



(51) МПК

A61K 39/395 (2006.01)*A61K 38/13* (2006.01)*A61K 31/573* (2006.01)*A61P 37/06* (2006.01)

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ(21)(22) Заявка: **2008139118/15**, **02.03.2007**(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
02.03.2007

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
02.03.2006 US 60/778,859(43) Дата публикации заявки: **10.04.2010** Бюл. № 10(45) Опубликовано: **27.03.2012** Бюл. № 9

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **WO 2005/110481**, **24.11.2005**. **RU 2169009 C2**, **20.01.1999**. **RU 2174405 C2**, **10.10.2001**. **MIN WP et al. Synergistic tolerance induced by LF 15-0195 and anti-CD45RB monoclonal antibody through suppressive dendritic cells// Transplantation. 2003 Apr 27; 75(8):1160-5. реферат, онлайн [Найдено в Интернет на www.pubmed.com 24.12.2010], PMID: 12717196 [PubMed - (см. прод.)**

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: **02.10.2008**(86) Заявка РСТ:
US 2007/005290 (02.03.2007)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2007/103134 (13.09.2007)

Адрес для переписки:

**129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.пов. А.В.Мишу, рег.№ 364**

(72) Автор(ы):

**РОТЕР Расселл П. (US),
ВАН Хао (CA),
ЧЖУН Чжень (CA)**

(73) Патентообладатель(и):

**АЛЕКСИОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US)**

(54) ПРОДЛЕНИЕ СРОКА ВЫЖИВАЕМОСТИ АЛЛОТРАНСПЛАНТАТА ПУТЕМ ИНГИБИРОВАНИЯ АКТИВНОСТИ КОМПЛЕМЕНТА

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к медицине, а именно к трансплантологии, и может быть использована для продления срока выживаемости аллотрансплантированных клеток, тканей и органов. Способ по изобретению включает введение

лекарственного средства, которое ингибирует активность комплемента, ингибитора IL-2 и LF 15-0195. Также группа изобретений касается применения лекарственного средства, которое ингибирует активность комплемента, ингибитора IL-2 и LF 15-0195 для производства лекарственного средства и фармацевтического

набора. Использование изобретений позволяет
продлить срок выживаемости

аллотрансплантата на 100 и более дней. 3 н.
и 58 з.п. ф-лы, 7 табл., 14 ил., 6 пр.

(56) (продолжение):

indexed for MEDLINE]. ZHOU D et al. LF 15-0195, a novel immunosuppressive agent prevents rejection and induces operational tolerance in a mouse cardiac allograft model // Transplantation. 2003 Aug 27; 76(4):644-50 реферат, онлайн [Найдено в Интернет на www.pubmed.com 24.12.2010], PMID: 12973102 [PubMed - indexed for MEDLINE].

R U 2 4 4 5 9 7 5 C 2

R U 2 4 4 5 9 7 5 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)**A61K 38/13** (2006.01)**A61K 31/573** (2006.01)**A61P 37/06** (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2008139118/15, 02.03.2007**(24) Effective date for property rights:
02.03.2007

Priority:

(30) Priority:
02.03.2006 US 60/778,859(43) Application published: **10.04.2010 Bull. 10**(45) Date of publication: **27.03.2012 Bull. 9**(85) Commencement of national phase: **02.10.2008**(86) PCT application:
US 2007/005290 (02.03.2007)(87) PCT publication:
WO 2007/103134 (13.09.2007)

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B.Spaskaja, 25, str.3, OOO
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",
pat.pov. A.V.Mitsu, reg.№ 364**

(72) Inventor(s):

ROTER Russell P. (US),**VAN Khao (CA),****ChZhUN Chzhen' (CA)**

(73) Proprietor(s):

ALEKSION FARMAS'JuTIKALZ, INK. (US)**(54) PROLONGATION OF ALLOGRAFT SURVIVAL BY COMPLEMENT ACTIVITY INHIBITION**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: group of inventions refers to medicine, namely to transplantology, and can be used for prolongation of allotransplantated cell, tissue and organ survival. A method under the invention refers to introducing a drug preparation which inhibits a complement, IL-2 and LF15-0195 inhibitor

activity. Also, the group of inventions refers to applying the drug preparation which inhibits the complement, IL-2 and LF15-0195 inhibitor activity for producing the drug preparation and the pharmaceutical kit.

EFFECT: use of the inventions prolongs the allograft survival by 100 and more days.

61 cl, 7 tbl, 14 dwg, 6 ex

РОДСТВЕННАЯ ЗАЯВКА

Данная заявка претендует на приоритет по предварительной патентной заявке США номер 60/778859, поданной 2 марта 2006 года, полное описание которой включено в настоящий документ в качестве ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее описание относится к способам продления срока выживаемости аллотрансплантата у млекопитающего. В частности, настоящее описание относится к пролонгированию выживаемости аллотрансплантата путем введения ингибитора комплемента или образования терминальных компонентов комплемента, в частности ингибитора расщепления компонента C5 комплемента, в дополнение к одному или нескольким лекарственным средствам или способам, которые вызывают иммуносупрессию.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Трансплантация органов является предпочтительным способом лечения большинства пациентов с хронической недостаточностью органов. Несмотря на то, что трансплантация почки, печени, легкого и сердца обеспечивает превосходную возможность реабилитации, поскольку реципиенты возвращаются к более нормальному образу жизни, она ограничена медицинской/хирургической пригодностью потенциальных реципиентов, возрастающей нехваткой доноров, и преждевременно возникающей недостаточностью функции трансплантированного органа.

Трансплантация клеток, тканей и органов стала очень распространенной и часто спасающей жизнь процедурой. Трансплантация органов представляет собой предпочтительный способ лечения большинства пациентов с хронической недостаточностью органов. Несмотря на значительное улучшение способов лечения в целях ингибирования отторжения, отторжение продолжает оставаться общим наиболее значительным препятствием для успешной трансплантации органов. Отторжение включает в себя не только острое отторжение, но также и хроническое отторжение. Показатели выживаемости в течение одного года для трансплантированных почек составляют в среднем 88,3% в случае почек от погибших доноров и 94,4% в случае почек, полученных от живых доноров. Соответствующие показатели выживаемости в течение пяти лет для трансплантированных почек составляют 63,3% и 76,5% (OPTN/SRTR Annual Report, 2002). Для печени показатели выживаемости в течение одного года составляют 80,2% и 76,5% в случае печени от погибших и живых доноров, соответственно. Соответствующие показатели выживаемости трансплантата печени в течение пяти лет составляют 63,5% и 73,0% (OPTN/SRTR Annual Report, 2002). Применение иммуносупрессивных лекарственных средств, особенно циклоспорина А и, позднее, такролимуса, значительно улучшило показатели успеха трансплантации органов, особенно посредством предотвращения острого отторжения. Однако приведенные выше цифры показывают, что все еще существует необходимость в повышении успешности как кратковременных, так и, в частности, долговременных показателей. Как видно из приведенных выше цифр для трансплантатов почки и печени, показатели отторжения в течение пяти лет для этих трансплантированных органов составляют порядка 25-35%. Только в 2001 году более 23000 пациентов получили трансплантаты органов, среди которых приблизительно 19000 представляли собой почку и печень (OPTN/SRTR Annual Report, 2002). Только среди трансплантатов за этот год, с учетом настоящих технологий, можно ожидать, что в течение 5 лет произойдет отторжение приблизительно 5000-6000

из этих трансплантированных почек и печеней. Эти цифры даже не включают в себя другие трансплантированные ткани или клетки, такие как костный мозг.

Существуют различные типы трансплантатов. Они описаны у Abbas et al., 2000.

Трансплантат, пересаженный от одного индивида тому же индивиду, называют аутологичным трансплантатом, или аутотрансплантатом. Трансплантат, пересаженный между двумя генетически идентичными или сингенными индивидами, называют сингенным трансплантатом. Трансплантат, пересаженный между двумя генетически отличающимися индивидами одного вида, называют аллогенным трансплантатом, или аллотрансплантатом. Трансплантат, пересаженный между различными видами, называют ксеногенным трансплантатом, или ксенотрансплантатом. Молекулы, которые распознаются в качестве чужеродных на аллотрансплантатах, называют аллоантигенами, и эти же молекулы на ксенотрансплантатах называют ксеноантигенами. Лимфоциты или антитела, которые реагируют с аллоантигенами или ксеноантигенами, описаны в качестве аллореактивных или ксенореактивных, соответственно.

В настоящее время каждый год в США проводят более 40000 трансплантаций почки, сердца, легкого, печени и поджелудочной железы (Abbas et al., 2000). Другие возможные трансплантаты включают, но не ограничиваются ими, сосудистую ткань, глаз, роговицу, хрусталик, кожу, костный мозг, мышцу, соединительную ткань, желудочно-кишечную ткань, нервную ткань, кость, стволовые клетки, островковые клетки, хрящ, гепатоциты и кроветворные клетки. К сожалению, кандидатов на трансплантацию существует значительно больше, чем доноров. Для преодоления этой нехватки большие усилия прилагают для изучения того, как применять ксенотрансплантаты. Несмотря на то, что в данной области был достигнут прогресс, фактом является то, что в настоящее время большинство трансплантатов представляют собой аллотрансплантаты. Аллогенный трансплантат, несмотря на то, что в настоящее время вероятность его успеха является более высокой, чем у ксеногенного трансплантата, для его успеха должен преодолеть множество препятствий. Существует несколько типов иммуногенных атак, осуществляемых реципиентом против донорского органа, которые могут привести к отторжению аллотрансплантата. Они включают сверхострое отторжение, острое сосудистое отторжение (включая ускоренное гуморальное отторжение и острое гуморальное отторжение *de novo*), и хроническое отторжение. В норме отторжение является результатом опосредуемой Т-клетками или гуморальной антительной атаки, однако оно может включать дополнительные вторичные факторы, такие как эффекты комплемента и цитокинов.

Постоянно растущее расхождение между количеством пациентов, которым требуется трансплантация органов, и количеством доступных донорских органов стала основной проблемой в мире. Park et al., 2003. Индивидов, у которых образовались антитела против HLA, называют иммунизированными или сенсibilизированными. Gloag, 2005. HLA-сенсibilизация является основной преградой для оптимального применения органов от живых доноров для трансплантации в клинике (Warren et al., 2004), вследствие развития тяжелого опосредуемого антителами отторжения (ABMR). Например, более 50% от всех индивидов, ожидающих трансплантации почки, представляют собой пресенсibilизированных пациентов (Glotz et al., 2002), которые обладают повышенными уровнями аллоантител с широкой реактивностью, вследствие многократных трансфузий, предшествующего отторжения аллотрансплантатов или

беременности (Kupiec-Weglinski, 1996). Роль ABMR в настоящее время является наиболее динамичной областью исследования при трансплантации, вследствие понимания того, что этот тип отторжения может привести либо к острой, либо к хронической утрате функции аллотрансплантата. Mehra et al., 2003. Было описано множество случаев ABMR, включая сверхострое отторжение (HAR) или ускоренное гуморальное отторжение (ACHR), которые характеризуются острым повреждением аллотрансплантата, которое является устойчивым к сильнодействующей терапии, направленной против Т-клеток, выявлением циркулирующих донор-специфичных антител, и накоплением компонентов комплемента в трансплантате. ABMR с повышенным уровнем циркулирующих аллоантител и активацией комплемента, которое происходит в 20-30% случаев острого отторжения обладает более неблагоприятным прогнозом, чем клеточное отторжение. Mauiyyedi et al., 2002.

Высокопресенсибилизированные пациенты, которые обладают высокими уровнями аллоантител, обычно страдают быстрым и агрессивным HAR. В клинической практике, прилагая большие усилия и со значительным усовершенствованием технологии, HAR избегают проведением лимфоцитотоксической пробы на совместимость перед трансплантацией в целях идентификации сенсibilизированных пациентов с антителами, специфичными в отношении донорских HLA-антигенов. Однако циркулирующие антитела против донорских HLA или других, не относящихся к МНС, эндотелиальных антигенов также могут быть ответственны за замедленную форму острого гуморального отторжения, которая ассоциирована с повышенной частотой отторжения трансплантатов. Collins et al., 1999. Таким образом, разработка новой модели пресенсибилизированных животных для имитации ABMR в клинических условиях может быть целесообразной для исследований механизма, и для высоко необходимого прогресса в лечении аллоотторжения трансплантата у пресенсибилизированных хозяев.

Некоторым высокопресенсибилизированным пациентам могут быть полезны программы с вмешательством, такие как иммуносорбция (Palmer et al., 1989; Ross et al., 1993; Krija et al., 1995), плазмаферез и внутривенный иммуноглобулин (Sonnenday et al., 2002; Rocha et al., 2003), которые были разработаны и внедрены для временного устранения антидонорских антител. Однако в дополнение к пользе, упомянутые выше способы терапии обладают рядом недостатков, поскольку некоторые индивиды менее чувствительны к их эффектам (Krija et al., 1995; Hakim et al., 1990; Glotz et al., 1993; Tuan et al., 1994); они являются очень дорогостоящими, длительными и опасными (Salama et al., 2001). Более того, временный и переменный эффект этих протоколов ограничил их эффект. Glotz et al., 2002; Kupin et al., 1991; Schweitzer et al., 2000. Таким образом, разработка новых стратегий для снижения риска и стоимости профилактики ABMR может быть полезной для пресенсибилизированных реципиентов, получивших аллотрансплантат.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Таким образом, предусмотрены способы продления срока выживаемости трансплантированных клеток, тканей или органов. В частности, предусмотрены способы продления срока выживаемости аллотрансплантированных клеток, тканей или органов. Эти способы относятся к применению одного или нескольких иммуносупрессантов и/или иммуносупрессивных способов в дополнение к ингибитору активности комплемента. Также предусмотрено применение одного или нескольких иммуносупрессантов и ингибитора активности комплемента для изготовления одного или нескольких лекарственных средств или упаковок с лекарственными средствами.

Такие лекарственные средства или упаковки с лекарственными средствами пригодны для продления срока выживаемости аллотрансплантата у субъекта-млекопитающего.

Примерами аллотрансплантатов являются аллотрансплантированные клетки, ткани или органы, и они включают, но не ограничиваются ими, сосудистую ткань, 5 глаз, роговицу, хрусталик, кожу, костный мозг, мышцу, соединительную ткань, желудочно-кишечную ткань, нервную ткань, кость, стволовые клетки, островковые клетки, хрящ, гепатоциты, кроветворные клетки, сердце, печень, легкое, почку и поджелудочную железу. В некоторых аспектах, это описание относится к способу 10 продления срока выживания аллотрансплантата почки у млекопитающего-реципиента, при этом указанный способ предусматривает в отношении указанного млекопитающего а) введение лекарственного средства, которое ингибирует активность комплемента, и б) проведение по меньшей мере одной 15 иммуносупрессивной терапии, где указанная терапия выбрана из i) по меньшей мере одного иммуносупрессивного лекарственного средства или ii) иммуномодулирующего лечения.

В определенных вариантах осуществления, указанным млекопитающим является человек. В определенных вариантах осуществления, указанный аллотрансплантат 20 является не соответствующим по МНС. В определенных вариантах осуществления, указанный не соответствующий по МНС аллотрансплантат представляет собой не соответствующий по HLA аллотрансплантат. В определенных вариантах осуществления, указанный реципиент не соответствует указанному аллотрансплантату по АВО. В определенных вариантах осуществления, указанное 25 лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, вводят в хроническом режиме.

В определенных вариантах осуществления, указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, ингибирует образование C5b или C5a. В 30 определенных вариантах осуществления, указанное лекарственное средство, которое ингибирует образование C5b или C5a, представляет собой целое антитело или фрагмент антитела. В определенных вариантах осуществления, указанное целое антитело или фрагмент антитела представляет собой человеческое, гуманизированное, химеризованное или деиммунизированное антитело или фрагмент антитела. В 35 определенных вариантах осуществления, указанные целое антитело или фрагмент антитела ингибируют расщепление компонента C5 комплемента. В определенных вариантах осуществления, указанный фрагмент антитела выбран из группы, состоящей из Fab, F(ab')₂, Fv, доменного антитела и одноцепочечного антитела. В 40 определенных вариантах осуществления, указанный фрагмент антитела представляет собой пекселизумаб. В определенных вариантах осуществления, указанное целое антитело представляет собой экулизумаб. В определенных вариантах осуществления, указанный экулизумаб вводят в хроническом режиме. В определенных вариантах осуществления, указанный экулизумаб вводят раз в 2 недели.

В определенных вариантах осуществления, указанный ингибитор активности комплемента выбран из группы, состоящей из i) растворимого рецептора компонента комплемента, ii) CD59, iii) CD55, iv) CD46 и v) антитела против C5, C6, C7, C8 или C9.

В определенных вариантах осуществления, указанное иммуносупрессивное 50 лекарственное средство ингибирует Т-клеточную активность или В-клеточную активность. В определенных вариантах осуществления, указанное иммуносупрессивное лекарственное средство ингибирует Т-клеточную активность и В-клеточную активность. В определенных вариантах осуществления, указанное

иммуносупрессивное лекарственное средство выбрано из группы, состоящей из циклоспорина А, такролимуса, сиролимуса, ОКТ3, кортикостероида, даклизумаба, базиликсимаба, азатиоприна, микофенолата мофетила, метотрексата, б-меркаптопурина, антитела против Т-клеток, циклофосфамида, лефлунамида, бреквинара, АТГ, АЛГ, 15-дезоксиспергуалина, LF15-0195, CTLA-4-Ig (белатацепта), ритуксана и брeдинина. В определенных вариантах осуществления, вводят более одного иммуносупрессивного лекарственного средства. В определенных вариантах осуществления, указанный способ включает в себя введение i) лекарственного средства, которое ингибирует активность комплемента, и ii) циклоспорина А. В определенных вариантах осуществления, указанный способ включает в себя введение i) лекарственного средства, которое ингибирует активность комплемента, и ii) LF15-0195. В определенных вариантах осуществления, указанный способ включает в себя введение i) лекарственного средства, которое ингибирует активность комплемента, ii) циклоспорина А и iii) LF15-0195. В определенных вариантах осуществления, указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, представляет собой антитело, которое ингибирует расщепление компонента С5 комплемента. В определенных вариантах осуществления, в сочетании с ингибитором активности комплемента применяют способ иммуномодулирующей терапии, например, плазмаферез, спленэктомия или иммуносорбцию.

В определенных вариантах осуществления, указанный аллотрансплантат выживает в течение периода времени, по меньшей мере на 20% более длительного, чем в случае проведения способа без указанного лекарственного средства, которое ингибирует активность комплемента. В определенных вариантах осуществления, указанный аллотрансплантат выживает в течение периода времени, по меньшей мере на 40% более длительного, чем в случае проведения способа без указанного лекарственного средства, которое ингибирует активность комплемента. В определенных вариантах осуществления, указанный аллотрансплантат выживает в течение оставшегося периода жизни указанного млекопитающего. В определенных вариантах осуществления, указанный аллотрансплантат выживает по меньшей мере в течение трех месяцев. В некоторых вариантах осуществления, указанный аллотрансплантат выживает по меньшей мере в течение шести месяцев. В определенных вариантах осуществления, указанный аллотрансплантат выживает по меньшей мере в течение одного года. В определенных вариантах осуществления, указанный аллотрансплантат выживает по меньшей мере в течение пяти лет. В определенных вариантах осуществления, указанный аллотрансплантат выживает в течение оставшегося периода жизни указанного человека.

В определенных вариантах осуществления, указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, вводят в хроническом режиме по меньшей мере в течение 14 суток. В определенных вариантах осуществления, указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, вводят в хроническом режиме по меньшей мере в течение 28 суток. В определенных вариантах осуществления, указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, вводят в хроническом режиме по меньшей мере в течение 3 месяцев. В определенных вариантах осуществления, указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, вводят в хроническом режиме по меньшей мере в течение 6 месяцев. В определенных вариантах осуществления, указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, вводят в хроническом режиме по меньшей мере в течение 1 года. В определенных

вариантах осуществления, указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, вводят в хроническом режиме по меньшей мере в течение 5 лет. В определенных вариантах осуществления, указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, вводят в хроническом режиме в течение оставшегося периода жизни указанного млекопитающего.

В определенных вариантах осуществления, по меньшей мере одно иммуносупрессивное лекарственное средство вводят в хроническом режиме в течение оставшегося периода жизни указанного млекопитающего. В определенных вариантах осуществления, по меньшей мере циклоспорин А вводят в хроническом режиме в течение оставшегося периода жизни указанного млекопитающего. В определенных вариантах осуществления, по меньшей мере LF15-0195 вводят в хроническом режиме в течение оставшегося периода жизни указанного млекопитающего.

В некоторых аспектах, описание относится к способу продления срока выживаемости аллотрансплантата почки у млекопитающего-реципиента, предусматривающему в отношении указанного млекопитающего а) введение лекарственного средства, которое ингибирует активность комплемента, и б) проведение по меньшей мере одной иммуносупрессивной терапии, где указанная терапия выбрана из i) по меньшей мере одного иммуносупрессивного лекарственного средства, или ii) иммуномодулирующего лечения, где указанное млекопитающее является пресенсибилизированным к указанному аллотрансплантату.

В определенных вариантах осуществления, указанным млекопитающим является человек. В определенных вариантах осуществления, указанный аллотрансплантат является не соответствующим по МНС. В определенных вариантах осуществления, указанный не соответствующий по МНС аллотрансплантат представляет собой не соответствующий по HLA аллотрансплантат. В определенных вариантах осуществления, указанный реципиент не соответствует указанному аллотрансплантату по ABO. В определенных вариантах осуществления, указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, вводят в хроническом режиме.

В определенных вариантах осуществления, указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, ингибирует образование C5b или C5a. В определенных вариантах осуществления, указанное лекарственное средство, которое ингибирует образование C5b или C5a, представляет собой целое антитело или фрагмент антитела. В определенных вариантах осуществления, указанное целое антитело или фрагмент антитела представляет собой человеческое, гуманизированное, химеризованное или деиммунизированное антитело или фрагмент антитела. В определенных вариантах осуществления, указанные целое антитело или фрагмент антитела ингибируют расщепление компонента C5 комплемента. В определенных вариантах осуществления, указанный фрагмент антитела выбран из группы, состоящей из Fab, F(ab')₂, Fv, доменного антитела, и одноцепочечного антитела. В определенных вариантах осуществления, указанный фрагмент антитела представляет собой пекселизумаб. В определенных вариантах осуществления, указанное целое антитело представляет собой экулизумаб. В определенных вариантах осуществления, указанный экулизумаб вводят в хроническом режиме. В определенных вариантах осуществления, указанный экулизумаб вводят раз в 2 недели.

В определенных вариантах осуществления, указанный ингибитор активности комплемента выбран из группы, состоящей из i) растворимого рецептора компонента комплемента, ii) CD59, iii) CD55, iv) CD46 и v) антитела против C5, C6, C7, C8 или C9.

В определенных вариантах осуществления, указанное иммуносупрессивное лекарственное средство ингибирует Т-клеточную активность или В-клеточную активность. В определенных вариантах осуществления, указанное иммуносупрессивное лекарственное средство ингибирует Т-клеточную активность и В-клеточную активность. В определенных вариантах осуществления, указанное иммуносупрессивное лекарственное средство выбрано из группы, состоящей из циклоспорина А, такролимуса, сиролимуса, ОКТЗ, кортикостероида, даклизумаба, базиликсимаба, азатиоприна, микофенолата мофетила, метотрексата, 6-меркаптопурина, антитела против Т-клеток, циклофосфамида, лефлунамида, бреквинара, АТG, АLГ, 15-дезоксиспергуалина, LF15-0195, СTLA-4-Ig (белатацепта), ритуксана и брединина. В определенных вариантах осуществления, вводят более одного иммуносупрессивного лекарственного средства. В определенных вариантах осуществления, указанный способ включает введение i) лекарственного средства, которое ингибирует активность комплемента, и ii) циклоспорина А. В определенных вариантах осуществления, указанный способ включает введение i) лекарственного средства, которое ингибирует активность комплемента, и ii) LF15-0195. В определенных вариантах осуществления, указанный способ включает введение i) лекарственного средства, которое ингибирует активность комплемента, ii) циклоспорина А и iii) LF15-0195. В определенных вариантах осуществления, указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, представляет собой антитело, которое ингибирует расщепление компонента С5 комплемента. В определенных вариантах осуществления, в сочетании с ингибитором активности комплемента применяют способ иммуномодулирующей терапии, например, плазмаферез, спленэктомия или иммуносорбцию.

В определенных вариантах осуществления, в которых млекопитающее является пресенсибилизированным к аллотрансплантату, указанный аллотрансплантат выживает в течение периода времени, по меньшей мере на 20% более длительного, чем в случае проведения способа без указанного лекарственного средства, которое ингибирует активность комплемента. В определенных вариантах осуществления, указанный аллотрансплантат выживает в течение периода времени, по меньшей мере на 40% более длительного, чем в случае проведения способа без указанного лекарственного средства, которое ингибирует активность комплемента. В определенных вариантах осуществления, указанный аллотрансплантат выживает в течение оставшегося периода жизни указанного млекопитающего. В определенных вариантах осуществления, указанный аллотрансплантат выживает по меньшей мере в течение трех месяцев. В определенных вариантах осуществления, указанный аллотрансплантат выживает по меньшей мере в течение шести месяцев. В определенных вариантах осуществления, указанный аллотрансплантат выживает по меньшей мере в течение одного года. В определенных вариантах осуществления, указанный аллотрансплантат выживает по меньшей мере в течение пяти лет. В определенных вариантах осуществления, указанный аллотрансплантат выживает в течение оставшегося периода жизни указанного человека. В определенных вариантах осуществления, в которых млекопитающее является пресенсибилизированным к аллотрансплантату, указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, вводят в хроническом режиме по меньшей мере в течение 14 суток. В определенных вариантах осуществления, указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, вводят в хроническом режиме по меньшей мере в течение 28 суток. В определенных вариантах осуществления,

указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, вводят в хроническом режиме по меньшей мере в течение 3 месяцев. В определенных вариантах осуществления, указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, вводят в хроническом режиме по меньшей мере в течение 6
 5 месяцев. В определенных вариантах осуществления, указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, вводят в хроническом режиме по меньшей мере в течение 1 года. В определенных вариантах осуществления, указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента,
 10 вводят в хроническом режиме по меньшей мере в течение 5 лет. В определенных вариантах осуществления, указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, вводят в хроническом режиме в течение оставшегося периода жизни указанного млекопитающего.

В определенных вариантах осуществления, в которых млекопитающее является пресенсибилизированным к аллотрансплантату, по меньшей мере одно
 15 иммуносупрессивное лекарственное средство вводят в хроническом режиме в течение оставшегося периода жизни указанного млекопитающего. В определенных вариантах осуществления, по меньшей мере циклоспорин А вводят в хроническом режиме в
 20 течение оставшегося периода жизни указанного млекопитающего. В определенных вариантах осуществления, по меньшей мере LF15-0195 вводят в хроническом режиме в течение оставшегося периода жизни указанного млекопитающего.

В некоторых аспектах, это описание относится к применению лекарственного средства, которое ингибирует активность комплемента, и иммуносупрессивного
 25 лекарственного средства для производства лекарственного средства или упаковки с лекарственным средством для продления срока выживаемости аллотрансплантата почки у млекопитающего. В определенных вариантах осуществления, в указанное лекарственное средство или в упаковку с лекарственным средством включено более
 30 одного иммуносупрессивного лекарственного средства. В определенных вариантах осуществления, указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, и указанное иммуносупрессивное лекарственное средство входит в состав композиции, пригодной для одновременного введения указанному
 35 млекопитающему. В определенных вариантах осуществления, указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, и указанное иммуносупрессивное лекарственное средство входит в состав композиции или композиций, пригодных для последовательного введения указанному
 40 млекопитающему. В определенных вариантах осуществления, указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, входит в состав композиции, пригодной для введения указанному млекопитающему в хроническом режиме. В определенных вариантах осуществления, указанное
 45 иммуносупрессивное лекарственное средство входит в состав композиции, пригодной для введения указанному млекопитающему в хроническом режиме.

В некоторых аспектах, описание относится к способу продления срока выживаемости аллотрансплантата у млекопитающего-реципиента, предусматривающему в отношении указанного млекопитающего а) введение
 50 лекарственного средства, которое ингибирует активность комплемента, и б) проведение по меньшей мере одной иммуносупрессивной терапии, где указанная терапия выбрана из i) по меньшей мере одного иммуносупрессивного лекарственного средства, содержащего LF15-0195, или ii) иммуномодулирующего лечения.

В определенных вариантах осуществления, указанным млекопитающим является

человек. В определенных вариантах осуществления, указанный аллотрансплантат является не соответствующим по МНС. В определенных вариантах осуществления, указанный не соответствующий по МНС аллотрансплантат представляет собой не соответствующий по HLA аллотрансплантат. В определенных вариантах

5 осуществления, указанный реципиент не соответствует указанному аллотрансплантату по АВО. В определенных вариантах осуществления, указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, вводят в хроническом режиме.

10 В определенных вариантах осуществления, указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, ингибирует образование C5b или C5a. В определенных вариантах осуществления, указанное лекарственное средство, которое ингибирует образование C5b или C5a, представляет собой целое антитело или

15 фрагмент антитела. В определенных вариантах осуществления, указанное целое антитело или фрагмент антитела представляет собой человеческое, гуманизированное, химеризованное или деиммунизированное антитело или фрагмент антитела. В определенных вариантах осуществления, указанное целое антитело или фрагмент антитела ингибируют расщепление компонента C5 комплемента. В определенных

20 вариантах осуществления, указанный фрагмент антитела выбран из группы, состоящей из Fab, F(ab')₂, Fv, доменного антитела, и одноцепочечного антитела. В определенных вариантах осуществления, указанный фрагмент антитела представляет собой пекселизумаб. В определенных вариантах осуществления, указанное целое антитело представляет собой экулизумаб. В определенных вариантах осуществления,

25 указанный экулизумаб вводят в хроническом режиме. В определенных вариантах осуществления, указанный экулизумаб вводят раз в 2 недели.

В определенных вариантах осуществления, указанный ингибитор активности комплемента выбран из группы, состоящей из i) растворимого рецептора компонента комплемента, ii) CD59, iii) CD55, iv) CD46 и v) антитела против C5, C6, C7, C8 или C9.

30

В определенных вариантах осуществления, указанное иммуносупрессивное лекарственное средство ингибирует Т-клеточную активность или В-клеточную активность. В определенных вариантах осуществления, указанное иммуносупрессивное лекарственное средство ингибирует Т-клеточную активность и В-

35 клеточную активность. В определенных вариантах осуществления, указанное иммуносупрессивное лекарственное средство выбрано из группы, состоящей из циклоспорина А, такролимуса, сиролимуса, ОКТ3, кортикостероида, даклизумаба, базиликсимаба, азатиоприна, микофенолата мофетила, метотрексата, 6-

40 меркаптопурина, антитела против Т-клеток, циклофосфамида, лефлунамида, бреквинара, АТG, АLГ, 15-дезоксиспергуалина, LF15-0195, СTLA-4-Ig (белатацепта), ритуксана и брeдинина. В определенных вариантах осуществления, вводят более одного иммуносупрессивного лекарственного средства. В определенных вариантах осуществления, указанный способ включает в себя введение i) лекарственного

45 средства, которое ингибирует активность комплемента, и ii) циклоспорина А. В определенных вариантах осуществления, указанный способ включает в себя введение i) лекарственного средства, которое ингибирует активность комплемента, и ii) LF15-0195. В определенных вариантах осуществления, указанный способ

50 включает в себя введение i) лекарственного средства, которое ингибирует активность комплемента, ii) циклоспорина А и iii) LF15-0195. В определенных вариантах осуществления, указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, представляет собой антитело, которое ингибирует расщепление

компонента C5 комплемента. В определенных вариантах осуществления, в сочетании с ингибитором активности комплемента применяют способ иммуномодулирующей терапии, например, плазмаферез, спленэктомия или иммуносорбцию.

В определенных вариантах осуществления, указанный аллотрансплантат выживает в течение периода времени, по меньшей мере на 20% более длительного, чем в случае проведения способа без указанного лекарственного средства, которое ингибирует активность комплемента. В определенных вариантах осуществления, указанный аллотрансплантат выживает в течение периода времени, по меньшей мере на 40% более длительного, чем в случае проведения способа без указанного лекарственного средства, которое ингибирует активность комплемента. В определенных вариантах осуществления, указанный аллотрансплантат выживает в течение оставшегося периода жизни указанного млекопитающего. В определенных вариантах осуществления, указанный аллотрансплантат выживает по меньшей мере в течение трех месяцев. В определенных вариантах осуществления, указанный аллотрансплантат выживает по меньшей мере в течение шести месяцев. В определенных вариантах осуществления, указанный аллотрансплантат выживает по меньшей мере в течение одного года. В определенных вариантах осуществления, указанный аллотрансплантат выживает по меньшей мере в течение пяти лет. В определенных вариантах осуществления, указанный аллотрансплантат выживает в течение оставшегося периода жизни указанного человека.

В определенных вариантах осуществления, указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, вводят в хроническом режиме по меньшей мере в течение 14 суток. В определенных вариантах осуществления, указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, вводят в хроническом режиме по меньшей мере в течение 28 суток. В определенных вариантах осуществления, указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, вводят в хроническом режиме по меньшей мере в течение 3 месяцев. В определенных вариантах осуществления, указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, вводят в хроническом режиме по меньшей мере в течение 6 месяцев. В определенных вариантах осуществления, указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, вводят в хроническом режиме по меньшей мере в течение 1 года. В определенных вариантах осуществления, указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, вводят в хроническом режиме по меньшей мере в течение 5 лет. В определенных вариантах осуществления, указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, вводят в хроническом режиме в течение оставшегося периода жизни указанного млекопитающего.

В определенных вариантах осуществления, по меньшей мере одно иммуносупрессивное лекарственное средство вводят в хроническом режиме в течение оставшегося периода жизни указанного млекопитающего. В определенных вариантах осуществления, по меньшей мере циклоспорин А вводят в хроническом режиме в течение оставшегося периода жизни указанного млекопитающего. В определенных вариантах осуществления, по меньшей мере LF15-0195 вводят в хроническом режиме в течение оставшегося периода жизни указанного млекопитающего.

В некоторых аспектах, описание относится к способу продления срока выживаемости аллотрансплантата у млекопитающего-реципиента, предусматривающему в отношении указанного млекопитающего а) введение лекарственного средства, которое ингибирует активность комплемента и б)

проведение по меньшей мере одной иммуносупрессивной терапии, где указанная терапия выбрана из i) по меньшей мере одного иммуносупрессивного лекарственного средства, содержащего LF15-0195, или ii) иммуномодулирующего лечения, где указанное млекопитающее является пресенсибилизированным к указанному аллотрансплантату.

В определенных вариантах осуществления, указанным млекопитающим является человек. В определенных вариантах осуществления, указанный аллотрансплантат является не соответствующим по МНС. В определенных вариантах осуществления, указанный не соответствующий по МНС аллотрансплантат представляет собой не соответствующий по HLA аллотрансплантат. В определенных вариантах осуществления, указанный реципиент не соответствует указанному аллотрансплантату по ABO. В определенных вариантах осуществления, указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, вводят в хроническом режиме.

В определенных вариантах осуществления, указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, ингибирует образование C5b или C5a. В определенных вариантах осуществления, указанное лекарственное средство, которое ингибирует образование C5b или C5a, представляет собой целое антитело или фрагмент антитела. В определенных вариантах осуществления, указанное целое антитело или фрагмент антитела представляет собой человеческое, гуманизированное, химеризованное или деиммунизированное антитело или фрагмент антитела. В определенных вариантах осуществления, указанное целое антитело или фрагмент антитела ингибируют расщепление компонента C5 комплемента. В определенных вариантах осуществления, указанный фрагмент антитела выбран из группы, состоящей из Fab, F(ab')₂, Fv, доменного антитела и одноцепочечного антитела. В определенных вариантах осуществления, указанный фрагмент антитела представляет собой пекселизумаб. В определенных вариантах осуществления, указанное целое антитело представляет собой экулизумаб. В определенных вариантах осуществления, указанный экулизумаб вводят в хроническом режиме. В определенных вариантах осуществления, указанный экулизумаб вводят раз в 2 недели.

В определенных вариантах осуществления, указанный ингибитор активности комплемента выбран из группы, состоящей из i) растворимого рецептора компонента комплемента, ii) CD59, iii) CD55, iv) CD46 и v) антитела против C5, C6, C7, C8 или C9.

В определенных вариантах осуществления, указанное иммуносупрессивное лекарственное средство ингибирует Т-клеточную активность или В-клеточную активность. В определенных вариантах осуществления, указанное иммуносупрессивное лекарственное средство ингибирует Т-клеточную активность и В-клеточную активность. В определенных вариантах осуществления, указанное иммуносупрессивное лекарственное средство выбрано из группы, состоящей из циклоспорина А, такролимуса, сиролимуса, ОКТ3, кортикостероида, даклизумаба, базиликсимаба, азатиоприна, микофенолата мофетила, метотрексата, 6-меркаптопурина, антитела против Т-клеток, циклофосфамида, лефлунамида, бреквинара, ATG, ALG, 15-дезоксиспергуалина, LF15-0195, CTLA-4-Ig (белатацепта), ритуксана и брединина. В определенных вариантах осуществления, вводят более одного иммуносупрессивного лекарственного средства. В определенных вариантах осуществления, указанный способ включает в себя введение i) лекарственного средства, которое ингибирует активность комплемента, и ii) циклоспорина А. В определенных вариантах осуществления, указанный способ включает в себя

введение i) лекарственного средства, которое ингибирует активность комплемента, и ii) LF15-0195. В определенных вариантах осуществления, указанный способ включает в себя введение i) лекарственного средства, которое ингибирует активность комплемента, ii) циклоспорина А и iii) LF15-0195. В определенных вариантах осуществления, указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, представляет собой антитело, которое ингибирует расщепление компонента C5 комплемента. В определенных вариантах осуществления, в сочетании с ингибитором активности комплемента применяют способ иммуномодулирующей терапии, например, плазмаферез, спленэктомия или иммуносорбцию.

В определенных вариантах осуществления, в которых млекопитающее является пресенсибилизированным к аллотрансплантату, указанный аллотрансплантат выживает в течение периода времени, по меньшей мере на 20% более длительного, чем в случае проведения способа без указанного лекарственного средства, которое ингибирует активность комплемента. В определенных вариантах осуществления, указанный аллотрансплантат выживает в течение периода времени, по меньшей мере на 40% более длительного, чем в случае проведения способа без указанного лекарственного средства, которое ингибирует активность комплемента. В определенных вариантах осуществления, указанный аллотрансплантат выживает в течение оставшегося периода жизни указанного млекопитающего. В определенных вариантах осуществления, указанный аллотрансплантат выживает по меньшей мере в течение трех месяцев. В определенных вариантах осуществления, указанный аллотрансплантат выживает по меньшей мере в течение шести месяцев.

В определенных вариантах осуществления, указанный аллотрансплантат выживает по меньшей мере в течение одного года. В определенных вариантах осуществления, указанный аллотрансплантат выживает по меньшей мере в течение пяти лет. В определенных вариантах осуществления, указанный аллотрансплантат выживает в течение оставшегося периода жизни указанного человека.

В определенных вариантах осуществления, в которых млекопитающее является пресенсибилизированным к аллотрансплантату, указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, вводят в хроническом режиме в течение по меньшей мере 14 суток. В определенных вариантах осуществления, указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, вводят в хроническом режиме по меньшей мере в течение 28 суток. В определенных вариантах осуществления, указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, вводят в хроническом режиме по меньшей мере в течение 3 месяцев. В определенных вариантах осуществления, указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, вводят в хроническом режиме по меньшей мере в течение 6 месяцев. В определенных вариантах осуществления, указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, вводят в хроническом режиме по меньшей мере в течение 1 года. В определенных вариантах осуществления, указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, вводят в хроническом режиме по меньшей мере в течение 5 лет. В определенных вариантах осуществления, указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, вводят в хроническом режиме в течение оставшегося периода жизни указанного млекопитающего.

В определенных вариантах осуществления, в которых млекопитающее является пресенсибилизированным к аллотрансплантату, по меньшей мере одно иммуносупрессивное лекарственное средство вводят в хроническом режиме в течение

оставшегося периода жизни указанного млекопитающего. В определенных вариантах осуществления, по меньшей мере циклоспорин А вводят в хроническом режиме в течение оставшегося периода жизни указанного млекопитающего. В определенных вариантах осуществления, по меньшей мере LF15-0195 вводят в хроническом режиме в течение оставшегося периода жизни указанного млекопитающего.

В некоторых аспектах, это описание относится к применению лекарственного средства, которое ингибирует активность комплемента, и иммуносупрессивного лекарственного средства для производства лекарственного средства или упаковки с лекарственным средством для продления срока выживаемости аллотрансплантата у млекопитающего, где по меньшей мере одно иммуносупрессивное лекарственное средство содержит LF15-0195. В определенных вариантах осуществления, в указанное лекарственное средство или упаковку с лекарственным средством включено более одного иммуносупрессивного лекарственного средства. В определенных вариантах осуществления, указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, и указанное иммуносупрессивное лекарственное средство входят в состав композиции, пригодной для одновременного введения указанному млекопитающему. В определенных вариантах осуществления, указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, и указанное иммуносупрессивное лекарственное средство входят в состав композиции или композиций, пригодных для последовательного введения указанному млекопитающему. В определенных вариантах осуществления, указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, входит в состав композиции, пригодной для введения указанному млекопитающему в хроническом режиме. В определенных вариантах осуществления, указанное иммуносупрессивное лекарственное средство входит в состав композиции, пригодной для введения указанному млекопитающему в хроническом режиме.

В некоторых аспектах, это описание относится к фармацевтической упаковке, содержащей лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, и по меньшей мере одно иммуносупрессивное лекарственное средство, где указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, и указанное иммуносупрессивное лекарственное средство изготовлены для введения в хроническом режиме, где по меньшей мере одно иммуносупрессивное лекарственное средство содержит LF15-0195.

В определенных вариантах осуществления, указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, представляет собой антитело в лиофилизированном составе, содержащем антитело и лиопротектор. В определенных вариантах осуществления, указанное иммуносупрессивное лекарственное средство входит в лиофилизированный состав, содержащий иммуносупрессивное лекарственное средство и лиопротектор. В определенных вариантах осуществления, указанное лекарственное средство и указанное иммуносупрессивное лекарственное средство входят в один лиофилизированный состав, содержащий указанное лекарственное средство, указанное иммуносупрессивное лекарственное средство и лиопротектор. В определенных вариантах осуществления, указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, находится в инъекционной системе, содержащей шприц, который содержит кассету, где указанная кассета содержит указанное лекарственное средство в составе, пригодном для инъекции. В определенных вариантах осуществления, указанное иммуносупрессивное лекарственное средство находится в инъекционной системе, содержащей шприц, который содержит кассету, где

указанная кассета содержит указанное иммуносупрессивное лекарственное средство в составе, пригодном для инъекции. В определенных вариантах осуществления, указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, и указанное иммуносупрессивное лекарственное средство находятся в инъекционной системе, содержащей шприц, который содержит кассету, где указанная кассета содержит указанное лекарственное средство и указанное иммуносупрессивное лекарственное средство в составе, пригодном для инъекции. В определенных вариантах осуществления, указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, представлено в единичной дозированной форме. В определенных вариантах осуществления, указанное иммуносупрессивное лекарственное средство представлено в единичной дозированной форме.

В определенных вариантах осуществления, указанное антитело ингибирует образование терминальных компонентов комплемента или C5a. В определенных вариантах осуществления, антитело представляет собой целое антитело или фрагмент антитела. В определенных вариантах осуществления, указанное целое антитело или фрагмент антитела представляет собой человеческое, гуманизированное, химеризованное или деиммунизированное антитело или фрагмент антитела. В определенных вариантах осуществления, указанное целое антитело или фрагмент антитела ингибируют расщепление компонента C5 комплемента. В определенных вариантах осуществления, указанный фрагмент антитела выбран из группы, состоящей из Fab, F(ab')₂, Fv, доменного антитела, и одноцепочечного антитела. В определенных вариантах осуществления, указанный фрагмент антитела представляет собой пекселизумаб. В определенных вариантах осуществления, указанное целое антитело представляет собой экулизумаб.

Данная заявка предусматривает сочетания любых из представленных выше аспектов и вариантов осуществления.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ РИСУНКОВ

На фигурах 1A-1D представлены уровни антидонорского антитела у пресенсибилизированных реципиентов по сравнению с несенсибилизированными реципиентами при различных способах лечения.

На фигурах 2A и 2B представлено сравнение между тройной терапией с использованием антитела против C5, CsA и CyP у пресенсибилизированных реципиентов аллотрансплантата и комбинированной терапией с использованием только антитела против C5 и CsA у пресенсибилизированных реципиентов аллотрансплантата. На фигуре 2A приведено сравнение выживаемости аллотрансплантата сердца у различных реципиентов при различных способах лечения, как указано. На фигуре 2B представлена гистология и иммунология, например, для инфильтрации лимфоцитов в аллотрансплантаты сердца реципиентов в различных группах.

На фигуре 3 представлена блокированная активность терминальных компонентов комплемента посредством антитела против C5 антитело по сравнению с иммуносупрессивными средствами.

На фигурах 4A-4D приведено сравнение уровней антидонорских антител у пресенсибилизированных реципиентов с аллотрансплантатами при монотерапии антителом против C5 отдельно, двойной комбинированной терапии посредством антитела против C5 и CsA, и тройной комбинированной терапии посредством антитела против C5, CsA и CyP.

На фигурах 5 представлено изменение соотношений изотипов IgG у реципиентов

аллотрансплантата без лечения или с лечением различными способами.

На фигуре 6 показана экспрессия на высоком уровне белков Bcl-2 и Bcl-x1 в трансплантатах сердца с длительным выживанием по сравнению с трансплантатами сердца животных без лечения.

На фигурах 7А-7С представлена улучшенная вторая трансплантация (повторная трансплантация) адаптированного трансплантата из реципиента с первой трансплантацией.

На фигурах 8А-8В представлены результаты экспериментов с повторной трансплантацией.

На фигурах 9А-9В представлены результаты экспериментов с повторной трансплантацией.

На фигурах 10А-10D представлены уровни антидонорского антитела у пресенсибилизированных реципиентов по сравнению с несенсибилизированными реципиентами в различных способах лечения.

На фигурах 11А-11С показано, что mAb против C5 в сочетании с CsA и LF приводит к неограниченной выживаемости трансплантата почки у пресенсибилизированных мышей.

На фигуре 12 показано, что гемолитическая активность комплемента полностью ингибировалась в сыворотке пресенсибилизированных мышей BALB/c.

На фигурах 13А-13В представлено изменение соотношений изотипов IgG у реципиентов аллотрансплантата, которых не лечили или лечили различными способами.

На фигуре 14 представлена экспрессия защитных белков трансплантатах почки с длительным выживанием у пресенсибилизированных реципиентов.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Обзор: Отторжение трансплантатов пересаженных тканей

Сверхострое отторжение происходит в течение от минут до часов после трансплантации и является следствием предварительно образованных антител к антигенам трансплантированной ткани. Оно характеризуется геморрагией и тромботической окклюзией сосудов трансплантата. Связывание антитела с эндотелием активирует комплемент, и антитело и комплемент индуцируют ряд изменений в эндотелии трансплантата, которые запускают внутрисосудистый тромбоз и приводят к окклюзии сосудов, результатом чего является необратимое страдание трансплантированного органа от ишемического повреждения (Abbas et al., 2000).

Сверхострое отторжение часто опосредуется предварительно существующими аллоантителами IgM, например, аллоантителами, направленными против антигенов групп крови АВО, экспрессируемых на эритроцитах. Этот тип отторжения, опосредуемый естественными антителами, является основной причиной отторжения ксенотрансплантатов. Сверхострое отторжение вследствие естественных антител IgM более не является основной проблемой аллотрансплантатов, поскольку аллотрансплантаты обычно подбирают, чтобы тип АВО донора и реципиента соответствовали. Тем не менее, может произойти сверхострое отторжение соответствующего по АВО аллотрансплантата, обычно опосредуемое антителами IgG, направленными против белковых аллоантигенов, таких как чужеродные молекулы МНС, или против менее строго определенных аллоантигенов, экспрессируемых на клетках сосудистого эндотелия. Такие антитела могут образовываться в результате предшествующего воздействия аллоантигенов посредством переливания крови перед трансплантацией или многократных

беременностей (это предшествующее воздействие называют "пресенсибилизацией"). Abbas et al., 2000.

Острое отторжение представляет собой процесс сосудистого и паренхимного повреждения, опосредуемого Т-клетками, макрофагами и антителами, который
 5 обычно начинается после первой недели после трансплантации. Abbas et al., 2001. Т-лимфоциты играют основную роль в остром отторжении посредством ответа на аллоантигены, включая молекулы МНС, представленные на сосудистом эндотелии и клетках паренхимы. Активированные Т-клетки вызывают прямой лизис пересаженных
 10 клеток или продуцируют цитокины, которые привлекают и активируют воспалительные клетки, которые вызывают некроз. В остром отторжении могут участвовать как $CD4^+$, так и $CD8^+$ клетки. Разрушение аллогенных клеток в трансплантате высоко специфично и является признаком уничтожения
 15 цитотоксическими Т-лимфоцитами $CD8^+$. Abbas et al., 2000. $CD4^+$ Т-клетки могут быть важны для опосредования острого отторжения трансплантата посредством секреции цитокинов и индукции реакций, подобных гиперчувствительности замедленного типа в трансплантатах, при этом доступны некоторые данные, которые указывают на то, что $CD4^+$ Т-клеток достаточно для опосредования острого отторжения. Abbas et al.,
 20 2000. Также антитела могут опосредовать острое отторжение после возникновения у реципиента трансплантата гуморального иммунного ответа на антигены сосудистой стенки, и антитела, которые продуцируются, связываются с сосудистой стенкой и активируют комплемент. Abbas et al., 2000.

Хроническое отторжение характеризуется фиброзом с потерей нормальных структур органа, происходящим на протяжении длительного периода. Патогенез хронического отторжения менее хорошо понятен, чем патогенез острого отторжения. Оклюзия артерий трансплантата может происходить в результате пролиферации
 25 гладкомышечных клеток интимы (Abbas et al., 2000). Этот процесс называют ускоренным артериосклерозом или артериосклерозом трансплантата, и он может развиваться в любом васкуляризированном трансплантате органа в течение от 6 месяцев до года после трансплантации.

Для успешной трансплантации необходимо преодолеть несколько типов отторжения. Для предотвращения отторжения применяют множество подходов. Это
 35 может требовать введения иммуносупрессантов, часто нескольких их типов, для предотвращения различных типов атаки, например для ингибирования Т-клеточной атаки, антител и эффектов цитокинов и комплемента. Предварительный скрининг доноров в отношении их совместимости с реципиентами также является основным
 40 фактором предотвращения отторжения, особенно предотвращения сверхострого отторжения. Сверхострое отторжение может снизить иммуноробция антител против HLA перед пересадкой. Перед трансплантацией реципиенту или хозяину можно вводить реагенты против Т-клеток, например, моноклональное антитело ОКТ3, антитимоцитарный глобулин (АТГ), циклоспорин А или такролимус (FK 506). Кроме
 45 того, перед трансплантацией хозяину можно вводить глюкокортикоиды и/или азатиоприн (или другие аналоги пуринов). Лекарственные средства, используемые для способствования предотвращению отторжения трансплантата, включают, но не ограничиваются ими, АТГ или ALG, ОКТ3, даклизумаб, базиликсимаб,
 50 кортикостероиды, 15-дезоксиспергуалин, LF15-0195, циклоспорины, такролимус, аналоги пуринов, такие как азатиоприн, метотрексат, микофенолат мофетил, 6-меркаптопурин, брединин, бреквинар, лефлунамид, циклофосфамид, сиролимус, моноклональные антитела против CD4, CTLA4-Ig, ритуксан, моноклональные

антитела против CD 154, моноклональные антитела против LFA1, моноклональные антитела против LFA-3, моноклональные антитела против CD2, и антитела против CD45.

Аллотрансплантаты отторгаются частично посредством активации Т-клеток. У реципиента трансплантата возникает ответ в виде отторжения после распознавания CD4⁺ Т-клетками чужеродных антигенов в аллотрансплантате. Эти антигены кодируются основным комплексом гистосовместимости (МНС). Существуют молекулы МНС как I класса, так и II класса. У человека молекулы МНС I класса представляют собой HLA-A, HLA-B и HLA-C. Молекулы МНС II класса у человека называют HLA-DR, HLA-DQ и HLA-DP. У мышей молекулы МНС I класса представляют собой H-2K, H-2D и H-2L, и молекулы МНС II класса представляют собой I-A и I-E. Когда CD4⁺ Т-клетки связывают чужеродные МНС-антигены, они активируются и подвергаются клональной пролиферации. Активированные Т-клетки секретируют цитокины, которые могут способствовать активации моноцитов/макрофагов, В-клеток и цитотоксических CD8⁺ Т-клеток. Активированные моноциты/макрофаги высвобождают вещества, которые приводят к повреждению ткани, В-клетки продуцируют аллоантитела, которые приводят к опосредуемому комплементом разрушению тканей, и CD8⁺ Т-клетки уничтожают пересаженные клетки антиген-специфичным способом через индукцию апоптоза и лизис клеток.

Иммуносупрессивные средства

Множество лекарственных средств, используемых для замедления отторжения трансплантатов (т.е. для продления срока их выживаемости) действуют различными способами. Широко применяют иммуносупрессивные средства. См. Stepkowski, 2000, для обзора механизма действия некоторых иммуносупрессивных лекарственных средств.

Циклоспорин А представляет собой одно из наиболее широко применяемых иммуносупрессивных лекарственных средств для ингибирования отторжения трансплантата. Он является ингибитором интерлейкина-2 или IL-2 (он препятствует транскрипции мРНК интерлейкина-2). Точнее, циклоспорин ингибирует активацию кальциневрина, которая в норме происходит при стимуляции Т-клеточного рецептора. Кальциневрин дефосфорилирует NFAT (ядерный фактор активированных Т-клеток), обеспечивая его проникновение в ядро и связывание с промотором интерлейкина-2. Блокируя этот процесс, циклоспорин А ингибирует активацию CD4⁺ Т-клеток и обусловленный ей каскад событий, которые в ином случае произойдут. Такролимус представляет собой другой иммуносупрессант, который действует, ингибируя образование интерлейкина-2.

Рапамицин (сиролимус), SDZ RAD, и блокаторы рецептора для интерлейкина-2 представляют собой лекарственные средства, которые ингибируют действие интерлейкина-2 и, таким образом, препятствуют каскаду событий, описанному выше.

Также для ингибирования отторжения трансплантата применяют ингибиторы биосинтеза пуринов или пиримидинов. Они препятствуют синтезу ДНК и, таким образом, ингибируют деление клеток, в том числе способность к делению Т-клеток. Результатом этого является ингибирование активности Т-клеток посредством препятствования образованию новых Т-клеток. Ингибиторы синтеза пуринов включают азатиоприн, метотрексат, микофенолата мофетил (MMF) и мизорибин (брединин). Ингибиторы синтеза пиримидинов включают бреквинар натрия и лефлуномид. Циклофосфамид представляет собой ингибитор синтеза как пуринов, так и пиримидинов.

Другим способом ингибирования активации Т-клеток является лечение реципиента антителами к Т-клеткам. ОКТ3 представляет собой моноклональные антитела мыши против CD3, который является частью Т-клеточного рецептора. Это антитело ингибирует Т-клеточный рецептор и подавляет активацию Т-клеток.

Известны множество других лекарственных средств и способов замедления отторжения аллотрансплантата, и их применяют специалисты в данной области. Одним подходом является устранение Т-клеток, например, облучением. Его часто применяют при трансплантации костного мозга, особенно если существует частичное не соответствие основного HLA. Применяли введение реципиенту ингибитора (блокатора) взаимодействия лиганд CD40-CD40 и/или блокатора взаимодействия CD28-B7 (патент США 6280957). В опубликованной патентной заявке PCT WO 01/37860 описано введение моноклонального антитела против CD3 и IL-5 для ингибирования Th1-иммунного ответа. В опубликованной патентной заявке PCT WO 00/27421 описан способ профилактики или лечения отторжения трансплантата роговицы посредством введения антагониста фактора некроза опухоли- α . Glotz et al. (2002) показали, что введение внутривенных иммуноглобулинов (IVIg) может индуцировать глубокое и постоянное снижение титров антител против HLA, обеспечивая возможность посредством этого трансплантации не соответствующего по HLA донора. Сходные протоколы включали способы плазмафереза (Taube et al., 1984) или иммуносорбции, сопряженные с иммуносупрессивными средствами (Hiesse et al., 1992) или их сочетание (Montgomery et al., 2000). В Changelian et al. (2003) описана модель, в которой иммуносупрессию вызывают пероральным ингибитором Janus-киназы 3 (JAK3), которая представляет собой фермент, необходимый для надлежащей передачи сигнала рецепторов для цитокинов, которые используют обычную гамма-цепь (γ) (интерлейкины-2, -4, -7, -9, -15, -21), результатом чего является ингибирование активации Т-клеток. Антисмысловые нуклеиновые кислоты против ICAM-1 применяют отдельно или в сочетании с моноклональным антителом, специфичным к функциональному лимфоцитарному антигену 1 (LFA-1) в исследовании трансплантации аллотрансплантата сердца (Stepkowski, 2000). Аналогично, антитело против ICAM-1 применяли в сочетании с антителом против LFA-1 для лечения при аллотрансплантации сердца (Stepkowski, 2000). Кроме того, применяли антисмысловые олигонуклеотиды совместно с циклоспорином в модели аллотрансплантации сердца или почки крысы, что привело к синергическому эффекту на продление срока выживаемости трансплантатов (Stepkowski, 2000). Хроническое отторжение трансплантата лечили введением антагониста TGF- β , который представляет собой цитокин, вовлеченный в дифференцировку, пролиферацию и апоптоз (публикация патентной заявки США US 2003/0180301).

Комплемент и трансплантат/отторжение трансплантата

Роль комплемента в отторжении трансплантата хорошо известна. Особенно, это справедливо в случае ксенотрансплантации, однако также комплемент участвует в отторжении аллотрансплантата. Для обзора, см. Platt and Saadi, 1999. Одним аспектом роли комплемента является то, что может произойти повреждение, связанное с ишемией-реперфузией в тот момент, когда трансплантат органа подвергается реперфузии кровью реципиента. Также комплемент может вызывать некоторые проявления отторжения аллотрансплантата. Система комплемента подробно описана в патенте США 6355245. Система комплемента действует совместно с другими иммунологическими системами организма для защиты его от вторжения клеточных и вирусных патогенов. Существует по меньшей мере 25 белков комплемента, которые

встречаются в качестве комплексной системы белков плазмы и мембранных кофакторов. Белки плазмы составляют приблизительно 10% от глобулинов в сыворотке позвоночных. Компоненты комплемента осуществляют их иммунные защитные функции посредством взаимодействия в серии сложных, но точных процессов ферментативного расщепления и мембранного связывания. Конечный каскад комплемента приводит к образованию продуктов с опсонической, иммунорегуляторной и литической функциями.

Каскад комплемента протекает по классическому каскаду или альтернативному каскаду. В этих каскадах множество компонентов являются общими и, несмотря на то, что они отличаются по их исходным стадиям, они сходятся и обладают одинаковыми "терминальными компонентами комплемента" (с C5 по C9), ответственными за активацию и разрушение клеток-мишеней.

Классический каскад комплемента, как правило, начинается распознаванием антителом и связыванием антигенной области на клетке-мишени. Альтернативный каскад, как правило, является независимым от антител, и может запускаться определенными молекулами на поверхностях патогенов. Оба каскада сходятся в точке, где компонент комплемента C3 расщепляется активной протеазой (которая отличается в каждом каскаде) с получением C3a и C3b. Другие каскады активации атаки комплемента могут действовать позднее в последовательности событий, ведущих к различным аспектам функции комплемента.

C3a представляет собой анафилатоксин. C3b связывается с бактериальными и другими клетками, а также с некоторыми вирусами и иммунными комплексами, и маркирует их для удаления из кровотока. C3b в этой роли известен как опсонин. Опсоническую функцию C3b считают наиболее важным противомикробным действием системы комплемента. Пациенты с генетическими повреждениями, которые блокируют функцию C3b, обладают склонностью к инфекции широким множеством патогенных организмов, в то время как выявлено, что пациенты с повреждениями далее в последовательности каскада комплемента, т.е. пациенты с повреждениями, которые блокируют функции C5, обладают большей склонностью только к инфекции *Neisseria*, и, таким образом, обладают только немного большей склонностью (Fearon, 1983).

C3b также образует комплекс с другими компонентами, уникальными для каждого каскада, с образованием классической или альтернативной C5-конвертазы, которая расщепляет C5 на C5a и C5b. Таким образом, C3 считают основным белком последовательности реакций комплемента, поскольку он необходим как для альтернативного, так и для классического каскадов (Wurzner et al., 1991). Это свойство C3b регулируется сывороточным протеазным фактором I, который действует на C3b с образованием iC3b. Несмотря на то, что iC3b, тем не менее, является функциональным в качестве опсонина, он не может образовывать активную C5-конвертазу.

C5 представляет собой бета-глобулин массой 190 кДа, находящийся в нормальной сыворотке в концентрации приблизительно 75 мкг/мл (0,4 мМ). C5 является гликозилированным, при этом приблизительно 1,5-3 процентов его массы относятся к углеводу. Зрелый C5 представляет собой гетеродимер из альфа цепи из 999 аминокислот массой 115 кДа, которая связана дисульфидной связью с бета-цепью из 656 аминокислот массой 75 кДа. C5 синтезируется в качестве одноцепочечного белкового предшественника, являющегося продуктом однокопийного гена (Naviland et al., 1991). Последовательность кДНК транскрипта этого гена предполагает

секретируемый про-C5-предшественник из 1659 аминокислот совместно с лидерной последовательностью из 18 аминокислот.

Предшественник про-C5 расщепляется после 655 и 659 аминокислот, с образованием бета-цепи в качестве N-концевого фрагмента (аминокислотные остатки с +1 по 655) и альфа-цепи в качестве C-концевого фрагмента (аминокислотные остатки с 660 по 1658), с четырьмя удаленными аминокислотами между ними.

C5a отщепляется от альфа-цепи C5 либо альтернативной, либо классической C5-конвертазой в качестве N-концевого фрагмента, содержащего первые 74 аминокислоты альфа-цепи (т.е. аминокислотные остатки 660-733). Приблизительно 20 процентов массы C5a, составляющей 11 кДа, относится к углеводу. Участок расщепления для действия конвертазы находится в области аминокислотного остатка 733 или в непосредственной близости от него. Соединение, которое связывается с этим участком расщепления или рядом с ним может обладать потенциалом в отношении блокирования доступа ферментов C5-конвертаз к участку расщепления, и, таким образом, действовать в качестве ингибитора комплемента.

C5 также может активироваться посредством активности, отличной от активности C5-конвертазы. Ограниченное расщепление трипсином (Minta and Man, 1977; Wetsel and Kolb, 1982) и обработка кислотой (Yamamoto and Gewurz, 1978; Vogt et al., 1989) также могут расщеплять C5 и образовывать активный C5b.

C5a представляет собой другой анафилатоксин. C5b объединяется с C6, C7 и C8 с образованием комплекса C5b-8 на поверхности клетки-мишени. При связывании нескольких молекул C9, образуется мембраноатакующий комплекс (MAC, C5b-9, комплекс терминальных компонентов комплемента - ТСС). Когда в мембраны клеток-мишеней встраиваются достаточные количества MAC, отверстия (поры MAC), которые они образуют, опосредуют быстрый лизис клеток-мишеней. Более низкие, нелигические концентрации MAC могут приводить к другим эффектам. В частности, встраивание небольших количеств комплексов C5b-9 в мембрану эндотелиальных клеток и тромбоцитов может вызывать повреждающую клеточную активацию. В некоторых случаях активация может предшествовать лизису клеток.

Как упомянуто выше, C3a и C5a являются анафилатоксинами. Эти активированные компоненты комплемента могут запускать дегрануляцию тучных клеток, которая приводит к высвобождению гистамина и других медиаторов воспаления, что приводит к сокращению гладких мышц, повышенной проницаемости сосудов, активации лейкоцитов, и другим воспалительным эффектам, включая клеточную пролиферацию, приводящую к повышенному содержанию паренхиматозных клеток. Также C5a функционирует в качестве хемотактического пептида, который служит для привлечения провоспалительных гранулоцитов в область активации комплемента.

Полагают, что связывающие комплемент антитела реципиента к донорским аллоантигенам являются основной причиной сверхострого отторжения трансплантата. Благодаря пробе на совместимость перед трансплантацией, это прототипное гуморальное отторжение в настоящее время наблюдают редко (Regele et al., 2001). В настоящее время данные показывают, что гуморальные иммунные механизмы могут участвовать в других типах отторжения аллотрансплантата (Regele et al., 2001). Было выявлено, что высокие уровни панели реактивных антител, указывающие на гуморальную пресенсибилизацию, ассоциированы с худшей выживаемостью трансплантата почки (Opelz, 1992), было описано, что возникновение аллоантител в процессе посттрансплантационного периода предопределяет плохой исход для трансплантата (Jeannet et al., 1970; Halloran et al., 1992), и селективное

удаление IgG реципиента посредством иммуносорбции приводило к реверсии некоторых эпизодов отторжения, указывая на вклад гуморальных иммунных механизмов в отторжение (Persson et al., 1995; Bohmig et al., 2000). Активация комплемента в трансплантате может указывать на опосредуемое антителами повреждение трансплантата. Продукт расщепления компонента комплемента C4d представляет собой маркер активации антителозависимого классического каскада. Капиллярные отложения C4d в биоптатах аллотрансплантата почки ассоциированы с неблагоприятным исходом для трансплантата.

Накапливающиеся в последнее время данные указывают на то, что активация комплемента достоверно приводит к сенсибилизации реципиентов аллотрансплантата и к развитию тканевого повреждения в аллотрансплантатах (Platt et al., 1999). Антитела представляют собой наиболее детально исследованные медиаторы активации классического каскада комплемента. Клинически, известно, что аллоантитела активируют комплемент (Baldwin et al., 2001). Halloran и Collins показали, что отложение C4d в околоканальцевых капиллярах аллотрансплантатов почки является чувствительным и диагностическим маркером острого гуморального отторжения, которое высоко коррелирует с наличием циркулирующих донор-специфичных антител (Collins et al., 1999; Halloran, 2003). Дальнейшие подтверждающие данные выявлены у животных при ингибировании комплемента (Pratt et al., 1996; Pruitt et al., 1991; Forbes et al., 1978) или дефекте (Pratt et al., 2000; Baurer et al., 1995), которые проявляют значительно сниженное воспалительное повреждение и сниженные антидонорские иммунные ответы. Полагают, что при ABMR комплемент активируется посредством классического каскада и играет ключевую роль в патогенезе (Collard et al., 1997). Несмотря на то, что роль комплемента в HAR или остром сосудистом отторжении (AVR) после ксенотрансплантации хорошо документирована (Platt et al., 1999), точные механизмы комплемента в патогенезе ABMR после аллотрансплантации еще не выяснены.

C5-компонент комплемента расщепляется с образованием продуктов со множеством провоспалительных эффектов, и, таким образом, представляет собой привлекательную мишень для ингибирования комплемента в опосредуемой иммунной системой воспалительном ответе. Как описано выше, C5a представляет собой мощный анафилатоксин и хемотактический фактор. Активация клеток посредством C5a индуцирует высвобождение множества дополнительных воспалительных медиаторов (Jose et al., 1983). Каскады активации комплемента (классический, альтернативный, или маннан-связывающий лектиновый каскад) в конечном итоге приводят к образованию цитолитического мембраноатакующего комплекса C5b-9 (Kirschfunk, 2001), который может опосредовать как прямое повреждение тканей посредством клеточного лизиса, так и провоспалительную активацию клеток в сублитических дозах (Saadi et al., 1995; Papadimitriou et al., 1991). Таким образом, для оптимального ингибирования опосредуемого комплементом воспалительного ответа после трансплантации может быть необходимо блокирование образования как C5a, так и C5b-9. В то же время, ингибирование каскада комплемента на уровне C5 не нарушает образование C3b, сохраняя опосредуемую C3b опсонизацию патогенных микроорганизмов, а также растворение и выведение иммунных комплексов (Liszewski, 1993).

Благоприятный эффект mAb против C5 ранее был описан в нескольких экспериментальных моделях, включая реперфузию миокарда (Vakeva et al., 1998), системную красную волчанку (Wang et al., 1996) и ревматоидный артрит (Wang et al.,

1995); а также в клинических испытаниях у человека (Kirschfink, 2001) при аутоиммунном заболевании, искусственном кровообращении и остром инфаркте миокарда. Кроме того, инактивация комплемента функционально блокирующими моноклональными Ат (mAb) против C5 предотвращала HAR в моделях ксенотрансплантации (Kroshus et al., 1995; Wang et al., 1999).

Способы замедления отторжения аллотрансплантата посредством введения ингибиторов комплемента были протестированы. В опубликованной патентной заявке PCT WO 92/10205 описано применение сочетания циклоспорина и растворимого рецептора комплемента (sCR1) для ингибирования отторжения аллотрансплантата сердца в модели на пресенсибилизированных крысах. Рецептор комплемента 1 связывает компоненты комплемента C3b и C4b. Растворимые формы рецептора комплемента 1 встречаются в природе, или их можно получить способами рекомбинантных ДНК. Эти растворимые рецепторы комплемента *in vitro* ингибировали последствия активации комплемента (патент США 6057131). В WO 92/10205, крысам, которые были пресенсибилизированными к аллотрансплантату сердца, который им пересаживали, вводили циклоспорин А внутримышечно в дозе 10 мг/кг/сутки, начиная за двое суток до трансплантации и продолжая до момента отторжения трансплантата. Кроме того, растворимый рецептор комплемента 1 (sCR1) вводили в виде однократного внутривенного болюса в дозе 15 мг/кг непосредственно перед реперфузией трансплантата. У контрольных животных без введения лекарственного средства происходило отторжение трансплантата в среднем через 3,8 суток. У животных, которые вводили циклоспорин А отдельно, происходило отторжение трансплантата в среднем через 57 суток (этот показатель был высоко варьирующим, причем у двух крыс отторжение произошло быстро через 2 и 4 суток и у третьей крысы отторжение произошло на 166 сутки). У крыс, которым вводили sCR1 отдельно, происходило отторжение трансплантатов в среднем через 44 суток. У крыс, которым вводили сочетание циклоспорина А и sCR1, отторжение происходило в среднем через 147 суток. В случае сочетания введения в хроническом режиме циклоспорина А и однократного болюса sCR1 наблюдали результат в виде синергического эффекта, значительно продлевающего время до отторжения трансплантата. В более ранних исследованиях Pruitt и Bollinger (1991) применяли сходную модель аллотрансплантата у пресенсибилизированных крыс, чтобы показать, что введение sCR1 отдельно для инактивации комплемента приводит к увеличению периода времени до отторжения трансплантата.

Sims et al. (патент США 5135916) предлагают применение ингибиторов комплемента, например CD59 или антител против C7 или C9 для блокирования образования комплекса C5b-9, для введения в сосудистый эндотелий органов и тканей, подлежащих трансплантации. Это будет предотвращать иницируемый посредством C5b-9 некроз клеток. Инактиваторы C5b-9 можно добавлять в перфузируемую жидкость или в среду для хранения, в целях защиты выстилающих стенку сосуда клеток от происходящей в процессе хранения *in vitro* активации комплемента. Кроме того, орган или ткань можно защищать от цитолитических и тромботических эффектов, появляющихся вследствие активации комплемента, возникающей при трансплантации, избегая посредством этого опосредуемого комплементом отторжения. Также Sims et al. (патент США 5573940 и патент США 6100443) описывают способ экспрессии CD59 в трансплантированной ткани или органе для защиты трансплантированного органа от отторжения. Это можно осуществить трансфекцией клеток, подлежащих трансплантации.

Несмотря на то, что некоторые лекарственные средства, разработанные к настоящему времени в сочетании со способами предварительного скрининга доноров и реципиентов на совместимость донорского аллотрансплантата с реципиентом, с течением времени повысили среднюю продолжительность выживаемости аллотрансплантатов, многие аллотрансплантаты, тем не менее, отторгаются в течение жизни реципиента. Главным образом, предшествующие достижения в данной области в основном были направлены на преодоление острого отторжения трансплантата. Кроме того, не проводили исследований роли активированных терминальных компонентов комплемента в опосредуемом антителами отторжении аллотрансплантата с использованием ингибиторов, которые специфично нацелены на каскад комплемента на уровне C5-белка. Способы, описанные в настоящем документе и проиллюстрированные в примерах, обеспечивают прогресс в области аллотрансплантации посредством ингибирования хронического отторжения аллотрансплантатов, в частности аллотрансплантатов у пресенсибилизированного реципиента. Новые способы предоставлены для дальнейшего продления срока выживаемости аллотрансплантата с использованием подходящего сочетания иммуносупрессивных лекарственных средств в сочетании с введением в хроническом режиме ингибитора комплемента.

Способы и применение

Способы, описанные в настоящем документе, применяют для продления срока выживаемости аллотрансплантата. Способы, главным образом, включают введение ингибитора активности комплемента в сочетании с одним или несколькими иммуносупрессантами.

Пригодные ингибиторы комплемента известны специалистам в данной области. Можно получать антитела к отдельным компонентам активированного комплемента, например, антитела против C5a, C7, C9 и т.д. (см., например, патент США 6534058; опубликованную патентную заявку США US 2003/0129187; и патент США 5660825). Известны белки, которые ингибируют опосредуемый комплементом лизис, включая CD59, CD55, CD46 и другие ингибиторы C8 и C9 (см., например, патент США 6100443). В патенте США 6355245 описано антитело, которое связывается с C5 и предотвращает его расщепление на C5a и C5b, препятствуя посредством этого образованию не только C5a, но также комплекса C5b-9. Также известны белки, известные как рецепторы комплемента и связывающие комплемент (см., опубликованную патентную заявку PCT WO 92/10205 и патент США 6057131). Применение растворимых форм рецепторов комплемента, например, растворимого CR1, может ингибировать последствия активации комплемента, такие как окислительный взрыв нейтрофилов, опосредуемый комплементом гемолиз и образование C3a и C5a. Специалистам в данной области понятны представленные выше способы как некоторые, но не все, из известных способов ингибирования комплемента и его активации. Пригодные иммуносупрессанты включают, но не ограничиваются ими, ATG или ALG, OKT3, даклизумаб, базиликсимаб, кортикостероиды, 15-дезоксиспергуалин, LF15-0195, циклоспорины, такролимус, азатиоприн, метотрексат, микофенолат мофетил, 6-меркаптопурин, брединин, бреквинар, лефлунамид, циклофосфамид, сиролимус, моноклональные антитела против CD4, CTLA4-Ig, ритуксан, моноклональные антитела против CD 154, моноклональные антитела против LFA1, моноклональные антитела против LFA-3, моноклональные антитела против CD2 и против CD45.

Аллотрансплантат может включать трансплантированный орган, часть органа,

ткань или клетку. Они включают, но не ограничиваются ими сердце, почку, легкое, поджелудочную железу, печень, сосудистую ткань, глаз, роговицу, хрусталик, кожу, костный мозг, мышцу, соединительная ткань, желудочно-кишечную ткань, нервную ткань, кость, стволовые клетки, островковые клетки, хрящ, гепатоциты и

кроветворные клетки.

По меньшей мере некоторые причины отторжения аллотрансплантатов состоят в ответе реципиента на аллотрансплантат посредством активации комплемента. Это приводит к образованию C5a и C5b-9, которые представляют собой мощные провоспалительные молекулы, которые способствуют возникновению отторжения трансплантата. Без связи с какой-либо высказываемой теорией, заявители предположили, что ингибирование образования C5a и C5b-9 или ингибирование имеющихся C5a и C5b-9 может способствовать предотвращению отторжения трансплантата. Более того, было предположено, что до тех пока существует аллотрансплантат, у реципиента будут продолжаться попытки вызвать иммунный ответ против трансплантата, и этот ответ будет включать попытки образования C5a и C5b-9. Если не предотвратить этот ответ комплемента, он приведет к острому сосудистому отторжению в короткие сроки и вызовет хроническое отторжение трансплантата в продолжительный период. Предшествующие способы с использованием ингибиторов активности комплемента были ограничены введением этих ингибиторов только в момент трансплантации. Это помогало предотвратить острое отторжение, однако, как иллюстрируют описанные в настоящем документе результаты, при введении таких ингибиторов в хроническом режиме получают улучшенные результаты. Это введение в хроническом режиме способствует предотвращению хронического отторжения аллотрансплантата в противоположность способствованию предотвращению только острого отторжения. Результатом этого является более длительная выживаемость аллотрансплантата по сравнению либо с отсутствием введения ингибитора активности комплемента, либо с введением такого ингибитора только во время трансплантации аллотрансплантата. Несмотря на то, что очень часто является желательной выживаемость аллотрансплантата в течение оставшейся продолжительности жизни реципиента, существуют случаи, когда аллотрансплантат требуется только в течение более короткого периода времени, например, промежуточный орган на период времени, пока собственный орган реципиента не сможет самостоятельно восстановиться, и к этому времени аллотрансплантат более не будет нужен. Продолжительность периода времени, в течение которого может быть необходим такой трансплантат, будет варьировать, однако, как правило, она будет составлять более чем период времени, за который происходит острое отторжение, и может быть достаточно длительным для возникновения хронического отторжения. Это требуемый период выживаемости для промежуточного трансплантата может составлять несколько месяцев, например, шесть месяцев.

Для того чтобы показать, что длительное ингибирование активности комплемента будет продлевать выживаемость аллотрансплантата, проводили эксперименты, в которых активацию комплемента ингибировали в хроническом режиме и не только во время трансплантации. Лечение в хроническом режиме означает лечение в течение продолжительного периода вплоть до всей длительности выживания аллотрансплантата. Оно может представлять собой ежедневное лечение, но оно не ограничивается ежедневным лечением. При лечении в хроническом режиме у реципиента аллотрансплантата будет поддерживаться эффективное количество

лекарственного средства. Например, предпочтительным способом является включение в лечение моноклонального антитела против C5 экулизумаба. В исследованиях лиц, страдающих пароксизмальной ночной гемоглобинурией (PNH), экулизумаб вводили в дозе 900 мг/пациент один раз каждые 12-14 суток. Было выявлено, что это дозирование полностью и постоянно блокирует активность терминальных компонентов комплемента и значительно ингибирует симптомы PNH (Hillmen et al., 2004). Вводимая доза способна блокировать эффекты комплемента в течение приблизительно двух недель, после чего экулизумаб инактивируется и удаляется из организма. Таким образом, лечение в хроническом режиме экулизумабом может представлять собой, например, введение 900 мг реципиенту аллотрансплантата один раз каждые две недели в течение оставшейся длительности жизни пациента. Аналогично, при необходимости можно вводить в хроническом режиме другие лекарственные средства, либо каждые сутки, либо по другой схеме, требующейся для поддержания эффективного количества лекарственного средства у реципиента аллотрансплантата. Вследствие того, что хорошо известно, что отторжение трансплантата может быть вызвано более чем только активацией комплемента, например, активностей Т-клеток, эксперименты включали иммуносупрессанты, такие как циклоспорин, для дальнейшего способствования предотвращению отторжения трансплантата.

Предпочтительным способом ингибирования активности комплемента является применение моноклонального антитела, которое связывается с компонентом C5 комплемента и препятствует расщеплению C5. Это препятствует образованию как C5a, так и C5b-9, и в то же время обеспечивает возможность образования C3a и C3b, которое оказывает благоприятное действие у реципиента. Такие антитела, которые являются специфичными к комплементу человека, известны (патент США 6355245). Эти антитела, описанные в патенте США 6355245, включают как целое или полноразмерное антитело (в настоящее время называемое экулизумабом), так и одноцепочечное антитело (в настоящее время называемое пекселизумабом). Сходное антитело против мышинового C5 называется BB5.1 (Frei et al., 1987). BB5.1 применяли в экспериментах, указанных ниже. Антитела для ингибирования активности комплемента не должны представлять собой моноклональные антитела. Они могут представлять собой, например, поликлональные антитела. Кроме того, они могут представлять собой фрагменты антител. Фрагмент антитела включает, но не ограничивается ими, Fab, F(ab'), F(ab')₂, одноцепочечное антитело, доменное антитело и Fv. Более того, специалистам в данной области хорошо известно, что антитела могут быть гуманизированными (Jones et al., 1986), химеризованными или деиммунизированными. Также антитело может содержать мутантный Fc-участок, так что мутантный Fc не активирует комплемент. Антитела, подлежащие применению в настоящем описании, могут представлять собой любые из них. Предпочтительным является применение гуманизированных антител, когда реципиентом аллотрансплантата является человек.

Введение и составы

Введение ингибитора активности комплемента проводят в соответствии со способами, известными специалистам в данной области. Эти ингибиторы предпочтительно вводят до момента трансплантации аллотрансплантата или во время трансплантации с продолжением введения в хроническом режиме. Кроме того, эти ингибиторы можно вводить в процессе криза отторжения, в случае, когда такой криз возникает.

Также настоящее описание относится к применению лекарственного средства, которое ингибирует активность комплемента, и иммуносупрессивного средства для производства лекарственного средства или упаковки с лекарственным средством. Такие лекарственное средство или упаковка с лекарственным средством являются пригодными для продления срока выживаемости аллотрансплантата у реципиента, в частности, для длительной выживаемости аллотрансплантата. В предпочтительных вариантах осуществления, лекарственное средство или упаковка с лекарственным средством получены и изготовлены, чтобы они были пригодными для введения в хроническом режиме реципиенту аллотрансплантата, например, используют стабильные составы. В определенных вариантах осуществления, лекарственное средство или упаковку с лекарственным средством получают и изготавливают, чтобы они были пригодны для одновременного введения лекарственного средства, которое ингибирует активность комплемента, и иммуносупрессивного лекарственного средства реципиенту аллотрансплантата. В определенных вариантах осуществления, лекарственное средство или упаковку с лекарственным средством получают и изготавливают, чтобы они были пригодны для последовательного (в любом порядке) введения реципиенту аллотрансплантата лекарственного средства, которое ингибирует активность комплемента, и иммуносупрессивного лекарственного средства.

Фармацевтическая упаковка настоящего описания может содержать лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, и по меньшей мере одно иммуносупрессивное средство. Фармацевтическая упаковка далее может содержать этикетку, указывающую о введении в хроническом режиме. Фармацевтическая упаковка также может содержать этикетку для самостоятельного введения пациентом, например, реципиентом пересаженного трансплантата, или инструкции для лица, осуществляющего уход за реципиентом пересаженного трансплантата. В определенных вариантах осуществления, лекарственное средство и средство в фармацевтической упаковке входит в состав композиции или в отдельные составы композиций, которые пригодны для введения в хроническом режиме и/или для самостоятельного введения.

Также настоящее описание относится к лиофилизированным составам и составам, пригодным для инъекции. Определенные варианты осуществления относятся к лиофилизированному составу антитела, содержащего антитело, которое ингибирует активность комплемента, и лиопротектор. В предпочтительных вариантах осуществления, состав антитела пригоден для введения в хроническом режиме, например, состав антитела является стабильным. Альтернативные варианты осуществления относятся к системе для инъекций, содержащей шприц; шприц содержит кассету, содержащую антитело, которое ингибирует активность комплемента и входит в состав композиции, пригодной для инъекции.

Антитело, применяемое в различных вариантах осуществления настоящего описания, предпочтительно ингибирует образование терминальных компонентов комплемента или C5a. В определенных вариантах осуществления, антитело, которое ингибирует образование терминальных компонентов комплемента или C5a, представляет собой целое антитело или фрагмент антитела. Целое антитело или фрагмент антитела может представлять собой человеческое, гуманизированное, химеризованное или деиммунизированное антитело или фрагмент антитела. В определенных вариантах осуществления, целое антитело или фрагмент антитела могут ингибировать расщепление компонента C5 комплемента. В определенных вариантах

осуществления, фрагмент антитела представляет собой Fab, F(ab')₂, Fv, доменное антитело, или одноцепочечное антитело. В предпочтительных вариантах осуществления, фрагмент антитела представляет собой пекселизумаб. В альтернативных предпочтительных вариантах осуществления, целое антитело

представляет собой экулизумаб. В определенных вариантах осуществления, лекарственное средство, такое как антитело, которое ингибирует активность комплемента, представлено в единичной дозированной форме, которая может быть особенно пригодной для самостоятельного введения. Аналогично, иммуносупрессивное средство настоящего описания также может быть представлено в единичной дозированной форме. Изготовленный продукт настоящего описания может быть помещен в контейнер, как правило, например, флакон, кассету, предварительно заполненный шприц или одноразовый шприц-ручку. Также можно использовать дозатор, такой как устройство для дозирования, описанное в патенте США 6302855, например, с системой инъекции настоящего описания.

В определенных вариантах осуществления, экулизумаб доставляют по схеме дозирования 600 мг посредством внутривенной инфузии в течение от 25 до 45 минут каждые 7 ± 2 суток в течение первых 4 недель, с последующими 900 мг для каждой пятой дозы следующие 7 ± 2 суток, а после этого 900 мг каждые 14 ± 2 суток. Введение можно проводить посредством внутривенной инфузии в течение от 25 до 45 минут. Перед введением, экулизумаб можно разбавлять до конечной концентрации 5 мг/мл.

"Стабильный" состав представляет собой состав, в котором лекарственное средство (например, антитело) или агент по существу сохраняют его физическую и химическую стабильность и целостность при хранении. Различные способы анализа для измерения стабильности белка доступны в данной области и рассмотрены в Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) и Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993). Стабильность можно определять при выбранной температуре в течение выбранного периода времени. Например, степень агрегации после лиофилизации и хранения можно использовать в качестве индикатора стабильности белка. Например, "стабильный" может представлять собой состав, где в составе менее чем приблизительно 10% и предпочтительно менее чем приблизительно 5% белка находится в качестве агрегата. В других вариантах осуществления, можно определять любое повышение образования агрегатов после лиофилизации и хранения лиофилизированного состава. Например, "стабильный" лиофилизированный состав может представлять собой состав, где повышение агрегации в лиофилизированном составе составляет менее приблизительно 5% и предпочтительно менее приблизительно 3%, при хранении лиофилизированного состава при 2-8°C в течение по меньшей мере одного года. В других вариантах осуществления, стабильность белкового состава можно определять с использованием анализа биологической активности.

"Разбавленный" состав представляет собой состав, который получен растворением лиофилизированного состава белка в разбавителе, чтобы белок был диспергирован в разбавленном составе. Разбавленный состав пригоден для введения (например парентерального введения) пациенту, подлежащему лечению, представляющего интерес белка, и, в определенных вариантах осуществления этого изобретения, он может быть пригоден для подкожного введения.

В определенных вариантах осуществления является предпочтительным изотонический разбавленный состав. Под "изотоническим" подразумевают, что

представляющий интерес состав обладает по существу таким же осмотическим давлением, как и кровь человека. Изотонические составы, как правило, будут обладать осмотическим давлением приблизительно от 250 до 350 мосм.

Изотоничность можно определять с использованием, например, парофазного осмометра или осмометра замораживающего типа.

"Лиопротектор" представляет собой молекулу, которая, при комбинировании с представляющим интерес лекарственным средством (например, антителом), значительно препятствует химической и/или физической нестабильности лекарственного средства (например, антитела), или снижает ее, при лиофилизации и последующем хранении. Иллюстративные лиопротекторы включают сахара, такие как сахароза или трегалоза; аминокислоту, такую как моноглутамат натрия или гистидин; метиламин, такой как бетаин; лиотропную соль, такую как сульфат магния; полиол, такой как трехосновные или высшие спирты сахаров, например глицерин, эритрит, глицерин, арабит, ксилит, сорбит и маннит; пропиленгликоль; полиэтиленгликоль; пюроники и их сочетания. Предпочтительным лиопротектором является нередуцирующий сахар, такой как трегалоза или сахароза.

Лиопротектор добавляют в состав перед лиофилизацией в "лиопротективном количестве", которое означает, что после лиофилизации лекарственного средства (например, антитела) в присутствии лиопротективного количества лиопротектора, лекарственное средство (например, антитело) по существу сохраняет его физическую и химическую стабильность и целостность при лиофилизации и хранении.

Представляющий интерес в настоящем документе "разбавитель" представляет собой разбавитель, который является фармацевтически приемлемым (безопасным и нетоксичным для введения человеку) и пригодным для получения разбавленного состава. Иллюстративные разбавители включают стерильную воду, бактериостатическую воду для инъекции (BWI), pH-буферный раствор (например, фосфатно-солевой буфер), стерильный физиологический раствор, раствор Рингера или раствор декстрозы.

"Консервант" представляет собой соединение, которое можно добавлять в разбавители для существенного снижения бактериального действия в разбавленном составе, облегчая, таким образом, изготовление, например, разбавленного состава для многократного применения. Примеры потенциальных консервантов включают хлорид октадецилдиметилбензиламмония, хлорид гексаметэтония, хлорид бензалкония (смесь хлоридов алкилбензилдиметиламмония, в которых алкильные группы представляют собой соединения с длинной цепью) и хлорид бензэтония. Другие типы консервантов включают ароматические спирты, такие как фенол, бутиловый и бензиловый спирт, алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен, катехол, резорцинол, циклогексанол, 3-пентанол и м-крезол.

"Наполнитель" представляет собой соединение, которое увеличивает массу лиофилизированной смеси и приводит к физической структуре лиофилизированного брикета (например, облегчает получение по существу гомогенного лиофилизированного брикета, который сохраняет структуру с открытыми порами). Иллюстративные наполнители включают маннит, глицин, полиэтилен гликоль и сорбит.

Таким образом, с использованием лиопротектора (предпочтительно сахара, такого как сахароза или трегалоза) можно получать стабильный лиофилизированный состав антитела, при этом лиофилизированный состав можно разбавлять с получением стабильного разбавленного состава, обладающего концентрацией антитела, которая

значительно превышает (например превышает приблизительно в 2-40 раз, предпочтительно превышает в 3-10 раз и наиболее предпочтительно превышает в 3-6 раз) концентрацию антитела в составе до лиофилизации. Такие концентрации белка в разбавленном составе считают особенно пригодными, когда состав предназначен для подкожного введения. Несмотря на очень высокую концентрацию белка в разбавленном составе, разбавленный состав может быть стабильным (т.е. не проявляет значительных или неприемлемых уровней химической или физической нестабильности белка) при 2-8°C в течение по меньшей мере приблизительно 30 суток. См. патент США 6821515. В определенных вариантах осуществления, разбавленный состав является изотоническим.

При разбавлении разбавителем, содержащим консервант (такой как бактериостатическая вода для инъекции, BWFI), разбавленный состав можно применять в качестве состава для многократного применения. Такой состав является пригодным, например, когда субъекту-пациенту требуются частые введения лекарственного средства или антитела и/или агента для лечения хронического медицинского состояния. Преимущество состава для многократного применения состоит в том, что он обеспечивает простоту применения для пациента, снижает отходы, обеспечивая полное применение содержимого флакона, и приводит к значительным снижениям затрат для изготовителя, поскольку несколько доз упаковывают в один флакон (снижение затрат на заполнение и транспортировку).

Также настоящее описание относится к способу получения состава, включающему стадии: (а) лиофилизации смеси антитела и лиопротектора; и (b) разбавления лиофилизированной смеси стадии (а) в разбавителе, чтобы разбавленный состав был изотоническим и стабильным.

Также в настоящем документе предусмотрено изделие, которое содержит: (а) контейнер, в котором находится лиофилизированная смесь антитела и лиопротектора; и (b) инструкции по разбавлению лиофилизированной смеси разбавителем до требуемой концентрации антитела в разбавленном составе. Кроме того, изделие может содержать второй контейнер, в котором находится разбавитель (например бактериостатическая вода для инъекции (BWFI), содержащая ароматический спирт).

В инъекционной системе настоящего описания может использоваться шприц-ручка для доставки, как описано в патенте США 5308341. Шприцы-ручки для доставки лекарственного средства были разработаны для упрощения самостоятельного введения лекарственного средства. Лекарственное средство настоящего описания может представлять собой лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, например антитело, специфичное к компоненту C5 комплемента, и/или иммуносупрессивное средство. Один шприц-ручка для доставки лекарственного средства включает держатель флакона, в который можно подавать инсулин или другое лекарственное средство. Держатель флакона представляет собой удлиненную, обычно трубчатую структуру с проксимальным и дистальным концами. Дистальный конец держателя флакона включает установку для соединения с двухсторонней игольчатой канюлей. Проксимальный конец также включает установку для соединения с корпусом шприца-ручки, который включает приводной механизм и устройство для установки дозы. Одноразовый содержащий лекарственное средство флакон для применения с держателем предшествующего уровня техники включает дистальный конец, обладающий поддающейся прокалыванию упругой пробкой, которую можно прокалывать одним концом двухсторонней игольчатой канюли. Проксимальный конец этого флакона включает пробку, удаляемую смещением, в

гермитичном соединении с цилиндрической стенкой флакона. Этот шприц-ручка для доставки лекарственного средства применяют встраиванием флакона с лекарственным средством в держатель для флакона. Затем корпус шприца-ручки соединяют с проксимальным концом держателя флакона. Корпус шприца-ручки
 5 включает устройство для установки дозы для доставки с помощью шприца-ручки указанной дозы лекарственного средства и приводное устройство для смещения пробки флакона дистально на расстояние, соответствующее выбранной дозе.

Пользователь шприца-ручки помещает двухстороннюю игольчатую канюлю в
 10 дистальный конец держателя флакона, чтобы проксимальный конец игольчатой канюли прокалывал пробку флакона. Затем пациент выбирает дозу и управляет шприцом-ручкой, чтобы сместить пробку дистально и доставить выбранную дозу. Устройство для выбора дозы возвращается к нулевому значению после инъекции выбранной дозы. Затем пациент извлекает и выбрасывает игольчатую канюлю, и
 15 хранит шприц-ручку известного уровня техники в удобном месте для последующего требуемого введения лекарственного средства. Лекарственное средство во флаконе исчерпается после нескольких таких введений лекарственного средства. После этого пациент отделяет держатель флакона от корпуса шприца-ручки. Затем пустой флакон
 20 можно извлечь и выбросить. В держатель флакона можно поместить новый флакон, и держатель флакона и корпус шприца-ручки можно повторно собрать и применять, как объяснено выше.

Таким образом, шприц-ручка для доставки лекарственного средства обычно имеет
 25 приводной механизм для точного дозирования и простоты применения. Механизм для дозирования, такой как вращающаяся ручка, позволяет пользователю точно подбирать количество лекарственного средства, которое будет инъецировано шприцом-ручкой из предварительного упакованного флакона лекарственного средства. Для инъекции дозы лекарственного средства пользователь помещает иглу
 30 под кожу и нажимает на ручку настолько, насколько ее можно нажать. Шприц-ручка может представлять собой полностью механическое устройство или он может быть комбинирован с электронным блоком для точной установки и/или указания дозировки лекарственного средства, которую инъецируют пользователю. См. патент США 6192891.

35 Также в настоящем описании представлены составы с контролируемым или замедленным высвобождением, пригодные для введения в хроническом режиме и/или самостоятельного введения лекарственного средства.

Различные составы можно вводить пациенту, нуждающемуся в лечении (например, реципиенту аллотрансплантата) лекарственным средством (например, антителом
 40 настоящего описания и по меньшей мере одним иммуносупрессивным средством) посредством внутривенного введения в виде болюса или посредством непрерывной инфузии в течение периода времени, внутримышечным, внутривенным, интрацеребральным, подкожным, внутрисуставным, интрасиновиальным,
 45 интратекальным, пероральным, местным или ингаляционным способами.

В определенных вариантах осуществления, состав вводят пациенту посредством подкожного (т.е. под кожу) введения. Для таких целей состав можно инъецировать с использованием шприца. Однако доступны другие устройства для введения состава,
 50 такие как устройства для инъекции (например устройства Inject-ease® и Genject®); шприцы-ручки для инъекций (такие как GenPen®); безыгольные устройства (например MediJector® и BioJector®); и подкожные системы для доставки в форме пластырей.

Настоящие способы и применение описаны на основании представленных ниже примеров, которые предоставлены в качестве иллюстрации и не предназначены для ограничения каким-либо образом описания. Применяют стандартные способы, хорошо известные в данной области или способы конкретно описанные ниже. В настоящем документе используют следующие сокращения: ABMR, опосредуемое антителами отторжение; ACHR, ускоренное гуморальное отторжение; ACR, острое клеточное отторжение; AVR, острое сосудистое отторжение; CsA, циклоспорин; CyP, циклофосфамид; HAR, сверхострое отторжение; MCP-1, моноцитарный хемотактический белок 1; MST, среднее время выживаемости; POD, сутки после операции.

Пример 1

Способы

Животные и иммуносупрессивные лекарственные средства

В качестве доноров и реципиентов были выбраны взрослые самцы мышей C3H (H-2^k) и мышей BALB/c (H-2^d) (Jackson Labs, Bar Harbor, Maine) массой 25-30 г, соответственно. В группах, в которых проводили иммуносупрессию, реципиентам инъектировали CsA (15 мг/кг/сутки, подкожно, каждые сутки начиная с 0 суток до конечного отторжения или 100 суток), или CyP (40 мг/кг/сутки, внутривенно, на 0 и 1 сутки), или mAb против C5 (клон BB5.1, Alexion Pharmaceuticals Inc., 40 мг/кг/сутки, внутривенно, 0-2 сутки, а затем два раза в неделю, сутки 0-60). Животных содержали в общепринятых условиях в Animal Care Facility, University of Western Ontario, и осуществляли уход за ними в соответствии с рекомендациями, установленными Canadian Council on Animal Care. Olfert et al., 1993.

Кожная пресенсибилизация

Лоскуты кожи на всю толщину, полученные от доноров C3H, разрезали на четырехугольные фрагменты 1×1 см² и трансплантировали на заднюю часть грудной клетки реципиентов BALB/c за одну неделю до трансплантации сердца от тех же доноров. Отторжение определяли как полный некроз трансплантатов кожи.

Абдоминальная и цервикальная трансплантация

Через семь суток после кожной пресенсибилизации сердца мышей C3H трансплантировали в брюшную полость пресенсибилизированных реципиентов BALB/c с помощью анастомоза аорты донора и аорты реципиента, и легочной артерии донора и нижней полой вены реципиента. В группах с повторной трансплантацией, вторые трансплантаты сердца, полученные либо от интактных мышей C3H, либо от пресенсибилизированных реципиентов BALB/c с длительной выживаемостью трансплантировали в шейную область реципиентов, обладающих первым абдоминальным трансплантатом сердца с длительной выживаемостью, посредством анастомоза донорской аорты и сонной артерии реципиента, и легочной артерии донора и наружной яремной вены реципиента (конец-в-бок). Трансплантаты сердец подвергали мониторингу каждые сутки до отторжения, если нет иных указаний, и отторжение определяли как полное прекращение пульсации.

Экспериментальные группы

Пресенсибилизированных реципиентов случайным образом разделяли на восемь групп, каждая из которых состояла из восьми животных: группа 1, мыши без лечения; группа 2, мыши, которым вводили CsA; группа 3, мыши, которым вводили CyP; группа 4, мыши, которым вводили CsA плюс CyP; группа 5, мыши, которым вводили mAb против C5; группа 6, мыши, которым вводили mAb против C5 плюс CsA; группа 7, мыши, которым вводили mAb против C5 плюс CyP; группа 8, мыши,

которым вводили mAb против C5 в сочетании с CsA и CyP. Когда сердечные импульсы более не прощупывались или на POD100, трансплантаты извлекали для обычной гистологии, иммуногистохимии и вестерн-блот анализа, образцы сыворотки собирали для проточного цитометрического анализа и анализа гемолиза комплементом. В группы 6 и 8 включили пять дополнительных животных и умерщвляли на POD3 (MST для групп 1-5, 7) для сравнений в одинаковые моменты времени. Также в группе 8 собирали образцы сыворотки также на POD 11, 21, 28 и 60 для детекции последовательных изменений уровней противодонорских антител и активности комплемента. Кроме того, когда пресенсибилизированные реципиенты, которым проводили тройную терапию, выдерживали первый трансплантат сердца в течение 100 суток, им повторно трансплантировали второе сердце. В качестве второго сердца использовали интактное сердце C3H или сердце C3H, выжившее после 100 суток, из другого пресенсибилизированного реципиента BALB/c. В каждую группу повторной трансплантации было включено восемь животных.

Гистология трансплантатов

Образцы тканей фиксировали в 10% забуференном формальдегиде. Затем образцы погружали в парафин и разрезали для окрашивания H&E. Микроскопические срезы слепым образом исследовал патолог в отношении тяжести отторжения. Критерии отторжения трансплантата включали наличие васкулита, тромбоза, геморрагии и инфильтрации лимфоцитов. Эти изменения оценивали следующим образом: 0, нет изменений; 1, минимальное изменение; 2, мягкое изменение; 3, умеренное изменение; или 4, выраженное изменение.

Иммуногистохимия

Получали срезы образцов, погруженных в гель Tissue-Tek O.C.T (Optimum Cutting Temperature, Skura Finetek, Torrance, CA) толщиной четыре микрометра, их помещали на покрытые желатином стеклянные предметные стекла для микроскопа и окрашивали стандартным непрямым способом окрашивания иммунопероксидазой с помощью авидин-биотины с использованием набора Elite Vcctastain ABC (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA). Образцы окрашивали в отношении клеток CD4⁺ и CD8⁺ посредством конъюгированного с биотином mAb крысы против CD4 мыши (клон YTS 191.1.2, Cedarlane Laboratories Ltd., Hornby, Ontario, Canada) и конъюгированного с биотином mAb крысы против CD8 мыши (clone 53-6,7, Pharmingen, Franklin Lakes, NJ), соответственно. Инфильтрацию моноцитов/макрофагов в трансплантат определяли окрашиванием посредством конъюгированного с биотином mAb крысы против Mac-1 мыши (Cedarlane Laboratories Ltd., Hornby, Ontario, Canada). Отложение IgG и IgM мыши в трансплантатах определяли с использованием конъюгированного с биотином антитела козы против IgG мыши и антитела козы против IgM мыши (Cedarlane). Для идентификации отложения комплемента, срезы серийно инкубировали с поликлональными Ат козы против C3 или против C5 (Quidel, San Diego, CA), биотинилированным антителом кролика против IgG козы (Vector Laboratories), и конъюгированным с HRP стрептавидином (Zymed Laboratories, South San Francisco, CA). Между стадиями предметные стекла промывали фосфатно-солевым буфером, и исследовали под световым микроскопом. Отрицательные контроли получали, исключая первичные антитела. Иммунное окрашивание оценивали в пяти полях зрения под большим увеличением каждого среза, и проводили пять независимых экспериментов. Срезы окрашивания иммунопероксидазой градуировали от 0 до 4+ в соответствии с интенсивностью окрашивания: 0, отрицательная; 1+, неопределенная; 2+, слабое окрашивание; 3+, умеренное окрашивание; и 4+ очень интенсивное

окрашивание.

Проточная цитометрия

Циркулирующие антидонорские специфичные к IgG и IgM антитела оценивали в сыворотке реципиентов посредством проточной цитометрии FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Glotz et al., (1993); Tyan et al. (1994). В кратком изложении, спленоциты мышей СЗН выделяли и инкубировали при 37°C в течение 30 минут с сывороткой из группы интактного контроля и экспериментальных групп. Для окрашивания на общий IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b и IgM, клетки промывали и инкубировали с конъюгированным с FITC антителом козы, специфичным к Fc-участку мышинового IgG или с конъюгированным с фикоэритрином антителом козы, специфичным к μ -цепи мышинового IgM (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA), или с конъюгированным с FITC антителом козы против мышинных IgG1 (CALTAG Laboratories, Burlingame, CA), или с конъюгированным с FITC антителом козы против IgG2a мыши (CALTAG), или с конъюгированным с FITC антителом козы против IgG2b мыши (CALTAG). После окрашивания в течение 1 часа при 4°C, клетки промывали посредством PBS, ресуспендировали в количестве 5×10^6 /мл, и анализировали проточной цитометрией на среднюю канальную интенсивность флуоресценции, которая соответствует антитело-связывающей реакционной способности.

Анализ гемолиза комплементом

Проводили серийные двукратные разведения очищенного mAb против C5 (175-0,1 мкг/мл) в буфере GVB²⁺ (буферный солевой раствор с желатином и вероналом: 0,1% желатин, 141 мМ NaCl, 0,5 мМ MgCl₂, 0,15 мМ CaCl₂ и 1,8 мМ барбитал натрия) и добавляли по три экземпляра (50 мкл/лунка) в 96-луночный планшет. Сыворотку мышей BALB/c разбавляли до 40% об./об. посредством буфера GVB²⁺ и добавляли (50 мкл/мл) в ряды того же 96-луночного планшета, чтобы конечная концентрация сыворотки мышей BALB/c в каждой лунке составляла 20%. Затем планшет инкубировали при комнатной температуре в течение приблизительно 30 мин, и в это время получали куриные эритроциты. Куриные эритроциты промывали 5×1 мл посредством буфера GVB²⁺ и ресуспендировали до конечной концентрации 5×10^7 /мл в GVB²⁺. Четыре миллилитра куриных эритроцитов подвергали сенсibilизации добавлением поликлонального антитела против куриных RBC (Intercell Technologies, Norwell, NJ, 0,1% об./об.) и клетки инкубировали при 4°C в течение 15 мин при частом встряхивании. Затем клетки промывали 2×1 мл посредством GVB²⁺ и ресуспендировали до конечного объема 2,4 мл в GVB²⁺. Куриные эритроциты (30 мкл/лунка $2,5 \times 10^6$ клеток) добавляли в планшет, содержащий сыворотку и mAb против C5, как описано выше, хорошо перемешивали, и инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Затем планшет центрифугировали при 1000xg в течение 2 мин, и 85 мкл супернатанта переносили в новый 96-луночный микропланшет для титрования. Считывание планшетов проводили при OD 415 нм с использованием устройства для считывания микропланшетов и процентный гемолиз определяли с использованием данной формулы:

$$\% \text{ гемолиза} = 100 \times \frac{(OD \text{ образца}) - (OD \text{ GVB}^{2+} \text{ контроля})}{(OD \text{ 100\% лизированного контроля}) - (OD \text{ GVB}^{2+} \text{ контроля})}$$

где 100% лизированный контроль был получен добавлением к куриным эритроцитам, полученным как описано выше, 100 мкл GVB²⁺, содержащего 0,1% NP-40, в концентрации 30 мкг/мл.

Вестерн-блот анализ

Обработку ультразвуком замороженных образцов сердец проводили в буфере для лизиса RIPA (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) при 4°C в течение 1 минуты с интервалами 10 секунд, с последующим микроцентрифугированием при 13000 об./мин в течение 10 минут при 4°C. Очищенные супернатанты сразу подвергали подсчету в трех экземплярах на содержание белка с использованием набора для анализа совместимого с детергентом белка (BIO-RAD). Лизаты сердца (100 мкг белка/лунка) разделяли на 4-12% градиентных бис-трис-гелях NuPAGE, и буферной системе MES (Invitrogen) и переносили на поливинилидендифторидную (PVDF) мембрану (размер пор 0,45 мкм; Invitrogen) с использованием устройства для полусухого переноса (BIO-RAD). Мембраны разрезали соответствующим образом в области правильных молекулярных масс для проявления блотов двумя различными первичными антителами на блот, чтобы каждый блот был подвергнут воздействию тестируемого антитела и внутреннего контрольного антитела, чтобы убедиться в равномерном нанесении образца. Для детекции экспрессии белков Bcl-2 и Bcl-x1 внутри трансплантата использовали первичные антитела, включающие поликлональные сыворотки кролика против Bcl-2 (N-19) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) и поликлональные сыворотки кролика против Bcl-XS/L (M-125) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). В качестве внутреннего контрольного первичного антитела использовали поликлональные сыворотки кролика против кальсеквестрина (Calbiochem) (Kobayashi et al., 1999). Детекцию связывания первичного антитела проводили, как описано ранее (Arg et al., 1996) посредством воздействия на промытые инкубированные блоты фракции поликлональных антител козы против IgG кролика, конъюгированных с пероксидазой хрена (HRP; Roche Laboratories), а затем соответствующим образом проявленных посредством воздействия для усиления хемилюминесценции конъюгированными с HRP антителами (Roche Laboratories).

Статистический анализ

Данные были представлены в качестве среднего значения $\pm$ SD. Выживаемость аллотрансплантата среди экспериментальных групп сравнивали с использованием знаково-рангового теста. Гистологические и иммуногистологические данные анализировали с использованием U-теста Манна-Уитни. Данные проточной цитометрии и данные вестерн-блот анализа анализировали с использованием одностороннего ANOVA. Значимыми считали отличия со значениями p менее 0,05.

Пример 2

Пресенсибилизация посредством кожного лоскута донора СЗН индуцирует опосредуемое антителами АСНН аллотрансплантатов сердца реципиентов BALB/c.

Для разработки пригодной модели на небольших животных, которая имитирует пресенсибилизированных пациентов в клинике и для исследования АВМР, была разработана новая модель АВМР у полностью соответствующих по МНС мышей посредством пресенсибилизации мышей-реципиентов. В этой модели, реципиентов BALB/c пресенсибилизировали лоскутами кожи доноров СЗН за одну неделю до трансплантации сердца того же донора. Через семь суток после пресенсибилизации кожей донора, уровень антидонорских антител IgG, но не антител IgM, у пресенсибилизированных реципиентов BALB/c был значительно повышен и достиг пикового уровня (фигура 1А). Затем у этих высокосенсибилизированных реципиентов проводили трансплантацию сердца от того же донора. Без иммуносупрессии, трансплантаты сердца СЗН быстро отторгались в течение $3,1 \pm 0,4$ суток вследствие АСНН, характеризующегося тяжелым тромбозом,

геморрагией и инфарктом (фигура 1B-a). В противоположность этому, некоторые трансплантаты сердца у несенсибилизированных реципиентов BALB/c (со средним временем выживаемости, MST $8,2 \pm 0,8$ суток) показали нормальную гистологию на 3

сутки после операции (POD) (фигура 1B-b). При сравнении с несенсибилизированными

реципиентами BALB/c на те же сутки, трансплантаты сердца у

пресенсибилизированных животных показали массивное отложение антител IgG и

компонентов комплемента (C3 и C5), но минимальную инфильтрацию клеток CD4⁺

и CD8⁺ (таблица 1). Более того, циркулирующие уровни антидонорских IgG у

пресенсибилизированных реципиентов были значительно выше, чем у

несенсибилизированных тех же реципиентов, которым была проведена

трансплантация сердца на POD3 ($P < 0,01$, фигура 1C). Однако антидонорские IgM

оставались на очень низких уровнях как в кровотоке (фигура 1C), так и в

трансплантатах сердца (таблица 1) и для них не было показано значимых отличий

между несенсибилизированными и пресенсибилизированными реципиентами. Кроме

того, нормальные уровни гемолитической активности комплемента были показаны

как у пресенсибилизированных, так и у несенсибилизированных реципиентов сердца

без лечения (фигура 1D). Эти данные указывают на то, что эта модель является

идеальной для исследования ABMR у пресенсибилизированных реципиентов, в

патогенезе которого комплемент играет важную роль.

Таблица 1

Сравнение иммуногистологических изменений аллотрансплантатов сердца C3H у несенсибилизированных и пресенсибилизированных реципиентов BALB/c на POD3

Группы	Несенсибилизированные	Пресенсибилизированные
IgG	1+	4+
IgM	1+	1+
C3	2+	3+
C5	2+	3+
CD4	0	1+
CD8	0	1+

Степени окрашивания иммунопероксидазой: 0, отрицательное; 1+, неопределенное; 2+, слабое; 3+, умеренное; 4+, интенсивное.

mAb против C5 в сочетании с CsA и CyP препятствует ABMR и приводит к неограниченной выживаемости аллотрансплантата сердца у пресенсибилизированных мышеч-реципиентов.

Было показано, что комплемент играет важную роль в ABMR. Однако ингибиторный эффект функционального блокирования терминальных каскада

компонентов комплемента на уровне C5 у высокосенсибилизированных реципиентов

неизвестен. В представленном в настоящем документе исследовании, модель

пресенсибилизации использовали для исследования эффективности mAb против C5

либо отдельно, либо в сочетании с CsA и /или CyP, в отношении

предотвращения ABMR. Как представлено на фигуре 2A, введение либо CsA,

либо CyP, либо двух лекарственных средств в сочетании, не предотвращает ABMR и

трансплантаты отторгались на $3,0 \pm 0,0$ суток, $3,3 \pm 0,5$ суток и $3,5 \pm 0,6$ суток,

соответственно, с типичными патологическими признаками ACHR, включающими

внутрисосудистый тромбоз и интерстициальную геморрагию (фигура 2B-b, c, d),

которые были неотличимы от трансплантатов сердца у не подвергавшихся лечению

пресенсибилизированных реципиентов BALB/c (фигура 2B-a). Монотерапия против C5

или комбинированная с CyP не была способна улучшить выживаемость

трансплантата и трансплантаты сердца отторгались посредством ACHR (фигура 2B-e,

f) через $3,5 \pm 0,6$ суток и $3,2 \pm 0,4$ суток, соответственно (фигура 2A). Несмотря на то, что комбинированная терапия mAb против C5 и CsA, что представляет собой протокол, способный индуцировать длительную выживаемость аллотрансплантата сердца у несенсибилизированных животных, немного продлевала выживаемость трансплантата в этой модели с пресенсибилизацией, трансплантаты сердца также отторгались посредством тяжелого гуморального отторжения с васкулитом, тромбозом, геморрагией и минимальной клеточной инфильтрацией (фигура 2B-g) в течение $11,9 \pm 1,8$ суток (фигура 2A). В противоположность этому, тройная терапия mAb против C5 в сочетании с CsA и CyP приводила к неограниченной выживаемости трансплантата сердца в течение 100 суток (фигура 2A) у пресенсибилизированных животных ($P < 0,01$ относительно животных без лечения или которым проводили монотерапию или вводили два лекарственных средства в сочетании) без признаков отторжения (фигура 2B-h). В этой модели на пресенсибилизированных мышках, как показано в таблице 2, наблюдали только минимальную инфильтрацию в трансплантате клеток $CD4^+$ и $CD8^+$ у реципиентов, у которых произошло отторжение их трансплантатов сердец в течение 3 суток. Однако если трансплантаты сердца выживали дольше, количество этих Т-клеток было немного повышено у реципиентов, которым вводили mAb против C5 плюс CsA во время отторжения (POD11) и у реципиентов, которым проводили тройную терапию на ранних стадиях выживания трансплантата (например POD11). Более того, при непрерывном введении CsA в группе с тройной терапией, инфильтрация клеток $CD4^+$ и $CD8^+$ была ингибирована в трансплантатах сердец с длительной выживаемостью на POD60 и 100. Кроме того, умеренная инфильтрация клеток Mac-1⁺ в трансплантат, включая моноциты и макрофаги, была выявлена у не подвергавшихся лечению животных и у животных, которым вводили CsA-, CyP- или CsA плюс CyP, в то время как инфильтрация этих клеток была значительно снижена у животных, которым вводили mAb против C5 (таблица 2). Эти результаты указывают на то, что функционально блокирующие mAb против C5 обеспечивает применение и эффективность общепринятых иммуносупрессивных средств, предотвращая посредством этого ABMR и вызывая неограниченную выживаемость трансплантатов сердца у пресенсибилизированных реципиентов.

Таблица 2

Степень окрашивания иммунопероксидазой аллотрансплантатов сердца у пресенсибилизированных реципиентов-мышей при некропсии

Группы	Дата сбора образцов (POD)	C3	C5	CD4	CD8	Mac-1	IgG	IgM
Без лечения	3	3+	3+	1+	1+	3+	4+	1+
CsA	3	3+	3+	1+	1+	3+	4+	1+
CyP	3	3+	3+	1+	1+	3+	3+	1+
CsA+CyP	3	3+	3+	1+	1+	3+	3+	1+
mAb против C5	3	3+	0	1+	1+	2+	4+	1+
mAb против C5+CsA	11	3+	0	2+	2+	2+	4+	1+
mAb против C5+CyP	3	3+	0	1+	1+	2+	3+	1+
mAb против C5+CsA+CyP	3	3+	0	1+	1+	2+	3+	1+
mAb против C5+CsA+CyP	11	3+	0	2+	2+	1+	3+	1+
mAb против C5+CsA+CyP	60	3+	0	1+	1+	0	2+	1+
mAb против C5+CsA+CyP	100	3+	2+	0	0	0	2+	1+

Степени: 0, отрицательное; 1+, неопределенное; 2+, слабое; 3+, среднее; 4+, интенсивное.

mAb против C5 полностью ингибирует общую гемолитическую активность комплемента и локальное отложение C5 у пресенсибилизированных реципиентов, которым провели аллотрансплантацию сердца.

Ранее было показано, что mAb против C5 блокирует расщепление белка C5 комплемента на провоспалительные молекулы C5a и C5b-9 (Kxoshus et al., 1995), и полностью и постоянно блокирует активность терминальных компонентов комплемента у мышей (Wang et al., 1999). В текущем исследовании, активность терминального компонента комплемента измеряли посредством оценки способности сыворотки мыши-реципиента лизировать пресенсибилизированные антителом куриные эритроциты, и сравнивали в один момент времени (POD3). Введение мышам либо CsA, либо CyP, либо двух лекарственных средств в сочетании, не оказывало эффекта на активность терминальных компонентов комплемента, в то время как введение mAb против C5 либо отдельно, либо в сочетании с CsA или/и CyP полностью ингибировало эту активность (фигура 3; $P < 0,01$, против интактных и не подвергавшихся лечению животных, а также животных, которым вводили CsA-, CyP-, или CsA плюс CyP). Кроме того, сыворотки, полученные от животных, которым вводили mAb против C5, в несколько более ранних моментов времени, показали сходным образом сниженную гемолитическую активность, позволяя предположить, что терминальные компоненты комплемента сыворотки были ингибированы на протяжении всего периода введения. Более того, локальное депонирование C5 в трансплантатах сердца было полностью предотвращено у пресенсибилизированных реципиентов, которым вводили mAb против C5, но не у пресенсибилизированных животных, не подвергавшихся лечению, или пресенсибилизированных животных, которым вводили CsA, CyP и CsA плюс CyP (таблица 2). Как предсказано, введение mAb против C5 не препятствовало отложению C3 в трансплантатах (таблица 2). Эти результаты позволяют предположить, что терапия против C5 полностью блокирует общую активность комплемента после аллотрансплантации сердца у высоко сенсibilизированных реципиентов.

Трансплантаты сердца с длительным выживанием у пресенсибилизированных животных являются устойчивыми к гуморальному повреждению в присутствии низкого уровня антидонорских антител и комплемента - ситуация адаптации.

Для дальнейшего исследования роли mAb против C5 в гуморальном отторжении, в различных группах измеряли уровни антидонорских аллоантител в сыворотке реципиентов посредством проточной цитометрии, и отложение антитела в трансплантате с использованием способов иммунного окрашивания. На фигуре 4А показано, что на POD3 пресенсибилизированные реципиенты BALB/c без лечения обладали высокими уровнями циркулирующих антидонорских антител IgG. Когда пресенсибилизированным реципиентам либо проводили монотерапию, либо вводили два лекарственных средства в сочетании, CsA и/или CyP частично снижали уровни циркулирующих антидонорских IgG, в то время как введение mAb против C5 либо отдельно, либо в сочетании с CsA или CyP далее не влияло на уровни антидонорских антител на те же сутки. В противоположность этому, в случае тройной терапии mAb против C5, CsA и CyP, высокий уровень циркулирующих антидонорских IgG постепенно снижался и достигал низкого уровня на POD60, оставаясь на этом уровне до 100 суток (фигура 4В). Аналогично уровням циркулирующих антител в различных группах по введению, в таблице 2 показано, что выраженное отложение противомышиных IgG было представлено в подвергшихся быстрому отторжению трансплантатах сердца пресенсибилизированных животных без лечения или которым

проводили монотерапию или вводили два лекарственных средства в комбинированной терапии. Интересно, что в случае тройной терапии, отложение антител IgG постепенно снижалось до слабого уровня в трансплантатах сердца с длительным выживанием на POD 100 (фигура 4C-a, таблица 2). В этой модели, IgM оставались на очень низком уровне как в кровотоке (фигура 4A, B), так и в пересаженных трансплантатах сердца (фигура 4C-b, таблица 2) у пресенсибилизированных реципиентов с лечением и без него. Кроме того, введение mAb против C5 устраняло активность комплемента до не поддающегося детекции уровня до 60 суток, с последующим прогрессирующим восстановлением до уровней перед устранением на POD 100 после прекращения терапии против C5 у пресенсибилизированных реципиентов-мышей, которым проводили тройную терапию (фигура 4D). Более того, также у пресенсибилизированных животных после 100 суток измеряли отложение в трансплантате C5 (таблица 2). Эти данные показывают, что, несмотря на наличия антител против трансплантата и активацию комплемента, у пресенсибилизированных реципиентов, которым проводили тройную терапию, происходила адаптация трансплантата.

MAb против C5 в сочетании с CsA и CyP снижает соотношение IgG1/IgG2a и приводит к переключению подкласса IgG на IgG2b у реципиентов с адаптированными трансплантатами.

Для определения того, может ли тройная терапия на основе mAb против C5 индуцировать переключение подкласса IgG, которое может быть ассоциировано с адаптацией, сравнивали сывороточные уровни подклассов антидонорских IgG: IgG1, IgG2a и IgG2b, между реципиентами без лечения и реципиентами с адаптированным трансплантатом сердца. Сыворотки от реципиентов без лечения содержали преобладающий изотип IgG1, показанный по высокому соотношению IgG1/IgG2a (фигура 5A). Напротив, значимое снижение соотношения IgG1/IgG2a наблюдали у реципиентов, обладающих адаптированными трансплантатами (фигура 5A, $P < 0,01$). Более того, пресенсибилизированные реципиенты с адаптированными трансплантатами сердца обладали повышенным уровнем антидонорских IgG2b по сравнению с теми же реципиентами с отторжением трансплантатов (фигура 5B, $P < 0,01$). Кроме того, паттерн изотипов IgG у реципиентов, которым либо проводили монотерапию, либо вводили два лекарственных средства в сочетании, не отличается от паттерна животных без лечения. Эти данные указывают на то, что антидонорский изотип IgG1 может быть ассоциирован с отторжением трансплантата, в то время как образованный антидонорский подкласс IgG2b может функционировать в качестве защитного антитела и играет важную роль в индукции адаптации.

MAb против C5 в сочетании с CsA и CyP индуцирует экспрессию внутри трансплантата Bcl-2 и Bcl-x1 у высокосенсибилизированных мышей-реципиентов.

В целях определения того, существует ли причинная связь между экспрессией в трансплантате защитных белков и устойчивостью трансплантата к гуморальному повреждению в этой модели, использовали вестерн-блот анализ для детекции представляющих интерес белков в тканях трансплантата сердца из высокосенсибилизированных мышей-реципиентов. Было выявлено, что трансплантаты сердца с длительной выживаемостью экспрессируют высокие уровни белков Bcl-2 и Bcl-x1 на POD 100, и эти белки были выявлены уже на 12 сутки после трансплантации сердца у высокосенсибилизированных реципиентов, которым проводили тройную терапию на основе mAb против C5 (фигура 6). Напротив, в

трансплантатах сердца животных без лечения (фигура 6) или животных, которым либо проводили монотерапию, либо вводили два лекарственных средства в комбинированной терапии, не происходило экспрессии белков Bcl-2 и Bcl-x1. Этот результат позволяет предположить, что устойчивость трансплантата к гуморальному повреждению у животных с неограниченной выживаемостью ассоциирована с защитой, обеспечиваемой белками Bcl-2 и Bcl-x1, в этой модели с пресенсибилизацией.

У пресенсибилизированных реципиентов с адаптацией первого трансплантата сердца происходит адаптация трансплантата второго адаптированного сердца, но отторжение второго интактного трансплантата сердца из тех же доноров.

Способность адаптированных трансплантатов противостоять отторжению не была тестирована в патофизиологических условиях, где интактные трансплантаты подвергаются отторжению после аллотрансплантации. В этой модели для определения того, произойдет ли у пресенсибилизированных реципиентов с первым адаптированным трансплантатом сердца адаптация второго адаптированного трансплантата, но отторжение второго интактного трансплантата, проводили программу повторной трансплантации. После выживания у пресенсибилизированного реципиента BALB/c, которому проводили тройную терапию на основе mAb против C5, адаптированных трансплантатов сердца C3H до 100 суток, когда были выявлены низкие уровни аллоантител (фигура 4B) и активность комплемента вернулась к уровням до введения (фигура 4D), этим реципиентам проводили трансплантацию второго сердца. Конкретно, либо интактное (фигура 7A), либо адаптированное в течение 100 суток сердце C3H (фигура 7B) из другого пресенсибилизированного реципиента BALB/c трансплантировали в шею пресенсибилизированных реципиентов, обладающих адаптированным первым сердцем C3H. У этих реципиентов происходило отторжение второго интактного сердца на $6,6 \pm 1,1$ сутки (фигура 8A) с тяжелым AVR (фигура 8B-a), в то время как выживание первого сердца продолжалось. Напротив, когда адаптированные сердца, которые уже выжили в течение 100 суток у различных пресенсибилизированных мышей, использовали в качестве вторых трансплантатов, эти трансплантаты адаптировались у пресенсибилизированных реципиентов, обладающих адаптированным первым трансплантатом сердца (фигура 8A). Отсутствовали признаки отторжения у реципиентов, у которых прижились вторые трансплантаты сердца через 90 дней после второй трансплантации (фигура 8B-b). Эти данные указывают на то, что адаптированные трансплантаты становятся устойчивыми к эффектам антидонорских антител и комплемента, которые в норме опосредуют отторжение аллотрансплантата у этих пресенсибилизированных реципиентов. Более того, тот факт, что у хозяина адаптированного трансплантата происходило отторжение нового трансплантата, позволяет предположить, что адаптация вовлекает изменения в трансплантате.

У пресенсибилизированных реципиентов, которым вводили CsA, происходит отторжение адаптированных трансплантатов сердца.

Другую повторную трансплантацию проводили для определения того, может адаптация в этой модели с пресенсибилизацией быть вызвана изменениями в трансплантатах и/или они происходят у реципиентов. Конкретно, после адаптации трансплантатов сердца C3H у пресенсибилизированных мышей BALB/c в течение 100 суток, адаптированный трансплантат сердца будут повторно трансплантировать второму пресенсибилизированному реципиенту BALB/c, которому вводят CsA отдельно (фигура 7C), что представляет собой терапию, которая может предотвратить клеточное отторжение, но не может предотвратить ускоренное гуморальное

отторжение свежего сердца СЗН у пресенсибилизированных реципиентов.

Адаптированные трансплантаты сердца СЗН быстро отторгались у пресенсибилизированных реципиентов BALB/c, которым вводили CsA. После повторной трансплантации патология в адаптированных трансплантатах сердца

5 изменялась с нормальной (фигура 9А) до тяжелого АСНР с массивной интерстициальной геморрагией, но немногочисленными клеточными инфильтратами (фигура 9В). Кроме того, высокие уровни антидонорских IgG и нормальные уровни гемолитической активности комплемента у этих реципиентов, которым пересаживали

10 адаптированное сердце СЗН, были сходными с уровнями пресенсибилизированных реципиентов с пересаженным интактным сердцем СЗН, которым вводили CsA. Кроме того, этот результат указывает на то, что адаптация, индуцированная тройной терапией на основе mAb против C5 может происходить вследствие механизмов, вовлекающих изменения не только в трансплантате, но также и у реципиента.

15 Пример 3

Острое сосудистое отторжение в модели трансплантации сердца

Эксперименты проводили для определения того, ослабляет ли включение ингибитора образования терминального компонента комплемента острое сосудистое

20 отторжение и приводит ли применение такого ингибитора совместно с иммуносупрессантом к длительной выживаемости аллотрансплантата. В этой группе экспериментов, моноклональное антитело против C5 использовали совместно с циклоспорином. Используемая модель представляла собой пересадку гетеротопного аллотрансплантата сердца из мышей СЗН мышам BALB/c. Эта модель представляет

25 собой точную модель острого сосудистого отторжения со строгим несоответствием мышей СЗН и BALB/c по МНС. Способы трансплантации и другие способы проводили, как описано в Wang et al. (2003).

Гетеротопная трансплантация сердца

30 Внутривентрикулярную гетеротопную трансплантацию сердца проводили, как описано ранее Wang et al. (2003). В кратком изложении, проводили срединную стернотомию у донора, и трансплантат сердца медленно перфузировали *in situ* посредством 1,0 мл холодного гепаринизированного лактатного раствора Рингера через нижнюю полую вену и аорту, а затем верхнюю полую вену и легочные вены лигировали и отделяли.

35 Восходящую аорту и легочную артерию пересекали, и трансплантат извлекали из донора. Затем осуществляли реваскуляризацию трансплантата посредством анастомозов конец-в-бок между легочной артерией донора и нижней полую вену реципиента, а также аортой донора и брюшной аортой реципиента с использованием

40 нейлоновых нитей 11-0. Мониторинг пульсации пересаженного сердца проводили каждые сутки непосредственно брюшной пальпацией. Степень пульсации оценивали следующим образом: А, сильная пульсация; В, заметное снижение интенсивности пульсации; или С, полное прекращение сердечных импульсов. Когда сердечные импульсы более не пальпировались, трансплантат удаляли для обычной гистологии. В

45 некоторых случаях, для проведения гистологии умерщвляли мышей, у которых трансплантат еще функционировал.

Результаты

Мышей (самцов в возрасте 8-12 недель с массой 25 - 30 г) разделяли на шесть

50 экспериментальных групп, от шести до восьми мышей на группу. Трансплантацию проводили на 0 сутки. Гистологические изменения определяли в конечный момент (конечным моментом является отторжение трансплантата) или в некоторых случаях мышью умерщвляли до отторжения трансплантата. Из более ранних исследований

было известно, что дозировка BB5.1, которую вводили (40 мг/кг массы тела три раза в неделю), полностью ингибирует активность терминальных компонентов комплемента.

Группа 1' (контроль) - мышам вводили 0,75 мл физиологического раствора внутрибрюшинно на -1, 0, 1 и 2 сутки. После этого этим мышам вводили 0,75 мл физиологического раствора внутрибрюшинно три раза в неделю (понедельник, среда, пятница) до конечного момента.

Группа 2' (циклоспорин А отдельно) - мышам вводили 15 мг/кг массы тела циклоспорина А подкожно каждые сутки, начиная с 0 суток (день трансплантации) до конечного момента.

Группа 3' (антитело против комплемента отдельно) - мышам вводили антитело против C5 мыши BB5.1 (Frei et al., 1987) в дозе 40 мг/кг массы тела внутрибрюшинно на -1, 0, 1 и 2 сутки, а затем 40 мг/кг массы тела вводили три раза в неделю (понедельник, среда, пятница) до конечного момента.

Группа 4' (антитело против комплемента до 14 суток после трансплантации плюс циклоспорин А) - мышам вводили антитело против C5 мыши BB5.1 в дозе 40 мг/кг массы тела внутривенно с -1 по 14 сутки и также вводили циклоспорин А в дозе 15 мг/кг массы тела каждые сутки, начиная с 0 суток до конечного момента. Следует отметить, что это отличается от других групп тем, что BB5.1 вводили внутривенно и каждые сутки.

Группа 5' (антитело против комплемента до 28 суток после трансплантации плюс циклоспорин А) - мышам вводили антитело против C5 мыши BB5.1 в дозе 40 мг/кг массы тела внутрибрюшинно на -1, 0, 1 и 2 сутки, а затем 40 мг/кг массы тела вводили три раза в неделю (понедельник, среда, пятница) до 28 суток, а также вводили циклоспорин А в количестве 15 мг/кг массы тела каждые сутки, начиная с 0 суток до конечного момента.

Группа 6' (антитело против комплемента в хроническом режиме до 100 суток плюс циклоспорин) - мышам вводили антитело против C5 мыши BB5.1 в дозе 40 мг/кг массы тела внутрибрюшинно на -1, 0, 1 и 2 сутки, а затем 40 мг/кг массы тела вводили три раза в неделю (понедельник, среда, пятница) до 100 суток, а также вводили циклоспорин А в дозе 15 мг/кг массы тела каждые сутки, начиная с 0 суток до 100 суток.

Результаты этого эксперимента представлены в таблицах 3 и 4. В таблице 3 показано время выживаемости трансплантатов. В таблице 4 указаны гистологические показатели.

Таблица 3 Выживаемость аллотрансплантата						
Группа (Введение)	Индивидуальная выживаемость (сутки)				Средняя продолжительность выживаемости (сутки)	
1'. Физиологический раствор	8, 8, 8, 8, 9				8,3 ± 0,5	
2'. Циклоспорин А	14, 15, 15, 16, 16, 16, 17				15,5 ± 1,1	
3'. BB5.1	7, 8, 8, 8, 8, 9				8,0 ± 0,6	
4'. BB5.1 до 14 суток + циклоспорин А	35, 38, 43, 45, 46, 47				42,3 ± 4,8	
5'. BB5.1 до 28 суток + циклоспорин А	77, 80, 80, 81, 82				80 ± 1,9	
6'. BB5.1 до 100 суток + циклоспорин А	>100 суток (7 мышей; одна была умерщвлена для гистологии)				>100 суток	

Таблица 4 Средние показатели гистологических изменений аллотрансплантатов сердца при некропсии							
Группы	Vase*	Infarc	Lymph	Throm	Hemo	Fibrin	PMN
1'. Физиологический раствор (конечный момент)	3,0	3,0	1,0	4,0	3,0	3,0	3,0

2'. Циклоспорин А (конечный момент)	2,0	1,0	2,0	3,0	2,0	2,0	3,0
3'. BV5.1 (конечный момент)	2,0	1,0	2,0	2,0	1,0	0,0	0,0
4'. BV5.1 до 14 суток + циклоспорин А	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
5'. BV5.1 28 суток + циклоспорин А (8 сутки после операции)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
5'. BV5.1 28 суток + циклоспорин А (конечный момент)	0,0	0,0	1,0	1,0	2,0	1,0	0,0
6'. BV5.1 до 100 суток + циклоспорин А (100 сутки после операции)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Средние показатели: 0 - норма; 1 - минимальное изменение; 2 - слабое изменение; 3 - умеренное изменение; 4 - выраженное изменение. N/A - нет данных. *Vasc - васкулит; Infar - инфаркт; Lymph - инфильтрация лимфоцитов; Throm - тромбоз; Hemo - геморрагия; Fibrin - отложения фибрина; PMN - инфильтрат полиморфноядерных клеток							

Результаты указывают на синергические эффекты применения ингибирующего комплемент лекарственного средства в дополнение к иммуносупрессанту. У мышей без лечения отторжение трансплантата происходило приблизительно на 8 сутки.

Применение в хроническом режиме иммуносупрессанта циклоспорина А отдельно каждые сутки привело к повышению выживаемости трансплантата приблизительно до 15 суток после трансплантации. Применение антитела против C5 BV5.1 для ингибирования образования терминальных компонентов комплемента не оказывало самостоятельного эффекта, отторжение трансплантата происходило на 8 сутки после трансплантации, как и в контрольной группе (группа 1'). Сочетание BV5.1 до 28 суток после трансплантации плюс циклоспорин А показало синергический эффект с продлением срока выживаемости трансплантата приблизительно до 80 суток. Более удивительным результатом является результат группы 5', в которой каждый из BV5.1 и циклоспорина А вводили в хроническом режиме после трансплантации. В этом случае выживаемость трансплантата составляла более 100 суток (исходя из данных, доступных в настоящее время). Кроме того, гистологические результаты, показанные в таблице 4, указывают на то, что введение как BV5.1, так и циклоспорина А, защищало трансплантат от изменений лучше, чем либо BV5.1, либо циклоспорин А отдельно, и что введение в хроническом режиме BV5.1 и циклоспорина А защищало трансплантат настолько, что даже на 100 сутки после трансплантации не было выявлено гистологических изменений в пересаженных сердцах. Время выживания 100 суток в этих моделях считают золотым стандартом. Полагают, что выживание в течение 100 в этой модели указывает на то, что выживание аллотрансплантата будет неограниченным. Когда введение BV5.1 останавливали через 28 суток, трансплантаты были защищены, однако в них начались проявления некоторых от минимальных до слабых гистологических изменений приблизительно на 80 сутки, к которым происходило отторжение трансплантата.

Мышам группы 4' проводили отличающееся лечение, поскольку им вводили BV5.1 каждые сутки посредством внутривенного введения. Эти животные становились нездоровыми, показывая снижение массы и задержку мочеиспускания, и их умерщвляли, когда пересаженные сердца все еще бились, хотя их функция была снижена. Это была первая исследованная группа мышей и не известно, почему наблюдались эти болезнетворные эффекты. Эти болезнетворные эффекты не наблюдались, когда BV5.1 вводили внутривентально по схеме три раза в неделю. Как показано ниже в примере 4, введение BV5.1 каждые сутки внутривентальным

способом не приводило к болезнетворным эффектам. Также внутривенное введение не обязательно являлось причиной болезненного состояния у этих животных.

Внутривенное введение экулизумаба (эквивалентное человеческое антитело к BB5.1 в том, что оно связывается с C5 человека) успешно проводили без болезнетворных
 5 эффектов в исследовании PNH (Hillmen et al., 2004). Ингибиторы комплемента можно вводить другими способами, в дополнение к внутривенному и внутрибрюшному, при этом все такие способы хорошо известны специалистам в данной области.

Пример 4

Ускоренное отторжение в модели трансплантации сердца с пресенсибилизацией

Проводили вторую группу экспериментов, сходную с экспериментами примера 3, однако реципиентную мышь пресенсибилизировали к донорскому органу. В этих
 10 экспериментах пресенсибилизацию проводили предшествующей трансплантацией кожного лоскута. Как правило, пресенсибилизация может происходить не только в
 15 результате предшествующего получения аллотрансплантата, но также она может быть вызвана проведением многократных переливаний крови или может происходить у женщин, у которых была беременность. Помимо таких способов пресенсибилизации, аллотрансплантаты с несоответствием ABO быстро атакуются и отторгаются
 20 вследствие предварительно образованных антител к антигенам ABO, если не предпринимать шагов для предотвращения такой атаки.

Некоторым мышам в этих исследованиях вводили циклофосфамид в дополнение к BB5.1 и/или циклоспорино А. Для этих экспериментов реципиентных мышей BALB/c пресенсибилизировали посредством кожных лоскутов СЗН за одну неделю до
 25 трансплантации сердца от того же донора (с использованием способа Pruitt and Bollinger, 1991). Эта модель разработана для имитации трансплантации с пресенсибилизацией у человека, особенно в отношении ускоренного гуморального отторжения. Реципиентных мышей разделяли на восемь групп, от шести до восьми
 30 мышей в каждой. Проводили следующие введения.

Группа 1" (контроль) - мышам (самцы в возрасте 8-12 недель с массой 25 - 30 г) вводили 0,75 мл физиологического раствора внутрибрюшинно каждые сутки, начиная с -1 суток и продолжая до конечного момента (отторжение трансплантата).

Группа 2" (циклоспорин А отдельно) - мышам вводили циклоспорин А подкожно в
 35 дозе 15 мг/кг массы тела, начиная с 0 суток (день трансплантации) до конечного момента.

Группа 3" (BB5.1 отдельно) - мышам вводили моноклональное антитело против комплемента мыши BB5.1 в дозе 40 мг/кг массы тела, доставляемое внутрибрюшинно
 40 каждые сутки, начиная с -1 суток и продолжая до конечного момента.

Группа 4" (циклофосфамид отдельно) - мышам вводили циклофосфамид внутривенно в дозе 40 мг/кг массы тела на каждые из суток 0 и 1.

Группа 5" (BB5.1 плюс циклоспорин А) - мышам вводили BB5.1 внутрибрюшинно в дозе 40 мг/кг массы тела каждые сутки, начиная с -1 суток и продолжая до конечного
 45 момента. Этим животным, дополнительно, вводили циклоспорин А подкожно в дозе 15 мг/кг массы тела каждые сутки, начиная с 0 суток до конечного момента.

Группа 6" (BB5.1 плюс циклофосфамид) - мышам вводили BB5.1 внутрибрюшинно в дозе 40 мг/кг массы тела каждые сутки, начиная с -1 суток и продолжая до
 50 конечного момента. Этим животным дополнительно вводили циклофосфамид внутривенно в дозе 40 мг/кг массы тела на каждые из 0 и 1 суток.

Группа 7" (циклоспорин А плюс циклофосфамид) - мышам вводили циклоспорин А подкожно в дозе 15 мг/кг массы тела каждые сутки, начиная с 0 суток до конечного

момента. Этим мышам дополнительно вводили циклофосфамид внутривенно в дозе 40 мг/кг массы тела на каждые из 0 и 1 суток.

Группа 8" (BV5.1 плюс циклоспорин А плюс циклофосфамид) - мышам вводили BV5.1 внутрибрюшинно в дозе 40 мг/кг массы тела каждые сутки, начиная с -1 суток и продолжая до 100 суток. Также этим мышам вводили циклоспорин А подкожно в дозе 15 мг/кг массы тела каждые сутки, начиная с 0 суток до 100 суток. Этим мышам дополнительно вводили циклофосфамид внутривенно в дозе 40 мг/кг массы тела на каждые из 0 и 1 суток. Двух мышей из этой группы умерщвляли на 60 суток для гистологических исследований (отторжение еще не произошло) и четырех мышей отторжение трансплантатов не произошло и к 100 суткам.

Кроме того, тестировали контрольную группу мышей, которые не были пресенсибилизированными и которым проводили только введение физиологического раствора, как в случае группы 1".

Результаты этих экспериментов представлены в таблицах 5 и 6. В таблице 5 представлена длительность выживаемости трансплантатов и в таблице 6 обобщены гистологические результаты.

Таблица 5 Выживаемость аллотрансплантатов		
Группы (Введение)	Индивидуальная выживаемость (сутки)	Средняя продолжительность выживаемости (сутки)
Без пресенсибилизации	8, 8, 8, 8, 9	8,3 ± 0,5*
1". Только пресенсибилизация кожи	3, 3, 3, 3, 3, 3, 4	3,1 ± 0,4
2". Циклоспорин А	3, 3, 3, 3	3,0 ± 0,0
3". BV5.1	3, 3, 4, 4	3,5 ± 0,6
4". Циклофосфамид	3, 3, 3, 4	3,3 ± 0,5
5". BV5.1 + Циклоспорин А	10, 10, 11, 11, 12, 12, 14, 15	11,9 ± 1,8**
6". BV5.1 + Циклофосфамид	3, 3, 3, 3, 3, 4	3,2 ± 0,4
7". Циклоспорин А + Циклофосфамид	3, 3, 3, 4, 4, 4	3,5 ± 0,6
8". BV5.1 + Циклоспорин А + Циклофосфамид	>100 суток (4 мыши)	>100***
*P < 0,01 группа 1" против отсутствия пресенсибилизации **P < 0,01 группа 5" против групп 1"-4" и 6"-7". ***P < 0,01 группа 8" против групп 1"-7".		

Таблица 6 Средние показатели гистологических изменений аллотрансплантатов сердца при некропии							
Группы	Vase*	Infarc	Lymph	Throm	Hemo	Fibrin	PMN
Без пресенсибилизации (конечный момент)	3,0	3,0	1,0	4,0	3,0	3,0	3,0
1". Только пресенсибилизация кожи (конечный момент)	0,0	4,0	1,0	4,0	3,0	0,0	0,0
2". Циклоспорин А (конечный момент)	0,0	4,0	0,0	3,0	3,0	N/A	N/A
3". BV5.1 (конечный момент)	2,0	2,0	2,0	2,0	3,0	N/A	N/A
4". Циклофосфамид (конечный момент)	2,0	4,0	0,0	3,0	2,0	N/A	N/A
5". BV5.1 + циклоспорин А (3 сутки после операции)	0,0	1,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0
5". BV5.1 + циклоспорин А (конечный момент)	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	0,0	0,0
6". BV5.1 + циклофосфамид (конечный момент)	1,0	3,0	0,0	3,0	2,0	N/A	N/A
7". Циклоспорин А + циклофосфамид (конечный момент)	0,0	1,0	1,0	2,0	3,0	N/A	N/A

5	8". BB5.1 + циклоспорин А + циклофосфамид (3 сутки после операции)	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	N/A	N/A
	8. BB5.1 + циклоспорин А + циклофосфамид (12 сутки после операции)	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	N/A	N/A
	8". BB5.1 + циклоспорин А + циклофосфамид (60 сутки после операции)	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	N/A	N/A
	8". BB5.1 + циклоспорин А + циклофосфамид (100 сутки после операции)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
10	Средние показатели: 0 - норма; 1 - минимальное изменение; 2 - слабое изменение; 3 - умеренное изменение; 4 - выраженное изменение. N/A - нет данных. *Vasc - васкулит; Infar - инфаркт; Lymph - инфильтрация лимфоцитов; Throm - тромбоз; Hemo - геморрагия; Fibrin - отложения фибрина; PMN - инфильтрат полиморфноядерных клеток							

15 Результаты, представленные в таблице 5, указывают на отличие между моделью на пресенсибилизированных мышцах и моделью на непресенсибилизированных мышцах, которую использовали в примере 3. Результаты указывают на то, что в отсутствии пресенсибилизации отторжение трансплантатов происходит приблизительно в течение 8 суток в отсутствии введения каких-либо лекарственных средств.

20 Пресенсибилизация животных вызывала более быстрое отторжение, отторжение трансплантата у пресенсибилизированных животных происходило приблизительно в течение 3 суток в отсутствии введения какого-либо лекарственного средства. Введение либо BB5.1, либо циклоспорина А, либо циклофосфамида не оказывало эффекта на

25 выживаемость трансплантата, при этом отторжение трансплантатов происходило приблизительно в течение 3-4 суток в каждой из этих групп животных. Сочетание BB5.1 и циклоспорина А показало некоторый эффект, при котором отторжение происходило приблизительно на 12 сутки. Сочетание BB5.1 и циклофосфамида не оказывало защитного эффекта с отторжением приблизительно

30 на 3 сутки. Аналогично, сочетание циклоспорина А и циклофосфамида по существу не оказывало защитного эффекта, с отторжением на 3-4 сутки. Очень удивительно, сочетание всех трех лекарственных средств (введение в хроническом режиме BB5.1 и циклоспорина плюс введение циклофосфамида во время трансплантации) показало

35 высокосинергический эффект, при этом все мыши выживали в течение более 100 суток. Также выживаемость, составляющую 100 суток, в этой модели считали золотым стандартом, и она подразумевает неограниченную выживаемость.

Эти результаты, а также гистологические результаты, как показано в таблице 6, указывают на то, что сочетание введения в хроническом режиме ингибитора

40 комплемента и иммуносупрессанта, такого как циклоспорин А, при лечении пресенсибилизированных мышей привело к некоторому ослаблению ускоренного отторжения. Введение этим животным дополнительно циклофосфамида в момент трансплантации и на первые сутки после трансплантации привело к более

45 длительному времени выживаемости, без наблюдаемого отторжения по меньшей мере в течение 100 суток.

Пример 5

Аллотрансплантаты почки СЗН подвергаются АВМР у пресенсибилизированных реципиентов BALB/c

50 Была разработана новая модель АВМР на мышцах с признаками, которые близко имитируют клинические условия аллотрансплантации почки у высокопресенсибилизированных пациентов. Реципиентных мышей BALB/c подвергали пресенсибилизации посредством полностью аллогенных донорских трансплантатов

кожи СЗН. После пресенсибилизации уровни циркулирующих противодонорских IgG были значительно повышены и достигали пиковых уровней через семь суток после пересадки кожи (фигура 10A). В это время аллотрансплантаты почки от той же донорской линии (СЗН) пересаживали пресенсибилизированным реципиентам; эти трансплантаты быстро отторгались у всех животных в течение $8,5 \pm 1,3$ суток (фигура 11A). В отторгшихся трансплантатах были показаны гистологические признаки, согласующиеся с ускоренным гуморальным отторжением, включая 1) признаки васкулита, геморрагии и отека в интерстиции, а также гломерулярный и тубулярный некроз (фигура 10B-a); 2) обширное отложение в трансплантате IgG (фигура 10B-c), C3 (фигура 10B-e) и C5 (фигура 10B-g); 3) значительно повышенные уровни циркулирующих антидонорских IgG по сравнению с уровнями, наблюдаемыми у непресенсибилизированных реципиентов, которых оценивали на те же сутки после трансплантации ($p < 0,01$; фигура 10C); 4) нормальные уровни активности комплемента (фигура 10D) и 5) массивная инфильтрация в трансплантате клеток Mac-1⁺, включая моноциты и макрофаги (фигура 10B-й). В противоположность этому у непресенсибилизированных мышей BALB/c отторжение трансплантатов почки СЗН происходило в течение $55,2 \pm 5,6$ суток и у них была показана нормальная гистология трансплантата на POD8 (фигура 10B-b) без поддающегося детекции отложения IgG (фигура 10B-d), с небольшой инфильтрацией клеток Mac-1⁺ или ее отсутствием (Фигура 10B-г) и только со слабым отложением C3 (фигура 10B-f) и C5 (фигура 10B-h). Оказалось, что пресенсибилизация донорской кожей не повышает уровни циркулирующих антидонорских IgM (фигура 10C) или активность комплемента в сыворотке (фигура 10D). Эти данные позволяют предположить, что эта новая модель аллотрансплантата почки обеспечивает превосходный инструмент для исследования потенциальной роли комплемента в опосредуемом антителами отторжении аллотрансплантата почки у высокопресенсибилизированных реципиентов.

MAb против C5 в сочетании с CsA и LF предотвращает ABMR и обеспечивает неограниченную выживаемость аллотрансплантата почки у пресенсибилизированных мышей-реципиентов

Первоначальные эксперименты, проведенные в ходе разработки этой модели, оценивали иммуносупрессивные эффекты CsA и циклофосамида (CyP) при продлении срока выживаемости трансплантата почки. Однако введение CyP было ассоциировано со значительной нефротоксичностью, препятствующей дальнейшей оценке (данные не представлены). Кратковременное введение LF не было ассоциировано с нефротоксичностью, и при дальнейшем моделировании это средство применяли как часть экспериментальной иммуносупрессивной схемы.

Была проведена оценка того, может ли mAb против C5, либо отдельно, либо в сочетании с CsA и кратковременным введением LF, предотвращать ABMR у пресенсибилизированных мышей-реципиентов, получивших аллотрансплантаты почек. Как представлено на фигуре 11 A, отторжение трансплантатов у пресенсибилизированных реципиентов, которым проводили монотерапию либо CsA, либо LF, или вводили два лекарственных средства в сочетании, происходило в течение $9,3 \pm 2,5$ суток, $6,0 \pm 1,0$ суток и $11,7 \pm 2,1$ суток, соответственно. Кроме того, монотерапия посредством mAb против C5, или терапия mAb против C5 в сочетании с CsA или LF были неспособны повысить выживаемость трансплантата, при этом отторжение происходило в течение $7,0 \pm 1,0$ суток, $7,0 \pm 1,0$ суток и $8,3 \pm 3,2$ суток, соответственно (фигура 11A). В этих подвергнутых отторжению трансплантатах почек также развивались типичные патологические признаки опосредуемого

антителом гуморального отторжения (данные не представлены) с паттерном отторжения, практически идентичным паттерну отторжения, наблюдаемому у не подвергавшихся лечению пресенсибилизированных реципиентов BALB/c (Фигура 10B-a). Напротив, тройная терапия, состоящая из mAb против C5, CsA и кратковременного введения LF, эффективно предотвращала отторжение трансплантата и обеспечивала неограниченную выживаемость аллотрансплантата почки в течение >100 суток у пресенсибилизированных животных (фигура 11 A). Кроме того, трансплантаты почки с длительной выживаемостью показали нормальную функцию почек, показанную посредством уровней креатинина в сыворотке в нормальном диапазоне (фигура 11B; $p < 0,01$ против мышей без лечения или мышей, которым проводили монотерапию посредством либо CsA, либо LF, или вводили два лекарственных средства в сочетании). Аллотрансплантаты почки на POD100 у пресенсибилизированных реципиентов, которым проводили тройную терапию, имели нормальную гистологию (фигура 11C-a) без поддающейся детекции инфильтрации клеток CD4⁺, CD8⁺ или Mac-1⁺ (фигура 11C-b, c, d). Кроме того, массивная инфильтрация в трансплантате клеток Mac-1⁺ была выявлена у животных без лечения и у животных, которым вводили CsA, LF или CsA плюс LF, в то время как инфильтрация этих клеток была значительно снижена у животных, которым вводили mAb против C5 (таблица 7). Эти результаты указывают на то, что введение функционально блокирующего mAb против C5 совместно с CsA и кратковременным LF предотвращает ABMR и обеспечивает неограниченную выживаемость аллотрансплантата у высокопресенсибилизированных реципиентов.

Введение MAb против C5 полностью ингибирует активность терминальных компонентов комплемента и локальное отложение C5 у пресенсибилизированных реципиентов, получивших аллотрансплантаты почки

Для определения системной и локальной эффективности введения mAb против C5 в этой модели оценивали активность комплемента, определяемую посредством гемолитического анализа сыворотки *in vitro*, у мышей в различных группах по введению в один момент времени (POD7). Введение мышам либо CsA, либо LF, либо двух лекарственных средств в сочетании, не оказывало ингибиторного эффекта на активность терминальных компонентов комплемента, в то время как введение mAb против C5 отдельно или в сочетании с CsA и/или LF полностью ингибировало активность комплемента в сыворотке ($p < 0,01$, против интактных мышей, пресенсибилизированных мышей без лечения, или животных, которым вводили CsA, LF или CsA плюс LF) (фигура 12). Гемолитическая активность комплемента восстанавливалась до нормальных уровней к POD100 после прекращения введения на POD60 (фигура 12). Более того, локальное (внутри трансплантата) отложение C5 полностью предотвращалось у пресенсибилизированных реципиентов, которым вводили mAb против C5, однако было очевидным у пресенсибилизированных животных без лечения, или у пресенсибилизированных животных, которым вводили CsA, LF и CsA плюс LF (таблица 7). Как было предсказано, терапия посредством mAb против C5 не предотвращала отложение C3 в трансплантате (таблица 7). Эти результаты указывают на то, что после аллогенной трансплантации почки у пресенсибилизированных реципиентов терапия посредством mAb против C5 полностью блокирует активность терминальных компонентов комплемента, однако сохраняет более ранние компоненты комплемента.

Трансплантаты почки с длительной выживаемостью являются устойчивыми к гуморальному повреждению у пресенсибилизированных реципиентов на протяжении адаптации

Для исследования наличия ассоциации длительной выживаемости этих трансплантатов почки с развитием адаптации, определяли уровни циркулирующих антидонорских антител, активность сывороточного комплемента и отложение в трансплантате антител и комплемента у мышей из различных групп по введению во время отторжения. У пресенсибилизированных реципиентов BALB/c без лечения образовывались высокие уровни циркулирующих антидонорских антител IgG (фигура 13A), которые частично снижались при введении CsA или LF либо отдельно, либо в сочетании. Добавление антител против C5 к монотерапии посредством либо CsA, либо LF, не снижало далее уровни антидонорского антитела. В случае тройной терапии посредством mAb против C5, CsA и LF, циркулирующие уровни антидонорских IgG были значительно ингибированы и оставались низкими на POD100 (* $p < 0,01$ против пресенсибилизированных животных без лечения или пресенсибилизированных животных, которым либо проводили монотерапию, либо вводили два лекарственных средства в сочетании). Однако этот низкий уровень антител, тем не менее, был выше, чем уровень у интактных животных (** $p < 0,05$ против пресенсибилизированных животных, которым проводили тройную терапию). В соответствии с эффектами лечения на уровни циркулирующих антидонорских антител значительное отложение IgG в трансплантате наблюдалось у пресенсибилизированных реципиентов без лечения или у пресенсибилизированных реципиентов, которым проводили монотерапию посредством либо CsA, либо LF, или вводили сочетание двух лекарственных средств (таблица 7). Интересно, что на POD100, в трансплантатах почки с длительной выживаемостью у животных, которым проводили тройную терапию, также было показано слабое отложение IgG (фигура 11C-e, таблица 7). Более того, отложение C3 и C5, от слабого до умеренного, было выявлено в трансплантатах почки с выживаемостью 100 суток у пресенсибилизированных животных (фигура 11C-f, g, таблица 7). Уровни антидонорских IgM либо в кровотоке (фигура 13A), либо в пересаженных трансплантатах почки (таблица 7) оставались низкими у всех пресенсибилизированных реципиентов, независимо от лечения. Взяты вместе, эти данные показывают, что тройная терапия на основе mAb против C5 предотвращает ABMR, несмотря на наличие очевидного отложения IgG и комплемента в трансплантате, подтверждая, что длительная выживаемость трансплантата была достигнута посредством процесса адаптации.

Переключение подклассов IgG на IgG2b у пресенсибилизированных реципиентов с длительной выживаемостью, имеющих адаптированные трансплантаты почки

Для определения наличия ассоциации тройной терапии на основе mAb против C5 с переключением подклассов IgG, проводили сравнение между сывороточными уровнями подклассов антидонорских IgG среди пресенсибилизированных реципиентов без лечения и пресенсибилизированных реципиентов, имеющих адаптированные трансплантаты почек. Сыворотки пресенсибилизированных реципиентов без лечения содержали, главным образом, антидонорские антитела IgG1, IgG2a и IgG3 (фигура 13B). Тот же паттерн наблюдали среди пресенсибилизированных реципиентов, которым вводили либо CsA, либо LF, или два лекарственных средства в сочетании (данные не представлены). Напротив, среди пресенсибилизированных реципиентов, имеющих адаптированные трансплантаты (POD100), преобладающим подклассом антидонорских IgG был IgG2b (фигура 13B, $p < 0,01$). Эти данные позволяют предположить, что образование антидонорских антител IgG2b может быть ассоциировано с индукцией адаптации трансплантата.

Защитные белки Bcl-2 и Bcl-x1 экспрессируются на адаптированных трансплантатах почки

Полагают, что устойчивость адаптированных трансплантатов к низким уровням аллоантител и комплемента может быть обусловлена экспрессией в трансплантате защитных белков, таких как Bcl-x1 и Bcl-2, для которых ранее было описано, что они активируются в сосудах адаптированных трансплантатов в моделях с ксенотрансплантацией (Bach et al., 1997). Экспрессию этих белков оценивали у пресенсибилизированных реципиентов, которым проводили тройную терапию на основе mAb против C5. Адаптированные трансплантаты почки от пресенсибилизированных реципиентов, которым проводили тройную терапию на основе mAb против C5, экспрессировали высокие уровни белков Bcl-2 и Bcl-x1 на POD100 (фигура 14). Напротив, экспрессия этих белков не поддавалась детекции в подвергнутых отторжению трансплантатах почки пресенсибилизированных животных без лечения (фигура 14) или пресенсибилизированных животных, которым проводили терапию посредством либо CsA, либо LF, или вводили два лекарственных средства в сочетании (данные не представлены). Эти результаты подтверждают, что устойчивость адаптированных трансплантатов к гуморальному повреждению у этих пресенсибилизированных животных может быть обусловлена защитой, обеспечиваемой белками Bcl-2 и Bcl-x1.

Таблица 7

Окрашивание иммунопероксидазой аллотрансплантатов почки у пресенсибилизированных реципиентов-мышей при некропии*

Группы	IgG	IgM	C3	C5	Mac-1
Без лечения	4+	1+	3+	3+	4+
CsA	4+	1+	3+	3+	4+
mAb против C5	4+	1+	3+	0	2+
LF	3+	1+	3+	3+	4+
mAb против C5+CsA	4+	1+	3+	0	2+
mAb против C5+LF	3+	1+	3+	0	2+
CsA+LF	3+	1+	3+	3+	4+
mAb против C5+CsA+LF	2+	1+	3+	2+	0

*Трансплантаты получали в момент отторжения или на POD100 (для группы с тройной терапией) после трансплантации.

Интенсивность окрашивания оценивали следующим образом: 0, отрицательное; 1+, неопределенное; 2+, слабое; 3+, умеренное; 4+, интенсивное.

Пример 6

Способы для примера 5

Животные

В качестве доноров и реципиентов были выбраны взрослые самцы мышей C3H (H-2^k) и мышей BALB/c (H-2^d) (Jackson Labs, Bar Harbor, Maine) массой 25-30 г, соответственно. Животных содержали в общепринятых условиях в Animal Care Facility, University of Western Ontario, и осуществляли уход за ними в соответствии с рекомендациями, установленными Canadian Council on Animal Care.

Кожная пресенсибилизация

Лоскуты кожи на всю толщину, полученные от доноров C3H, разрезали на четырехугольные фрагменты 1×1 см² и трансплантировали на спину реципиентов BALB/c. Отторжение определяли как полный некроз трансплантатов кожи.

Ортотопная трансплантация почки

Через семь суток после кожной пресенсибилизации почки мышей C3H трансплантировали в брюшную полость пресенсибилизированных

реципиентов BALB/c посредством анастомоза аорты донора и реципиента и почечной вены донора и нижней полой вены реципиента с использованием нейлоновых нитей 11-0. Донорскую уретру также сшивали с мочевым пузырем реципиента с использованием нитей 10-0. Нативные почки извлекали сразу после пересадки.

Отторжение трансплантата, ведущее к гибели хозяина, использовали в качестве конечного результата отторжения трансплантатов почки.

Экспериментальные группы

Пресенсибилизированных реципиентов случайным образом разделяли на восемь групп, каждая из которых состояла из пяти животных: группа 1, мыши без лечения; группа 2, мыши, которым вводили CsA (15 мг/кг/сутки, подкожно, каждые сутки от 0 суток до конечного момента исследования (отторжение трансплантата или 100 сутки после операции (POD)); группа 3, мыши, которым вводили mAb против C5 (клон BB5.1, Alexion Pharmaceuticals, Inc., 40мг/кг/day, внутривенно, каждые сутки на 0-14

сутки, а затем два раза в неделю до 60 суток); группа 4, мыши, которым вводили LF15-0195 (LF, 2 мг/кг/сутки, подкожно, 0-14 сутки); группа 5, мыши, которым вводили mAb против C5 плюс CsA; группа 6, мыши, которым вводили mAb против C5 плюс LF; группа 7, мыши, которым вводили CsA плюс LF; группа 8, мыши, которым проводили тройную терапию, состоящую из mAb против C5, CsA и LF. В момент отторжения, все трансплантаты почки извлекали для обычной гистологии, иммуногистохимии и вестерн-блот анализа, и образцы сыворотки собирали для оценки уровней антидонорских антител и активности комплемента.

Измерение сывороточного креатинина

Образцы сыворотки получали в конечный момент исследования (момент отторжения или POD100) после трансплантации почки. Уровни сывороточного креатинина количественно определяли в образцах объемом 10 мкл с использованием способа Sigma Diagnostics (Sigma, St. Louis, MO), который определяет креатинин посредством кинетической модификации реакции Яффе (Junge et al., 2004).

Гистология трансплантата

При некропии образцы тканей обрабатывали для окрашивания гематоксилином и эозином (H&E) (Wang et al, JI 2003) и оценивали в отношении васкулита, тромбоза, геморрагии и инфильтрации лимфоцитов; изменения оценивали следующим образом: 0, нет; 1, минимальные; 2, слабые; 3, умеренные или 4, выраженные, по сравнению с нормальными тканями.

Иммуногистохимия

Получали срезы образцов, погруженных в гель Tissue-Tek O.C.T (Optimum Cutting Temperature, Skura Finetek, Torrance, CA) и их окрашивали на инфильтрацию клеток CD4⁺, CD8⁺ и Mac-1⁺ и на отложение IgG, IgM, C3 и C5 с использованием набора Elite Vectastain ABC (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA). Первичные биотинилированные антитела включали антитело CD4 (YTS 191.1.2, Cedarlane Laboratories Ltd., Hornby, Ontario, Canada) и антитело против CD8 (53-6.7, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) и антитело против Mac-1 (Cedarlane), соответственно. Отложение IgG и IgM в трансплантатах определяли с использованием биотинилированного антитела козы против IgG мыши и антитела козы против IgM мыши (Cedarlane). Детекцию отложения комплемента проводили после серийной инкубации с поликлональными Ат козы против C3 мыши или против C5 мыши (Quidel, San Diego, CA), и конъюгированным с HRP стрептавидином (Zymed Laboratories, South San Francisco, CA). Отрицательные контроли получали, исключая первичные антитела. Иммунное окрашивание оценивали в пяти полях зрения под большим увеличением каждого среза

с использованием образцов тканей от пяти животных на экспериментальную группу. Иммуноную реактивность градуировали от 0 до 4+ в соответствии с интенсивностью окрашивания следующим образом: 0, отрицательная; 1+, неопределенная; 2+, слабое окрашивание; 3+, умеренное окрашивание; и 4+ очень интенсивное окрашивание.

Проточная цитометрия

Циркулирующие антидонорские специфичные к IgG и IgM антитела оценивали в сыворотке реципиентов посредством проточной цитометрии. В кратком изложении, спленоциты мышей СЗН выделяли и инкубировали при 37°C в течение 30 минут с образцами сыворотки, полученными в указанные моменты времени от мышей из различных групп по введению. Для окрашивания на общий IgG или конкретные подклассы антител промытые клетки инкубировали с конъюгированными с FITC противомышиными антителами козы, специфичным к Fc-участку мышинового IgG, мышинового IgG1, мышинового IgG2a, мышинового IgG2b или мышинового IgG3 (все от CALTAG Laboratories, Burlingame, CA) или с конъюгированным с фикоэритрином антителом козы, специфичным к мышинному IgM (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) в течение 1 часа при 4°C, и анализировали проточной цитометрией на проточном цитометре FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA) (Collins et al., 1999; Pratt et al., 1996). Результаты выражают в качестве средней канальной интенсивности флуоресценции в качестве показателя уровня каждого антидонорского изотипа в образцах.

Статистический анализ

Данные были представлены в качестве среднего значения $\pm$ стандартное отклонение (SD). Выживаемость аллотрансплантата среди экспериментальных групп сравнивали с использованием знаково-рангового теста. Гистологические и иммуногистологические данные анализировали с использованием рангового ANOVA. Данные проточной цитометрии и данные вестерн-блот анализа анализировали с использованием одностороннего ANOVA. Значимыми считали отличия со значениями p менее 0,05.

Будет понятно, что способы и композиции настоящего описания могут быть включены в форме различных вариантов осуществления, из которых только немногие описаны в настоящем документе. Специалисту будет очевидно, что существуют другие варианты осуществления, и они не отклоняются от сущности описания. Таким образом, описанные варианты осуществления являются иллюстративными, и их не следует истолковывать как ограничивающие.

СПИСОК ССЫЛОК

Публикации и другие материалы, используемые в настоящем документе для освещения уровня техники описания, и, в частности, доводы, обеспечивающие дополнительные детали, касающиеся практики, включены в настоящий документ в качестве ссылок в полном объеме и, для удобства, приведены в тексте по автору и дате и соответственно сгруппированы в следующем списке ссылок.

Abbas AK, et al. (2000). *Cellular and Molecular Immunology* (4th edition), p. 363-383 (W.B. Saunders Company, New York).

Arp et al. (1996). *J. Virol.* 70:7349-7359.

Baldwin et al. (2001). *Immunity* 14:369-376.

Böhmig GA, et al. (2000). *Am. J. Kidney Dis.* 35:667-673.

Brauer et al. (1995). *Transplantation* 59:288-293.

Changelian PS, et al. (2003). *Science* 302:875-878.

Collard et al. (1997). *Circulation* 96:326-333.

- Collins et al. (1999). *J. Am. Soc. Nephrol.* 10:2208-2214.
- Fearon (1983). In Intensive Review of Internal Medicine. 2nd Ed. Fanta and Minaker. eds.
- Brigham and Women's and Beth Israel Hospitals.
- Forbes et al. (1978). *Lab. Invest.* 39:463-470.
- 5 Frei Y, et al. (1987). *Mol. Cell. Probes* 1:141-149.
- Gloor (2005). *Contrib. Nephrol.* 146: 11 -21.
- Glottz et al. (1993). *Transplantation* 56:335-337.
- Glottz D, et al. (2002). *Am. J. Transplant.* 2:758-760.
- 10 Hakim et al. (1990). *Am. J. Kidney Dis.* 16:423-431.
- Halloran PF, et al. (1992). *Transplantation* 53:550-555.
- Halloran (2003). *Am. J. Transplant.* 3:639-640.
- Haviland DL, et al. (1991). *J. Immunol.* 146:362-368.
- Hiesse C, et al. (1992). *Nephrol. Dial. Transplant.* 7:944-951.
- 15 Hillmen P, et al. (2004). *New Engl. J. Med.* 350:552-559.
- Jeannet M, et al. (1970). *New Engl. J. Med.* 282:111-117.
- Jones PT, et al. (1986). *Nature* 321:522-525.
- Jose et al. (1983). *J. Exp. Med.* 158:2177-2182.
- 20 Junge et al. (2004). *Clin Chim Acta.* 344 (1-2): 137.
- Kirschfink (2001). *Immunol. Rev.* 180:177-189.
- Kobayashi et al. (1999). *J. Biol. Chem.* 274:28660-28668.
- Kriaa et al. (1995). *Nephrol. Dial. Transplant.* 10 Suppl. 6:108-110.
- Kroshus et al. (1995). *Transplantation* 60:1194-1202.
- 25 Kupiec-Weglinski (1996). *Ann. Transplant.* 1:34-40.
- Kupin et al. (1991). *Transplantation* 51:324-329.
- Liszewski (1993). Fundamental Immunology pp. 917-939.
- Mauillycdi et al. (2002). *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 11:609-618.
- 30 Mehra et al. (2003). *Curr. Opin. Cardiol.* 18:153-158.
- Minta JO and Man DP (1977). *J. Immunol.* 119:1597-1602.
- Montgomery RA, et al. (2000). *Transplantation* 70:887-895.
- Olfert et al. (1993) Guide to the care and use of experimental animals (Vol.1). Ottawa: Association of Universities and Colleges of Canada 1.
- 35 Opelz G (1992). *Transplant. Proc.* 24:2342-2355.
- OPTN/SRTR Annual Report (2002). Chapter 1 of the Annual Report produced by the Scientific Registry of Transplant Recipients (SRTR) in collaboration with the Organ Procurement and Transplantation Network (OPTN). See http://www.unos.org/data/ar2002/ar02_chapter_one.htm.
- 40 Palmer et al. (1989). *Lancet* 1:10-12.
- Papadimitriou et al. (1991). *J. Immunol.* 147:212-217.
- Park WD et al. (2003). *Am. J. Transplant* 3:952-960.
- Persson NH et al. (1995). *Transplant. Proc.* 27:3466.
- 45 Platt et al. (1999). *Mol. Immunol.* 36:965-971.
- Pratt et al. (1996). *Am J Pathol* 149:2055-2066.
- Pratt et al. (2000). *Am. J. Pathol.* 157:825-831.
- Pruitt et al. (1991). *J. Surg. Res.* 50:350-355.
- 50 Regele H, et al. (2001). *Nephrol. Dial. Transplant.* 16:2058-2066.
- Rocha et al. (2003). *Transplantation* 75:1490-1495.
- Ross et al. (1993). *Transplantation* 55:785-789.
- Saadi et al. (1995). *J. Exp. Med.* 182:1807-1814.

- Salama et al. (2001). *Am. J. Transplant.* 1:260-269.
 Schweitzer et al. (2000). *Transplantation* 70:1531-1536.
 Sonnenday et al. (2002). *Transplant. Proc.* 34:1614-1616.
 Stepkowski SM (2000). *Exp. Rev. Mol. Med.* 21 June, <http://www-ermmm.cbcu.cam.ac.uk/00001769h.htm>.
 Taube DH, et al. (1984). *Lancet* 1:824-828.
 Tyan et al. (1994). *Transplantation* 57:553-562.
 Vakeva et al. (1998). *Circulation* 97:2259-2267.
 Vogt W, et al. (1989). *Molec. Immunol.* 26:1133-1142.
 Wang et al. (1995). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92:8955-8959.
 Wang et al. (1996). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93:8563-8568.
 Wang et al. (1999). *Transplantation* 68: 1643-1651.
 Wang H, et al. (2003). *J. Immunol.* 171:3823-3836.
 Warren et al. (2004). *Am. J. Transplant.* 4:561-568.
 Wetsel RA and Kolb WP (1982). *J. Immunol.* 128:2209-2216.
 Wurzner R, et al. (1991). *Complement Inflamm.* 8:328-340.
 Yamamoto KI and Gewurz G (1978). *J. Immunol.* 120:2008-2015.
 Публикация патентной заявки PCT WO 92/10205
 Публикация патентной заявки PCT WO 00/27421
 Публикация патентной заявки PCT WO 01/37860
 Публикация патентной заявки США US 2003/0129187
 Публикация патентной заявки США US 2003/0180301
 Патент США 5133916
 Патент США 5573940
 Патент США 5660825
 Патент США 6057131
 Патент США 6100443
 Патент США 6192891
 Патент США 6280957
 Патент США 6302855
 Патент США 6355245
 Патент США 6534058
 Патент США 6821515

Содержание всех приведенных в настоящем документе ссылок включено в качестве ссылок в полном объеме.

Формула изобретения

1. Способ продления срока выживаемости аллотрансплантата почки у реципиента-млекопитающего, включающий введение указанному млекопитающему (а) лекарственного средства, которое ингибирует активность комплемента, (b) ингибитора IL-2 и (c) LF 15-0195.
2. Способ по п.1, где указанным млекопитающим является человек.
3. Способ по п.1, где указанный аллотрансплантат является не соответствующим по МНС.
4. Способ по п.3, где указанный не соответствующий по МНС аллотрансплантат представляет собой не соответствующий по HLA аллотрансплантат.
5. Способ по п.1, где указанный реципиент не соответствует указанному аллотрансплантату по АВО.

6. Способ по п.1, где указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, вводят постоянно.

7. Способ по п.1, где указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, ингибирует образование C5b или C5a.

8. Способ по п.7, где указанное лекарственное средство, которое ингибирует образование C5b или C5a, представляет собой целое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

9. Способ по п.8, где указанные целое антитело или фрагмент антитела представляет собой человеческое, гуманизированное, химеризованное или деиммунизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

10. Способ по п.8, где указанное целое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует расщепление компонента C5 комплемента.

11. Способ по п.8, где указанный антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы, состоящей из Fab, F(ab')₂, Fv, доменного антитела и одноцепочечного антитела.

12. Способ по п.8, где указанный антигенсвязывающий фрагмент представляет собой пекселизумаб.

13. Способ по п.8, где указанное целое антитело представляет собой экулизумаб.

14. Способ по п.13, где указанный экулизумаб вводят раз в 2 недели.

15. Способ по п.1, где указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, выбрано из группы, состоящей из i) растворимого рецептора комплемента, ii) CD59, iii) CD55, iv) CD46 и v) антитела против C5, C6, C7, C8 или C9.

16. Способ по п.1, где указанный ингибитор IL-2 выбран из группы, состоящей из циклоспорина А, такролимуса и сиролимуса.

17. Способ по любому из пп.1-16, где указанный ингибитор IL-2 представляет собой ингибитор mTOR.

18. Способ по п.17, где указанный ингибитор mTOR включает сиролимус.

19. Способ по п.1, где указанный аллотрансплантат выживает в течение оставшегося периода жизни указанного млекопитающего.

20. Способ по п.1, где указанный аллотрансплантат выживает по меньшей мере в течение трех месяцев.

21. Способ по п.1, где указанный аллотрансплантат выживает по меньшей мере в течение шести месяцев.

22. Способ по п.1, где указанный аллотрансплантат выживает по меньшей мере в течение одного года.

23. Способ по п.1, где указанный аллотрансплантат выживает по меньшей мере в течение пяти лет.

24. Способ по п.6, где указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, вводят постоянно по меньшей мере в течение 14 суток.

25. Способ по п.6, где указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, вводят постоянно по меньшей мере в течение 28 суток.

26. Способ по п.6, где указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, вводят постоянно по меньшей мере в течение 3 месяцев.

27. Способ по п.6, где указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, вводят постоянно по меньшей мере в течение 6 месяцев.

28. Способ по п.6, где указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, вводят постоянно по меньшей мере в течение 1 года.

29. Способ по п.6, где указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, вводят постоянно по меньшей мере в течение 5 лет.

30. Способ по п.6, где указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, вводят постоянно в течение оставшегося периода жизни указанного млекопитающего.

31. Способ по п.1, где указанный LF 15-0195 вводят постоянно в течение оставшегося периода жизни указанного млекопитающего.

32. Способ по п.1, где ингибитор IL-2 вводят постоянно в течение оставшегося периода жизни указанного млекопитающего.

33. Способ по п.1, дополнительно включающий проведение реципиенту млекопитающему плазмафереза, спленэктомии или иммуносорбции.

34. Способ по п.1, где указанное млекопитающее является пресенсибилизированным к указанному аллотрансплантату.

35. Применение лекарственного средства, которое ингибирует активность комплемента, ингибитора IL-2 и LF 15-0195 для производства лекарственного средства для продления срока выживаемости аллотрансплантата почки у млекопитающего.

36. Применение по п.35, где указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, и указанный ингибитор IL-2 и LF 15-0195 входят в состав композиции, пригодной для одновременного введения указанному млекопитающему.

37. Применение по п.35, где указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, ингибитор IL-2, LF 15-0195 входят в состав композиции или композиций, пригодных для последовательного введения указанному млекопитающему.

38. Применение по п.35, где указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, входит в состав композиции, пригодной для введения указанному млекопитающему постоянно.

39. Применение по п.35, где LF 15-0195 входит в состав композиции, пригодной для введения указанному млекопитающему постоянно.

40. Применение по п.35, где указанное лекарственное средство ингибирует образование C5b или C5a.

41. Применение по п.40, где указанное лекарственное средство, которое ингибирует образование C5b или C5a, представляет собой целое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

42. Применение по п.41, где указанное целое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой человеческое, гуманизированное, химеризованное или деиммунизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

43. Применение по п.41, где указанное целое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует расщепление компонента C5 комплемента.

44. Применение по п.41, где указанный антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы, состоящей из Fab, F(ab')₂, Fv, доменного антитела и одноцепочечного антитела.

45. Применение по п.41, где указанный антигенсвязывающий фрагмент представляет собой пекселизумаб.

46. Применение по п.41, где указанное целое антитело представляет собой экулизумаб.

47. Применение по п.35, где указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, выбрано из группы, состоящей из i) растворимого рецептора комплемента, ii) CD59, iii) CD55, iv) CD46 и v) антитела против C5, C6, C7, C8 или C9.

48. Применение по п.35, где указанный ингибитор IL-2 включает циклоспорин А или такролимус.

49. Применение по п.35, где указанный ингибитор IL-2 представляет собой

ингибитор mTOR.

50. Применение по п.49, где указанный ингибитор mTOR включает сиролимус.

51. Фармацевтический набор, включающий: (i) лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, (ii) LF 15-0195 и (iii) ингибитор IL-2, где
5 указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, LF 15-0195 и ингибитор IL-2 сформулированы для постоянного введения, и где указанный ингибитор IL-2 выбран из группы, состоящей из циклоспорина А, такролимуса и сиролимуса.

10 52. Фармацевтический набор по п.51, где указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, ингибирует образование C5b или C5a.

53. Фармацевтический набор по п.52, где указанное лекарственное средство, которое ингибирует образование C5b или C5a, представляет собой целое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

15 54. Фармацевтический набор по п.53, где указанное целое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой человеческое, гуманизированное, химеризованное или деиммунизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

20 55. Фармацевтический набор по п.52, где указанное целое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует расщепление компонента C5 комплемента.

56. Фармацевтический набор по п.52, где указанный антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы, состоящей из Fab, F(ab')₂, Fv, доменного антитела и одноцепочечного антитела.

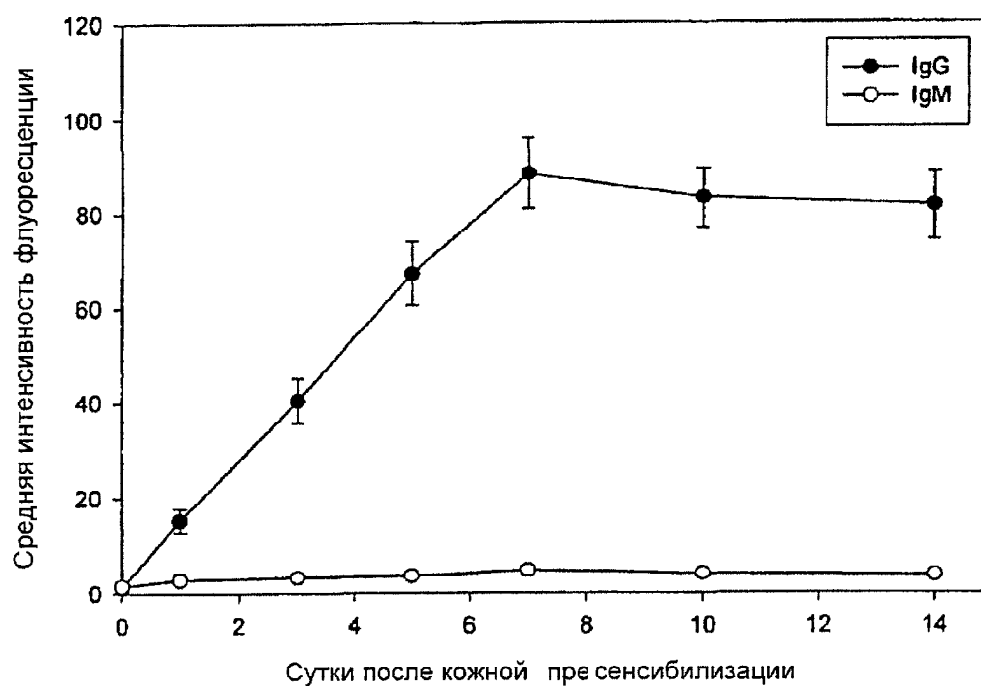
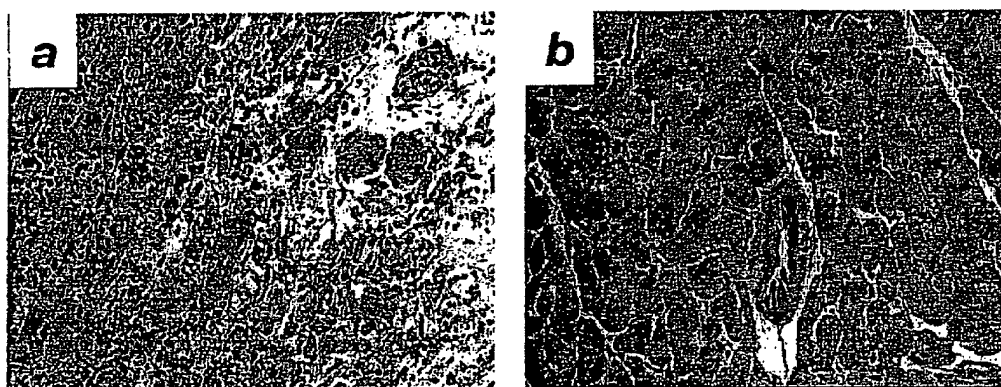
25 57. Фармацевтический набор по п.52, где указанный антигенсвязывающий фрагмент представляет собой пекселизумаб.

58. Фармацевтический набор по п.52, где указанное целое антитело представляет собой экулизумаб.

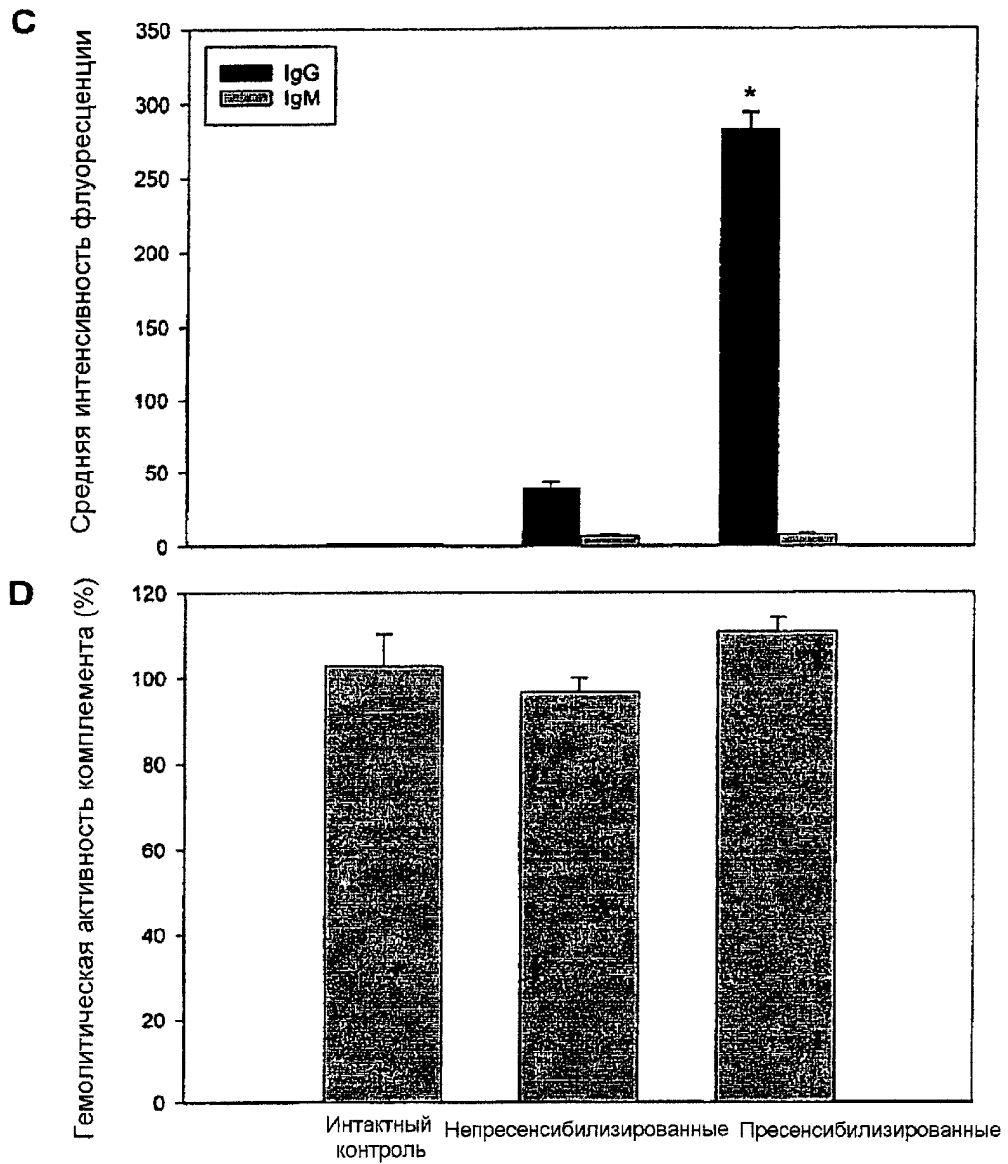
30 59. Фармацевтический набор по п.51, где указанное лекарственное средство, которое ингибирует активность комплемента, выбрано из группы, состоящей из i) растворимого рецептора комплемента, ii) CD59, iii) CD55, iv) CD46 и v) антитела против C5, C6, C7, C8 или C9.

35 60. Способ по п.1, где указанное молокопитающее является пресенсибилизированным к указанному аллотрансплантату почки.

61. Применение по п.38, где указанное молокопитающее является пресенсибилизированным к указанному аллотрансплантату почки.

A**B**

Фиг. 1А, В

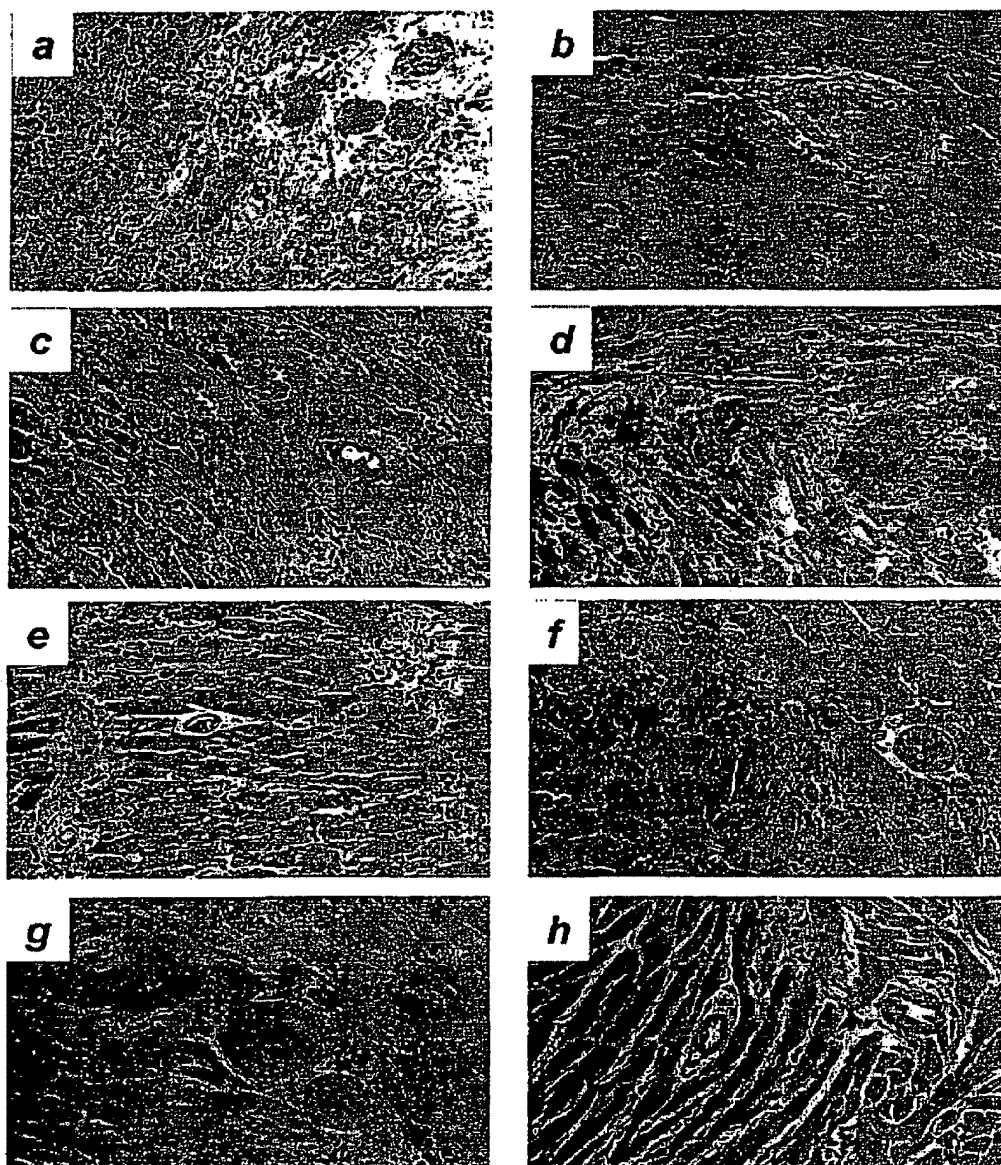


Фиг. 1C, D

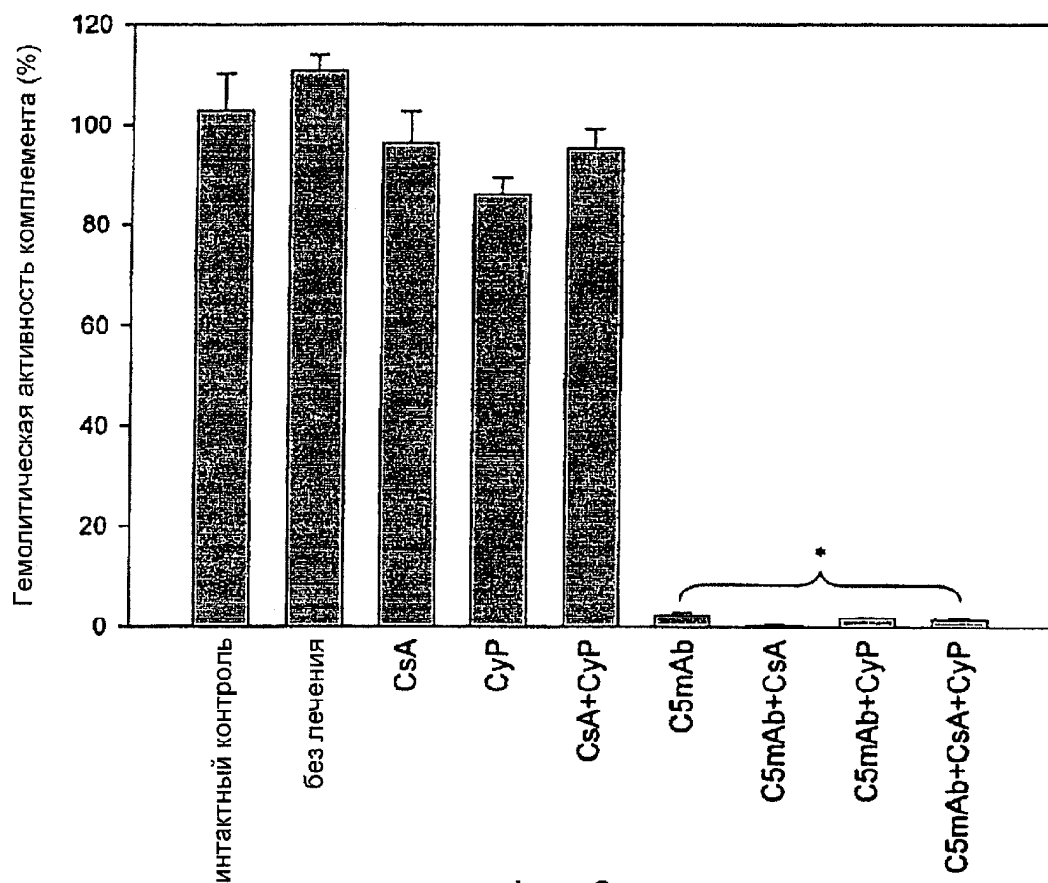


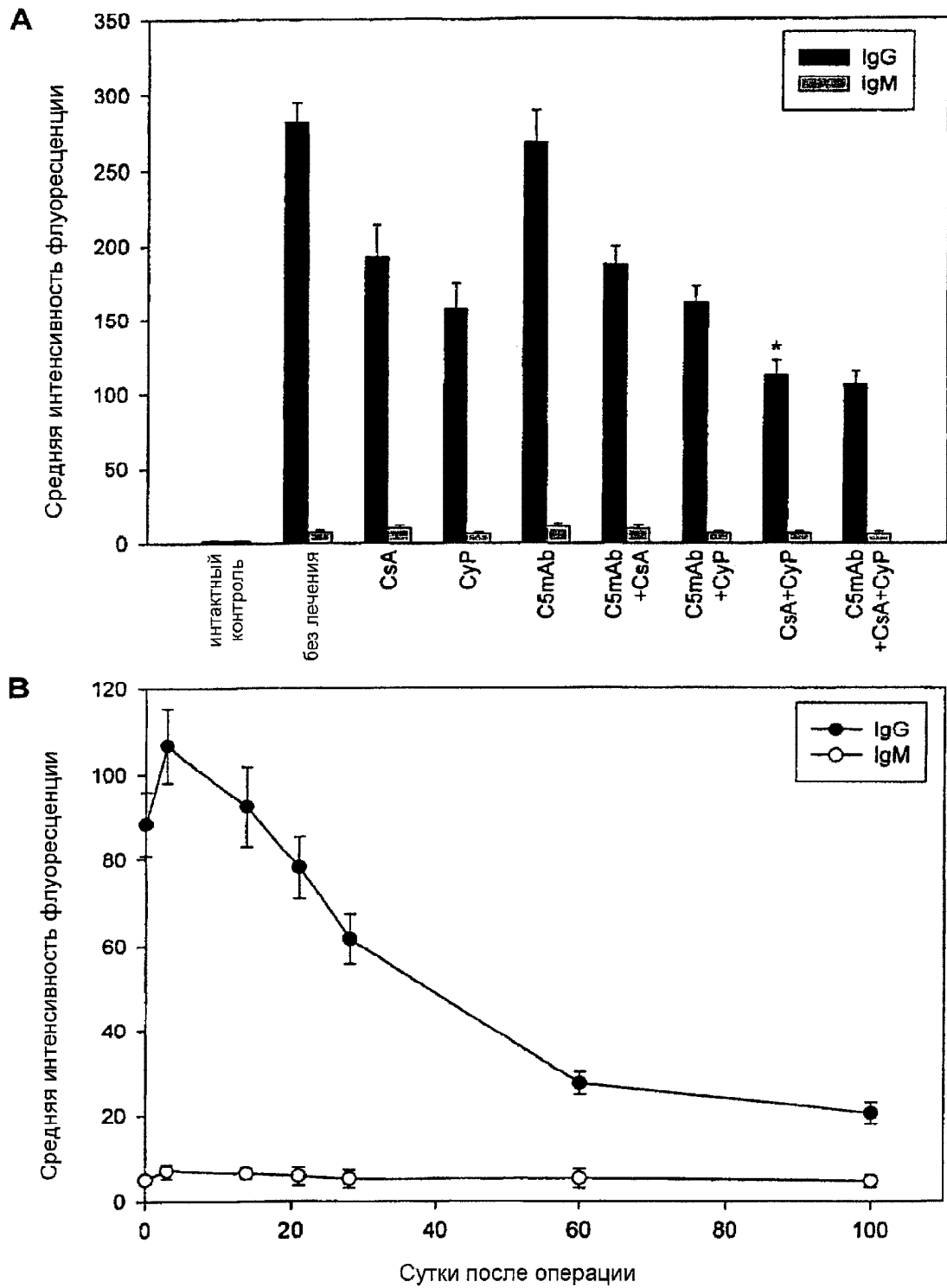
Фиг. 2A

B



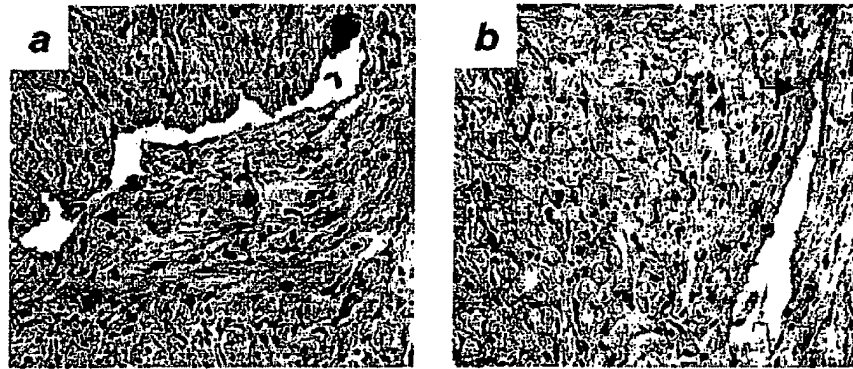
Фиг. 2В



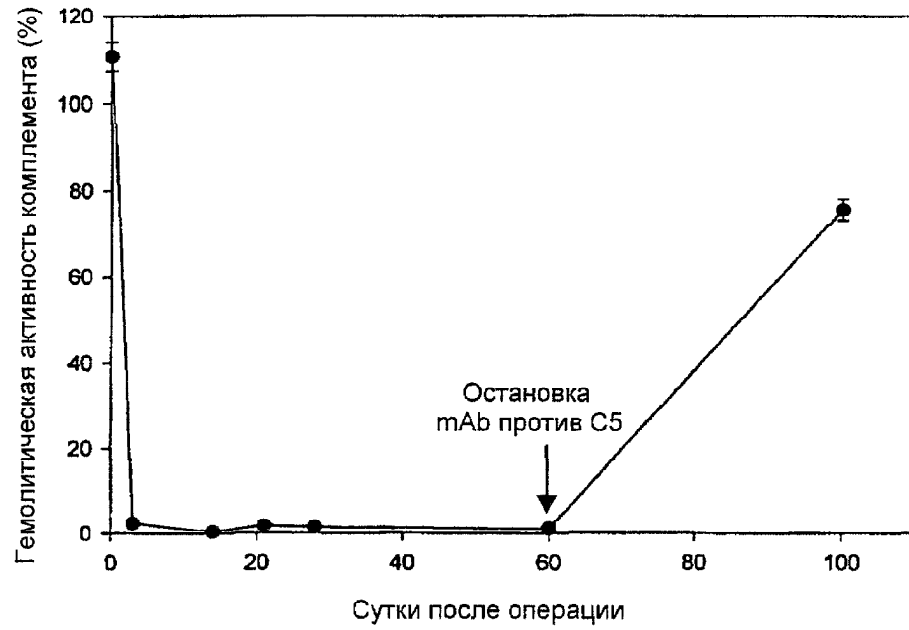


Фиг. 4А, В

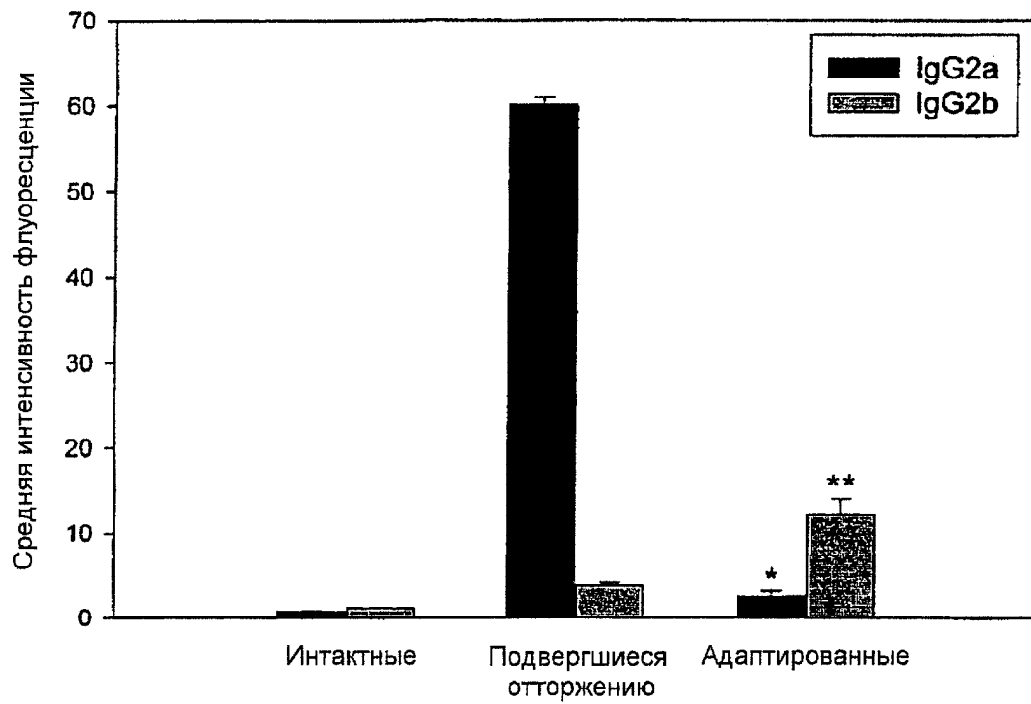
C



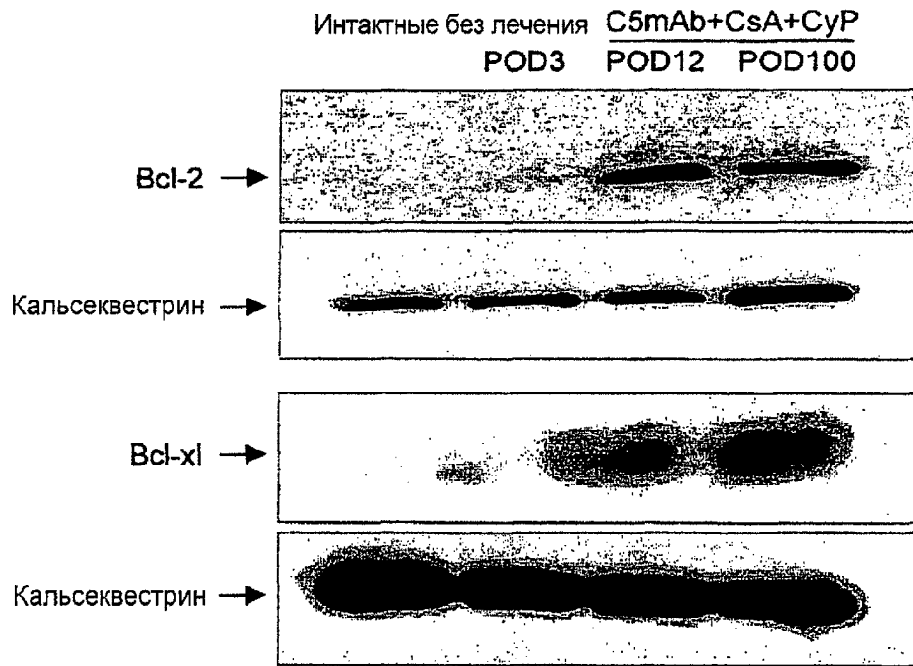
D



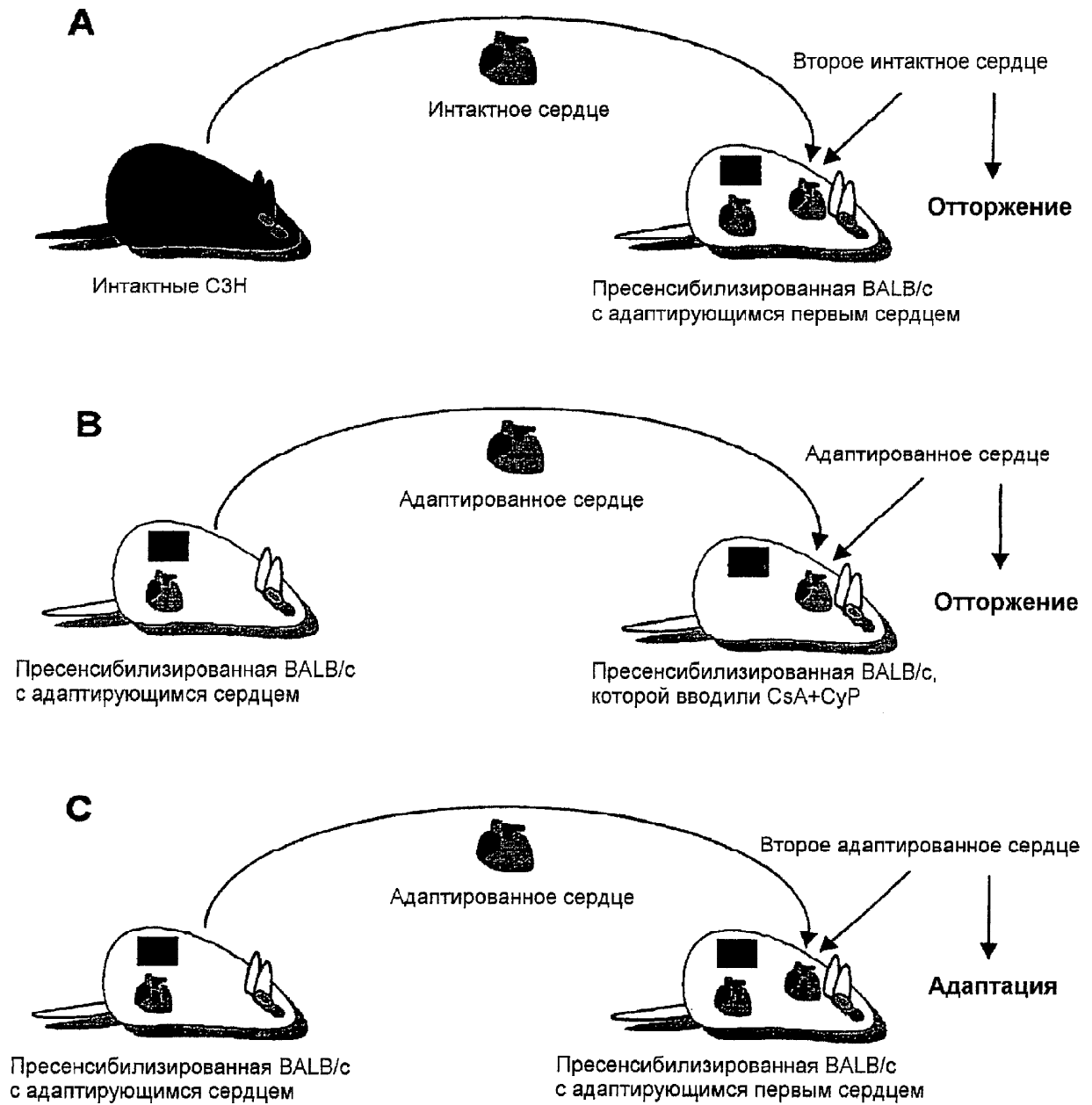
Фиг. 4C, D



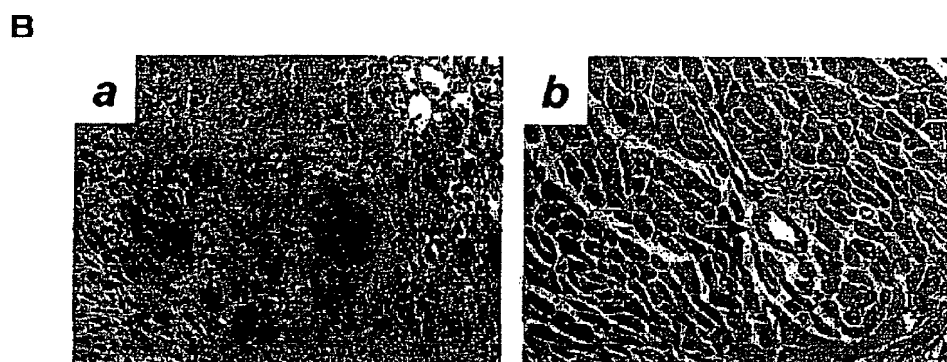
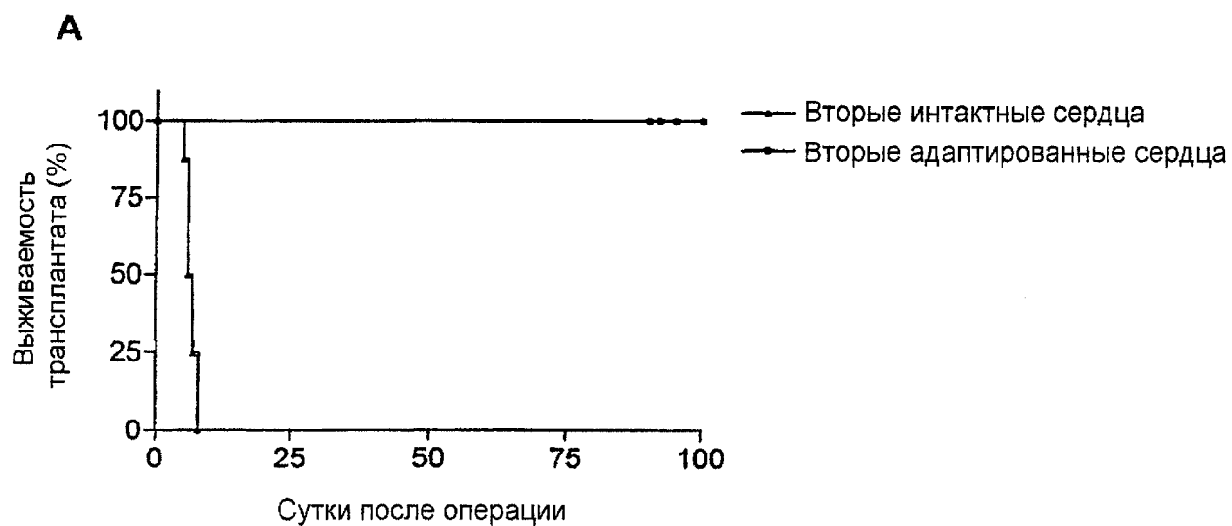
Фиг. 5



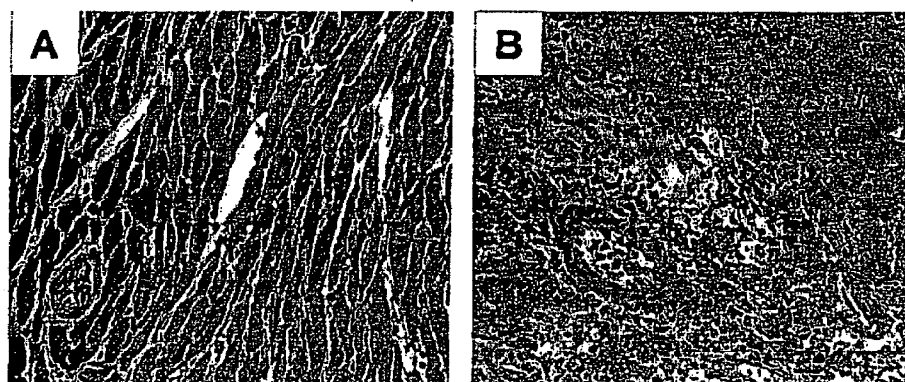
Фиг. 6



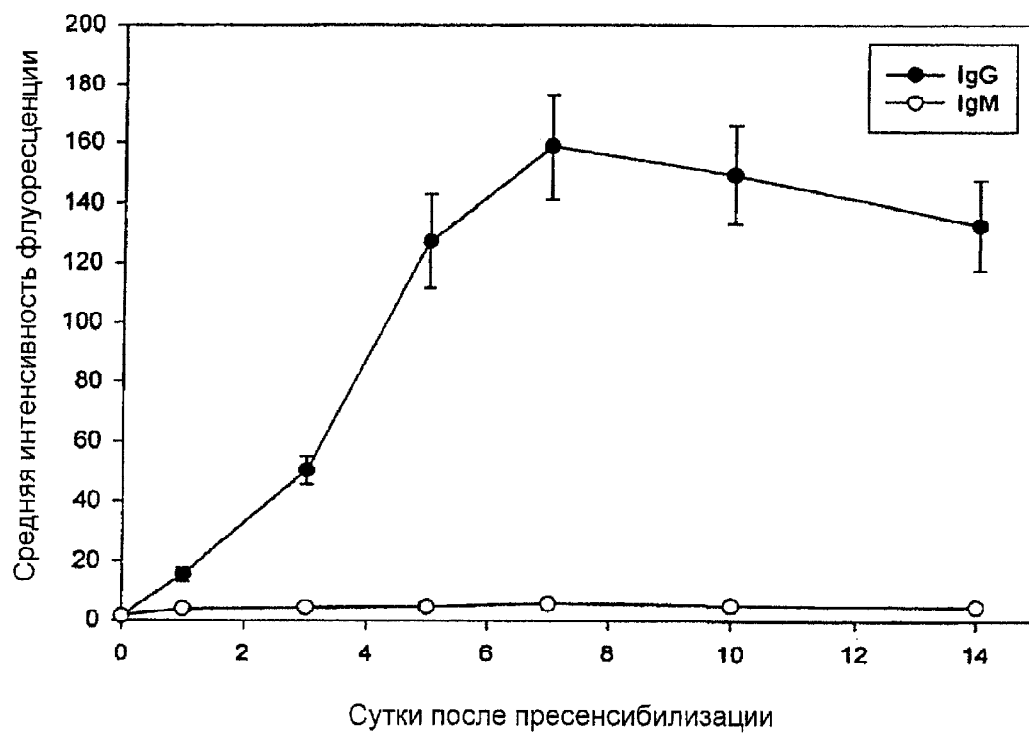
Фиг. 7А, В, С



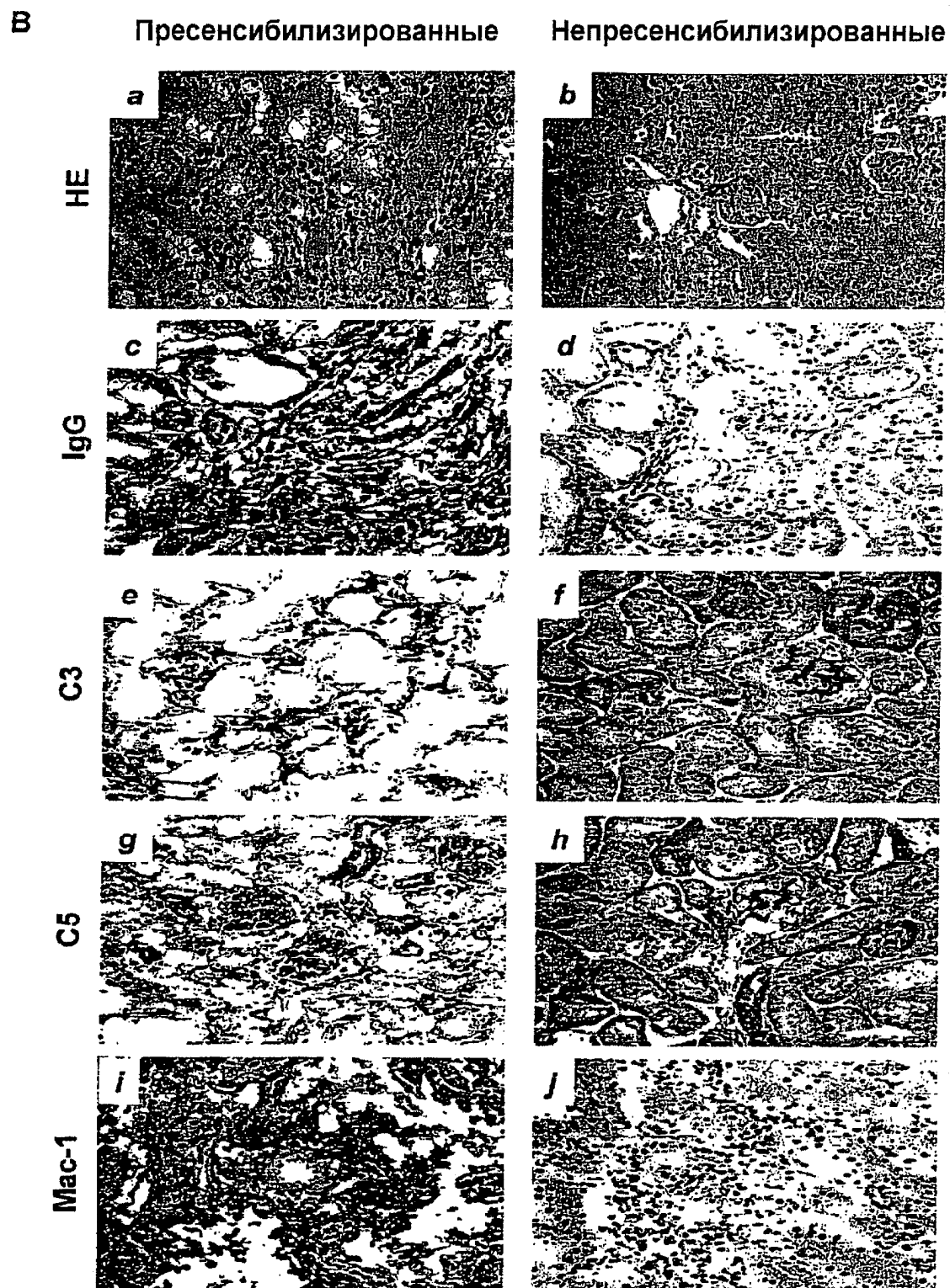
Фиг. 8А, В



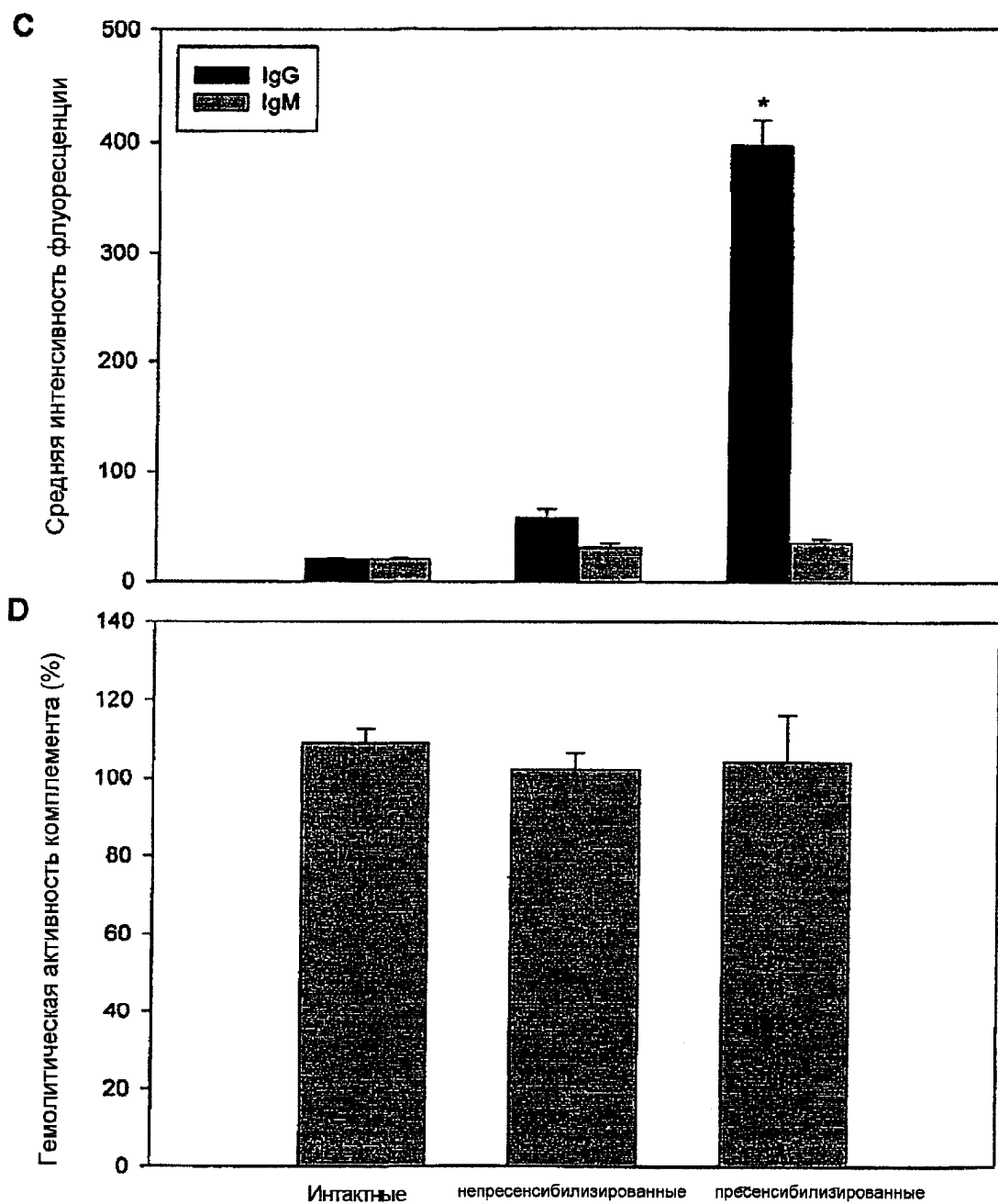
Фиг. 9А, В



Фиг. 10А



Фиг. 10В

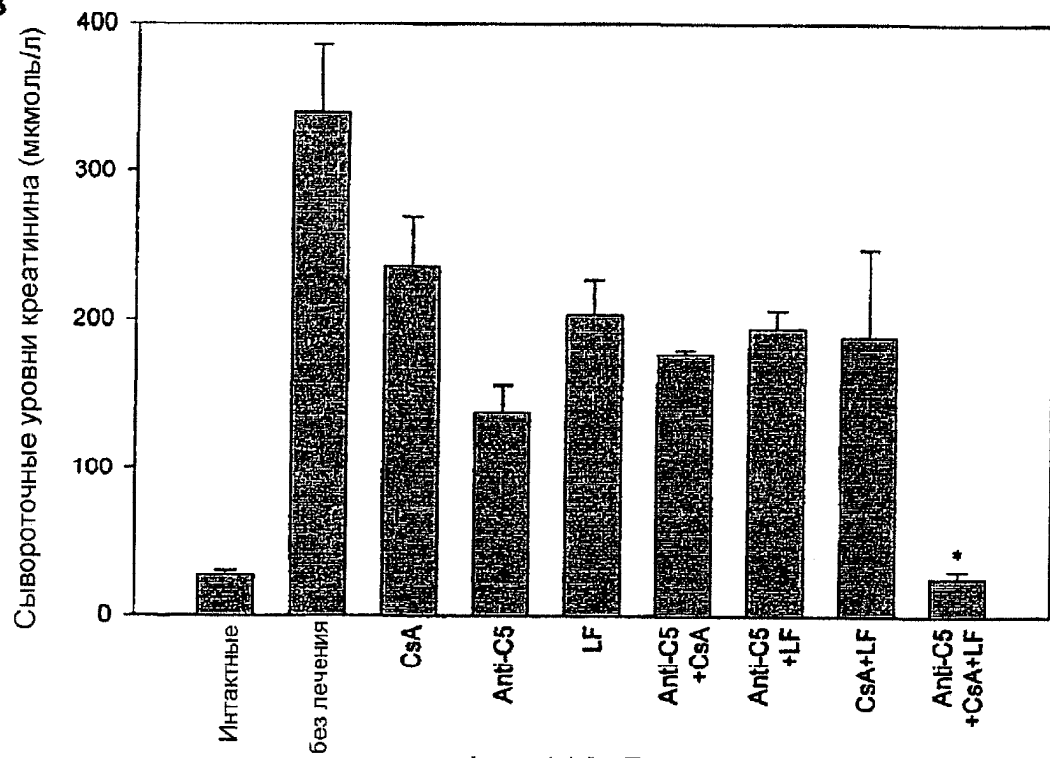


Фиг. 10C, D

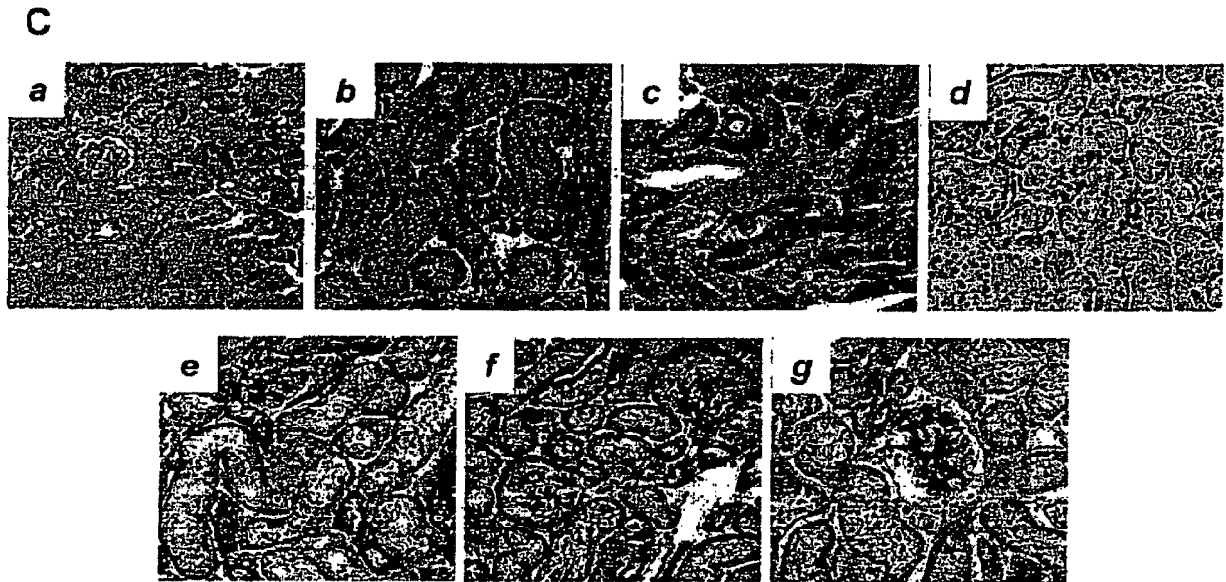
A



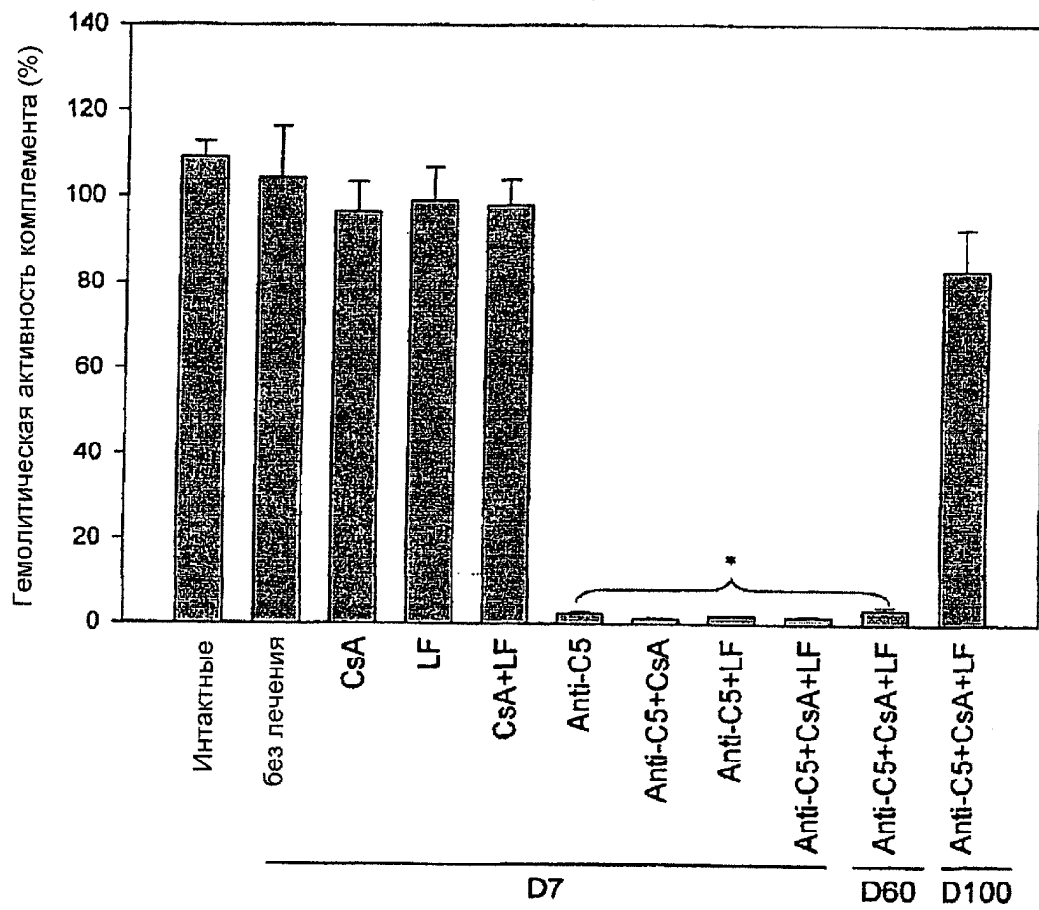
B



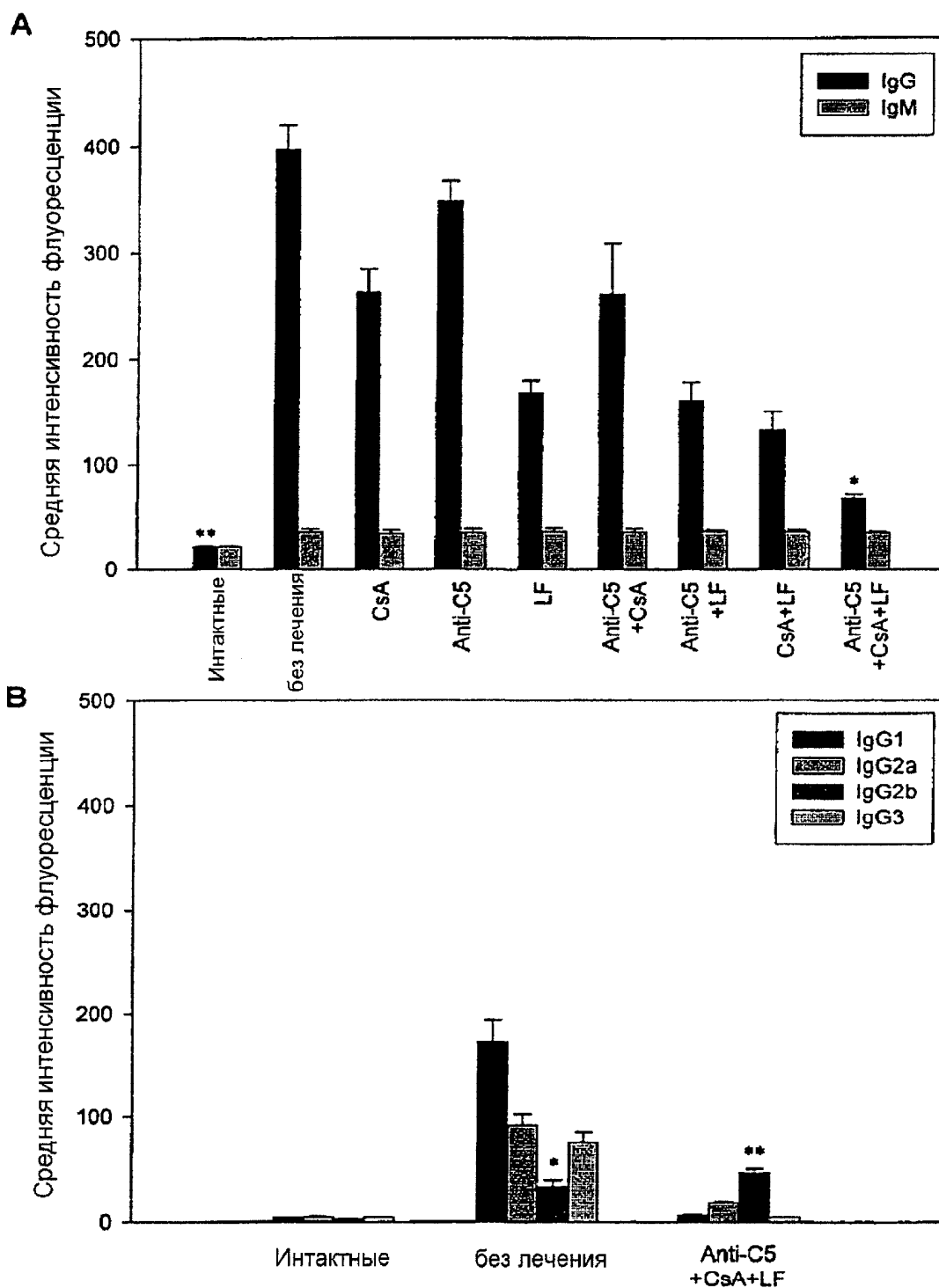
Фиг. 11А, В



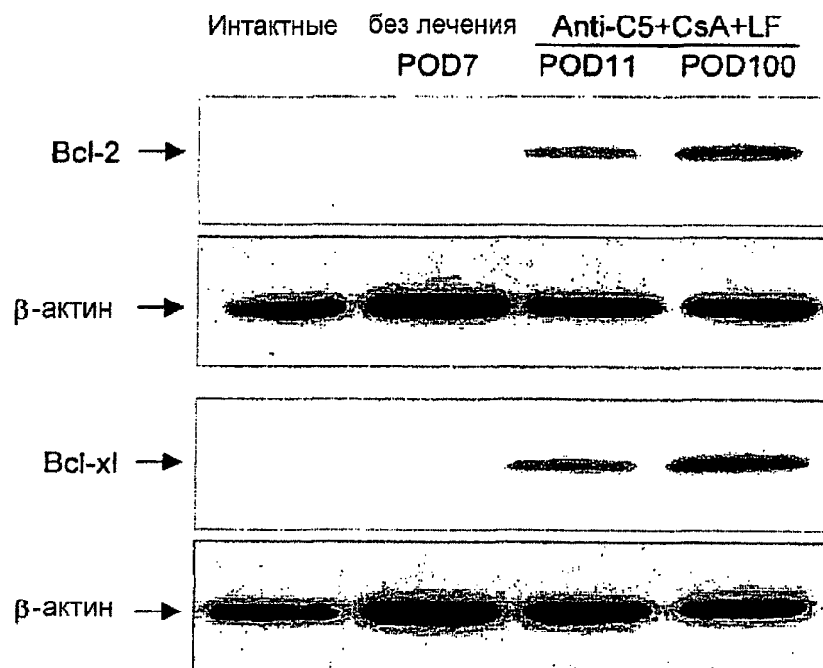
Фиг. 11C



Фиг. 12



Фиг. 13А, В



Фиг. 14