

申請日期	85 年 2 月 5 日
案 號	85101405
類 別	A 61 k $\frac{35}{12}$, $\frac{39}{00}$, $\frac{35}{36}$, $\frac{35}{39}$

修正
86年1月13日
補充

公告本

426518

(以上各欄由本局填註)

發 明 專 利 說 明 書

一、發明 名稱	中 文	含有光敏化劑以預防移植物排斥反應的藥學組成物
	英 文	Pharmaceutical compositions for preventing transplant rejection comprising a photosensitizing agent
二、發明 創作人	姓 名	(1) 朱利亞·李維 Levy, Julia (2) 墨迪圖斯·奧柏奇 Obochi, Modestus Onuora Kay
	國 籍	(1) 加拿大 (2) 加拿大
	住、居所	(1) 加拿大英屬哥倫比亞省溫哥華潘尼法辛路六〇 一一一四九〇號 #601-1490 Pennyfarthing Dr., Vancouver, B.C., Canada V6J 423 (2) 加拿大英屬哥倫比亞省溫哥華史帕葛雷斯廣場 二一二一一八六九號 #212-1869 Spyglass Place, Vancouver, B.C., Canada V5Z 4K7
	三、申請人	姓 名 (名稱)
	國 籍	(1) 奎德洛邏輯技術股份有限公司 Quadra Logic Technologies, Inc. (2) 英屬哥倫比亞大學 University of British Columbia
	住、居所 (事務所)	(1) 加拿大 (2) 加拿大 (1) 加拿大溫哥華·第六大道西五二〇號 520 West 6th Avenue, Vancouver, BC V5Z 4H5, Canada (2) 加拿大英屬哥倫比亞省溫哥華健康科學廣場二 一九四號 I R C 3 3 1 IRC 331, 2194 Health Sciences Mall, Vancouver, B.C., Canada V6T 1W5
	代 表 人 姓 名	(1) 大衛·道菲 Dolphin, David (2) 威廉·柏恩 Palm, William N.

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

426518

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大類：
IPC分類：

A6
B6

本案已向：

國(地區) 申請專利，申請日期： 案號： ， 有 無主張優先權

美國 1995年 1月 13日 08/371,707 無主張優先權

有關微生物已寄存於： ，寄存日期： ，寄存號碼：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明(1)

技術領域

本發明是有關在治療中供應移植物及避免移植物為受者排斥之過程。特言之，是有關以光力療法技術處理供者組織，以耗盡抗原—呈現細胞之組織及消除其中所含細胞之免疫原性。

背景技藝

宿主中同種移植物移植之成功依下列因素而定，如在經移植組織上之抗原為受者確認為是外來的且可激發出排斥反應，受者可調升排斥之免疫系統中之細胞及可修飾外來抗原呈現作用或細胞反應之反應。已知同種移植排斥中一個重要的組份是存在於供者組織上之非一實質細胞（過渡白血球）。

也已知，主要組織適容性複合物（MHC）產物在調介由移植組織拮抗受者之侵犯中扮演重要的角色。MHC通常是複製的，因其包括許多不同的區域，各自編碼不同的細胞—表面抗原，且因為區域極具多型性。MHC區域分成二類，I類或II類，依其組織分佈，所表現抗原之結構及其功能而定。I類抗原，存在在所有有核細胞中，充作胞毒性T（CD8⁺）淋巴細胞之主要標的物。II類抗原並不廣泛分佈在組織中，且充作輔助T（CD8⁺）淋巴細胞之主要標的物。

人類白血球抗原（HLA），即人類之MHC，其個別區域之多型性已由抗體及偵測T—淋巴細胞確認之各種

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

五、發明說明(2)

試管內技術所確認。這些反應，由供者中受者之多型性確認作用所調介，與活體內發生之強烈排斥反應符合。檢視移植物排斥之細胞基礎，利用試管內及活體內研究，顯示出CD4⁺及CD8⁺淋巴細胞參與排斥反應之中。

在實驗模式及醫學實演上，於移植後企圖延長同種移植物及異種移植物之存活，主要均集中在受者免疫機構之遏止作用上。此處理使預防移植物排斥之免疫抑制及／或處理成爲其目標。

用於免疫抑制之作用物實例包括胞毒性藥物，抗代謝物，皮質類固醇及抗淋巴球血清。頃發現非特異的免疫抑制劑可有效預防免疫抑制（硫唑嘌呤，溴麥角環肽，去氫潑尼松甲酯，潑尼松，及環孢靈A），可顯著地增進移植之臨床成功。將類固醇如去氫潑尼松或去氫潑尼松與硫唑嘌呤配合共同投藥可減少腎移植後環孢靈A之腎毒性。此外，利用抗淋巴細胞球蛋白再繼以環孢靈A已成功移植腎臟。另一策略是移植前受者接受淋巴學整體放射治療，及移植後少量的免疫抑制。排斥之處理涉及使用類固醇，2-胺基-6-芳基-5-經取代之嘧啶，異質的抗淋巴細胞球蛋白及針對各種淋巴球族群之單株抗體。

免疫抑制藥物主要的併發症爲感染。另外，全身性免疫抑制會伴隨不良的毒性作用，如於腎移植後使用環孢靈A之腎毒害，及造血幹細胞水平之減低。免疫抑制藥物也會造成肥胖，不良的傷口癒合，類固醇低血糖，類固醇精神病，白血球過少症，胃腸出血，淋巴瘤及高血壓。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(3)

基於這些併發症，移植免疫學家已尋求可以抗原特異方式抑制免疫反應之方法，如此僅有針對供者同種抗原之反應會喪失。此種特異的免疫抑制通常由變化欲移植組織之抗原性或可調介排斥之特異細胞而達成。在某些例子中，到底是免疫力或耐性被誘生要依抗原呈現至免疫系統之方式而定。其他抗-排斥策略則集中在攜有MHC之過渡白血球，即抗原-呈現細胞（“APC’s”）之消除或減弱方面，是在移植前之供者組織內進行。

針對此目的已提出之技術包括供者組織培養時間之加表（Lafterty et al., "Thyroid Allograft Immunogenicity is Reduced after a Period in Organ Culture", Science, 188:259(1975)）。經由移植前在組織培養中生長之預先處理同種移植組織，已見於二個鼠類模式系統中，造成跨越MHC障壁持久之可接受性（Latterty et al., Transplantation, 22:138-49(1976); Bowen et al., Lancet, 2:585-86 (1979)）。已有假說提出此處處理方式可造成過渡淋巴細胞之耗盡，因此使組織免疫原性所必要之刺激物細胞族群缺席。如，已使用某些供者-受者之HLA配對，如於血管及腎移植物中及有時是在血液輸血前進行。

供者組織已經以生長因子處理，如TGF- β （Czarniecki et al., 美國專利案No. 5,135,915公告於1992年8月4日），有時配合延長之培養時間（Orton, 美國專利案No. 5,192,312, 公

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

五、發明說明(4)

告於1993年3月9日)。

供者組織可以UV光處理(Reemtsma et al., 美國專利案No. 4,946,438, 公告於1990年8月7日; 及Lau et al., "Prolongation of Rat Islet Allograft Survival by Direct Ultraviolet Irradiation of the Graft, Science, 223:60>(1984)), 有時配合微包膠作用(Weber et al., 美國專利案No. 5,227,298, 公告於1993年7月13日)。其他研究者會單獨使用障壁膜, 如包括一個第一非毒性層及生物相容且半通透聚合材質之第二外層之雙層結構, 出自Cochrum, 美國專利案No. 4,696,286, 公告於1987年9月29日。

供者細胞曾以各樣物質處理, 如局部應用環孢靈於皮膚移植物, 如Hewitt et al, 美國專利案No. 4,996,193, 公告於1991年2月26日所教示, 及以淋巴抑素灌注至供者腎臟, 由Jones et al., 美國專利案No. 4,294,824, 公告於1981年10月13日, 所教示。於試管內以可體松, 酞胺哌啶酮, 或尿素在移植至實驗動物前處理, 已可延長皮膚移植物之存活時間。局部施加於皮膚之藥物劑量, 通常較達到相似作用由注射至受全身所需之劑量還小。為減少欲移植皮膚之抗原性, 供者皮膚在移植前已經過鏈激酶/鏈追鏈, 受者之RNA及DNA製劑, 或戊二醛溶液處理。

更精巧之方法是涉及以直接拮抗NH₂C產物之單株抗

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(5)

體配合補體來處理供者組織 (Faustman et al., "Prolongation of Murine Islet Allograft Survival by Pretreatment of Islets with Antibody Directly to Ia Determinants", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:5156(1981)) 或以直接拮抗 M H C 之抗體免疫共軛物處理供者組織 (Shizuru, J. A., et al., "Inhibition of Rat Mixed Lymphocyte Pancreatic Islet Cultures with Anti-Ia Immunotoxin", Transplantation, 42:660(1986))。由這些方法得到各種結果。因此，在此需有一種可延長移植手術中移植物存活時間且將因使用大劑量免疫制劑所導致之毒性及其他副作用減至最低之方法。

依據本發明欲選擇性破壞這些 A P C 細胞所選用之技術涉及以光敏化劑與供者組織接觸，繼而曝於光下再行移植。相似的光力方法先前已有使用，主要是來破壞組織如腫瘤組織，粥樣動脈硬化斑，表皮疾病，及血中不要的病原體 (Levy et al., 美國專利案 5, 283, 255, 公告於 1994 年 2 月 1 日；4, 883, 790, 公告於 1989 年 11 月 28 日；4, 920, 143 公告於 1990 年 4 月 24 日；5, 095, 030, 公告於 1992 年 3 月 10 日；及 5, 171, 749, 公告於 1992 年 12 月 15 日，其揭示在此均納為參考用)。也見，Dougherty et al., 美國專利案 Nos. 4, 932, 934, 公告於 1990 年 6 月 12 日，4, 889, 129 公告於 1989 年 12 月 26 日；5, 028,

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(6)

621 公告於 1991 年 7 月 2 日；4,866,168 公告於 1989 年 12 月 12 日；5,145,863 公告於 1992 年 9 月 8 日；及 4,649,151 公告於 1987 年 3 月 10 日，也列為本案之參考文獻。

例如，Dougherty et al 揭示於美國專利 4,866,168 中有關一種商品名為“Photofrin II”之組成物，其由回收血卟啉衍生物高度集合一分子量部份而得。另一特異實例由 Levy et al 揭示於美國專利案 4,883,790 中，係基於同質目的使用一群相關的化合物，命名為“單氫苯並卟啉”。

此外，許多具相似結構的各樣光敏化劑之用法也有所描述。如，(1-羥乙基)次卟啉之衍生物，疏水的血卟啉醚，及製備自脫鎂葉綠酸甲酯之化合物 (Pandey et al., 美國專利案 No. 5,002,962, 公告於 1991 年 3 月 26 日)；焦脫鎂葉綠酸共軛物 (Pandey et al., 美國專利案 No. 5,314,905)；細菌葉綠素-A 衍生物 (Dougherty, 美國專利案 No. 5,171,741 及 5,173,504)；單乙烯及二乙烯醚-連接之二聚體 (Ward, 美國專利案 No. 4,961,920)；苯並卟啉衍生物 (Allison et al., 美國專利案 No. 5,214,036)；二苯並卟啉化合物 (Oolphin et al., 美國專利案 No. 5,308,608 及 5,149,708)；所謂的“綠”卟啉，如單苯並卟啉衍生物 (Jamieson et al., 美國專利案 No. 5,

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(7)

087,636)；含有外向環雙鍵之卟啉化合物 (Cheng et al., 美國專利案 No. 5,064,952)；及 Porfiner Sod. 組成物 (Clauss et al., 美國專利案 No. 5,244,914)。所有這些專利之揭示均納為本案參考。一般而言，在第一概算下這些藥物被視為在其利用價值上可與光力療法互相轉換。

雖然光力療法主要是用於腫瘤細胞之處理，然先前已示出其額外的應用。例如，這些光敏化藥物已應用於消除粥樣動脈硬化斑之策略中，並可處理血液及其他體液以破壞感染性有機體。然而，顯然光力療法尚未用來根絕供者同種移植組織中之過渡白血球。

本發明特別有益之處在於不同於將光敏化藥物投予至有機體之療程，供者組織最適於在確實之移植過程之前先於試管內處理。以此方式，和為確保光曝露有適當水平，如曝於與有機體內標的細胞有關之共軛物下，所致之相關問題均可實質地排除。

再者，本發明方法可造成在適合宿主中有免疫穩定性，具生物功能，且在移植前可貯存之移植物。因此，本發明可建立一個經光力處理之移植物庫，其可用於短期貯存。

發明揭示

本發明提出將動物個體中移植物排斥減至最低之方法。在移植之前，含有抗原-呈現細胞 (APCs) 之供

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(8)

者組織與光敏化劑接觸，並曝於所具波長可為光敏化劑吸收之光下充份時間以耗盡 APC's。此處理法並不會殺死角質細胞但可改變其表現 I 及 / 或 II 類抗原，及其所分泌之細胞動素，如此皮膚本身之免疫原性可消除。

於一個具體實例中，光敏化劑係呈共軛物型式，含有抗原 - 特異的組份以加強光敏化劑及標的 APC's 間之交互作用。光敏化劑可調介 APC's 之破壞，此係當同種移植物為可為光敏化劑吸收之適合波長所照射時。

附圖說明

圖 1 示出 BPD 化合物之結構，其特別可用於充作本發明之光敏化劑。

進行本發明之模式

依據下述之發明，在供者組織移植前先與光敏化劑接觸。所謂「供者組織」包括來自供者，非受者，可移植或可植入組織之任一型式，其中含有 APC's。用於本發明之供者組織可為各樣組織中任一種，如軟組織，如新生兒之羊膜，骨髓，造血前驅細胞，膠原蛋白，及可刺激軟骨生長之骨蛋白質，器官如皮膚，心臟，肝，脾，胰臟，甲狀腺葉，肺，腎臟，管狀組織（如腸，血管，或氣管）；及器官之一部份如心臟瓣膜及經分離之細胞或細胞簇，如胰臟之蘭氏小島或肝細胞。

管狀器官可用來替換氣管，血管或膽道之受損部份。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(9)

皮膚移植也可使用，不僅用於灼傷，也可作為受損之腸之敷料，或是閉合某些缺失如膈疝脫。於一個特佳具體實例中，供者組織為皮膚組織或胰臟小島細胞。

此中所用的“移植物”係指衍自供者之生物物質欲移植至受者內。所謂“移植”及其變化指將移植物嵌入受者內，不謂移植是同基因的（在此供者及受者為遺傳上相同的），同種（在此供者及受者為不同的遺傳來源但相同種）或異種的（在此供者及受者來自不同種）。因此，於典型之版本中，宿主是人類且移植物是同種同基因，衍自相同或不同遺傳來源之人體。於另一版本中，移植物是衍自與欲移植入者不同之種類，包括來自種族廣大分隔之種類之動物，如狒狒心臟移植至人類宿主中。

供者組織可來自任何來源，不論是屍體或活的供者。適合的供者實例包括活的動物，如實驗動物，如狗、貓、老鼠、大鼠、沙鼠、天竺鼠、牛、靈長類、或人類。供者較好是哺乳動物，包括人類。

人類供者較好是自願的有血源關係之供者，其身體檢查正常且有相同的主要 A B O 血型，因為穿越主要血型障壁可傷害同種移植之存活。然而也可能，可將 O 型供者之腎移植至 A，B 或 A B 血型之受者。

“同種移植”指細胞及組織，其起源自或係衍自與受者相同種類之供者。較好，供者與受者為相同種類。

所謂“受者”此中指任何相適容之移植宿主。“相適容”表示宿主可接受捐獻之移植物。潛在有用的受者實例

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

五、發明說明(10)

包括人類，較好是哺乳動物如農場動物，如馬、牛或羊；家庭寵物如狗或貓；實驗室動物，如老鼠、大鼠、沙鼠或天竺鼠；或靈長類如類人猿或人類。最好是人類。若移植物之供者及宿主均為人類，其較好 H L A II 類抗原可配對符合以改善組織相適容性。

光敏化劑

一般而言，可用於典型光力療法之大範圍化合物中之任一種均適用於本發明。如一般精藝者所熟知的，最主要的已知光敏化劑為與卟啉有關之化合物。如上文詳述的，這些藥物包括血卟啉衍生物；血卟啉衍生物之高分子量部份，以 Photofrin II 光敏化組成物上市及其活性組份；各種合成的卟啉衍生物，如單氫苯並卟啉，也稱為苯並卟啉衍生物或 B P D's；綠卟啉；及當照射時威信可產生單氧之其他各種多環化合物，因此造成組織之破壞。適合光敏化劑之製法完全揭示於上述專利中，及此中所示之刊物。較好光敏化劑是 B P D。

原則上，任一光敏化劑之關鍵特色是其自然傾向，當曝於可為光敏化劑吸收之波長之光源下，可在其所處部位之細胞上呈現胞毒作用。雖然在許多例子中威信，胞毒作用是於曝露時形成單氧之結果，但確實之操作模式對本發明而言並非關鍵問題。

如 Dougherty 等人於上文討論的，許多額外的特異特性通常與有效之光敏化劑有關。在實行本發明中，光敏

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(11)

化劑特性中特別重要的是，在無光化效應下對細胞之毒性相當少及特定細胞及光敏化劑間無標的一特異之交互作用時其自組織之清除率極快。

本發明之光敏化劑較好具有波長在350毫微米及／200毫微米範圍內之吸收光譜，此吸收光譜可以本身已知之方式使適合至欲求的穿透，較好介於約400及900間，且最好是600及800間。

本發明之光敏化劑之符合良好醫學實務之方式給藥，考慮移植之本質及欲治療之失調症，供者種類，個別受者之醫學狀況，供者組織或受者體內有否存在其他任何藥物，及參與者已知之其他因素。用來接觸移植物之光敏化劑治療有效劑量是可有效減少移植物免疫原性之劑量，如此可與受者相適容而不放排斥。用於此目的一般有效劑量在約0.1至約10微克／毫升範圍，較好由約0.1至約2.0微克／毫升，最好是由約0.25至約1.0微克／毫升。

光敏化劑可與一種以上的免疫抑制劑混合，以加強移植物上之免疫抑制作用。其他作用物此有效劑量依調和物中光敏化劑之含量，移植物型式，移植原因，遞送位置，投藥方法，投藥程序，上述其他因素及參與者已知之其他因素而定。

典型而言，光敏化劑之調和是在環境溫度，適合的pH值及欲求之純度下將其與一種以上生理可接受之載劑混合，即在所應用之劑量及濃度下對受者而言為無毒性之

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(12)

載劑。調和物之 pH 值主要依特殊用途及光敏化劑濃度而定，但不論如何較好在約 3 至約 8 範圍內。

較好，光敏化劑維持在中性 pH 下（如約 6.5 至約 7.5）以避免粘附至其所置之容器內，如趨近生理水平之 pH 值下所發生的，及可確保光敏化劑之活化。因此，以在含有 pH 6.5 平衡鹽緩衝溶液之電解質溶液，但不含胚牛血清（“FBS”）的調和物為適合的具體實施例。FBS 省略之原因在於其含有抗原組份，可惡化同種移植反應。若光敏化劑粘附至移植物所處理之容器上，可視所需加上適合的非一抗原性組份，如人類血清白蛋白，其含量應不致干擾光敏化劑灌流或粘附至欲處理之移植物上。

若光敏化劑調和物欲局部應用，如若其欲在移植前塗在皮膚移植物上，則較好使用粘稠溶液，如凝膠，而非不粘稠的溶液。凝膠之完成可將光敏化劑溶液與成膠劑混合，如多醣，較好是水溶性多醣如玻璃酸，澱粉，及纖維質衍生物，如甲基纖維素，羥乙基纖維素，及羧甲基纖維素。當多醣存在於凝膠調和物中時，含量通常是凝膠按重計之約 1 - 90% 範圍，較好約 1 - 20%。其他針對此目的適合的多醣，及多醣溶解度之決定可見 EP 267,015，公告於 1988 年 5 月 11 日，其揭示已列入本案參考用。

若欲處理之移植物欲貯存一段時間，則光敏化劑較好調和至或加至全氟化學乳液中（充作血液替代品），使高濃度的氧可達到移植物中。此乳液中含有全氟化學藥品，

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

五、發明說明(13)

如全氟羧烷及／或全氟三丙胺，以乳化劑乳化在水中。所選用之全氟化學藥品必須是對受者最不具毒性者。

適合的界面劑實例包括 poloxamer 界面活性劑，其代表環氧乙烷及環氧丙烷成塊共聚物一系列分子，可單獨的或與磷脂，如雞蛋卵磷質，混合而成。另一種買得到的乳液實例為購自 Green Cross 之 Fluosol-DA 20%，其含有全氟羧烷及全氟三丙胺，並以 polooamer 界面活性劑， pluronic F-68 乳化。全氟化學藥品乳液及其在哺乳動物上之作用詳述於 Bolland et al., J. Pharm. pharmacol., 39:1021-1024(1987), 其揭示已列為本案參考。

用於治療性投藥之光敏化劑調和物較好是無菌的。無菌可由經 10 . 2 微米) 膜無菌過濾而容易地達成。一旦調和成且滅菌了，光敏化劑將不致穩定至不被氧化變性。然而，可供重組用之經冷凍乾燥之調和物，如含有 B P D，則適於貯存。

標的系統

使用光敏化劑來破壞供者組織啟動移植物對宿主反應之能力，經由光敏化劑與標的特異之作用物質共軛可予以加強。特言之，光敏化物質可共軛至 (1) 可特異地直接對準供者組織中抗原一呈現細胞 (APCs) 之部份；(2) 可特異對準中間物質，且其標記有 APC's 以供共軛物對準用，之部份；或 (3) T 細胞至移植物對宿主狀況。在任一例子中，一旦供者組織因與共軛物交互作用而

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(14)

修飾，其以本身已知之方式曝靈，如此達成供者組織中 A P C 之匯集實質之耗盡。

本發明提出可用於對準同種移植供者組織內 A P C 之含有光敏化劑之共軛物，以及大體上由光力療法（P D T）破壞供者組織中 A P C 之方法。可用於本方法的一種調和物基本上由光敏化劑及可連接「返巢劑」與光敏化劑之系統。另一調和物包括 A P C 一標的系統及光敏化劑之組合，後者與用於 A P C 一標的系統之返巢劑共軛。不論何種調和物，遞送光敏化藥物至 A P C 之最終目的是相同的。

標的之 A P C 可以各種不同型式之標的一特異的作用物來接近，包括對 M H C 糖蛋白產物具免疫特異性部份及淋巴激素因子，而彼之受體攜於細胞上。典型而言，為與 M H C 糖蛋白反應，拮抗糖蛋白生成之抗體，不論是多株或單株均可使用。

多株抗體抗血清以傳統方式製備，如將欲求抗體之抗原注入適合的哺乳動物中，分析血清中拮抗抗原之抗體水平，且於效價高時製備抗血清。也可以傳統方式製備單株抗體製劑，如 koehler 及 Milstein 之方法（ ），利用如取自經免疫動物之週邊血液淋巴球或脾細胞，並使細胞不朽化或以病毒感染，以骨髓瘤融合，或以其他傳統步驟，再由分離之集落篩選欲求抗體之產製。

除了抗體，也可應用適合的免疫反應性片段，如 F a b，F a b 或 F (a b) 2 片段。適用於形成標的

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

五、發明說明(15)

機制之許多抗體已是技藝上可應用的。如，使用免疫反應性片段替代全抗體述於 Spiegeberg, H.L., "Immunoassays in Clinical Laboratory", ()3:1-23(1978)。

除了免疫反應性，也可使用可對準 A P C 細胞表面受體之受體配體來達成目標對準，如在受體及配體間外形或電荷型式互補之基礎上。如此中所用的“受體配體”係指任何天然或合成的物質，其可與 A P C 細胞表面受體特異地結合。受體配體包括激巴動素因子，如 I L 2。

依據本發明之特殊具體實例，光敏化劑以標的特異之作用物為中介共軛之，其依序與 A P C 具特異性。如，在可呈現 I a 之大鼠細胞例子中，可使用老鼠抗一大鼠 I a 抗體為中升。在此例子中，與抗一老鼠抗體偶合之光敏化劑共軛物可與標有鼠抗體之標的細胞精確地對準，其方式如同可直接如此之含有抗一大鼠 I a 抗體之共軛物。

共軛方法

標的對準系統可以傳統方法及連接子技術直接共軛至光敏化藥物上，如一般技藝中已知的，且由上述 Levy et al. 專利案中之實例描述。對於如 I g 及其他多肽之蛋白質而言，可利用如脫水劑，如碳化二亞胺，達成光敏化劑及標的一特異組份間之直接共價鍵。當然共軛物之活性部份也可經由連接子化合物之使用而連接，此化合物為雙官能的且可將二個活性組份共價結合。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(16)

技藝中適於連接二化學部份之任何有效技術，均落於本發明範圍內。連接子部份廣泛了解是一種共價鍵或技藝中可運用的任何連接子部份，或是以標準技術可自其中衍生。

另外，可由額外特異的作用物調介標的對準。如下文所說明的，A P C - 特異抗體直接之第二抗體可直接連接至光敏化劑上，且可使用 M H C - 糖蛋白對準作用物為免疫共軛物及標的細胞間之橋樑。

處理方法

依據本發明，A P C - s 之消去或功能減弱，或其他皮膚細胞，如角質細胞，之調控可以相當直接的方式達成，即將供者組織與光敏化劑直接接觸，其可呈共軛型式，在可形成光敏化劑（或含光敏化劑共軛物之標的特異組份）及標的 A P C - s 間強烈關聯性之條件下，同時將供者組織中之光敏化劑濃度減至最低。

接觸適當地包括將組成物施加至移植物一個以上表面，或以本發明之光敏化劑調和物培育或灌注器官移植物。處理通常發生至少 1 分鐘，較好由 1 分鐘至約 72 小時，且甚至較好是由約 2 分鐘至約 24 小時。接觸時間依下列因素而是，如調和物中光敏化劑之濃度，欲處理之移植物，特殊之調和物型式。灌注可以任何適合的步驟完成。如，器官可經由提供固定壓力之裝置未灌注，或以在泵及器官間有壓力調控器及溢流狀況之裝置灌注。另外，器官可

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

五、發明說明(17)

置於經由熔封門之施壓艙中，並由泵遞送至艙中，其可自貯存槽引流流體，同時視所需以瓣膜將灌注液送回貯存槽。

於皮膚移植物方面，調和物可塗佈或噴霧在欲移植皮膚之下表面，如此在供者之下表面及受者組織間可有一層光敏化劑。然而較好全部皮膚移植物浸在光敏化劑組成物中。

接觸步驟之發生可在大範圍溫度下，只避開會使移植物變性或不利影響之高溫及減少光敏化劑細胞吸收之低溫。較好，接觸步驟發生在約 50 °C 至約 400 °C 範圍下，較好是由約 150 °C 至約 370 °C，且最好是在環境溫度下。

在光敏化劑適當地分佈以確保與標的 APC's 有正確之關聯後，如此處理之供者組織再接受光之曝露，此光具有可為光敏化劑吸收之波長，並導致光敏化劑胞毒特性之活化。當然此種曝露完全是光力療法技藝中傳統的。此目的方面之實例方法及裝置述於如上述之 Dongherty et al 專利案中。

於移植物與光敏化劑接觸並曝於光之後，其可貯存長至約 24 - 48 小時。然而，較好可立即應用於移植步驟中。貯架期可依上述般加長，如利用血液替代品於調和物中（如全氟化學藥品乳液），或以含有經冷卻之等滲劑及抗凝固劑之光敏化劑調和物灌注移植物，再利用甘油，使移植物冷凍但極少破壞細胞，如 1985 年 4 月 9 日所發

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(18)

表之 J P 6 0 0 6 1 5 0 1 中所述。此外，移植物可以不同的液體保存，其中包括調和物，同時器官冷卻至冷凍溫度，以半持久地保存器官而不致使細胞壞死。

在移植之前，移植物較好洗去光敏化劑組成物，可浸於生理食鹽水中或利用其他針對此目的之方法。同時在移植之前，受體可接受加有經 P D T 一處理過之週邊血液單核細胞之一種以上供者特異之輸血以助移植物存活。另一步驟是受者接受整體淋巴照射再行移植手術。任何有益於特殊移植受者之其他移植前步驟，均可進行且為本發明方法之一部份。

在某些例子中，希望可變化移植物之表面如此提供正或負電荷群，如利用適合的胺基酸或聚合物，或粘附生理上可接受之荷電官能基來源。如，負電荷表面對血管而言是適合的可消除血液凝塊。在某些狀況下也希望表面具疏水或親水性，可由偶合如苯丙胺酸，弱胺酸或賴胺酸至表面而成。針對這些表面修飾，特別有效率之免疫抑制劑是戊二醛。

移植步驟本身依所處理之特殊失調症，病人的狀況等而定。在任何特定病例中，醫事人員可確認適合的方法來應用。移植物在手術後關鑑期間（前3個月）可利用任何適合的步驟系統性追蹤，如放射核種之靜脈內血管攝影。在移植後，免疫抑制療法為確保移植物存活七分重要故常使用，其中係採用適合的免疫抑制劑來進行。

本發明方法可予以補充，或是再配合相同或減量之免

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(19)

疫抑制劑)，同時系統性投予至供者，至試管內之供者組織或至受者，可局部或系統地進行。所謂「免疫抑制劑」如此中所用的是指其作用可遏止或掩蓋移植物欲移植處之宿主免疫系統之物質。此因包括可抑制細胞動素產製，向下調控或抑制自體抗原產製，或掩蓋MHC抗原之物質。

此作用物之實例包括2-胺基-6-芳基-5-經取代之嘧啶，硫唑嘌呤或環磷醯胺，溴麥角環肽，戊二醛，MHC抗原之抗遺傳性型抗體，環孢靈A，一種以上之類固醇，較好是皮質類固醇及糖皮質類固醇如潑尼松，甲基去氫潑尼松及地塞米松；抗干擾素- γ 抗體；抗腫瘤壞死因子- α 抗體；抗腫瘤壞死因子- β 抗體；抗間白素-2抗體；抗細胞動素受體抗體，如抗-IL-2受體抗體；異質的抗-淋巴細胞球蛋白；抗-J抗體，較好是OKT-3單株抗體；對CD4之抗體；鏈激酶，鏈追酶；或來自宿主之RNA或DNA。

由這些考量所決定之有效劑量為預防移植物為受者排斥之免疫反應之最低必要量，但多至為達到移植物更長存活時間之必要量。此種劑量較好較對受者造成毒性或使受者顯著更易感染之量還低。本發明中免疫抑制劑之用量通常較尙未經預處理之經移植移植物所需之量還低，且依移植物四週個別之狀況及所使用之免疫抑制劑型式而定。

舉一特異實例，免疫抑制劑一環孢靈A腸外投予之總藥學有效劑量為每劑在每天每公斤病人體重由約0.1至20毫克範圍內，與傳統的免疫抑制療法中目前環孢靈A

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(20)

由約 5 至約 15 毫克 / 公斤 / 天之典型範圍比較。於腎臟移植中，一般之實務是在短時間內投予大量糖皮質類固醇，每天給予數克劑量之甲基去氫潑尼松共歷 3 至 5 天，再給 20 至 100 毫克之潑尼松，移植物組織無光力預處理。由本發明之預處理，可使用顯著較低劑量。

如上示，這些建議用量之免疫抑制劑接受更多的治療判斷。選擇適合劑量及程序之關鍵因素為得到移植物長期存活之結果。如不論在處理超急性移植排斥之初，此歸因於抗體一調升之移植物破壞，或在移植物功能突然下降之晚期均可能需要相當高之劑量。

當使用免疫抑制劑時，其可以任何適合之方法投予，包括腸外方式，且若需局部的免疫抑制處理時，可採傷處內投予方式。腸外輸注包括肌內、靜脈內、動脈內、腹膜內、或皮下投藥。此外，當使用免疫抑制劑時，較好以脈衝輸注方式投予，特別是減少之劑量或採連續輸注方式。

以下實例用以說明，不限制本發明。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

四、中文發明摘要(發明之名稱:)

含有光敏化劑以預防移植物排斥反應的藥學組成物

本發明有關減少同種移植物排斥之方法，其中該移植物內包括有含抗原呈現細胞(antigen presenting cell 簡寫成 APC's)之供者組織，此方法包括：

a. 將供者組織與光敏化劑接觸以得經修飾之供者組織；

b. 將經修飾之供者組織曝於其波長可為光敏化劑吸收之光線下足夠時間以耗盡供者組織中之 APC's；及

c. 將 APC 一耗盡之供者組織移植至受者組織內。將供者組織進行光力療法，則移植物特別是皮膚之同種移植物之平均存活時間可顯著地延長。光敏化劑也可以是含有標的一特異部份之共軛物的一部份。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

英文發明摘要(發明之名稱:)

PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS FOR PREVENTING TRANSPLANT REJECTION COMPRISING A PHOTOSENSITIZING AGENT

A method for reducing the rejection of allografts comprising donor tissue containing antigen presenting cells (APC's), which method comprises:

- a. contacting the donor tissue with a photosensitizing agent to obtain a modified donor tissue;
- b. exposing the modified donor tissue to light having a wavelength absorbed by the photosensitizing agent for a time sufficient to deplete the APC's in the donor tissue; and
- c. transplanting the APC-depleted donor tissue into the tissue of a recipient.

By subjecting donor tissue to photodynamic therapy, the mean survival time of grafts, particularly skin allografts, was significantly lengthened. The photosensitizer may also be part of a conjugate containing a target-specific moiety.

訂

附件一：第85101405號專利申請案

中文補充實施例

實例 1製備 B P D - R a - M I g 共軛物

示於圖 1 的光敏化劑，苯並咪啉衍生物單酸環 A (B P D - M A) 於暗處以磷酸鹽緩衝的食鹽水由濃度，毫克 / 毫升稀釋至 200 微微克 / 毫升，並與已知量的大鼠抗一老鼠 J g (R a M I g) 混合，其得自 Cedar Lane Laboratories 或是經由老鼠免疫球蛋白免疫於兔子而製備並在免疫吸收管柱上純化。混合物在室溫下之暗處培育 1 小時，且生成的共軛物經由對分子量少於 12 - 14 k d 之分子可通透的膜，對 3 升的 P B S 於 4 °C 下透析一夜。以經標記的 B P D - M A 進行的模式顯示所保留的共軛物具有 10 - 20 的 B P D : A b 比例。之後再將透析所得的滯留物冷凍，冷凍乾燥，並貯於暗處。

實例 2以共軛物處理同種移植組織

如下自大鼠中分離供者之胰臟蘭氏小島組織：

公的 S D 大鼠 (200 - 250 克) 以腹膜內尿烷 (100 毫克 / 公斤) 麻醉，並經由中線剖腹術，以兩側氣

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

胸誘生心呼吸停止。將近端共同膽管接上導管並在其進入八十二指腸之點處末端地閉合。胰臟再以逆行方式，以濃度 0.42 毫克 (650 單位) / 毫升的冷的 (4 °C) 膠原蛋白酶溶液 (X I 型, Sigma Chemicals) 擴大。經在原位的膠原蛋白酶擴大後，進行整體胰切除術。

腺體在 37 °C 的水溶中水解 22 分鐘，經水解的腺體經由無菌且聚矽氧化之吸量管滴定使分散。粗製的組織液漿通過 200 微米篩濾膜以移去未水解之導管，血管及淋巴結，再經由分別是 1.065 及 1.031 之比重之二個單層組成之不連續右旋糖梯度離心。較不稠密的蘭氏小島組織自單層介面中吸出，洗滌，並以解剖顯微鏡下手 2 挑檢進一步再純化。利用此技術，每個胰臟中可回收 300 - 400 個功能上及外形上完整的蘭氏小島。

蘭氏小島在添加有 25% 牛血清，15 mM HEPES 緩衝溶液及 1% Streptomycin 的 Ham 5 F - 12 培養基於試管內培養一天。所培養的蘭氏小島先與商品化之老鼠抗一大鼠 Ja 單株抗體 (命名為 OX - 6) 培育，以 0.2 毫克 / 毫升在 -4 °C 下歷小時。OX - 6 係免疫) 特異地拮抗 I I 類 MHC 產物。

部份的經 OX - 6 處理的蘭氏小島分別與下列培育：
 (1) Pa - Mig - BPD 共軛物具有 6.5 BPD : 1 Ab 之比例，(2) 相同的共軛物在 20 BPD : 1 Ab 比例下；(3) BPD 與不相關抗體 GA - 7 sig G 之共軛物在 6.5 BPD : 1 Ab 比例下；(

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

4) 單獨的 B P D : 及 (5) 單獨的培養基在 2 0 ° C , 暗處下歷 2 小時。培育混合物再曝於波長 4 0 0 - 8 0 0 毫微米以及 / 0 焦耳 / 公分²光能量下。經照射的培養物進行組織學測試及 A P C 耗盡研究。

實例 3

供者組織之鑑定

在組織學研究中，將已經 6 . 5 B P D : 1 A b 共軛物處理的約 7 5 - 1 0 0 蘭氏小島移植至受者同基因 S D 大鼠及同種異基因 W F 大鼠之腎囊下。在同基因及同種異基因移植物中，所有受者均有成功的結果。特別是在二者均可觀察到淋巴細胞浸潤物完全替代移植物，且在任一者均無可鑑知之內分泌組織。

於 A P C 耗盡研究中，蘭氏小島先以 O X - 6 抗體免疫染色。如此處理的細胞接受標記有 F I T C 之山羊抗 - 老鼠 J y (Jackson Laboatories) 的二次染色，再接受螢光顯微鏡檢。在已經共軛物處理之製劑中，未見可鑑知之 M N C I I 類細胞。然而於對照組中 (具不相關抗體之共軛物，單獨的 B P D 以及培養基) ，可以螢光顯微鏡檢偵測這些細胞之存在，因為標有 F I T C 之二次抗體可標記出 A P C 並射出綠色螢光。

實例 4

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

皮膚同種移植排斥之預防

爲確定出可代表最少排斥之基線，依據標準步驟（Billingham et al. "The Teehnigue of Free Skin Grafting in Mammals", J. Exp Biol., 28 : 385 - 99 (1951)）如下在BALBK老鼠上進行9處同種同基因移植（供者及受者爲同一動物）：被移植老鼠之軀幹皮膚刮毛並除毛。老鼠再經20微升氯胺酮鹽酸，10微升甲苯噻吡及70微升PBS混合物之腹膜內注射而麻醉，再小心解剖得全厚的皮膚（1公分×1公分），留下適合的移植體並小心保持內層完整。

自體移植的皮膚移植物再施加至移植位置，並加數滴（約4滴）Vetrap組織粘合劑於移植物及移植床間之界面使保持定位。移植物以塗布有凡士林之網布綿向下壓，移植物與綿以Vetbond繃帶定位，其圍著身體包紮形成一個“身體石膏紗布”。

長期同種同基因移植之成功率，即超過120天，大於90%。當移植物中有至少80%壞死表示移植物的排斥是完全的。移植物存活以按天數計之存活時間平均值±標準偏差來表示。

也以C57132/6（供者，H-2^b）及BALB/L（受者，H-2^d）間之同種異基因皮膚移植物爲對照組，利用如上之相同步驟，除了各皮膚移植物取自一個供者老鼠並施加至不同受者老鼠之移植床上。簡

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

皮

訂

線

言之，將供者老鼠之軀幹皮膚刮毛並除毛，再得全厚皮膚移植物（1公分×1公分）。受者老鼠刮毛並腹膜內注入20微升氯胺酮鹽鹼，10微升甲苯噻吡及70微升PBS之混合物使麻醉。各受者之移植床由軀幹皮膚之小心解剖作準備（1公分×1公分），小心地保持內層的完整。移植物施加至同種異基因移植位置，並以Vetbond組織粘合劑使固定，加上塗布有凡士林之紗布綿及Vetrap繃帶形成一個「身體石膏紗布」。平均存活時間為11.1天（11.9標準偏差）。

依據本發明方法，欲移植於受者之皮膚樣品先與1.0微克／毫升之光敏化劑BPD溶液於試管內接觸1小時。皮膚再懸浮於不含胎牛血清（「FBS」）之電解質溶液中30分鐘，再曝於射光之二極管（「LEBS」）紅光下（10焦耳／公分²，於690毫微米±10毫微米下）。經此光線處理，曝露的皮膚移植至如上述之受者老鼠身上。自移植後第8天開始追蹤動物之排斥現象。

結果劃圖示於表1，為平均值加上標準偏差。同種異基因移植之平均存活時間增加至18.5天（2.1標準偏差）。以Student's t-試驗比較各組之平均值。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

線

表 1

移植型式	受試動物數	平均存活時間 (標準偏差)
同種同基因	9	無限的
同種異基因	16	11.1天(119)
同種異基因加上 供者皮膚預處理	6	18.5天(2.1)

結果建議光動力學處理欲移植組織之免疫調控作用，可造成移植存活期顯著地延長。

重覆實驗以再次比較 Balb/c 受者老鼠身上進行之同種異基因移植，與同種異基因之皮膚於活體外預先與光敏化劑 B P D 處理之結果，變化 B P D 濃度由 0.125 - 1.0 微克/毫升，及光度，並與標準的對照用同種異基因移植比較。於此實驗中，當在移植組織內先觀察到壞死的斑紋，即排斥開始，此在大多數例子中視為同種異基因之排斥。預處理之移植組織加上低劑量的 B P D，有或無光照，對於皮膚同種異基因移植存活之效力結果示於表 2。可觀察到 (1) 組織移植物與 B P D 在無光照下培育，或 (2) 以光在無 B P D 下預處理組織移植物，任者在同種異基因移植存活上均無顯著作用。另一方面，在移植前老鼠給予預處理過之皮膚組織其存活依據 B P D 之劑量而顯著地延長 (經由變化分析 $p < 0.0001$ (" A N O V A "))。較高劑量之 B P D 不會造成皮膚同種異基因移植物較長的存活。反之，在取低劑量之 B P D 之

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂 線

0.2 加上光 (0.25 - 0.5 微克 / 毫升) 可觀察到最有益的處理作用，和 1.0 微克 / 毫升相反。

表 2 Balb/c 受者老鼠之同種異基因移植之存活，老鼠給予試管內經 BPD 10.125, 0.25, 0.5 或 1.0 微克 / 毫升) 及光 (10 焦耳 / 公分², 690 ± 10 毫微米波長) 預處理之同種異基因皮膚

處理組	MST 天數 ± 標準偏差 *	延長率 +
對照組		
未處理 (n=42)	9.3 ± 2.2	-
10 焦耳 / 公分 ² 僅 LED 光 (n=15)	8.4 ± 2.1	-9.7
1.0 微克 / 毫升 僅 BPD (n=5)	10.2 ± 0.4	9.7
0.25 微克 / 毫升 僅 BPD (n=5)	9.8 ± 0.4	5.4
供者皮膚之 PDT (微克 / 毫升 BPD + 10 焦耳 / 公分 ² CED)		
1.0 微克 / 毫升 BPD (n=5)	11.2 ± 0.4	20.4
0.5 微克 / 毫升 BPD (n=10)	15.0 ± 1.4 S	61.3
0.25 微克 / 毫升 BPD (n=20)	16.9 ± 1.7	82.9
0.125 微克 / 毫升 BPD (n=10)	14.2 ± 2.5 S	52.7

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

表

訂

線

*平均同種異基因存活時間天數±標準偏差。在移植組織內開始壞死時為同種異基因之排斥計分。

+ 相較於未處理組估計出同種異基因移植上之延長率。幾指動物數目，列於制簇內。

$\bar{s} p < 0.001$ 及 $p < 0.0001$ ，由 Student's t - 試驗與未處理組比較而得。 $p < 0.001$ 經由 $\alpha = 0.05$ 之 ANOVA 而得。

由於增加光敏化劑之劑量其本身似乎並不會顯著地延長移植物之存活，因此假定欲移植組織之光動力學處理之免疫調控作用可能依據皮膚中細胞族群之選擇作用而定，且因此光動力療法中已知之胞毒性，細胞耗盡作用因此未必是必要的。

實例 5

欲移植皮膚之組織學檢查

為檢查在可造成延長存活時間之條件下，光動力療法對處理皮膚移植物之作用，如上述取得及處理皮膚樣品，除了利用不同的光敏化劑濃度範圍，即 0.25 或 0.5 微克/毫升 BPD。某些組織僅與電解質溶液培育，未加任何光敏化劑，作為對照樣品之用。所有組織均培育 24 小時以上，之後取代表數目曝於光照下。照光時，曝於 10 焦耳/公分² 能量水平之紅光下。

所有樣品再置於福馬林中，並接受組織學檢查。在無

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

光照下，組織於僅電解質溶液下（對照樣品）或 0.50 微克／毫升 B P D 中似乎是正常的。然而，樣品先以 0.25 或 0.50 微克／毫升 B P D 處理，再以紅光處理，在處理後 25 小時呈現出下列最少的組織學變化：核變大，核周之空泡化，上皮細胞中嗜伊紅血球之減少，胞質體積增加，及上皮表面角質細胞間細胞間隙之增加。基本上與未處理皮膚比較下，於經處理皮膚上的所有細胞均彈持程度以上之存活。然而，由於上皮中的細胞有 90% 以上為角質細胞，且僅有約 3.5% 藍蓋罕士氏細胞，處理可能會消除許多的 L C，且因此其在皮膚中數目很少，由例常組織學並不易得知。事實上最低劑量的 B P D 對移植最為有益，然而，成為選擇性細胞 拭作用是機制之反證。因此提出，依據這些組織學發現，本發明之光動力學處理造成少程度之細胞傷害，而非廣布之細胞死亡。對於此非預期的非胞毒性作用機制是未知的。

實例 6

“低劑量” P D T 對於異反應性 T 細胞 L C - 依賴之增殖作用之影響

已知藍蓋罕士氏細胞（Langerhans Cell 縮寫成 “L C”）在混合的上皮細胞 - 淋巴細胞反應（M E C L R）中負責誘生 T 細胞反應（Stingl et al., J. Immunol, 121: 2005 (1978)），於是評估低劑量

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

線

P D T 對於以密度梯度加豐之上皮 L C 誘生異反應性 T 細胞增殖之能力。當上皮細胞與同種異基因 T 細胞混合時，族群中之 L C 通常出現相對於 T 細胞之同種異基因抗原（I 及 I I 類）。T 細胞之增殖反應可作為抗原呈現幅度之指標。如 Grabbe et al., J. Invest Dermatol. 102 : 67 (1994) 所述進行初步 M E C L R。

簡言之，L C 自經處理的（0 - 1.0 微克 / 毫升 B P D + 0 焦耳 / 公分²光）或未處理的供者皮膚（L 5 7 B L / 6）利用二步驟密度梯度離心法加豐。以尼龍一羊毛加豐之 B A L B K 之頸及鼠蹊淋巴結 T 細胞（ 4×10^5 / 孔洞）與 1×10^5 經絲裂黴素 C（Sigma）處理（100 微克 / 毫升於 37 °C 下 20 分鐘）的（L 5 7 B L / 6）L C 在完全的培養基中共培養。細胞古 9 6 孔洞圓底微滴定盤中（Falcon 3077, Becton Drkinson Labaare, Vew Torsey）以 37 °C 培養 5 天，分成三批。所造成的在 M E C L R 中同種異基因 T 細胞 L C - 依賴性增殖作用（其中以來自經處理或未處理之上皮為刺激物）以非放射活性之 M T T 分析法定量（Chen et al., "Colorimetric Assay Detects Mitogen Responses of Spleen But Not Blood Lymphocytes", Int. Anl. Allesay Appl Immunol. 93 : 249 (1990)）。結果以相較於 100 % 反應之對照細胞（僅光照處理）之平均百分率表示，且示於圖 3（n = 3）（± S D）。結果顯示低劑量的 P D T 可顯著地（p < 0.0001 由

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂
線

A N D V A 知) 破壞 L C 之異反應性。在 0.25 微克 / 毫升 B P D 下 (當使用固定光照時) 可得 M E C L R 中 T 細胞增殖最大的遏止作用，因此與皮膚同種異基因接受性之延長所需之最適合條件符合。

培養物之顯微觀察顯示，未處理之對照組中出現細胞巨大的簇集，而在經處理樣品中則簇集有限。細胞簇集被視為是包圍 L C 之異反應性 T 細胞。已知樹突細胞為主要的抗原，呈現細胞其可與異反應性 T 細胞成簇集，並為混合的白血球反應 (" M L R ") 中 T 細胞增殖所必要的。

皮膚移植之排斥，以及各種角質疾病之致病原理涉及上皮及發覺細胞中細胞動素之產生。在發覺反應早期中最重要一點是一群趨多的細胞動素，其中包括間白素 (" I L ") - 1, I L - 6, I L - 8 及 α - 腫瘤壞死因子 (" T N F - α ")。因此，頃發現在同種異基因移植之排斥期間，這些發覺前之細胞動素會提高 (Coito et al., " TNF- α Upregulates the Expression of Fibronectin in Azutely Rejected Rat Cardiac Allografts ", Transplantation Proc. 27 : 1, 463 - 65 (1995))。因此，取得上述 M E C L R 培養物上清液，也用來評估在初級同種異基因反應中 T N F - α 分泌上 " 以於致死量 " B P D 及光照之作用。

以可購自 Biosource International, Colifornia 之特異的酵素 - 鏈結之免疫吸附分析法 (" E L I S A ") 偵測 α - T N F。結果圖示於圖 2，其中示出上皮細胞及 T

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

細胞經由尼龍羊毛粘附作用加豐之共同培養物中，以於致死量之 P D T 於 T N F - α 水平上之影響，按微克 / 毫升計。結果建議，供者皮膚以穿皮 P D T 預處理，可消除活性免疫反應中 α - T N F 之分泌。因此當偵測培養物上清液中是否存在有免疫刺激性細胞動素時，頃發現在對照組中出現顯著的水平 (α - T N F)，但在含有經 P D T 處理之上皮細胞培養物中則偵測不到。由於 T 細胞為 M E C L R 中 α - T N F 之要主來源， α - T N F 產量之下滑被視是次於一最佳 T 細胞活化作用之結果。

這些結果顯示，穿皮 P D T 的標的之一包括 L C，其為處理的結果，呈現出受損的免疫刺激特性。此機制可能可解釋光動力學處理如何來延長皮層同種異基因移植之接受性。

實例 7

低劑量 P D T 對於預光敏化之 T 細胞免疫勝任力之作用

Kripke et al., "Evidence that Cutaneous Antigen Presenting Cells Migrate Through Regional Lymph Nodes during Contact Sensitization", J. Immunol., 145: 2833 (1990) 顯示上皮 L C 因反應接觸性過敏原之局部施用而移動至排空的淋巴結。再者已有暗示指出經 U V - 改變的 L C 可能負責誘生活動力缺失，此由經 U V 照射 L C 之試管內實驗推知 (Simon et al.,

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

Ultraiolet B Radiation Converts Langerhans Cells
from Immunogen to Tolerogen Antigen-Presenting
Cells: Induction of Specific Clonal Anergy in
CDL+ T Helper Cells, J. Immunol., 146: 485

(1991)。因此，吾等自進行移植排斥中受者移植物排空之淋巴結中評估 T 細胞之免疫勝任性。

來自第 6 天受者移植物之淋巴結 T 細胞，以診鮮分離之未經處理的同種異基因 LC (異抗原) 再刺激，係如上述將彼於 M E C L R 中共培養。LC 利用二步驟式蜜度梯度離心自未處理之供者皮膚 (C 5 7 B L / 6) 加豐之。以尼龍羊毛純化之 T 細胞 (4×10^5 / 孔洞) 及加豐的 LC (1×10^5 / 孔洞) 共培養於 37°C 潮濕的大氣中 5 天。利用 M T T 分析法定量已充滿之 T 細胞之增殖作用，以僅以光照處理之對照組之百分率及平均值 ($n = 3$) \pm S D 表示。結果示於圖 4。經充滿且以尼龍羊毛加豐之 T 細胞 (得自給予供者皮膚之受者移植物，以低劑量 P D T 在 0.25 微克 / 毫升之 B P D 劑量下處理) 對於異抗原之再刺激反應為 $30.5 \pm 1.9\%$ ，與之比較之未處理對照組視為 100% 反應。類似的，以供者皮膚經低劑量 P D T 在較高 B P D 劑量下 (1.0 微克 / 毫升) 預處理移植至受者後，取自移植物中之 T 細胞再刺激反應為 $79.5 \pm 8.5\%$ (和對照組比較而言)。

實例 8

‘低劑量 P D T’ 在藍蓋士氏細胞表面抗原上之作用

在低劑量 P D T 後，在 L C 上觀察到的受損的異反應性功能是否可以 L C 上表面抗原之減少來解釋的此一主題也加以研究。將言之，L C 利用二步驟式密度梯度離心加豐自經處理（1.0 及 0.25 微克／毫升 B P D + 10 焦耳／公分²光）或未處理之供者皮膚（C 5 7 B L / 6）。以一系列單株抗體對上皮 L C 染色，並以 E P I C S X L[®] 流體細胞計數器分析。圖 5 示出‘以於致死 P D T 於經尼龍羊毛粘附作用加豐之上皮細胞及 T 細胞共培養物中輔助細胞活性上之作用。所示出之數據代表特異的平均螢光強度（相關單株抗體之強度減去同型，配合之對照組 I g G 之強度）以平均值（n = 3）± S D 表示。

在 L C 表面抗原此流體細胞計數分析中，可發現在 0.25 微克／毫升 B P D 劑量及光之低劑量 P D T 中，和未處理組比較可顯著地降低（p < 0.001，以 A N O V A 知）M H C I 類（H 2^b）（62.8%），I I 類（I - A^b）（90.1%），B 7 - 1（89.2%）及 B 7 - 2（80.0%）之 L C 表面分子。數據以相較於未處理之上皮細胞之平均增殖功能 ± S D（n = 4）表示。以 1.0 微克／毫升 B P D 劑量及光下之低劑量 P D T 可得到相似的減低水平。然而，L C 之存活活力以及 C D 4 5，I e A M - 1 及 D E C - 2 0 5 之表面表現不受影響。此建議於低劑量 P D T 後，L C 表面分

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

訂

線

子降低的水平似乎並非 L C 細胞膜或骨架結構整體瓦解之任意事件結果。類似的結果在他處也有報告，如利用紫外線 B (U V B) 之分子。(Tang et al., J. Immunol, 146 : 3347 (1991))。

一般而言，加豐的 L C 可表現不同的，然而是非常低的 I C A M - 1, B 7 - 1 及 B 7 - 2 分子，但中等程度的 I 類及高程度的 I I 類 M H C 分子。此與先前的報告一致，即新鮮得自老鼠的 L C 為 I a ¹⁰/_{hi} / B 7 - 1 ⁻¹¹⁰ / B 7 - 2 ⁻¹¹⁰，和培養的 L C 相反，後者已知表現出的表型為 I a ^{hi} / B 7 - 1 ^{hi} / B 7 - 2 ^{hi} (Xu et al., J. Invest. Dermatol. 105 : 831 (1995) ; Inaba et al., J. Exp Med 180 : 849 (1994))。

實例 9

低劑量 P D T 在短期及長期培養中之加豐的 L C 上之作用

爲了排除低劑量 P D T 對 L C 之胞毒性是上述所觀察到的細胞表面抗原減少之可能解釋，於是在加豐的鼠類 L C 試管內存活上研究低劑量 P D T 之作用。經加豐的 L C 維持在短期 (24 小時) 或長期 (7 天) 培養中，完全的培養基中添加有等濃度的粒性細胞 / 巨噬細胞一集落刺激因子 (G M - C S F) 及巨噬細胞一集落刺激因子 (M - C S F) (20 毫微克 / 毫升 ; R & D Systems,

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

Minneapolis MN)。GM-CSF及M-CSF已示出對於LC之試管內存活是最適宜的(Xu et al., Eur. J. Immuno, 25:1010(1995); Kitajima et al., J. Immunol, 155:5190(1995)。於溶青期末了，細胞回收，計數，並進行存活力分析或針對MHCI類(I-A^b)，B7-1及B7-2抗原進行染色。生成之數據示於下表3。表3低劑量PDT對LC之作用，其加豐自未處理或經處理之供者皮膚組織，於短期(24小時)及長期(7天)培養中。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

藍蓋士氏細胞經加豐之存活力 ^a ±標準偏差(%)			
組別	新鮮的	短期培養	長期培養
未處理組	79.6±9.5	80.2±4.0 ^{ns}	80.1±2.4 ^{ns}
低劑量PDT (微克/毫升BPD+10J/公分 ² 光(λ=690毫微米))			
1.0微克/毫升BPD	73.8±8.0	49.7±2.0 ^b	28.0±4.9 ^c
0.25微克/毫升BPD	79.7±6.8	82.9±4.1 ^{ns}	78.8±1.7 ^{ns}

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

a : 以錐藍或碘化丙錠排阻法決定 LC 之存活力。存活力之評估利用新鮮分離之 LC 或 LC 維持在添加有 10% FBS, 20 毫微克/毫升 M-CSF 及 GM-CSF 之完全培養基中 (RPMI-1640) 於 37°C 下歷 24 小時 (短期) 或 7 天 (長期)。所表示的數據為利用各組實驗 10 隻老鼠的三次獨立實驗之平均值 ± 標準偏差。

b : $p < 0.001$ 為相較於新鮮分離物之 Student's t - 試驗結果。

c : $p < 0.0001$ 為相較於新鮮分離物之 Student's t - 試驗結果。

ns 與新鮮分離物無類表的差異 ($p > 0.05$ 以 Student's t - 試驗所得)。

頃發現，於短期試管內培養後低劑量 PDT 一誘導的 LC 表面抗原之減少和在預處理及分離後 6 小時內所進行的分析所得的相似。再者，頃發現在 0.25 微克/毫升 BPD 之低劑量 PDT 並不影響短期及長期培養後細胞之存活力 (見表 3)。相反的，在 1.0 微克/毫升 BPD 之低劑量 PDT，可顯著地降低短期及長期試管內培養後 LC 之存活力 (表 3)。這些數據建議，在 BPD (1.0 微克/毫升) 及光照之低劑量 PDT 下，其調控 LC 之表面抗原，最終對 LC 是具有胞毒性的。相反的，較低劑量的 BPD (0.25 微克/毫升) 及光照下 (其同種異基因移植之延長中較為有效) 並不具胞毒性。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

實例 10低劑量 P D T 對 L C ATPase 活性之作用

在 L C 細胞膜上呈現的對強福馬林見抗性之 ATPase 染色，已被充份且信賴地充作這些細胞於原位及於浮液中的組織化學標幟 (Girolomoni et al., J Invest Dermatol, 100:282 (1993))。頃發現經加豐的 L C，但非角質細胞 (K C) 細胞株 (D A M 2 1 2) 對 ATPase 染色呈陽性，證實 ATPase 活性受限於上皮 L C。來自未處理供者皮膚之上皮細胞之 ATPase 染色強度和來自供者皮膚經 0.25 微克 / 毫升 B P D 及光照之低劑量 P D T 處理後於上皮細胞上所觀察到的相似。在某些例子中，在此群中 ATPase 強度似乎略大於對照組供者皮膚。然而非預期的，在 B P D 較高劑量 (1.0 微克 / 毫升的 B P D) 及光照之低劑量 P D T F，ATPase 活性和未處理對照組比較有 90% 的減低。

可能是 L C 上 - ATPase 之去色會誘使細胞死亡。令人感興趣的，有建議指出酵素可提供保護以拮抗細胞外 A I P - 透生之滲透性 (Girolomoni, et al., J. Invest Dermatol, 100:282 (1993))，接下來於曝於細胞外 A T P 下可誘使細胞預期死亡 (Zanovelli et al., J. Immunol. 145:1545 (1990))。在不為此理論受限下，低劑量 P D T - 誘導的皮膚同種異基因移植存活之延長機制液在相當較高之 B P D 劑量下

(1.0 微克 / 毫升) B P D 劑量：L C 胞毒性，及在較低（最適當的）B P D 劑量（0.2 微克 / 毫升）及光照下 L C 表面抗原之調控而定。因為在 B P D 劑量（0.25 微克 / 毫升）及光照下最適當的皮膚移植延長，在此培養中的 L C 無明顯的毒性，於是假設由供者衍生來的樹空細胞其總體的耗盡並非達到細胞，組織或器官移植中較欲求之供者特異的耐性之最佳方式。然而，除非另有所示，並不希望本發明為此假設在任一方面受限。

實例 11

穿皮 P D T 在 L C 移動上之作用

Kripke 及其同僚 (Kripke et al., J. Immunol. 145: 2833-38 (1990)) 在對螢光接觸性過敏原，異硫氰酸螢光素 (L F I T C) 誘生接觸性過敏 (L H S) 之充份研究，已可所研究上皮 L C 之命運及活性提供一個有用的模式。這些研究已顯示，經由螢光接觸性過敏原之局部應用後，帶有 F I T C 之 L C 可移出皮膚，並於局部排空之淋巴結中收集，在此其與 T 細胞系互作用而啓動 C H S。

利用一種活體內模式，其中以 690 毫微米波光之光（“穿皮 P D T”）照射老鼠全身而活化 B P D，再評估反映接觸性過敏原，8-氯甲基-4,4-二氟-1,3,5,7-四甲基-4-硼-3a,4a-二吡-喹（

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

線

cell Tracker™ Green B O D I P Y® , Yolecular Probe Inc., Engene OR) 之局部施用, P D T 對於 L C 移動上之作用。於處理及施用 Green B O D I P Y®, 後 24 小時, 分析排空的淋巴結細胞中帶有過敏原的細胞。利用 Coulter X2® 流體細胞計數器, 評估來自經處理或來處理老鼠之排空的淋巴結細胞之螢光強度。另外, 自這些老鼠之表面鼠蹊及腋淋巴結可得存活細胞總數。將給予穿皮 P D T 及 Green B O D I P Y® 之老鼠所得的結果與 (1) 僅接受 Green B O D I P Y® 等穿皮 P D T (陽性對照組) 之老鼠或 (2) 來操作之雜亂配對 (天然的或陰性對照組) 之結果比較。

數據建議, 穿皮 P D T 通常不會影響上皮 L C 移動至局部排空的淋巴結。接觸光敏化劑可誘導帶有 B O D I P 之上皮細胞 (可能是 L C) 由上皮移至局部排空的淋巴結。單獨塗佈 Green B O D I P Y® (陽性對照組) 的老鼠, 其帶有過敏原細胞之平均強度顯著 ($p < 0.001$, 由常規 A N O V A 知) 大於得自天然老鼠之背景螢光強度, 後者並未接受接觸性過敏原 (陰性對照組)。相反的, 在 B P D 使用劑量 (0.25 或 1.0 毫克/公斤) 及使用之光照 ($15 \text{ J} / \text{公分}^2$, $\lambda = 690 \pm 10$ 毫微米) 下之穿皮 P D T 中, 對於帶有 Green B O D I P Y® 上皮細胞移動至排空的淋巴結上並無顯著作用。

再者, 吾等發現接觸過敏原誘導淋巴結中適度細胞增加 ($p < 0.05$ 以 A N O V A 知) 由 1.39×10^7

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

存活細胞 / 老鼠 (陰性對照組) 平均值增加至 2.04×10^7 存活細胞 / 老鼠 (陽性對照組) 平均值。然而, 陽性對照組淋巴結之細胞結構 (存活的淋巴結細胞) 與接受抗原之處理組者並無顯著的差異 ($p > 0.05$ 以常規 ANOVA 及 Bonferroni 多重比較試驗)。

實例 1 2

穿皮 P D T 於皮膚同種異基因移植排斥中發覺細胞浸潤至移植物之作用

許多宿主細胞型式於排斥中通常會浸潤同種異基因移植物。大多數的浸潤細胞 (主要是單核白血球) 配有與移植物上異抗原具特異性之受體。這些細胞浸潤物負責調升排斥過程。以下實驗評估 "低劑量 P D T" 於皮膚同種異基因排斥並存之組織學及免疫組織學變化發展上之影響。

Balblc 老鼠以未經處理的供者皮膚 (C 5 7 B 2 / 6) 或供者皮膚以 B P D 最佳劑量 (0.25 微克 / 毫升) 及光照 $10 \text{ J} / \text{公分}^2$ 之 "低劑量 P D T" 預處理移植之。犧牲動物係, 移植的組織在各種時間時 (移植後 4 - 8 天) 切片。預處理的皮膚組織與未處理的對照樣品於移植後的配合時間點時比較。

進行免疫組織學分析時, 皮膚組織於液態氮冷卻之異戊烷中驟凍。冷凍組織切片以鹼性磷酸酶鏈抗生物素蛋白 - 生物素方法免疫染色, 如他處所述 (Retkay et al)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

clin Exp. Immunol. 98 : 52 - 59 (1994))
 , 應用與下列老鼠細胞表面抗原直接拮抗之商品化生物素
 化之單株抗體 : Mrec II類 (I - A^d) 及 ICAM - 1 抗
 原 (LC , 巨噬細胞) , CD 4 (T 輔助細胞) 及 CD 8
 (T 胞毒細胞) 。經免疫染色之玻片再利用光學顯微鏡
 “ 盲目的 ” 評估。利用以下計分準則於反映各染色強度下計
 分 = 0 = 無染色 ; 1 = 某些區域少量染色 ; 2 = 輕微染色 ;
 3 = 輕微至中度染色區域 ; 4 = 中度染色區域 ; 5 = 中度
 至顯著染色區域 ; 及 6 = 顯著染色強度區域。

此外 , 未處理或預處理之移植組織固定於 10 % 福馬
 林中 , 切片以蘇木素及嗜伊紅染色 , 再以 “ 雙盲 ” 方式進
 行 H / E 染色皮膚組織之顯微評估。針對各種解剖 / 病理
 變化指定分數 , 其反映出發覺程度及血管變化 : 0 = 無發
 光浸潤 ; 1 = 少量浸潤細胞 ; 2 = 輕微浸潤 ; 3 = 輕微至
 中度浸潤 ; 4 = 中度浸潤 ; 5 = 中度至顯著浸潤 ; 及 6 =
 顯著浸潤。

吾等的免疫組織學及組織學結果顯示 , “ 低劑量
 P D T ” 可使細胞浸潤至移植物之水平保持在和對照組移
 植物比較下之低水平。和對照組相反的 , 細胞浸潤之速度
 , 此可引導至移植物排斥 , 於 “ 低劑量 P D T ” 處理過之
 移植物中較不強烈。發覺細胞浸潤至移植物是組織學上明
 顯的 , 而 CD 8 , M H C I I 類及 ICAM - 1 表面抗原
 之染色強度則是免疫組織學上明顯的 , 所有皮膚樣品評估
 之一般總覽顯示 , 經處理過的樣品在移植物之基礎真皮上

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

定

訂

象

通常有 I C A M - 1 及 M H C I I 類較少的焦點浸潤染巴 (和對照樣品比較而言)。處理組中 C D 8 - 染色細胞上浸潤物顯著較少, C D 4 - 染色細胞較少或無, 此與對照組皮膚切片比較而言。就組織學而言, 「低劑量 P D T」誘導發覺細胞浸潤開始之延遲及強度上有所減低。再者經處理移植物中出自程度顯著地減少。而少腫方面於經處理及對照組中在所有天數中為略少或相似。再者, 角質肌肉退化之開始有所延遲, 且在處理樣品中退化程度較不如對照組。在接受「低劑量 P D T」L 處理過之供者皮膚的某些動物中通常會出現肌肉纖維之礦物化作用。

於皮膚同種異基因移植中, 已知藍蓋士氏細胞 (L C) 經由呈現出 C D 4 + 及 C D 8 + T 細胞之抗原可在移植受者之排空的淋巴結中啓動移植物排斥作用。接下來這些異抗原一特異的 T 細胞移動至移植物處以調介排斥過程。在吾等先前發現之基礎上, 其中建議「低劑量 P D T」可反問調控 L C 之抗原一呈現功能, 似乎移動至移植物之較低的發覺細胞浸潤水平可能是 L C 無效率同種異基因刺激功能之因果關係。然而, 本發明不欲在任何方式下為此理論所縛, 除非明白地與所陳述的相反。

實例 1 3

以苯並嘧啶衍生物 (B P D, Verteporfin) 及可見光行光敏化作用修飾變化鼠類脾樹突細胞之免疫刺激特性

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

由於樹空細胞（`DC`）已被視為可傳播初級免疫反應，於是進行實驗以決定BPD，有或無光照下，是否可變化混合的白血球反應（`MLR`）中DC之免疫刺激行為或是不同免疫調節分子之表面水平。當以流體細胞計數器進行研究時，頃發現單獨紅光（5焦耳/公分²）或BPD（≤2微克/毫升）處理DBA/2老鼠牌之DC（大於85%純度）並不會改變MLR中細胞刺激基因T細胞增殖之能力。再者，關於MHCI類，MHCI I類，ICAM-1，CD80，CD86，LFA-1（CD11a）Mac-1（CD11b），CD18抗原或CD-特異的標幟NTDC-145之表現則無顯著的變化。

然而以15毫微克/毫升BPD及光處理DC，實質上可消除（大於85%）其刺激MLR之能力。再者，在光動力學處理後24小時內，PC表面之MHCI類，II類，ICAM-1，CD80及CD86水平降至對照組水平之40-65%。相反的，CD11b水平不受此處理影響，而LFA-1及NLDC-145之相對表現則加強。

由碘化丙錠及錐藍染色可證實細胞的完整性。接下來顯示DC上由BPD及光造成的MHCI類及ICAM-1表現之減少可在1小時內測及，4小時後達到最高點，並持續最少48小時。由DC反向調控之受體快速的同步本質中建議，這些細胞之光動力學處理可能會完全一重排

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂 線

細胞骨架，此可能可代表 B P D 及可見光干涉免疫反應性之細胞機制。

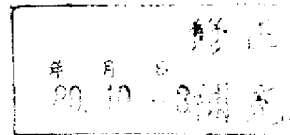
對於精藝者很清楚地，只要不偏離以下申請專利範圍，此中揭示之主題可有修飾及／或變化。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

定

訂

線



六、申請專利範圍

附件 (A) :

第 85101405 號 專利 申請 案

中文 申請 專利 範圍 修正 本

民國 89 年 10 月 修正

1 . 一種 減少 同種 移植 排斥 之藥學 組成 物，此 移植 物 中 包括 含有 抗原 呈現 細胞 (A P C ' s) 之 供者 組織，該 組成 物 包括：

a . 與 供者 組織 接觸 之光敏 化劑，以 得到 經修飾 之 供者 組織；及

b . 藥學 上可 接受 之賦形 劑；

其中 該經 修飾 之 供者 組織 曝於 波長 350 至 1200 nm 可為 該光 敏化 劑吸收 之光 下達 充份 之時間，以 耗盡 供者 組織 中之 A P C ' s，且 該 A P C 已耗 盡之 供者 組織 再移植 至受者 組織 內。

2 . 如 申請 專利 範圍 第 1 項 之組成 物，其中 供者 組織 是 皮膚 組織 或 胰臟 蘭氏 小島。

3 . 如 申請 專利 範圍 第 1 項 之組成 物，其中 該光 敏化 劑是 苯並 卟啉 衍生物 (B P D)。

4 . 如 申請 專利 範圍 第 1 項 之組成 物，其中 該光 線至 少 某些 波長 係在 電磁 光譜 可見 光部份。

5 . 如 申請 專利 範圍 第 1 項 之組成 物，其中 該光 敏化 劑呈 溶液 型式，濃度 在由 0 . 25 至 1 . 0 微克 / 毫升 之間。

6 . 如 申請 專利 範圍 第 1 項 之組成 物，其中 於該 曝露

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

本

訂

六、申請專利範圍

中，該經修飾之供者組織係懸浮在電解質溶液中。

7. 如申請專利範圍第1項之組成物，其中該光之劑量在曝光中為約10 J / 公分²。

8. 如申請專利範圍第1項之組成物，其中該光敏化劑係呈包括有標的一特異之組份之共軛物型式。

9. 如申請專利範圍第8項之組成物，其中該標的特異之作用物包括可與APC^s特異結合之作用物。

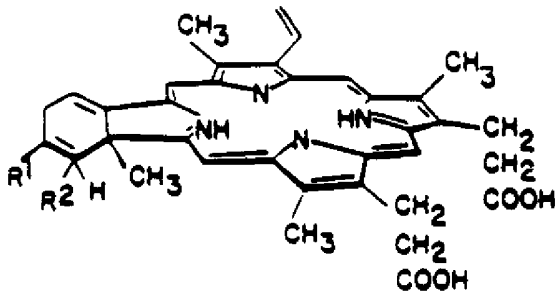
10. 如申請專利範圍第8項之組成物，其中該標的特異之作用物為抗體，其片段，或針對APC^s表面上受體之受體配體

11. 如申請專利範圍第8項之組成物，其中該標的特異之作用物包括可與標幟結合之作用物，其依序再與APC^s特異地結合。

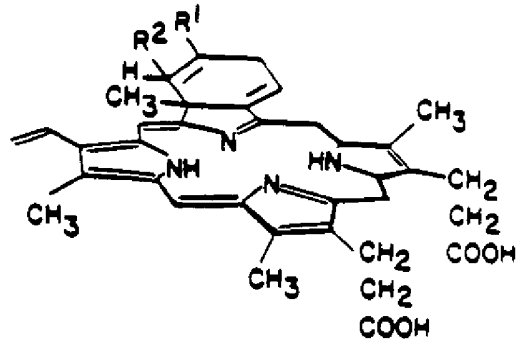
(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

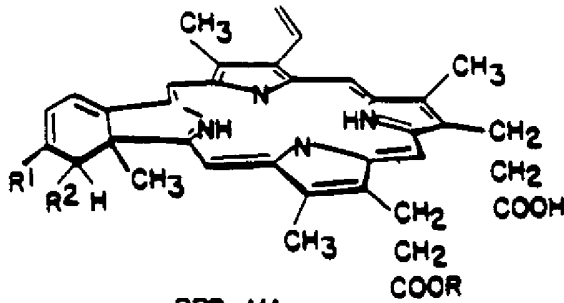
訂



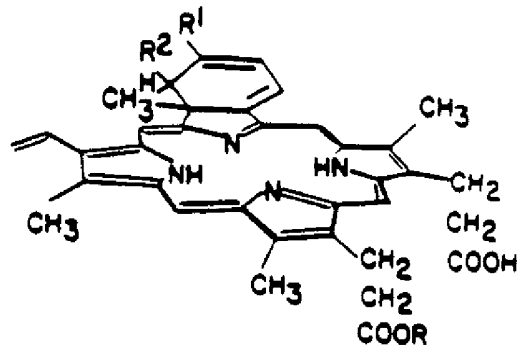
BPD-DA
第1-1圖



BPD-DB
第1-2圖



BPD-MA
第1-3圖



BPD-MB
第1-4圖

申請日期	85 年 2 月 5 日
案 號	85101405
類 別	A 61 k $\frac{35}{12}$, $\frac{39}{00}$, $\frac{35}{36}$, $\frac{35}{39}$

修正
86年1月13日
補充

公告本

426518

(以上各欄由本局填註)

發 明 專 利 說 明 書

一、發明 名稱	中 文	含有光敏化劑以預防移植物排斥反應的藥學組成物
	英 文	Pharmaceutical compositions for preventing transplant rejection comprising a photosensitizing agent
二、發明 人 創作	姓 名	(1) 朱利亞·李維 Levy, Julia (2) 墨迪圖斯·奧柏奇 Obochi, Modestus Onuora Kay
	國 籍	(1) 加拿大 (2) 加拿大
	住、居所	(1) 加拿大英屬哥倫比亞省溫哥華潘尼法辛路六〇 一一一四九〇號 #601-1490 Pennyfarthing Dr., Vancouver, B.C., Canada V6J 4Z3 (2) 加拿大英屬哥倫比亞省溫哥華史帕葛雷斯廣場 二一二一一八六九號 #212-1869 Spyglass Place, Vancouver, B.C., Canada V5Z 4K7
	三、申請人	姓 名 (名稱)
	國 籍	(1) 加拿大 (2) 加拿大
	住、居所 (事務所)	(1) 加拿大溫哥華·第六大道西五二〇號 520 West 6th Avenue, Vancouver, BC V5Z 4H5, Canada (2) 加拿大英屬哥倫比亞省溫哥華健康科學廣場二 一九四號 I R C 3 3 1 IRC 331, 2194 Health Sciences Mall, Vancouver, B.C., Canada V6T 1W5
	代 表 人 姓 名	(1) 大衛·道菲 Dolphin, David (2) 威廉·柏恩 Palm, William N.

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

附件一：第85101405號專利申請案

中文補充實施例

實例 1製備 B P D - R a - M I g 共軛物

示於圖 1 的光敏化劑，苯並咪啉衍生物單酸環 A (B P D - M A) 於暗處以磷酸鹽緩衝的食鹽水由濃度，毫克 / 毫升稀釋至 200 微微克 / 毫升，並與已知量的大鼠抗一老鼠 J g (R a M I g) 混合，其得自 Cedar Lane Laboratories 或是經由老鼠免疫球蛋白免疫於兔子而製備並在免疫吸收管柱上純化。混合物在室溫下之暗處培育 1 小時，且生成的共軛物經由對分子量少於 12 - 14 k d 之分子可通透的膜，對 3 升的 P B S 於 4 °C 下透析一夜。以經標記的 B P D - M A 進行的模式顯示所保留的共軛物具有 10 - 20 的 B P D : A b 比例。之後再將透析所得的滯留物冷凍，冷凍乾燥，並貯於暗處。

實例 2以共軛物處理同種移植組織

如下自大鼠中分離供者之胰臟蘭氏小島組織：

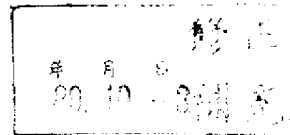
公的 S D 大鼠 (200 - 250 克) 以腹膜內尿烷 (100 毫克 / 公斤) 麻醉，並經由中線剖腹術，以兩側氣

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線



六、申請專利範圍

附件 (A) :

第 85101405 號 專利 申請 案

中文 申請 專利 範圍 修正 本

民國 89 年 10 月 修正

1 . 一種 減少 同種 移植 排斥 之 藥學 組成 物 , 此 移植物 中 包括 含有 抗原 呈現 細胞 (A P C ' s) 之 供者 組織 , 該 組成 物 包括 :

a . 與 供者 組織 接觸 之 光敏 化劑 , 以 得到 經 修飾 之 供者 組織 ; 及

b . 藥學 上 可 接受 之 賦形 劑 ;

其中 該 經 修飾 之 供者 組織 曝於 波長 350 至 1200 nm 可為 該 光敏 化劑 吸收 之 光 下 達 充份 之 時間 , 以 耗盡 供者 組織 中之 A P C ' s , 且 該 A P C 已 耗盡 之 供者 組織 再 移植 至 受者 組織 內 .

2 . 如 申請 專利 範圍 第 1 項 之 組成 物 , 其中 供者 組織 是 皮膚 組織 或 胰臟 蘭氏 小島 .

3 . 如 申請 專利 範圍 第 1 項 之 組成 物 , 其中 該 光敏 化劑 是 苯並 卟啉 衍生物 (B P D) .

4 . 如 申請 專利 範圍 第 1 項 之 組成 物 , 其中 該 光線 至少 某些 波長 係在 電磁 光譜 可見 光 部份 .

5 . 如 申請 專利 範圍 第 1 項 之 組成 物 , 其中 該 光敏 化劑 呈 溶液 型式 , 濃度 在 由 0 . 25 至 1 . 0 微克 / 毫升 之間 .

6 . 如 申請 專利 範圍 第 1 項 之 組成 物 , 其中 於 該 曝露

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂