

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 97.277

REQUERENTE: IMUTRAN LIMITED., britânica, industrial,
em 21 Holborn Viaduct, London EC1A 2DY
INGLATERRA

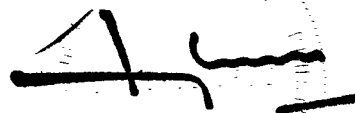
EPÍGRAFE: "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE FORMULAÇÕES
FARMACEUTICAS, CONTENDO, POR EXEMPLO, CICLOS
PORINA A E FACTOR DE VENENO DE COBRACAPELO,
UTEIS PARA A INIBIÇÃO DA REJEIÇÃO DE ALOEN
XERTO E DE XENOENXERTO CONCORDANTE"

INVENTORES: DAVID JAMES GRAHAM WHITE; JOHAN BEYERS VAN
DEN BOGAERDE

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4.º da Convenção de Paris
de 20 de Março de 1883.

REINO UNIDO, em 9 DE ABRIL DE 1990, SOB O No.GB9007971.6

97.277



IMUTRAN LIMITED

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS, CONTEN-
DO, POR EXEMPLO, CICLOSPORINA A E FACTOR DE VENENO DE COBRA-
-CAPELO, ÚTEIS PARA A INIBIÇÃO DA REJEIÇÃO DE ALOENXERTO E DE
XENOENXERTO CONCORDANTE"

=====

MEMÓRIA DESCRITIVA

RESUMO

O presente invento diz respeito a um processo para a preparação de uma formulação farmacêutica que consiste em se incluir na referida formulação ciclosporina A, ou outro composto tendo uma actividade semelhante à da ciclosporina A, e factor veneno de cobra-capelo, ou outro inibidor do complemento, os quais podem ser usados em conjunto um com o outro para a promoção da sobrevivência do aloenxerto e do xenoenxerto concordante e para evitar que esses enxertos sejam rejeitados.

Este invento relaciona-se com formulações farmacêuticas úteis no tratamento da rejeição crónica de aloenxertos e da rejeição de xenoenxertos concordantes. O invento relaciona-se assim com a promoção da sobrevivência do enxerto, ou com a prevenção da perda do enxerto, num hospedeiro.

O aloenxerto é a transplantação de tecido entre dois membros da mesma espécie. O xenoenxerto, que consiste na transplantação de tecidos entre duas espécies diferentes, foi dividido por meio de critérios biológicos em dois subenxertos (Calne, Transplant. Proc. II 550-554 (1970)). Os dois subenxertos são xenoenxertos concordantes e xenoenxertos discordantes. A distinção entre estes dois subenxertos consiste no facto de um enxerto de órgão vascularizado transplantado entre espécies discordantes é rejeitado hiperagudamente, ou seja no espaço de alguns minutos ou horas de revascularização. Entre espécies concordantes, a rejeição hiperaguda de xenoenxertos não se verifica. Os enxertos, contudo, serão rejeitados, e frequentemente de um modo acelerado, mas isto irá ocorrer no espaço de vários dias e não no espaço de horas ou minutos.

Pensa-se geralmente, embora não exista para este facto uma evidência formal, que entre espécies discordantes a rejeição hiperaguda é um resultado da acção de anticorpos que ocorrem naturalmente contra a espécie do dador. Os enxertos concordantes, por outro lado, sobrevivem pelo menos durante um curto período de tempo visto não estarem presentes esses anticorpos capazes de causar a sua destruição. Existem muitos exemplos na bibliografia para demonstrar esta diferença. Talvez os mais elegantes sejam os de Hammer (em "Xenograft 25" (Mark A. Hardy, Ed) Elsevier, Amsterdam (1989)). Usando sempre o cão como espécie recipiente, Hammer indica os tempos de sobrevivência dos enxertos de rim como sendo os seguintes:

Cão-cão	11,4 dias
Cão Selvagem da Austrália-cão	11,5 dias
Lobo-cão	19,4 dias
Raposa-cão	6,5 dias
Leão-cão	10-24 horas
Tigre-cão	10-24 horas
Gato-cão	10-24 horas
Porco-cão	10-30 minutos

As quatro últimas interacções seriam nesta base xenoenxertos discordantes, enquanto que os quatro primeiros xenoenxertos seriam concordantes. Hammer equacionou estas diferenças entre xenoenxertos discordantes e concordantes com a presença ou ausência, respectivamente, de anticorpos hemoaglutinantes de espécies cruzadas.

Num nível académico, existem algumas dificuldades isoladas no que se refere ao que é essencialmente uma definição de trabalho sobre as relações entre espécies concordantes e discordantes. Sob um ponto de vista prático, contudo, tendo como finalidade o presente invento, duas espécies diferentes são consideradas como relacionadas de um modo concordante se não houver uma rejeição hiperaguda de um xenoenxerto de uma espécie para a outra. Assim, tendo como finalidade o presente invento, as espécies relacionam-se concordantemente se, embora mesmo normalmente não viessem a dar origem a uma rejeição hiperaguda, tenham contudo sido submetidas a um processo, por exemplo manipulação genética, de modo a evitar a rejeição hiperaguda. O Requerimento da Patente Internacional PCT/GB90/01575 por exemplo relaciona-se em apresentações específicas com animais dadores de xenoenxertos que foram modificados transgênicamente para expressar reguladores do complemento do recipiente (tais como factor acelerador do enfraquecimento (DAF) ou proteína cofactor da membrana (MCP)).

Os órgãos dos animais dadores não são rejeitados hiperagudamente quando enxertados num animal que seria normalmente encarado como de uma espécie relacionada discordantemente. Assim, tendo como finalidade este invento, esses animais dadores transgênicos podem ser encarados como relacionados concordantemente com as suas espécies alvo pretendidas.

Exemplos de espécies tendo uma relação concordante, tal como foi definido anteriormente, incluem lebre-coelho, criceto-rato e primata não humano-humano, incluindo, por exemplo, babuíno-humano, chimpanzé-humano e macaco-humano.

A promoção da sobrevivência do enxerto foi alvo de atenção tanto no campo dos xenoenxertos (discordantes e concordantes) e aloenxertos. Aproveitando as primeiras sugestões que foram feitas para a promoção da sobrevivência do xenoenxerto discordante, Adachi et al (Transplant. Proc. XIX (1) 1149-1152)) estudaram a sobrevivência de xenoenxertos cardíacos discordantes em ratos. Entre os potenciais promotores de sobrevivência encontraram-se a ciclosporina A, a aspirina e o factor veneno de cobra-capelo. Adicionalmente, foi estudada a combinação de ciclosporina A e de factor veneno de cobra-capelo. Adachi et al referem que "no nosso estudo, não se verificou uma diferença estatisticamente significativa no tempo de sobrevivência médio entre o grupo tratado com ciclosporina A e factor veneno de cobra-capelo e o grupo tratado apenas com factor veneno de cobra capelo". Os tempos de sobrevivência médios variaram entre 40 e 50 horas. Kemp etg al (Transplant. Proc. XIX (6) 4471-4474 (1987)) também estudaram vários potenciais promotores da sobrevivência de xenoenxertos discordantes num estudo de xenoenxertos de rim de coelho em gatos. Os promotores de sobrevivência candidatos incluíram captopril, analapril, nifedipina, prostaciclina, cromoglicato de sódio, uma combinação azatioprina/corticosteroide, ciclos-

porina A e factor veneno de cobra-capelo. A rejeição hiperaguda não foi evitada por qualquer uma destas drogas candidatas exceptuando o factor veneno de cobra-capelo o qual, afirmaram os autores, "apresentou um efeito notável, com prolongamentos da sobrevivência do enxerto até sete dias".

A rejeição do xenoenxerto concordante foi estudada por Hardy et al (Transplantation 33 (3) 237-242 (1982)), que examinaram o efeito da irradiação linfoide selectiva (SLI) com paládio-109-hematoporfirina combinada com globulina antilinfocito, uma terapêutica que é principalmente dirigida contra a rejeição mediada pelas células T. Os tempos de sobrevivência médios foram da ordem dos 12,5 dias, em comparação com controlos não tratados que sobreviveram durante 2,9 dias em média. Homan et al (Transplantation 31 (3) 164-166 (1981)) estudaram o efeito da ciclosporina A na promoção da sobrevivência do xenoenxerto concordante. A melhor sobrevivência foi para uma média de 21 dias, em comparação com 2 dias para os controlos não tratados. Monden et al (Transplantation 43 (5) 745-746 (1987)) estudaram xenoenxertos do fígado criceto-para-rato e verificaram que a ciclosporina A não apresentava um efeito promotor da sobrevivência significativo em comparação com controlos não tratados. Valdevere et al (Transplant. Proc. XIX (1) 1158-1159 (1987)) também estudaram xenoenxertos do fígado criceto-para-rato e verificaram uma melhoria significativa no tempo de sobrevivência do enxerto, em comparação com os controlos, quando a ciclosporina A foi administrada em conjunção com esplenectomia; a sobrevivência melhorou uma média de 3,6 dias até uma média de 17,6 dias. Knechtle et al (Transplant. Proc. XIX (1) 1137-1139 (1987)), tal como o grupo Hardy et al referido anteriormente, estudaram o efeito da irradiação linfoide total (TLI), mas desta vez em conjunção com a terapêutica com a ciclosporina A, sobre a promoção da sobrevivência do xenoenxerto concordante. Referiram que, nos xenoenxertos

cardíacos criceto-para-rato, a ciclosporina A em doses elevadas prolongava significativamente a sobrevivência, mas apenas um recipiente ocasional apresentou função do enxerto a longo prazo. TLI em combinação com a ciclosporina A promoveu ainda mais significativamente a sobrevivência do enxerto.

A terapêutica convencional contra a rejeição do aloenxerto consiste em usar ciclosporina A ou por si só ou em combinação com esteroides ou azatioprin ou ambos. Na opinião de alguns, a combinação de terapêuticas triplas não representa uma melhoria em relação à terapêutica usando ciclosporina A isoladamente. Estas terapêuticas são eficazes na prevenção e reversão da rejeição aguda do enxerto, e provavelmente retardam o início da rejeição crónica do enxerto, mas parece apresentarem um efeito pequeno ou nulo sobre a reversão da rejeição crónica após o seu início.

O presente invento procura promover a melhor sobrevivência, ou evitar a rejeição, de xenoenxertos e/ou aloenxertos. O invento baseia-se na percepção de que a sobrevivência de xenoenxertos concordantes, e também a sobrevivência de aloenxertos, pode ser acentuadamente aumentada por tratamento com uma combinação de ciclosporina A e de factor veneno de cobra-capelo, ou por combinação de compostos apresentando modos semelhantes de acção.

De acordo com um primeiro aspecto do presente invento, proporciona-se uma formulação farmacêutica compreendendo um inibidor do complemento e um imunossupressor com actividade semelhante à da ciclosporina A.

As formulações farmacêuticas de acordo com o invento têm assim dois componentes, pelo menos. Um primeiro composto é um inibidor do complemento. O inibidor do complemento pode ou evitar

a activação do complemento ou fazer a sua remoção ou depleção, ou de um ou mais dos seus componentes. De preferência, o inibidor do complemento irá inibir as vias tanto clássica como alternativa da activação do complemento. É assim preferido que o inibidor do complemento actue a fim de bloquear a via em C3, seja por inibição, remoção ou depleção. Será assim tomado em consideração, que anticorpos (por exemplo anticorpos monoclonais) contra C3 podem ser usados como o inibidor do complemento no presente invento. Outros inibidores do complemento úteis incluem factor de activação do enfraquecimento (DAF) e proteína cofactor de membrana solúvel (MCP). Um dos inibidores do complemento mais preferidos é o factor veneno de cobra-capelo.

Os venenos de cobra constituem uma das secreções animais mais complexas, contendo um vasto número de substâncias com diferentes actividades farmacológicas e bioquímicas. A presença em venenos de princípios que afectam o complemento já é conhecida há quase um século. A acção do veneno da cobra-capelo (Naja naja kaouthia) sobre o complemento do soro foi estudada com um certo detalhe. O factor activo é uma glicoproteína com um peso molecular de 144kDa, que se combina com o factor B do soro na presença de iões de magnésio. O factor B é então dividido em dois componentes pela acção proteolítica do factor D do soro, criando Bb e Ba. O complexo CoF-Bb, onde CoF representa o factor veneno de cobra-capelo, é um enzima ou convertase altamente activo fazendo a divisão em C3 e C5. Contudo, diferentemente das convertases normais em C3 e C5, o CoF-Bb é resistente aos sistemas reguladores do complemento normal. Assim, a sua acção irá continuar, até todo o C3 ter sido convertido, fazendo assim a depleção eficaz da actividade do complemento individual. A divisão de C5 liberta C5a, que apresenta acção anafilactoide; nem todos os factores de veneno de cobra-capelo Naja possuem esta actividade convertase de C5, mas não se pensa que este facto seja importante

para a finalidade do presente invento. A inibição do complemento não se restringe a venenos do género Naja. Eggertsen et al (Toxicon 18 87-96 (1980)) estudaram venenos de cobras das famílias Elapidae Viperidae e Crotalidae. Dos 26 venenos estudados, 22 apresentam a capacidade de inibir a actividade do complemento humano normal. A análise da estrutura do factor veneno da cobra-capelo sugere que seja o equivalente do C3 da cobra-capelo ou um seu produto de degradação parcial.

O factor veneno de cobra-capelo, e factores veneno de outras cobras, não serão geralmente administrados no presente invento na sua forma nativa, devido a óbvios problemas de toxicidade. Na ausência de outras medidas para combater o problema da toxicidade, será, assim, geralmente necessário, pelo menos parcialmente, purificar o factor activo a partir do veneno cru. Não é necessário que o veneno da cobra-capelo ou de outra cobra seja purificado até à homogeneidade para utilização no presente invento, mas é evidente que pelo menos problemas reguladores se não outros, levam a prescrever a utilização do factor substancialmente purificado. O factor veneno de cobra-capelo, sob a forma de uma preparação semi-purificada, pode ser obtida a partir de fornecedores químicos tais como Sigma (Sigma Chemicals Limited, Poole, Dorset), que também fornecem veneno de cobra-capelo cru para purificação pelo utilizador. Um exemplo de um processo preparativo para o factor veneno de cobra-capelo é indicado nos exemplos.

Será tomado em consideração que, para além da utilização do factor veneno de cobra-capelo natural e de factores de outras cobras, análogos desses factores (incluindo fragmentos activos) podem ser usados neste invento, tal como acontece com factores sintéticos incluindo os produzidos por tecnologia de ADN recombinante. A característica de CoF que o torna apropriado para

utilização no presente invento é a sua capacidade para formar um complexo estável com o factor Bb que é resistente ao mecanismo normal de decomposição. Outras moléculas apresentando esta característica são assim também preferidas para utilização no invento.

Um segundo componente das formulações farmacêuticas de acordo com este invento é constituído por um imunossupressor com actividade semelhante à da ciclosporina A. Esses compostos são do conhecimento dos especialistas nesta técnica e incluem ciclosporinas diferentes da ciclosporina A, tais como ciclosporina C e ciclosporina G. Os eicosanoides também apresentam actividade semelhante à da ciclosporina A e incluem PGI₂ (prostaciclina), PGE₂, PGD₂, rapamicina e FK 506 (Fujisawa). O composto FK 506 é um dos que é preferido para utilização no presente invento, mas o mais preferido é a própria ciclosporina A. A ciclosporina A é fornecida por Sandoz sob o nome comercial de SANDIMUN.

Uma apresentação particularmente preferida do presente invento é uma formulação farmacêutica que compreende factor veneno de cobra-capelo e ciclosporina A, dois dos compostos individuais mais preferidos discutidos anteriormente.

Será tomado em consideração que podem estar presentes outros ingredientes nas formulações farmacêuticas de acordo com o invento. Estarão usualmente presentes excipientes, e a presença de outros ingredientes activos não é excluída. Podem estar presentes mais de um ingrediente activo de cada categoria.

Será tomado em consideração que os ingredientes activos não têm necessariamente que ser co-administrados numa única formulação. Assim, de acordo com um segundo aspecto do presente invento, é proporcionado um produto contendo um inibidor do

complemento e um imunossupressor com uma actividade semelhante à da ciclorporina A para utilização como uma preparação combinada para utilização simultânea, separada ou sequencial na promoção da sobrevivência ou para evitar a rejeição do aloenxerto ou do xenoenxerto concordante.

De acordo com um terceiro aspecto do invento, proporciona-se um estojo compreendendo uma preparação farmacêutica de um inibidor do complemento e uma preparação farmacêutica de um imunossupressor com actividade semelhante à da ciclosporina A.

A ciclosporina A e outros imunossuppressores com uma actividade semelhante à da ciclosporina A serão usualmente administrados parentéricamente na prática do presente invento. Nesses casos, a preparação contendo imunossupressor será estéril. Contudo, a própria ciclosporina A, e alguns outros imunossuppressores, podem ser administrados oralmente, caso esse em que a esterilidade não constitui um factor essencial. A própria ciclosporina A é apenas ligeiramente solúvel em água e para fins de ordem prática é preferido dissolvê-la num óleo, tal como um óleo vegetal. Verificou-se ser aceitável na prática o azeite. A dissolução em óleo só é necessária quando se trata de um imunossupressor que não é solúvel na água, e em termos gerais, o imunossupressor pode ser dissolvido em qualquer veículo fisiologicamente aceitável apropriado. Nalguns casos, a dissolução pode mesmo não ser necessária. A concentração à qual o imunossupressor é preparado dependerá, evidentemente, da natureza do próprio imunossupressor e da dose pretendida, que dependerá geralmente da orientação do médico assistente. Regra geral, contudo, foi considerado apropriado preparar formulações da ciclosporina com uma concentração variando entre 1 e 100 mg/ml, por exemplo entre 1 e 10 mg/ml, tipicamente entre cerca de 5 mg/ml para utilização

parentérica ou 25 a 100 mg/ml, por exemplo entre 50 e 100 mg/ml, tipicamente cerca de 100 mg/ml para administração oral.

Inibidores do complemento tais como factor veneno de cobra-capelo serão geralmente administrados parentéricamente e para esta via serão geralmente estéreis. O próprio factor veneno de cobra-capelo pode ser formulado em solução salina tamponada com fosfato (sem azeto) ou em qualquer outro solvente ou veículo apropriado. Pode acontecer que venham a ser preparadas formulações por via oral. A concentração do inibidor do complemento numa formulação farmacêutica irá depender de novo da dose final pretendida, que será orientada pelo médico assistente. Regra geral, contudo, uma preparação de factor veneno de cobra-capelo em PBS pode ser feita com uma concentração variando entre 0,05 mg/ml e acima até ao limite da solubilidade, o que irá depender da sua pureza. Composições tendo uma concentração até 5 mg/ml podem ser úteis na prática, por exemplo as que têm uma concentração variando entre 0,1 e 2 mg/ml, por exemplo cerca de 0,5 mg/ml.

Porque a cefalosporina é essencialmente não solúvel em meio aquoso, enquanto que o factor veneno de cobra-capelo o é, estes dois ingredientes activos preferidos serão geralmente formulados separadamente e administrados separadamente na prática. Contudo, isto não é em princípio essencial, visto ser possível formular uma emulsão apropriada dos dois ingredientes activos, e diferentes combinações dos ingredientes activos podem ser solúveis num solvente comum ou pelo menos podem ser suspensos num veículo comum.

Foi feita referência anteriormente à injeção parentérica. O sítio preferido para a injeção é o músculo, devido ao efeito depot resultante de uma injeção intramuscular. Contudo, a injeção intravenosa, pode ser apropriada nalgumas circunstâncias

e a injeccção subcutânea pode apresentar algumas senão todas as vantagens da injeccção intramuscular. A injeccção intraperitoneal pode ser usada se as circunstancias o ditarem.

De acordo com um quarto aspecto do presente invento, proporciona-se a utilização de um inibidor do complemento e de um imunossupressor com uma actividade semelhante à da ciclosporina A na preparação de um agente para a promoção da sobrevivência ou para evitar a rejeição de um aloenxerto ou de um xenoenxerto concordante. Será assim tomado em consideração que o invento tem applicação num método para a promoção da sobrevivencia ou para evitar a rejeição de um aloenxerto ou de um xenoenxerto concordante, num hospedeiro, compreendendo o método a administração a um recipiente de enxerto ou a um recipiente de enxerto projectado de um inibidor do complemento ou de um imunossupressor com uma actividade semelhante à da ciclosporina A.

Pode ser preferível em muitos casos pré-administrar alguns ou todos os ingredientes activos úteis neste invento antes de se realizar a cirurgia para enxerto. Deve ser tomado em consideração que uma vantagem principal do presente invento quando se relaciona com aloenxertos consiste no facto da combinação de ingredientes activos útil no presente invento ser útil para a prevenção da rejeição crónica ou para regular a rejeição crónica (isto é evitar a rejeição) após o seu início; isto acontece usualmente muitos anos após a transplantação.

Os recipientes de aloenxertos que sofrem de rejeição crónica do enxerto, podem estar a receber imunossupressão com ciclosporina A ou com outro imunossupressor tendo uma actividade semelhante à da ciclosporina A. Para a finalidade deste invento, a fim de tratar ou evitar a rejeição do enxerto crónica nesses doentes é necessário adicionar apenas uma terapêutica inibidora

do complemento. De acordo com um quinto aspecto do invento, proporciona-se a utilização de um inibidor do complemento na preparação de um agente para a promoção da sobrevivência ou para evitar a rejeição de um aloenxerto ou de um xenoenxerto concordante, num recipiente de enxerto a ser tratado com um imunossupressor com uma actividade semelhante à da ciclosporina A. O invento tem assim aplicação num método para a promoção da sobrevivência e/ou para evitar a rejeição de um aloenxerto ou de um xenoenxerto concordante, num hospedeiro, compreendendo o método a administração a um recipiente de enxerto ou a um recipiente de enxerto pretendido, a ser tratado com um imunossupressor com uma actividade semelhante à da ciclosporina A, de um inibidor do complemento.

O imunossupressor com uma actividade semelhante à da ciclosporina A será administrado a um nível apropriado eficaz mas não tóxico, tomando em consideração a espécie a ser tratada e o órgão a ser transplantado. O limite superior da tolerância à ciclosporina A nos seres humanos é determinado pela sua acção nefrotóxica e pela idade do recipiente. 20 mg/kg por dia pode constituir um limite superior inócuo para o tratamento de seres humanos em muitos casos, embora outras espécies possam apresentar tolerâncias mais elevadas. A ciclosporina A é eficaz em baixas doses, e assim, a quantidade mais baixa que pode ser administrada será simplesmente a quantidade mais baixa que dá origem a uma resposta eficaz. Quantidades de 1 ou 2 mg/kg por dia revelaram ser nalguns casos, eficazes. Como regra geral, pode-se administrar entre 5 e 10 mg/kg por dia. Se administrada parentericamente, a ciclosporina A pode ser injectada em dias alternados, caso esse em que a dose deverá ser duplicada. Contudo, para a via preferida, a oral, a dosagem diária será o regime de administração de escolha; mais particularmente a ciclosporina A pode ser administrada duas vezes por dia ou com maior frequência para dar

origem a uma dose diária total na ordem dos 5 a 10 mg/kg, de preferência. Outros imunossuppressores com uma actividade semelhante à da ciclosporina A serão administrados em doses eficazes mas não tóxicas, tal como será determinado pelo médico assistente.

O inibidor do complemento, tal como factor veneno de cobra-capelo, será, em regra, administrado numa quantidade que irá inibir com eficácia a actividade do complemento tal como é determinado pelo ensaio da hemólise do complemento (CH_{50}). O limite superior inócuo para a administração de factor veneno de cobra-capelo não foi determinado, mas doses de 2 mg/kg não parecem ser tóxicas. A dosagem mínima do factor veneno de cobra-capelo depende da espécie e pode ser determinada rapidamente pelo ensaio CH_{50} . Verificou-se que doses entre 0,01 e 0,1 ou 0,2 mg/kg são eficazes para o factor veneno de cobra-capelo. Doses eficazes e não tóxicas de outros inibidores do complemento podem também ser determinadas rapidamente pelos especialistas na técnica, por exemplo, usando o ensaio CH_{50} .

O factor veneno de cobra-capelo leva cerca de 6 horas para que a sua actividade inicial se realize após administração intramuscular. Uma vez observada a actividade inicial, ela pode durar mais de um dia, por exemplo 2 dias, e assim a administração diária do factor veneno de cobra-capelo pode não ser necessária. Com efeito, é preferível administrar o factor veneno de cobra-capelo em dias alternados, caso esse em que as doses diárias preferidas indicadas anteriormente serão duplicadas no dia da administração. Na prática, verificou-se que um regime de dosagem particularmente apropriado consiste em administrar 0,4 mg/kg intramuscularmente em dias alternados.

A administração de ciclosporina ou de outro imunossupressor será usualmente contínua. A administração do factor veneno de cobra-capelo ou de outro inibidor do complemento será geralmente não contínua, mas pode ser prolongada; mesmo isto pode, na prática, não ser essencial, visto poder ser necessária apenas uma terapêutica de curta duração para o tratamento, ou para evitar a rejeição de xenoenxertos concordantes.

Aspectos preferidos dos segundo a quinto aspectos do invento são como para o primeiro aspecto, mutatis mutandis.

O invento será agora ilustrado tendo como referência as preparações e exemplos que se seguem. Os exemplos referem-se aos desenhos acompanhantes, em que:

FIGURA 1 é um gráfico da sobrevivência de um xenoenxerto de coração de criceto em ratos, sendo a percentagem de sobrevivência registada em relação aos dias pós transplantação; e

FIGURA 2 é um gráfico da sobrevivência de um xenoenxerto de coração de criceto em ratos tratados com ciclofosfamida; de um modo diferente o gráfico corresponde à Figura 1.

Preparação

Esta preparação dá origem a um protocolo para a preparação do factor veneno de cobra-capelo a partir de veneno de cobra-capelo cru.

1 g de veneno de Naja naja kaouthia (Sigma, Product No. V-9125, Lotes Nos. 116F-0398 e 58F-0565) foi dissolvido em 60 ml de tampão fosfato de sódio desgaseificado (0,01M) a um pH de 7,5 e bombeado para uma coluna com 90cm x 26mm (diâmetro interno) de celulose DEAE (DE52, Whatman) e equilibrado com o mesmo tampão. A coluna foi então eluída a 43,0 ml por hora com o tampão inicial até a absorvência A_{280} do efluente voltar a 0. Um gradiente linear 3 litros : 3 litros do tampão de partida e tampão limite (fosfato de sódio 0,01M, pH 7,5, contendo cloreto de sódio 0,5M) foi então para ela bombeado a 40,0 ml por hora e foram recolhidas fracções de 7,0 ml. As fracções foram testadas quanto a anti-complementaridade, e as fracções positivas foram reunidas e concentradas em ultrafiltros CX-10.

A totalidade do veneno de cobra-capelo reunido foi bombeada para uma coluna com 90cm x 26mm (diâmetro interno) de Sephadex G200 (fino) (Pharmacia GB Limited, London), equilibrada com PBS (não azeto) e eluída com PBS a 36 ml por hora. Fracções de 6 ml foram recolhidas e ensaiadas quanto à actividade anti-complementaridade. As fracções do factor veneno de cobra-capelo (isto é as fracções activas) foram reunidas, especialmente no elemento descendente do pico, concentradas em ultrafiltros CX-10, divididas em porções alíquotas e armazenadas com congelação a -20°C prontas para utilização.

A anti-complementaridade do factor veneno de cobra-capelo referida anteriormente pode ser medida pelo método que se segue. Fracções de 20 μ l foram incubadas com 20 μ l de soro humano fresco durante 20 minutos a 37°C. Quantidades de 5 μ l foram então adicionadas a recipientes numa placa de teste, constituídas por:

5,0 ml de agarose aquosa a 2%;
4,5 ml de PBS de energia dupla incluindo EDTA 20mM;
0,5 ml de eritrocitos de cobaia lavados a 10%; e
0,5 ml de soro humano normal fresco.

A placa foi então incubada durante a noite a +4°C. Resultados positivos são indicados por zonas transparentes de lise após incubação.

Exemplo 1 (Exemplo de Comparação)

Neste exemplo, os ratos são ratos DA de Banting and Kingdom, e os cricetos são cricetos Sírios, também de Banting and Kingdom. Seguindo o método de Heron (Acta Pathol. Microbiol. Scand. 79 366-372 (1971)), corações de criceto foram enxertados nos pescoços de ratos. A aorta foi reunida à artéria carótida usando a técnica de canhão descrita por Heron. De um modo semelhante, a artéria pulmonar foi reunida à veia jugular. Todos os outros vasos cardíacos foram laqueados. Os corações começaram a bater no espaço de alguns minutos após a remoção dos grampos. A pele foi então fechada sobre o coração implantado, o qual foi monitorizado diariamente por palpação externa.

Os dados de sobrevivência do enxerto cardíaco são indicados na Figura 1 e são representados pela linha 1. Pode verificar-se que a taxa de sobrevivência média dos enxertos foi de 3 dias.

Exemplo 2 (Exemplo de Comparação)

O processo do Exemplo 1 foi repetido, exceptuando o facto de se administrar ciclosporina A numa dose de 20 mg/kg em dias alternados. A ciclosporina A foi administrada sob a forma de uma preparação de 20 mg/ml em azeite e injectada intramuscularmente, sendo a primeira dose administrada na altura da transplantação. As injeções foram em seguida feitas em dias alternados. Os dados da sobrevivência do enxerto são de novo indicados na Figura 1: linha 2 apresentando os resultados deste exemplo. A taxa de sobrevivência média é de 3 dias.

Exemplo 3 (Exemplo de Comparação)

O processo do Exemplo 1 foi repetido, exceptuando o facto do factor veneno de cobra-capelo ser administrado numa dose de 0,4 mg/kg em dias alternados. O factor veneno de cobra-capelo foi administrado sob a forma de uma solução 0,5 mg/ml em PBS sem azeto. A primeira injeção foi realizada intramuscularmente na altura da transplantação, e injeções intramusculares subsequentes foram feitas em seguida em dias alternados. Os dados de rejeição do enxerto são de novo apresentados na Figura 1. Os resultados são indicados na linha 3, o que mostra que a taxa de sobrevivência média para os enxertos é de 6 dias.

Exemplo 4

O processo do Exemplo 1 foi repetido, exceptuando o facto de tanto a ciclosporina A como o factor veneno de cobra-capelo serem administrados ao recipiente. A cefalosporina A foi administrada numa dose de 20 mg/kg em dias alternados, de tal

modo que as condições para a administração da ciclosporina foram iguais às do Exemplo 2. O factor veneno de cobra-capelo foi administrado nas mesmas condições que foram descritas no Exemplo 3. Tanto a ciclosporina A como o factor veneno de cobra-capelo foram administrados pela primeira vez na altura da transplantação. Os dados de sobrevivência do enxerto são de novo indicados na figura. Neste exemplo, não se observa qualquer rejeição, como se pode concluir da linha 4 da Figura 1. Presentemente, a sobrevivência média do enxerto ultrapassa os 50 dias.

Exemplo 5

O processo do Exemplo 4 foi repetido, exceptuando o facto da administração do factor veneno de cobra-capelo ser interrompida 28 dias após o transplante. A sobrevivência média do transplante foi superior a 100 dias. Foram sacrificados dois animais aos 103 e aos 105 dias e o exame histológico do enxerto indicou uma arquitetura cardíaca normal. Um rato restante sobreviveu com um coração de criceto pulsátil durante mais de 5 meses até agora.

Exemplo 6 (Exemplo de Comparação)

Foram dados corações de criceto a 20 ratos pelo protocolo descrito no Exemplo 1. Os ratos foram tratados com ciclosporina A tal como foi descrito no Exemplo 2, e além disso foi-lhes administrada ciclofosfamida ENDOXAM i.p. (20 mg/kg) um dia antes da transplantação (dia-1) e no dia 2 após a transplantação. (A palavra ENDOXAM é um nome comercial para a ciclofosfamida, que é um inibidor da produção de anticorpos). Os corações de criceto foram rejeitados tal como é indicado na linha 5 da Figura 2. A

rejeição retardada observada, em que o atraso foi resultado da curta terapêutica com ciclofosfamida, simula uma rejeição retardada do xenoenxerto do tipo que resultaria de protocolos imunossuppressores inadequados.

Exemplo 7

Cinco ratos foram tratados tal como no Exemplo 6, mas foram adicionalmente tratados com factor veneno de cobra-capelo tal como no Exemplo 4 a partir do dia 7. O tratamento com factor veneno de cobra-capelo durou 14 dias. A rejeição foi evitada em todos os animais, como se pode concluir da linha 6 da Figura 2.

REIVINDICAÇÕES

1a. - Processo para a preparação de uma formulação farmacêutica, caracterizado por se incluir um inibidor do complemento, de preferência numa concentração compreendida entre 0.05 até 5 mg/ml, e um imunossupressor com uma actividade semelhante à da ciclosporina A, de preferência numa concentração compreendida entre 1 até 100 mg/ml.

2a. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o inibidor do complemento inibir as vias tanto clássica como alternativa da activação do complemento.

3a. - Processo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado por o inibidor do complemento compreender MCP, DAF ou um anticorpo contra C3.

4a. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o inibidor do complemento compreender uma molécula que forma um complexo estável com o factor Bb, em que o complexo é resistente aos mecanismos normais de desintegração.

5a. - Processo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado por o inibidor do complemento compreender o factor de veneno de cobra-capelo.

6a. - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado por o imunossupressor com uma actividade semelhante à da ciclosporina A ser uma ciclosporina ou um eicosanoide.

7a. - Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por o imunossupressor ser a ciclosporina A.

8a. - Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por o imunossupressor ser FK 506.

9a. - Processo para a preparação de um produto caracterizado por se incorporar no referido produto um inibidor do complemento e um imunossupressor com uma actividade semelhante à da ciclosporina A para utilização como uma preparação combinada para utilização simultânea, separada ou sequencial na promoção da sobrevivência ou para evitar a rejeição de um aloenxerto ou xenoenxerto concordante.

10a. - Estojo ("Kit"), caracterizado por compreender uma preparação farmacêutica de um inibidor do complemento e uma preparação farmacêutica de um imunossupressor com uma actividade semelhante à da ciclosporina A.

11a. - Método para a promoção da sobrevivência de um aloenxerto ou xenoenxerto concordante num hospedeiro, ou para evitar a rejeição desse enxerto, caracterizado por compreender a administração a um receptor de um enxerto ou a um receptor que vai ser submetido a enxerto, de um inibidor do complemento, de preferência numa gama de dosagem de 0,01 a 2 mg por quilograma de peso corporal por dia, e de um imunossupressor com uma actividade semelhante à da ciclosporina A, de preferência numa gama de dosagem de 1 a 20 mg por quilograma de peso corporal por dia.

12a. - Método para a promoção da sobrevivência num hospedeiro de um aloenxerto ou de um xenoenxerto concordante, ou para evitar a rejeição desse enxerto, caracterizado por compreender a administração de um inibidor do complemento, de preferência

numa gama de dosagem de 0,01 a 2 mg por quilograma de peso corporal por dia, a um receptor de um enxerto ou a um receptor que vai ser submetido a enxerto, que tenha sido tratado com um imunossupressor com uma actividade semelhante à da ciclosporina A.

Lisboa, 8 de Abril de 1991



J. PEREIRA DA CRUZ

Agente Oficial da Propriedade Industrial
RUA VICTOR CORDON, 10-A 3.º
1200 LISBOA

FIG. 1

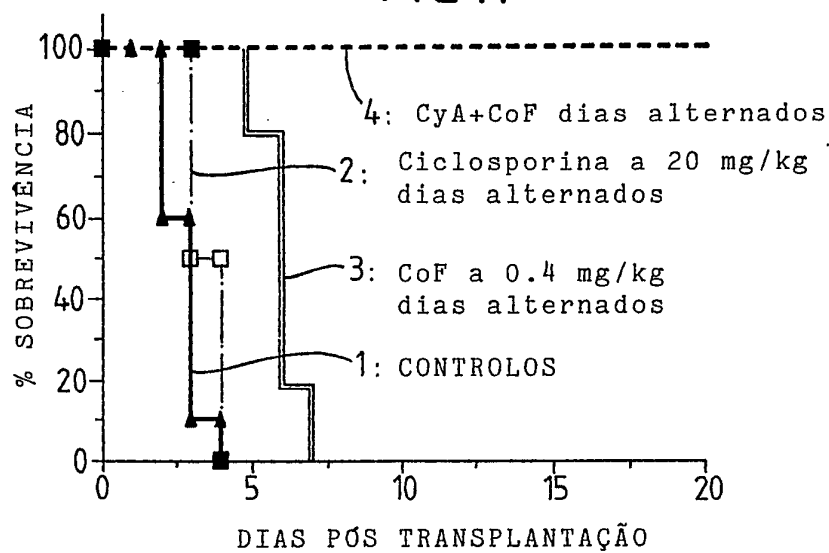


FIG. 2

