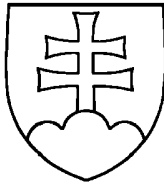


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

**ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA
VYNÁLEZU**

- (22) Dátum podania: 12.01.96
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 08/371 707
(32) Dátum priority: 13.01.95
(33) Krajina priority: US
(40) Dátum zverejnenia: 14.01.98
(86) Číslo PCT: PCT/CA96/00019, 12.01.96

(21) Číslo dokumentu:

937-97

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.⁶:

A 61K 41/00

(71) Prihlasovateľ: QUADRA LOGIC TECHNOLOGIES, INC., Vancouver, British Columbia, CA;
THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA, Vancouver, British Columbia, CA;

(72) Pôvodca vynálezu: Obochi Modestus Onuora Kay, Vancouver, British Columbia, CA;
Levy Julia, Vancouver, British Columbia, CA;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Spôsob prevencie odhojovania transplantátov**

(57) Anotácia:

Spôsob obmedzovania odhojovania aloimplantátov zahŕňajúcich darcovské tkanivo, obsahujúce bunky vykazujúce antigény (APC), pričom a) darcovské tkanivo sa uvedie do styku s fotosenzibilizačným prostriedkom na získanie modifikovaného darcovského tkaniva, b) modifikované darcovské tkanivo sa vystaví svetlu s vlnou dĺžkou absorbovanou uvedeným fotosenzibilizačným prostriedkom v čase dostatočnom na zbavenie darcovského tkaniva buniek APC a c) darcovské tkanivo zbavené buniek APC sa transplantuje do tkaniva príjemcu. Ošetrovaním darcovského tkaniva fotodynamickou terapiou sa významne predĺži čas prežitia transplantátov, hlavne kožných aloimplantátov. Fotosenzibilizátor môže byť tiež súčasťou konjugátu, obsahujúceho cieľovo špecifickú jednotku.

Spôsob prevencie odhojovania transplantátov

Oblasť techniky

Vynález sa týka spôsobu terapeutického dodávania aloimplantátov a prevencie ich odhojovania príjemcom. Hlavne sa týka ošetrovania tkaniva darcu metódou fotodynamickej terapie za účelom odstránenia buniek obsahujúcich antigény z tkaniva a zníženia imunogenity v ňom obsiahnutých buniek.

Doterajší stav techniky

Úspech transplantácie aloimplantátu hostiteľovi závisí od takých faktorov, ako sú antigény v transplantovanom tkanive, ktoré sú príjemcom rozpoznávané ako cudzie a môžu vyvolať odmietavú reakciu, ďalej bunky v imunitnom systéme príjemcu, ktoré sprostredkovávajú odhojovanie, a reakcie, ktoré modifikujú buď výskyt cudzieho antigénu alebo bunkovú reakciu. Je známe, že významná zložka odhojovania aloimplantátov súvisí s prítomnosťou neparenchymálnych buniek (cestujúcich leukocytov) v darcovskom tkanive.

Je tiež známe, že významnú úlohu pri sprostredkovaní útoku tkaniva štepu proti príjemcovi zohrávajú produkty hlavného histokompatibilného systému (major histocompatibility complex, MHC). MHC je obvykle komplexný, pretože zahrnuje mnoho rôznych miest, z ktorých každé kóduje zvláštne povrchové antigény buniek, a pretože tieto miesta majú rozsiahly polymorfizmus. Miesta MHC spadajú na základe distribúcie svojho tkaniva, štruktúry exprimovaných antigénov a ich funkcií do jednej z dvoch tried, triedy I alebo triedy II. Antigény triedy I, prítomné na všetkých jadrových bunkách, slúžia ako primárne ciele pre cytotoxické T (CD8⁺) lymfocyty. Antigény triedy II nie sú v tkanive natoľko rozšírené a slúžia ako primárne ciele pre pomocné T (CD8⁻) lymfocyty.

Polymorfne formy jednotlivých miest ľudského leukocytového antigénu (HLA) MHC u ľudí sú rozpoznávané protilátkami a rôznymi metódami in vitro, ktoré merajú rozpoznávanie T-lymfocytov. Tieto reakcie, sprostredkované príjemcovým rozpoznaním polymorfizmu u darcu, korelujú so silnými odmietavými reakciami, ktoré prebiehajú in vivo. Skúmanie bunkovej bázy

odhojovania transplantátov štúdiami ako in vitro, tak in vivo odhalilo, že odmietavej reakcie sa zúčastňujú ako lymfocyty CD4⁺, tak CD8⁺.

Pokusy predĺžiť prežitie aloimplantátov i xenoimplantátov po transplantácii ako na experimentálnych modeloch, tak aj v medicínskej praxi, sa sústreďujú hlavne na potlačenie imunitného aparátu príjemcu. Cieľom tejto terapie je preventívna imunosupresia a/alebo liečba odhojovania štepov.

Ako príklady prostriedkov, používaných pre imunosupresiu, je možné uviesť cytotoxické liečivá, antimetabolity, kortikosteroidy a antilymfocytické sérum. Klinický úspech transplantácií významne zväčšili nešpecifické imunosupresívne prostriedky, ktoré sa ukázali ako zvlášť účinné v preventívnej imunosupresii (azatioprin, bromokryptín, metylprednizolón, prednizón a cyklosporín A). Nefrotoxicita cyklosporínu A po renálnej transplantácii bola znížená súčasným podávaním steroidov, ako je prednizolón alebo prednizolón v spojení s azatioprinom. Ďalej boli obličky úspešne transplantované s použitím anti-lymfocytového globulínu nasledovaného cyklosporínom A. Iný postup spočíva v celkovom ožarovaní lymfatických uzlín príjemcu pred transplantáciou s minimálnou imunosupresiou po transplantácii. Liečba odhojovania zahŕňa použitie steroidov, 2-amino-6-aryl-5-substituovaných pyrimidínov, heterológneho anti-lymfocytového globulínu a monoklonálnych protilátok k rôznym populáciám leukocytov.

Hlavnou komplikáciou imunosupresívnych liečiv sú infekcie. Okrem toho je systémová imunosupresia sprevádzaná nežiadúcimi toxickými účinkami, napríklad nefrotoxicitou, ak sa používa po renálnej transplantácii cyklosporín A, a znížením hladiny hemopoietických kmeňových buniek. Imunosupresívne liečivá môžu tiež viesť k obezite, zlému hojeniu rán, steroidnej hypoglykémii, steroidnej psychóze, leukopénii, gastrointestinálnemu krvácaniu, lymfómu a hypertenzií.

Z dôvodu týchto komplikácií hľadajú transplantáčni imunológovia metódy potlačovania imunitnej reaktivity antigénovo špecifickým spôsobom tak, aby sa stratila len reakcia na aloantigén darcu. Takáto špecifická imunosupresia sa obvykle dosahuje modifikáciou buď antigenity transplantovaného tkaniva alebo špecifických buniek, schopných sprostredkovať odhojovanie. V určitých prípadoch závisí skutočnosť, či bude vyvolaná imunita alebo tolerancia, od spôsobu, ktorým je antigén dodaný imunitnému systému. Ďalšie stratégie proti odhojovaniu sa zameria-

vajú na elimináciu alebo oslabenie cestujúcich leukocytov, nesúcich MHC, t.j. buniek vykazujúcich antigén („antigen-presenting cells“, APC), v tkanivách darcu pred transplantáciou.

Medzi metódy, ktoré boli opísané za týmto účelom, patrí predĺžená doba kultivácie darcovského tkaniva (Lafferty a spol., „Thyroid Allograft Immunogenicity is Reduced after a Period in Organ Culture“, *Science* 188:259 (1975)). Zistilo sa, že predbežné ošetrenie tkanív aloimplantátov kultiváciou v tkanivovej kultúre pred transplantáciou vedie na dvoch myších modeloch k trvalému prijatiu cez bariéry MHC (Lafferty a spol., *Transplantation* 22:138-49 (1975); Bowen a spol., *Lancet* 2:585-86 (1979)). Bola vyslovená hypotéza, že toto ošetrenie vedie k odstráneniu cestujúcich lymfatických buniek, a teda k absencii stimulačnej bunkovej populácie nutnej pre imunogenitu tkaniva. Boli napríklad použité niektoré vzájomne si zodpovedajúce dvojice HLA darca - príjemca, napríklad u vaskulárnych a obličkových štepov, a niekedy pred krvnými transfúziami.

Darcovské tkanivo bola ošetrované rastovým faktorom, napríklad TGF-beta (Czarniecki a spol., patent US č. 5,135.915, vydaný 4.8.1992), niekedy v kombinácii s predĺženou dobou kultivácie (Orton, patent US č. 5,192.312, vydaný 9.3.1993).

Darcovské tkanivo môže byť ošetrené UV žiarením (Reemtsma a spol., patent US č. 4,946.438, vydaný 7.8.1990, a Lau a spol., „Prolongation of Rat Islet Allograft Survival by Direct Ultraviolet Irradiation of the Graft“, *Science* 223:607 (1984)), niekedy v spojení s mikroenkapsuláciou (Weber a spol., patent US č. 5,227.298, vydaný 13.7.1993). Iní pracovníci používali samotné bariérové membrány, ako je dvojvrstva, zahrnujúca prvú necytotoxickú vrstvu a druhú vonkajšiu vrstvu biokompatibilného a semipermeabilného polymérneho materiálu, opísaná Cochrumom, patent US č. 4,696.286, vydaný 29.9.1987.

Darcovské tkanivo bolo ošetrované rozmanitými látkami, napríklad topickou aplikáciou cyklosporínu na kožné štepy, ako je opísané Hewittom a spol., patent US č. 4,996.193, vydaný 26.2.1991, a perfúziou darcovskej obličky lymfocytickým chalónom, ako uvádza Jones a spol., patent US č. 4,294.824, vydaný 13.10.1981. Doba prežitia kožných štepov bola predĺžená ošetrením kortizónom, talidomidom alebo uretánom *in vitro* pred implantáciou laboratórnemu zvierat'u. Množstvo liečiva, aplikovaného lokálne na koži, je menšie ako množstvo potrebné na dosiahnutie podobného účinku systémovou injekciou liečiva príjemcovi. Darcovská koža bola

ošetrovaná pred transplantáciou in vitro streptokinázou/streptodornázou, preparátmi RNA a DNA prijemcu alebo roztokmi glutaraldehydu za účelom zníženia antigenity implantovanej kože.

Prepracovanejšie prístupy zahŕňujú ošetrovanie darcovského tkaniva monoklonálnou protilátkou zameranou proti produktu MHC spolu s komplementom (Faustman a spol., „Prolongation of Murine Islet Allograft Survival by Pretreatment of Islets with Antibody Directly to Ia Determinants“, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:5156 (1981)) alebo ošetrovanie darcovského tkaniva imunokonjugátom protilátky zameranej proti MHC (Shizuru, J.A. a spol., „Inhibition of Rat Mixed Lymphocyte Pancreatic Islet Cultures with Anti-Ia Immunotoxin“, Transplantation 42:660 (1986)). Tieto metódy poskytli premenlivé výsledky. Existuje teda potreba spôsobu predĺženia prežitia štepú pri transplantáčnych operáciách, ktorý by minimalizoval toxicitu a ďalšie nepriaznivé účinky vznikajúce použitím veľkých dávok imunosupresív.

Metóda používaná podľa vynálezu na selektívne ničenie týchto buniek APC zahŕňa kontakt darcovského tkaniva s fotosenzibilizátorom, vystavenie pôsobeniu svetla a potom transplantáciu. Podobné fotodynamické metódy boli už predtým použité primárne na ničenie tkanív, ako sú nádorové tkanivá, aterosklerotické plaky, povrchové onemocnenia kože a nežiaduce patogény v krvi (Levy a spol., patenty US č. 5,283.255, vydaný 1.2.1994, 4,883.790, vydaný 28.11.1989, 4,920.143, vydaný 24.4.1990, 5,095.030, vydaný 10.3.1992, a 5,171.749, vydaný 15.12.1992, na ktoré sa tu týmto odkazuje). Vid' tiež Dougherty a spol., patenty US č. 4,932.934, vydaný 12.6.1990, 4,889.129, vydaný 26.12.1989, 5,028.621, vydaný 2.7.1991, 4,866.168, vydaný 12.9.1989, 5,145.863, vydaný 8.9.1992, a 4,649.151, vydaný 10.3.1987, na ktoré sa tu tiež odkazuje.

Napríklad patent US č. 4,866.168 Doughertyho a spol. opisuje prípravok, predávaný pod názvom „Photofrin II“, ktorý sa získava izoláciou vysokoagregátového podielu molekulovej hmotnosti hematoporfyrínového derivátu. Ako ďalší konkrétny príklad opisuje patent US č. 4,883.790 Levyho a spol. použitie skupiny príbuzných zlúčenín, označovaných „monohydrobenzoporphyryny“, na analogické účely.

Ďalej bolo opísané použitie mnohých rôznych fotosenzibilizátorov s podobnou štruktúrou. Vid' napríklad deriváty (1-hydroxyetyl)deuteroporfyrínu, hydrofóbne étery hematoporfyrínu a zlúčeniny pripravené z metylfeoforbidu (Pandey a spol., patent US č. 5,002.962, vydaný 26.3.1991), konjugáty pyrofeoforbidu (Pandey a spol., patent US č. 5,314.905), deriváty bakte-

riochlorofylu-a (Dougherty, patenty US č. 5,171.741 a 5,173.504), diméry viazané na monovinyl- a divinylétery (Ward, patent US č. 4,961.920), benzoporfyrínové deriváty (Allison a spol., patent US č. 5,214.036), dibenzoporfyrínové zlúčeniny (Dolphin a spol., patenty US č. 5,308.608 a 5,149.708), takzvané „zelené“ porfyríny, ako sú deriváty monobenzoporfyrínu (Jamieson a spol., patent US č. 5,087.636), porfyrínové zlúčeniny obsahujúce exocyklické dvojité väzby (Chang a spol., patent US č. 5,064.952) a sodné porfimérové zlúčeniny (Clauss a spol., patent US č. 5,244.914). Na opisy všetkých týchto patentov sa tu týmto odkazuje. Všeobecne sa na tieto liečivá v prvom priblížení nazerá z hľadiska použiteľnosti vo fotodynamickej terapii ako na vzájomne zameniteľné.

Hoci sa fotodynamická terapia zaoberá primárne liečbou nádorových buniek, už predtým sa objavili ďalšie aplikácie. Tieto fotosenzibilizačné liečivá je možné napríklad používať v postupoch pre elimináciu aterosklerotických plakov a pri ošetrovaní krvi a iných telových tekutin za účelom ničenia infekčných organizmov. Fotodynamická terapia však zjavne doposiaľ nebola použitá na elimináciu cestujúcich leukocytov v tkanive darcovského aloimplantátu.

Zvláštna výhoda vynálezu spočíva v tom, že na rozdiel od terapeutických postupov zahrnujúcich podávanie fotosenzibilizačného liečiva organizmu je možné tkanivo najvhodnejšie ošetrovať in vitro pred skutočnou transplantáčnou procedúrou. Týmto spôsobom sú podstatne odstránené problémy spojené so zaistením správnej hladiny expozície svetlu napríklad v prípade konjugátu spojeného s cieľovými bunkami vnútri organizmu.

Ďalej sa spôsobom podľa vynálezu získajú štepy, ktoré sú vo vhodných hostiteľoch imunologicky stabilné, biologicky funkčné a schopné uchovávanie pred transplantáciou. Vynález tak umožňuje vytvorenie banky fotodynamicky ošetrovaných štepev, ktoré môžu byť použité na krátkodobé uchovávanie.

Podstata vynálezu

Vynález poskytuje postup pre minimalizáciu odhojovania transplantátov v živočíšnych subjektoch. Pred transplantáciou sa darcovské tkanivo, ktorá obsahuje bunky vykazujúce antigén (APC), uvedie do styku s fotosenzibilizačným prostriedkom a vystaví svetlu s vlnovou dĺžkou absorbovanou týmto fotosenzibilizačným prostriedkom počas doby potrebnej na odstránenie

APC. Týmto ošetrením sa neusmrtia keratinocyty, ale môže sa zmeniť ich expresia antigénov triedy I a/alebo II, rovnako ako cytokíny, ktoré vylučujú, takže sa zníži imunogenita kože samotnej.

V jednom uskutočnení je fotosenzibilizačný prostriedok vo forme konjugátu, zahrnujúceho cieľovo špecifický komponent, za účelom zvýšenia interakcie medzi fotosenzibilizačným prostriedkom a cieľovými APC. Fotosenzibilizačné liečivo sprostredkuje deštrukciu APC, ak je aloimplantát ožiarený pri vhodnej vlnovej dĺžke, absorbovanej fotosenzibilizačným prostriedkom.

Podľa ďalej uvedeného podrobného opisu sa podľa vynálezu darcovské tkanivo pred transplantáciou uvedie do styku s fotosenzibilizačným prostriedkom. Výraz „darcovské tkanivo“ zahŕňa akýkoľvek typ transplantovateľného alebo implantovateľného tkaniva z darcu iného ako je príjemca, ktoré obsahuje APC. Darcovským tkanivom, používaným podľa vynálezu, môže byť akekoľvek z rozmanitých tkanív, napríklad mäkké tkanivo, ako je amniotická blana novorodenca, kostná dreň, hematopoietické prekurzorové bunky, kolagén a kostný proteín na stimuláciu rastu chrupavky, orgány, ako je koža, srdce, pečeň, slezina, pankreas, lalok štítnej žľazy, pľúca, obličky, tubulárne orgány (napríklad črevo, krvné cievy alebo pažerák), a časti orgánov, ako sú srdcové chlopne a izolované bunky alebo zhluky buniek, ako sú ostrovčekové bunky pankreasu alebo pečenevé bunky.

Tubulárne orgány môžu byť používané k náhrade poškodených častí pažeráka, krvných ciev alebo žlčovodu. Kožné štepy môžu byť používané nielen pre popáleniny, ale aj na úpravu poškodeného čreva alebo na uzavretie určitých defektov, ako je bráničná prietrž. Vo zvlášť výhodnom uskutočnení je darcovským tkanivom kožné tkanivo alebo pankreatické ostrovčekové bunky.

Výraz „štep“, ako je tu používaný, sa vzťahuje na biologický materiál pochádzajúci od darcu, pre transplantáciu príjemcovi. Výraz „transplantát“ a rôzne jeho varianty sa vzťahuje na vloženie štepu do príjemcu, či už je transplantácia syngénna (kde darca a príjemca sú geneticky identickí), alogénna (kde darca a príjemca sú rôzneho genetického pôvodu, ale rovnakého druhu) alebo xenogénna (kde darca a príjemca patria k rôznym druhom). Podľa typického scenára teda je hostiteľom človek a štepom je izotransplantát, pochádzajúci od človeka rovnakého alebo iného genetického pôvodu. Podľa iného scenára pochádza štep z odlišného druhu od toho, kto-

rému sa transplantuje, vrátane zvierat fylogenicky značne vzdialených druhov, napríklad v prípade transplantácie srdca paviána do ľudského hostiteľa.

Darcovské tkanivo môže byť odobraté z akéhokoľvek zdroja, či ide o mŕtvolu alebo živých darcov. Príklady vhodných darcov sú živé zvieratá, ako sú laboratórne zvieratá, napríklad psy, mačky, myši, krysy, skokušky (gerbily), morčatá, kravy, primáty, alebo ľudia. Výhodne sú darcami cicavce vrátane človeka.

Ľudskými darcami sú prednostne dobrovoľní, pokrvne príbuzní darcovia s normálnym výsledkom lekárskeho vyšetrenia a s rovnakou hlavnou krvnou skupinou ABO, pretože prekračovanie bariér medzi hlavnými krvnými skupinami môže brániť prežitiu aloimplantátu. Je však možné transplantovať napríklad obličku darcu typu 0 do príjemcu A, B alebo AB.

Výraz „aloimplantát“ sa vzťahuje na bunky a tkanivo, ktoré pochádzajú alebo sú odvodené od darcu rovnakého druhu ako je príjemca. Prednostne je darca rovnakého druhu ako príjemca.

Výraz „príjemca“, ako je tu používaný, sa vzťahuje na akéhokoľvek kompatibilného hostiteľa transplantátu. Výrazom „kompatibilný“ sa rozumie hostiteľ, ktorý darovaný štep prijme. Príklady potenciálne použiteľných príjemcov sú zvieratá, prednostne cicavce, ako sú hospodárske zvieratá, napríklad kone, kravy alebo ovce, domáce zvieratá, napríklad psy alebo mačky, laboratórne zvieratá, ako sú myši, krysy, gerbily alebo morčatá, alebo primáty, napríklad opice alebo ľudia. Hlavne je príjemcom človek. Ak je ako darcom, tak príjemcom štepu človek, potom sa pre zlepšenie histokompatibility oba kombinujú z hľadiska antigénov HLA triedy II.

Fotosenzibilizačné prostriedky

Na použitie podľa vynálezu je všeobecne vhodná akákoľvek z rôznych zlúčenín, ktoré sa používajú v klasickej fotodynamickej terapii. Ako je odborníkom známe, hlavnou skupinou známych fotosenzibilizačných prostriedkov sú zlúčeniny príbuzné porfyrínom. Ako je o niečo podrobnejšie opísané vyššie, zahrňujú tieto liečivá hematoporfyrínové deriváty, vysokomolekulárnu frakciu hematoporfyrínového derivátu, predávanú ako fotosenzibilizačný prostriedok Photofrin II, a jej aktívne zložky, rôzne syntetické deriváty porfyrínov, ako sú monohydrobenzoporfyríny, označované tiež ako benzoporfyrínové deriváty alebo BPD, zelené porfyríny a rôzne iné poly-

cyklické zlúčeniny, o ktorých sa má za to, že pri ožarovaní generujú singletový kyslík, ktorý spôsobuje deštrukciu tkaniva. Spôsoby prípravy vhodných fotosenzibilizačných zlúčenín sú plne opísané vo vyššie uvedených patentoch a v publikáciách, v nich citovaných. Prednostne je fotosenzibilizačným prostriedkom BPD.

Kritickou charakteristikou akéhokoľvek fotosenzibilizačného prostriedku je v princípe jeho tendencia vykazovať pri ožiarení svetlom s vlnovou dĺžkou, ktorá môže byť fotosenzibilizátorom absorbovaná, cytotoxický účinok na bunky, v ktorých je lokalizovaný. Hoci sa má za to, že v mnohých prípadoch je cytotoxický účinok výsledkom tvorby singletového kyslíka pri expozícii, nie je presný spôsob uskutočnenia pre vynález kritický.

Ako je do určitej miery diskutované vo vyššie uvedených patentoch Doughertyho a spol., s účinnými fotosenzibilizačnými prostriedkami sú typicky spojené početné ďalšie špecifické vlastnosti. Medzi vlastnosti fotosenzibilizátorov všeobecne, ktoré majú zvláštny význam pri uskutočňovaní vynálezu, patrí relatívna absencia toxicity voči bunkám pri absencii fotochemického účinku a ľahké vymiznutie z tkanív v neprítomnosti cieľovo špecifickej interakcie medzi konkrétnymi bunkami a fotosenzibilizátorom.

Fotosenzibilizačné prostriedky podľa vynálezu majú prednostne absorpčné spektrum, ktoré je v rozmedzí vlnových dĺžok medzi 350 nm a 1200 nm a ktoré môže byť o sebe známym spôsobom prispôsobené požadovanej penetrácii a prednostne leží medzi asi 400 a 900, hlavne medzi 600 a 800 nm.

Fotosenzibilizačné prostriedky podľa vynálezu sa dávajú spôsobom konzistentným s dobrou lekárskou praxou s uvažovaním charakteru transplantácie a upravovanej poruchy, druhu darcu, zdravotného stavu konkrétneho príjemcu, prítomnosti akéhokoľvek iného liečiva v darcovskom tkanive alebo v organizme príjemcu a ďalších faktorov, známych praktikom. Terapeuticky účinné množstvo fotosenzibilizátora, uvádzané do styku so štepom, je množstvo, ktoré účinne znižuje imunogenitu štepu, takže je kompatibilný s príjemcom a nie je odmietnutý. Všeobecne je účinné množstvo pre tento účel v rozmedzí asi 0,1 až asi 10 $\mu\text{g/ml}$, prednostne asi 0,1 až asi 2,0 $\mu\text{g/ml}$ a hlavne asi 0,25 až asi 1,0 $\mu\text{g/ml}$.

Fotosenzibilizačný prostriedok môže byť kombinovaný s jedným alebo viac imunosupresívami pre posilnenie imunosupresívneho účinku na štep. Účinné množstvo týchto ďalších prostriedkov závisí od množstva fotosenzibilizátora prítomného vo formulácii, typu transplantátu,

dôvodu transplantácie, miesta dodania, spôsobu podania, rozvrhu aplikácie, ďalších vyššie diskutovaných faktorov a iných faktorov známych praktikom.

Fotosenzibilizačný prostriedok sa typicky formuluje zmiešaním pri teplote miestnosti, vhodnom pH a požadovanom stupni čistoty s jedným alebo viac fyziologicky prijateľnými nosičmi, t.j. nosičmi, ktoré sú pri použití dávokovaní a koncentrácii voči príjemcovi netoxické. Hodnota pH formulácie závisí hlavne od konkrétneho použitia a koncentrácie fotosenzibilizátora, ale prednostne sa pohybuje kdekoľvek od asi 3 do asi 8.

Fotosenzibilizátor sa kvôli zabráneniu adhézie k nádobám, kde je umiestnený, ku ktorej dochádza pri hodnotách pH blížiacich sa fyziologickej hodnote, a na zaistenie aktivácie fotosenzibilizátora prednostne udržiava na neutrálnom pH (napríklad asi 6,5 až asi 7,5). Vhodným usku-točnením je teda formulácia v roztoku elektrolytu obsahujúcom rovnovážny soľný pufer s pH 6,5, ale neobsahujúcom fetálne bovinné sérum („FBS“). Dôvodom vypustenia FBS je obsah jeho antigénnych zložiek, ktoré by mohli exacerbovať reakciu aloimplantátu. Pokiaľ fotosenzibilizátor prilne k nádobám, v ktorých sú ošetrované štepy, pridá sa poprípade vhodná neantigénna zložka, ako je ľudský sérový albumín, v množstve, ktoré neinterferuje s fotosenzibilizátorom pri perfúzii alebo adhézii k ošetrovanému štepu.

Ak sa má formulácia fotosenzibilizátora aplikovať topicky, napríklad ak sa natiera na kožný štep pred transplantáciou, je výhodné používať viskózný roztok, ako je gél, skôr ako neviskózný roztok. Gél môže byť vytvorený napríklad zmiešaním roztoku fotosenzibilizátora s gélotvorným činidlom, ako je polysacharid, prednostne vodorozpustný polysacharid, napríklad kyselina hyalurónová, škroby a deriváty celulózy, napríklad metylcelulóza, hydroxyetylcelulóza a karboxymetylcelulóza. Keď je v gélovej formulácii prítomný polysacharid, je obvykle prítomný v množstve v rozmedzí asi 1 až 90 % hmotnostných, prednostne asi 1 až 20 % hmotnostných gélu. Príklady ďalších vhodných polysacharidov na tento účel a stanovenie rozpustnosti polysacharidov možno nájsť v dokumente EP 267015, zverejnenom 11.5.1988, na opis ktorého sa tu odkazuje.

Keď má byť ošetrovaný štep uchovávaný počas akejkoľvek doby, je fotosenzibilizátor prednostne formulovaný alebo pridaný k emulzii perfluórovanej zlúčeniny (pôsojacej ako náhradka krvi) na umožnenie prístupu vysokých koncentrácií kyslíka ku štepu. Tiež emulzie zahrnujú perfluórovanú zlúčeninu, ako je perfluórdekalín a/alebo perfluórtripropylamín, emulgovanú

pomocou povrchovo aktívnej látky vo vode. Perfluórovaná zlúčenina sa volí tak, aby bola čo najmenej toxická voči príjemcovi.

Príklady vhodných povrchovo aktívnych látok zahŕňujú poloxamérové povrchovo aktívne látky, ktoré predstavujú rad molekúl, tvorených blokovými kopolymérmi etylénoxidu a propylénoxidu, buď samotnými alebo v zmesi s fosfolipidom, ako je vaječný lecitín. Ďalším príkladom emulzie, komerčne dostupnej od Green Cross, je Fluosol-DA 20 %, ktorý produkt obsahuje perfluórdekalín a perfluórtripopylamín, emulgovaný poloxamérovým surfaktantom Pluronic F-68. Emulzie perfluórovaných zlúčenín a ich účinok na cicavce sú úplnejšie opísané v Bolland a spoi., J. Pharm. Pharmacol. 39:1021-1024 (1987), na čo sa tu týmto odkazuje.

Formulácia fotosenzibilizátora na použitie pri terapeutickej aplikácii je prednostne sterilná. Sterilita sa ľahko dosiahne sterilnou filtráciou cez (0,2 μ m) membrány. Akonáhle je formulovaný a sterilizovaný, nemusí byť fotosenzibilizátor stabilný voči oxidačnej denaturácii. Pre uchovávanie sú však vhodné lyofilizované formulácie pre rekonštitúciu, napríklad s obsahom BPD.

Cielené systémy

Použitie týchto fotosenzibilizátorov na deštrukciu schopnosti darcovského tkaniva vyvolať reakciu štepu voči hostiteľovi je podporené konjugáciou fotosenzibilizátora s cieľovo špecifickým prostriedkom. Fotosenzibilizátor môže byť konjugovaný hlavne (1) s jednotkou, ktorá sa špecificky zameriava na bunky obsahujúce antigén (APC) priamo v darcovskom tkanive, (2) s jednotkou, ktorá sa špecificky zameriava na sprostredkujúci materiál, ktorý označuje APC pre zameranie konjugátom, alebo (3) s T-bunkami pre situáciu štep verzus hostiteľ. V každom prípade je darcovské tkanivo, akonáhle bolo modifikované interakciou s konjugátom, exponované o sebe známym spôsobom tak, aby v ňom došlo k podstatnému odstráneniu skupiny APC.

Vynález poskytuje špecifické konjugáty, obsahujúce fotosenzibilizátor, použiteľné na cielené napadanie APC v aloimplantátovom darcovskom tkanive, a spôsob ničenia APC v darcovskom tkanive všeobecne fotodynamickou terapiou (photodynamic therapy, „PDT“). Jedna z formulácií, použiteľných pri tomto spôsobe, je tvorená v podstate fotosenzibilizátorom a systémom pre naviazanie „navádzacieho prostriedku“ na fotosenzibilizátor. Ďalšia formulácia zahŕňa kombináciu systému cieleného na APC a fotosenzibilizátora konjugovaného s navádzacím

ti-myšiu protilátku, zameriavať na bunky značené myšou protilátkou presne rovnakým spôsobom, ako sa konjugát zahrnujúci anti-krysiu protilátku Ia na ne zameriava priamo.

Metódy konjugácie

Cielený systém môže byť konjugovaný priamo s fotosenzibilizátorom s použitím bežných metód a technológií linkerov, ako sú v odbore všeobecne známe a opísané napríklad vo vyššie uvedených patentoch Levyho a spol. Pre proteíny, ako je Ig a ďalšie polypeptidy, je možné uskutočniť priamu kovalentnú väzbu medzi fotosenzibilizátorom a cieľovo špecifickou zložkou napríklad s použitím dehydratačného činidla, ako je karbodiimid. Aktívne jednotky konjugátu môžu byť samozrejme tiež spojené pomocou linkerových zlúčenín, ktoré sú bifunkčné a sú schopné sa kovalentne viazať s každou z oboch aktívnych zložiek.

Do rozsahu vynálezu spadá akákoľvek účinná metóda, o ktorej je známe, že je schopná spájať dve chemické jednotky. Linkerovú jednotku je nutné chápať široko ako kovalentnú väzbu alebo akúkoľvek linkerovú jednotku, dostupnú v odbore alebo odvoditeľnú štandardnými metódami.

Alternatívne je možné zameriavanie na cieľ sprostredkovať dodatočnými špecifickými prostriedkami. Napríklad, ako je opísané ďalej, môže byť priamo na fotosenzibilizátor naviazaná sekundárna protilátka, zameraná na APC-špecifickú protilátku, a ako mostík medzi imunokonjugátom a cieľovou bunkou môže byť použitý prostriedok zameriavania na glykoproteín MHC.

Postup liečby

Eliminácia alebo funkčné oslabenie APC alebo modulácie iných kožných buniek, ako sú keratinocyty, sa podľa vynálezu uskutočňuje relatívne priamočiarym spôsobom uvádzaním darcovského tkaniva do styku priamo s fotosenzibilizátorom, ktorý môže byť vo forme konjugátu, v podmienkach, ktoré umožňujú vytvorenie silnej asociácie medzi fotosenzibilizátorom (alebo cieľovo špecifickou zložkou konjugátu obsahujúceho fotosenzibilizátor) a cieľovými APC pri súčasnej minimalizácii koncentrácie fotosenzibilizátora v darcovskom tkanive.

Je výhodné, ak toto uvedenie do styku zahrnuje nanosenie kompozície na jeden alebo viac povrchov štepu alebo inkubáciu alebo perfúziu orgánového štepu formuláciou fotosenzibilizátora podľa vynálezu. Toto ošetrenie sa všeobecne vykonáva počas doby aspoň 1 min, prednostne asi 1 min až asi 72 h, hlavne asi 2 min až asi 24 h. Doba styku závisí od takých faktorov, ako je koncentrácia fotosenzibilizátora vo formulácii, ošetrovaný štep a konkrétny typ formulácie. Perfúzia sa vykonáva akýmkoľvek vhodným postupom. Napríklad orgán je možné perfundovať pomocou zariadenia, ktoré zaisťuje konštantný tlak alebo perfúziu s tlakovým regulátorom a prietokom medzi pumpou a orgánom. Alternatívne je možné orgán umiestniť do tesne uzavretej hyperbarickej komory a dodávať perfuzát do komory pumpou, ktorá odoberá tekutinu z rezervoára, poprípade s vracaním spotrebovaného perfuzátu do rezervoára pomocou ventilu.

U kožných štepov je možné formuláciu natierať alebo nastrekovať na spodný povrch transplantovanej kože tak, že medzi spodným povrchom darcovského tkaniva a tkanivom príjemcu vznikne vrstva fotosenzibilizátora. Prednostne sa však celý kožný štep ponorí do kompozície fotosenzibilizátora.

Stupeň uvádzania do styku sa môže uskutočňovať pri rôznych teplotách s vylúčením len tých teplôt, ktoré sú dosť vysoké, aby spôsobili denaturáciu alebo iné poškodenie štepu, a teplôt, ktoré sú dosť nízke, aby minimalizovali príjem fotosenzibilizátora bunkami. Prednostne sa stupeň uvádzania do styku vykonáva pri teplote v rozmedzí asi 50 až asi 400 °C, výhodne asi 150 až asi 370 °C a hlavne pri teplote okolia.

Po riadnej distribúcii fotosenzibilizátora, zaisťujúcej, že je správne asociovaný s cieľovými APC, sa takto ošetrené darcovské tkanivo podrobí expozícii svetlu s vlnovou dĺžkou, ktorá je absorbovaná fotosenzibilizátorom a vedie k aktivácii jeho cytotoxických vlastností. Taká expozícia je samozrejme v odbore fotodynamickej terapie úplne bežná. Príklady postupov a zariadení na tento účel sú uvedené napríklad vo vyššie uvedených patentoch Doughertyho a spol.

Potom, čo bol štep uvedený do styku s fotosenzibilizátorom a exponovaný svetlu, môže byť uchovávaný až asi 24 až 48 h. Prednostne sa však použije bezprostredne v procese transplantácie. Životnosť je možné zvýšiť vyššie opísaným spôsobom použitím náhradky krvi vo formulácii (napríklad emulzia perfluórovanej zlúčeniny) alebo perfúziou štepu formuláciou fotosenzibilizátora, obsahujúcou chladené izotonické činidlo a antikoagulant, a potom glycerolom, čo umožňuje zmrazenie štepov s malým poškodením buniek, ako je opísané v dokumente JP

60061501, zverejnenom 9.4.1985. Štep môže byť okrem toho uchovávaný s rôznymi kvapalinami, ktoré zahrnujú formuláciu, zatiaľ čo sú orgány chladené na teplotu mrznutia, za účelom poltrvalej ochrany orgánu bez nekrocytózy buniek.

Pred transplantáciou sa štep prednostne premyje na odstránenie kompozície fotosenzibilizátora, napríklad prepláchnutím vo fyziologickom salinickom roztoku alebo inými prostriedkami vhodnými na tento účel. Na podporu prežitia štepu môže byť tiež pred transplantáciou príjemcovi uskutočnená jedna alebo viac krvných transfúzií, špecifických pre darcu, s mononukleárnymi krvnými bunkami periférnej krvi, ošetrovanými pomocou PDT. Alternatívny postup spočíva v tom, že sa príjemca pred transplantáčnou operáciou podrobí celkovému ožarovaniu lymfatických uzlín. Ako súčasť tohto vynálezu je možné uskutočňovať akúkoľvek pre-transplantačnú procedúru, ktorá bude mať priaznivý účinok pre konkrétneho príjemcu.

V niektorých prípadoch je žiadúce modifikovať povrch štepu tak, aby boli vytvorené kladne alebo záporne nabité skupiny, napríklad použitím vhodnej aminokyseliny alebo polyméru alebo naviazaním fyziologicky prijateľného zdroja nabitých funkčných skupín. Napríklad záporne nabitý povrch je pre krvné cievy vhodný na zníženie zrážania krvi. Za určitých okolností je tiež žiadúce urobiť povrch hydrofóbnym alebo hydrofilným, naviazaním napríklad fenylalanínu, serínu alebo lyzínu na povrch. Imunosupresívnym prostriedkom, zvlášť účinným pre tieto modifikácie povrchu, je glutaraldehyd.

Samotný postup transplantácie závisí od konkrétnej odstraňovanej poruchy, stavu pacienta atď. Vhodný postup pre každý daný prípad určí lekárskeho praktika. Transplantáty sa poprípade počas kritickej pooperačnej doby (prvých troch mesiacov) systematicky monitorujú akoukoľvek vhodnou metódou, napríklad rádionuklidovou intravenóznou angiografiou. Po transplantácii sa ako dôležitá na zaistenie prežitia štepu často používa imunosupresívna terapia s použitím vhodného imunosupresíva.

Spôsob podľa vynálezu môže byť doplnený alebo použitý v kombinácii s rovnakými alebo zníženými dávkami imunosupresíva, súčasne podávaného systémovo darcovi, in vitro darcovskému tkanivu alebo príjemcovi, buď miestne alebo systémovo. Výraz „imunosupresívum“, ako je tu používaný, sa vzťahuje na látky, ktoré pôsobia tak, že potlačujú alebo maskujú imunitný systém hostiteľa, do ktorého je štep transplantovaný. Zahrnuje látky, ktoré potlačujú produkciu cytokínu, tlmia alebo potlačujú expresiu autoantigénov alebo maskujú antigény MHC.

Príklady takýchto látok zahŕňujú 2-amino-6-aryl-5-substituované pyrimidíny, azatioprín alebo cyklofosfamid, bromokryptín, glutaraldehyd, antiidiotypické protilátky pre antigény MHC, cyklosporín A, jeden alebo viac steroidov, prednostne kortikosteroidy a glukokortikosteroidy, ako je prednizón, metylprednizolón a dexametazón, protilátky proti interferónu gama, protilátky proti faktoru alfa nádorovej nekrózy, protilátky proti faktoru beta nádorovej nekrózy, protilátky proti interleukínu-2, protilátky proti cytokínovému receptoru, ako sú protilátky proti receptoru IL-2, heterológny anti-lymfocytový globulín, protilátky pan-T, prednostne monoklonálne protilátky OKT-3, protilátky k CD4, streptokinázu, streptodornázu alebo RNA alebo DNA z hostiteľa

Účinné množstvo, ktoré sa stanovuje na základe týchto úvah, je minimálne množstvo nutné na prevenciu imunitnej reakcie, ktorá by mala za následok odhojenie štepu príjemcom, ale rovnako tak nutné na dosiahnutie dlhšej doby prežitia štepu. Toto množstvo je prednostne nižšie než množstvo, ktoré je pre príjemcu toxické alebo významne zvyšuje náchylnosť príjemcu k infekciám. Množstvo imunosupresíva, nutné podľa vynálezu, je typicky nižšie než sa normálne požaduje pre transplantované štepy, ktoré neboli vopred ošetrené, a závisí od individuálnych podmienok transplantátu a typu použitého imunosupresíva.

Ako konkrétny príklad je možné uviesť celkové množstvo imunosupresíva cyklosporínu A, podávaného parenterálne, činiace na dávku asi 0,1 až 20 mg/kg telesnej hmotnosti pacienta, oproti typickému rozmedziu asi 5 až asi 15 mg/kg/deň cyklosporínu A, bežne používaného v konvenčnej imunosupresívnej terapii. U renálnych transplantátov sa podľa obvyklej praxe podávajú masívne množstvá glukokortikosteroidu v krátkych časových obdobiach, napríklad metylprednizolón v niekoľkokogramových dávkach denne podávaný počas doby 3 až 5 dní a potom 20 až 100 mg prednizónu, bez fotodynamického predbežného ošetrenia tkaniva štepu. Pri predbežnom ošetrení podľa vynálezu sú použiteľné významne nižšie dávky.

Ako je vyššie uvedené, tieto navrhované množstvá imunosupresíva sú z veľkej časti vecou rozhodnutia terapeuta. Kľúčovým faktorom pri voľbe príslušnej dávky a postupu dávkovania je dosiahnutý výsledok, t.j. dlhodobé prežitie štepu. Napríklad môžu byť potrebné relatívne vysoké dávky buď spočiatku na liečbu hyperakútneho odhojovania štepu, ktoré možno prisúdiť deštrukcii štepu, sprostredkovanej protilátkami, alebo v neskoršom štádiu, charakterizovanom náhlým poklesom funkcie štepu.

Ak sa používa imunosupresívum, môže byť podávané akýmkoľvek vhodným spôsobom, zahrnujúcim parenterálnu, a ak je to požadované pre miestnu imunosupresiu, intralezionálnu aplikáciu. Parenterálne infúzie zahrnujú intramuskulárnu, intravenóznou, intraarteriálnu, intraperitoneálnu alebo subkutánnu aplikáciu. Ak sa používa imunosupresívum, podáva sa navyše výhodne pulznou infúziou, hlavne s klesajúcimi dávkami, alebo kontinuálnou infúziou.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Obr. 1 znázorňuje štruktúru zlúčenín BPD, zvlášť použiteľných ako fotosenzibilizačné prostriedky podľa vynálezu.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Na ozrejmienie vynálezu, avšak nie na jeho obmedzenie, sú uvedené príklady uskutočnenia.

Príklad 1

Príprava konjugátu BPD-Ra-MIg

Fotosenzibilizátor BPD-MA, znázornený na obr. 1, sa v tme zriedi z koncentrácie 1 mg/ml na 200 pg/ml vo fosfátom pufrovanom salinickom roztoku a zmieša so známym množstvom krysieho anti-myšieho Ig (RaMIg), ktorý sa získava od Cedar Lane Laboratories alebo pripraví imunizáciou králikov myšim imunoglobulínom a čistením protilátok na imunoabsorpčných kolónach. Zmes sa inkubuje 1 h v tme pri teplote miestnosti a získaný konjugát sa dialyzuje cez noc pri 4 °C cez membránu priepustnú pre molekuly s molekulovou hmotnosťou menšou ako 12 až 14 kD proti trom litrom PBS. Modelové štúdie so značeným BPD-MA ukazujú, že zadržaný konjugát má pomer BPD:Ab 10 až 20. Retentát z dialýzy sa potom zmrazí a lyofilizuje a uchováva v tme.

Príklad 2

Ošetrovanie tkaniva aloimplantátu konjugátom

Darcovské tkanivo pankreatických ostrovčekov bola izolované z krýs týmto spôsobom:

Samce krýs SD (200 až 250 g) boli anestetizované intraperitoneálne uretánom (100 mg/kg) a pomocou laparotómie stredovou čiarou bola bilaterálnymi pneumotoraxami vyvolaná kardiorespiračná zástava. Proximálny spoločný žlčový kanál bol kanylovaný a distálne okludovaný v mieste vstupu do dvanástnika. Pankreas potom bol retrográdne rozšírený chladným (4 °C) roztokom kolagenázy (typ XI, Sigma Chemicals) s koncentráciou 0,42 mg (650 U)/ml. Po rozšírení kolagenázou in situ bola uskutočnená totálna pankreatektómia.

Žľazy boli vylúhované počas doby 22 min vo vodnom kúpeli 37 °C. Vylúhované žľazy boli dispergované trituráciou cez sterilnú silikónovanú pipetu. Surová tkanivová suspenzia bola podrobená prechodu filtrom s veľkosťou sita 200 µm na odstránenie nevytlúhovaných kanálikov, krvných ciev a lymfatických uzlín a potom odstredovaná s diskontinuálnym gradientom dextransu, tvoreným dvoma monovrstvami so špecifickou hmotnosťou 1,065, resp. 1,031. Z rozhrania monovrstvy bola odsatá ostrovčeková tkanivo s menšou hustotou, premyté a ďalej prečistené ručným vyzbieraním pod disekčným mikroskopom. Touto metódou bolo získaných 300 až 400 funkčne a morfológicky neporušených ostrovčekov na pankreas.

Ostrovčky boli kultivované in vitro počas doby 1 dňa v Hamovom médiu F-12, doplnenom 25 % tel'acieho séra, 15 mM pufru HEPES a 1 % streptfungizónu. Kultivované ostrovčky boli najprv inkubované počas doby niekoľkých hodín pri 0 °C s komerčne dostupnou myšou anti-krýsou monoklonálnou protilátkou Ia (označenou OX-6), dostupnou od SeraLab, v množstve 0,2 mg/ml. OX-6 je imunošpecifická proti produktu MHC triedy II.

Časti ostrovčekov, ošetrovaných OX-6, boli inkubované pri 20 °C počas doby 2 h v tme s (1) konjugátom Ra-MigG-BPD s pomerom 6,5 BPD : 1 Ab, (2) tým istým konjugátom s pomerom 20 BPD : 1 Ab, (3) konjugátom BPD s irelevantnou protilátkou GA-7sIgG s pomerom 6,5 BPD : 1 Ab, (4) BPD samotným a (5) médiom samotným. Inkubačné zmesi potom boli vystavené svetelnej energii 10 J/cm² s vlnovou dĺžkou 400 až 800 nm. Ožiarené kultúry potom boli testované histologicky a na úbytok APC.

Príklad 3

Charakterizácia darcovského tkaniva

V histologických štúdiách bolo asi 75 až 100 ostrovčekov, ktoré boli ošetrené konjugátom 6,5 BPD : 1 Ab, transplantovaných pod tukové puzdro obličky príjemcovských syngénnych krýs SD a alogénnych krýs WF. Ako u syngénnych, tak aj u alogénnych transplantátov poskytli všetci príjemcovia úspešné výsledky. Hlavne bola ako u syngénnych, tak aj u alogénnych transplantátov pozorovaná kompletná náhrada štepu lymfocytickým infiltrátom a nebolo pozorované identifikovateľné endokrinné tkanivo.

V štúdiách úbytku APC boli ostrovčky primárne imunofarbené protilátkou OX-6. Takto ošetrené bunky boli podrobené sekundárnemu farbeniu kozím anti-myším Ig, značeným FITC (Jackson Laboratories) a podrobené fluorescenčnej mikroskopii. V preparátoch, ktoré boli ošetrené konjugátmi, neboli pozorované identifikovateľné bunky MHC triedy II. V kontrolných preparátoch (konjugát s irelevantnou protilátkou, samotný BPD a médium) však bola prítomnosť týchto buniek fluorescenčnou mikroskopiou detegovaná, pretože sekundárna protilátka, značená FITC, označila APC a emitovala zelenú fluorescenciu.

Príklad 4

Prevenia odhojovania kožných aloimplantátov

Na stanovenie základnej hodnoty reprezentujúcej minimálne odmietnutie bolo na myšiach BALB/c v súlade so štandardnými metódami (Billingham a spol., „The Technique of Free Skin Grafting in Mammals“, J. Exp. Biol. 28:385-99 (1951)) uskutočnených deväť syngénnych štepov (darca a príjemca sú to isté zviera) týmto postupom: Transplantovaná koža trupu myši bola oholená a depilovaná. Myš potom bola anestetizovaná intraperitoneálnou injekciou zmesi 20 μ l ketamínhydrochloridu, 10 μ l xylazínu a 70 μ l PBS, načo bola opatrným vyrezaním získaná koža (1 cm x 1 cm) v plnej hrúbke s ponechaním vhodného lôžka štepu a tak, aby nedošlo k poškodeniu platyzmy.

Autológne kožné štepy potom boli aplikované späť na miesto transplantácie a udržiavané na mieste aplikáciou niekoľkých, asi štyroch kvapiek tkanivového adhezíva Vetbond na rozhra-

nie medzi štepom a lôžkom štepu. Štep bol stlačený pomocou gázy napustenej vazelinou a spolu s gázou udržovaný na mieste pomocou lepiacej pásky Vetrap, ktorá ovínutím okolo tela vytvorila obväz.

Miera úspešnosti pre dlhodobé syngénne štepy, t.j. vyše 120 dní, bola vyššia ako 90 %. Odmietnutie štepu bolo považované za úplné, keď došlo k aspoň 80% nekróze štepu. Prežitie štepu bolo vyjadrené ako priemer pomocou doby prežitia v dňoch \pm štandardná odchýlka.

Ako kontroly boli pomocou rovnakých postupov ako sú vyššie uvedené, uskutočnené tiež alogénne kožné transplantáty medzi myšami C57BL/6 (darcovia, H-2^h) a BALB/c (prijemcovia, H-2^d), avšak s tou výnimkou, že každý kožný štep bol odobratý z darcovskej myši a nanesený do lôžka štepu inej príjemcovskej myši. Stručne povedané bola koža trupu darcovských myši oholená a depilovaná, načo boli získané úplné kožné štepy (1 cm x 1 cm). Prijemcovské myši boli oholené a potom anestetizované intraperitoneálnou injekciou zmesi 20 μ l ketamínhydrochloridu, 10 μ l xylazínu a 70 μ l PBS. Lôžko štepu každého príjemcu bolo pripravené opatrným vyrezaním kože trupu (1 cm x 1 cm) tak, aby nedošlo k poškodeniu platyzmy. Štepy boli aplikované na miesto alogénneho štepu a udržované na mieste použitím tkanivového adhezíva Vetbond, gázy napustenej vazelinou a obväzu z pásky Vetrap. Stredná doba prežitia bola 11,1 dňa (štandardná odchýlka 1,9).

Spôsobom podľa vynálezu bola vzorka kože, transplantovaná príjemcovi, najprv in vitro uvedená počas doby 1 h do styku s roztokom 0,1 μ g/ml fotosenzibilizátora BPD. Koža potom bola suspendovaná počas doby 30 min v roztoku elektrolytu, obsahujúcom fetálne bovinné sérum („FBS“), a vystavená červenému svetlu diód emitujúcich svetlo („LED“) (10 J/cm² pri 690 \pm 10 nm). Po tomto ošetrení svetlom bola exponovaná koža transplantovaná vyššie opísaným spôsobom príjemcovskej myši. Počas doby 8 dní po transplantácii bolo zvieru monitorované na odmietavú reakciu. Stredná doba prežitia aloimplantátov sa zvýšila na 18,5 dňa (štandardná odchýlka 2,1).

Výsledky sú pre porovnanie uvedené v tabuľke 1.

Tabuľka 1

| typ štepu | počet testovaných zvierat | stredná doba prežitia (štandardná odchýlka) |
|--|---------------------------|--|
| syngénny | 9 | neobmedzená |
| alogénny | 16 | 11,1 dní (1,9) |
| alogénny s predbežným ošetrením kože darcu | 6 | 18,5 dní (2,1) |

Z výsledkov vyplýva, že imunomodulačný účinok fotodynamického ošetrenia na transplantované tkanivo môže viesť k významne predĺženej dobe prežitia implantátu.

Experiment bol zopakovaný pre porovnanie aloimplantátov uskutočnených podľa vynálezu s obmenami koncentrácie (od 0,25 do 1,0 $\mu\text{g/ml}$) fotosenzibilizátora BPD so štandardnými kontrolnými aloimplantátmi. Výsledky týchto testov sú zhrnuté v tabuľke 2.

Tabuľka 2

| typ štepu (počet testovaných zvierat) | dávka fotosenzibilizátora a svetla | stredná doba prežitia (štandardná odchýlka) |
|--|--|--|
| kontrolný aloimplantát (10) | 0 | 7,5 dní (0,84) |
| alogénny s predbežným ošetrením kože darcu (5) | 1,0 $\mu\text{g/ml}$ BPD, 10 J/cm^2 LED | 11,0 dní (0,0) |
| alogénny s predbežným ošetrením kože darcu (5) | 0,5 $\mu\text{g/ml}$ BPD, 10 J/cm^2 LED | 14,3 dní (1,5) |

Pretože sa zdá, že dvojnásobné zvýšenie množstva fotosenzibilizátora samo o sebe významne nepredĺžilo dobu prežitia implantátu, bolo postulované, že imunomodulačné účinky fotodynamického ošetrenia transplantovaného tkaniva môžu závisieť od selektívnych účinkov na bunkovú populáciu v koži a nemusia byť nutne dôsledkom cytotoxického účinku fotodynamickéj terapie.

Príklad 5

Histologické vyšetrenie kože určenej na transplantáciu

Na vyšetrenie účinku ošetrenia kožných štepov fotodynamickou terapiou za podmienok, ktoré vedú k predĺženiu doby prežitia, boli vyššie opísaným spôsobom získané a ošetrené vzorky kože s výnimkou iného rozmedzia koncentrácie fotosenzibilizátora, tj. 0,25 alebo 0,50 $\mu\text{g/ml}$ BPD. Niektoré tkanivá boli inkubované v roztoku elektrolytu samotného bez prítomnosti fotosenzibilizátora ako kontrolné vzorky. Všetky tkanivové vzorky boli inkubované počas doby 24 h, načo bol reprezentatívny počet vystavený svetlu. V prípade svetelnej expozície bolo použité červené svetlo s hodnotou energie 10 J/cm^2 .

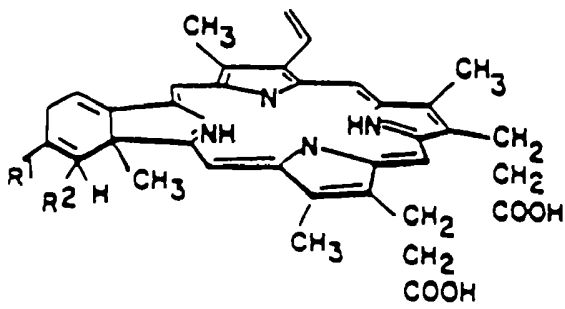
Všetky vzorky potom boli umiestené do formalínu a podrobené histologickému vyšetreniu. Tkanivá inkubované v samotnom elektrolytovom roztoku (kontrolné vzorky) alebo v roztoku 0,50 $\mu\text{g/ml}$ BPD bez expozície svetlom sa javili normálne. Vzorky ošetrené buď 0,25 alebo 0,50 $\mu\text{g/ml}$ BPD s následným ošetrením červeným svetlom vykazovali tieto zmeny: rozšírenie jadra, perinukleárnu vakuoláciu, pokles eozinofílie epiteliálnych buniek, zvýšenie objemu cytoplazmy a zväčšenie medzibunkových priestorov medzi keratinocytmi na povrchu epitelu. Na základe týchto histologických nálezov bolo postulované, že fotodynamické ošetrenie podľa vynálezu viedlo skôr než k usmrteniu buniek k určitému stupňu ich poškodenia. Mechanizmus tohto neočakávaného necytotoxického pôsobenia nie je známy.

Odborníkovi je zrejmé, že opísaný vynález je možné obmieňať a modifikovať bez prekročenia jeho rozsahu vyjadreného patentovými nárokmi.

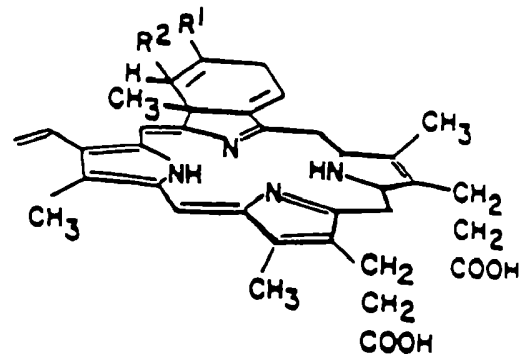
PATENTOVÉ NÁROKY

1. Použitie fotosenzibilizačného prostriedku na prípravu liečiva na obmedzovanie odhojovania aloimplantátov zahrnujúcich darcovské tkanivo, obsahujúce bunky vykazujúce antigény (APC), pričom uvedené obmedzovanie odhojovania aloimplantátov spočíva v tom, že
 - a) darcovské tkanivo sa uvedie do styku s fotosenzibilizačným prostriedkom na získanie modifikovaného darcovského tkaniva.
 - b) modifikované darcovské tkanivo sa vystaví svetlu s vlnovou dĺžkou absorbovanou uvedeným fotosenzibilizačným prostriedkom počas doby dostatočnej na zbavenie darcovského tkaniva buniek APC a
 - c) darcovské tkanivo zbavené buniek APC sa transplantuje do tkaniva prijemcu.
2. Použitie podľa nároku 1, **vyznačujúce sa tým**, že darcovským tkanivom je kožné tkanivo alebo pankreatické ostrovčeky.
3. Použitie podľa nároku 1, **vyznačujúce sa tým**, že fotosenzibilizačným prostriedkom je BPD.
4. Použitie podľa nároku 1, **vyznačujúce sa tým**, že aspoň niektoré vlnové dĺžky uvedeného svetla sú vo viditeľnej časti elektromagnetického spektra.
5. Použitie podľa nároku 1, **vyznačujúce sa tým**, že fotosenzibilizačný prostriedok je vo forme roztoku s rozmedzím koncentrácie 0,25 až 1,0 $\mu\text{g/ml}$.
6. Použitie podľa nároku 1, **vyznačujúce sa tým**, že počas stupňa b) je modifikované darcovské tkanivo suspendované v roztoku elektrolytu.

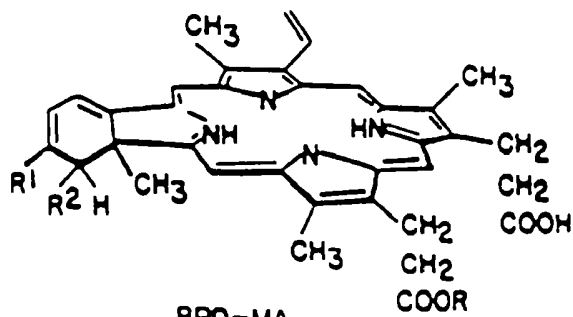
7. Použitie podľa nároku 1, **vyznačujúce sa tým**, že dávka svetla počas stupňa b) je asi 10 J/cm².
8. Použitie podľa nároku 1, **vyznačujúce sa tým**, že fotosenzibilizačný prostriedok je vo forme konjugátu zahrnujúceho cieľovo špecifickú zložku.
-
-
9. Použitie podľa nároku 8, **vyznačujúce sa tým**, že cieľovo špecifický prostriedok zahrnuje činidlo, ktoré sa špecificky viaže na APC.
10. Použitie podľa nároku 8, **vyznačujúce sa tým**, že cieľovo špecifickým činidlom je protilátka, jej fragment alebo receptorový ligand pre receptor na povrchu buniek APC.
11. Použitie podľa nároku 8, **vyznačujúce sa tým**, že cieľovo špecifický prostriedok zahrnuje činidlo, ktoré sa viaže na značku, ktorá sa potom špecificky viaže na bunky APC.
12. Darcovské tkanivo so zníženou náchylnosťou k odhojovaniu aloimplantátov, pripravené s použitím liečiva podľa nároku 1.
-
-
13. Kompozícia, **vyznačujúca sa tým**, že zahrnuje darcovské tkanivo obsahujúce bunky vykazujúce antigén (APC) v zmesi s fotosenzibilizačným prostriedkom.



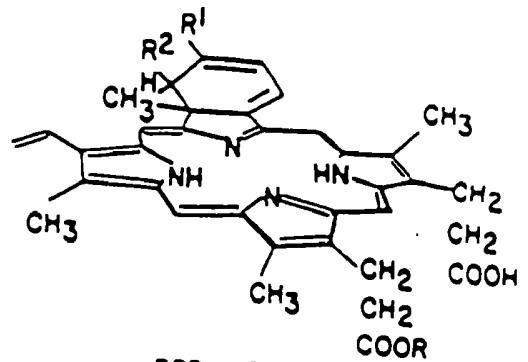
BPD-DA
Obr. 1-1



BPD-DB
Obr. 1-2



BPD-MA
Obr. 1-3



BPD-MB
Obr. 1-4