

Даний винахід відноситься до способу визначення наявності у ссавця каталітичних ало-антивіл до фактору VIII, які спроможні розщеплювати фактор VIII, та отримання характеристик сайтів розщеплення молекули зазначеного фактору VIII зазначеними каталітичними антитілами до фактору VIII.

Даний винахід відноситься також до інгібітору розщеплення (деградації) фактору VIII, каталізує ало-антитіла до фактору VIII.

Далі даний винахід відноситься до фармацевтичного складу, що містить зазначені каталітичні ало-антитіла до фактору VIII, що здатні розщеплювати фактор VIII і які отримані в процесі здійснення зазначеного способу визначення, і до фармацевтичної композиції, що містить вказаний інгібітор розщеплення фактору VIII, каталізує ало-антитіла до фактору VIII.

Нарешті, даний винахід відноситься до терапевтичного застосування вказаного інгібітору розщеплення фактору VIII, каталізує ало-антитіла до фактору VIII, фармацевтичної композиції, що містить зазначені каталітичні ало-антитіла до фактору VIII, що здатні розщеплювати фактор VIII і які отримані в процесі здійснення зазначеного способу визначення, і фармацевтичної композиції, що містить вказаний інгібітор розщеплення фактору VIII, каталізує ало-антитіла до фактору VIII.

Гемофілія А – це пов'язане з Х-хромосомою рецесивне порушення, що призводить до дефектності або дефіциту молекул фактору VIII, що у гострій формі є небезпечним для життя і геморагічним захворюванням, що позбавляє працездатності.

Вливання пацієнтам із гострою гемофілією А гомологічного фактору VIII у 25% випадків призводить до появи ало-антитіл до фактору VIII (Ehrenforth S., Kreuz W., Scharrer L., Linde R., Funk M., Gungor T., Krackhardt B. and Kornhuber B. "Incidence of development of factor VIII and factor IX inhibitors in haemophiliacs". // *Lancet*. 1992. T. 339. C.594-598), що інгібують про-коагулянтну активність фактору VIII, створюючи стеричні перешкоди взаємодії фактору VIII із молекулами, що стабілізують, (Saenko E.L., Shima M., Rajalakshmi K. J. and Scandella D. "A role for the C2 domain of factor VIII in binding to von Willebrand factor". // *J. Biol. Chem.* 1994. T. 269.C. 11601-11605; i Saenko E. L., Shima M., Gilbert G. E. and Scandella D. "Slowed release of thrombin-cleaved factor VIII from von Willebrand factor by a monoclonal and a human antibody is a novel mechanism for factor VIII inhibition". // *J. Biol. Chem.* 1996. T. 271.C. 27424-27431), із необхідними для його активності молекулами (Arai M., Scandella D. and Hoyer L. W. "Molecular basis of factor VIII inhibition by human antibodies: Antibodies that bind to the factor VIII light chain prevent the interaction of factor VIII with phospholipids". // *J. Clin. Invest.* 1989. T. 83.C. 1978-1984; i Zhong D., Saenko E. L., Shima M., Felch M. and Scandella D. "Some human inhibitor antibodies interfere with factor VIII binding to factor IX". // *Blood*. 1998. T. 92.C. 136-142) або з молекулами, що активують, (Lubahn B C., Ware J., Stafford D. W. and Reiser H. M. "Identification of a FVIII epitope recognized by a human hemophilic inhibitor". // *Blood*. 1989. T. 73.C. 497-499; i Neuenschwander P. F. and Jesty J. "Thrombin-activated and factor Xa-activated human factor VIII: differences in cofactor activity and decay rate". // *Arch. Biochem. Biophys.* 1992. T. 296.C. 426-434).

Заявниками було зроблене відкриття, що не впливало з попереднього досвіду, про розщеплення фактору VIII ало-антитілами двох пацієнтів із високою імунною відповіддю, що мають гостру гемофілію А, що виявило невідомий досі механізм, за яким інгібітори фактору VIII можуть перешкоджати про-коагулянтній функції фактору VIII.

Відкриття заявниками каталітичних ало-антитіл до фактору VIII є, наскільки відомо, першим описом появи каталітичних антитіл, що індукуються при введенні пацієнтам фактору VIII. Тому вважалось несподіваним, навіть абсурдним або неймовірним, що в присутності фактору VIII утворюються антитіла, що дійсно роблять молекулу фактору VIII неактивною шляхом каталітичного гідролізу ("протеолізу"). Проте відомі дотепер каталітичні антитіла всі є ауто-антитілами, що виявляються в процесі захворювання або при фізіологічних умовах. Тому всі антитіла, що індукуються названі АПО-антитілами, походження котрих явно відрізняється від походження АУТО-антитіл у будь-якому аутоімунному захворюванні.

Розраховані значення середньої K_m і що здається V_{max} для реакції антитіл до фактору VIII одного з пацієнтів складала відповідно $9,46 \pm 5,62 \text{ мкМ}$ і 85 ± 60 фемтомоль хв.⁻¹. Кінетичні параметри гідролізу фактору VIII змушують припустити наявність функціональної ролі каталітичної імунної відповіді в інактивації фактору VIII *in vivo*.

Тому отримання характеристики ало-антитіл до фактору VIII як сайт-специфічних протеаз забезпечує нові підходи до лікування захворювань у пацієнтів, що мають ало-антитіла до фактору VIII.

Таким чином, відповідно до першого аспекту, даний винахід передбачає спосіб визначення наявності у ссавця каталітичних ало-антитіл до фактору VIII, які здатні розщеплювати фактор VIII, який відрізняється тим, що він включає:

- i) виділення плазми зі зразка крові, взятого в зазначеного ссавця;
- ii) виділення із зазначеної плазми ало-антитіл до фактору VIII;
- iii) приведення зазначених ало-антитіл до фактору VIII у контакт із фактором VIII на період часу, що достатній для забезпечення розщеплення зазначеного фактору VIII зазначеними ало-антитілами до фактору VIII; і
- iv) визначення, після зазначеного періоду часу, чи ефективно зазначені ало-антитіла до фактору VIII розщепили зазначений фактор VIII.

Відповідно до варіанта здійснення етапу (ii) способу за даним винаходом, ало-антитіла до фактору VIII виділяють із плазми, об'єднуючи їх із фактором VIII, причому зазначений фактор VIII переважно пов'язаний із носієм (матриксом). Зручно, щоб на етапі (ii) ало-антитіла до фактору VIII були виділені за допомогою афінної хроматографії. Переважно, щоб на етапі (ii) зазначена афінна хроматографія включала використання в якості носія сефарози, переважно активованої ціаноген-бромідом.

Відповідно до варіанта здійснення етапу (iii) способу за даним винаходом, зазначений фактор VIII позначений мітійним агентом, що переважно радіактивно-мітійним агентом - таким, зокрема, як ¹²⁵I. Переважно, щоб на етапі (iii) зазначений фактор VIII був приведений у контакт з ало-антитілами до фактору VIII на період часу від приблизно 0,5 години до приблизно 30 годин, переважно близько 10 годин, при температурі від

приблизно 15°C до приблизно 40°C, переважно 38°C.

Відповідно до варіанта здійснення етапу (iv) способу за даним винаходом, визначення того, чи ефективно зазначений фактор VIII був розщеплений зазначеними ало-антитілами до фактору VIII, проводиться способом визначення, що включає метод розділення - такий, як електрофорез у гелі, як, зокрема, електрофорез у поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфату натрію (SDS-PAGE), або гель-фільтраційна хроматографія - така, як, зокрема, швидка рідинна гель-фільтраційна хроматографія білків, та техніку візуалізації - таку, як, зокрема, авторадіографію.

У відповідності з таким варіантом здійснення способу за даним винаходом, для цього способу характерно те, що він додатково включає:

v) одержання характеристик сайту (сайтів) молекули зазначеного фактору VIII, у котрому (який) відбувається розщеплення зазначеними ало-антитілами до зазначеного фактору VIII.

Відповідно до варіанта здійснення етапу (v) способу за даним винаходом, вказане одержання характеристик здійснюють, приводячи зазначений фактор VIII у контакт із зазначеними ало-антитілами до фактору VIII, які спроможні розщеплювати фактор VIII, розділяючи та потім секвенуючи отримані внаслідок такої процедури фрагменти фактору VIII. Зручно здійснювати таке розподілення, використовуючи таку техніку, як електрофорез у гелі - такий, як, зокрема, SDS-PAGE, або гель-фільтрацію. Зазначене секвенування зручно здійснювати, використовуючи таку техніку, як N-кінцеве секвенування, зокрема, із використанням автоматичного білкового міросеквенатора. З використанням зазначеного секвенування локалізовані такі спроможні до розщеплення зв'язку: Arg³⁷²-Ser³⁷³, що знаходиться між доменами A1 і A2, Tyr¹⁶⁸⁰-Asp¹⁶⁸¹, що знаходиться на N-кінці домену A3, і Glu¹⁷⁹⁴-Asp¹⁷⁹⁵, що знаходиться всередині домену A3 молекули фактору VIII.

Таким чином, відповідно до другого аспекту, даний винахід пропонує амінокислотну послідовність: Ser Val Ala Lys Lys His Pro; амінокислотну послідовність:

Asp Glu Asp Glu Asn Gin Ser; і

амінокислотну послідовність:

Asp Gin Arg Gin Gly Ala Glu.

Даний винахід поширюється також на варіанти або аналоги такої або будь-якої іншої послідовності фактору VIII, що спроможні інгібувати будь-який сайт у молекулі фактору VIII, що чутливий до лізису ало-антитілом до фактору VIII. У контексті даного винаходу таким варіантом може бути, наприклад, пептидний або непептидний аналог амінокислотної послідовності, яка описана вище, що інгібує будь-який сайт у молекулі фактору VIII, який чутливий до лізису ало-антитілом до фактору VIII. Таким варіантом може бути, наприклад, варіант послідовності, що коротше на декілька амінокислот, наприклад, на N-кінці, на C-кінці або на обох кінцях, або довше на декілька амінокислот (такі варіанти можна одержати хімічним синтезом або ферментативним розщепленням існуючої в природі молекули), за умови, що цей варіант інгібує будь-який сайт у молекулі фактору VIII, чутливий до лізису ало-антитілами до фактору VIII.

Тому, відповідно до третього аспекту, даний винахід передбачає інгібітор розщеплення фактору VIII, який каталізується ало-антитілами до фактору VIII. Переважно цей інгібітор відрізняється тим, що він містить у собі інгібітор протеази. Прикладами інгібіторів протеази, що можуть бути використані в контексті даного винаходу як інгібітори розщеплення фактору VIII, що каталізується ало-антитілами до фактору VIII, але не обмежуючись ними, є інгібітори типу фторидів - такі, як, наприклад, PMSF (фенілметилсульфоніл-фторид) або AEBSF (4-(2-аміноетил)бензилсульфонілфторид гідроклорид (що особливо продається фірмою Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany, під товарним знаком Refabloc®)). Більш конкретно, для цього інгібітору характерно, що зазначений інгібітор інгібує (пригнічує) розщеплення чутливих до розщеплення зв'язків: Arg³⁷²-Ser³⁷³, що знаходиться між доменами A1 і A2, Tyr¹⁶⁸⁰-Asp¹⁶⁸¹, що знаходиться на N-кінці домену A3, і Glu¹⁷⁹⁴-Asp¹⁷⁹⁵, що знаходиться всередині домену A3 молекули фактору VIII. Ще більш переважно, для цього інгібітору характерно те, що він являє собою пептидний або непептидний аналог амінокислотної послідовності:

Ser Val Ala Lys Lys His Pro;

пептидний або непептидний аналог амінокислотної послідовності:

Asp Glu Asp Glu Asn Gin Ser; або

пептидний або непептидний аналог амінокислотної послідовності:

Asp Gin Arg Gin Gly Ala Glu.

Інгібітори розщеплення фактору VIII, як вони були визначені вище, так само як і їхні солі заміщення, особливо їхні фармацевтично прийнятні солі заміщення, мають цінні фармакологічні показники, тому що вони виявляють нейтралізуючу активність стосовно ало-антитіл до фактору VIII.

Ці властивості обґрунтовують їхнє застосування в терапії, та даний винахід додатково відноситься до зазначених вище інгібіторів розщеплення фактору VIII, а також до їхніх солей заміщення, особливо до їхніх фармацевтично прийнятних солей заміщення, у якості ліків.

Таким чином, вони особливо показані для лікування захворювань, зокрема, гемофілічного походження, більш конкретно - захворювань, які пов'язані із дефектами згортання крові внаслідок недостатності фактору VIII.

Можна згадати як приклад застосування зазначених речовин для лікування, з одного боку, пацієнтів із високою імунною відповіддю, що мають такі захворювання, як, наприклад, слабка або гостра гемофілія A (у випадках, коли в цих пацієнтів виявлені каталітичні антитіла), і/або з іншого боку, пацієнтів, що страждають, наприклад, аутоімунними захворюваннями (у випадках, коли в цих пацієнтів виявлені каталітичні антитіла).

Таким чином, відповідно до четвертого принципового аспекту, даний винахід забезпечує рішення проблеми створення фармацевтичної композиції, яка існувала тривалий час, що відрізняється тим, що вона містить фармацевтично ефективну кількість щонайменше одного типу ало-антитіл до фактору VIII, які спроможні розщеплювати фактор VIII, як визначено вище, особливо таких, які можна одержати в процесі описаного вище способу, або однієї з їхніх фармацевтично прийнятних солей, які включені у фармацевтично прийнятний наповнювач, розчинник або носій.

Далі, відповідно до п'ятого принципового аспекту, даний винахід передбачає фармацевтичну композицію, яка відрізняється тим, що вона містить фармацевтично ефективну кількість щонайменше одного інгібітору розщеплення фактору VIII, як він визначений вище, або однієї з його фармацевтично прийнятних солей заміщення, яка включена у фармацевтично прийнятний наповнювач, розчинник або носій.

Ці фармацевтичні композиції можуть вводитись, наприклад, трансбукальним, ректальним, парентеральним, трансдермальним, окулярним, назальним або вушним шляхом.

Ці фармацевтичні композиції можуть бути твердою речовиною або рідиною і можуть бути подані у фармацевтичних формах, що використовуються звичайно в медицині людини, - таких, як, наприклад, прості таблетки або таблетки з покриттям, желатинові капсули, гранули, свічки, препарати для ін'єкції, трансдермальні системи (для введення через шкіру), краплі для очей, аерозолі та розчини, які розпорошуються, а також вушні краплі. Їх готують звичайним шляхом. Активний початок, що складається з фармацевтично ефективною кількістю щонайменше одного з інгібіторів розщеплення фактору VIII, як вони визначені вище, або однієї з його фармацевтично прийнятних солей заміщення, може бути включений сюди разом із наповнювачами, які використовуються звичайно у фармацевтичних композиціях - такими, як тальк, гуміарабік, лактоза, крохмаль, стеарат магнію, полівідон, похідні целюлози, кокосова олія, напівсинтетичні гліцериди, водні або неводні носії, жири тварини або рослинного походження, гліколи, різноманітні зволожуючі агенти, диспергатори або емульгатори, силіконові гелі, деякі полімери або співполімери, консерванти, ароматизатори та барвники. Кращою фармацевтичною формою є форма для ін'єкції.

Даний винахід поширюється також на фармацевтичну композицію з активністю, що нейтралізує, що може використовуватися головним чином як прийнятні ліки для лікування таких захворювань, як гемофілія А з продукцією ало-антитіл до фактору VIII; аутоімунні захворювання з ало-антитілами до фактору VIII (у випадку, коли в цих пацієнтів виявлені каталітичні антитіла), причому для зазначеної фармацевтичної композиції характерно, що вона містить фармацевтично ефективну кількість щонайменше одного зазначеного вище інгібітору розщеплення фактору VIII або однієї з його фармацевтично прийнятних солей заміщення, які включені у фармацевтично прийнятний наповнювач, розчинник або носій.

Винахід поширюється також на спосіб терапевтичного впливу на ссавця, що страждає патологією, яка є результатом рівня утримання в його крові фактору VIII, що відрізняється тим, що зазначеному ссавцю вводиться терапевтично ефективна кількість щонайменше одного інгібітору розщеплення фактору VIII, як він визначений вище, або однієї з його фармацевтично прийнятних солей заміщення.

Цей спосіб забезпечує головним чином успішне лікування захворювань гемофілічної природи, особливо патологій, які викликані нестачею фактору VIII у крові хворого.

Винахід поширюється також на фармацевтичну композицію з протитромбозною активністю, що може бути використана головним чином як корисні ліки при таких захворюваннях як, особливо, тромбоз, причому для зазначеної фармацевтичної композиції характерно, що вона містить фармацевтично ефективну кількість щонайменше одного типу ало-антитіл до фактору VIII, які здатні розщеплювати фактор VIII, особливо такий, який може бути отриманий у процесі описаного вище способу, або однієї з його фармацевтично прийнятних солей заміщення, яка включена у фармацевтично прийнятний наповнювач, розчинник або носій.

Винахід поширюється також на спосіб терапевтичного впливу на ссавців, для яких характерно те, що зазначеному ссавцю вводять терапевтично ефективну кількість щонайменше одного типу ало-антитіл до фактору VIII, як вони визначені вище, або однієї з його фармацевтично прийнятних солей заміщення.

Цей спосіб забезпечує головним чином успішне лікування захворювань тромбозної природи, особливо патологій, які викликані наявністю надлишку фактору VIII у крові хворого.

У терапії людини і тварин ало-антитіла до фактору VIII або інгібітори розщеплення фактору VIII, як вони визначені вище, можуть вводитись самі по собі або у сполученні з фізіологічно активним наповнювачем, у будь-якій формі, зокрема, орально у формі желатинових капсул або таблеток або парентерально у формі розчинів для ін'єкцій. Можна розглядати інші форми введення - такі, як препарати у вигляді свічок, мазей, кремів, гелів або аерозолів.

У контексті даного винаходу використані такі терміни:

"каталітичні ало-антитіла до фактору VIII", що розуміється як такий, що позначає антитіла, які націлені на фактор VIII, наділені каталітичною активністю, які індукуються у пацієнтів з гемофілією А при трансфузії терапевтичних препаратів фактору VIII;

"фактор VIII", що розуміється як такий, що позначає кофермент фактору IX у ферментативному розщепленні фактору X у процесі згортання крові;

"розщеплення фактору VIII", що розуміється як такий, що позначає створення фрагментів фактору VIII, які не з'являються внаслідок спонтанного гідролізу або гідролізу ферментами, що фізіологічно розщеплюють - наприклад, тромбіном, який активований фактором IX, активований фактором XI активованою білком C;

"інгібітор розщеплення фактору VIII, каталізує ало-антитілами до фактору VIII", що розуміється як будь-який пептид, що позначає, що належить або не належить до амінокислотної послідовності фактору VIII, або інгібітор протеази, що здатний специфічно нейтралізувати гідролізуючу активність каталітичних антитіл до фактору VIII.

У рекомбінантний фактор VIII людини була введена радіоактивна мітка ¹²⁵I. Ало-антитіла до фактору VIII були виділені й очищені з плазми трьох пацієнтів із гемофілією та інгібуванням за допомогою афінної хроматографії на сефарозі (Sephарозе), до матриксу якої був пришитий очищений імунологічним методом фактор VIII людини. Афінно очищені антитіла до фактору VIII пацієнтів Bor, Che і Wal інгібували про-коагулянтну активність фактору VIII до рівня відповідно 57,0, 64,0 і 43,0 BU/мг (одиниць Bethesda на мг) IgG.

Спільна інкубація міченого фактору VIII з ало-антитілами до фактору VIII призводила, у двох пацієнтів з трьох, до протеолізу молекули. Була продемонстрована специфічність гідролізу в сайтах об'єднання антитіл для ало-антитіл ізотипу IgG до фактору VIII. Спільна інкубація [¹²⁵I]-фактору VIII з афінно очищеним IgG до фактору VIII пацієнтів Bor і Wal в присутності інгібіторів протеази аprotиніну (0,15мкМ), E-64 (28мкМ), EDTA (1,3мкМ), лейпептину (10мкМ) і пепстатину (10мкМ) не призводила до інгібування протеолітичної активності.

Заявники охарактеризували головні сайти розщеплення каталітичним IgG в молекулі фактору VIII як такі: Arg³⁷²-Ser³⁷³, що знаходиться між доменами A1 і A2 фактору VIII, Tyr¹⁶⁸⁰-Asp¹⁶⁸¹, що знаходиться на N-кінці домену A3, і Glu¹⁷⁹⁴-Asp¹⁷⁹⁵, що знаходиться всередині домену A3.

Була продемонстрована залежність гідролізу фактору VIII ало-антитілами до фактору VIII від часу і дози. Зокрема, гідроліз спостерігався в умовах, коли Ig до фактору VIII і фактор VIII інкубували спільно при молярних співвідношеннях, що були в 80-9500 разів нижче, ніж ті, що очікувалися в плазмі пацієнтів, що призводить до припущення, що гідроліз є механізмом інактивації фактору VIII ало-антитілами пацієнтів *in vivo*.

Далі заявники досліджували кінетику опосередкованого антитілами гідролізу фактору VIII, інкубуючи IgG до фактору VIII пацієнта Wal із зростаючими концентраціями неміченого фактору VIII при фіксованій концентрації [¹²⁵I]-фактору VIII. Криві залежності розміру, зворотної швидкості, від розміру, зворотної концентрації субстрату, були лінійними ($r=0,99$), що дозволяє припустити, що реакція має просту кінетику Міхаеліса-Ментен, як вже спостерігалось для поліклональних каталітичних антитіл. Для пацієнта Wal були розраховані каталітична ефективність, що здається, V_{max} і швидкість гідролізу ало-антитілами до фактору VIII. На підставі розрахованих кінетичних параметрів гідролізу *in vitro* було зроблене припущення, що механізмом інактивації фактору VIII ало-антитілами пацієнтів *in vivo* може бути протеоліз.

Асоціація фактору VIII із фактором фон Вілебранда (vWF) підвищує каталітичну швидкість тромбіну стосовно фактору VIII, оскільки він захищає фактор VIII від гідролізу активованим білком C (APC). Додавання vWF до фактору VIII призводило до часткового інгибування (тобто на 36,9%) гідролізу фактору VIII імуноглобуліном G (IgG) до фактору VIII, якщо очищений vWF і фактор VIII змішували у ваговому співвідношенні, що близьке до їхнього співвідношення в нормальній плазмі, тобто 30мкг/мл vWF і 300нг/мл фактору VIII.

Ідентифікація ало-антитіл до фактору VIII як каталітичних антитіл, на додаток до описаних раніше антитіл, що гідролізують, до вазоактивного кишкового пептиду (VIP) у пацієнтів з астмою, антитіл, що гідролізують ДНК у пацієнтів із системним червоним вовчком та тироглобулін-специфічних каталітичних антитіл у пацієнтів з аутоімунним тиреоїдитом, розширює спектр каталітичних імунних відповідей. Наскільки відомо заявникам, це перше свідчення індукції в людини каталітичних антитіл у відповідь на екзогенне введення білкового антигену. Кінетичні параметри гідролізу фактору VIII, що проявляють каталітичні властивості IgG до фактору VIII і оцінка кількостей цих антитіл у плазмі дозволяють припустити наявність у каталітичної імунної відповіді функціональної ролі в інактивації фактору VIII *in vivo*. У поліклональній суміші ало-антитіл до фактору VIII, що різняться за їхніми функціональними властивостями, каталітичні антитіла можуть інгібувати про-коагулянтну активність фактору VIII із більшою швидкістю, ніж ті антитіла до фактору VIII, що не каталізують. Таким чином, ідентифікація пептидних епітопів, що є мішенями для протеолітичних антитіл до фактору VIII, може бути вирішальною для розуміння патофізіології відповіді з наявністю інгібітору фактору VIII. Крім того, одержання характеристик інгібіторів фактору VIII як сайт-специфічних протеаз забезпечує нові підходи до лікування пацієнтів, що мають ало-антитіла до фактору VIII.

Для кращого розуміння даного винаходу та більш ясного уявлення про його цілі, характерні риси та переваги наведено нижчевикладений пояснювальний опис із посиланнями на додані фігури, які подані винятково як приклади, що не обмежують, а ілюструють специфічність розщеплення фактору VIII ало-антитілами до фактору VIII.

Фіг.1: Гідроліз [¹²⁵I]-фактору VIII афінно очищеними антитілами IgG до Фактору VIII пацієнтів із гемофілією А з інгібітором

Фіг.1 (A): Мічений ¹²⁵I фактор VIII інкубували з афінно очищеним IgG до фактору VIII пацієнтів Bor (смуга Bor), Che (смуга Che) і Wal (смуга Wal) або тільки з буфером (смуга 1) протягом 10 год. при 38°C, потім проводили SDS-PAGE та авторадіографію. Для двох з трьох пацієнтів (Bor і Wal) інкубація фактору VIII з афінно очищеним IgG до фактору VIII призводила до гідролізу молекули фактору VIII. Навпаки, профіль міграції в гелі фактору VIII не змінювався, якщо мічений ¹²⁵I фактор VIII інкубували з IgG до фактору VIII, який був очищеним із плазми пацієнта Che (смуга Che). Профіль міграції фактору VIII не змінювався також і при інкубації з моноклональним IgG M061 людини до дигоксину (mAb) або з нормальним нефракціонованим поліклональним IgG людини (Sandoglobulin, IVIg), що не виявляє інгібуючої активності стосовно фактору VIII

Фіг.1 (B):

Фракції потоку через афінні колонки не містили антитіл до фактору VII, що визначаються методом твердофазного імуоферментного аналізу ELISA, та не гідролізували мічений ¹²⁵I фактор VIII.

Фіг.1 (C):

Видалення IgG з кислотних елюатів, що містять афінно очищені антитіла до фактору VIII від пацієнтів Wal і Bor, хроматографією на білку G призводило до втрати їхньої гідролітичної активності стосовно фактору VIII.

Фіг.2: Гель-проникаюча хроматографія каталітичної активності антитіл до Фактору VII

Фіг.2 (A):

Щоб додатково виключити можливість того, що протеолітична активність антитіл обумовлена примісними протеазами, афінно очищені антитіла до фактору VIII пацієнта Wal опрацьовували 8М сечовиною та піддавали гель-проникаючій хроматографії. Основний пік утримувався у фракції 25, що відповідає IgG за тестом ELISA. Активність, що гідролізує, елюювалася у фракції IgG, і така активність не виявлялася у фракціях, у яких був відсутній IgG (наприклад, фракція 35).

Фіг.2 (B):

Основний пік, що був виділений у фракції 25, відповідав IgG, як свідчить SDS-PAGE, що несе радіоактивну мітку вмісту фракції.

Фіг.3: Залежність протеолізу [¹²⁵I]-фактору VIII афінно очищеними антитілами до фактору VIII пацієнтів із гемофілією А з інгібітором від дози і від часу

Кінетика гідролізу фактору VIII ало-антитілами до фактору VIII пацієнтів Bor і Wal. Швидкість гідролізу міченого ¹²⁵I фактору VIII імуноглобуліном G до фактору VIII пацієнта Wal була вище, ніж швидкість гідролізу, що виявляється імуноглобуліном G до фактору VIII пацієнта Bor; це дозволяє припустити, що каталітичні

антитіла пацієнтів мають різноманітні кінетичні властивості, або, альтернативно, що частка каталітичних антитіл серед антитіл до фактору VIII у пацієнтів різняться.

Fig.4: Гідроліз [¹²⁵I]-фактору VIII антитілами до Фактору VIII в присутності зростаючих кількостей неопрацьованого (неміченого) Фактору VIII.

Кінетика опосередкованого антитілами гідролізу фактору VIII при інкубуванні IgG до фактору VIII у пацієнта Wal із зростанням концентрації неміченого фактору VIII в присутності фіксованої концентрації [¹²⁵I]-фактору VIII. Додавання зростаючих концентрацій кількостей неміченого фактору VIII призводило до залежного від дози інгібування гідролізу [¹²⁵I]-фактору VIII імуноглобуліном G (Ig) до фактору VIII. Насичення гідролізу фактору VIII не було досягнуто при максимальній концентрації, що була використана (тобто при 1,7мкМ). Графік залежності величини, що зворотна до швидкості, від величини, що зворотна до концентрації субстрату, був лінійним (r=0,99), що свідчить про те, що реакція має просту кінетику Міхаеліса-Ментен, як уже спостерігалось для поліклональних каталітичних антитіл.

Fig.5: Інгібування каталітичної активності IgG до фактору VIII пацієнта Wal

Протеоліз фактору VIII, що несе радіоактивну мітку, ало-антитілами до фактору VIII пацієнта Wal пригнічувався до приблизно 62%, якщо антитіла та фактор VIII спільно інкубували в присутності Pefabloc® (продукт фірми Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany); це вказує на активність певного інгібітору протеази в нейтралізації каталітичної активності деяких із каталітичних антитіл.

ПРИКЛАДИ

Приклад 1: Афінне очищення антитіл до фактору VIII

Антитіла виділяли з плазми осадженням сульфату амонію. Потім антитіла, що реагують із фактором VIII, очищали афінною хроматографією на матриці активованої CNBr сефарози 4B, до якої був пришитий фактор VIII, що промислово випускається та який очищений імунологічним методом, отримуваний із плазми людини (25000од./3г гелю). Збирали фракції потоку через колонку. Після ретельного промивання фосфатно-буферним сольовим розчином (PBS) pH7,4 антитіла до фактору VIII елюювали розчином 0,2М гліцину pH2,8, діалізували проти PBS та концентрували за допомогою Centrifer. Відбирали проби з фракцій потоку та елюатів і берегли їх до використання при -20°C. Фраменти F(ab')₂ антитіл до фактору VIII одержували, як описано раніше.

Вміст IgG до фактору VIII у 10мг IgG, що нанесений на колонку, для пацієнтів Bor, Che і Wal дорівнювало відповідно 130, 20 та 280мкг (тобто 143±130мкг/мл нефракціонованої плазми), що узгоджується з попередніми спостереженнями.

Приклад 2: Нейтралізуюча активність по відношенню до фактору VIII

Активність, що нейтралізує, по відношенню до фактору VIII антитіл до фактору VIII визначали методом Kasper та ін. та виражали в одиницях Bethesda (BU) (посилання). BU визначали як величину, що зворотна до концентрації IgG, що дає 50% інгібування про-коагулянтної активності фактору VII. Залишкову активність фактору VIII вимірювали в одноступінчатому аналізі шляхом вимірювання часу активованого часткового тромбопластину, використовуючи в якості субстрату людську плазму, яка не містить фактору VIM (Behring), а в якості активатора - pathromptin® плаценти людини (Behring). Випробувані прогріту плазму або імунологічно очищений IgG до фактору VIII інкубували з об'єднаної, обробленої цитратом людської плазми протягом 2год. при 37°C. Час згортання для чотирьох послідовних розведень референсного зразка плазми (Immuno AG, Wien) порівнювали з часом згортання трьох розведень кожного випробуваного зразка. Розведення робили в буфері Owren-Koller (Diagnostica Stago). Розбіжності між повторами складали від 1 до 2,5%.

Афінно очищені антитіла до фактору VIII пацієнтів Bor, Che і Wal інгібували прокоагулянтну активність фактору VIII відповідно до 57,0, 64,0 і 43,0 BU/мг IgG.

Приклад 3: Оцінка гідролізу фактору VIII

Рекомбінантний фактор VIII людини, що випускається в промисловості, мітили ¹²⁵I іодогенним методом до питомої активності 11,6нКюрі/мкг. [¹²⁵I]-фактор VIII (від 1,5 до 150нг) інкубували в 50мкл буфера 50м трис-HCl pH7,7, 100мМ гліцин, 0,025% твін-20 та 0,02% NaN₃ без або з додаванням від 17 до 1667нМ імунологічно очищеного IgG до фактору VIII протягом від 5хв. до 10год. при 38°C. Моноклональний IgG M061 людини до дигоксину (mAb) та нормальний нефракціонований людський поліклональний IgG (IVIg, Sandoglobulin®) використовували в якості негативних контролів. Проби змішували у відношенні 1:1 із буфером Лемлі без меркаптоетанолу та після нанесення в осередки 20мкл кожної проби піддавали їх без кип'ятіння електрофорезу при SDS. Електрофорез проводили паралельно в 7,5% і 15% гелях із SDS при умовах, що не відновлюють. Електрофорез проводили при кімнатній температурі за допомогою системи mini-PROTEAN II при 25мА/гель до досягнення фронтом барвника низу гелю. Потім гелі сушили та зони білка виявляли за допомогою X-OMAT AR. Після авторадіографії сканували зони фактору VIII із молекулярною вагою 200 і 300кДа, що завжди гідролізуються IgG до фактору VIII, щоб мати можливість розрахувати швидкість гідролізу міченого фактору VIII.

Приклад 4: Швидка гель-фільтраційна рідинна хроматографія білка

Аліквоту 100мкл IgG до фактору VIII пацієнта Wal (740мкг), що оброблена 8М сечовиною, піддавали гель-фільтрації на колонці із суперозою-12, яка урівноважена PBS із 0,01% азиду, при швидкості потоку 0,2мл/хв. Збирали фракції об'ємом 500мкл та після 10-кратного розведення аналізували їх на наявність IgG методом ELISA-сендвіч і на протеолітичну активність стосовно фактору VIII. Білки у фракції 25 мітили ¹²⁵I і піддавали SDS-PAGE при умовах, що не відновлюють, паралельно з нормальним поліклональним IgG людини. Гель забарвлювали барвником кумасі блакитним, а також авторадіографували; потім обидва зображення сполучали. Основний пік, виділений у фракції 25, відповідав IgG, відповідно до ELISA і SDS-PAGE міченого вмісту фракції. Активність, що гідролізує, елюювалася разом із фракцією IgG і не виявлялася у фракціях, у яких був відсутнім IgG (наприклад, фракція 35).

Приклад 5: Аналіз послідовностей NH₂-кінця

Сахарозний склад із неміченим рекомбінантним фактором VIII (rDNA-BHK) (300мкг, octocog alfa, Bayer Corporation, Berkeley, CA, США) опрацьовували IgG до фактору VIII пацієнта Wal (74мкг) у 1500мкл буфера

50м тріс-НСІ рН7,7, 100мМ гліцин, 0,025% твін-20 і 0,02% NaN₃ протягом 24год. при 38°С. Отримані фрагменти фактору VIII піддавали SDS-PAGE у 10% гелі при 50мА в умовах, що не відновлюють, та переносили протягом 2год. при 100мА на мембрану Hybond-P PVDF (Amersham, Little Chalfont, Англія) у 10мМ CAPS та 10% етанолі при рН11,0. Після фарбування кумаді блакитним видимі зони вирізали та проводили N-кінцеве секвенування за допомогою автоматичного білкового мікросеквенатора Prosize 492 cLC (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Кількість секвенованого білку, в залежності від фрагмента, варіювала від 0,5 до 2 пікомолей.

Основними доступними для розщеплення зв'язками були такі: Arg³⁷²-Ser³⁷³ (R³⁷²-S³⁷³), що знаходиться між доменами A1 і A2 фактору VIII, Tyr¹⁶⁸⁰-Asp¹⁶⁸¹ (Y¹⁶⁸⁰-D¹⁶⁸¹), що знаходиться на N-кінці домену A3, і Glu¹⁷⁹⁴-Asp¹⁷⁹⁵ (E¹⁷⁹⁴-D¹⁷⁹⁵), що знаходиться всередині домену A3. Декілька сайтів розщеплення фактору VIII антитілами до фактору VIII можуть мати походження від індивідуальних антитіл із поліспецифічною каталітичною активністю або ж поліклональних популяцій антитіл, кожний тип із яких має унікальну специфічність у змісті сайта розщеплення.

Амінокислотна послідовність	Сайт розщеплення
Ser ValAla Lys Lys His Pro (CVAKKHP)	Arg ³⁷² -Ser ³⁷³ (R ³⁷² -S ³⁷³)
Asp Gin Arg Gin Gly Ala Glu (DQRQGAE)	Glu ¹⁷⁹⁴ -Asp ¹⁷⁹⁵ (E ¹⁷⁹⁴ -D ¹⁷⁹⁵)
Asp Glu Asp Glu Asn Gin Ser (DEDENQS)	Tyr ¹⁶⁸⁰ -Asp ¹⁶⁸¹ (Y ¹⁶⁸⁰ -D ¹⁶⁸¹)

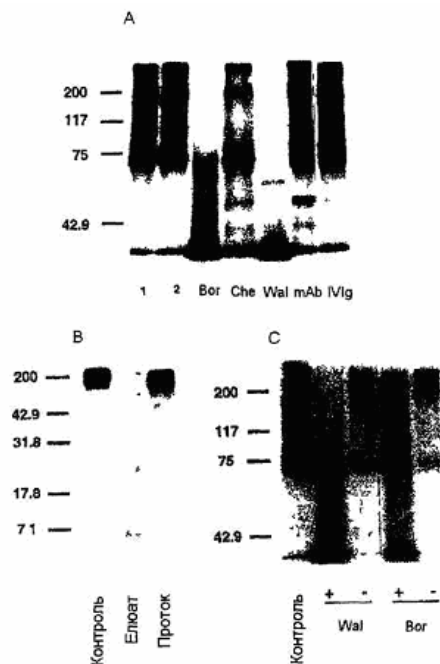
Приклад 6: Дослідження інгібування проведено за допомогою Pefabloc - загального інгібітору серинових протеаз

Гідроліз [¹²⁵I]-фактору VIII афінно очищеними антитілами IgG до фактору VIII пацієнтів із гемофілією А з інгібітором в присутності Pefabloc®. [¹²⁵I]-фактор VIII (150нг) інкубували окремо, при 50мкг/мл імунологічно очищеного IgG до фактору VIII пацієнта Wal або в присутності і IgG до фактору VIII, та інгібітору серинових протеаз Pefabloc® (Boehringer) протягом 5год. при 38°С. Потім фактор VIII аналізували за допомогою SDS-PAGE у 7,5% гелі за умов, що не відновлюють. Після авторадіографії зони фактору VIII із молекулярною вагою 200 і 300кДа, незмінно гідролізує IgG до фактору VIII, сканували, щоб обчислити відсоток гідролізу міченого фактору VIII.

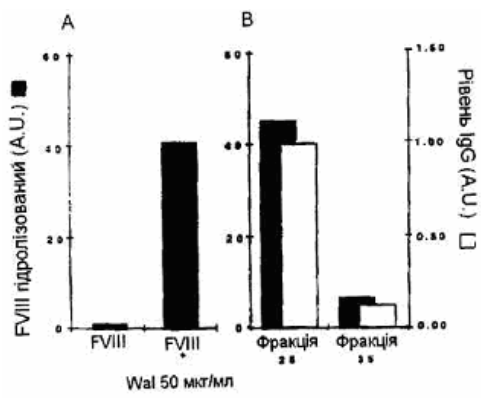
Протеоліз радіактивно міченого фактору VIII ало-антитілами до фактору VIII пацієнта Wal був інгібований до рівня приблизно 62% у тому випадку, коли антитіла та фактор VIII інкубували спільно при Pefabloc®, що вказувало на спроможність деякого інгібітору серинових протеаз нейтралізувати каталітичну активність деяких каталітичних антитіл.

Подальші спостереження

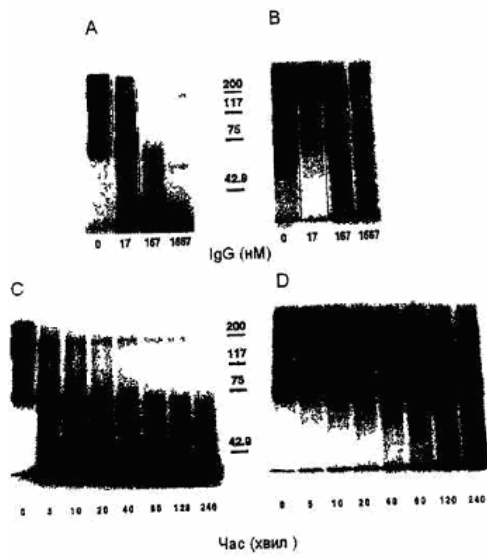
При скринінгу очищених IgG від десяти таких, що мають високу імунну відповідь, пацієнтів із гемофілією А, при використанні в якості молекули-мішені міченого ¹²⁵I фактору VIII, для шести пацієнтів спостерігали зміни в профілі міграції фактору VIII. Ці результати підкріплюють попередні спостереження заявників і вказують на те, що каталітичні антитіла до фактору VIII є приблизно в 60% пацієнтів.



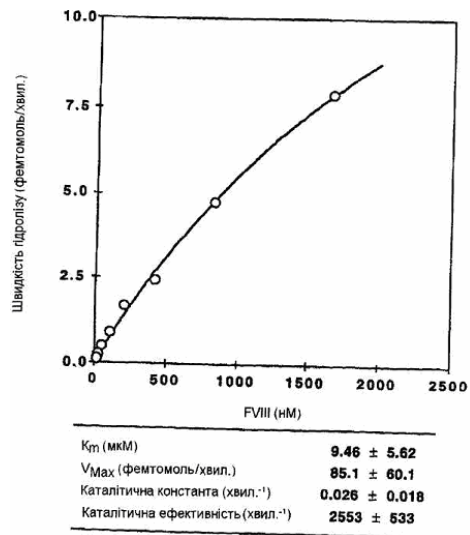
ФІГ. 1



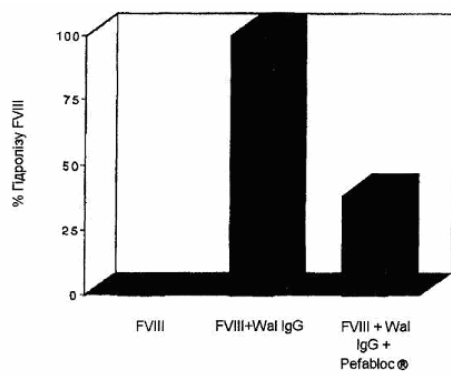
ФІГ. 2



ФІГ. 3



ФІГ. 4



ФИГ. 5