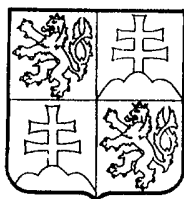


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(22) 09.04.91

(32) 09.04.90

(31) 90/07971

(33) GB

(40) 17.12.91

(21) 00988-91.Z

(13) A3

5(51) A 61 K 37/02,
35/58

(71) Imutran Limited, London, GB

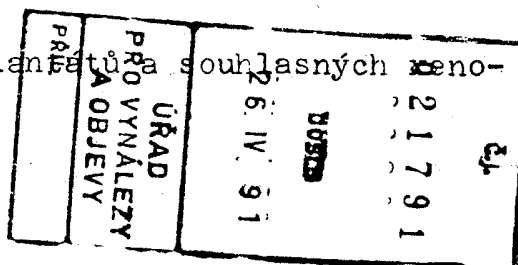
(72) White David James Graham, Harston, GB
Van den Bogaerde Johan Beyers, Harrow-on-the-Hill, GB

(54) Inhibice odhojování alotransplantátů a
souhlasných xenotransplantátů

(57) Cyklosporin A nebo jiná sloučenina, mající
aktivitu podobnou cyklosporinu A a faktor jedu
kobry nebo jiný inhibitor komplementu, mohou
být společně použity k podpoře přežití alotrans-
plantátů nebo souhlasných xenotransplantátů a
zabránění odhojení takových transplantátů.

Inhibice odhojování alotransplantátů a souhlasných xeno-
transplantátů

Oblast techniky



Vynález se týká farmaceutických přípravků, vhodných pro ošetřování chronického odhojování alotransplantátů a odhojování souhlasných xenotransplantátů. Vynález se rovněž týká napomáhání přežití nebo prevence ztráty transplantátu u hostitele.

Dosavadní stav techniky

Alotransplantace je transplantace tkání mezi dvěma členy stejného druhu. Xenotransplantace, která je transplantací tkání mezi dvěma různými druhy, byla podle biologických kritérií rozdělena na dvě podskupiny (Calne, Transplant. Proc. II 550-556 (1970)). Tyto dvě podskupiny jsou shodné xenotransplantáty a neshodné xenotransplantáty. Rozdíl mezi těmito dvěma skupinami je v tom, že vaskularizovaný orgánový transplantát, transplantovaný mezi nesouhlasnými druhy je hyperakutně odmítnut, to jest v několika minutách nebo hodinách po revaskularizaci. Mezi souhlasnými druhy nemá hyperakutní rejekce xenotransplantátů místo. Transplantáty nicméně budou rejektovány a často zrychleným způsobem, ale v rozmezí několika dnů a ne hodin nebo minut.

Obecně se předpokládá, že ačkoliv formálně evidentní pro tuto situaci je ztráta, že mezi nesouhlasnými rody je hyperakutní rejekce výsledkem působení přírodních protilátek vůči druhům dárce. Souhlasné transplantáty přežívají na jedné straně o něco kratší dobu, jestliže takové protilátky schopné jejich destrukce nejsou přítomny. V literatuře je mnoho příkladů pro doložení takových rozdílů. Snad nej-
elegantnější jsou příklady od Hammera (v "Xenograft 25" (Mark A. Hardy, vyd. Elsevier, Amsterdam 1989)). Za použití

vždy psa jako příjemce Hammer uvádí, že doby přežití ledvinových transplantátů jsou následující:

pes - pes	11,4 dny
dingo - pes	11,5 dnů
vlk - pes	19,4 dny
liška - pes	6,5 dne
lev - pes	10-24 hodin
tigr - pes	10-24 hodin
kočka - pes	10 -24 hodin
vepř - pes	10-30 minut

Poslední čtyři interakce jsou na bázi nesouhlasných xenotransplantátů, zatímco první čtyři xenotransplantáty jsou souhlasné. Hammer hodnotil tyto rozdíly mezi neshodnými a shodnými transplantáty přítomností nebo nepřítomností křížových druhů hemaglutinačních protilátek.

Z akademického hlediska jsou obtíže s vytvořením definice vztahů souhlasných a nesouhlasných druhů. Z praktického hlediska pro účely předloženého vynálezu jsou dva rozdílné druhy hodnoceny jako souhlasné, jestliže není žádná hyperakutní rejekce xenotransplantátu z jednoho do druhého. Pro účely předloženého vynálezu jsou druhy hodnoceny souhlasně i když by normálně mohlo dojít k hyperakutní rejekci, nicméně mohou být podrobeny určitému postupu, např. genetické manipulaci, takže se zabrání hyperakutnímu odmítnutí. International Patent Application PCT/GB90/01575 např. uvádí ve specifickém provedení zvířecí dárce xenotransplantátů, kteří byli transgenně modifikováni k expresi spodních regulátorů recipientova komplementu (jako je rozklad urychlující faktor (DAF) nebo membránový kofaktorový protein (MCP)). Orgány od zvířecího dárce nejsou hyperakutně vypuzeny, když jsou transplantovány zvířeti, které by normálně bylo označeno jako nesouhlasný druh. Pro účely tohoto vynálezu takoví transgenní dárce mohou být hodno-

cení jako souhlasní vzhledem k zamýšleným cílovým druhům.

Příklady druhů, majících souhlasný vztah jak je definováno výše, zahrnují pypy zajíc-králík, křeček-krysa a nečlověčí primát-člověk, zahrnující například typy pavián-člověk, šimpanz-člověk a makak-člověk.

Podpoření přežití transplantátu bylo dosaženo v oblasti xenotransplantátů (nesouhlasných a souhlasných) a alograftů. První podněty byly provedeny pro podporu přežití nesouhlasných xenotransplantátů, Adachi a spol. (Transplant. Proc. XIX (1) 1149-1152 (1987)) studovali přežití nesouhlasných srdečních xenotransplantátů u krys. Z potenciálních promotorů přežití byly studovány cyklosporin A, aspirin a faktor jedu kobry. Dále byla studována kombinace cyklosporinu A a faktoru jedu kobry. Adachi a spol. uvádějí "v naší studii nebyl podstatný rozdíl v průměrné době přežití mezi skupinou ošetřenou cyklosporinem A a faktorem jedu kobry a skupinou ošetřenou samotným faktorem jedu kobry". Průměrná doba přežití byla mezi 40 a 50 hodinami. Kemp a spol. (Transplant. Proc. XIX (6) 4471-4474 (1987)) také studovali různé potenciální promotory přežití nesouhlasných xenotransplantátů u koček. Možné promotory přežití zahrnují captopril, enalapril, nifedipine, prostacyclin, chromoglykát sodný, kombinaci azathioprine/kortikosteroid, cyklosporin A a faktor jedu kobry. Hyperakutnímu vypuzení nebylo zabráněno jakýmkoliv z uvedených léčiv s výjimkou faktoru jedu kobry, který podle autorů "měl překvapující účinek s prodloužením přežití transplantátu až do 7 dnů".

Vypuzení souhlasných xenotransplantátů bylo studováno Hardym a spol. (Transplantation 33 (3) 237 - 242 (1982)), kteří zkoušeli vliv selektivního lymfoidního ozařování (SLI) palladium-109-hematoporfyrinem v kombinaci s antilymfoidním globulinem, terapii, která je primárně vedena vůči vypuzení působenému T-buňkami. Průměrná doba přežití byla v

tomto případě 12,5 dne ve srovnání s neošetřenou kontrolou, která přežívala průměrně 2,9 dne. Homan a spol. (Transplantation 31 (3) 164-166 (1981)) studovali vliv cyklosporinu A na zlepšení přežití souhlasných xenotransplantátů. Nejlepší přežití transplantátu bylo 21 dní ve srovnání se 2 dny pro neošetřenou kontrolu. Monden a spol. (Transplantation 43 (5) 745-746 (1987)) studovali jaterní xenotransplantáty křeček-krysa a zjistili, že cyklosporin A nemá významný vliv na zlepšení přežití transplantátu ve srovnání s neošetřenými kontrolami. Valdevere a spol. (Transplant. Proc. XIX (1) 1158-1159 (1987)) také studovali jaterní xenotransplantáty křeček-krysa a našli významné zlepšení v době přežití ve srovnání s kontrolami, když byl cyklosporin podán společně se splenektomií, přežití bylo zlepšeno z průměru 3,6 dnů na průměr 17,6 dnů. Knechtle a spol. (Transplant. Proc. XIX (1) 1137-1139 (1987)) podobně jako skupina Hardyho a spol. uvedená výše, studovali vliv celkového lymfoidního ozařování (TLI), ale současně s terapií cyklosporinem A, na zlepšení přežití souhlasných xenotransplantátů. Uvádějí, že u srdečních xenotransplantátů křeček-krysa, cyklosporin A ve vysokých dávkách výrazně prodlužuje přežívání, ale pouze nahodilý příjemce měl dlouhodobou funkci transplantátu. TLI v kombinaci s cyklosporinem A dále výrazně podporuje přežití transplantátu.

Běžnou terapií vůči vypuzení alotransplantátu je použití cyklosporinu A buď samotného nebo v kombinaci se steroidy nebo azathioprinem nebo oběma těmito látkami. Podle některých názorů, kombinace trojitě terapie nepředstavuje zlepšení terapie, používající samotný cyklosporin A. Tyto terapie jsou účinné při prevenci a zvratu akutního vypuzení transplantátu a pravděpodobně zpomalují nástup chronického vypuzení transplantátu, ale jeví se, že mají malý nebo žádný vliv na zvrát chronického vypuzování po nástupu.

Podstata vynálezu

Předložený vynález se snaží podporovat zlepšení přežití nebo zabránit vypuzení souhlasných xenotransplantátů a/ nebo alotransplantátů. Vynález je založen na skutečnosti, že přežití souhlasných xenotransplantátů a také přežití alotransplantátů, může být výrazně zvýšeno ošetřením kombinací cyklosporinu A a faktoru jedu kobry, nebo kombinací sloučenin, majících stejný model působení.

V souladu s prvním aspektem předloženého vynálezu je poskytnout farmaceutický přípravek, obsahující inhibitor komplementu a imunosupresant s účinností podobnou cyklosporinu A.

Farmaceutické přípravky podle vynálezu mají alespoň dvě složky. První složkou je inhibitor komplementu. Inhibitor komplementu může buď bránit aktivaci komplementu nebo jeho odstranění nebo vypuštění, nebo jedné nebo více jeho složek. Výhodně inhibitor komplementu bude inhibovat jak klasické tak alternativní způsoby aktivace komplementu. Je proto výhodné, že inhibitor komplementu působí blokováním cestou C3, buď inhibicí nebo odstraněním nebo vypuštěním. Je třeba si uvědomit, že protilátky (např. monoklonální protilátky) vůči C3 mohou být použity jako inhibitor komplementu v předloženém vynálezu. Další vhodné inhibitory komplementu zahrnují rozpustný rozklad aktivující faktor (DAF) a rozpustný membránový kofaktorový protein (MCP). Jedním z nejpreferovanějších inhibitorů komplementu je faktor jedu kobry.

Hadí jedy jsou většinou komplexy živočišných sekretů, obsahující obrovský počet složek s rozdílnými farmakologickými a biochemickými aktivitami. Řídnost složek v jedech, působících na komplement je známa více než sto let. Působení

ní jedu kobry (*Naja naja kaouthia*) na serový komplement bylo detailně studováno. Aktivním faktorem je glykoprotein s molekulovou hmotností 144 kDa, který se spojuje s faktorem B sera za přítomnosti iontů hořčíku. Faktor B je pak štěpen na dvě komponenty proteolytickým působením faktoru D sera, označených Bb a Ba. Komplex CoF-Bb, kde CoF představuje faktor jedu kobry, je vysoce aktivní C3 a C5- štěpící enzym nebo kovertáza. Nicméně na rozdíl od normálních C3- a C5 konvertáz je CoF-Bb rezistentní k normálním systémům regulace komplementu. Jeho působení pokračuje, dokud nebyl všechen C3 převeden, což účinně vyčerpá individuální aktivitu komplementu. Štěpení C5 uvolňuje C5a, která působí anafyloidně; ne všechny faktory jedu kobry *Naja* vykazují C5 konvertázovou aktivitu, ale toto není pro účely vynálezu důležité. Inhibice komplementu není omezena na jedy rodu *Naja*. Eggertsen a spol. (Toxicon 18 87-96 (1980)) studovali jedy z hadů z rodů Elapidae, Viperidae a Crotalidae. Ze 26 jedů, které byly studovány, mělo 22 schopnost inhibovat normální lidský komplement. Analýza struktury faktoru jedu kobry potvrzuje, že je ekvivalentní kobra C3 nebo jeho částečně degradovanému produktu.

Faktor jedu kobry a faktory jiných hadích jedů se^{ne}/budou obecně podle předloženého vynálezu podávat ve své nativní formě, protože jsou zřejmě problémy s toxicitou. Jelikož chybí jiná opatření při potlačování problémů s toxicitou, je obecně potřebné čistit alespoň částečně aktivní faktor ze surového jedu. Není nutné u faktoru jedu kobry nebo jiného hadího jedu, aby byl čištěn do homogenity podle předloženého vynálezu, ale dochází k problémům v regulaci, jestliže je zamýšleno předepsání užití v podstatě čištěného faktoru. Faktor jedu kobry jako semi-čištěný přípravek, může být získán od dodavatelů chemikálií jako je Sigma (Sigma Chemicals Limited, Poole, Dorset), kteří také dodá-

vají surový jed kobry pro další čištění. Příklad přípravy faktoru jedu kobry ze surového jedu kobry je uveden v příkladech.

Je třeba zvážit, že dále při použití faktoru přírodního jedu kobry a faktorů jiných hadích jedů, mohou být použity v tomto vynálezu analogy takových faktorů (obsahující aktivní fragmenty), jako jsou syntetické faktory, zahrnující faktory připravené technologií rekombinantní DNA. Charakteristikou CoF, která jej činí vhodným pro použití v předloženém vynálezu je jeho schopnost tvořit stabilní komplex s faktorem Bb, který je rezistentní k běžnému mechanismu vypuzení. Jiné molekuly mající tuto vlastnost jsou také výhodné pro použití podle vynálezu.

Druhou složkou farmaceutického přípravku v souladu s předloženým vynálezem, je imunosupresant s aktivitou podobnou cyklosporinu A. Takové sloučeniny jsou odborníkům známé a zahrnují jiné cyklosporiny než cyklosporin A jako je cyklosporin C a cyklosporin G. Eikosanoidy také mají aktivitu podobnou cyklosporinu A a zahrnují PGI_2 (prostacyklin), PGE_2 , PGD_2 , rapamycin a FK 506 (Fujisawa). Sloučenina FK 506 je sloučenina, která je v předloženém vynálezu preferována, ale nejvýhodnější je samotný cyklosporin A. Cyklosporin A je dostupný od firmy Sandoz pod značkou SANDIMUN.

Zvláště výhodné provedení předloženého vynálezu se týká farmaceutického přípravku, který obsahuje faktor jedu kobry a cyklosporin A, dvě nejvýhodnější výše uvedené sloučeniny.

Předpokládá se, že v souladu s vynálezem mohou být ve farmaceutických přípravcích přítomny další složky. Budou obvykle přidávány přísady a přítomnost dalších aktiv-

ních složek není vyloučena. Může být přítomno více než jedna aktivní složka z každé kategorie.

Aktivní složky nutně nemusí být podány spolu v jednom přípravku. Podle druhého aspektu předloženého vynálezu je poskytnut produkt, obsahující inhibitor komplementu a imunosupresant s aktivitou podobnou cyklosporinu A pro použití jako kombinovaný přípravek pro současné, oddělené nebo postupné použití při podpoře přežití alotransplantátu nebo souhlasného xenotransplantátu nebo ochraně před vypuzením.

V souladu s třetím aspektem je podle vynálezu poskytnut kit, obsahující farmaceutický přípravek imunosupresantu s aktivitou podobnou cyklosporinu A.

Cyklosporin A a další imunosupresanty s aktivitou podobnou cyklosporinu A budou obvykle podávány v praktickém provedení vynálezu parenterálně. V takových případech musí být přípravek, obsahující imunosupresant sterilní. Nicméně samotný cyklosporin A a některé další imunosupresanty mohou být podány orálně, v takovém případě není sterilita podstatná. Cyklosporin A samotný je jen nepatrně rozpustný ve vodě a pro praktické účely je výhodné jej rozpustit v oleji, jako v oleji rostlinném. Přijatelný je v praxi olej olivový. Disoluce v oleji je nezbytná, když se jedná o imunosupresant, který není rozpustný ve vodě a obecně může být imunosupresant rozpuštěn v jakémkoliv fyziologicky přijatelném nosiči. V některých případech ani není disoluce nutná. Koncentrace, ve které se připraví imunosupresant, bude samozřejmě záviset na charakteru samotného imunosupresantu a zamýšlené dávce, která se obecně bude řídit návodem lékaře. Obecně bylo zjištěno, že je vhodné připravit přípravky o koncentraci cyklosporinu od 1 do 100 mg/ml, například od 1 do 10 mg/ml, typicky asi 5 mg/ml pro parenterální účely nebo 25 až 100 mg/ml, například od 50 do 100 mg/ml,

typicky asi 100 mg/ml pro orální podání.

Inhibitory komplementu jako je faktor jedu kobry se obecně podávají parenterálně a pro tento účel by měly být sterilní. Pamotný faktor jedu kobry může být formulován ve fosfátem fufrovaném salinickém roztoku (bez azidu) nebo v jakémkoliv vhodném rozpouštědle nebo nosiči. Koncentrace inhibitoru komplementu ve farmaceutickém přípravku bude opět záviset na konečné zamýšlené dávce, která by měla být pod kontrolou lékaře. Přípravek faktoru jedu kobry v PDS může mít koncentraci v rozmezí od 0,05 mg/ml až do meze rozpustnosti, která závisí na jeho čistotě. V praxi lze užít kompozic o koncentraci až do 5 mg/ml, např. od 0,1 do 2 mg/ml, například asi 0,5 mg/ml.

Protože cyklosporin A je prakticky ve vodném mediu nerozpustný, zatímco faktor jedu kobry je, měly by obecně tyto dvě preferované aktivní složky být formulovány odděleně a podány odděleně. Tato skutečnost není zásadní, nicméně je možné formulovat vhodnou emulzi dvou aktivních složek a různé kombinace aktivních složek mohou být rozpuštěny v běžném rozpouštědle nebo alespoň suspendovány v běžném nosiči.

Pokud se jedná o parenterální injekce, je výhodným místem pro injekci sval, protože depotní účinek vzniká z intramuskulární injekce. Intravenózní injekce nicméně může být za některých okolností vhodná a subkutánní injekce může mít některé, i když ne všechny výhody injekce intramuskulární. Intraperitoneální injekce by mohla být použita podle okolností.

Podle čtvrtého aspektu předloženého vynálezu je poskytnuto použití inhibitoru komplementu a imunosupresantu s aktivitou podobnou cyklosporinu A. V přípravku činidla pro

podporu přežití alotransplantátu nebo souhlasného xenotransplantátu nebo zábranu před vypuzením. Proto má vynález užití ve způsobu podpory přežití alotransplantátu nebo souhlasného xenotransplantátu, nebo zábraně před vypuzením u hostitele, způsob zahrnuje podání inhibitoru komplementu a imunosupresantu s aktivitou podobnou cyklosporinu A příjemci transplantátu nebo zamýšlenému příjemci transplantátu.

Může být výhodné za různých okolností podat před uskutečněním transplantace některé nebo všechny aktivní složky podle vynálezu. Je také třeba poznamenat, že hlavní výhodou předloženého vynálezu je, že kombinace aktivních složek by měla být vhodná pro prevenci chronického vypuzení nebo vznik chronického vypuzení (tj. zábranu před vypuzením) po jeho nástupu; k tomu obvykle dochází mnoho let po transplantaci.

U příjemců alotransplantátu, trpících chronickým vypuzováním transplantátu, nebo rizikem chronického vypuzování transplantátu je možno dosáhnout imunosuprese cyklosporinem A nebo jiným imunosupresantem, majícím aktivitu podobnou cyklosporinu A. Pro účely tohoto vynálezu s cílem léčit nebo zabránit chronickému vypuzení transplantátu u takových pacientů je nutné pouze přidat terapii inhibitorem komplementu. V souladu s pátým aspektem vynálezu je poskytnuto použití inhibitoru komplementu při přípravě činidla pro podporu přežití alotransplantátu nebo souhlasného xenotransplantátu, nebo zabránění vypuzení transplantátu příjemcem, který je ošetřen imunosupresantem s aktivitou podobnou cyklosporinu A. Vynález je tak možno použít při způsobu podpory přežití alotransplantátu nebo souhlasného xenotransplantátu a/nebo zabránění vypuzení transplantátu u hostitele. Způsob zahrnuje podání příjemci transplantátu nebo zamýšlenému příjemci transplantátu, který je ošetřen

imunosupresantem s aktivitou podobnou cyklosporinu A, inhibitoru komplementu.

Imunosupresant s aktivitou podobnou cyklosporinu A může být podán v jakékoliv vhodné účinné, ale netoxické hladině, s přihlédnutím k ošetřovaným druhům a orgánu, který bude transplantován. Horní hranice tolerance cyklosporinu A u člověka je dána jeho nefrotoxicitou a stářím příjemce. 20 mg/kg na den může být bezpečná horní hranice pro ošetření lidí v mnoha případech, ačkoliv jiné druhy mohou mít vyšší tolerance. Cyklosporin A je účinný v nižších dávkách a tak nejmenší množství, které může být podáno bude jednoduše nejmenší množství, které dává účinnou odezvu. Množství 1 nebo 2 mg/kg na den byly v některých případech shledány účinnými. Obecně může být podáváno mezi 5 a 10 mg/kg na den. Jestliže je podání parenterální, může být cyklosporin A podáván ob den, v takovém případě, v takovém případě by dávka byla dvojitá. Pro výhodnou orální cestu denní dávka nicméně bude řízena podle příjemce, výhodněji může být cyklosporin A podáván dvakrát nebo častěji za den pro získání celkové denní dávky 5 až 10 mg/kg. Jiné imunosupresanty s aktivitou podobnou cyklosporinu A budou podávány v účinných, ale netoxických dávkách, jak stanoví lékař.

Inhibitor komplementu, jako je faktor jedu kobry bude podáván v takovém množství, které účinně inhibuje aktivitu komplementu, jak se stanoví hemolysou₅₀ (CH₅₀) komplementu. Bezpečná horní hranice po podání faktoru jedu kobry nebyla stanovena, ale dávka 2 mg/kg se nejeví být toxická. Minimální dávka faktoru jedu kobry je závislá na druhu a může být snadno stanovena CH₅₀ zkouškou. Denní dávky mezi 0,01 a 0,1 nebo 0,2 mg/kg byly zjištěny jako účinné pro faktor jedu kobry. Účinné a netoxické dávky jiných inhibitorů komplementu mohou být také snadno stanoveny odborníky, na-

příklad použitím CH_{50} zkoušky.

Faktor jedu kobry působí asi 6 hodin po počátku aktivity po intramuskulárním podání. Účinnost je pozorována počáteční aktivita, může trvat více než jeden den, například 2 dny a tak nemusí být nezbytné denní podávání faktoru jedu kobry. Je výhodné podávat faktor jedu kobry ob den, v takovém případě výhodné denní dávky uvedené výše budou v den podání zdvojeny. V praxi bylo zjištěno, že zvláště výhodný režim zahrnuje podání 0,4 mg/kg intramuskulárně ob den.

Cyklosporin A nebo jiné imunosupresanty mohou být podávány kontinuálně. Faktor jedu kobry nebo jiný inhibitor komplementu obecně nebude podáván kontinuálně, ale může být prolongován; i když to není pro praktické provedení podstatné, krátkodobou terapií mohou být všechny, kde je nutné ošetření před nebo zabránění vypuzení, souhlasných xenotransplantátů.

Výhodné rysy druhého až pátého aspektu vynálezu jsou jako u prvního aspektu, mutatis mutandis.

Vynález bude nyní ilustrován následujícími příklady a přípravami. Příklady souvisejí s připojenými obrázky, které představují:

Obr.1 - je graf přežití xenotransplantátů křeččího srdce u krysy, procenta přežití jsou vynesena proti dnům po transplantaci a

obr.2 - je graf přežití xenotransplantátu křeččího srdce u krys ošetřených cyklofosfamidem; graf jinak odpovídá obr.1.

Příklady provedení vynálezu

Příprava

Tato příprava uvádí protokol pro přípravu faktoru jedu kobry ze surového jedu kobry.

1 g jedu *Naja naja kaouthia* (Sigma, produkt č. V-9125, Lots č. 116F-0398 a 58F-0565) byl rozpuštěn v 60 ml odplyněného fosfátového pufru (0,01M) při pH 7,5 a načerpán na 90 cm x 26 mm (vnitřní průměr) kolonu DEAE celulozy (DE52, Whatman) a ekvilibrované stejným pufrem. Kolona pak byla eluována 43,0 ml za hodinu s výchozím pufrem dokud A_{280} absorbance eluentu se nevrátí na 0. Lineární 3 litry: 3 litrům gradient výchozího pufru a limitního pufru (0,01M fosfát sodný, pH 7,5, obsahující 0,5M chloridu sodného) pak byl čerpán rychlostí 40,0 ml za hodinu a byly odebírány frakce 7,0 ml. Frakce byly testovány na anti-komplementaritu a pozitivní frakce byly spojeny a zahuštěny na CX-10 ultrafiltrech.

Celý pool faktoru jedu kobry byl čerpán na 90 cm x 26 mm (vnitřní průměr) kolonu Sephadexu G200 (jemný) (Pharmacia GB Limited, londýn), ekvilibrovaný PBS (bez azidu) a eluován PBS rychlostí 36 ml za hodinu. 6 ml frakce byly shromážděny a zkoušeny na antikomplementární aktivitu. Frakce faktoru jedu kobry (tj. aktivní frakce) byly spojeny, zvláště na sestupné větvi píku, zahuštěny na CX-10 ultrafiltrech, rozděleny do částí a tyto byly zmrazeny na -20°C a připraveny pro použití.

Antikomplementární aktivita faktoru jedu kobry uvedená výše může být měřena následujícím způsobem. 20 μl frakce se inkubují se 20 μl čerstvého lidského sera 20 minut při 37°C . Do jamek testovací destičky se přidají 5 μl podíly. Destička je vyrobena z:

5,0 ml 2% vodné agarozy,
4,5 ml dvakrát zesíleného PBS obsahujícího 20 mM EDTA,
0,5 ml 10% promytých erythrocytů morčete a
0,5 ml čerstvého normálního lidského sera.

Destička pak byla inkubována přes noc při +4 °C. Pozitivní se projevují jasnými zónami lýzí po inkubaci.

Příklad 1 (Srovnávací příklad)

V tomto příkladu jsou krysy kryсами DA od Banting a Kingdom a křečci jsou syřští křečci také od Banting a Kingdom. Metodou podle Herona (Acta Pathol. Microbiol. Scand. 79 366-372(1971)) byla srdce křečků transplantována do krků krys. Aorta byla připojena ke karotidě za použití techniky popsané Heronem. Podobně pulmonární arterie byla připojena k jugulární véně. Všechny další srdeční cévy byly podvázány. Srdce začala bít několik minut po odstranění svorek. Kůže byla nad implantovaným srdcem uzavřena a srdce bylo denně sledováno externální palpací.

Hodnoty přežití srdečních transplantátů jsou uvedeny na obr. 1 a jsou představovány křivkou 1. Je zřetelné, že průměrná doba přežití transplantátů byla 3 dny.

Příklad 2 (Srovnávací příklad)

Opakuje se postup z příkladu 1 s tím rozdílem, že byl podán cyklosporin A v dávce 20 mg/kg obden. Cyklosporin A byl podán jako přípravek 20 mg/ml v olivovém oleji a byl injikován intramuskulárně, první dávka byla podána v době transplantace. Injekce pak byly podávány obden. Hodnoty přežití transplantátu jsou opět uvedeny na obr. 2: křivka 2 představuje výsledky z tohoto příkladu. Střední hodnota přežití je 3 dny.

Příklad 3 (Srovnávací příklad)

Opakuje se postup z příkladu 1 s tím rozdílem, že byl obden podáván faktor jedu kobry v dávce 0,4 mg/kg. Faktor jedu kobry byl podáván jako Roztok o koncentraci 0,5 mg/ml v PBS prostém azidu. První injekce byla podána intramuskulárně v době transplantace a následující intramuskulární injekce byly podávány potom obden. Hodnoty vypuzení transplantátu jsou opět uvedeny na obr. 1. Výsledky jsou znázorněny křivkou 3, která udává, že střední hodnota přežití pro transplantáty je 6 dnů.

Příklad 4

Opakuje se postup z příkladu 1 s tím rozdílem, že příjemci byl podán jak cyklosporin A tak faktor jedu kobry. Cyklosporin A byl podán v dávce 20 mg/kg obden, takže podmínky podávání cyklosporinu jsou stejné jako v příkladu 2. Faktor jedu kobry byl podáván za stejných podmínek jak je popsáno v příkladu 3. Jak cyklosporin A tak faktor jedu kobry byly poprvé podány v době transplantace. Hodnoty přežití jsou opět uvedeny na obrázku. V tomto příkladu nebyla pozorováno žádné vypuzení transplantátu, jak je zřejmé ze křivky 4 na obr. 1. Přežití transplantátu je v průměru vyšší než 50 dnů.

Příklad 5

Opakuje se postup z příkladu 4 s tím rozdílem, že podávání faktoru jedu kobry bylo přerušeno po 28 dnech po transplantaci. Průměrné přežití transplantátu bylo větší než 100 dnů. Dvě zvířata byla usmrcena 103. a 105. den a histologické vyšetření transplantátu prokázalo normální srdeční stavbu. Bylé krysy přežívaly s tlukoucím křeččím srdcem více než 5 měsíců.

Příklad 6 (Srovnávací příklad)

20 krys obdrželo křeččí srdce postupem podle příkladu 1. Byly ošetřeny cyklosporinem A jak je popsáno v příkladu 2 a dále obdržely ENDOXAN cyklofosfamid i.p. (20 mg/kg) jeden den před transplantací (den-1) a den 2 po transplantaci. (Výraz ENDOXAN je ochranná známka pro cyklofosfamid, který je inhibítorem produkce protilátek.) Srdce křečků byla vypuzena jak je zřejmé ze křivky 5 na obr. 2. Pozorované odložené vypuzení, ve kterém je zpoždění výsledkem krátké cyklofosfamidové terapie, simuluje zpoždění vypuzení transplantátu odpovídající neadekvátním imunosupresivním protokolům.

Příklad 7

Pět krys bylo ošetřeno jako v příkladu 6, ale navíc byly ošetřeny jako v příkladu 4 faktorem jedu kobry. Ošetření bylo prováděno od 7.dne, trvalo 14 dnů. Všechna zvířata byla ochráněna před vypuzením jak je zřejmé ze křivky 6 obr.2.

P1988-912

ČJ	0 2 1 7 9 1	26. IV. 91	UŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY	ŘIL
----	-------------	------------	----------------------------------	-----

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Farmaceutický přípravek, v y z n a č u j í c í s e
t í m , že obsahuje inhibitor komplementu a imunosupre-
sant s aktivitou podobnou cyklosporinu A.
2. Farmaceutický přípravek podle nároku 1, v y z n a -
č u j í c í s e t í m , že inhibitor komplementu inhi-
buje jak klasické tak alternativní způsoby aktivace kom-
plementu.
3. Farmaceutický přípravek podle nároku 1 nebo 2,
v y z n a č u j í c í s e t í m , že inhibitor komple-
mentu obsahuje MCP, DAF nebo protilátku proti C3.
4. Farmaceutický přípravek podle nároku 1, v y z n a č u -
j í c í s e t í m , že inhibitor komplementu obsahuje
molekuly, které tvoří stabilní komplex s faktorem Bb, při-
čemž je komplex rezistentní k normálnímu mechanismu poruchy.
5. Farmaceutický přípravek podle nároku 1 nebo 2, v y -
z n a č u j í c í s e t í m , že inhibitor komplementu
obsahuje faktor jedu kobry.
6. Farmaceutický přípravek podle kteréhokoliv z náro-
ků 1 až 5, v y z n a č u j í c í s e t í m , že imuno-
supresantem s aktivitou podobnou cyklosporinu A je cyklo-
sporin nebo eikosanoid.
7. Farmaceutický přípravek podle nároku 6, v y z n a č u -
j í c í s e t í m , že imunosupresantem je cyklospo-
rin A.

8. Farmaceutický přípravek podle nároku 6, v y z n a -
č u j í c í s e t í m , že imunosupresantem je FK 506.

9. Produkt, obsahující inhibitor komplementu a imu-
nosupresant s aktivitou podobnou cyklosporinu A pro použi-
tí jako kombinovaný přípravek pro současné, oddělené nebo
postupné použití při podpoře přežití alotransplantátů ne-
bo souhlasných xenotransplantátů nebo při zabránění vypu-
zení transplantátů.

10. Kit, obsahující farmaceutický přípravek inhibitoru
komplementu a farmaceutický přípravek imunosupresantu s
aktivitou podobnou cyklosporinu A.

11. Použití inhibitoru komplementu a imunosupresantu s
aktivitou podobnou cyklosporinu A pro přípravu činidla pro
podporu přežití alotransplantátu nebo souhlasného xeno-
transplantátu nebo pro zabránění vypuzení transplantátů.

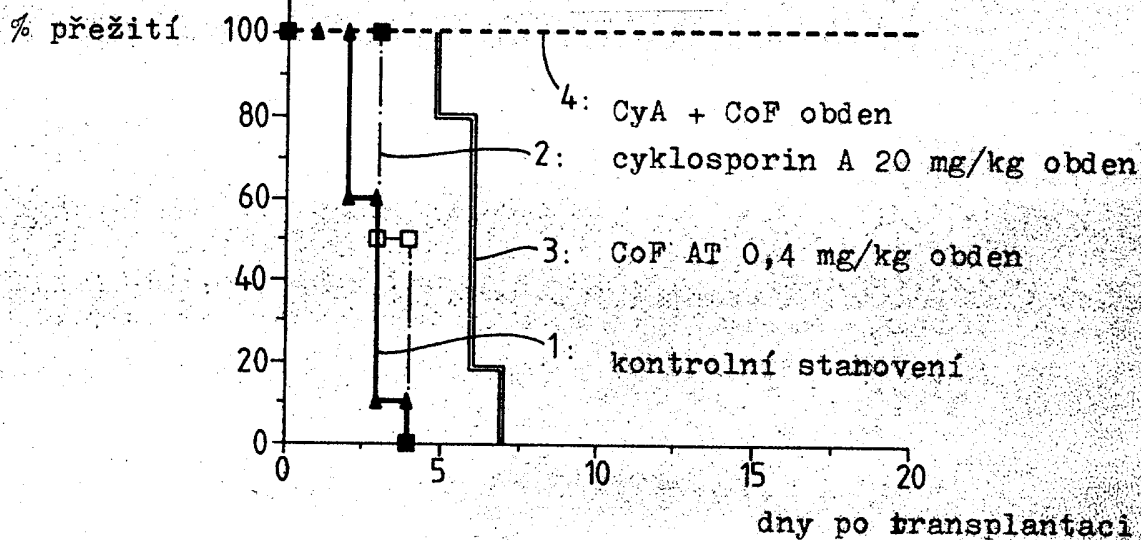
12. Způsob podpory přežití alotransplantátů nebo souhlas-
ných xenotransplantátů u hostitele, nebo zabránění odhoje-
ní takových transplantátů, který se v y z n a č u j e t í m ,
že zahrnuje podání příjemci nebo zamýšlenému příjemci
transplantátu, inhibitoru komplementu a imunosupresantu s
aktivitou podobnou cyklosporinu A.

13. Použití inhibitoru komplementu při přípravě činidla
pro podporu přežití alotransplantátů nebo souhlasných xeno-
transplantátů, nebo zabránění odhojení, u příjemce trans-
plantátu, který je ošetřen imunosupresantem s aktivitou
podobnou cyklosporinu A.

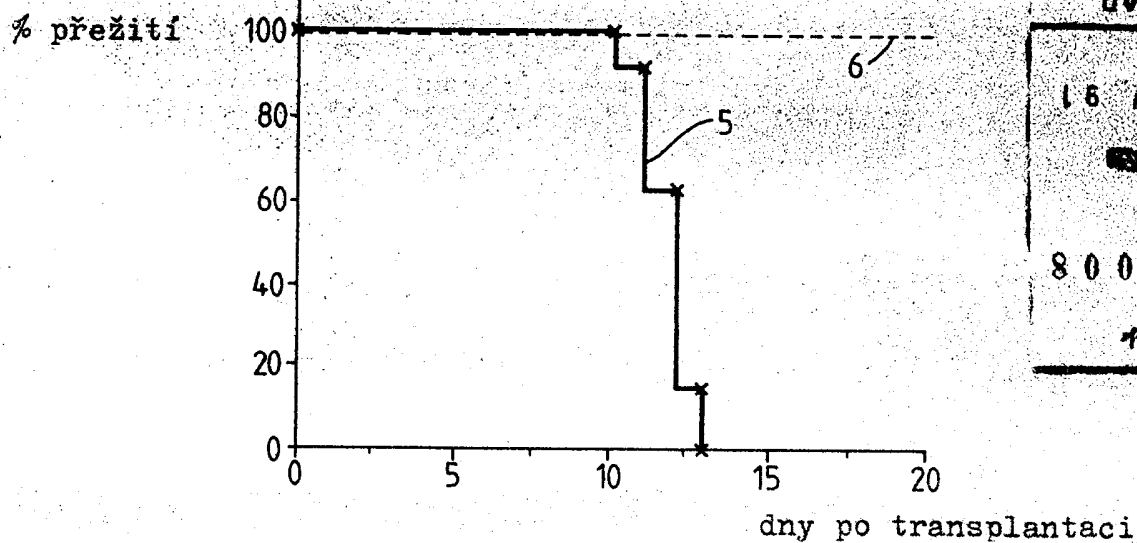
14. . . Způsob podpory přežití alotransplantátů nebo souhlasných xenotransplantátů v hostiteli, nebo zabránění odhojení takových transplantátů, v y z n a č u j í c í s e t í m , že zahrnuje podání inhibitoru komplementu příjemci transplantátu nebo zamýšlenému příjemci transplantátu, který je ošetřen imunosupresantem, majícím aktivitu podobnou cyklosporinu A.

PV 988-91

Obr. 1



Obr. 2



Pril.
PROVYNALEZY
OBJEVY
ORAD
16 11 80
800610
800610
800610
800610