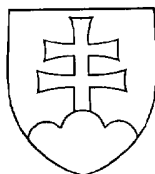


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

279 949

- (21) Číslo prihlášky: **988-91**
(22) Dátum podania: **09.04.91**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **9007971.6**
(32) Dátum priority: **09.04.90**
(33) Krajina priority: **GB**
(40) Dátum zverejnenia: **17.12.91**
(45) Dátum zverejnenia udelenia vo Vestníku: **11.06.99**
(86) Číslo PCT:

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl⁶:

A 61K 38/00

A 61K 39/395

A 61K 35/58

(73) Majiteľ patentu: Imutran Limited, London, GB;

(72) Pôvodca vynálezu: White David James Graham, Harston, Cambridge, GB;
Van de Bogaerde Johan Beyers, Harrow-on-the-Hill, Middlesex, GB;

(54) Názov vynálezu: **Použitie inhibítora komplementu a imunosupresora s cyklosporínu A podobnou aktivitou na prípravu činidla na ochranu pred rejekciou transplantátu**

(57) Anotácia:
Cyklosporín A alebo iná zlúčenina s aktivitou podobnou cyklosporínu A a faktor kobriejho jedu alebo iný inhibítor komplementu môžu byť spoločne použité na podporu prežitia alotransplantátov alebo súhlasných xenotransplantátov a zabránenie rejekcii takých transplantátov.

Oblasť techniky

Vynález sa týka farmaceutických prípravkov, vhodných na liečbu chronických odhojovaní alotransplantátov a odhojovaní súhlasných xenotransplantátov. Vynález sa preto týka napomáhaniu prežitia alebo straty transplantátu u hostiteľa.

Doterajší stav techniky

Alotransplantácia je transplantácia tkanív medzi dvomi členmi rovnakého druhu. Xenotransplantácia, ktorá je transplantáciou tkaniva medzi dvomi rôznymi druhmi, boli podľa biologických kritérií rozdelené do dvoch podskupín (Calne, Transplant. Proc. II 550 - 556 (1970)). Tieto dve podskupiny sú súhlasné xenotransplantáty a nesúhlasné xenotransplantáty. Rozdiel medzi týmito dvomi podskupinami je v tom, že vaskularizovaný transplantovaný orgán, ktorý je transplantovaný medzi nesúhlasnými druhmi, je hyperakútne odmietnutý, to znamená v niekoľkých minútach alebo hodinách po revaskularizácii. Medzi súhlasnými druhmi nemá hyperakútna reakcia xenotransplantátov miesto. Transplantáty budú však odmietnuté, a často akcelerovaným spôsobom, ale toto sa stane po niekoľkých dňoch, nie po hodinách alebo minútach.

Všeobecne sa predpokladá, hoci formálne dôkazy chýbajú, že medzi nesúhlasnými rodmi je hyperakútna reakcia dôsledkom pôsobenia prirodzene sa vyskytujúcich protilátok proti druhom darcu. Na druhej strane, súhlasné transplantáty prežívajú aspoň krátky čas, pretože takéto protilátky, schopné spôsobiť ich deštrukciu, nie sú prítomné. V literatúre je veľa príkladov dokladajúcich tento rozdiel. Snáď najelegantnejšie sú príklady od Hammera (v "Xenograft 25" (Mark A. Hardy, vyd. Elsevier, Amsterdam 1989)). S použitím vždy psa ako druhu príjemcu Hammer uvádza, že časy prežitia obličkových transplantátov sú nasledujúce:

pes – pes	11,4 dňa
dingo – pes	11,5 dňa
vlk – pes	19,4 dňa
liška – pes	6,5 dňa
lev – pes	10 – 24 hodín
tiger – pes	10 – 24 hodín
mačka – pes	10 – 24 hodín
prasa – pes	10 – 30 minút

Posledné štyri interakcie sú na báze nesúhlasných xenotransplantátov, zatiaľ čo prvé štyri xenotransplantáty by mali byť súhlasné. Hammer hodnotil tieto rozdiely medzi súhlasnými a nesúhlasnými xenotransplantátmi vzhľadom na prítomnosť alebo neprítomnosť skrížených hemaglutinačných protilátok.

Z akademického hľadiska sú určité ťažkosti s tým, ako definovať vzťahy súhlasných a nesúhlasných druhov. Z praktického hľadiska, na účely predkladaného vynálezu, sú dva rozdielne druhy hodnotené ako súhlasné, ak nie je žiadna hyperakútna reakcia xenotransplantátu od jedného do druhého. Na účely predkladaného vynálezu sú preto druhy súhlasné, ak - i keď môžu normálne vykazovať hyperakútnu reakciu - môžu byť podrobené určitému postupu, napríklad genetickej manipulácii tak, že sa zabráni hyperakútnej reakcii. Medzinárodná patentová prihláška PCT/GB90/01575 sa napr. týka v špecifických spôsoboch

realizácie potenciálnych zvieracích darcov xenotransplantátov, ktorí boli transgeneticky modifikovaní tak, aby exprimovali "down" regulátory komplementu príjemcu (ako je rozklad urýchľujúci faktor (DAF) alebo membránový ko-faktorový proteín (MCP)). Orgány od zvieracieho darcu nie sú hyperakútne rejektované, ak sú transplantované zvieratú, ktoré by bolo inak označené ako nesúhlasný druh. Na účely tohto vynálezu môžu preto byť takito transgénni zvierací darcovia označení ako súhlasní vzhľadom na zamýšľaný cieľový druh.

Príklady druhov, ktoré by mali súhlasný vzťah, ako je definovaný, zahŕňajú zajac - králik, škrečok - krysa a nehumánny primát - človek, napríklad pavián - človek, šimpanz - človek a makak - človek.

Podporenie prežitia transplantátu bolo dosiahnuté v oblasti xenotransplantátov (nesúhlasných a súhlasných) a alotransplantátov. Prvé práce, ktoré boli vykonané na podporu prežitia nesúhlasných xenotransplantátov, Adachi et al., (Transplant. Proc. XIX (1) 1145 - 1138 (1987)), študovali prežitie nesúhlasných srdcových xenotransplantátov na krysách. Z potenciálnych promótorov prežitia boli študované cyklosporín A, aspirín a faktora kobrieheho jedu. Navyše bola študovaná kombinácia cyklosporínu A a faktora kobrieheho jedu. Adachi et al. uvádzajú, že v "našej štúdii nebol štatisticky významný rozdiel medzi priemerným časom prežitia medzi skupinou liečenou cyklosporínom A a faktorom kobrieheho jedu, a faktorom kobrieheho jedu samým". Priemerný čas prežitia bol medzi 40 a 50 hodinami. Kemp et al. (Transplant. Proc. XIX (6) 4471 - 4474 (1987)) tiež študoval rôzne potenciálne promótor prežitia nesúhlasných xenotransplantátov v štúdii xenotransplantátov kráľičej obličky na mačkách. Kandidáti promótorov prežitia zahŕňajú kaptopril, enalapril, nifedipín, prostacyklín, chromoglykát sodný, kombináciu azatioprin/kortikosteroid, cyklosporín A a faktor kobrieheho jedu. Hyperakútnej reakcii nebolo zabránené žiadnym z týchto liečiv okrem faktora kobrieheho jedu, ktorý, podľa autorov "mal prekvapujúci účinok s predĺžením prežitia transplantátu až do siedmich dní".

Rejekciu súhlasných xenotransplantátov študoval Hardy et al., (Transplantation 33 (3) 237 - 242 (1982)), ktorý skúmal efekt selektívneho ožiarovania lymfatického tkaniva (SLI) palladiom - 109 - hematoporfyrínom kombinovaným s antilymfocytárnym globulínom terapiou, ktorá je primárne namierená proti T-bunkami sprostredkovanej reakcii. Priemerný čas prežitia bol v tomto prípade 12,5 dňa v porovnaní s priemernou 2,9 dňami pri neošetrenej kontrole. Homan et al., (Transplantation 31 (3) 164 - 166 (1981)), študoval efekt cyklosporínu A v podpore prežitia súhlasného xenotransplantátu. Najlepšie prežitie transplantátu bolo 21 dní v porovnaní s 2 dňami pri neošetrených kontrolách. Monden et al., (Transplantation 43 (5) 745 - 746 (1987)), študoval pečenné xenotransplantáty od škrečka do krysy a zistil, že cyklosporín A nemá žiadny významný podporný efekt na prežití transplantátu v porovnaní s neošetrenou kontrolou. Valdevere et al., (Transplant. Proc. XIX (1) 1158 - 1159 (1987)), tiež študoval pečenné xenotransplantáty od škrečka do krysy a zistil významné zlepšenie v čase prežitia transplantátu v porovnaní s kontrolami, pokiaľ bol cyklosporín A podaný spoločne so splenektómiou; prežitie bolo zlepšené z priemerného 3,6 dní na priemerné 17,6 dní. Knechtel et al., (Transplant. Proc. XIX (1) 1137 - 1139 (1987)), rovnako ako Hardy et al., študoval vplyv totálneho ožiarovania lymfatického tkaniva (TLI), ale v tomto prípade

v spojení s terapiou cyklosporínom A na podporu prežitia súhlasného xenotransplantátu. Uvádajú, že v prípade kardiálnych xenotransplantátov škrečok - krysa cyklosporín A vo vysokých dávkach signifikantne predlžoval prežitie, ale len náhodný príjemca mal dlhodobú funkciu transplantátu. TLI v kombinácii s cyklosporínom A signifikantne ďalej podporovalo prežitie transplantátu.

Bežnou terapiou proti rejekcii alotransplantátu je použitie cyklosporínu A buď samého, alebo v kombinácii so steroidmi alebo azatioprinom, alebo oboma týmito látkami. Podľa niektorých názorov kombinácie trojitej terapie nepredstavuje zlepšenie oproti terapii cyklosporínom A samotným. Tieto terapie sú účinné v prevencii a zvrate akútnej rejekcie transplantátu a pravdepodobne spomaľujú nástup chronickej rejekcie transplantátu, ale zdá sa, že majú malý alebo žiadny vplyv na zvrat chronickej rejekcie po jej nástupe.

Knechtle et al., (Heart Transplantation & Immunology IV No 5: 541 - 545 (Sept/Oct 1985)), analyzoval vplyv cyklosporínu, totálneho ožiarenia lymfatického tkaniva a faktoru kobrieho jedu na hyperakútnej rejekcii kryš. Bolo zistené, že pridanie totálneho ožiarenia lymfatického tkaniva alebo cyklosporínu A k liečbe faktorom kobrieho jedu nevedlo k ďalšiemu prežitiu než faktor kobrieho jedu samostatne.

Podstata vynálezu

Predložený vynález sa snaží podporovať lepšie prežitie, alebo zabrániť rejekcii súhlasných xenotransplantátov a/alebo alotransplantátov. Vynález je založený na skutočnosti, že prežitie súhlasných xenotransplantátov a tiež prežitie alotransplantátov môžu byť značne predĺžené liečbou kombináciou cyklosporínu A a faktora kobrieho jedu alebo kombináciou zlúčenín, ktoré majú rovnaký spôsob pôsobenia.

V súlade s prvým aspektom predkladaného vynálezu je poskytnuté použitie inhibítora komplementu a imunosupresora s aktivitou podobnou cyklosporínu A v príprave činidla alebo činidiel na podporu prežitia alotransplantátu alebo súhlasného xenotransplantátu, alebo na zabránenie rejekcie; kde uvedené prežitie alotransplantátu alebo zabránenie rejekcie je vzťahované na alotransplantát, ktorý nie je hyperakútne rejektovaný.

Farmaceutické prípravky, ktoré môžu byť použité podľa vynálezu, majú preto aspoň dve zložky. Prvou zložkou je inhibítor komplementu. Inhibítor komplementu môže buď brániť aktivácii komplementu, alebo ho odstrániť, alebo depletovať jednu, alebo viac jeho zložiek. Výhodne bude inhibítor komplementu inhibovať tak klasickú, ako i alternatívnu dráhu aktivácie komplementu. Je preto preferované, aby inhibítor komplementu blokoval dráhu na úrovni C3, či už inhibíciou, alebo odstránením, alebo depĺciou. Je potrebné si uvedomiť, že protilátky (napríklad monoklonálne protilátky) proti C3 môžu byť použité ako inhibítor komplementu v predkladanom vynáleze. Iné využiteľné inhibítory komplementu zahŕňajú rozpustný rozklad aktivujúci faktor (DAF) a rozpustný membránový kofaktorový proteín (MCP). Jedným z najpreferovanejších inhibítorov komplementu je faktor kobrieho jedu.

Hadie jedy sú väčšinou komplexy živočíšnych sekrétov, obsahujúce obrovský počet zložiek s rozdielnymi far-

makologickými a biochemickými aktivitami. Prítomnosť zložiek v hadích jedoch, pôsobiach na komplement, je známa viac ako sto rokov. Pôsobenie kobrieho jedu (Naja naja kaouthia) na sérový komplement bolo detailne študované. Aktivačným faktorom je glykoproteín s molekulárnou hmotnosťou 144 kDa, ktorý sa spája s faktorom B séra za prítomnosti iónov horčika. Faktor B je potom štiepený na dva komponenty proteolytickým pôsobením faktora D séra, a vytvára tak Bb a Ba. Komplex CoF-Bb, kde CoF reprezentuje faktor kobrieho jedu, je vysoko aktívny C3- a C5-štiepiaci enzým alebo konvertáza. Akokoľvek, na rozdiel od normálnych C3- a C5- konvertáz, CoF-Bb je rezistentný proti normálnym regulačným systémom komplementu. Preto jeho pôsobenie pokračuje do času, kým nie je všetok C3 konvertovaný, čo účinne vyčerpá komplementovú aktivitu jedinca. Štiepenie C5 uvoľní C5a, ktorý má anafylaktoidné účinky; nie všetky Naja faktory kobrieho jedu majú túto aktivitu C5 konvertázy, ale to sa nezdá byť dôležité na účely tohto vynálezu. Inhibícia komplementu nie je obmedzená na jedy rodu Naja. Eggertsen et al., (Toxicon 18 87 - 96 (1980)), študovali hadie jedy rodov Elapidae Viperidae a Crotalidae. Z 26 študovaných jedov malo 22 schopnosť inhibovať aktivitu normálneho ľudského komplementu. Analýza štruktúry faktora kobrieho jedu napovedá, že je ekvivalentný kobriemu C3 alebo jeho čiastočne degradovnému produktu.

Faktor kobrieho jedu a faktory iných hadích jedov sa nebudú všeobecne podľa predpokladaného vynálezu podávať v ich prirodzenej forme, pretože sú zrejme problémy s ich toxicitou. Pretože chýbajú iné opatrenia pri zabránení vzniku problémov s toxicitou, bude nevyhnutné aspoň čiastočne purifikovať aktívny faktor zo surového jedu. Pri faktore kobrieho alebo iného hadieho jedu nie je nutná purifikácia do homogenity na použitie podľa predpokladaného vynálezu, ale zrejme regulačné problémy, ak nič iné, budú pri predpisovaní na použitie podstatne purifikovaného faktora. Faktor kobrieho jedu, ako semipurifikovaný prípravok, môže byť získaný od dodávateľov, ako je Sigma (Sigma Chemicals Limited, Poole, Dorset), ktorí môžu dodať surový kobrí jed na purifikáciu. Príklad prípravy faktora kobrieho jedu zo surového kobrieho jedu je uvedený v príkladoch.

Je potrebné si uvedomiť, že okrem použitia prirodzeného faktora kobrieho jedu a iných hadích jedov môžu byť v tomto vynáleze použité analógy týchto faktorov (vrátane aktívnych fragmentov), ako sú syntetické faktory vrátane tých, ktoré sú produkované rekombinantnou DNA technológiou.

Charakteristikou CoF, ktorá ho robí využiteľným v predkladanom vynáleze, je jeho schopnosť vytvárať stabilný komplex s faktorom Bb, ktorý je rezistentný od bežného mechanizmu regulácie. Iné molekuly majúce túto charakteristiku sú preto tiež preferované na použitie podľa vynálezu.

Druhou zložkou farmaceutického prípravku podľa predloženého vynálezu je imunosupresor s cyklosporínu A podobnou aktivitou. Také zlúčeniny sú odborníkom známe a zahŕňajú iné cyklosporíny ako cyklosporín A, ako je cyklosporín C a cyklosporín G. Eikosanoidy tiež majú cyklosporínu A podobnú aktivitu a zahŕňajú PGE₂, PGD₂, rapamycin a FK 506 (Fujisawa). Zlúčenina FK 506 je jednou z tých, ktoré sú preferované na použitie v predkladanom vynáleze, ale najviac preferovaný je cyklosporín

A samotný. Cyklosporín A je dostupný od firmy Sandoz pod značkou SANDIMUN.

Zvlášť výhodný spôsob realizácie predkladaného vynálezu používa farmaceutický prípravok, ktorý obsahuje faktor kobriejho jedu a cyklosporín A, dve z najviac preferovaných zmienených zlúčenín.

Je potrebné si uvedomiť, že iné zložky môžu byť prítomné vo farmaceutických prípravkoch na použitie podľa predkladaného vynálezu. Obvykle budú prítomné excipienty a prítomnosť iných aktívnych prísad nie je vylúčená. Môže byť prítomná viac ako jedna aktívna zložka.

Je potrebné si uvedomiť, že aktívne zložky nemusia byť nevyhnutne podávané spoločne v jednom prípravku. Produkt, obsahujúci inhibítor komplementu a imunosupresor s cyklosporínom A podobnou aktivitou, môže byť použitý ako kombinovaný prípravok na simultánne, separátne alebo sekvenčné použitie v podpore prežitia alotransplantátov alebo súhlasného xenotransplantátu alebo ochrany pred rejekciou.

Môže byť použitý kit, obsahujúci farmaceutický prípravok inhibítora komplementu a farmaceutický prípravok imunosupresoru s cyklosporínom A podobnou aktivitou.

Cyklosporín A a iné imunosupresory s cyklosporínom A podobnou aktivitou budú obvykle podávané v praktickom spôsobe realizácie parenterálne. V takom prípade musí byť prípravok obsahujúci imunosupresor sterilný. No cyklosporín A sám a niektoré iné imunosupresory môžu byť podané orálne a v tomto prípade nie je sterilita zásadná. Cyklosporín A samotný je len nepatrne rozpustný vo vode a na praktické účely je výhodné ho rozpustiť v oleji, ako v oleji rastlinnom. Prijateľný je v praxi olej olivový. Disolúcia v oleji je nevyhnutná, ak ide o imunosupresor, ktorý nie je rozpustný vo vode a všeobecne môže byť imunosupresor rozpustený v akomkoľvek fyziologicky prijateľnom nosiči. V niektorých prípadoch ani nie je disolúcia nevyhnutná. Koncentrácia, v ktorej bude imunosupresor pripravený, bude samozrejme závisieť od charakteru imunosupresora samotného a zamýšľanej dávky, ktorá sa vo všeobecnosti bude riadiť návodom lekára. Všeobecne bolo zistené, že bude vhodné pripraviť prípravky s koncentráciou cyklosporínu od 1 do 100 mg/ml, napríklad od 1 do 10 mg/ml, typicky asi 5 mg/ml na parentálne účely alebo od 25 do 100 mg/ml, napríklad od 50 do 100 mg/ml, typicky okolo 100 mg/ml na orálne podanie.

Inhibítory komplementu ako je faktor kobriejho jedu budú všeobecne podávané parentálne a na tento účel by mali byť sterilné. Samotný faktor kobriejho jedu môže byť formulovaný vo fosfátom pufrovanom salinickom roztoku (bez azidu) alebo v akomkoľvek vhodnom rozpúšťadle alebo nosiči. Môže byť vyvinutá orálna formulácia. Koncentrácia inhibítora komplementu vo farmaceutickom prípravku bude opäť závisieť od konečnej zamýšľanej dávky, ktorá by mala byť pod kontrolou lekára. Prípravok faktora kobriejho jedu môže mať koncentráciu v rozsahu od 0,05 mg/ml až do medze rozpustnosti, ktorá závisí od jeho čistoty. V praxi možno použiť prípravky, ktoré majú koncentráciu vyššiu ako 5 mg/ml, napríklad tie, ktoré majú koncentráciu od 0,1 do 2 mg/ml, napríklad okolo 0,5 mg/ml.

Pretože cyklosporín je prakticky nerozpustný vo vodnom médiu, zatiaľ čo faktor kobriejho jedu je, budú tieto dve preferované aktívne zložky všeobecne formulované oddelene a v praxi oddelene podané. Táto skutočnosť nie je zásadná, no je možné formulovať vhodnú emulziu dvoch

aktívnych zložiek a rôzne kombinácie aktívnych zložiek môžu byť rozpustené v bežnom rozpúšťadle alebo aspoň byť suspendované v bežnom nosiči.

Ak ide o parentálne injekcie, je výhodným miestom na injekciu sval, pretože depotný účinok vzniká v dôsledku intramuskulárnej injekcie. Za niektorých okolností môže byť však vhodná intravenózne injekcia a subkutánna injekcia môže mať niektoré, ak nie všetky výhody intramuskulárnej injekcie. Intraperitoneálne injekcie môžu byť použité podľa okolností.

Za viacerých okolností môže byť výhodné vopred podať niektoré alebo všetky aktívne zložky podľa vynálezu pred chirurgickým prenesením transplantátu. Malo by byť tiež spomenuté, že primárnou výhodou predkladaného vynálezu vo vzťahu k alotransplantátom je to, že kombinácia aktívnych zložiek podľa vynálezu môže byť užitočná na zabránenie chronickej rejekcie alebo na zvládnutie chronickej rejekcie (t. j. obrane pred rejekciou) po jej nástupe; toto sa zvyčajne prihodí po viacerých rokoch po transplantácii.

Prijemca transplantátu, ktorý trpí chronicou rejekciou transplantátu alebo rizikom chronickej rejekcie transplantátu, môže dostať imunosupresiu cyklosporínom A alebo iným imunosupresorom, ktorý má podobnú aktivitu ako cyklosporín. Na účely tohto vynálezu s cieľom liečiť alebo zabrániť rejekcii transplantátu u takéhoto pacienta je nevyhnutné pridať terapiu inhibítorom komplementu. V súlade s jedným aspektom vynálezu je tu poskytnuté použitie inhibítora komplementu v príprave agens na podporu prežitia alotransplantátu alebo súhlasného xenotransplantátu, alebo obranu takéhoto transplantátu od rejekcie, u prijemcu transplantátu liečeného imunosupresorom s aktivitou podobnou cyklosporínu A. Vynález má preto uplatnenie v metóde podpory prežitia alotransplantátu alebo súhlasného xenotransplantátu a/alebo obrane takéhoto transplantátu pred rejekciou u hostiteľa, v metóde podania inhibítora komplementu prijemcu transplantátu alebo zamýšľanému prijemcovi transplantátu, ktorý je liečený imunosupresorom s aktivitou podobnou cyklosporínu.

Imunosupresor s aktivitou podobnou cyklosporínu môže byť podaný v akejkoľvek vhodnej účinnej, ale netoxickej hladine, s prihliadnutím na liečené druhy a transplantované orgány. Horná hranica tolerancie cyklosporínu A u človeka je daná jeho nefrotoxicitou a vekom prijemcu. 20 mg/kg môže byť bezpečnou hornou účinnou hranicou na liečbu ľudí v mnohých prípadoch, hoci iné druhy môžu mať vyššiu toleranciu. Cyklosporín A je účinný v nižších dávkach a tak najnižšie množstvo, ktoré môže byť podané, bude jednoducho najnižšie množstvo, ktoré dáva účinnú odozvu. Množstvo 1 alebo 2 mg/kg bolo v niektorých prípadoch dokázané ako účinné. Všeobecne môže byť podané medzi 5 až 10 mg/kg a deň. Ak je podanie parentálne, môže byť cyklosporín A podaný ob deň a v takomto prípade bude dávka dvojnásobná. Na preferované orálne podanie bude však režimom voľby denné podanie; presnejšie môže byť cyklosporín A podávaný dvakrát alebo viackrát za deň do celkovej dennej dávky 5 až 10 mg/kg. Iné imunosupresory s aktivitou podobnou cyklosporínu A budú podávané v efektívnej, ale netoxickej dávke, ako bude určené lekárom.

Inhibítor komplementu, ako je faktor kobriejho jedu, bude vo všeobecnosti podávaný v množstve, ktoré efektívne inhibuje aktivitu komplementu, ako je určené skúškou

komplementovej hemolýzy₅₀ (CH₅₀). Bezpečná horná hranica podania faktora kobriehe jedu nebola určená, ale dávka 2 mg/kg sa zdá byť netoxickou. Minimálna dávka kobriehe jedu závisí od druhu a môže byť ľahko určená CH₅₀ skúškou. Denné dávky medzi 0,01 a 0,1 alebo 0,2 mg/kg boli stanovené ako účinné pre faktor kobriehe jedu. Efektívne a netoxické dávky iných inhibítorov komplementu môžu byť ľahko určené odborníkmi, napríklad CH₅₀ skúškou.

Faktor kobriehe jedu potrebuje asi 6 hodín na začiatok aktivity po intramuskulárnom podaní. Akonáhle je pozorovaná počiatočná aktivita, môže trvať dlhšie ako deň, napríklad 2 dni, a preto nie je nevyhnutné denné podanie faktora kobriehe jedu. Z tohto hľadiska je preferované podanie faktora kobriehe jedu ob deň, a v tomto prípade budú preferované spomenuté denné dávky zdvojnásobené v deň podania. V praxi bolo zistené, že zvlášť výhodný režim zahŕňa podanie 0,4 mg/kg intramuskulárne ob deň.

Podanie cyklosporínu A alebo iného imunosupresora bude obvykle kontinuálne. Podanie faktora kobriehe jedu alebo iného inhibítora komplementu nemusí byť vo všeobecnosti kontinuálne, ale môže byť prolongované; i keď to nie je pre praktickú realizáciu podstatné, krátkodobá terapia môže byť všade tam, kde je potreba liečby alebo obrany pred reakciou súhlasného xenotransplantátu.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Vynález bude teraz ilustrovaný odkazmi na nasledujúcu prípravu a príklady. Príklady sa vzťahujú na pripojené obrázky, v ktorých:

obrázok 1 je grafom prežitia xenotransplantátov škrečkových srdc v krysiach, percentá prežitia sú nanesené oproti dňom po transplantácii; a

obrázok 2 je grafom prežitia xenotransplantátov škrečkových srdc v cyklofosfamidom liečených krysiach; graf inak zodpovedá obrázku 1.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Táto príprava uvádza protokol na prípravu faktora kobriehe jedu zo surového kobriehe jedu.

1 g jedu Naja naja kaouthia (Sigma, produkt č. V-9125, šarža č. 116F-0398 a 58F-0565) bol rozpustený v 60 ml odplyného fosfátového pufru (0,01 M) pri pH 7,5 a načerpaný na 90 cm x 26 mm (vnútorný priemer) kolónu DEAE celulózy (DE 52, Whatman) a ekvilibrované rovnakým pufrom. Kolóna potom bola eluovaná 43,0 ml za hodinu s východiskovým pufrom, pokiaľ sa A₂₈₀ absorbancia eluentu nevráti na 0. Lineárne 3 litre: 3 litrový gradient východiskového pufru a limitného pufru (0,01 M fosfát sodný, pH 7,5, obsahujúci 0,5 M chloridu sodného) potom bol čerpaný rýchlosťou 40 ml za hodinu a boli odoberané frakcie 7,0 ml. Frakcie boli testované na antikomplementaritu a pozitívne frakcie boli spojené a zahustené na CX-10 ultrafiltrach.

Celý pool faktora kobriehe jedu bol čerpaný na 90 cm x 26 mm (vnútorný priemer) kolónu Sephadexu G200 (jemný) (Pharmacia GB Limited, Londýn), ekvilibrovaný PBS (bez azidu) a eluovaný PBS rýchlosťou 36 ml za hodinu. 6 ml frakcie bolo zhromaždených a skúšaných na anti-

komplementárnu aktivitu. Frakcie faktora kobriehe jedu (t. j. aktívne frakcie) boli spojené, zvlášť na zostupnej vrstve píku, zahustené na CX-10 ultrafiltrach, rozdelené do častí a tieto boli zmrazené na -20 °C a pripravené na použitie.

Uvedená antikomplementárna aktivita kobriehe jedu môže byť meraná nasledujúcim spôsobom. 20 µl frakcie sa inkubuje s 20 µl čerstvého ľudského séra počas 20 minút pri 37 °C. Do zberných nádrží testovacej doštičky sa potom pridajú 5 µl podiely. Doštička je vyrobená z:

5,0 ml 2 % vodnej agarózy

4,5 ml dvakrát zosilneného PBS obsahujúceho 20 mM EDTA

0,5 ml 10 % premytých erytrocytov morčat'a a

0,5 ml čerstvého normálneho ľudského séra

Doštička potom bola inkubovaná cez noc pri +4 °C. Pozitívne sa prejavujú jasnými zónami lýzy po inkubácii.

Príklad 1 (porovnávací príklad)

V tomto príklade sú krysy DA krysami od Banting a Kingdom a škrečky sú sýrske škrečky tiež od Banting a Kingdom. Metódou podľa Herona (Acta Pathol. Microbiol. Scand. 79: 366-372, (1971) boli srdcia škrečkov transplantované do krkov krysi. Aorta bola pripojená ku karotíde s použitím techniky opisanej Heronom. Podobne bola pulmonálna artéria pripojená na jugulárnu venu. Všetky ostatné srdcové cievy boli podviazané. Srdcia začali biť niekoľko minút po odstránení svoriek. Koža nad implantovaným srdcom bola zošitá a srdce bolo denne sledované vonkajšou palpáciou.

Dáta prežitia srdcových transplantátov sú ukázané na obrázku 1 a sú reprezentované krivkou 1. Je zreteľné, že priemerný čas prežitia transplantátov bol 3 dni.

Príklad 2 (porovnávací príklad)

Bol opakovaný postup z príkladu 1 s tým rozdielom, že bol podaný cyklosporín A v dávke 20 mg/kg ob deň. Cyklosporín A bol podaný ako prípravok 20 mg/kg v olivovom oleji a bol injikovaný intramuskulárne s tým, že prvá dávka bola podaná v čase transplantácie. Injekcie boli potom podávané ob deň. Dáta prežitia srdcových transplantátov sú ukázané na obrázku 1: krivka 2 ukazuje výsledky z tohto príkladu. Stredná hodnota prežitia transplantátu je 3 dni.

Príklad 3 (porovnávací príklad)

Opakuje sa postup z príkladu 1 s tým rozdielom, že bol ob deň podávaný faktor kobriehe jedu v dávke 0,4 mg/kg. Faktor kobriehe jedu bol podávaný ako roztok s koncentráciou 0,5 mg/ml v PBS bez azidu. Prvá injekcia bola podaná intramuskulárne v čase transplantácie, a nasledujúce intramuskulárne injekcie boli potom podávané ob deň. Dáta rejekcie transplantátu sú opäť uvedené na obrázku 1. Výsledky sú znázomené krivkou 3, ktorá ukazuje, že stredný čas prežitia transplantátu je 6 dní.

Príklad 4

Opakuje sa postup príkladu 1 s tým rozdielom, že príjemcovi bol podaný tak cyklosporín A, ako aj faktor kobriehe jedu. Cyklosporín A bol podaný v dávke 20 mg/kg ob deň, takže podmienky podania cyklosporínu sú rovnaké ako v príklade 2. Faktor kobriehe jedu bol podaný za rovnakých podmienok ako v príklade 3. Tak faktor kobriehe jedu, ako cyklosporín A boli prvýkrát podané počas transplantácie. Dáta prežitia transplantátov sú opäť ukázané na

obrázku. V tomto príklade nebola pozorovaná žiadna rejekcia transplantátu, ako je zrejme z krivky 4 obrázku 1. Prežitie transplantátu je v priemere vyššie ako 50 dní.

Príklad 5

Opakuje sa postup z príkladu 4 s tým rozdielom, že podávanie faktora kobriehe jedu bolo prerušené po 28 dňoch po transplantácii. Priemerné prežitie transplantátu bolo väčšie ako 100 dní. Dve zvieratá boli usmrtené 103. a 105. deň a histologické vyšetrenie transplantátov preukázalo normálnu srdcovú stavbu. Zvyšné krysy s funkčným srdcom škrečka prežili viac ako 5 mesiacov.

Príklad 6 (porovnávaci príklad)

20 krys dostalo škrečkove srdce podľa protokolu príkladu 1. Boli ošetrované cyklosporínom A ako je opísané v príklade 2 a navyše im bol podaný ENDOXAN cyklofosfamid i. p. (20 mg/kg) deň pred transplantáciou (deň - 1) a deň 2 po transplantácii. (Výraz ENDOXAN je ochranná známka cyklofosfamidu, ktorý je inhibítorom produkcie protilátok). Srdcia škrečkov boli rejektované, ako ukazuje krivka 5 na obr. 2. Pozorovaná oddialená rejekcia, v ktorej bolo oddialenie výsledkom krátkej terapie cyklofosfamidom, simuluje oddialenú rejekciu xenotransplantátu, zodpovedajúcu neadekvátnym imunopresívnym protokolom.

Príklad 7

Päť krys bolo ošetrovaných ako v príklade 6, ale navyše boli krysy ošetrované ako v príklade 4 faktorom kobriehe jedu odo dňa 7. Ošetrovanie faktorom kobriehe jedu trvalo 14 dní. Všetky zvieratá boli ochránené pred rejekciou, ako je zrejme z krivky 6 obrázku 2.

7. Použitie podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, kde imunosupresorom s cyklosporínu podobnou aktivitou je cyklosporín alebo eikosanoid.

8. Použitie podľa nároku 7, kde imunosupresorom je cyklosporín A.

9. Použitie podľa nároku 7, kde imunosupresorom je FK 506.

10. Použitie podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, kde inhibítor komplementu a imunosupresor s cyklosporínu podobnou aktivitou sú na simultánne, separátne alebo sekvenčné podanie.

11. Použitie podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, kde inhibítor komplementu a imunosupresor s cyklosporínu podobnou aktivitou sú poskytnuté vo forme kitu.

1 výkres

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Použitie inhibítora komplementu a imunosupresoru s cyklosporínu A podobnou aktivitou na prípravu činidla alebo činidiel na podporu prežitia alotransplantátu, alebo súhlasného xenotransplantátu, alebo na ochranu pred rejekciou; kde uvedené prežitie alotransplantátu alebo ochrana pred rejekciou sa vzťahuje na alotransplantát, ktorý nie je hyperakútne rejektovaný.

2. Použitie inhibítora komplementu na prípravu činidla alebo činidiel na podporu prežitia alotransplantátu, alebo súhlasného xenotransplantátu, alebo ochrany pred rejekciou u príjemcu transplantátu liečeného imunosupresorom s cyklosporínu A podobnou aktivitou, kde sa uvedené prežitie alotransplantátu alebo ochrana pred rejekciou vzťahuje na alotransplantát, ktorý nie je hyperakútne rejektovaný.

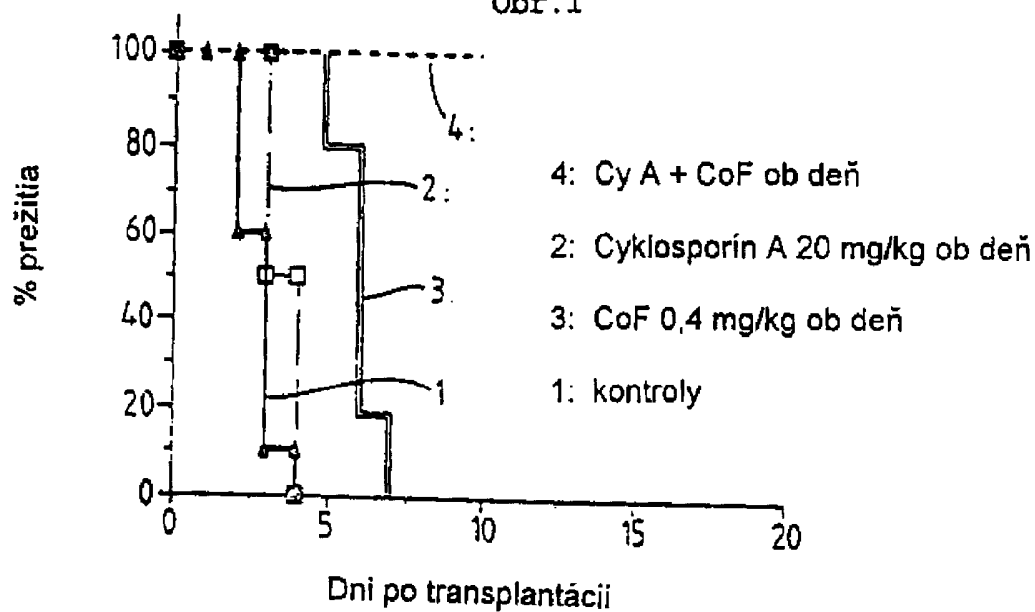
3. Použitie podľa nároku 1 alebo 2, kde inhibítor komplementu inhibuje tak klasickú, ako alternatívnu dráhu aktivácie komplementu.

4. Použitie podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, kde inhibítor komplementu zahŕňa MCP, DAF, alebo protilátku proti C3.

5. Použitie podľa nároku 1, alebo nároku 2, kde inhibítor komplementu zahŕňa molekulu, ktorá vytvára stabilný komplex s faktorom Bb, keď tento komplex je rezistentný proti normálnym regulačným mechanizmom.

6. Použitie podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 3, kde inhibítor komplementu zahŕňa faktor kobriehe jedu.

Obr. 1



Obr. 2

