al., *J. Nucl. Med.*, 32, 1254-60 (1991).

Buvo pagaminti antikūnai fibrinui, konjuguotam su trombolitiniais fermentais, skirti terapiniam panaudojimui. Žr., pavyzdžiui, Bode, C., et al., *Science*, 229, 765-67 (1985). Pagal šį pranešimą, pasirodo, kad trombolitinio agento pristatymas į specifinę vietą labai padidina agento efektyvumą krešulio lizavimo atžvilgiu.

Be to, buvo išduota keletas JAV patentų, kurie yra skirti monokloninių antikūnų, specifiskų fibrinogenui, fibrinui arba jų degradacijos produktams, gavimui ir/arba jų panaudojimo būdams. Žr. U.S. Patent Nos. 4 722 903; 4 758 524; ir 4 916 070; nemanome, kad šis sąrašas yra pilnas.

Būdai išvengti trombo susidarymo

Antitrombinė terapija paprastai apima vieno arba daugiau antikoagulantų, tokių kaip heparinas arba kumarinas, vartojimą (*Physicians' Desk Reference*, 47th Ed., Medical Economics Data (1993); *The Merck Manual of Diagnostics and Therapy*, 15th Ed., Merck Sharpe & Dohme Research Labs (1987)). Šie antikoagulantai dažnai naudojami, bandant išvengti pasikartojančios trombozės pacientams, sergantiems kraujagyslių liga, ir bandant išvengti ūmaus trombinio užsikimšimo po angioplastikos.

Didžiausias tokių sisteminių antikoagulantų trūkumas yra sisteminės hemoragijos rizika. Gydantieji gydytojai įspėjami, kad “pacientams, gaunantiems hepariną, hemoragija gali atsirasti faktiškai bet kokioje vietoje”. (*Physicians' Desk Reference*, 47th Ed., Medical Economics Data (1993), p.2568).

Be to, buvo parodyta, kad tokių antikoagulantų efektyvumas, siekiant išvengti kraujagyslių užsikimšimo po angioplastikos, arba nesiskiria nuo gydymo placebo efektyvumo, arba yra nereprodukuojamas. (Ip, J.H., et al., *JACC*, 17, 77B-88B (1991)).

Taigi, tokių antikoagulantų panaudojimo naudą atsveria tiek hemoragijos rizika, tiek ir jų abejotinas efektyvumas, norint išvengti užsikimšimo.

Bandant sumažinti pakartotinio kraujagyslių užsikimšimo greitį po angioplastikos, buvo naudota daug biologinių ir mechaninių strategijų, bet nei viena terapija nedavė pastovių teigiamų rezultatų. Todėl susidomėjimas "lokalizuotu" arba "tiesioginiu" antitrombinių agentų padavimu į pažeistas kraujagyslių vietas vis didėja. (Gimple, L.W., et al., *Circulation*, 86, 1536-46 (1992)).

Antitrombinių agentų lokalizuotas padavimas, naudojant antikūnus prieš atitinkamus hemostatinės sistemos komponentus, pasitarnaus lokalizuojant tokius agentus kraujagyslės pažeidimo vietoje. Vienas tokios lokalizacijos privalumas yra tas, kad yra reikalingos mažesnės dozės. Antrasis lokalizacijos privalumas yra sisteminės hemoragijos rizikos sumažėjimas.

Kai kuriais atvejais pasirodė, kad patys antikūnai prieš specifinius hemostatinės sistemos komponentus inhibuoja fibrino polimerizaciją. Francis, S.E., et al., *Am. J. Hem.*, 18, 111-19 (1985) aprašo monokloninio antikūno prieš fibrinogeną, kuris turi "švelnų" antikoaguliantinį aktyvumą, tyrimus. Mirshahi M., et al., *Fibrinogen*, 4, 49-54 (1990) aprašo hibridomos ląstelių linijos, išskiriančios monokloninius antikūnus, kuriuose antigenas yra fragmentas D (fibrinogeno degradacijos produktas, veikiant plazminui), gavimą. Šie monokloniniai antikūnai stipriai reaguoja su fibrinogenu ir inhibuoja fibrino polimerizaciją. Ciernewski, C.S., and Budzynski, A.Z., *Biochemistry*, 31, 4248-53 (1992) aprašo trijų skirtingų hibridomos ląstelių linijų, kuriose antigenas yra gamtinis žmogaus fibrinogenas, ir kurios išskiria monokloninius antikūnus, inhibuojančius fibrino polimerizacijos greitį, gavimą.

Tačiau visos trys publikacijos yra mažai naudingos arba ir visai nenaudingos, kuriant lokalizuotą terapinį arba profilaktinį antitrombinį agentą. Taip yra todėl, kad visais trim atvejais antikūnai yra kryžmiškai reakingi arba fibrinogeno, arba fibrinogeno degradacijos produktų atžvilgiu, kurie visi yra visur esantys per visą hemostatinę sistemą. Bet kuris iš antikūnų, jei jį vartos pacientas, susijungs su fibrinogenu arba fibrinogeno degradacijos produktais ir negalės inhibuoti fibrino polimerizacijos arba trombo susidarymo kraujagyslės pažeidimo vietoje.

Šis išradimas remiasi visiškai skirtinga trombo susidarymo inhibavimo strategija, panaudojant monokloninius antikūnus, kurie yra specifiški fibrinui (t.y. beveik neturi kryžminio reakingumo su fibrinogenu arba fibrinogeno bei fibrino degradacijos produktais, susidariusiais veikiant plazminui). Šiame išradime siūlomas minėtų specifinių fibrinui monokloninių antikūnų, kurie stebėtinai inhibuoja trombo susidarymą kraujagyslės pažeidimo vietoje, panaudojimo būdas.

Šiame išradime siūlomas trombo susidarymo kraujagyslės pažeidimo vietoje inhibavimo būdas žmonėms, kuriems reikalingas toks inhibavimas, skiriant specifinį fibrinui monokloninį antikūną. Šiame išradime taip pat aprašomi specifinio fibrinui monokloninio antikūno fragmentai arba dariniai, kurie turi antikūno rišančiąją dalį. Šiame išradime taip pat siūloma farmacinė kompozicija, į kurią įeina specifinis fibrinui monokloninis antikūnas, arba jo fragmentas, arba darinys ir farmaciškai efektyvus nešiklis, kurių kiekiai yra pakankami, kad būtų efektyviai inhibuojamas trombo susidarymas žmogaus organizme. Šiame išradime taip pat siūlomi farmaciniai rinkiniai, į kuriuos įeina vienas arba daugiau šio išradimo farmacinių kompozicijų ingredientų.

Trumpas figūrų aprašymas

Fig. 1. MH-1 monokloninio antikūno pridėjimas į fibrinogeno/trombino krešėjimo reakcijos mišinį inhibuoja tiek greitį, tiek absoliutų krešėjimo kiekį. "Fibrinogenas" ir "45J" yra kontrolinės reakcijos.

Fig.2. MH-1 monokloninių antikūnų didėjančio kiekio pridėjimas į fibrinogeno/trombino krešėjimo reakcijos mišinį duoda didėjančią krešėjimo inhibavimą. "Fibrinogenas" yra kontrolinė reakcija.

Išradimo naudingumas

Netikėtai buvo rasta, kad specifiškas fibrinui monokloninis antikūnas gali inhibuoti fibrino polimerizaciją ir trombo susidarymą. Taigi, specifiški fibrinui monokloniniai antikūnai gali būti panaudoti profilaktikai arba gydymui žmogaus organizmo būsenų, kurias galima gydyti arba sustabdyti jų susidarymą, inhibuojant fibrino polimerizaciją arba trombo susidarymą. Pavyzdžiui, specifiniai fibrinui monokloniniai antikūnai yra naudingi, gydant žmones, sergančius bet kokia kraujagyslių liga, kurioje pasireiškia patologinės trombozės rizika. Tokių kraujagyslių ligų pavyzdžiais yra (bet jais neapsiriboja) giluminių

venų trombozė (DVT), arterinė ir veninė trombozė, insultas, tromboembolija, plaučių embolija ir aterosklerozės trombinės komplikacijos.

Specifiniai fibrinui monokloniniai antikūnai yra taip pat naudingi, pavyzdžiui, gydant žmones, kurie ruošiami invazinėms chirurginėms procedūroms, jų metu arba pooperaciniu laikotarpiu. Šiame išradime terminas “invazinė chirurginė procedūra” reiškia bet kokią chirurginę procedūrą, kurioje gali būti pažeista arterinė arba veninė kraujagyslė, ir gali būti trombinės komplikacijos. Tokių procedūrų pavyzdžiais yra (bet jais neapsiriboja) balionų angioplastika ir organų (tiek natūralių tiek ir dirbtinių) transplantacija.

Šalia specifinių fibrinui monokloninių antikūnų, pagal žinomas metodikas gali būti gauti antikūnų fragmentai, kurie turi idiotipą (rišančią vietą). Pavyzdžiui, tokiais fragmentais yra (bet neapsiriboja): (1) $F(ab')_2$ fragmentai, kuriuos galima gauti antikūno molekulę skaldant pepsinu; (2) Fab' fragmentai, kuriuos galima pagaminti, redukuojant $F(ab')_2$ fragmento disulfidinius tiltelius; ir (3) Fab fragmentai, kuriuos galima gauti, veikiant antikūno molekulę papainu ir redukuojančiu agentu. Tokius antikūno fragmentus irgi apima šis išradimas. Kitus antikūnų fragmentų gavimo ir panaudojimo pavyzdžius galima rasti Parham, F., et al., *J. Immunol. Meth.*, 53, 133 (1982) ir Khaw, B-A, et al., *J. Nuc. Med.*, 34, 2264-68 (1993).

Šalia specifinių fibrinui monokloninių antikūnų ir antikūnų fragmentų, pagal žinomas metodikas gal būti gauti kiti antikūno dariniai, kuriuose yra specifinio fibrinui antikūno idiotipas (rišanti vieta). Pavyzdžiui, gali būti sintezuoti rekombinantiniai ir sintetiniai oligopeptidai ir jų analogai, kurie turi tą patį inhibitorinį poveikį trombo susidarymui, kaip ir specifinis fibrinui monokloninis antikūnas arba jo fragmentai. Tokius darinius taip pat apima šis išradimas. Kitus sintetinių oligopeptidų, kurių sekos paremtos monokloninio antikūno pirmine rišančia sritimi, panaudojimo pavyzdžius galima rasti Knight, L., et al., *J. Nucl. Med.*, 35, 282-88 (1994).

Pagaliau šis išradimas apima bet koki funkciškai ekvivalentišką specifinį fibrinui monokloninį antikūną, jo fragmentą arba darinį. Terminas “funkciškai ekvivalentiškas” reiškia bet koki specifinį fibrinui monokloninį antikūną, jo fragmentą arba jo darinį, galintį pakankamai inhibuoti trombo susidarymą žmogaus, kuriam reikia tokio gydymo, organizme, susirišdamas su tuo pačiu epitopu, su kuriuo susiriša MH-1 antikūnas.

MH-1 monokloninio antikūno gavimas ir charakterizavimas

Dauguma ankstesniųjų strategijų, pritaikytų specifiniams fibrinui antikūnams sukelti, susiveda į gyvuliukų imunizavimą tirpiaisi fibrino fragmentais ir sintetiniais peptidais, kurie imituoja išreikštas neoantigenines vietas fibrinui. (Žr. Hui, K.Y., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 7091-95 (1985); Elms, M.J., et al., *Thromb. Haemostas*, 50, 591-94 (1983); ir Kudryk, B., et al., *Mol. Immunol.*, 21, 89-94 (1984)). Tikimasi, kad tokių antikūnų rišimosi vieta išsilaiko fibrino degradacijos proceso metu, ir todėl tokie antikūnai taip pat gali susijungti su fibrino degradacijos produktais.

JAV patentas Nr. 5 120 834 (toliau "patentas '834'"), išduotas Gargan et al., 1992 m. birželio 9 d., kuris čia duodamas kaip literatūros šaltinis, pagrindinai susijęs su monokloninių antikūnų gavimo būdu iš sterilių (gnotobiotinių) gyvuliukų, imunizuojant šiuos sterilius gyvuliukus pasirinktu antigenu. Manoma, kad sterilios sistemos, kuria gaminami monokloniniai antikūnai, naudojimo privalumas yra tai, kad tokia sistema duos labiau sustiprintą imuninį atsaką į antigeną, padidinant B-limfocito, kuris produkuoja antikūną, galintį jungtis su antigeno specifiniu epitopu, atsiradimo galimumą. Buvo nustatyta, kad tokia sistema ypatingai tinka labai specifinio fibrinui antikūno, kuris nėra arba yra mažai kryžmiškai reakingas su fibrinogenu, generavimui. Tokio specifinio antikūno išauginimas buvo labai problematiškas, kadangi buvo nustatyta, kad struktūrinis ir konformacinis panašumas tarp fibrino ir fibrinogeno yra didesnis už 98 % (Plow, E.F., et al., *Semin. Thromb. Haemostas*, 8, 36 (1982)). Iš to seka, kad tik mažas kiekis epitopų fibrino molekulei faktiškai yra neoantigenai (t.y. unikalūs fibrinui).

Patente '834 aprašyta hibridomos ląstelių linija (ATCC Nr. HB 9739), išskirianti monokloninį antikūną MH-1. MH-1 monokloninis antikūnas yra specifinis susiūtiems ir nesusiūtiems fibrino polimerams, bet nereaguoja su fibrinogenu arba fibrinogeno bei fibrino degradacijos produktais, gaunamais veikiant plazminui.

MH-1 valomas pagal metodikas, aprašytas patente '834. MH-1 specifiškai susijungia su fibrinu ir nereaguoja su fibrinogenu konkurenciniuose bandymuose. MH-1 nereaguoja nei su fibrinogeno degradacijos produktais, gautais veikiant plazminui, nei su plazmino poveikyje susidariusiais susiūto fibrino degradacijos produktais. Taigi, galima padaryti tokias išvadas: (1) MH-1 atpažįsta nepaliestos fibrino molekulės, kurios nėra arba kuri yra

pirmtako molekulės paviršiuje, epitopą, fibrinogeną; ir (2) epitopas, matyt, yra suardomas susiūto fibrino skaldymo plazminu metu.

MH-1 buvo taip pat charakterizuotas Scatchard analizės metodu (Frankel, et al., *Mol. Immunol.*, 16, 101-6 (1979), naudojant ^{125}I -žymėtą MH-1 antikūną MH-1 giminingumo fibrinui nustatymui. Gauta disociacijos konstantos K_D reikšmė yra $6,7 \times 10^{-10}$ M, kas rodo, kad giminingumas yra apie 5000 kartų didesnis už audinių plazminogeno aktyvatoriaus giminingumą fibrinui.

Western'o imunoblotingo analizė parodė, kad MH-1 nereąguoja su fibrinogeno $A\alpha$, $B\beta$ arba γ grandinėmis. Be to, ELISA analizė parodė, kad MH-1 reąguoja tiek su susiūtu fibrinu, tiek ir nesusiūtu fibrinu; giminingumas susiūtam fibrinui yra du kartus didesnis.

Vartojimo būdai

Pagal šį išradimą, specifiniai fibrinui monokloniniai antikūnai, jų fragmentai arba dariniai skiriami žmonėms, kuriems reikia inhibuoti trombo susidarymą. Žmonėms geriausiai tinka vartoti antikūnus, jų fragmentus arba darinius formoje, kurioje jie nėra sujungti su radiožymėtais, trombolitiniais arba kitokiais agentais arba bet kokiomis kitomis molekulėmis arba jų dalimis. Tačiau išradime siūlomi būdai taip pat gali būti realizuojami ir naudojant antikūnus arba jų darinius, kurie yra sujungti su radiožymėtais, trombolitiniais arba kitokiais agentais, arba kitokiomis molekulėmis arba jų dalimis, ir norime pasakyti, kad juos taip pat apima šis išradimas.

Terminas "nešiklis" reiškia skiediklį, pagalbinę medžiagą arba tirpiklį, kartu su kuriuo vartojamas specifinis fibrinui monokloninis antikūnas.

Terminas "farmaciškai tinkamas nešiklis" reiškia, kad nešiklis yra aprobuotas Federalinės arba Valstijos vyriausybės reguliuojančios agentūros arba yra įtrauktas į JAV Farmakopėją arba kitą plačiai žinomą farmakopėją, kuris gali būti skirtas naudoti gyvuliams, ypatingai žmonėms.

Terminas "antitrombinė kompozicija" šiame išradime reiškia kompoziciją, kurioje yra specifinis fibrinui antikūnas, jo fragmentas arba darinys ir farmaciškai tinkamas nešiklis, kurių kiekiai yra tokie, kad jų pakanka inhibuoti trombo susidarymą žmogaus, kuriam reikia tokio inhibavimo, organizme.

Terminas “efektyvi dozė” šiame išradime reiškia tokį monokloninio antikūno, jo fragmento arba darinio kiekį, kuris yra pakankamas inhibuoti trombo susidarymą žmogaus, kuriam reikia tokio gydymo, organizme. Dozė neturi būti per didelė, kad nebūtų sukeliama nepalankūs pašaliniai efektai, tokie kaip nepageidautinos kryžminės reakcijos, anafilaktinės reakcijos ir pan. Aplamai dozės turi parinkti konkretus terapeutas priklausomai nuo paciento amžiaus, būsenos, lyties, ligos stovio, kontraindikacijų (jeigu jos pasireiškia), imuninės tolerancijos ir kitų kintamųjų. Nors dozės priklausys nuo serijos atskirų aplinkybių, daugeliu kraujagyslių susirgimų atvejų ir daugeliu chirurginių intervencijų atvejų dozė galima nustatyti pagal žmogaus, kuriam reikalingas toks gydymas, kūno svorį, ir ji yra nuo 1 $\mu\text{g/kg}$ kūno svorio iki 50 $\mu\text{g/kg}$ kūno svorio, geriausia nuo 5 $\mu\text{g/kg}$ kūno svorio iki 10 $\mu\text{g/kg}$ kūno svorio.

Vartojimo būdai

Specifiniai fibrinui monokloniniai antikūnai, jų fragmentai arba dariniai gali būti vartojami žmonių gydymui bet kokiais tinkamais būdais, įskaitant parenteralinį būdą, panaudojant vienetinio vaistinio rutuliuko injekciją, nepertraukiamą infuziją arba šių dviejų būdų kombinaciją. Galima taip pat vartoti vaistą, panaudojant tiesioginę infuziją kateteriu, tokią kaip intrakoronarinis vartojimo būdas, jeigu jis yra tinkamas.

Parenteralinio vartojimo preparatai yra, pavyzdžiui, liofilizuotų specifinių fibrinui monokloninių antikūnų, jų fragmentų arba darinių kompozicijos steriliame neturiničiame endotoksinų fiziologiniame tirpale arba, bendresniu atveju, gali būti specifinių fibrinui monokloninių antikūnų, jų fragmentų arba darinių kompozicijos arba dispersijos steriliuose vandeniniuose arba nevandeniniuose tirpaluose, suspensijose ir emulsijose. Nevandeninių tirpiklių pavyzdžiais yra propileno glikolis, polietileno glikolis, augalinis aliejus, toks kaip alyvų aliejus, ir injekcijoms naudojami organiniai esteriai, tokie kaip etiloleatas. Vandeniniais nešikliais gali būti vanduo, alkoholio/vandens tirpalai, emulsijos arba suspensijos, įskaitant turinčias druskos arba buferines terpes. Parenteraliniais nešikliais gali būti natrio chlorido tirpalas, Ringerio dekstrozė, dekstrozė ir natrio chloridas, Ringerio mišinys su laktatu arba sutirštinti aliejai. Intraveniniais nešikliais gali būti skysti ir maistiniai užpildai, tokie kaip užpildai Ringerio dekstrozės pagrindu ir panašūs. Taip pat gali įeiti apsauginės medžiagos ir kiti priedai, tokie kaip, pavyzdžiui, antimikrobinės medžiagos, antioksidantai, chelatus sudarančios medžiagos, inertinės dujos

ir pan. Pageidautina, kad farmacinės kompozicijos būtų sterilios formos ir atitiktų JAV Maisto ir Vaistų administracijos nustatytus sterilumo standartus.

Šiame išradime taip pat aprašomi farmaciniai rinkiniai, susidedantys iš šio išradimo farmacinės kompozicijos vieno arba daugiau ingredientų, laikomų tame pačiame arba atskiruose kontaineriuose. Tokiame konteineryje (kontaineriuose), esant reikalui, gali būti pridėtas aprašymas, kurio forma yra tokia, kokią nurodyto Vyriausybės agentūra, reguliuojanti vaistų arba biologinių produktų, skirtų žmonėms, gavimą, panaudojimą arba prekybą. Į rinkinius, kuriuose yra tik liofilizuotas antikūnas, jo fragmentas arba darinys, esant reikalui, gali būti įdėtos instrukcijos apie nešiklius, tinkamus vartoti žmonių gydymui.

Gydymo apimtį, trukmę, išdėstymą pagal laiką ir gydymo būdą turi pritaikyti pagal visą eilę aplinkybių gydantysis terapeutas priklausomai nuo ligonio amžiaus, svorio, būsenos ir lyties, o taip pat nuo ligos, kurią reikia gydyti, pobūdžio ir laipsnio. Gydymas gali būti skiriamas arba prieš pat chirurginę procedūrą, jos metu arba po jos, o taip pat tiek prieš, tiek ir procedūros metu, arba tiek procedūros metu, tiek ir po jos, arba prieš procedūrą, jos metu ir po jos priklausomai nuo gydomo atvejo aplinkybių serijos.

Pavyzdžiui, chirurginės procedūros, tokios kaip balionų angioplastika atveju, dažniausiai paciento organizme jau yra daug plačiai išsisklaidžiusių kraujo krešuliukų. Esant tokiai situacijai, paprastai naudinga vartoti antitrombinę kompoziciją tuoj pat po angioplasinės procedūros, geriausia naudojant angioplastikos kateterį, kol jis dar neišimtas, kad pažeista kraujagyslės dalis būtų tiesiogiai užliejama antitrombine kompozicija ir taip sutelkiamas gydymas į šią vietą. Tai leidžia išvengti antitrombinės kompozicijos nuostolių, kurie atsirastų, pavyzdžiui, dėl antikūno susirišimo su trompais, esančiais nepažeistose vietose.

Chirurginių invazijų atvejais, kai pacientai neserga pataloginėmis trombozėmis, paprastai tinkamiausia skirti antitrombines kompozicijas arba prieš pat operaciją arba operacijos metu, kadangi yra mažesnis pavojus prarasti antitrombinę kompoziciją, prisijungiant jai nepažeistose kraujagyslių vietose.

Be to, daugeliu chirurginių intervencijų atvejų laikas, kai yra didelis trombo susidarymo pavojus, turi tendenciją baigtis kartu su atliekama procedūra. Iš to seka, kad pakanka riboto vaisto panaudojimų skaičiaus arba net ir vieno panaudojimo, norint

efektyviai inhibuoti trombo susidarymą, tuo pačiu sumažinant chirurgijos sukeltą trombo susidarymo pavojų, kuris lydi pacientą.

Chroniškos trombinės ligos atveju antitrombinių gydymų išdėstymas pagal laiką, trukmę ir skaičius labai priklauso nuo paciento stovio prieš ir po vaisto panaudojimo ir atsako į preliminarinį antitrombinį gydymą, kurį turi nustatyti, kontroliuoti ir įvertinti gydantysis terapeutas.

Gydymo efektyvumo nustatymas

Antitrombinio gydymo MH-1 monokloniniu antikūnu, jo fragmentu arba dariniu efektyvumą galima nustatyti standartiniais metodais. Tokie metodai yra (bet jais neapsiribojama): (1) angiografinė kontrolė, atvaizduojant arterinio arba veninio dažo srautą, kai dažo srauto kliuvinio atsiradimas rodo, kad reikia gydymą tęsti; (2) scintigrafija, panaudojant specifinį trombai antikūną, konjuguotą su radiožyme, kuria galima kontroliuoti trombo dydį ir padėtį, ir nustatyti ar reikia gydymą tęsti; (3) klinikinių simptomų atsiradimo ir jų kiekio kontrolė, kai simptomų skaičiaus padidėjimas arba jų aštrumo padidėjimas rodo, kad reikia gydymą tęsti; ir (4) fibrinogeno kiekio paciento kraujyje matavimas, kadangi yra atvirkštinė priklausomybė tarp fibrinogeno ir fibrino kiekių, kai fibrinogeno kiekio sumažėjimas rodo galimą fibrino kiekio atitinkamą padidėjimą ir fibrino polimerizaciją, o tai rodo, kad reikia gydymą tęsti.

Dabar, aprašius išradimą bendrais bruožais, jo objektas bus daug geriau suprantamas, duodant konkretų pavyzdį, kuris yra skirtas tik išradimo iliustracijai ir neriboja jo apimties.

Pavyzdys. Krešėjimo inhibicija *in vitro*

Norint nustatyti MH-1 poveikį į krešėjimą, buvo atlikta serija eksperimentų *in vitro*. Išvalytas žmogaus fibrinogenas (Kabi, Chromogenix Co, Ohio) ištirpinamas 150 mM fosfatiname buferyje ir druskos tirpale, esant fiziologiniam pH, (koncentracija - 1 mg/ml) ir po 100 μ l šio tirpalo įpilama į kiekvieną mikrotitratoriaus (Costar) lėkštelės duobutę. Į kiekvieną duobutę pridedama apie 50 μ l jaučio trombino, kad galutinė koncentracija būtų 0,5 NIH vienetai/ml, ir taip gaunamas reakcijos mišinys. Į šį reakcijos mišinį, esant nuliniam laikui, pridedama apie 50 μ l vieno iš šių reagentų: (1) MH-1 monokloninio antikūno, kad galutinė antikūno koncentracija būtų 100 μ g/ml.; (2) 45J monokloninio

antikūno (45J monokloninis antikūnas, kryžmiškai reaguojantis su fibrinu ir fibrinogenu, kurį išskiria hibridomos ląstelių linija ATCC Nr. HB 9740, buvo gautas pagal įprastas metodikas, naudojant Balb/c peles, kurios buvo imunizuojamos fibrinu), kad galutinė antikūno koncentracija būtų 200 $\mu\text{g/ml}$; arba (3) fiziologinio druskos tirpalo. Reakcija vykdoma 60 min. 37 °C temperatūroje. Krešėjimas matuojamas spektrofotometriškai ties 340 nm kas 2 minutes. Sugerties padidėjimas rodo, kad krešėjimas didėja. Krešėjimo proceso pabaiga nustatoma iš to, kad sugerties priklausomybės nuo laiko kreivė išeina į plato.

Fig.1 rodo, kad paveikus MH-1, inhibuojamas krešėjimo greitis, kas matyti iš sugertis/laikas kreivės mažesnio pradinio polinkio, kai reakcijos mišinys apdorotas MH-1, lyginant arba su 45J kontrolinės reakcijos mišiniu arba su fiziologinio tirpalo kontrolinės reakcijos mišiniu (fibrinogenas). Be to, MH-1 sumažino absoliutų krešėjimo lygį, kas matyti iš žemiau esančio kreivės plato, lyginant su kontrolinėmis reakcijomis. Kontrolinės reakcijos mišinys, kuriame yra 45J antikūnas (koncentracija du kartus didesnė už MH-1 koncentraciją) nerodo krešėjimo inhibicijos, lyginant su fiziologinio tirpalo kontroline reakcija. Šie duomenys patvirtina, kad MH-1 monokloninis antikūnas gali inhibuoti trombo susidarymą.

Antrajame eksperimente išbandytas keleto skirtingų MH-1 koncentracijų efektas į krešėjimo laiką, lyginant su fibrinogeno kontroline reakcija. Fig.2 duoti krešėjimo reakcijos vaizdai rodo, kad krešėjimo reakcijos inhibicija didėja, didėjant MH-1 koncentracijai reakcijos mišinyje. (1:1000 = 1 $\mu\text{g/ml}$; 1:100 = 10 $\mu\text{g/ml}$; 1:50 = 20 $\mu\text{g/ml}$; 1:20 = 50 $\mu\text{g/ml}$; 1:10 = 100 $\mu\text{g/ml}$; fibrinogenas = kontrolė).

Hibridomos deponavimas

Hibridomos ląstelių linijos MH-1 ir 45J deponuotos American Type Culture Collection (ATCC) 1988 m. birželio 9 d., ir joms duoti atitinkamai HB 9739 ir HB 9740 depozito numeriai. ATCC yra 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD. 20852. MH-1 antikūnas yra IgG₁ antikūnas, turintis lengvąją kapa grandinę; buvo pastebėta, kad MH-1 antikūnas kryžmiškai reaguoja tiek su žmogaus, tiek ir su triušio fibrinu.

Šis išradimas neapsiriboja deponuota hibridomos ląstelių linija ATCC Nr. HB 9739 arba MH-1 monokloniniu antikūnu. Jis yra tik specifinio fibrinui monokloninio antikūno, kuris inhibuoja trombo susidarymą, iliustracija. Šis išradimas apima bet kokią funkciškai

ekvivalentišką specifinį fibrinui monokloninį antikūną, jo fragmentą arba darinį. Terminas “funkciškai ekvivalentiškas” čia reiškia, kad monokloninis antikūnas, jo fragmentas arba darinys gali inhibuoti trombo susidarymą, susijungdamas su tuo pačiu epitopu, su kuriuo susijungia MH-1 antikūnas.

Šis išradimas gali būti įgyvendintas ir kitokiomis specifinėmis formomis, nenukrypstant nuo jo prasmės arba esminių požymių, ir todėl, nurodant išradimo apimtį, reikia remtis pridedama apibrėžtimi, o ne vien tik aukščiau duotu aprašymu.

Pridedamos aukščiau cituotos publikacijos ir patentai, kaip literatūros šaltiniai.

APIBRĖŽTIS

1. Specifinio fibrinui monokloninio antikūno panaudojimas, gaminant vaistą, skirtą trombo susidarymo inhibavimui žmogaus, kuriam reikalingas toks inhibavimas, organizme.
2. Specifinio fibrinui monokloninio antikūno panaudojimas, gaminant vaistą, skirtą pochirurginių trombinų komplikacijų grėsmės sumažinimui žmogaus organizme.
3. Panaudojimas pagal 2 punktą, besiskiriantis tuo, kad pochirurginė trombinė komplikacija atsiranda dėl angioplastikos.
4. Panaudojimas pagal 2 punktą, besiskiriantis tuo, kad pochirurginė trombinė komplikacija atsiranda dėl organų transplantacijos.
5. Specifinio fibrinui monokloninio antikūno panaudojimas, gaminant vaistą, skirtą žmogaus trombinės kraujagyslių ligos gydymui.
6. Panaudojimas pagal 5 punktą, besiskiriantis tuo, kad trombinė kraujagyslių liga yra insultas.
7. Panaudojimas pagal 5 punktą, besiskiriantis tuo, kad trombinė kraujagyslių liga yra pulmonarinė embolija
8. Panaudojimas pagal 5 punktą, besiskiriantis tuo, kad trombinė kraujagyslių liga yra giluminių venų trombozė.
9. Panaudojimas pagal 5 punktą, besiskiriantis tuo, kad trombinė kraujagyslių liga yra arterinė arba veninė trombozė.
10. Panaudojimas pagal 5 punktą, besiskiriantis tuo, kad trombinė kraujagyslių liga yra aterosklerozė.
11. Panaudojimas pagal bet kurį iš 1-10 punktų, besiskiriantis tuo, kad specifinis fibrinui monokloninis antikūnas yra MH-1.
12. Specifinio fibrinui monokloninio antikūno fragmento arba darinio, kuriuose yra minėto antikūno rišanti vieta, panaudojimas, gaminant vaistą, skirtą trombo susidarymo inhibavimui žmogaus, kuriam reikalingas toks inhibavimas, organizme.
13. Specifinio fibrinui monokloninio antikūno fragmento arba darinio, kuriuose yra minėto antikūno rišanti vieta, panaudojimas, gaminant vaistą, skirtą pochirurginių trombinų komplikacijų grėsmės sumažinimui žmogaus organizme.

14. Panaudojimas pagal 13 punktą, besiskiriantis tuo, kad po chirurginė trombinė komplikacija atsiranda dėl angioplastikos.

15. Panaudojimas pagal 13 punktą, besiskiriantis tuo, kad po chirurginė trombinė komplikacija atsiranda dėl organų transplantacijos.

16. Specifinio fibrinui monokloninio antikūno fragmento arba darinio, kuriuose yra minėto antikūno rišanti vieta, panaudojimas, gaminant vaistą, skirtą žmogaus trombinės kraujagyslių ligos gydymui.

17. Panaudojimas pagal 16 punktą, besiskiriantis tuo, kad trombinė kraujagyslių liga yra insultas.

18. Panaudojimas pagal 16 punktą, besiskiriantis tuo, kad trombinė kraujagyslių liga yra pulmonarinė embolija

19. Panaudojimas pagal 16 punktą, besiskiriantis tuo, kad trombinė kraujagyslių liga yra giluminių venų trombozė.

20. Panaudojimas pagal 16 punktą, besiskiriantis tuo, kad trombinė kraujagyslių liga yra arterinė arba veninė trombozė.

21. Panaudojimas pagal 16 punktą, besiskiriantis tuo, kad trombinė kraujagyslių liga yra aterosklerozė.

22. Panaudojimas pagal bet kurį iš 12-21 punktų, besiskiriantis tuo, kad specifinio fibrinui monokloninio antikūno fragmentas arba darinys yra MH-1 fragmentas arba darinys.

23. Farmacinė kompozicija, besiskirianti tuo, kad į ją įeina nekonjuguotas specifinis fibrinui monokloninis antikūnas ir farmaciškai tinkamas nešiklis, ir kompozicija yra sterilios formos.

24. Kompozicija pagal 23 punktą, besiskirianti tuo, kad joje esantis specifinis fibrinui monokloninis antikūnas yra MH-1.

25. Farmacinė kompozicija, besiskirianti tuo, kad į ją įeina specifinio fibrinui monokloninio antikūno nekonjuguotas fragmentas arba darinys, kurie turi minėto antikūno rišančią vietą, ir farmaciškai tinkamas nešiklis, ir kompozicija yra sterilios formos.

26. Kompozicija pagal 25 punktą, besiskirianti tuo, kad joje esantis specifinis monokloninis fibrinui antikūnas yra MH-1.

27. Rinkinys, skirtas žmonių, kuriems reikia inhibuoti trombo susidarymą, gydymui, besiskiriantis tuo, kad į jį įeina nekonjuguotas specifinis fibrinui monokloninis antikūnas, arba jo fragmentas arba darinys, kurie turi minėto antikūno rišančią vietą, ir šis rinkinys yra sterilios formos.

28. Rinkinys pagal 27 punktą, besiskiriantis tuo, kad jame esantis specifinis fibrinui monokloninis antikūnas yra MH-1.

29. Rinkinys pagal 27 punktą, besiskiriantis tuo, kad į jį įeina dar ir farmaciškai sterilus nešiklis, kuris yra sterilios formos.

30. Rinkinys pagal 29 punktą, besiskiriantis tuo, kad jame esantis specifinis fibrinui monokloninis antikūnas yra MH-1.

1/2

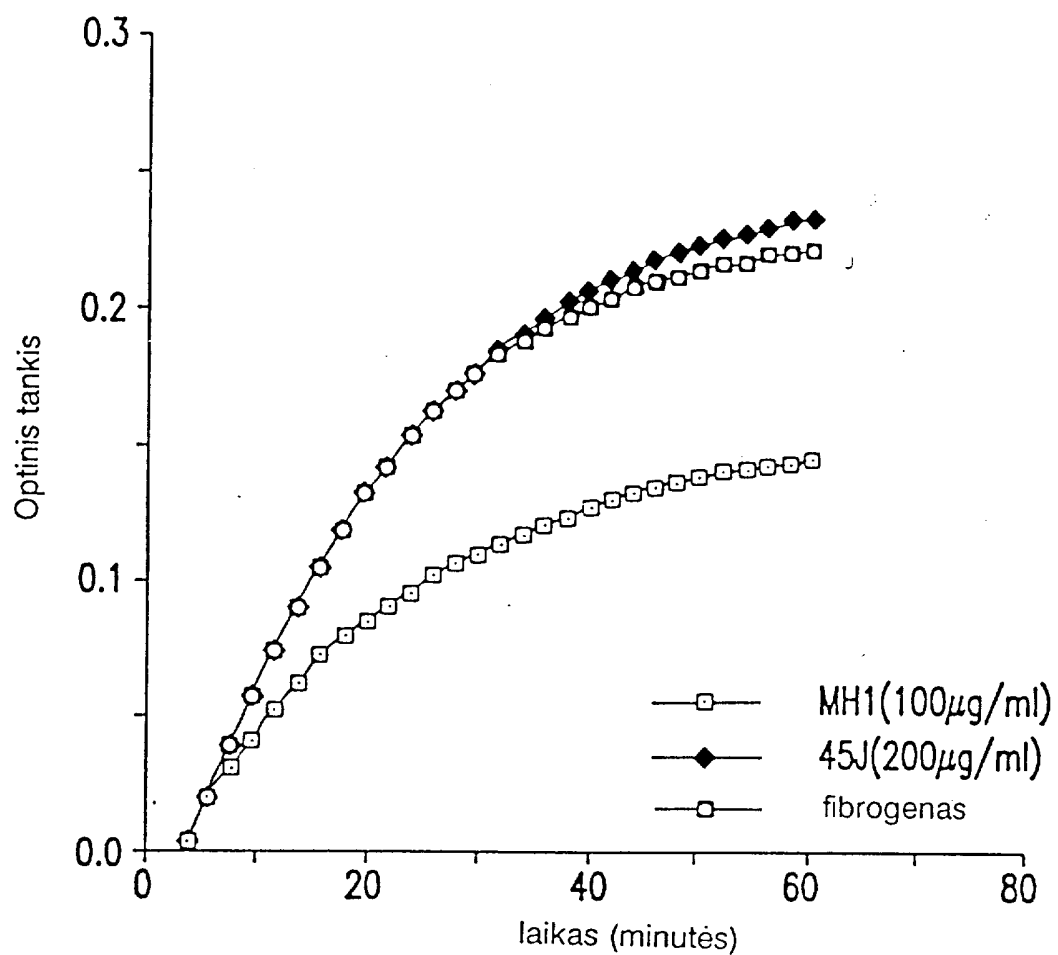


FIG.1

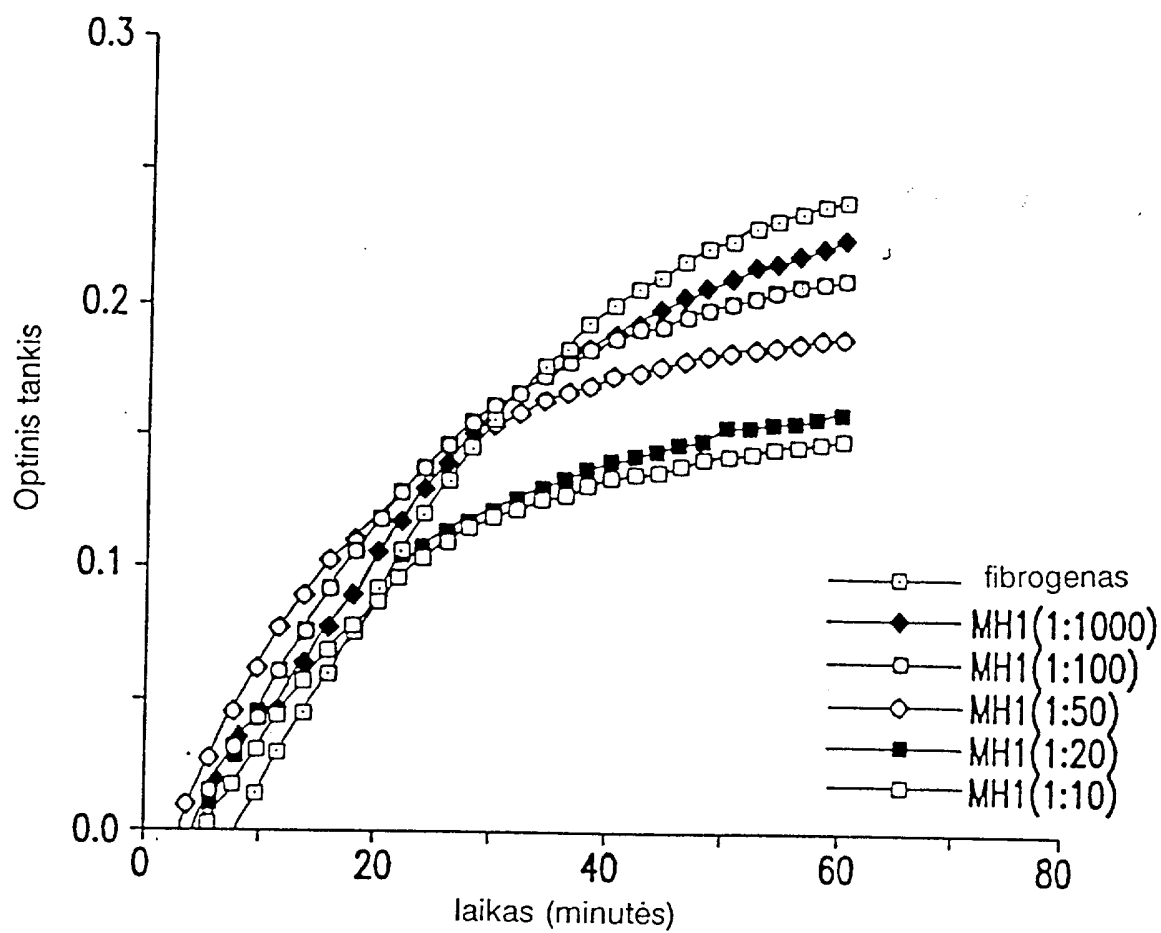


FIG.2