

(11) *Número de Publicação:* **PT 100932 B**

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)
A61K038/00 A A61K038/21 B

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

<p>(22) <i>Data de depósito:</i> 1992.10.06</p> <p>(30) <i>Prioridade:</i> 1991.10.07 US 773382</p> <p>(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1993.10.29</p> <p>(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 04/99 1999.04.16</p>	<p>(73) <i>Titular(es):</i> GENENTECH, INC. 460 POINT SAN BRUNO BOULEVARD SOUTH S.FRANCISCO, CALIF.94080 US</p> <p>(72) <i>Inventor(es):</i> CHRISTINE CZARNECKI US</p> <p>(74) <i>Mandatário(s):</i> JORGE BARBOSA PEREIRA DA CRUZ RUA DE VÍTOR CORDON 10-A 3/AND. 1200 LISBOA PT</p>
--	--

(54) *Epígrafe:* UTILIZAÇÃO DE LINFOQUINAS ANTIMICROBIANAS, NOMEADAMENTE O INTERFERÃO GAMA, NA PREPARAÇÃO DE MEDICAMENTOS PARA O TRATAMENTO DE INFECÇÕES EM SUJEITOS RECEPTORES DE TRANSPLANTES

(57) *Resumo:*

LINFOQUINAS ANTIMICROBIANAS; INTERFERÃO GAMA; TRANSPLANTES;
FÁRMACO; LINFOQUINAS; IFN-GAMA; INFECÇÕES MICROBIANAS;
REJEIÇÕES DOS ENXERTOS

RESUMO

Este documento descreve a utilização de linfoquinas antimicrobianas, nomeadamente o interferão gama, na preparação de medicamentos para o tratamento de infecções em sujeitos receptores de transplantes.

A linfoquina antimicrobiana é administrada ao receptor de transplante antes ou durante o procedimento de transplante, para prevenir ou tratar infecções.

A linfoquina antimicrobiana é administrada ao receptor de transplante antes ou durante o procedimento de transplante, para prevenir ou tratar infecções.

A linfoquina antimicrobiana é administrada ao receptor de transplante antes ou durante o procedimento de transplante, para prevenir ou tratar infecções.



DIRECÇÃO DE SERVIÇOS DE PATENTES

CAMPO DAS CEBOLAS, 1100 LISBOA
TEL.: 888 51 51 / 2 / 3 TELEX: 18356 INPI
TELEFAX: 87 53 08

FOLHA DO RESUMO

Modalidade e n.º (11)	T D	Data do pedido: (22)	Classificação Internacional (51)
100932			
Requerente (71): GENENTECH, INC., norte-americana, industrial, com sede em 460 Point San Bruno Blvd., South San Francisco, CA 94080, Estados Unidos da América do Norte			
Inventores (72): CHRISTINE CZARNIECKI, residente nos Estados Unidos da América do Norte			
Reivindicação de prioridade(s) (30)			Figura (para interpretação do resumo)
Data do pedido	País de Origem	N.º de pedido	
07.10.91	E.U.A.	07/773,382	
Epigrafe: (54) "UTILIZAÇÃO DE LINFOQUINAS ANTIMICROBIANAS, NOMEADAMENTE O INTERFERÃO GAMA, NA PREPARAÇÃO DE MEDICAMENTOS PARA O TRATAMENTO DE INFECCÕES EM SUJEITOS RECEPTORES DE TRANSPLANTES"			
Resumo: (máx. 150 palavras) (57)			
<p>O presente invento diz genericamente respeito à utilização de linfoquinas antimicrobianas, e especificamente de interferão gama (IFN-gama), na preparação de um medicamento para a profilaxia e tratamento de infecções microbianas em sujeitos receptores de transplantes sem aumentar a incidência de rejeições dos enxertos.</p>			

NÃO PREENCHER AS ZONAS SOMBREADAS

Âmbito do invento

O presente invento diz genericamente respeito à prevenção e ao tratamento de infecções de origem microbiana em pacientes submetidos a transplantes. Mais em particular, o presente invento diz respeito à utilização de linfoquinas, e especificamente do gama interferon (IFN-gama), na profilaxia e no tratamento de infecções de origem microbiana em pacientes submetidos a transplantes sem que seja aumentada a incidência de rejeições dos mesmos.

Antecedentes do invento

É do amplo conhecimento clínico que as complicações devidas a infecções subsequentes a transplantes podem ter como consequência a rejeição do órgão ou tecido transplantado. Os pacientes submetidos a transplantes contraem infecções de origem microbiana no decurso da sua hospitalização ou sofrem de infecções atribuíveis a microrganismos já colonizadores do paciente no momento da sua admissão no hospital. As infecções de origem microbiana são consideradas o principal factor limitador do sucesso de um transplante. Isto sucede em especial por a imunossupressão requerida para evitar a rejeição do órgão ou tecido aumentar grandemente o sucesso do tratamento antimicrobiano convencional para debelar infecções em pacientes submetidos a transplantes [Rolston e outros, Hospital Formul., 1987, 22, 710; Glenn e outros, Rev. Infec. Dis., 1988, 10, 42; L. S. Young, J. Infec. Dis., 1983, 147, 611; Delgado e outros, South med. J., 1980, 73, 627; S. C. Schimpf, Current Concepts in Antibiotic Therapy for Febrile Episodes in Neutropenic Patients (Generalidades em terapia antibiótica para episódios febris em pacientes neutropénicos), pág. 7, Eli Lilly & Co., Indianapolis, IN, E.U.A., 1983].

Uma das vias possíveis para controlar as infecções de origem microbiana em pacientes submetidos a transplantes consistiria na utilização de modificadores da reacção biológica (imunomoduladores) para aumentar a reacção imunitária. Esta abordagem foi levada a cabo com sucesso em modelos animais de trauma/infecção não associados com transplantes mediante o tratamento com IFN-gama. Os roedores que foram submetidos a diversos modelos diferentes de trauma foram imunossuprimidos e revelaram uma taxa de mortalidade acrescida quando infectados com uma diversidade de bactérias. A profilaxia ou terapia dos roedores com gama interferon murino resultou numa maior taxa de sobrevivência em vários dos modelos [Hershman e outros, Microb. Pathogen., 1988, 4, 165; J. Interferon Res., 1988, 8, 367; Clin. Exp. Immunol., 1988, 73, 406 e Infec. Immun., 1988, 56, 2412; D. H. Livingstone e M. A. Malangoni, J. Surg. Res., 1988, 45, 37]. Contudo, existem fortes contra-indicações quanto à utilização do tratamento com IFN-gama para controlar infecções em pacientes submetidos a transplantes.

É sabido que as moléculas da membrana celular codificadas por genes do principal complexo de histocompatibilidade desempenham um papel essencial na interacção entre células do sistema imunitário e um órgão transplantado [E. Thorsby, Transplant Proc., 1987, 17, 29]. Especificamente, as moléculas do principal complexo de histocompatibilidade (PCH) de tecido transplantado possuem a capacidade de induzir fortes reacções imunitárias mediante a activação das células T dos sujeitos receptores. As moléculas da classe II do PCH parecem ser antigénios de transplantes particularmente fortes [Klempnauer e outros, Transplant Proc., 1985, 17, 1987]. Uma vez sabido que a imunomodulação por tratamento com IFN-gama inclui um acentuar da expressão dos antigénios da classe II do PCH [Interferons and the Immune System (Interferons e o sistema imunitário), ed. org. por J. Vilcek & DeMaeyer, Elsevier Scientific Publishers, B. V.,

Amsterdão, 1985], são pertinentes as reticências quanto à utilização do IFN-gama no tratamento de pacientes submetidos a transplantes. De facto, o IFN-gama (tal como a interleucina-2 (IL-2)) foi considerado implicado como importante mediador da rejeição de órgãos ou tecidos transplantados. Os anticorpos dos receptores de IFN-gama e de IL-2 revelaram evitar a rejeição dos órgãos ou tecidos transplantados em animais de laboratório [Landolfo e outros, Science, 1985, 220, 176; Rosenberg e outros, J. Immunol., 1990, 144, 4648; Kirkman e outros, Transplantation, 1985, 40, 719] e diversos estudos sugeriram que a produção de linfoquina, e em particular de IL-2, e de IFN-gama podem estar correlacionadas com episódios de rejeição em sujeitos receptores de transplantes [N. Yoshimura e B. D. Kahan, Transplantation, 1985, 40, 661]; H. Vie e outros, Kidney Int., 1985, 28, 553; K. Claesson e outros, Transplantation, 1984, 38, 32]. Woloszczuk e outros, J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 1986, 24, 729-34, observaram níveis elevados de IFN-gama no soro antes dos episódios de rejeição, quer directamente relacionados quer não relacionados com as infecções, e sugeriram poder esta observação proporcionar um métodos simples e fiável para monitorizar o estado imunitário dos sujeitos receptores de transplantes. A administração sistémica de interferon a sujeitos receptores de transplantes renais tinha sido associada a uma acrescida incidência de rejeições de órgãos [J. Kovarik e outros, Transplantation, 1988, 45, 402]. Concluiu-se ser este grave efeito adverso uma contraindicação para o uso de interferons no tratamento de pacientes submetidos a transplantes renais [Baron e outros, JAMA, 1991, 266, 1375].

Apesar do grau de participação das linfoquinas na rejeição de órgãos e tecidos transplantados, e em especial do mecanismo que rege o seu envolvimento, estarem longe de estar esclarecidos e de alguns estudos sobre fenómenos de rejeição subsequente a terapia com IFN-gama terem produzido resultados

contraditórios [R. M. McKeena e outros, Transplantation, 1988, 45, 76; Ijzermans e outros, Transplantation, 1989, 48, 1039; Rosenberg e outros, op. cit.; Kover e outros, Transplantation, 1990, 49, 148; K. Kover e W. V. Moore, Transplantation Proceedings, 1990, 22, 853-85], o potencial risco de uma acelerada rejeição do órgão ou tecido transplantado associada à administração de IFN-gama tem, até á data, levado os médicos a evitar a utilização de IFN-gama no tratamento de infecções em pacientes submetidos a transplantes.

As contraindicações no que diz respeito à administração de linfoquinas, e especificamente do IFN-gama, a pacientes submetidos a transplantes são ainda mais aparentes quando se tem em vista o nosso conhecimento do mecanismo de acção das ciclosporinas e dos corticoesteróides que são os imunossupressores mais vulgarmente utilizados em casos de transplante.

A acção imunossupressora das ciclosporinas em transplantes tem sido extensivamente estudada e é considerada como sendo principalmente devida à sua potente inibição da produção de linfoquina pelas células T. A ciclosporina A (CsA) revelou inibir a transcrição do mRNA do IFN-gama e da IL-2 in vitro [M. Kronke e outros, Proc. Natl. Acad. Sci. 1984, 81, 5214; Elliot e outros, Science, 1984, 226, 1439; Granelli-Piperno e outros, J. Exp. Med., 1986, 163, 922]. Diversos estudos revelaram um decréscimo da produção da interleucina-2 (IL-2) e do IFN-gama em sujeitos receptores de transplantes renais submetidos a um tratamento com ciclosporina A (CsA). Por exemplo, Yoshimura e outros, J. Clin. Immunol. (USA), 1989, 9, 322-328, examinaram o efeito in vivo da CsA administrada com um esteróide sobre a capacidade das células sanguíneas mononucleares periféricas (CSMP) de sujeitos receptores de transplantes renais para gerar citoquinas e a sua expressão genética a nível do mRNA. Descobriram que uma terapia

combinada de CsA e esteróide inibe a expressão genética tanto do IFN-gama como da IL-2.

Um segundo grupo importante de imunossuppressores é o grupo de corticoesteróides (glucocorticóides, GCC). Parece que os mais importantes mecanismos celulares gerais através dos quais exercem acções imunossupressoras podem ser os seus efeitos sobre a produção e acção de factores solúveis, tais como citocinas [Guyre e outros, "Glucocorticoids and the immune system: activation of glucocorticoid-receptor complexes in thymus cells; modulation of Fc receptors of phagocytic cells" (Glucocorticóides e o sistema imunitário: activação de complexos receptores de glucocorticóides em células do timo; modulação de receptores Fc de células fagocíticas) *in* Progress in Research and Clinical Applications of Corticosteroids (Progressos na investigação a aplicações clínicas de corticoesteróides), ed. org. por H.J. Lee e C. A. Walker, Heyden & Son, Philadelphia, 14-27, 1991]. Também foi relatado o bloqueamento da produção de IFN-gama por glucocorticóides [Guyre e outros, *J. Steroid Biochem*, 1981, 14, 35-39; A. Kelso e A. Munck, *J. Immun.*, 1984, 133, 784-791] equanto que diversos parâmetros da activação monocítica pelo IFN-gama ou não são afectados ou são acentuados [Girard e outros, *J. Immun.*, 1987, 138, 3235-3241]. Uma revisão do efeito dos glucocorticóides sobre a produção e acções das citocinas imunitárias é fornecida, por exemplo, por Guyre e outros, *J. Steroid Biochem.*, 1988, 30, 89-93.

Em resumo, apesar o mecanismo exacto do envolvimento das linfoquinas, e especialmente do IFN-gama, na rejeição de órgãos ou tecidos transplantados não estar ainda completamente esclarecido, os resultados experimentais publicados levantam sérias dúvidas quanto à aplicabilidade de linfoquinas, por exemplo da terapia com IFN-gama, na prevenção e combate de

infecções microbianas em pacientes submetidos a transplantes e parecem sugerir que os efeitos potencialmente negativos da administração exógena de linfoquinas são largamente superiores a qualquer benefício resultante desse tratamento de infecções microbianas.

Sumário do invento

O presente invento baseia-se na descoberta inesperada de que as linfoquinas, e especificamente o IFN-gama, podem ser usadas com sucesso na profilaxia e no tratamento de infecções de origem microbiana em pacientes submetidos a transplantes sob condições apropriadas sem que se verifique um aumento significativo no grau de incidência de episódios de rejeição. Os presentes inventores descobriram que, sob condições clínicas, quando na sequência da transplantação os sujeitos receptores dos transplantes são rotineiramente submetidos a um tratamento a longo prazo com doses "de manutenção" de ciclosporina, as infecções de origem microbiana podem ser controladas (evitadas ou tratadas) eficazmente mediante a administração de IFN-gama sem que se verifique o efeito potencialmente deletério do IFN-gama sobre a sobrevivência do órgão ou tecido transplantado.

Num dos seus aspectos, o presente invento diz respeito a um método para a profilaxia ou o tratamento de infecções de origem microbiana em sujeitos receptores de transplantes caracterizado por se administrar uma dose terapêuticamente eficaz de uma linfoquina antimicrobiana aos sujeitos receptores de transplantes após a realização do transplante sob condições tais que seja suprimida a acção da linfoquina conducente a uma acrescida rejeição do órgão ou tecido transplantado mantendo-se contudo a sua actividade microbiana. A linfoquina antimicrobiana pode ser, por exemplo, o IFN-gama, a IL-2 ou uma sua combinação. A

linfoquina antimicrobiana é administrada de preferência aos sujeitos receptores de transplantes submetidos a uma terapia imunossupressora de manutenção após a transplantação. A terapia imunossupressora de manutenção consiste, de preferência, na administração de um ou mais imunossupressores, tal como ciclosporina e/ou esteróides.

Num outro aspecto, o presente invento diz respeito a um método para evitar a rejeição de órgãos ou tecidos transplantados associada a infecções em sujeitos receptores de transplantes, caracterizado por se administrar uma dose terapêuticamente eficaz de IFN-gama aos sujeitos receptores de transplantes submetidos a uma terapia imunossupressora de manutenção após a transplantação.

Descrição pormenorizada do invento

O termo "linfoquina" é usado para designar produtos solúveis de células linfóides incluindo as proteínas segregadas pelas células T como resultado da activação através de antigénios ou lectinas. São exemplos de linfoquinas, entre outros, os interferons -alfa, -beta e -gama (IFN- α , IFN- β , IFN-gama), a interleucina-2 (IL-2), a interleucina-3 (IL-3), o factor alfa da necrose de tumores (FNT- α), os factores de estimulação de colónias (FEC-1, FEC-G ou FEC-GM), etc. O termo "antimicrobiana", quando referido a "actividade" torna-a abrangente das actividades antiviral, antibacteriana, antiparasítica e antifúngica. São representantes típicos de linfoquinas com actividade antimicrobiana o IFN- α , o IFN- β , o IFN-gama, a IL-2 e o FNT- α . A actividade antimicrobiana pode ser testada em modelos in vitro e in vivo estabelecidos. Os modelos in vitro típicos baseiam-se no teste da activação dos monócitos ou neutrófilos e incluem o modelo de eclosão oxidativa descrito no Exemplo 1 [ver também D. P. Clifford e J. E. Repine, Methods. Enzimol. 1984, 105, 393]. Os

modelos animais (por exemplo roedores e humanos não primatas) in vivo adequados a uma avaliação das actividades antiviral, antibacteriana, antiparasítica e antifúngica das linfoquinas, por exemplo dos interferons tal como o IFN-gama, são também do conhecimento dos técnicos especializados, e serão discutidos subsequentemente.

No âmbito do presente invento, "gama interferon", "interferon-gama" ou "IFN-gama" referem-se diversamente a todas as formas de interferons gama (humanos ou animais não humanos) com capacidade para activarem uma reacção imunitária contra uma infecção. Os termos precedentes incluem especificamente o IFN-gama sob as formas madura, pro, met ou des(1-3) (também designado por desCisTirCisIFN-gama), quer seja de origem natural, quimicamente sintetizado ou produzido mediante técnicas da tecnologia do ADN recombinante.

Na natureza a produção de IFN-gama é induzida nos linfócitos T através de antigénios estrangeiros a que as células T são sensíveis. Sob determinadas condições, os linfócitos assassinos naturais (AN) também podem produzir IFN-gama. A produção recombinante de IFN-gama foi relatada pela primeira vez por Gray, Goeddel e colaboradores [Gray e outros, Nature, 1982, 295, 503-508] e constitui o sujeito das patentes dos E.U.A. nº 4 929 544, nº 4 727 138 e nº 4 925 793. O IFN-gama recombinante de Gray e Goeddel, tal como foi produzido em E. coli, era constituído por 146 aminoácidos, começando a porção com o terminal N da molécula com a sequência CisTirCis. Descobriu-se posteriormente que o IFN-gama nativo (isto é, resultante da indução através de mitogénios dos linfócitos sanguíneos periféricos humanos e da subsequente purificação) é um polipeptídeo destituído do terminal N CisTirCis atribuído por Gray e outros, op.cit..

Os interferons animais não humanos, incluindo o interferon-gama, são revelados, por exemplo, na patente europeia nº 88 622 publicada em 14 de Setembro de 1983.

Os termos "gama interferon", "interferon-gama" ou "IFN-gama" abrangem formas diversamente glicosiladas e outras variantes e derivados destes interferons, quer conhecidas dos técnicos especializados quer apenas futuramente disponíveis. São exemplos destas variantes os aleles, e os produtos da mutagénese direccionada para locais em que os resíduos são eliminados, inseridos e/ou substituídos (ver por exemplo o pedido de patente nº 146 354 publicado em 26 de Junho de 1985).

A actividade antiviral dos interferons, e em particular do IFN-gama, foi demonstrada no que diz respeito a um grande número de vírus, em numerosos modelos in vitro e in vivo.

Neumann-Haefelin e outros, Med. Microbio. Immunol., 1985, 174, 81, descobriram que o IFN-gama recombinante humano (rHuIFN-gama) evitava a queratite provocada pelo Herpes simplex (HS) nos macacos verdes africanos.

Van der Meide e outros, Antiviral Reserch, Suppl. 1, 1985, 199, compararam os efeitos antivirais in vivo dos IFNs- α , - β e -gama sobre a infecção com o vírus vaccinia em macacus Rhesus. A infecção foi monitorizada por observação das lesões cutâneas (aspecto e diâmetro dos pápulos e das pústulas). Os resultados revelaram uma significativa redução na severidade da lesão nos grupos tratados intramuscularmente com HuIFN-gama natural ou recombinante.

A actividade antiviral in vivo do IFN-gama murino recombinante (rMuIFN-gama) foi avaliada, por exemplo, por Shalaby

e outros, J. Interferon research, 1985, 5, 339, num modelo murino de infecção pelo vírus da encefalomiocardite (EMC). Os resultados demonstraram a capacidade do rMuIFN-gama para proteger ratinhos contra a infecção pelo vírus da EMC. Resultados semelhantes foram obtidos por I. S. Sim e R. L. Cerruti, Antiviral Res., 1987, 8, 209.

O tratamento com o rMuIFN-gama antes da infecção por citomegalovírus (MCMV) foi descrito como significativamente redutor da mortalidade num modelo murino [Fennie e outros, Antiviral Res., 1988, 10, 27].

Outros estudos examinaram a eficácia dos diversos imunomoduladores, incluindo o rMuIFN-gama, em modelos murinos de infecção experimental com o vírus Herpes simplex do tipo 2 (VHS-2), o vírus banzi flavi, o vírus da encefalite equina venezuelana (EEV) e o vírus bunya caraparu [Pinto e outros, Intern. J. Immunopharmacol., 1988, 10, 197].

A eficácia do IFN-gama recombinante do rato (rRatIFN-gama) contra a infecção provocada pelo vírus da pseudo-raiva (VPR) em ratos imunologicamente debilitados e imunossuprimidos foi demonstrada por Schijns e outros, J. gen. Virol., 1988, 69, 1979.

Apesar do mecanismo através do qual os interferons desencadeiam as suas acções antivirais não ser completamente compreendido, sabe-se que em vez de desactivarem directamente os vírus eles actuam indirectamente através de células sensíveis aos vírus. A ampla gama antiviral de interferons, incluindo o IFN-gama, parece ser devida à sua capacidade para modular múltiplas vias bioquímicas que têm efeitos antivirais diferentes e actuam sobre diferentes porções dos ciclos de replicação virais [Pestka

e outros, Ann. Rev. Biochem., 1987, 56, 727; C. E. samuel, Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol., 1988, 35, 27; H. jacobsen, Arzneim. Forsch. Drug res., 1986, 36, 512.

Numerosos estudos demonstraram a capacidade dos interferons para controlar, e em particular evitar, infecções bacterianas.

O rMuIFN-gama e o rRatIFN-gama foram testados e considerados eficazes em diversos modelos simulados de infecções bacterianas de feridas, incluindo modelos cirurgicamente estimulados e infecções em feridas resultantes de queimaduras [Hershman e outros, Microbial Pathogenesis, 1988, 4, 165; Hershman e outros, J. Interferon Res., 1988, 8, 367]. A utilização do IFN-gama no tratamento da sepsia associada a traumas é descrita por M. J. Herman e outros, Infection and Immunity, 1988, 56, 2412.

O IFN-gama revelou ser eficaz, por exemplo, na profilaxia e no tratamento das infecções provocadas por Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Staphilococcus aureus, Chlamydia trachomatis, Mycobacterium intracellulare, Mycobacterium tuberculosis, Francisella tularensis, Salmonella typhimurium e Lysteria monocytogenes em diversos modelos in vitro e in vivo dessas infecções.

Apesar de não estar ainda completamente esclarecido, o mecanismo de acção dos interferons, por exemplo do interferon-gama, parece envolver a reduzida capacidade de penetração das células tratadas com interferon apresentada pelas bactérias.

As infecções parasíticas eficazmente controladas (isto é, evitadas e/ou tratadas) com o IFN-gama incluem as infecções


provocadas por Leshmania donovani [ver Murray e outros, J. Clin. Invest. 1989, 83, 1253] e por Tosoplasma gondii [McCabe e outros, J. Infect. Dis., 1984, 150, 961], e a malária em diversos modelos de infecções provocadas por Plasmodium.

Os dados obtidos in vitro sugerem que as células imunitárias (macrófagos, neutrófilos, etc.) são activados mediante a incubação com IFN-gama para destruir fungos (C. albicans, H. capsulatum, B. dermatitis, P. brasiliensis) através de mecanismos tanto oxidativos como não oxidativos tão eficazmente como outras classes de agentes patogénicos microbianos [ver Brummer e outros, J. Immunol. 1988, 140, 2786]. Shear e outros, J. Acquired Immune Deficiency Syndromes, 1990, 3, 943, descreve a eficácia do IFN-gama na profilaxia e tratamento da pneumonia provocada por Pneumocystis carinii (PCP) e induzida por esteróides em ratos.

Os recentes conhecimentos sobre os mecanismos de acção e a aplicação clínica dos interferons, incluindo o IFN-gama, é resumida por baron e outros em JAMA, 1991, 266, 1375.

É sabido que o IFN-gama tem uma diminuta variedade de hospedeiros devendo, conseqüentemente usar-se um IFN-gama homólogo em relação ao do animal a ser tratado. Na terapia humana, utilizam-se de preferência a variante desCisTirCis com a sequência indicada, por exemplo, na patente dos E:U:A. nº 4 717 138 e no seu complemento patente europeia nº 77 670 (publicada em 27 de Abril de 1983), e, facultativamente, a variante com o terminal C truncado em que os últimos 4 resíduos são eliminados no decurso do processamento pós-translacional.

A "interleucina-2" ou "IL-2" (originalmente designada factor de crescimento das células T) foi descrita pela primeira vez por D. A. Morgan e outros, Science, 1976, 193, 1007. A



produção de IL-2 mediante a preparação de culturas de linfócitos sanguíneos periféricos humanos (LSP) encontra-se descrita, por exemplo, na patente nos E.U.A. nº 4 401 756. A produção recombinante de IL-2 é descrita, por exemplo, por Taniguchi e outros em Nature, 1983, 302, 305 e por Devos e outros em Nucleic Acid Res., 1983, 11, 4307. Os termos "interleucina-2" ou "IL-2" designam diversamente todas as formas de IL-2 conhecidas como biologicamente activas em testes aceites com IL-2 incluindo aleles e variantes obtidas por substituição, inserção ou eliminação de um ou mais aminoácidos na sequência de aminoácidos original, por exemplo do modo descrito na patente nos E.U.A. nº 4 518 584. A actividade antimicrobiana da IL-2 encontra-se descrita, por exemplo, nos pedidos de patente PCT nº WO 85/05124 (publicado em 21 de Novembro de 1985) e nº WO/03948 (publicado em 12 de Setembro de 1985) e EP nº 147 819 (publicado em 10 de Julho de 1985), EP nº 118 617 (publicado em 19 de Setembro de 1984), EP nº 118 977 (publicado em 19 de Setembro de 1984), EP nº 132 754 (publicado em 13 de Fevereiro de 1985), EP nº 94 317 (publicado em 16 de Novembro de 1983) e nas patentes nos E.U.A. nº 4 407 945 e nº 4 473 642.

O "factor- α de necrose dos tumores" ou "FNT- α " foi descrito pela primeira vez por Carswell e outros em Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1975, 72, 3666. A produção de FNT- α mediante a tecnologia do ADN recombinante foi descrita por Pennica e outros em Nature, 1984, 312, 724, e, por exemplo, no EP nº 168 214 (publicado em 15 de Janeiro de 1986).

O tratamento das infecções bacterianas em hospedeiros mamíferos com linfoquinas e, especificamente, com o FNT- α isolado ou em combinação com a IL-2 ou com o IFN-gama encontra-se descrito na patente nos E.U.A. nº 4 879 111.

O termo "imunossuprimido" quando aplicado a um paciente designa um hospedeiro com defesas debilitadas em risco de manifestar infecções oportunistas. Em pacientes submetidos a transplantes, a imunossupressão é o resultado de uma terapia imunossupressora que é inevitável para que a transplantação tenha sucesso.

Os termos "transplantação" e "transplante" são aqui usadas no seu sentido mais abrangente e aplicam-se a transplantações e transplantes de órgãos sólidos e não sólidos e de tecidos, tais como o fígado, o coração, os rins e transplantações/transplantes de medula óssea heteróloga ou homóloga.

O termo "terapia imunossupressora" é utilizado no seu sentido mais abrangente podendo envolver a administração de medicamentos imunossupressores "também abreviados para imunossupressores"), tais como ciclosporinas, corticoesteróides, imunossupressores citotóxicos, globulinas antilinfócito, mas englobando igualmente a irradiação e a quimioterapia associada. A terapia imunossupressora particular utilizada depende da natureza do transplante.

A terapia imunossupressora típica utilizada para evitar a rejeição dos órgãos sólidos transplantados em sujeitos receptores inclui a utilização de ciclosporinas, corticoesteróides e outros agentes imunossupressores tais como a azatioprina, a ciclofosfamida e o metotrexato. Os sujeitos receptores de transplantes de medula óssea são em geral submetidos a uma irradiação extensiva e a quimioterapia antes da transplantação.

Os corticoesteróides tais como a prednisona e a dexametasona são conhecidos por terem os efeitos imunossupressores mais globais, sendo capazes de alterar quase todos os aspectos do

sistema de defesa do hospedeiro. Debilitam a mobilização, a aderência, a fagocitose e a actividade de neutrófilos, monócitos e macrófagos, reduzem a actividade dos linfócitos T e B, diminuem a produção de interferons e de outras citocinas e alteram a flora gastrointestinal. O seu efeito mais pronunciado é sobre as reacções dos leucócitos. O tratamento com esteróides aumenta grandemente a susceptibilidade do paciente em relação a diversas infecções bacterianas, virais, fúngicas ou parasíticas e activa infecções endógenas latentes. De acordo com a prática clínica, doses elevadas de esteróides são geralmente bem toleradas até cerca de três semanas, altura em que aumenta substancialmente a incidência de diversas infecções, podendo frequentemente fazer perigar a vida do paciente.

Os agentes imunossuppressores, frequentemente usados em combinação com corticoesteróides tais como ciclofosfamida, azatioprina e metotrexato, também são conhecidos por produzirem defeitos nas defesas do hospedeiro e aumentarem o risco de complicações infecciosas.

As "ciclosporinas" são um grupo de metabolitos biologicamente activos produzidos por Tolypocladium inflatum gams e por outros fungos imperfeitos. As principais componentes, ciclosporinas A e C, são oligopeptídeos cíclicos não polares dotados de propriedades imunossupressoras. Em particular, a Ciclosporina A (CsA) é amplamente usada na prática clínica como imunossupressor. As ciclosporinas sintéticas análogas, tais como a Ciclosporina G (CsG) [Sandoz, Inc.; ver McKeena e outros Transplantation (U.S.A.), 1989, 47, 343-348], a (Mvasup 2)-CS e a (Valsup 2)DH-CS [Hiestand e outros, Immunology, 1985, 55, 249-255] também são conhecidas. O termo "ciclosporina" tal como é usado no âmbito das presentes memória descritiva e reivindicações inclui todas as ciclosporinas naturais e os seus análogos sintéticos e derivados,

quer já conhecidos dos técnicos especializados quer futuramente preparados, desde que que possuas propriedades imunossupressoras semelhantes, no tipo, às da Ciclosporina A. As ciclosporinas são vantajosas por serem mais específicas, na sua acção, que os corticoesteróides. A sua actividade parece ser especificamente dirigida contra a subpopulação de linfócitos auxiliares/indutores de linfócitos T sem qualquer efeito directo sobre o funcionamento de células B, monócitos, macrófagos, neutrófilos e células assassinas naturais (AN).

A terapia com radiações (tal como com medicamentos citotóxicos) é a mais eficaz no que diz respeito à supressão do desenvolvimento de uma nova reacção imunitária. Apesar de, nos casos em que o tratamento é cuidadosamente administrado, serem relativamente raras as infecções directamente tributáveis à terapia com radiações, a irradiação total do corpo resulta frequentemente em granulocitopenia.

De acordo com a experiência clínica, os efeitos cumulativos de diversos terapias/agentes imunossupressores pode exceder grandemente os efeitos de cada tratamento isolado.

Um protocolo profilático (pré operatório e de manutenção) imunossupressor usado em pacientes submetidos a transplantes renais (e, com algumas modificações, cardíacos) inclui a administração de Ciclosporina A, de aztioprina e de corticoesteróides. De acordo com um protocolo representativo, a Ciclosporina A é administrada oralmente numa dose pré-operatória de 12 mg/kg enquanto que a dose pós-operatória inicial é de 8 mg/kg/dia, sendo ajustada em função do nível sanguíneo. Seguindo o mesmo protocolo, a azatioprina é administrada intravenosamente numa dose pré-operatória de 3 mg/kg e numa dose pós-operatória de 1,5 mg/kg/dia, dose essa que será diminuída se a contagem dos




glóbulos brancos (CGB) diminuir para valores inferiores a 3000. A dose diária de esteróides é de 2 mg/kg/dia nos dias 0, 1 e 2, sendo gradualmente diminuída para cerca de 0,15 mg/kg/dia, valor que é tipicamente atingido no dia 120.

Em algumas situações é administrada ao paciente, imediatamente após a transplantação, uma preparação anti-linfócito (por exemplo anti-CD3 [OKT3], anti-CD4 [4], anti-CD8, anti-CD11a, 11b ou 11c, anti-CD18, anti-globulina de linfócito, anti-receptor de IL-2). Isto permite a interrupção da administração de ciclosporina e, segundo alguns especialistas, pode induzir uma tolerância parcial do órgão ou tecido transplantado. O risco de infecção, em particular dos síndromas linfoproliferativos associados ao Citomegalovírus (CMV) e ao vírus de Epstein-Barr (E-B), é muito elevado nesta situação.

Quando a rejeição do órgão ou tecido transplantado é diagnosticada através de uma biópsia, impressão clínica ou de qualquer outro método de diagnóstico conhecidos dos técnicos especializados, a terapia anti-rejeição é iniciada. Pode incluir a administração de doses elevadas de esteróides, a terapia anti-linfócito ou a combinação das duas. Por exemplo, os sujeitos receptores de transplantes renais são tipicamente tratados com uma dose intravenosa de 500 mg/kg/dia de Solumedrol (sal de sódio de 21-succinato de metilprednisolona, Upjohn) durante quatro dias subsequentes ao diagnóstico de ligeira rejeição. Se a rejeição for moderada ou severa, poderá administrar-se, por exemplo, um anticorpo monoclonal murino anti-CD3 [OKT3] (Ortoclone) numa dose intravenosa de 5 mg/dia durante cerca de 10 a 14 dias.

Deve entender-se que apesar de os protocolos profiláticos e anti-rejeição atrás delineados serem típicos de muitos centros de transplantação, o tratamento pode variar



consideravelmente em função da filosofia programática, do tipo de órgão transplantado ou do estado do paciente. por exemplo, a dose de manutenção de ciclosporina pode variar entre cerca de 1 e cerca de 20 mg/kg/dia. As doses requeridas para os transplantes do fígado e do coração são em geral superiores às requeridas para os transplantes de rins e de medula óssea. A utilização de linfoquinas, em particular do IFN-gama, na profilaxia ou tratamento de infecções microbianas em pacientes submetidos a transplantes é estudada em conjunto com quaisquer protocolos profiláticos ou de anti-rejeição usados na prática clínica. nos pacientes submetidos a transplantes que não recebem um tratamento profilático anti-linfócito e a quem são administradas ciclosporina e doses elevadas de esteróides, a administração de linfoquina (IFN-gama) deverá ser tipicamente iniciada no momento da transplantação e deverá ser tipicamente mantida durante os cerca de 40 dias subsequentes. Nos pacientes submetidos a uma terapia profilática antilinfócito a administração de linfoquinas (por exemplo IFN-gama) pode ser tipicamente iniciada no momento da transplantação e continuada durante os cerca de 7 a cerca de 21 dias após a conclusão da terapia anti-linfócito. Quando a monitorização do paciente sugerir que está a ocorrer uma rejeição, a administração de linfoquina (IFN-gama) pode ser iniciada em paralelo com a terapia imunossupressora convencional (por exemplo doses elevadas de esteróides) e deverá ser mantida durante pelo menos duas semanas a fim de evitar as infecções associadas a uma debilitada reacção imunitária.

As linfoquinas, tais como o IFN-gama e a IL-2, bem como os imunossupressores, tais como as ciclosporinas, são geralmente administrados sob a forma de composições farmacêuticas contendo uma quantidade eficaz do ingrediente activo em mistura com um veículo farmacêuticamente aceitável adequado e, facultativamente, outros aditivos farmacêuticamente aceitáveis.

O termo "composição farmacêutica" diz respeito a preparações que se encontram sob uma forma que permita que a actividade biológica do ingrediente activo seja inequivocamente eficaz e que não contenham componentes adicionais que sejam tóxicos para os sujeitos a quem a composição deva ser administrada. Estas composições farmacêuticas podem ser preparadas e formuladas para efeitos de dosagem mediante métodos conhecidos dos técnicos especializados (ver, por exemplo Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, 15ª edição, Easton, Pensilvânia, E.U.A., 1975.

Os excipientes (veículos, aditivos) "farmaceuticamente aceitáveis" são aqueles que podem ser razoavelmente administrados a um sujeito mamífero a fim de administrar-lhe uma dose eficaz do ingrediente activo utilizado. Os veículos típicos incluem as soluções salina, de dextrose, de Ringer, etc., podendo igualmente usar-se veículos não aquosos.

As linfoquinas podem ser administradas a um sujeito mamífero, tal como um ser humano, por qualquer uma das vias aceites de administração destes agentes, incluindo as vias subcutânea e parentérica. São exemplos de vias de administração parentérica as vias intravenosa, intrapulmonar, intra-arterial, intramuscular e intraperitoneal. A via real de administração dependerá de um determinado número de considerações, incluindo a natureza da infecção a ser tratada, caso a administração seja iniciada após o desencadear da infecção. Em geral prefere-se a administração subcutânea ou intravenosa mas no caso do tratamento de infecções pulmonares (P. carinii) pode ser mais adequada a administração por via intrapulmonar.

No caso da administração se efectuar por via parentérica as linfoquinas são em geral formuladas sob a forma de unidades

de dosagem injectáveis (por exemplo soluções, suspensões, emulsões).

A formulação do IFN-gama é preferencialmente líquida sendo em geral constituída por uma solução de dextrose ou de sal fisiológico em conjunto com estabilizantes e/ou excipientes convencionais. As composições contendo IFN-gama também podem ser fornecidas sob a forma de pós liofilizados. Uma formulação típica pode conter IFN-gama (20×10^6 U) a 1,0 ou 0,2 mg/ml, 0,27 mg/ml de ácido succínico e hexahidrato de succinato dissódico 0,73 ml/injecção com pH 5,0. as formulações líquidas preferidas contendo IFN-gama não liofilizado encontram-se descritas em PCT nº WO89/4177, publicado em 18 de Maio de 1989. Estas formulações líquidas têm um pH compreendido entre 4,0 e 6,0 e contêm um agente estabilizante e um detergente não iónico. No caso da administração intrapulmonar o IFN-gama é tipicamente administrado sob a forma de uma dispersão contendo uma sua quantidade terapêuticamente eficaz. A dispersão é de preferência uma formulação do tipo aerosol em que mais de 15% das partículas tem dimensões compreendidas entre cerca de 0,5 μm e cerca de 4 μm (ver EP nº 257 956 publicado em 3 de Fevereiro de 1988).

O IFN-gama é administrado, de preferência e de acordo com o presente invento, subcutaneamente em doses compreendidas entre cerca de 0,01 e cerca de 0,1 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{dia}$ durante o tempo necessário para tratar a infecção. A frequência da administração varia em função da natureza da infecção e do estado do paciente, estando preferencialmente compreendida entre a diária e a que se realiza uma vez por semana.

As composições farmacêuticas contendo IL-2 próprias para serem reconstituídas num veículo aquoso farmacêuticamente aceitável são descritas no pedido de patente PCT nº WO 85/04328.

Num sentido farmacológico, no contexto do presente invento, a expressão "quantidade eficaz" de uma linfoquina, tal como IFN-gama e/ou IL-2, designa uma quantidade que seja eficaz no controlo de infecções microbianas. Neste contexto, o termo "controlo" abrange tanto a profilaxia como o tratamento destas infecções. em conformidade, o IFN-gama pode ser administrado profilaticamente (isto é, antes do aparecimento da infecção) ou terapêuticamente (isto é, após o aparecimento da infecção), sendo preferida a administração a título profilático.

A determinação das doses exactas em função do estado do paciente e da frequência de administração desejável estão ao alcance do técnico especializado. As doses imunologicamente eficazes podem ser geralmente determinadas para cada administração particular de acordo com o procedimento descrito por Maluish e outros em J. Clin. Oncol., 1988, 6, 434-435.

A expressão "infecção microbiana" e as suas variantes gramaticais são usadas para designar quaisquer infecções que ocorram em pacientes submetidos a transplantes e possam ser controladas mediante um tratamento com linfoquinas, por exemplo IFN-gama ou IL-2. estas infecções microbianas são principalmente as infecções oportunistas resultantes de uma deficiente imunidade dos sujeitos receptores dos transplantes que é consequência de um tratamento com imunossuppressores, sendo também comum em outros hóspedes imunocomprometidos tais como os pacientes com SIDA [Gottlieb e outros, Ann. Intern. Med., 1983, 99, 208; P. Periti e T. mazzei, Clinical therapeutics, 1985, 8, 100. Os agentes patogénicos oportunistas que frequentemente causam complicações infecciosas em pacientes imunocomprometidos são bactérias tais como Staphylococcus aureus, Streptococci, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Haemophilus influenzae, Legionella pneumophila, a espécie Salmonella, Aeromonas

hydrophila, vibrios marinhos (halofílicos), a espécie Nocardia, Mycobacterium tuberculosis, fungos tais como a espécie Candida, a espécie Torulopsis, a espécie Aspergillus, zigomicetes, Cryptococcus neoformans, Histoplasma capsulatum, vírus tais como Herpes simplex, vírus zoster da varicela, Citomegalovírus (CMV), vírus de Epstein-Barr (E-B), vírus da hepatite B, parasitas tais como Toxoplasma gondii, Strongiloides stercoralis, Pneumocystis carinii (este último organismo sendo igualmente considerado um fungo) [P. Periti e T. Mazzei, "Infections in Immunocompromised Patients" (Infecções em pacientes imunocomprometidos), Clin. Ther., 1985, 8, 100-117, e M. Ho, "Human cytomegalovirus infections in immunosuppressed patients" (Infecções citomegalovirais humanas em pacientes imunossuprimidos), Cytomegalovirus: Biology and Infection (Citomegalovírus: biologia e infecção), 171-204, Plenum Press, Nova Iorque, 1982]. Uma aparição clínica corrente destas infecções é a ocorrência de pneumonia causada por Pneumocystis (P.) carinii ou pela espécie Legionella; contudo, outras infecções usuais de origem bacteriana (espécie Salmonella, Lysteria monocytogenes, micobacteriana, fúngica ou protozoica, atrás apresentadas ou de outro modo conhecidas, também podem ser evitadas ou tratadas com o IFN-gama de acordo com o presente invento.

As potencialidades do IFN-gama no tratamento de infecções microbianas em sujeitos receptores de transplantes imunocomprometidos são suportadas por relatórios que descrevem, além do seu profundo efeito sobre as reacções imunitárias, como o IFN-gama aumenta a fagocitose, a capacidade oxidativa, a quimiotaxia e a capacidade microbiana dos monócitos e macrófagos in vitro em pacientes com SIDA [Murray e outros, N. Engl. J. Med. 1984, 310, 883].

Algumas das infecções microbianas atrás citadas e outras ainda estão também directamente associadas com o traumatismo cirúrgico da transplantação. Estas infecções associadas a traumas incluem tipicamente infecções bacterianas causadas por bactérias gram-positivas tais como Staphylococcus aureus, Streptococcus faecalis, Pneumococci, Enterococci an-hemolíticos, a espécie Sarcina e Streptococci hemolíticos e bactérias Gram-negativas tais como Escherichia coli, a espécie Pseudomonas, a espécie Klebsiella, a espécie Proteus, Enterobacter cloacae, bactérias coliformes, a espécie Serratia, a espécie Citrobacter e a espécie Providencia [Allgower e outros, Surg. Clin. Am., 1980, 60, 133-144].

As linfoquinas, e especificamente o IFN-gama, podem ser co-administrados quer umas com as outras quer com outros agentes antimicrobianos e terapêuticos usados no tratamento de pacientes submetidos a transplantes. A co-administração inclui as administrações simultânea ou sucessiva. Os agentes antimicrobianos administráveis por via oral que preservam, apesar da supressão da flora aeróbica, a resistência à colonização incluem, por exemplo, o co-trimoxazole, o ácido nalidixínico, o ácido oxolínico, o ácido pipemídico, a frameticina, a polimixina B, a colistina, a niastatina, a anfotericina B, o clotrimazole, o miconazole, o cetoconazole. A profilaxia com co-trimoxazole, por exemplo, tornou-se o procedimento padrão com pacientes em elevado risco de contrair pneumonia provocada por P. carinii [Russe e outros, J. Antimicrob. Chemother., 1981, 8, 87]. Os agentes antimicrobianos administráveis por via oral que diminuem a resistência à colonização incluem, por exemplo, os antibióticos de aminoglicosidase, por exemplo neomicina, paromomicina, canamicina, becanamicina, ribostamicina, dibecacina, tobramicina, amicacina, gentamicina, sisomicina, netilmicina, bacitracina, vancomicina. Os antibióticos de aminoglicosidase são geralmente administrados com um

antibiótico de beta-lactam (penicilina e/ou cefalosporina). Os antibióticos de penicilina incluem penicilina, carbenicilina, ampicilina, amoxicilina, meticilina, oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina, nafcilina, tienamicina, piperacilina, azlocilina, mezlocilina, etc. Os antibióticos de cefalosporinas incluem, por exemplo, cefalexina, cefradina, cefaclor, cefadroxil, cefatrizina, cefaparole, cefroxadina, cefalotina, cefaloridina, cefalozi-
na, cefonicid, cafametazole, etc. A terapia antimicrobiana de acordo com o presente invento pode ser combinada com a administração de qualquer um daqueles agentes antimicrobianos conhecidos e de outras terapêuticas tradicionalmente usadas no tratamento de pacientes submetidos a transplantes. Para mais pormenores ver P. Periti e T. mazzei, op. cit. e Cushing, Surg. Clin. N. Am., 1977, 57, 165.

Outros pormenores do presente invento serão ilustrados nos seguintes Exemplos não limitativos do seu âmbito.

EXEMPLO 1

Administração de IFN-gama a sujeitos receptores de transplantes cardíacos

I. Materiais e métodos

Ratos Ratos da estirpe Lewis e da estirpe AC (200-250 g) obtidos de Charles River Laboratories, Portage, MI, E.U.A.

Procedimento de transplantação Todos os ratos foram anestesiados com solução sódica de fenobarbital a 10%. Os ratos da estirpe Lewis receberam 1 mg de gentamicina por via intramuscular. Os ratos da estirpe AC receberam 100 unidades de heparina por via intravenosa. O coração dos ratos AC foi removido, lavado,

através da aorta, com solução salina a 4°C e colocados numa solução salina gelada. A transplantação heterotópica dos corações dos ratos AC para os abdômens dos ratos Lewis foi realizada de acordo com a técnica de Ono e Lindsey [J. Thorac. Cardio. Surg., 1969, 57, 15]. Utilizaram-se procedimentos convencionais de recuperação e os animais foram examinados diariamente quanto a batimento cardíaco palpável. A rejeição foi considerada completa no último dia em que o batimento cardíaco era palpável. Os animais foram sacrificados no dia subsequente ao da rejeição ou, no caso de não haver rejeição, 20 ou 45 dias após a transplantação. As secções transversais da porção média das câmaras ventriculares direita e esquerda foram tingidas com hematoxilina e com eosina. As lamelas foram examinadas e classificadas de acordo com uma tabela de rejeição histológica de 0 a 10 usando a escala de rejeição do Texas Heart Institute [McAllister e outros, texas heart Institute, 1986, 13, 1] por um patologista experimentado na avaliação de rejeições de transplantes cardíacos e completamente ignorante do protocolo experimental.

Tratamento com ciclosporina Todos os ratos submetidos a transplantes receberam doses de 20 mg/kg/dia no dia da transplantação bem como 1 e 2 dias após a transplantação. Esta dose controla a rejeição sendo os corações transplantados rejeitados 45 dias após o transplante [Hershman e outros, Infec. Immun., 1988, 56, 2412; D. P. clifford e J. E. Repine, Methods Enzimol., 1984, 105, 393]. Alguns dos ratos submetidos a transplantes receberam um tratamento de "manutenção" adicional de ciclosporina, oral e compulsivo, de 8 mg/kg/dia iniciado no terceiro dia após a transplantação e prosseguido durante toda a experiência.

Tratamento com IFN-gama Adquiriu-se IFN-gama de rato recombinante a Amgen Biologicals, Thousand Oaks, CA, E.U.A. com uma actividade específica de 4×10^8 unidades/mg de proteína. O

IFN-gama foi administrado aos ratos do modo descrito para cada experiência individual.

Medição da eclosão oxidativa Os neutrófilos foram separados do sangue completo dos ratos mediante centrifugação de densidade usando um meio de isolamento 1119 (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, E.U.A.). O F-Met Leu-Fe (FMLF) foi usado para desencadear a eclosão oxidativa e a produção de superóxido foi medida por métodos fluorométricos [lifford e outros, Methods Enzimol., 1984, 105, 393].

Análise estatística Nos casos em que as dimensões das amostras dos dois grupos eram iguais aplicou-se o teste t de Student para analisar os dados. Nos casos em que as dimensões das amostras eram diferentes usou-se a estatística t de Behrens-Fisher com a correcção df de Welsh para analisar os dados.

Todas as experiências foram efectuadas em conformidade com os "princípios de Cuidados Animais Laboratoriais" formulados pela National Society for Medical Research (E.U.A.). Todos os animais foram alojados em instalações AAALAC sob directivas NIH e sob a supervisão directa de um veterinário.

II. Efeito do IFN sobre a rejeição de corações transplantados

Ratos receptores da estirpe Lewis receberam 20 mg/kg/dia de cilosporina no dia do transplante e nos dois dias que se seguiram ao transplante. O coração de um rato da estirpe AC foi transplantado para o abdómen de cada rato receptor. Os ratos do grupo de controlo não receberam qualquer tratamento adicional. Sabe-se que a dose de 20 mg/kg/dia de ciclosporina, administrada do modo indicado, controla a rejeição de modo que os

corações são rejeitados 45 dias após a transplantação. [Hershman e outros, op. cit.].

Os ratos experimentais receberam cada um 759 unidades de IFN-gama por dia, administrados por via intramuscular, no dia da transplantação e nos 3 dias subsequentes. Os resultados apresentados no Quadro 1 mostram que os ratos tratados com IFN-gama tinham uma rejeição mais acelerada que os controles.

Quadro 1

Efeito do tratamento com IFN-gama sobre a retenção de corações tranplantados em ratos

<u>Tratamento</u>	<u>N</u>	<u>Nº de Dias Médio até Rejeição</u>	<u>P</u>
Controlo	10	44,7	-
750 U IFN-gama	5	11,0	<0,05

(Num terceiro grupo a transplantação foi realizada para um rato receptor da estirpe Lewis que não tinha recebido ciclosporina e a que se administrou IFN-gama tal como atrás. Esta grupo não pôde ser avaliado devido a rejeição prematura.)

III. Efeito de doses de manutenção de ciclosporina sobre rejeições intensificadas de corações transplantedos mediadas pelo IFN-gama

A. Efeito de doses de manutenção de ciclosporina sobre rejeições de corações transplantedos

Cada rato receptor da estirpe Lewis recebeu 20 mg/kg/dia de ciclosporina no dia da transplantação bem como em um ou dois dias após a transplantação. Os ratos receberam doses

adicionais "de manutenção" de 8 mg/kg/dia de ciclosporina no terceiro dia após a transplantação que e em todos os dias subsequentes até ao fim da experiência. Sacrificaram-se grupos de ratos 20 dias e 45 dias após a transplantação. Não se observou qualquer diferença na classificação da rejeição média histológica 20 e 45 dias após a transplantação, tal como se indica no Quadro 2.

Quadro 2

Efeito da ciclosporina "de manutenção" sobre a rejeição de corações transplantados

<u>Momento do Sacrifício</u>	<u>N</u>	<u>Grau de Rejeição Média</u>	<u>P</u>
20 dias pós-transpl.	10	1,0	-
45 dias pós-transpl.	10	1,2	NS

NS= não significativo

B. Efeito do tratamento de manutenção de ciclosporina sobre a rejeição intensificada pelo IFN-gama de corações transplantados

Todos os ratos receberam 20 mg/kg/dia de ciclosporina no dia da transplantação e durante os dois dias subsequentes. Os ratos também receberam doses "de manutenção" de 8 mg/kg/dia de ciclosporina no terceiro dia após a transplantação e nos dias subsequentes até ao do sacrifício. Os ratos experimentais foram tratados quer com 750 unidades/dia quer com 7500 unidades/dia, pela via intramuscular, no dia da transplantação e nos três dias subsequentes. Os corações transplantados não foram completamente rejeitados (paragem cardíaca) no decurso de toda a experiência, isto é, os corações não foram rejeitados durante os 45 dias que

se seguiram ao transplante. Os graus de rejeição médios só aumentaram significativamente com as doses de 750 unidades de IFN-gama após 20 dias, não se observando contudo uma diferença significativa 45 dias após a transplantação (Quadro 3).

Quadro 3

Efeito do tratamento "de manutenção" de ciclosporina sobre a rejeição intensificada pelo IFN-gama de corações transplantados

<u>Tratamento</u>	<u>GRM (20 d.)</u>	<u>N</u>	<u>P</u>	<u>GRM (5 d.)</u>	<u>N</u>	<u>P</u>
nenhum	1,0	10	-	1,2	10	-
750 U IFN-gama	3,0	10	<0,05	1,5	5	NS
7500 U IFN-gam.	2,9	5	NS	2,2	4	NS

GRM = grau de rejeição médio, usando o método de classificação de biópsias endomiocárdicas do Texas Heart Institute. 1-3: fraca; 4-6: moderada e 7-10: grave [ver McAllister e outros, A system for grading cardiac allograft rejection, Texas Heart Institute J., 1986, 13, 1].

NS = não significativo

IV. Efeito do tratamento "de manutenção" com ciclosporina sobre a eclosão oxidativa em neutrófilos induzida por FMLP e mediada pelo IFN-gama

Os ratos Lewis no regime "de manutenção" de ciclosporina atrás descrito receberam transplantes de corações de ratos AC. Todos os ratos receberam 20 mg/kg/dia ciclosporina no dia do transplante e nos dois dias subsequentes. Os ratos também receberam uma dose "de manutenção" de 8 mg/kg/dia de ciclosporina no terceiro dia após o transplante e nos dias subsequentes até ao do

sacrifício dos animais que ocorreu 4 dias após o transplante. Os ratos receberam uma dose elevada de 75 000 unidades de IFN-gama pela via intramuscular no dia do transplante e nos três dias subsequentes. Passados quatro dias os ratos foram sacrificados e sangrados e os seus neutrófilos foram testados quanto a uma eclosão oxidativa induzida por FMLP e mediada pelo IFN-gama. Efectuaram-se duas experiências usando dois ratos em cada uma. Os dados apresentados no Quadro 4 sugerem que a dose "de manutenção" de ciclosporina não inibiu a produção de superóxido, mediada pelo IFN-gama, por parte dos neutrófilos.

Quadro 4

Efeito do tratamento "de manutenção" de ciclosporina sobre a eclosão oxidativa induzida por FMLP em neutrófilos de animais que receberam IFN-gama

<u>Tratamento</u>	<u>N</u>	<u>Superóxido gerado (nm/10⁶ células)</u>
Controlo	2 (em duplic.)	0,68
75 000 IFN-gam.	2 (em duplic.)	3,70

V. Discussão

No presente estudo, o tratamento com IFN-gama dos ratos com um coração transplantado heterólogo revelou aumentar a velocidade de rejeição do coração. O tempo decorrido até à rejeição diminuiu de 44,7 dias para 11 dias. Isto sugere que o tratamento com o IFN-gama de infecções durante a transplantação pode afectar dramaticamente o sucesso do transplante. A maior rejeição pode ser devida a uma maior indução de antigénios de histocompatibilidade, em particular da classe II de antigénios de histocompatibilidade, por parte do tratamento com IFN-gama. Contudo, uma vez que o IFN-gama tem uma multiplicidade de

actividades imunoreguladoras, é possível que o IFN-gama esteja a afectar a rejeição através de outros mecanismos ainda indefinidos. Os mecanismos que levam o IFN-gama a intensificar a rejeição terão de ser estabelecidos em futuros estudos.

No entanto, os resultados do presente estudo sugerem que os efeitos potencialmente deletérios da utilização do IFN-gama em pacientes submetidos a transplantes podem ser evitados. A utilização de doses baixas e contínuas, "de manutenção", de ciclosporina no decurso do período de estudo, tal como no decurso de extensos períodos na maior parte dos pacientes submetidos a transplantes, teve como resultado o cancelamento dos efeitos deletérios do tratamento com IFN-gama sobre o coração transplantado. É portanto possível administrar IFN-gama a indivíduos submetidos a transplantes por uma via sistémica sem induzir a rejeição dos tecidos transplantados. Este facto torna ainda mais atraente a utilização potencial da administração de IFN-gama a pacientes submetidos a transplantes por uma via local (tal como uma aerosolização).

Uma vez que a ciclosporina é um medicamento imunossupressor geral, poderia colocar-se a seguinte questão: se um tratamento "de manutenção" com ciclosporina tem como resultado o cancelamento da acrescida rejeição de um coração transplantado induzida pelo IFN-gama, os efeitos antimicrobianos benéficos do tratamento com IFN-gama serão igualmente cancelados? Os resultados do presente estudo sugerem não ser esse o caso. A terapia "de manutenção" com ciclosporina não alterou a acrescida eclosão oxidativa induzida por FMLP em neutrófilos de animais que tinham recebido IFN-gama. Uma vez que o neutrófilo é uma célula importante no combate às infecções, os resultados sugerem que pelo menos alguns dos efeitos antimicrobianos positivos do potencial tratamento com IFN-gama de indivíduos submetidos a transplantes

serão retidos através de uma terapia "de manutenção" com ciclosporina.

EXEMPLO 2

Efeito do IFN-gama sobre o modelo de transplante homólogo de medula óssea no ratinho

Neste modelo, ratinhos CBA/J machos, adultos, pesando 20 a 25 g cada um (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine, E.U.A.) foram letalmente irradiados com 900 rad de raios X. Os ratos são reconstituídos no mesmo dia com aproximadamente 1×10^7 células da medula óssea obtidas a partir dos fêmures e das tíbias de ratinhos CBA/J dadores normais. Os ratinhos são mantidos em água acidificada num ambiente limpo, sobrevivendo alguns durante pelo menos 2 a 3 semanas após a transplantação. Os ratinhos recebem 20 mg/kg/dia de ciclosporina no dia da transplantação da medula óssea e nos dois dias subsequentes. Os ratinhos também recebem doses "de manutenção" de 8 mg/kg/dia de ciclosporina no terceiro dia após o transplante e nos dias subsequentes até ao do sacrifício. Os ratinhos da experiência são tratados quer com 750 unidades/dia quer com 7500 unidades/dia de IFN-gama murino recombinante (oferta de Genetech, Inc., São Francisco-Sul, Califórnia, E.U.A. Este IFN-gama tem uma actividade específica de aproximadamente $2,3 \times 10^7$ unidades/mg de proteína e encontra-se diluído com meio RPMI-1640 (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, E.U.A.)) por via intramuscular no dia da transplantação da medula óssea e nos três dias subsequentes. Num dos conjuntos de experiências estuda-se a sobrevivência dos ratinhos no decurso de um período de três semanas. Efectuam-se contagens sanguíneas completas periféricas regularmente a fim de avaliar o sucesso dos transplantes. além disso, sacrificam-se membros dos grupos tratado com IFN-gama e de controlo 1 a 2 vezes por semana sendo a

sua medula óssea examina quanto ao sucesso do transplante. Quando os animais morrem são examinados quanto à existência de infecção. Os níveis de expressão do antigénio Ia nos linfócitos sanguíneos periféricos são determinados mediante tingimento específico em relação a anticorpos e citometria de fluxo no dia precedente ao da transplantação e no 1º, 7º e 14º dias após a transplantação. Uma comparação entre a contagem sanguínea completa e a taxa de sobrevivência entre os grupos de controlo e tratado elucida quanto ao efeito do tratamento com IFN-gama sobre o curso de uma transplantação homóloga de medula óssea.

EXEMPLO 3

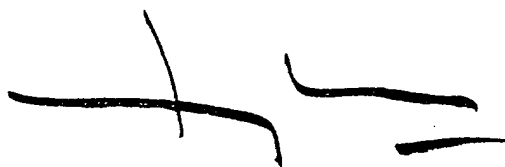
Efeito do tratamento com IFN-gama sobre infecções exogenamente induzidas em pacientes submetidos a transplantes

A capacidade, inerente a um tratamento com IFN-gama, para afectar a taxa de sobrevivência de roedores submetidos a transplantes e deliberadamente infectados é estudada nos modelos de transplantes cardíacos e de transplantes homólogos da medula óssea descritos nos Exemplos 1 e 2. Incuba-se pedaços de sutura de algodão torcido 3 a 0 em caldo de suja com tripticase (BBL Microbiological Systems, Cockeysville, Maryland, E.U.A.) até ao dia seguinte e inocula-se com Klebsiella pneumoniae (tipo capsular 2). No terceiro dia após a transplantação insere-se assepticamente pedaços de sutura presos ao buraco de uma agulha francesa na coxa direita de cada roedor a sutura é cortada rente à pele e enterrada subcutaneamente. Um grupo de roedores submetidos a transplantes de cada modelo é tratado com IFN-gama essencialmente do mesmo modo que foi descrito nos precedentes Exemplos 1 e 2. Um outro grupo é tratado com diluente. Os roedores são monitorizados durante 2 a 3 semanas. Preparam-se culturas bacterianas em sangue em dias alternados. Os roedores não infectados servem de

controlos para assegurar que as complicações resultantes do procedimento de transplantação não são responsáveis pela mortalidade animal. A eficácia do tratamento com IFN-gama é avaliada mediante a observação da existência de uma maior sobrevivência e por análise das culturas sanguíneas. No instante da morte, todos os animais são submetidos a necropsia sob cuidadoso exame das manifestações de pneumonia, peritonite e endocardite.

A precedente descrição apresenta pormenores dos métodos e composições representativos do presente invento. Deve sublinhar-se que são possíveis modificações e variações sem que estas constituam desvios em relação ao espírito geral do presente invento, sendo por conseguinte abrangidas pelo seu âmbito.

Lisboa, 6 de Outubro de 1992



J. PEREIRA DA CRUZ
Agente Oficial da Propriedade Industrial
RUA VICTOR CORDON, 10 - A 3.º
1200 LISBOA

REIVINDICAÇÕES

1ª - Utilização de uma linfoquina antimicrobiana, caracterizada por a referida linfoquina ser empregada na preparação de um medicamento para a profilaxia ou tratamento de infecções microbianas em sujeitos receptores de transplantes.

2ª - Utilização de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por pelo menos um dos organismos causadores da referida infecção microbiana ser bacteriano, fúngico, viral ou parasítico.

3ª - Utilização de acordo com uma das reivindicações 1 ou 2, caracterizada por os sujeitos receptores serem submetidos a uma terapia imunossupressora de manutenção após a transplantação.

4ª - Utilização de acordo com a reivindicação 3, caracterizada por a linfoquina antimicrobiana ser o interferão gama (IFN-gama) ou a interleucina 1 (IL-2) ou uma sua combinação, e por a terapia imunossupressora de manutenção incluir a administração pós-operatória de um ou mais imunossupressores.

5ª - Utilização de acordo com a reivindicação 4, caracterizada por a linfoquina antimicrobiana ser o IFN-gama.

6ª - Utilização de acordo com a reivindicação 5, caracterizada por os referidos imunossupressores incluírem uma ciclosporina.



7ª - Utilização de acordo com a reivindicação 6, caracterizada por a referida ciclosporina ser a Ciclosporina A.

8ª - Utilização de acordo com a reivindicação 7, caracterizada por a Ciclosporina A ser administrada numa dose pós-operatória compreendida entre cerca de 1 e cerca de 20 mg/kg de peso corporal/dia.

9ª - Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 8, caracterizada por o IFN-gama ser administrado a título profilático.

10ª - Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 8, caracterizada por o referido IFN-gama ser administrado sob a forma de uma composição farmacêutica líquida.

11ª - Utilização de acordo com a reivindicação 7, caracterizada por a referida composição farmacêutica líquida ter um pH compreendido entre cerca de 4,0 e cerca de 6,0 e conter um agente estabilizante e um detergente não iónico.

12ª - Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 8, caracterizada por o referido IFN-gama se destinar à administração ultrapulmonar de uma dispersão de uma sua quantidade terapêuticamente eficaz.

13ª - Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 5, 10 e 12, caracterizada por o referido IFN-gama ser o IFN-gama humano desCisTirCis.

14ª - Utilização de acordo com a reivindicação 13, caracterizada por o referido IFN-gama não possuir os últimos quatro resíduos aminoácido com um terminal carbono.

15ª - Utilização do IFN-gama, caracterizada por a o referido IFN-gama ser utilizado na preparação de um medicamento destinado a evitar a rejeição de transplantes associada a infecção em sujeitos receptores de transplantes submetidos a uma terapia imunossupressora de manutenção após a transplantação.

Lisboa, 6 de Outubro de 1992



J. PEREIRA DA CRUZ
Agente Oficial da Propriedade Industrial
RUA VICTOR CORDON, 10-A 3.ª
1200 LISBOA