

(11) Número de Publicação: **PT 1769807 E**

(51) Classificação Internacional:

**A61K 45/00** (2007.10) **A61K 31/52** (2007.10)

**A61K 31/573** (2007.10) **A61K 38/13** (2007.10)

**A61K 31/7056** (2007.10) **A61K 31/436**

(2007.10)

**A61K 31/365** (2007.10) **A61K 31/16** (2007.10)

**A61K 38/02** (2007.10) **A61K 39/395** (2007.10)

**A61K 31/711** (2007.10)

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

(22) Data de pedido: **2002.02.05**

(30) Prioridade(s): **2001.03.01 JP 2001056209**  
**2001.03.01 JP 2001056216**  
**2002.01.16 JP 2002008028**

(43) Data de publicação do pedido: **2007.04.04**

(45) Data e BPI da concessão: **2010.04.07**  
**106/2010**

(73) Titular(es):

**JAPAN TOBACCO, INC.**

**2-2-1 TORANOMON, MINATO-KU TOKYO 105-8422**

**JP**

(72) Inventor(es):

**SEIICHI SUZUKI**

**ISOBE, MITSUAKI**

**JP**

**JP**

(74) Mandatário:

**JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO**

**R DO SALITRE 195 RC DTO 1250-199 LISBOA**

**PT**

(54) Epígrafe: **SUPRESSORES DE REJEIÇÃO DE ENXERTOS**

(57) Resumo:

## DESCRIÇÃO

### SUPRESSORES DE REJEIÇÃO DE ENXERTOS

#### Domínio técnico

A presente invenção tem por objecto composições farmacêuticas que contêm uma substância com actividade para regular a actividade biológica da "molécula imunomoduladora que induz activação linfocitária" (MIIAL) (também conhecida como "co-estimulador indutível" (COEI)), especialmente a transdução de sinal mediada por MIIAL.

Especificamente, a presente invenção tem por objecto composições farmacêuticas que compreendem uma substância com uma actividade para modular (por exemplo, inibir) a proliferação de células que expressam MIIAL ou regulam (por exemplo, inibem) a produção de uma citocina (por exemplo, interferão  $\gamma$  ou interleucina 4) por meio de células que expressam MIIAL.

Mais especificamente, a presente invenção tem por objecto (1) composições farmacêuticas para a inibição, tratamento ou prevenção da rejeição de enxertos (rejeição imunológica) que acompanham o transplante de um órgão, uma porção dele ou um tecido; e (2) composições farmacêuticas para melhorar o efeito inibidor, terapêutico ou preventivo de agentes imuno-supressores na rejeição de enxertos. (rejeição imunológica) que acompanham o transplante de um órgão, uma porção dele ou um tecido.

### **Técnica anterior**

Devido à recente revisão das leis sobre o transplante de órgãos, realizaram-se no Japão alguns transplantes de órgãos de pacientes com morte cerebral. Num caso, sete pacientes receberam esses benefícios de um dador. A partir daqui, espera-se que aumentem os transplantes de órgãos.

Por outro lado, estima-se que venham a aumentar os pacientes japoneses afectados por doenças cardiovasculares severas tais como doenças hepáticas (insuficiência hepática aguda, cirrose hepática, etc.), doenças cardíacas (insuficiência cardíaca severa, cardiomiopatia, hipertrofia cardíaca, etc.), doenças renais (insuficiência renal, glomerulonefrite crónica, nefropatia diabética, pielonefrite, etc.), doenças pulmonares (disfunção pulmonar de ambos os pulmões, etc.) e doenças pancreáticas (tratamento de pacientes diabéticos), para quem o transplante de órgãos é vital para a terapia. Estima-se que esse aumento seja de cerca de 600 doentes cardíacos, cerca de 3.000 pacientes do fígado e cerca de 500 pacientes de pulmões em cada ano. Embora o aspecto legal esteja a ser desenvolvido, a falta de órgãos transplantáveis é também um problema real que existe de momento. Do mesmo modo, a falta de órgãos é um problema sério nos Estados Unidos, que é uma nação avançada em termos de transplantes. Nos Estados Unidos, aproximadamente 4.300 pessoas (1999) estão à espera de transplantes do coração e aproximadamente 43.000 pessoas (1999) estão à espera de transplantes renais. Na realidade, aproximadamente 800 pessoas e aproximadamente 2.300 pessoas morrem em cada ano sem conseguirem receber transplantes de coração e de rim, respectivamente.

Os transplantes de tecido (tal como pele, córnea e osso) ou de órgãos (tal como fígado, coração, rim, pulmão e pâncreas) incluem: (1) autotransplante (transplante autólogo), (2) isotransplante, (3) alotransplante e (4) xenotransplante.

O auto-transplante refere-se ao transplante de uma parte de um indivíduo para outra parte do mesmo indivíduo e um exemplo é o caso do tratamento de uma queimadura por meio de um enxerto da própria pele, que esteja normal, para a área afectada.

O iso-transplante realiza-se entre animais homogéneos. Nos seres humanos, esse transplante realiza-se entre gémeos monozigóticos (por exemplo, transplante de um dos rins ou tecidos do fígado).

O alo-transplante realiza-se entre dois indivíduos diferentes com antecedentes genéticos diferentes e, nos seres humanos, esse transplante realiza-se entre gémeos dizigóticos ou entre indivíduos que não têm absolutamente nenhuma relação sanguínea entre si.

O xenotransplante realiza-se entre indivíduos de espécies animais diferentes. Um exemplo é o caso em que um tecido ou um órgão de um chimpanzé ou de um porco são transplantados para um ser humano.

Tal como se mencionou antes, espera-se que os alo-transplantes de pacientes em morte cerebral aumentem devido ao desenvolvimento da legislação relacionada com o transplante de órgãos. Contudo, para resolver a falta absoluta de órgãos que se possam transplantar, estão activamente em curso várias investigações que têm como

objectivo as aplicações práticas de xeno-transplantes, mais especificamente, o transplante de tecidos ou de órgãos de mamíferos não humanos tal como de porcos para seres humanos.

Embora se espere que o tema da falta de tecidos e órgãos que se possam transplantar seja resolvido pelo desenvolvimento de leis sobre a morte cerebral e o transplante e pela melhoria das técnicas de xeno-transplante, há um outro enormíssimo obstáculo ao tratamento de doenças por alo-transplante e xeno-transplante. Mais especificamente, o obstáculo é uma rejeição imunológica severa (rejeição de enxerto) por parte dos receptores, que ocorre depois do transplante de tecidos ou de órgãos de dadores.

A rejeição de enxertos refere-se a várias respostas imunitárias que tentam rejeitar e eliminar um enxerto (uma parte de um organismo vivo que é transplantada, uma célula, um tecido ou um órgão) de um dador cujos antecedentes genéticos são diferentes dos do receptor (isto é, alo-transplante ou xeno-transplante) dado que o receptor reconhece o enxerto como uma substância estranha. As respostas imunitárias que acompanham este transplante podem ser classificadas como: (1) rejeição hiper-aguda, que é uma rejeição forte que ocorre imediatamente depois do transplante; (2) rejeição aguda, que se observa alguns meses após o transplante; e (3) rejeição crónica observada vários meses após o transplante. Além disso, embora a imunidade celular devida às células imuno-concorrentes representadas pelas células T e a imunidade humoral devida aos anticorpos, ocorram de uma forma intrinsecamente coordenada, a resposta principal é dada pela imunidade celular.

Como resultado da rejeição de enxerto, o enxerto, em última análise, torna-se necrótico e cai. Além disso, o receptor desenvolve não apenas vários sintomas sistémicos tal como febre, leucocitose e fadiga, mas também inchaço e amolecimento no sítio do transplante. Além disso, podem ocorrer complicações severas tal como infecções.

Em particular, quando se transplanta um enxerto xenogénico tal como o de um porco, ocorre um problema sério de rejeição hiper-aguda quando o enxerto é rejeitado no prazo de minutos.

Utiliza-se um número limitado de agentes imuno-supressores que suprimem a função das células imuno-concorrentes para suprimir a rejeição imunológica (rejeição de enxerto) que acompanha esses transplantes, porque a rejeição imunológica causada pelo alo-transplante é devida principalmente à imunidade celular. Esses agentes imuno-supressores incluem ciclosporina (CsA); tacrolimus (FK-506); azatioprina (AZ); micofenolato de mofetilo (MMF); mizoribina (MZ); leflunomide (LEF); esteróides adrenocorticais (também conhecidos como hormonas adrenocorticais, corticoesteróides, corticóides) tais como prednisolona e metilprednisolona; sirolimus (também conhecido como rapamicina); desoxiespergualina (DSG); e FTY720 (nome químico: cloridrato de 2-amino-2-[2-(4-octilfenil)etil]-1,3-propanodiol).

A CTLA4 e a CD28, que são moléculas responsáveis pelos sinais co-estimuladores da transdução, necessárias para a activação das células T (moléculas de transdução do sinal co-estimulador) e especialmente os fármacos de CTLA4 que utilizam a região solúvel de CTLA4 e o gene que a codifica

também estão a ser clinicamente desenvolvidos como agentes imuno-supressores.

Por outro lado, recentemente, e do mesmo modo que CTLA4 e CD28 que são moléculas de transdução do sinal co-estimulador, identificou-se uma molécula chamada molécula imuno-moduladora que induz activação linfocitária (MIIAL; humana, de murganho e de rato; Int. Immunol., 12 (1), p.51-55, 2000; também designada por co-estimulador indutível (COEI; humana; Nature, 397 (6716), p.263-266, 1999); J. Immunol., 166 (1), p.1, 2001; J. Immunol., 165 (9), p.5035, 2000; Biochem. Biophys. Res. Commun., 276 (1), p.335, 2000; Immunity, 13 (1), p.95, 2000; J. Exp. Med., 192 (1), p.53, 2000; Eur. J. Immunol., 30 (4), p. 1040, 2000) identificada como a terceira molécula co-estimuladora da transdução do sinal que transduz um segundo sinal (sinal co-estimulador) necessário para a activação dos linfócitos tal como células T e acoplado com o sinal, regula a função dos linfócitos activados tal como as células T activadas.

Com base nas verificações dos últimos estudos relacionados com esta molécula, prevê-se que a molécula MIIAL esteja possivelmente envolvida em várias doenças (por exemplo, doenças autoimunes, alergias e inflamações) causadas pela activação de células imuno-concorrentes tal como células T (especialmente células T). Contudo, não há relatórios sobre a relação entre a modulação funcional da molécula MIIAL e a rejeição de enxertos (rejeição imunológica) que acompanha o transplante de tecido ou de um órgão, nem sobre tentativas para suprimir, tratar ou prevenir essas reacções de rejeição que acompanham o transplante de tecidos ou de órgãos, por meio da regulação da actividade da molécula MIIAL.

Além disso, já se identificou, muito recentemente, uma nova molécula designada por B7h, B7RP-1, GL50 ou LICOS que se considera ser um ligando que interage com a molécula de transdução do sinal co-estimulador MIIAL (Nature. Vol.402, No.6763, pp.827-832, 1999; Nature Medicine, Vol.5, No.12, pp.1365-1369, 1999; J. Immunology, Vol.164, pp.1653-1657, 2000; Curr. Biol., Vol.10, No.6, pp.333-336, 2000).

A identificação destes dois tipos de moléculas novas, nomeadamente MIIAL (COEI) e B7RP-1 (B7h, GL50, LICOS), revelaram que, além do conhecimento do primeiro e do segundo circuitos de transdução de sinal entre CD28 e CD80 (B7-1) / CD86 (B7-2) e entre CTLA4 e CD80 (B7-1) / CD 86 (B7-2), há um terceiro novo circuito de transdução de sinal co-estimulador que é essencial para a activação de linfócitos mencionada antes, tal como as células T e o controlo da função das células T activadas, que funciona através da interacção entre MIIAL (COEI) e B7RP-1 (B7h, GL50, LICOS).

Estão em progresso estudos exaustivos sobre as funções biológicas destas novas moléculas, a regulação de funções de linfócitos tal como células T através da terceira transdução de sinal co-estimulador por meio das moléculas e a relação entre a nova transdução de sinal e as doenças.

### **Descrição da invenção**

Mais especificamente, um dos objectivos da presente invenção consiste em providenciar processos e agentes farmacêuticos que suprimem, tratam ou previnem rejeições imunológicas (rejeição do enxerto) que acompanham o transplante de um tecido ou de um órgão (alo-transplante ou xeno-transplante) utilizando técnicas médicas e



farmacêuticas (por exemplo, agentes farmacêuticos tal como compostos com peso molecular baixo e anticorpos) para regular a função biológica de uma nova molécula, a MIIAL, que se considera que transduz um segundo sinal (sinal co-estimulador) necessário para a activação de linfócitos tal como células T e em conjunto com o sinal, regula a função dos linfócitos activados tal como de células T activadas.

Um outro objectivo consiste em providenciar processos para aumentar o efeito supressor na rejeição de enxertos por meio dos agentes imuno-supressores existentes (ciclosporina, azatioprina, esteróides adrenocorticais, FK-506, etc.) utilizando esses agentes farmacêuticos que regulam a função biológica da MIIAL (por exemplo, agentes farmacêuticos tal como compostos de baixo peso molecular e anticorpos).

Como resultado da investigação exaustiva relacionada com a função biológica da MIIAL de mamíferos e com um processo para a supressão da rejeição imunológica (rejeição do enxerto), que é um sério problema que acompanha os transplantes (alo-transplante ou xeno-transplante) de enxertos (células, um tecido ou um órgão), os requerentes verificaram que (1) os agentes farmacêuticos que regulam a função de MIIAL suprimem significativamente a rejeição imunológica (rejeição do enxerto) que acompanha os transplantes de tecidos ou órgãos e (2) o efeito supressor dos agentes imuno-supressores existentes, na rejeição de enxertos, é aumentado pela utilização de agentes farmacêuticos que regulam a função de MIIAL e completam a presente invenção.

Uma composição farmacêutica da presente invenção é útil como um produto farmacêutico para regular vários

reacções *in vivo* em que está envolvida a transdução de um sinal co-estimulador para as células que expressam MIIAL, mediado pelas MIIAL (por exemplo, a proliferação de células que expressam MIIAL, a produção de citocinas por meio de células que expressam MIIAL, a citólise imunitária ou a apoptose de células que expressam MIIAL e a actividade para induzir citotoxicidade celular dependente de anticorpos contras as células que expressam MIIAL) e/ou como um produto farmacêutico para a prevenção do início e/ou da progressão de várias doenças em que está envolvida a transdução de sinal mediada por MIIAL e para o tratamento ou a profilaxia das doenças.

Especificamente, uma composição farmacêutica da presente invenção pode regular (suprimir ou promover) a proliferação das células que expressam MIIAL ou pode regular (inibir ou promover) a produção de citocinas (por exemplo, interferão  $\gamma$  ou interleucina 4) por meio de células que expressam MIIAL e pode prevenir vários estados clínicos provocados por vários fenómenos fisiológicos em que está envolvida a transdução de sinal mediada por MIIAL e permite o tratamento ou a prevenção de várias doenças.

A utilização de uma composição farmacêutica da presente invenção permite a supressão, prevenção e/ou o tratamento da rejeição imunológica (rejeição do enxerto), que é um problema sério em terapias em que se transplanta um órgão (fígado, coração, pulmão, rim, pâncreas, etc.) uma parte dele ou um tecido (tal como pele, córnea e osso) de um dador transplantado (alo-transplante ou xeno-transplante) para um receptor afectado por uma doença cardiovascular severa.

Além disso, a utilização de uma composição farmacêutica da presente invenção permite o aumento do efeito supressor da rejeição dos enxertos por meio dos agentes imuno-supressores existentes administrados para suprimir a rejeição imunológica nessas terapias do transplante.

Mais especificamente, a presente invenção tem os objectivos que se seguem:

(1) Uma composição farmacêutica para a supressão, tratamento ou prevenção da rejeição de enxertos que acompanha o transplante de um órgão, uma porção dele ou um tecido, em que a referida composição compreende uma substância com actividade para regular a transdução de sinal mediada por MIIAL e um veículo aceitável sob o ponto de vista farmacêutico.

(2) Uma composição farmacêutica para aumentar o efeito de um ou mais agentes imuno-supressores na supressão, tratamento ou prevenção da rejeição de enxertos que acompanha o transplante de um órgão, uma porção dele ou um tecido, em que a referida composição compreende uma substância com actividade para regular a transdução de sinal mediada por MIIAL e um veículo aceitável sob o ponto de vista farmacêutico.

(3) A composição farmacêutica de (2), em que o referido agente imuno-supressor é um ou mais agentes terapêuticos seleccionados no grupo que consiste nos fármacos azatioprina, esteróides adrenocorticais, ciclosporina, mizoribina e tacrolimus (FK-506), micofenolato de mofetilo, leflunomide, sirolimus, desoxiespergualina, FTY720 e CTLA4.

(4) A composição farmacêutica de qualquer um de (1) a (3), em que o referido transplante é um alo-transplante.

(5) A composição farmacêutica de qualquer um de (1) a (3), em que o referido transplante é um xeno-transplante.

(6) A composição farmacêutica de qualquer um de (1) a (5), em que o referido órgão é fígado, coração, pulmão, rim ou pâncreas.

(7) A composição farmacêutica de qualquer um de (1) a (5), em que o referido tecido é tecido da pele, da córnea ou tecido ósseo.

(8) A composição farmacêutica de qualquer um de (1) a (7), em que a referida substância é uma substância proteinácea.

(9) A composição farmacêutica de (8) em que a referida substância proteinácea selecciona-se no grupo que consiste em:

- a) um anticorpo que se liga a MIIAL ou uma porção do referido anticorpo;
- b) um polipéptido que compreende toda ou uma porção de uma região extracelular de MIIAL;
- c) um polipéptido de fusão que compreende toda ou uma porção de uma região extracelular de MIIAL e toda ou uma porção de uma região constante da cadeia pesada de imunoglobulina; e
- d) um polipéptido que se liga a MIIAL.

(10) A composição farmacêutica de qualquer um de (1) a (7), em que a referida substância é uma substância não proteinácea.

(11) A composição farmacêutica de (10) em que a referida substância não proteinácea é ADN, ARN ou um composto quimicamente sintetizado.

Descreve-se aqui a seguir, em detalhe, a presente invenção, definindo os termos e os processos para a produção das substâncias utilizadas na presente invenção.

Aqui, o termo "mamífero" significa um ser humano, uma vaca, uma cabra, um coelho, um murganho, um rato, um hamster e um porquinho da Guiné; prefere-se um ser humano, uma vaca, um rato, um murganho ou um hamster e particularmente preferido é um ser humano.

"MIIAL", na presente invenção, é uma abreviatura para "molécula imunomoduladora que induz a activação linfocitária" e indica uma molécula da superfície da célula de um mamífero que tem a estrutura e a função descrita em relatórios anteriores (J. Immunol., 166 (1), p.1, 2001; J. Immunol., 165 (9), p.5035, 2000; Biochem. Biophys. Res. Commun., 276 (1), p.335, 2000; Immunity, 13 (1), p.95, 2000; J. Exp. Med., 192 (1), p.53, 2000; Eur. J. Immunol., 30 (4), p.1040, 2000; Int. Immunol., 12 (1), p.51, 2000; Nature, 397 (6716), p.263, 1999; números de acesso no GenBank: BAA82129 (humano); BAA82128 (rato); BAA82127 (variante de rato); BAA82126 (murganho)).

De uma forma especialmente preferida, o termo indica MIIAL derivadas de um ser humano (por exemplo, International Immunology, Vol. 12, No. 1, p.51-55, 2000).

Esta MIIAL é também chamada COEI (Nature, Vol.397, No.6716, p.263-266, 1999) ou antigénio JTT-1 /antigénio JTT-2 (pedido de patente japonesa publicada, não examinada No. (JP-A) Hei 11-29599, pedido de patente internacional No. WO98/38216) e estas designações de moléculas referem-se mutuamente à mesma molécula.

Além disso, "MIIAL", tal como referido na presente invenção, inclui um polipéptido que tem a sequência de aminoácidos da MIIAL de cada mamífero, descrita na literatura anterior, que a relata e, de uma forma especialmente preferida, também um polipéptido que tem praticamente a mesma sequência de aminoácidos que a MIIAL de um ser humano. Além disso, as variantes humanas de MIIAL semelhantes às variantes de MIIAL identificadas previamente derivadas de rato (número de acesso no GenBank: BAA82127) também estão incluídas nas "MIIAL" da presente invenção.

Aqui, a expressão "tendo praticamente a mesma sequência de aminoácidos" significa que a "MIIAL" da presente invenção inclui um polipéptido que tenha uma sequência de aminoácido em que múltiplos aminoácidos, preferencialmente 1 a 10 aminoácidos, particularmente preferido 1 a 5 aminoácidos, tenham sido substituídos, eliminados e/ou modificados e os polipéptidos com as sequências de aminoácidos em que múltiplos aminoácidos, preferencialmente 1 a 10 aminoácidos, particularmente preferido 1 a 5 aminoácidos, tenham sido adicionados, desde que os polipéptidos tenham praticamente as mesmas propriedades biológicas que os polipéptidos que compreendem a sequência de aminoácidos mostrada em relatórios anteriores.

Essas substituições, eliminações ou inserções dos aminoácidos podem conseguir-se de acordo com o processo usual (Experimental Medicine: SUPLEMENTO, "Handbook of Genetic Engineering" (1992), etc.).

Exemplos são a mutagénese de oligonucleótidos sintéticos dirigidos ao sítio (processo em duplex intervalado), mutagénese de pontos por meio da qual se

introduz aleatoriamente uma mutação num ponto por tratamento com nitrito ou sulfito, processo por meio do qual se prepara um mutante de eliminação com a enzima Bal31, etc, mutagénese de cassette, processo de rastreio do ligante, processo de desincorporação, processo de iniciador de desemparelhamento, processo de síntese do segmento de ADN, etc.

A mutagénese dirigida ao sítio de oligonucleótidos sintéticos (processo duplex intervalado) pode ser realizada, por exemplo, como se segue. A região que se deseja mutagenizar é clonada num vector do fago M13 com uma mutação de âmbar para preparar um ADN de fago de filamento simples. Depois, o ADN de RF I do vector M13 que não tem mutação de âmbar é linearizado por meio do tratamento com uma enzima de restrição, mistura-se o ADN com o ADN do fago mencionado antes, desnatura-se e hibrida-se formando assim um "ADN em duplex intervalado". Um oligonucleótido sintético no qual se introduziram mutações hibrida com o ADN em duplex intervalado e prepara-se um ADN de filamento duplo fechado de forma circular, por meio da reacção com polimerase de ADN e ligase de ADN. As células *mustS* de *E. coli*, deficientes na actividade de reparação de desemparelhamentos, são transfectadas com este ADN. As células de *E. coli* que não têm actividade supressora são infectadas com os fagos em crescimento e rastreiam-se apenas os fagos que não têm mutações de âmbar.

O processo pelo qual uma mutação pontual é introduzida com nitrito utiliza, por exemplo, o princípio que se menciona a seguir. Se se trata o ADN com nitrito, os nucleótidos são desaminados para mudar a adenina em hipoxantina, a citosina em uracilo e a guanina em xantina. Se se introduz o ADN desaminado nas células, "A:T" e "G:C"

são substituídos por "G:C" e "A:T", respectivamente, porque a base de hipoxantina, uracilo e xantina emparelha com citosina, adenina e timina, respectivamente, na replicação do ADN. Depois, os fragmentos de ADN de filamento simples tratados com nitrito hibridam com o "ADN em duplex intervalado" e depois as estirpes mutantes são separadas por manipulação da mesma maneira que na mutagénese dirigida ao sítio de oligonucleótidos sintéticos (processo em duplex intervalado).

O termo "citocina", tal como em "produção de uma citocina por meio de células que expressam MIIAL", na presente invenção, significa uma citocina arbitrária produzida por células que expressam MIIAL (especialmente, células T).

Exemplos de células T são as células T do tipo Th1 e do tipo Th2 e uma citocina da presente invenção significa, especificamente, uma citocina produzida pelas células T do tipo Th1 e/ou uma citocina arbitrária produzida pelas células T do tipo Th2.

As citocinas produzidas pelas células T do tipo Th1 incluem IFN- $\gamma$ , IL-2, FNT, IL-3 e citocinas produzidas por células T do tipo Th2 incluem IL-3, IL-4, IL-5, IL-10 e FNT (Cell, Vol.30, No.9, pp.343-346, 1998).

O termo "substância", tal como se utiliza na presente invenção, especificamente uma "substância com actividade para regular a transdução de sinal mediada por MIIAL" e, mais especificamente, uma "substância com actividade para inibir a proliferação de células que expressam MIIAL ou para inibir a produção de uma citocina por meio de células que expressam MIIAL" significa uma substância de ocorrência



natural ou uma substância arbitrária preparada artificialmente.

Aqui, a expressão "transdução do sinal mediada por MIIAL" significa transdução do sinal através de MIIAL, o que leva a uma alteração de qualquer fenotipo nas células que expressam MIIAL descritas antes ou nos exemplos que se seguem (uma alteração na proliferação das células, activação das células, inactivação das células, apoptose e/ou a capacidade para produzir uma citocina arbitrária a partir das células que expressam MIIAL).

"A substância" pode ser classificada principalmente em "substância proteinácea" e "substância não proteinácea".

Exemplos de "substâncias proteináceas" são os polipéptidos e anticorpos que se seguem (anticorpos policlonais, anticorpos monoclonais ou porções de anticorpos monoclonais).

Quando a substância é um anticorpo, é preferencialmente um anticorpo monoclonal. Quando a substância é um anticorpo monoclonal, inclui não apenas os anticorpos monoclonais derivados de mamíferos não humanos, mas também os anticorpos monoclonais quiméricos, recombinantes que se seguem, os anticorpos monoclonais humanizados recombinantes e os anticorpos monoclonais humanos.

Quando a substância é um polipéptido, inclui os polipéptidos, fragmentos de polipéptidos (oligopéptidos), polipéptidos de fusão e polipéptidos quimicamente modificados que se seguem. Exemplos de oligopéptidos são péptidos que compreendem 5 a 30 aminoácidos, preferencialmente 5 a 20 aminoácidos. Pode-se conceber uma

modificação química consoante as várias finalidades, por exemplo, aumentar o semi-período de vida no sangue, no caso da administração *in vivo* ou para aumentar a tolerância contra a degradação ou aumentar a absorção no tracto digestivo na administração oral.

Exemplos de polipéptidos são os que se seguem:

- (1) Um polipéptido que compreende toda ou uma porção de uma região extracelular de MIIAL;
- (2) um polipéptido de fusão que compreende toda ou uma porção de uma região extracelular de MIIAL e toda ou uma porção de uma região constante da cadeia pesada de imunoglobulina; ou
- (3) um polipéptido que se liga a MIIAL.

Exemplos de "substâncias não proteínáceas" são ADN, ARN e compostos sintetizados quimicamente.

Aqui, "ADN" significa "ADN útil como um ADN anti-paralelo de um fármaco que compreende uma sequência parcial de nucleótido de um ADN que codifica a MIIAL anterior (preferencialmente MIIAL humana) ou o seu ADN quimicamente modificado, que pode ser concebido com base no ADN (ADNc ou ADN genómico) que codifica a MIIAL". Especificamente, o ADN anti-paralelo pode inibir a transcrição do ADN que codifica a MIIAL no ARNm ou a tradução do ARNm numa proteína por hibridação com o ADN ou o ARN que codifica a MIIAL.

A frase "sequência parcial de nucleótidos", tal como se refere aqui, refere-se a uma sequência parcial de nucleótidos que compreende um número arbitrário de nucleótidos na região arbitrária. Uma sequência parcial de nucleótidos inclui 5 a 100 nucleótidos consecutivos,

preferencialmente 5 a 70 nucleótidos consecutivos, mais preferencialmente 5 a 50 nucleótidos consecutivos e ainda mais preferencialmente 5 a 30 nucleótidos consecutivos.

Quando se utiliza o ADN como um fármaco de ADN anti-paralelo, a sequência de ADN pode ser quimicamente modificada em parte de modo a alargar o semi-período de vida (estabilidade) no sangue quando o ADN é administrado a pacientes, para aumentar a permeabilidade da membrana intracitoplásmica do ADN ou para aumentar a resistência à degradação ou à absorção do ADN administrado oralmente nos órgãos digestivos. As modificações químicas incluem, por exemplo, a modificação de uma ligação de fosfato, uma ribose, um nucleótido, a parte de açúcar e a extremidade 3' e/ou a extremidade 5' na estrutura do ADN de um oligonucleótido.

As modificações das ligações de fosfato incluem, por exemplo, a conversão de uma ou mais ligações em ligações de fosfodiéster (D-oligo), ligações de fosforotioato, ligações de fosforoditioato (S-oligo), ligações de fosfonato de metilo (MP-oligo), ligações de fosforoamidato, ligações que não são de fosfato ou ligações de fosfonotioato de metilo ou as suas combinações. A modificação de uma ribose inclui, por exemplo, a conversão em 2'-fluororibose ou 2'-O-metilribose. A modificação de um nucleótido inclui, por exemplo, a conversão em 5'-propiniluracilo ou 2-aminoadenina.

Aqui, "ARN" significa ARN útil como um fármaco de ARN anti-paralelo que compreende uma sequência parcial de nucleótidos de um ARN que codifica a MIIAL anterior (preferencialmente MIIAL humana) ou o seu ARN quimicamente modificado, que pode ser concebido com base no ARN que

codifica a MIIAL". O ARN anti-paralelo pode inibir a transcrição do ADN que codifica a MIIAL no ARNm ou a tradução do ARNm numa proteína por hibridação com o ADN ou com o ARN que codifica a MIIAL.

A frase "sequência parcial de nucleótidos", tal como se utiliza aqui, refere-se a uma sequência parcial de nucleótidos que compreende um número arbitrário de nucleótidos na região arbitrária. Uma sequência parcial de nucleótidos inclui 5 a 100 nucleótidos consecutivos, preferencialmente 5 a 70 nucleótidos consecutivos, mais preferencialmente 5 a 50 nucleótidos consecutivos e ainda mais preferencialmente 5 a 30 nucleótidos consecutivos.

A sequência de ARN anti-paralelo pode ser quimicamente modificada, em parte, de modo a alargar o semi-período de vida no sangue quando o ARN é administrado a pacientes para aumentar a permeabilidade da membrana intracitoplásmica do ARN ou para aumentar a resistência à degradação ou à absorção de ARN administrado oralmente nos órgãos digestivos. As modificações químicas incluem modificações tais como as que se aplicam ao ADN anti-paralelo anterior.

Exemplos de "um composto quimicamente sintetizado" são os compostos arbitrários excluindo o ADN, o ARN e as substâncias proteínáceas anteriores, com um peso molecular de cerca de 100 a cerca de 1000 ou menos, preferencialmente um composto com um peso molecular de cerca de 100 a cerca de 800 e mais preferencialmente um peso molecular de cerca de 100 a cerca de 600.

O termo "polipéptido", incluído na definição anterior de "substância", significa uma porção (um fragmento) de uma cadeia de polipéptido que constitui a MIIAL (preferencial-

mente MIIAL humana), preferencialmente toda ou uma porção de uma região extracelular do polipéptido que constitui MIIAL (pode-se adicionar, eventualmente, 1 a 5 aminoácidos no terminal N e/ou no terminal C da região).

MIIAL, de acordo com a presente invenção, é uma molécula da transmembrana que penetra a membrana da célula, compreendendo 1 ou 2 cadeias de polipéptido.

Aqui, uma "proteína da transmembrana" significa uma proteína que está ligada à membrana da célula através de uma região peptídica hidrofóbica que penetra a dupla camada de lípidos da membrana uma ou várias vezes e cuja estrutura é, no seu todo, composta por três regiões principais, isto é, uma região extracelular, uma região da transmembrana e uma região citoplásmica, tal como se vê em muitos receptores ou moléculas da superfície das células. Essa proteína da transmembrana constitui cada um dos receptores ou a molécula da superfície das células como um monómero ou como um homodímero, heterodímero ou oligómero acoplado com uma ou várias cadeias com as mesmas sequências de aminoácidos ou com sequências diferentes.

Aqui, uma "região extracelular" significa toda ou uma porção de uma estrutura parcial (região parcial) de toda a estrutura da proteína da transmembrana mencionada antes em que a estrutura parcial existe fora da membrana. Por outras palavras, significa toda ou uma porção da região da proteína da transmembrana, excluindo a região incorporada na membrana (região da transmembrana) e a região que existe no citoplasma no seguimento da região da transmembrana (região citoplásmica).

"Um polipéptido de fusão", incluído na "substância proteinácea" anterior, significa um polipéptido de fusão que compreende toda ou parte de uma região extracelular de um polipéptido constituinte da MIIAL (preferencialmente MIIAL humana) e "toda ou porção da região constante da cadeia pesada de imunoglobulina (Ig, preferencialmente Ig humana)". Preferencialmente, o polipéptido de fusão é um polipéptido de fusão com a região extracelular de MIIAL e uma porção da região constante da cadeia pesada da IgG humana e, particularmente preferido, um polipéptido de fusão da região extracelular de MIIAL e uma região (Fc) de cadeia pesada de IgG humana compreendendo uma região charneira, domínio C<sub>P</sub>2 e domínio C<sub>P</sub>3. Como IgG, prefere-se a IgG1 e como MIIAL, prefere-se uma MIIAL humana, de murganho ou de rato (preferencialmente humana).

A expressão "toda ou parte da região constante da cadeia pesada de imunoglobulina (Ig)", tal como se utiliza aqui, significa que a região constante da região Fc da cadeia pesada de imunoglobulina de origem humana (cadeia P) ou uma parte dela. A imunoglobulina por ser qualquer imunoglobulina que pertença a qualquer classe e a qualquer subclasse. Especificamente, a imunoglobulina inclui as IgGs (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), IgM, IgAs (IgA1 e IgA2), IgD e IgE. Preferencialmente, a imunoglobulina é IgG (IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4) ou IgM. Exemplos de imunoglobulinas particularmente preferidas da presente invenção são as que pertencem às IgGs de origem humana (IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4).

A imunoglobulina tem uma unidade estrutura em forma de Y em que quatro cadeias, compostas por duas cadeias leves homólogas (cadeias L) e duas cadeias pesadas homólogas (cadeias P) que estão ligadas através de pontes de

disulfureto (ligações S-S). A cadeia leve é composta pela região variável de cadeia leve ( $V_L$ ) e uma região constante de cadeia leve ( $C_L$ ). A cadeia peada é composta pela região variável de cadeia peada ( $V_P$ ) e uma região constante de cadeia pesada ( $C_P$ ).

A região constante de cadeia pesada é composta por alguns domínios com sequências de aminoácidos únicas para cada classe (IgG, IgM, IgA, IgD e IgE) e cada sub-classe (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, IgA1 e IgA2).

A cadeia pesada das IgGs (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) é composta pelo domínio  $C_{P1}$ , pela região charneira, pelo domínio  $C_{P2}$  e pelo domínio  $C_{P3}$  de  $V_P$ , por esta ordem, a partir do terminal N.

Do mesmo modo, a cadeia pesada de IgG1 é composta pelo domínio de  $C_{Y11}$ , região charneira, domínio  $C_{Y12}$  e domínio  $C_{Y13}$  de  $V_P$ , por esta ordem, a partir do terminal N. A cadeia pesada de IgG2 é composta pelo domínio  $C_{Y21}$ , região charneira, domínio  $C_{Y22}$  e domínio  $C_{Y23}$  de  $V_P$ , por esta ordem, a partir do terminal N. A cadeia pesada de IgG3 é composta pelo domínio  $C_{Y31}$ , região charneira, domínio  $C_{Y32}$  e domínio  $C_{Y33}$  de  $V_P$ , por esta ordem, a partir do terminal N. A cadeia pesada de IgG4 é composta pelo domínio  $C_{Y41}$ , região charneira, domínio  $C_{Y42}$  e domínio  $C_{Y43}$  de  $V_P$ , por esta ordem, a partir do terminal N.

A cadeia pesada de IgA é composta pelo domínio  $C_{\alpha 1}$ , região charneira, domínio  $C_{\alpha 2}$  e domínio  $C_{\alpha 3}$  de  $V_P$ , por esta ordem, a partir do terminal N.

Do mesmo modo, a cadeia pesada de IgA1 é composta pelo domínio  $C_{\alpha 11}$ , região charneira, domínio  $C_{\alpha 12}$  e domínio  $C_{\alpha 13}$

de  $V_P$ , por esta ordem, a partir do terminal N. A cadeia pesada de IgA2 é composta pelo domínio  $C\alpha_{21}$ , região charneira, domínio  $C\alpha_{22}$  e domínio  $C\alpha_{23}$  de  $V_P$ , por esta ordem, a partir do terminal N.

A cadeia pesada de IgD é composta pelo domínio  $C\delta_1$ , região charneira, domínio  $C\delta_2$  e domínio  $C\delta_3$  de  $V_P$ , por esta ordem, a partir do terminal N.

A cadeia pesada de IgM é composta pelo domínio  $C\mu_1$ , domínio  $C\mu_2$ , domínio  $C\mu_3$  e domínio  $C\mu_4$  de  $V_P$ , por esta ordem, a partir do terminal N e não tem região charneira como se vê na IgG, na IgA e na IgD.

A cadeia pesada de IgE é composta pelo domínio  $C\epsilon_1$ , domínio  $C\epsilon_2$ , domínio  $C\epsilon_3$  e domínio  $C\epsilon_4$  de  $V_P$ , por esta ordem, a partir do terminal N e sem região charneira como se vê na IgG, na IgA e na IgD.

Se, por exemplo, se trata IgG com papaína, ela cliva num local próximo do terminal N do lado oposto às ligações de sulfureto que existem na região de charneira em que as ligações de disulfureto se ligam às duas cadeias pesadas para gerar dois Facs homólogos, nos quais um fragmento de cadeia pesada composto por  $V_P$  e  $C_P1$  está ligado a uma cadeia leve através de uma ligação de disulfureto; e uma Fc, em que dois fragmentos homólogos de cadeia pesada compostos pela região charneira, o domínio  $C_P2$  e o domínio  $C_P3$  estão ligados através de ligações de disulfureto (ver "Immunology Illustrated", original, 2ª ed., Nankodo, pp.65-75 (1992); e "Focus of Newest Medical Science Recognition Mechanism of Immune System", Nankodo, pp.4-7 (1991); e etc.).



Nomeadamente, "uma porção de uma região constante da cadeia pesada de imunoglobulina" mencionada antes significa uma porção da região constante da uma cadeia pesada de imunoglobulina com características estruturais tal como as mencionadas antes e, preferencialmente, é uma região constante sem o domínio C1 ou a região Fc. Especificamente, um exemplo disto é uma região composta pela região charneira, o domínio C2 e o domínio C3 de cada uma das IgG, IgA e IgD ou é uma região composta pelo domínio C2, o domínio C3 e o domínio C4 de cada uma das IgM e IgE. Um exemplo particularmente preferido é o da região Fc de uma IgG1 de origem humana.

O polipéptido de fusão mencionado antes tem a vantagem de ser extremamente fácil de purificar utilizando uma cromatografia de afinidade em coluna utilizando a propriedade da proteína A que se liga especificamente ao fragmento de imunoglobulina, porque o polipéptido de fusão da presente invenção tem uma porção de uma região constante (por exemplo Fc) de uma imunoglobulina tal como IgG como mencionado antes como parceiro de fusão. Além disso, dado que existem disponíveis vários anticorpos contra a Fc de várias imunoglobulinas, pode-se realizar facilmente um imuno-ensaio para os polipéptidos de fusão com anticorpos contra a Fc.

"Um polipéptido que se liga à MIIAL" está englobado num "polipéptido" incluído na definição anterior de "substância".

Um exemplo específico de "um polipéptido que se liga a MIIAL" é uma porção de um polipéptido ou um polipéptido inteiro que compreende uma molécula conhecida designada por B7h, B7RP-1, GL50 ou LICOS, que é um ligando que interage

com MIIAL (Nature, Vol. 402, No. 6763, pp.827-832, 1999; Nature Medicine, Vol. 5, No. 12, pp.1365-1369, 1999; J. Immunology, Vol. 164, pp.1653-1657, 2000; Curr. Biol., Vol. 10, No.6, pp.333-336, 2000).

Preferencialmente, o polipéptido é um polipéptido que compreende toda ou uma porção de uma região extracelular dos ligandos anteriores (B7h, B7RP-1, GL50, LICOS) ou um polipéptido de fusão que compreende o polipéptido e toda ou uma parte da região constante da cadeia pesada de imunoglobulina (preferencialmente uma imunoglobulina humana). Aqui, as expressões "região extracelular" e "região constante de cadeia pesada de imunoglobulina" têm os mesmos significados já mencionados antes.

Os polipéptidos, porções de polipéptido (fragmento) e os polipéptidos de fusão mencionados antes podem ser produzidos não apenas pela tecnologia de ADN recombinante, tal como se menciona a seguir, mas também por um processo bem conhecido na técnica tal como o processo de síntese química ou um processo de cultura de células ou uma modificação desses processos.

O "anticorpo" da presente invenção pode ser um anticorpo policlonal (anti-soro) ou um anticorpo monoclonal contra MIIAL de mamífero (particularmente e preferencialmente MIIAL humana) definido antes e, preferencialmente, um anticorpo monoclonal.

Especificamente, o anticorpo é um anticorpo com actividade para inibir a proliferação das células que expressam MIIAL por meio da ligação a MIIAL ou para inibir a produção de interferão  $\gamma$  ou de interleucina-4 por meio de células que expressam MIIAL através da ligação a MIIAL.

Os anticorpos da presente invenção podem ser anticorpos naturais obtidos por imunização de mamíferos tais como murganhos, ratos, hamsters, porquinhos da Guiné e coelhos, com um antigénio tal como células (células naturais, linhas de células, células de tumor, etc.) expressando a MIIAL da presente invenção, transformantes preparados utilizando a tecnologia de ADN recombinante de modo a sobre-expressar MIIAL na sua superfície, polipéptidos que constituem as MIIAL ou os polipéptidos de fusão mencionados antes que compreendem o polipéptido da MIIAL ou a região extracelular de MIIAL. Os anticorpos da presente invenção também incluem anticorpos quiméricos e anticorpos humanizados (anticorpos enxertados nas RDC) que podem ser produzidos utilizando animais transgénicos que produzem o anticorpo humano.

Os anticorpos monoclonais incluem os que têm qualquer isótopo de IgG, IgM, IgA, IgD ou IgE. IgG ou IgM são as preferidas.

Um anticorpo policlonal (anti-soro) ou um anticorpo monoclonal podem ser produzidos por processos conhecidos. Nomeadamente, imuniza-se um mamífero, preferencialmente um murganho, rato, hamster, porquinho da Guiné, coelho, gato, cão, porco, cabra, cavalo ou vaca ou, mais preferencialmente, um murganho, rato, hamster, porquinho da Guiné ou coelho, por exemplo, com um antigénio mencionado antes, se necessário com adjuvante de Freund.

Pode obter-se um anticorpo policlonal a partir do soro obtido de um animal imunizado daquele modo. Além disso, os anticorpos monoclonais produzem-se como se segue. Os hibridomas preparam-se a partir das células que produzem anticorpos obtidas do animal assim imunizado e células de

mieloma que não são capazes de produzir auto-anticorpos. Os hibridomas são clonados e rastreiam-se os clones que produzem os anticorpos monoclonais que exibem uma afinidade específica para o antígeno utilizado para imunizar o mamífero.

Especificamente, um anticorpo monoclonal pode ser produzido como se segue. As imunizações realizam-se por injeção ou implante, uma vez ou várias vezes, de um antígeno mencionado antes como um imunogénio, se necessário, com adjuvante de Freund, subcutaneamente, intramuscularmente, intravenosamente, através da sola do pé ou intraperitonealmente num mamífero não humano, especificamente um murganho, rato, hamster, porquinho da Guiné ou coelho, preferencialmente um murganho, rato, hamster (incluindo um animal transgénico gerado de modo a produzir anticorpos derivados de outro animal tal como um murganho transgénico que produz o anticorpo humano mencionado a seguir). Normalmente, as imunizações realizam-se de uma a quatro vezes, cada um delas de catorze em catorze dias depois da primeira imunização. As células que produzem o anticorpo obtêm-se dos mamíferos assim imunizados em cerca de um a cinco dias depois da última imunização. A frequência e o intervalo das imunizações podem ser arrançados apropriadamente consoante, por exemplo, a propriedade do imunogénio utilizado.

Os hibridomas que segregam um anticorpo monoclonal podem ser preparados pelo processo de Köhler e Milstein (Nature, Vol. 256, pp.495-497 (1975)) ou por meio desse processo modificado. Nomeadamente, preparam-se os hibridomas fundindo as células que produzem os anticorpos contidos num baço, nódulo linfático, medula óssea ou amígdala, obtidos de um mamífero não humano imunizado, tal

como se mencionou antes, preferencialmente um baço, com mielomas sem a capacidade de produzir um auto-anticorpo, que derivam, preferencialmente de um mamífero tal como um murganho, rato, hamster, porquinho da Guiné, coelho ou ser humano ou, mais preferencialmente, um murganho, um rato ou um ser humano.

Por exemplo, pode-se utilizar, como mieloma para a fusão das células, um mieloma derivado de um murganho P3/X63-AG8.653 (653), P3/NSI/1-Ag4-1 (NS-1), P3/X63-Ag8.U1 (P3U1), SP2/0-Ag14 (Sp2/0, Sp2), PAI, F0, NSO ou BW5147, um mieloma derivado de rato 210RCY3-Ag.2.3 ou um mieloma derivado de um ser humano U-266AR1, GM1500-6TG-A1-2, UC729-6, CEM-AGR, D1R11 ou CEM-T15.

Os hibridomas que produzem anticorpos monoclonais podem ser rastreados por meio de hibridomas de cultura, por exemplo, em placas de microtitulação e medindo a reactividade do sobrenadante da cultura em poços em que se observa o crescimento do hibridoma, com o imunogénio utilizado para a imunização mencionada antes, por exemplo, por meio de um imuno-ensaio tal como RIA e ELISA.

Os anticorpos monoclonais podem ser produzidos a partir de hibridomas por meio de cultura de hibridomas *in vitro* ou *in vivo* tal como no fluido de ascites de murganho, rato, hamster, porquinho da Guiné ou coelho preferencialmente murganho e isolando os anticorpos do sobrenadante da cultura resultante ou do fluidos das ascites de um mamífero.

A cultura de hibridomas *in vitro* pode ser realizada consoante, por exemplo, as propriedades das células a pôr em cultura, o objecto do estudo e as várias condições do

processo de cultura, utilizando meios nutrientes conhecidos ou qualquer meio nutriente derivado de um meio básico conhecido para o crescimento, manutenção e armazenagem dos hibridomas para produzir anticorpos monoclonais no sobrenadante da cultura.

Exemplos de meios básicos são os meios com uma baixa concentração em cálcio tal como meio Ham'F12, meio MCDB153 ou meio MEM com uma baixa concentração em cálcio e meios com uma elevada concentração em cálcio tal como meio MCDB104, meio MEM, meio D-MEM, meio RPMI1640, meio ASF104 ou meio RD. O meio básico pode conter, por exemplo, soros, hormonas, citocinas e/ou várias substâncias, orgânicas ou inorgânicas, consoante o objectivo.

Os anticorpos monoclonais podem ser isolados e purificados a partir do sobrenadante da cultura ou dos fluidos de ascites mencionados antes, por meio da precipitação em sulfato de amónio saturado, processo de precipitação de euglobulina, processo do ácido caprílico, processo do ácido caprílico, cromatografia de permuta iónica (DEAE ou DE52) e cromatografia de afinidade utilizando uma coluna anti-imunoglobulina ou uma coluna de proteína A.

Um "anticorpo monoclonal, quimérico, recombinante" é um anticorpo monoclonal preparado por engenharia genética e significa, especificamente, um anticorpo quimérico tal como um anticorpo monoclonal quimérico de murganho/humano cujas regiões variáveis derivam de uma imunoglobulina de um mamífero não humano (murganho, rato, hamster, etc.) e cujas regiões constantes derivam de uma imunoglobulina humana.

Uma região constante derivada de uma imunoglobulina humana tem uma única sequência de aminoácidos para cada isotipo tal como IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgA, IgD e IgE. A região constante do anticorpo monoclonal, quimérico, recombinante pode ser de uma imunoglobulina humana que pertença a qualquer isotipo. Preferencialmente, é uma região constante de IgG humana.

Um anticorpo monoclonal quimérico pode ser produzido, por exemplo, como se segue. Não é necessário dizer que o processo de produção não está limitado.

Um anticorpo monoclonal, quimérico de murganho/humano pode ser preparado com referência à Experimental Medicine: suplemento, Vol. 1.6, No. 10 (1988); e ao pedido de patente japonesa examinada e publicada No. (JP-A) Hei 3-73280. Nomeadamente, pode-se preparar inserindo operacionalmente o gene CP (gene C que codifica a região constante da cadeia P) obtida de um ADN que codifica uma imunoglobulina humana a jusante dos genes activos de V<sub>P</sub> (gene VDJ rearranjado que codifica a região variável da cadeia P) obtido de um ADN que codifica um anticorpo monoclonal de murganho isolado de um hibridoma que produz o anticorpo monoclonal de murganho e o gene C<sub>L</sub> (gene C que codifica a região constante da cadeia L) obtido de um ADN que codifica uma imunoglobulina humana a jusante dos genes activos de V<sub>L</sub> (gene VJ rearranjado que codifica a região variável da cadeia L) obtido de um ADN que codifica um anticorpo monoclonal de murganho isolado do hibridoma, no mesmo vector ou num vector diferente, de uma forma expressível, seguido da transformação das células hospedeiras com o vector de expressão e depois fazendo a cultura dos transformantes.

Especificamente, primeiro extraem-se os ADNs a partir de hibridomas que produzem anticorpos monoclonais de murganho, pelo processo usual, digeridos com as enzimas de restrição apropriadas (por exemplo, EcoRI e HindIII), submetem-se a electroforese (utilizando, por exemplo, 0,7 % de gel de agarose) e analisaram-se por "Southern blotting". Depois do gel da electroforese ser corado, por exemplo, com brometo de etídio e fotografado, dão-se posições de marcador ao gel, lava-se duas vezes com água e embebe-se em HCl 0,25 M durante 15 minutos. Depois, embebe-se o gel numa solução de NaOH 0,4 N durante 10 minutos com uma ligeira agitação. Transferem-se os ADNs para um filtro durante 4 horas pelo processo usual. Recupera-se o filtro e lava-se duas vezes com 2x SSC. Depois de se ter secado suficientemente o filtro, leva-se a um forno a 75 °C durante 3 horas. Depois de ter ido ao forno, trata-se o filtro com 0,1 x SSC/0,1 % de SDS a 65 °C durante 30 minutos. Depois, embebe-se em 3 x SSC/0,1 % de SDS. Trata-se o filtro obtido com uma solução de pré-hibridação, num saco de plástico, a 65 °C durante 3 a 4 horas.

Em seguida, adiciona-se ao saco o ADN sonda marcado com <sup>32</sup>P e uma solução de hibridação e faz-se reagir a 65 °C durante cerca de 12 horas. Depois da hibridação, lava-se o filtro com uma concentração de sal apropriada, à temperatura de reacção e durante o tempo (por exemplo, 2 x SSC/0,1 % de SDS, temperatura ambiente, 10 minutos) apropriados. Põe-se o filtro num saco de plástico com um pequeno volume de 2 x SSC e submete-se a uma autoradiografia depois de se selar o saco.

O gene VDJ e o gene VJ rearranjados que codificam a cadeia P e a cadeia L de um anticorpo monoclonal de murganho são identificados pela análise de "Southern



blotting" mencionada antes. A região, que compreende o fragmento de ADN identificado, é fraccionada por centrifugação com um gradiente de densidade de sacarose e insere-se num vector de fago (por exemplo, Charon 4A, Charon 28,  $\lambda$ EMBL3 e  $\lambda$ EMBL4). Transforma-se *E. coli* (por exemplo LE392 e NM539) com o vector de fago para gerar uma biblioteca genómica. A biblioteca genómica é rastreada por uma técnica de hibridação de placas tal como o processo de Benton-Davis (Science, Vol. 196, pp.180-182 (1977)) utilizando as sondas apropriadas (gene J da cadeia P, gene J de cadeia L ( $\kappa$ ), etc.) para se obter clones positivos que compreendem o gene VDJ ou o gene VJ rearranjados. Fazendo um mapa de restrição e determinando a sequência de nucleótidos dos clones obtidos, confirma-se se se obtêm os genes compreendem os desejados gene (VDJ) de  $V_P$  ou o gene (VJ) de  $V_L$  rearranjados.

Separadamente, isolou-se o gene  $C_P$  humano e o gene  $C_L$  humano utilizados para a quimerização. Por exemplo, quando se produz um anticorpo quimérico com IgG1 humana, isola-se o gene  $C_{\gamma 1}$  como um gene de  $C_P$  e um gene CK como um gene de  $C_L$ . Estes genes podem ser isolados a partir de uma biblioteca genómica humana com o gene  $C_{\gamma 1}$  de murganho e o gene CK de murganho, correspondendo ao gene humano  $C_{\gamma 1}$  e o gene humano Ck, respectivamente, como sondas, tirando vantagem da elevada homologia entre as sequências de nucleótidos do gene de imunoglobulina de murganho e o gene da imunoglobulina humana.

Especificamente, isolam-se fragmentos de ADN que compreendem o gene CK humano e uma região potenciadora, a partir da biblioteca genómica humana de Charon 4A  $\lambda$  HaeIII-AluI (Cell, Vol.15, pp.1157-1174 (1978)), por exemplo, utilizando um fragmento de HindIII-BamHI de 3 kb do clone

Ig146 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 75, pp.4709-4713 (1978)) e um fragmento de EcoRI de 6,8 kb do clone MEP10 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 78, pp.474-478 (1981)) como sondas. Além disso, por exemplo, depois do ADN do hepatócito fetal humano ter sido digerido com HindIII e fraccionado por meio de electroforese em gel de agarose, insere-se um fragmento de 5,9 kb em  $\lambda$ 788 e depois isola-se o gene humano C $\gamma$ 1 com as sondas mencionadas antes.

Utilizando o gene V<sub>P</sub> de murganho, o gene V<sub>L</sub> de murganho, o gene humano de C<sub>P</sub> e o gene humano de C<sub>L</sub> assim obtidos e tomando a região promotora e a região potenciadora em consideração, insere-se o gene humano de C<sub>P</sub> a jusante do gene de murganho da V<sub>P</sub> e insere-se o gene humano de C<sub>L</sub> a jusante do gene de V<sub>L</sub> num vector de expressão tal como pSV2gpt ou pSV2neo com as enzimas de restrição apropriadas e a ligase de ADN, pelo processo usual. Neste caso, os genes quiméricos do gene de murganho de V<sub>P</sub> gene humano de C<sub>P</sub> e o gene de murganho de V<sub>L</sub>/gene humano de C<sub>L</sub> podem ser inseridos, respectivamente, no mesmo vector de expressão ou em diferentes vectores de expressão.

Os vectores de expressão onde estão inseridos os genes quiméricos assim preparados são introduzidos em mielomas que não produzem anticorpos, por exemplo, células P3X63·Ag8·653 ou células SP210 pelo processo da fusão de protoplastos, o processo de DEAE-dextrano, o processo de fosfato de cálcio ou o processo de electroporação. Os transformantes são rastreados por meio de uma cultura num meio contendo um fármaco correspondendo ao gene que tem resistência ao fármaco inserido no vector de expressão e depois obtêm-se as células que produzem os anticorpos monoclonais quiméricos desejados.

Os anticorpos monoclonais quiméricos desejados são obtidos a partir do sobrenadante da cultura de células que produzem os anticorpos assim rastreadas.

O "anticorpo monoclonal humanizado (anticorpo enxertado numa RDC)" da presente invenção é um anticorpo monoclonal preparado por engenharia genética e significa especificamente um anticorpo monoclonal humanizado em que uma porção ou todas as regiões de determinação de complementaridade da região hipervariável derivam das regiões de determinação de complementaridade da região hipervariável de um anticorpo monoclonal de um mamífero não humano (murganho, rato, hamster, etc.), as regiões do sistema da região variável derivam de regiões do sistema da região variável da imunoglobulina humana e a região constante deriva de uma região constante de uma imunoglobulina derivada de um ser humano.

As regiões de determinação de complementaridade da região hipervariável existem na região hipervariável na região variável de um anticorpo e significa três regiões que directamente e complementarmente se ligam a um antigénio (resíduos de determinação de complementaridade, RDC1, RDC2 e RDC3). As regiões do sistema da região variável significa quatro regiões comparativamente conservadas situadas a montante, a jusante ou entre as três regiões de determinação de complementaridade (região do sistema, RS1, RS2, RS3 e RS4).

Por outras palavras, um anticorpo monoclonal humanizado significa que todas as regiões, excepto uma porção ou todas as regiões de determinação de complementaridade da região hipervariável de um anticorpo monoclonal derivado de um mamífero não humano foram

substituídas pelas regiões correspondentes derivadas de uma imunoglobulina humana.

A região constante derivada de uma imunoglobulina humana tem uma sequência única de aminoácidos para cada isotipo tal como IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgA, IgD e IgE. A região constante de um anticorpo monoclonal humano na presente invenção pode ser a de uma imunoglobulina humana pertencendo a qualquer isotipo. Preferencialmente, é uma região constante de IgG humana. As regiões do sistema da região constante derivada de uma imunoglobulina humana não estão particularmente limitadas.

Um anticorpo monoclonal humanizado pode ser produzido, por exemplo, como se segue. É escusado dizer que o processo de produção não está limitado.

Por exemplo, um anticorpo monoclonal humanizado recombinante, derivado de um anticorpo monoclonal de murganho pode ser preparado por engenharia genética, referido na tradução japonesa publicada de publicação internacional (JP-WA) No. Hei 4-506458 e JP-A Sho 62-296890. Nomeadamente, pelo menos um gene de uma RDC de cadeia P de murganho e pelo menos um gene de uma RDC de cadeia L de murganho, correspondendo ao gene de uma RDC de cadeia P de murganho, são isolados a partir de hibridomas que produzem anticorpos monoclonais de murganho e o gene humano de cadeia P que codifica regiões completas excepto a RDC de cadeia P humana correspondendo à RDC de cadeia P de murganho mencionada antes e o gene de cadeia L humana que codifica toda a região excepto a RDC de cadeia L humana correspondendo à RDC de cadeia L de murganho mencionada antes, são isolados a partir dos genes de imunoglobulina humana.

Os genes da RDC de cadeia P de murganho e os genes da cadeia P humana assim isolados são inseridos operacionalmente num vector apropriado de modo a poderem ser expressos. Do mesmo modo, os genes da RDC de cadeia L de murganho e os genes da cadeia L humana assim isolados são inseridos operacionalmente num outro vector apropriado de modo a poderem ser expressos. Alternativamente, os genes da RDC de cadeia P de murganho/os genes da cadeia H humana e os genes da RDC de cadeia L de murganho/os genes da cadeia L humana podem ser operacionalmente inseridos no mesmo vector de expressão de uma forma expressível. As células hospedeiras são transformadas com o vector de expressão assim preparado para se obter transformantes que produzem o anticorpo monoclonal humanizado. Fazendo a cultura dos transformantes, obtém-se o desejado anticorpo monoclonal humanizado a partir do sobrenadante da cultura.

O "anticorpo monoclonal humano" é uma imunoglobulina em que todas as regiões que compreendem a região variável e a região constante de cadeia P e a região variável e a região constante de cadeia L que constituem a imunoglobulina derivam de genes que codificam a imunoglobulina humana.

O anticorpo humano (preferencialmente o anticorpo monoclonal humano) pode ser produzido por processos bem conhecidos, por exemplo, da mesma maneira que o processo de produção dos anticorpos policlonais ou monoclonais mencionados antes, por imunização, com um antigénio, um animal transgénico preparado por integração de pelo menos um gene de imunoglobulina humana no local do gene de um mamífero não humano tal como um murganho.

Por exemplo, um murganho transgênico que produz anticorpos humanos é preparado pelos processos descritos em Nature Genetics, Vol. 7, pp. 13-21 (1994); Nature Genetics, Vol.15, pp.146-156 (1997); JP-WA Hei 4-504365; JP-WA Hei 7-509137; Nikkei Science, No.6, pp. 40-50 (1995); WO94/25585; Nature, Vol.368, pp. 856-859 (1994); e JP-WA No. Hei 6-500233.

Além disso, também se pode aplicar uma técnica recentemente desenvolvida para a produção de uma proteína, derivada de um ser humano, de leite de vacas ou porcas transgênicas (Nikkei Science, pp. 78-84 (Abril, 1997)).

A frase "porção de um anticorpo", tal como se utiliza na presente invenção, significa uma região parcial de um anticorpo monoclonal tal como mencionado antes. Especificamente, significa  $F(ac')_2$ ,  $Fac'$ ,  $Fac$ ,  $Fv$  (fragmento variável do anticorpo),  $sFv$ ,  $dsFv$  ( $Fv$  estabilizado com dissulfureto) ou  $dAc$  (anticorpo com um único domínio) (Exp. Opin. Ther. Patents, Vol.6, No.5, pp.441-456 (1996)).

" $F(ac')_2$ " e " $Fac$ " podem ser produzidos por tratamento da imunoglobulina (anticorpo monoclonal) com uma protease tal como pepsina e papaína e significa um fragmento de anticorpo gerado por digestão de uma imunoglobulina próxima das ligações de dissulfureto nas regiões de charneira existentes entre cada uma das duas cadeias P. Por exemplo, a papaína cliva a IgG a montante das ligações de dissulfureto nas regiões de charneira existentes entre cada uma das duas cadeias P para gerar dois fragmentos homólogos do anticorpo em que a cadeia L é composta pela  $V_L$  (região variável da cadeia L) e  $C_L$  (região constante da cadeia L) e um fragmento da cadeia P composto pela  $V_P$  (região variável

da cadeia P) e C<sub>P</sub>γ1 (região γ1 na região constante de cadeia P) estão ligados nas suas regiões do terminal C através de uma ponte de dissulfureto. Cada um destes dois fragmentos homólogos do anticorpo é designado por Fac' (Fab' na terminologia inglesa). A pepsina também cliva a IgG a jusante das ligações de dissulfureto nas regiões de charneira existentes entre cada uma das duas cadeias P para gerar um fragmento de anticorpo ligeiramente maior do que o fragmento em que os dois Fac's mencionados antes estão ligados na região de charneira. Este fragmento de anticorpo é designado por F(ac')<sub>2</sub> (F(ab')<sub>2</sub> na terminologia inglesa).

A expressão "rejeição do enxerto" da presente invenção refere-se a várias respostas imunitárias que tentam rejeitar e eliminar um enxerto (uma parte de um organismo vivo que é transplantada; uma célula, um tecido ou um órgão) de um dador cujos antecedentes genéticos são diferentes dos do receptor (isto é, alo-transplante ou xeno-transplante) dado que o receptor reconhece o enxerto como uma substância estranha. As respostas imunitárias que acompanham este transplante podem ser classificadas em (1) rejeição hiper-aguda, que é uma rejeição forte que ocorre imediatamente depois do transplante; (2) rejeição aguda, que se observa alguns meses após o transplante; e (3) rejeição crónica observada vários meses após o transplante. Além disso, embora a imunidade celular devida às células imuno-concorrentes representadas pelas células T e a imunidade humoral devida aos anticorpos, ocorram de uma forma intrinsecamente coordenada, a resposta principal é dada pela imunidade celular.

Como resultado da rejeição de enxerto, o enxerto, em última análise, torna-se necrótico e cai. Além disso, o paciente desenvolve não apenas vários sintomas sistémicos

severos tal como febre, leucocitose e fadiga, mas também edemas e amolecimento no sítio do transplante. Além disso, podem ocorrer complicações severas como infecções.

Em particular, quando se transplanta um enxerto xenogénico tal como o de um porco, ocorre um problema sério de rejeição hiper-aguda quando o enxerto é rejeitado no prazo de minutos.

O termo "enxerto", da presente invenção, refere-se a "um órgão ou parte dele" ou a "um tecido" que é transplantado para um mamífero receptor, de um mamífero dador.

A frase "um órgão ou parte dele" relativa ao transplante da presente invenção refere-se a um órgão arbitrário ou a uma porção dele que compõe o organismo vivo de um mamífero (preferencialmente um ser humano ou um porco e sendo especialmente preferido um ser humano). Um exemplo preferido é o fígado, coração, pulmão, pâncreas, rim, intestino grosso, intestino delgado ou uma porção desses órgãos. Especialmente preferido é o fígado ou uma porção dele.

O termo "tecido", relacionado com a presente invenção, refere-se a um tecido arbitrário derivado de um organismo vivo de um mamífero (preferencialmente de um ser humano ou um porco e, preferencialmente de um ser humano). Um exemplo preferido é um tecido como pele, córnea, osso ou válvula cardíaca; contudo não se limita a estes.

A expressão "agente imuno-supressor", na presente invenção, refere-se a qualquer um ou a mais do que um agente imuno-supressor utilizado para suprimir uma rejeição



imunológica (rejeição do enxerto) num receptor, causada pelo transplante de um enxerto no transplante clínico de células, tecidos ou órgãos, cujo fabrico e comercialização, como agente farmacêutico, já foram aprovados por uma organização governamental; ou qualquer um ou mais do que um dos agentes imuno-supressores que são utilizados normalmente em ensaios clínicos e pré-clínicos ou que será utilizado em ensaios clínicos no futuro, cujo fabrico e comercialização como agente farmacêutico serão aprovados por uma organização governamental depois dos ensaios.

Esses agentes imuno-supressores são utilizados não apenas isolados, mas também em combinação com 2, 3 ou mais agentes. Por isso, a expressão "agente imuno-supressor" de acordo com a presente invenção inclui a utilização de um único tipo de agente farmacêutico ou a utilização combinada de agentes farmacêuticos (preferencialmente utilizando 2 ou 3 agentes em combinação).

Preferencialmente, o agente imuno-supressor é, por exemplo, um ou mais dos agentes farmacêuticos seleccionados entre ciclosporina (CsA); tacrolimus (FK-506); azatioprina (AZ); micofenolato de mofetilo (MMF); mizoribina (MZ); leflunomide (LEF); esteróides adrenocorticais (também conhecidos como hormonas adrenocorticais, cortico-esteróides, corticóides) tais como prednisolona e metil-prednisolona; sirolimus (também conhecido como rapamicina); desoxiespergualina (DSG); e FTY720 (nome químico: cloridrato de 2-amino-2-[2-(4-octilfenil)etil]-1,3-propanodiol) e um "fármaco de CTLA4" descrito a seguir. São especialmente preferidos um ou de tacrolimus (FK-506) e ciclosporina ou ambos.

A expressão "fármaco de CTLA4", da presente invenção, refere-se a um medicamento que contém como ingrediente activo (1) um polipéptido que compreende todo o comprimento (incluindo moléculas que têm praticamente a mesma sequência de aminoácidos) ou toda ou uma porção de uma região extracelular de CTLA4 (antigénio 4 associado aos linfócitos T citotóxicos; <sequência de aminoácidos> GenBank No. de acesso NP 005205; <ADNc> n° de acesso do GenBank NM 005214) humana; (2) um polipéptido de fusão que compreende toda ou uma porção da região extracelular de CTLA4 humana e toda ou uma porção de outra proteína (especialmente e preferencialmente, toda ou uma porção da região constante da cadeia pesada de imunoglobulina humana) (daqui para a frente abreviada como CTLA4-IgFc ou CTLA4-Ig); ou (3) um ADN que pode providenciar a um mamífero (especialmente e preferencialmente a um ser humano) o polipéptido de (1) ou o polipéptido de fusão de (2) ou um vector que compreende o ADN (sendo especialmente preferido um plasmido geralmente utilizado na terapia de genes ou um vector viral derivado de um vírus (retrovírus, adenovírus, vírus adeno-associado, etc.) ou similar).

Aqui, cada um dos termos/frases tais como "região extracelular", "uma porção", "região constante da cadeia pesada de imunoglobulina", "polipéptido de fusão" e "praticamente o mesmo" têm os mesmos significados que se definiram antes.

Há um certo número de relatórios sobre o significado do efeito imuno-supressor da CTLA4-Ig mencionada antes. Por exemplo, o forte efeito imuno-supressor de Y100F (a tirosina da posição 100 é substituída por alanina) desenvolvido pela Bristol-Myers Squibb/Repligen tem sido confirmado em várias experiências com animais e este

produto também está incluído como um dos fármacos de CTLA4 da presente invenção (Igaku no Ayumi, Vol.194, No.14, p.1195-1200, 2000; J. Clin. Invest., Vol.103, p.1223-1225, 1999; N. Engl. J. Med., Vol. 335, p. 1369-1377, 1996; J. Exp. Med., Vol. 178, p. 1801-1806, 1993; Blood, Vol. 94, p. 2523-2529, 1999; Nature Med., Vol. 6, p. 464-469, 2000; Blood, Vol. 83, p. 3815-3823, 1995; J. Clin. Invest., Vol. 2, p. 473-482, 1998; Blood, Vol. 85, p. 2607-2612, 1995; N. Engl. J. Med., Vol. 340, p. 1704-1714, 1999; N. Engl. J. Med. Vol. 335, p. 1369-1377, 1996; J. Clin. Invest., Vol. 103, p. 1243-1252, 1999).

A frase "veículo aceitável sob o ponto de vista farmacêutico", da presente invenção, inclui um excipiente, um diluente, uma carga, um agente de decomposição, um estabilizante, um conservante, um tampão, um emulsionante, um agente aromático, um corante, um adoçante, um agente para aumentar a viscosidade, um aromatizante, um agente para aumentar a solubilidade ou qualquer outro aditivo. Utilizando um ou mais desses veículos, pode-se formular uma composição farmacêutica em comprimidos, pós, grânulos, injeções, soluções, cápsulas, pastilhas, elixires, suspensões, emulsões, xaropes, etc.

A composição farmacêutica pode ser administrada oralmente ou parentericamente. Outras formas para a administração parentérica incluem uma solução para aplicação externa, supositórios para administração rectal e supositórios vaginais, prescritos pelo processo usual, que compreende um ou mais ingredientes activos.

A dose pode variar consoante a idade, género, peso e sintomas de um paciente, efeito de tratamento, via de administração, período de tratamento, tipo de ingrediente

activo (a "substância", de acordo com a presente invenção, mencionada antes) contido na composição farmacêutica, etc. Normalmente, a composição farmacêutica pode ser administrada a um adulto numa dose de 10 µg a 1000 mg (ou 10 µg a 500 mg) por cada administração. Consoante as várias condições, uma dosagem inferior à mencionada antes pode ser suficiente nalguns casos e uma dosagem superior à mencionada antes pode ser necessária noutros.

No caso de uma injeção pode-se produzi-la dissolvendo ou suspendendo um anticorpo num veículo não tóxico, aceitável sob o ponto de vista farmacêutico, tal como uma solução salina fisiológica ou água destilada disponível no mercado para injeção, ajustando a concentração num intervalo de 0,1 µg de anticorpo/ml de veículo até 10 mg anticorpo/ml de veículo. A injeção assim produzida pode ser administrada a um paciente humano que necessite do tratamento numa dose variando de 1 µg a 100 mg/kg de peso do corpo, preferencialmente no intervalo de 50 µg a 50 mg/kg de peso do corpo, uma ou mais vezes por dia. Exemplos de vias de administração são as vias de administração apropriadas sob o ponto de vista da medicina tais como injeção intravenosa, injeção subcutânea, injeção intradérmica, injeção intramuscular, injeção intra-peritoneal ou similar, preferencialmente injeção intravenosa.

A injeção pode também ser preparada num diluente não aquoso (por exemplo, propileno-glicol, polietileno-glicol, óleos vegetais tal como azeite e álcool tal como etanol), suspensão ou emulsão.

A injeção pode ser esterilizada por filtração com um filtro de filtração de bactérias, misturando um agente

bactericida ou por radiação. A injeção pode ser produzida de tal maneira que se prepara no momento da utilização. Nomeadamente, liofiliza-se de modo a ser uma composição sólida esterilizada que pode ser dissolvida em água destilada esterilizada para injeção ou outro dissolvente, antes da sua utilização.

A composição farmacêutica da presente invenção é extremamente útil para a supressão, prevenção e/ou tratamento de rejeição imunológica (rejeição do enxerto), que é um problema sério em terapias em que se transplanta um órgão (fígado, coração, pulmão, rim, pâncreas, etc.) ou uma parte dele ou um tecido (tal como pele, córnea e osso) de um dador transplantado (alo-transplante ou xeno-transplante) para um receptor afectado por uma doença cardiovascular severa.

Além disso, a composição farmacêutica da presente invenção pode aumentar o efeito da supressão da rejeição do enxerto (rejeição imunológica) por meio da presença de agentes imuno-supressores administrados para suprimir a rejeição do enxerto durante essas terapias de transplante quando se utiliza a composição farmacêutica em combinação com os agentes imuno-supressores.

### **Breve descrição dos desenhos**

A fig. 1 mostra o efeito de um anticorpo anti-MIIAL e/ou um agente imuno-supressor na supressão de rejeição imunológica (rejeição de enxerto) que acompanha o transplante de um órgão, utilizando como índice, o prolongamento da sobrevivência do enxerto num receptor que foi transplantado com um fígado de um dador.

A fig. 2 mostra o efeito de supressão da rejeição imunológica (rejeição do enxerto) que ocorre acompanhando o transplante de um órgão por meio de um anticorpo anti-MIIAL e/ou um agente imuno-supressor, que utiliza como índice, o prolongamento dos dias de sobrevivência do enxerto do fígado transplantado de um dador para um receptor.

A fig. 3 mostra o efeito de supressão da rejeição imunológica (rejeição do enxerto) que ocorre acompanhando o transplante de um órgão por meio de um anticorpo anti-MIIAL (também chamado anticorpo anti-COEI), que utiliza como índice, a extensão dos dias de sobrevivência do enxerto do coração transplantado de um dador para um receptor.

A fig. 4 mostra o efeito de supressão da rejeição imunológica (rejeição do enxerto) que ocorre acompanhando o transplante de um órgão, por meio de MIIAL-Ig (também chamado anticorpo COEI-Ig), que utiliza como índice, a extensão dos dias de sobrevivência do enxerto do coração transplantado de um dador para um receptor.

A fig. 5 é uma fotografia que mostra o grau de infiltração das células que expressam MIIAL num coração transplantado.

A fig. 6 mostra o efeito de supressão da rejeição imunológica (rejeição do enxerto) que ocorre acompanhando o transplante de um órgão por meio de um anticorpo anti-MIIAL e ou AdCTLA4-Ig, que utiliza como índice, a extensão dos dias de sobrevivência do enxerto do coração transplantado de um dador para um receptor.

A fig. 7 mostra o efeito de uma anti-MIIAL utilizada em combinação com AdCTLA4-Ig na supressão da rejeição imunológica (rejeição de enxerto) que acompanha o transplante do órgão, que utiliza como índice a presença

ou a ausência da sobrevivência do enxerto de um coração transplantado (transplante primário do coração e transplante secundário do coração) e pele transplantada (transplante primário da pele) num receptor.

### **Melhor prática de realização da presente invenção**

Daqui para a frente, a presente invenção será ilustrada, especificamente, com referência aos exemplos, mas não será construída como estando limitada aos enquadramentos descritos nos exemplos.

**[Exemplo 1] Supressão da rejeição de enxerto por meio de uma substância que regula as MIIAL no transplante de fígado**

#### **<1> Materiais e processos**

##### **<1-1> Animais**

Utilizaram-se ratos Lewis adultos (machos, 210-250 g) e ratos DA (machos, 210-250 g) como receptores e dadores, respectivamente.

##### **<1-2> Anticorpo monoclonal de MIIAL anti-rato**

Utilizou-se um anticorpo monoclonal purificado a partir de fluido de ascites ou do sobrenadante da cultura obtido por meio da cultura *in vitro* ou *in vivo* do hibridoma relatado previamente e designado por "JTT-1" (este hibridoma tinha sido internacionalmente depositado em 11 de Outubro de 1996 no National Institute of Bioscience and Human-Technology, Advanced Industrial Science and Technology, Ministry of Economy, Trade and Industry, que é uma agência internacional depositária, certificada à luz do

Tratado de Budapeste com o n° internacional de acesso: FERM BP-5707) que produz um anticorpo monoclonal de MIIAL de murganho anti-rato (anticorpo monoclonal de antigénio JTT-1 de murganho, anti-rato), JP-A Hei 11-29599 (exemplos 1 e 2) e pedido de patente internacional No. W098/38216 (exemplos 1 e 2)). Daqui para a frente, este anticorpo é simplesmente referido como "anticorpo anti-MIIAL".

### **<1-3> Transplante de fígado**

No seguimento do processo de Kamada et al., referido antes, fez-se o transplante de fígados de ratos dadores DA para ratos receptores Lewis (Surgery, 93, p.64, 1983; Transplantation, 30, p.43, 1980; Transplantation, 28, p.47, 1979).

Especificamente, os fígados obtidos a partir de ratos DA foram lavados por meio de jacto de água destilada esterilizada, arrefecida com gelo, a partir da veia portal. Em seguida, iniciou-se o transplante dos fígados para os ratos de Lewis receptores, suturando a veia cava supra-hepática. Depois, utilizando a técnica da baina, suturou-se a veia portal e a veia cava supra-hepática (Transplant. Proc., 19, p.1158, 1987; Transplantation, 43, p. 745, 1987).

Se os ratos morrerem no prazo de 3 dias depois do transplante estar completo, isto terá sido considerado como sendo uma falha técnica do transplante. Como resultado, a taxa de sucesso do transplante foi de 95 %.

### **<1-4> Administração do anticorpo anti-MIILA e/ou de um agente imuno-supressor**



Depois de o transplante estar completo, o anticorpo anti-MIIAL e/ou o agente imuno-supressor FK-506 foram administrados a cada um dos ratos Lewis (contendo cada grupo 5-9 animais) nas doses e nos tempos que se descrevem a seguir. O dia em que o transplante estava completo foi contado como o dia zero (0).

O grupo a que não se administrou nem o anticorpo anti-MIIAL nem o agente imuno-supressor FK-506 foi utilizado como controlo.

1. Anticorpo anti-MIIAL (1 mg/kg; injeção intravenosa; dia 0)
2. Anticorpo anti-MIIAL (1 mg/kg; injeção intravenosa; dia 0 e 6)
3. Anticorpo anti-MIIAL (1 mg/kg; injeção intravenosa; dia 0, 3 e 6)
4. Anticorpo anti-MIIAL (1 mg/kg; injeção intravenosa; dia 0, 3, 6, 9 e 12)
5. Anticorpo anti-MIIAL (0,3 mg/kg; injeção intravenosa; dia 0, 3, 6, 9 e 12)
6. FK-506 (1 mg/kg; injeção intramuscular; dia 0)
7. Anticorpo anti-MIIAL (1 mg/kg; injeção intravenosa; dia 0) e FK-506 (1 mg/kg; injeção intramuscular; dia 0)

A duração da sobrevivência do enxerto do fígado transplantado, no receptor, foi avaliada e determinada de acordo com o ensaio de Kaplan-Meier.

## **<2> Resultados**

Os resultados estão ilustrados na fig. 1 e na fig. 2. Parte dos dados na fig.2 são actualizações dos dados da fig. 1.

Como resultado, no grupo a que se administrou o anticorpo anti-MIIAL (1 mg/kg), que se administrou 3 vezes ou 5 vezes, durante um período de tempo, no seguimento do transplante, observou-se um prolongamento significativo da sobrevivência do enxerto do fígado transplantado, comparado com o do controlo.

Além disso, no grupo a que se administrou uma dosagem baixa de anticorpo anti-MIIAL (0,3 mg/kg) a administração foi feita 5 vezes ao longo de um certo período de tempo no seguimento do transplante, observou-se um prolongamento significativo similar da sobrevivência do enxerto do fígado transplantado.

Além disso, surpreendentemente, quando se administrou o anticorpo anti-MIIAL, administrou-se apenas uma vez em combinação com FK-506, que é um agente imuno-supressor utilizado clinicamente para vários fins e a sobrevivência do enxerto do fígado transplantado foi muitíssimo prolongada, tendo sido consideravelmente mais prolongada do que quando se administrou apenas FK-506 (1 mg/kg), uma vez.

A partir destes resultados, revelou-se o seguinte.

- 1) O anticorpo anti-MIIAL suprime significativamente a rejeição do enxerto (rejeição imunológica) que acompanha o transplante de um enxerto tal como o de um órgão.
- 2) A rejeição do enxerto que acompanha o transplante de um enxerto, tal como o de um órgão, pode ainda ser suprimida utilizando o anticorpo anti-MIIAL em combinação com um agente imuno-supressor, comparada com a situação em que se utilizou apenas um deles.

**[Exemplo 2] Supressão da rejeição imunológica por meio de uma substância que regula as MIIAL no transplante de coração (parte 1)**

**<1> Reagentes, animais e processo de ensaio**

**<1-1> Animais**

Utilizaram-se murganhos C3H/He adultos (machos, com 6 semanas de idade) e murganhos BALB/c (machos, com 6 semanas de idade) como receptores e dadores, respectivamente.

**<1-2> Preparação de um anticorpo monoclonal de MIIAL anti-murganho**

A preparação foi feita como se segue.

Utilizando o ADNc que codifica toda a sequência de aminoácidos da MIIAL de murganho relatada previamente (Int. Immunol., Vol. 12, No. 1, p. 51-55, 2000), preparou-se uma célula transformada que expressa MIIAL de murganho, de acordo com processos normalizados utilizando a tecnologia de recombinação genética.

A célula transformada foi homogeneizada e ultra-centrifugada (100.000x g) e recolheu-se o resíduo centrifugado contendo a fracção da membrana da célula e suspendeu-se em SBF. A fracção da membrana da célula obtida foi injectada em conjunto com adjuvante Freund completo na sola da pata de um rato Wistar para a imunização inicial (dia 0). Além disso, administrou-se a fracção da membrana da célula como um antigénio, na sola da pata, a intervalos, no dia 7, dia 14 e dia 28, Dois dias depois da imunização final, recolheram-se células de nódulos linfáticos.

As células dos nódulos linfáticos e as células de mieloma de murganho PAI (JCR No. B0113; Res. Disclosure, Vol. 217, p. 155, 1982) foram misturadas numa relação de 5:1 e preparou-se um hibridoma produzindo um anticorpo monoclonal fundindo as células utilizando, como o agente de fusão, o polietileno-glicol 4000 (Boehringer Mannheim). A selecção do hibridoma realizou-se por meio da cultura num meio ASF104 contendo HAT (Ajinomoto) contendo soro bovino fetal a 10 % e aminopterina.

Mediram-se as intensidades de fluorescência das células coradas por meio da reacção dos sobrenadantes da cultura de cada hibridoma com as células transfectadas que expressam MIIAL recombinante de murganho mencionadas antes e depois fazendo-as reagir com IgG anti-rato marcada com FITC (capa 1) utilizando o citómetro de fluxo de EPICS-ELITE para confirmar a reactividade dos anticorpos monoclonais produzidas no sobrenadante da cultura de cada hibridoma contra MIIAL de murganho. Como resultado, obtiveram-se vários hibridomas que produziram anticorpos monoclonais com reactividade em relação a MIIAL de murganho.

Um deste hibridomas foi designado por "B10.5". Este hibridoma ( $10^6$  a  $10^7$  células/0,5 mL/de cada murganho) foi injectado intraperitonealmente a um murganho ICR nu/nu (fêmea, 7 a 8 semanas de idade). Dez a vinte dias mais tarde realizou-se uma laparotomia ao murganho, sob anestesia e realizou-se uma preparação em larga escala de anticorpo monoclonal de MIIAL de rato, anti-murganho (IgG2a) a partir de ascites obtidas de acordo com procedimentos normalizados. Daqui para a frente, este anticorpo é simplesmente referido como "anticorpo anti-MIIAL".

### **<1-3> Transplante de coração**

No seguimento do processo relatado previamente, os corações dos ratos dadores BALB/c foram transplantados para os abdômenes dos murganhos receptores C3H/He. O desaparecimento da pulsação do coração transplantado foi considerado como sendo o início da rejeição do enxerto.

### **<2> Experiência 1 (administração de anticorpo anti-MIIAL)**

A cada murganho C3H/He (10 murganhos) que tinham completado o transplante, administrou-se o anticorpo anti-MIIAL (10 mg/kg) imediatamente após o transplante (dia 0; 200 µg), no dia 2 (200 µg), no dia 4 (200 µg), no dia 7 (200 µg) e no dia 10 (100 µg). Utilizou-se como controlo o grupo (25 murganhos) ao qual não se administrou o anticorpo anti-MIIAL.

A duração da sobrevivência do enxerto do coração transplantado no receptor, no seguimento do transplante, foi avaliada e determinada de acordo com o ensaio de Kaplan-Meier.

A duração média da sobrevivência do enxerto do coração transplantado nos receptores foi como se segue:

(grupo a que se administrou o anticorpo anti-MIIAL)  
duração da sobrevivência do enxerto: 9 dias em 1 murganho, 10 dias em 3 murganhos, 13 dias em 4 murganhos, 16 dias em 2 murganhos

(grupo de controlo)

duração da sobrevivência do enxerto: 6 dias em 2 murganhos, 7 dias em 9 murganhos, 8 dias em 7

murganhos, 9 dias em 3 murganhos, 10 dias em 4 murganhos

A duração da sobrevivência do enxerto no grupo de controlo a que não se administrou o anticorpo anti-MIIAL foi de 7,9 dias, mas, pelo contrário, foi de 12,3 dias no grupo a que se administrou o anticorpo anti-MIIAL e um prolongamento significativo da sobrevivência do enxerto do coração transplantado foi demonstrado no grupo a que se administrou anticorpo anti-MIIAL.

## **<2> Experiência 2 (administração de anticorpo anti-MIIAL ou MIIAL-Ig)**

Os animais (dadores e receptores) e o anticorpo anti-MIIAL utilizados foram os mesmos que os mencionados antes. A MIIAL-Ig utilizada neste exame foi uma proteína de fusão entre IgG-Fc e a região extracelular da MIIAL de murganho preparada do mesmo modo que referido num relatório anterior (pedido de patente internacional No. W098/38216; pedido de patente europeia No. EP0984023).

O transplante do coração foi realizado de uma maneira semelhante à da experiência 1.

A cada murganho C3H/He que tinha completado o transplante, administrou-se, intraperitonealmente, anticorpo anti-MIIAL (100 µg/dia) ou MIIAL-Ig (100 µg/dia) imediatamente a seguir ao transplante (dia 0), no dia 2, no dia 4, no dia 7 e no dia 10. Utilizou-se como controlo o grupo a que não se administrou nem anticorpo anti-MIILA nem MIIAL-Ig.

A duração média da sobrevivência do enxerto do coração transplantado para os murganhos receptores foi de, aproximadamente, 7,7 dias no grupo de controlo, enquanto o grupo a que se administrou o anticorpo anti-MIIAL foi de aproximadamente 40,9 dias (valor intermédio: 29 dias/ valor máximo: 120 dias) e no grupo a que se administrou MIAAL-Ig foi de 30 dias ou mais (valor intermédio: 20 dias/ valor máximo: 64 dias) (fig. 3 e fig. 4). Nomeadamente, tanto no grupo a que se administrou o anticorpo anti-MIIAL como no grupo a que se administrou MIIAL-Ig, demonstrou-se um prolongamento significativo da sobrevivência do enxerto do coração transplantado.

Além disso, por meio da coloração com hematoxilina/eosina (coloração HE), de acordo com processos normalizados, analisou-se o grau de infiltração das células que expressam MIIAL (COEI) no coração transplantado, em cada um dos murganhos de controlo (sem tratamento terapêutico depois do transplante do coração) e os murganhos aos quais se administrou anticorpo anti-MIIAL depois do transplante.

Como resultado, no grupo não tratado, observou-se uma significativa infiltração de células que expressam MIIAL (COEI) assim como necrose do músculo cardíaco (porção corada). Por outro lado, no coração transplantado de um murganho ao qual foi administrado anticorpo anti-MIIAL, não se observou necrose do músculo cardíaco e confirmou-se um decréscimo significativo da infiltração de células que expressam (COEI) (fig. 5).

**[Exemplo 3] Supressão de rejeições imunológicas por substâncias que regulam as MIIAL nos transplantes do coração e de pele**

## **<1> Reagentes, animais e método de ensaio**

### **<1-1> Vector de adenovírus**

Produziu-se um adenovírus recombinante contendo uma cassette de expressão quer de ADNc que codifica hCTLA4-Ig (proteína de fusão que compreende a região extracelular de CTLA4 humana e Fc humana) quer do gene de  $\beta$ -galactosidase de *E. coli* (lacZ) por recombinação homóloga entre a cassette dos cosmídeos de expressão pAdex/CAhCTLA4-Ig (Transplantation, Vol. 68, No. 6, p. 758, 1999) e o genoma do adenovírus da estirpe parental (Proc. Natl. Acad. Sci. EUA., Vol. 90, No. 24, p.11498-11502, 1993).

Em seguida, o vírus recombinante proliferou dentro da linha de células 293 derivada de rim humano. Recolheu-se o vector do vírus preparado desta maneira e armazenou-se por congelação a -80 °C. O adenovírus recombinante contendo o ADNc de hCTLA4-Ig e o adenovírus contendo LacZ foram designados por AdCTLA4-Ig e AdLacZ, respectivamente.

### **<1-2> Animais e anticorpo**

Utilizaram-se ratos Lewis adultos, machos (210-250 g) (RT1<sup>l</sup>) como receptores e um rato DA adulto, macho (210-250 g) (RT1<sup>a</sup>) ou ratos BN (RT1<sup>n</sup>) como dadores.

Utilizou-se o anticorpo monoclonal de MIIAL anti-rato preparado no exemplo 1.

### **<1-3> Transplante de coração e de pele e método de ensaio**

No seguimento de um método relatado previamente (J. Thorac. Cardiovasc. Surg., Vol. 57, No. 2, p.225-229,



1969), transplantaram-se os corações obtidos dos ratos DA para o abdómen de ratos Lewis. Imediatamente depois do transplante do coração, administrou-se, intravenosamente, numa dose única, um anticorpo de MIIAL anti-rato (1 mg/kg) e/ou AdCTLA4-Ig ( $10^9$  unidades de formação de placa; pfu) aos ratos receptores.

O grupo de animais transplantados ao qual não se administrou nem anticorpo de MIIAL anti-rato nem AdCTLA4-Ig e o grupo de animais transplantados ao qual, em vez disso, se administrou AdLacZ, foram utilizados como controlos. O processo de tratamento de cada grupo de animais está ilustrado a seguir.

Grupo 1: Alotransplante (Lewis/DA) sem tratamento imuno-supressor.

Grupo 2: Isotransplante (Lewis/Lewis) sem tratamento imuno-supressor.

Grupo 3: Alotransplante (Lewis/DA) com administração de AdLacZ.

Grupo 4: Alotransplante (Lewis/DA) com administração de AdCTLA4-Ig.

Grupo 5: Alotransplante (Lewis/DA) com administração de anticorpo anti-MIIAL.

Grupo 6: Alotransplante (Lewis/DA) com administração de AdCTLA4-Ig e anticorpo anti-MIIAL.

O desaparecimento da pulsação do coração transplantado foi considerado como sendo o completar da rejeição do

enxerto. Confirmou-se a rejeição do enxerto por análise histológica de células mononucleares que se tinham infiltrado no tecido do coração transplantado e a necrose das células do músculo por coloração com HE, de acordo com métodos normalizados.

Em seguida, na parede torácica lateral dos ratos receptores do grupo 4 e do grupo 6, em que o coração transplantado sobreviveu durante um longo período, transplantou-se um enxerto de pele suficientemente espesso de um rato dador DA, no 140º dia após o transplante do coração. Depois do transplante de pele, não se realizou nenhum tratamento imuno-supressor com o anticorpo anti-MIIAL, AdCTLA4-Ig ou qualquer outro. Determinou-se o fim da duração da sobrevivência do enxerto de pele quando o grau de enxerto de pele, visualmente observado, diminuiu para 10 % ou menos do estado inicial.

Depois, no 200º dia a partir do transplante inicial do coração de rato DA, utilizando a técnica da bainha (Acta. Pathol. Microbiol. Scand. [A], Vol. 79, No. 4, p. 366-372, 1971), transplantou-se novamente o coração de um rato dador DA para a região cervical de 3 ratos receptores do grupo 6 que indicaram rejeição do enxerto depois de receberem o transplante de pele do dador.

Além disso, no 150º dia a partir do transplante inicial do coração de ratos dadores DA, transplantaram-se corações de ratos dadores BN para os ratos receptores remanescentes do grupo 6 em que o coração transplantado sobreviveu durante um longo período.

A avaliação estatística do grau de sobrevivência do enxerto nos receptores realizou-se de acordo com o ensaio de Kaplan-Meier.

## **<2> Resultados do exame**

Como se mostra na fig. 6, não se observou um prolongamento significativo da sobrevivência do enxerto do coração transplantado para receptores, quando comparado com o grupo dos animais não tratados nos quais se realizou um xenotransplante (grupo 1), no grupo de animais a que se administrou AdLacZ (grupo 3) e no grupo de animais a que se administrou uma única dose do anticorpo anti-MIIAL (grupo 5).

Por outro lado, no grupo de animais a que se administrou AdCTLA4-Ig (grupo 4), a sobrevivência do enxerto do coração transplantado (coração de rato DA inicialmente transplantado) foi significativamente prolongada (a média: aproximadamente 64 dias). Além disso, em 3 ratos do grupo 4 (10 ratos), observou-se a sobrevivência do enxerto do coração transplantado durante um longo período de 100 dias ou mais (fig. 6).

Além disso, no grupo de animais em que se utilizou, em combinação, AdCTLA4-Ig e anticorpo anti-MIIAL (grupo 6), a sobrevivência do enxerto do coração transplantado (coração inicial do rato DA) foi prolongada indefinidamente (300 dias ou mais) em todos os receptores (fig. 6).

Nos ratos receptores do grupo 4, o coração transplantado (coração de rato dador DA inicialmente transplantado) foi rejeitado simultaneamente com a rejeição

da pele transplantada, enquanto nos ratos receptores do grupo 6 não se observou rejeição do coração transplantado.

Como se mostra na fig. 7, em todos os ratos receptores do grupo 4 e do grupo 6 que receberam transplante de pele de um dador, a pele transplantada foi rejeitada. Contudo, ao contrário do grupo 4 e do grupo de controlo em que a rejeição da pele transplantada se concretizou em 12 dias ou menos a partir da data do transplante da pele, o aparecimento da rejeição foi de alguma forma retardado e verificou-se no prazo de 16 dias ou menos no grupo 6. Este resultado mostra que a utilização combinada de AdCTLA4-Ig e anticorpo anti-MIILA pode retardar a rejeição da pele enxertada, comparada com o caso em que se utiliza isoladamente AdCTLA4-Ig.

É interessante que nos ratos receptores do grupo 6, em que se confirmou uma sobrevivência de longo prazo do enxerto do coração transplantado (coração inicial de rato DA), a pele transplantada foi completamente rejeitada como mencionado antes, mas a sobrevivência do enxerto foi vista por um período indefinido no segundo coração transplantado (coração de rato dador DA transplantado uma segunda vez). Além disso, nos ratos receptores, o coração do dador transplantado inicialmente sobreviveu ao longo do exame.

Nos receptores do grupo 6, para o qual os corações de ratos dadores BN foram transplantados, os corações de ratos DA inicialmente transplantados continuaram a pulsar e sobreviveram durante o exame, mas os corações de ratos dadores BN transplantados uma segunda vez foram rejeitados num período similar ao dos resultados dos animais do grupo 1.

## **Aplicabilidade industrial**

As composições farmacêuticas da presente invenção são extremamente úteis na supressão, prevenção e/ou no tratamento de rejeição imunológica (rejeição de enxerto), um sério problema que acompanha as terapias adjuvantes dos transplantes (alotransplante ou xenotransplante) de órgãos (fígado, coração, pulmões, rins, pâncreas, etc.), partes deles ou tecidos (pele, córnea, osso, etc.) de doadores para receptores afectados por severas doenças cardiovasculares.

As composições farmacêuticas da presente invenção podem também suprimir mais fortemente rejeições de enxertos quando utilizadas em combinação com agentes imunossuppressores existentes que são administrados para suprimir rejeições de enxertos (rejeições imunológicas) nessas terapias de transplante.

Além disso, uma composição farmacêutica que compreende um anticorpo humano contra MIIAL, incluído nas composições farmacêuticas da presente invenção, é um medicamento extremamente útil, porque não causa quaisquer efeitos colaterais tais como alergia quando se administra o anticorpo derivado de murganhos a seres humanos.

Lisboa, 27 de Maio de 2010.

## REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de uma substância com actividade para regular a transdução de sinal mediada por MIILA para potenciar o efeito de um ou mais agentes imuno-supressores na supressão, tratamento ou prevenção da rejeição de enxerto que acompanha o transplante de um órgão, de uma porção de um órgão ou de um tecido, caracterizada pelo facto de a referida substância se seleccionar entre uma qualquer de (a) a (e);

(a) um anticorpo que se liga a MIILA ou uma porção do referido anticorpo;

(b) um polipéptido que compreende toda ou parte de uma região extracelular de MIIAL;

(c) um polipéptido de fusão que compreende toda ou uma porção de uma região extracelular de MIIAL e toda ou uma porção de uma região constante da cadeia pesada de imunoglobulina;

(d) um polipéptido que se liga a MIILA; e

(e) um ADN anti-paralelo ou um ARN anti-paralelo contra MIIAL.

2. Substância, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo facto de o referido agente imuno-supressor ser um ou mais agentes terapêuticos seleccionados no grupo que consiste em fármacos de azatioprina, esteróides adrenocorticais, ciclosporina, mizoribina e tacrolimus (FK-506), micofenolato de mofetilo, leflunomide, sirolimus, desoxiespergualina, FTY720 e CTLA4.

3. Substância, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo facto de se utilizar em combinação com tacrolimus (FK-506) e/ou um fármaco de CTLA4.
4. Substância, de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo facto de o referido transplante ser um alotransplante.
5. Substância, de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo facto de o referido transplante ser um xenotransplante.
6. Substância, de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 5, caracterizada pelo facto de a referida substância ser um anticorpo que se liga a MIIAL ou a uma porção do referido anticorpo.
7. Combinação farmacêutica de uma substância que tem actividade para modular uma transdução de sinal regulada pela MIIAL e um ou mais agentes imuno-supressores, caracterizada pelo facto de a referida substância se seleccionar a partir de qualquer um dos seguintes (a) a (e);

(a) um anticorpo que se liga a MIIAL ou uma porção do referido anticorpo;

(b) um polipéptido que compreende toda ou parte de uma região extracelular de MIIAL;

(c) um polipéptido de fusão que compreende toda ou uma porção de uma região extracelular de MIIAL e toda ou uma porção de uma região constante da cadeia pesada de imunoglobulina;

(d) um polipéptido que se liga a MIIAL; e

(e) um ADN anti-paralelo ou um ARN anti-paralelo contra MIIAL.

8. Combinação farmacêutica, de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo facto de o referido agente imunossupressor ser um ou mais agentes terapêuticos seleccionados no grupo que consiste em azatioprina, esteróides adrenocorticais, ciclosporina, mizoribina e tacrolimus (FK-506), micofenolato de mofetilo, leflunomide, sirolimus, desoxiespergualina, FTY720 e um fármaco de CTLA4.
9. Combinação farmacêutica, de acordo com uma qualquer das reivindicações 7 ou 8, caracterizada pelo facto de a referida substância ser um anticorpo que se liga a MIIAL ou a uma porção do referido anticorpo.

Lisboa, 27 de Maio de 2010.



## RESUMO

### SUPRESSORES DA REJEIÇÃO DE ENXERTOS

Verificou-se que os anticorpos contra MIIAL (também conhecidos como ICOS e 8F4) e MIIAL-Ig têm efeitos terapêuticos significativos em relação à supressão e à prevenção da rejeição de enxertos. A rejeição de enxertos é um problema sério associado com o transplante de tecidos e de órgãos (alo-transplante ou xeno-trans-plante), realizado para tratar várias insuficiências de órgãos (fígado, coração, rim, pâncreas, etc.)

Fig. 1

Tratamento	Grupo	Rejeição de enxerto (%)	Supressão de rejeição (%)	Significância
Controle	6	10, 11, 11, 12, 12	11.1	
Anti-ICOS (1 mg/kg, 10 dias)	5	10, 10, 11, 12, 13	11.2	
Anti-8F4 (1 mg/kg, 10 dias)	5	10, 11, 11, 12, 13	11.5	
Anti-ICOS (1 mg/kg, 10 dias) + Anti-8F4 (1 mg/kg, 10 dias)	7	10, 14, 16, 26, 33, 33*	> 31.9	< 0.001
Anti-ICOS (1 mg/kg, 10 dias) + Anti-8F4 (1 mg/kg, 10 dias) + Anti-8F4 (1 mg/kg, 10 dias)	9	13, 16, 18, 19, 23, 25, 28, 31, 32	23	< 0.001
Anti-ICOS (1 mg/kg, 10 dias) + Anti-8F4 (1 mg/kg, 10 dias) + Anti-8F4 (1 mg/kg, 10 dias) + Anti-8F4 (1 mg/kg, 10 dias)	6	12, 12, 14, 17, 25, 27	17.8	< 0.001
Anti-ICOS (1 mg/kg, 10 dias) + Anti-8F4 (1 mg/kg, 10 dias) + Anti-8F4 (1 mg/kg, 10 dias) + Anti-8F4 (1 mg/kg, 10 dias) + Anti-8F4 (1 mg/kg, 10 dias)	8	22, 24, 26, 30, 33*, 33*, 33*, 33*	16.5	
Anti-ICOS (1 mg/kg, 10 dias) + Anti-8F4 (1 mg/kg, 10 dias) + Anti-8F4 (1 mg/kg, 10 dias) + Anti-8F4 (1 mg/kg, 10 dias) + Anti-8F4 (1 mg/kg, 10 dias) + Anti-8F4 (1 mg/kg, 10 dias)	8	17, 41, 47, 60, 12*, 19*, 64*, 129*	> 40.0	< 0.001

\* Significância estatística em relação ao grupo controle.

Fig. 1

Tratamento	Número de animais	Duração da sobrevivência do enxerto do fígado transplantado (dias)	Média (dias)	valor de ensaio (p*)
Controlo	6	10, 11, 11, 12, 12	11.1	
Anticorpo anti-MIAl (1 mg/kg; injeção IV; dia 0)	5	10, 10, 11, 12, 13	11.2	
Anticorpo anti-MIAl (1 mg/kg; injeção IV; dia 0 e 6)	5	10, 11, 11, 12, 14	11.6	
Anticorpo anti-MIAl (1 mg/kg; injeção IV; dia 0, 3 e 6)	7	10, 14, 16, 25, 28, 30*, 30*	>21.9	<0.001
Anticorpo anti-MIAl (1 mg/kg; injeção IV; dia 3, 6, 9 e 12)	9	13, 16, 18, 19, 23, 25, 29, 31, 32	23	<0.001
Anticorpo anti-MIAl (0.3 mg/kg; injeção IV; dia 0, 3, 6, 9 e 12)	6	12, 12, 14, 17, 25, 27	17.8	<0.001
FK-506 (1 mg/kg; injeção IM; dia 0)	8	22, 24, 26, 30, 30*, 30*, 19*, 19*	15.5	
Anticorpo anti-MIAl (1 mg/kg; injeção IV; dia 0) e	8	17, 41, 47, 56, 19*, 19*, 64*, 129*	>49.0	<0.001
FK-506 (1 mg/kg; injeção IV; dia 0)				

\* : quando comparado com o grupo de controlo    \* : enxerto ainda sobrevivente

Fig. 2

Tratamento	Número de animais	Duração da sobrevivência do enxerto do fígado transplantado (dias)	Valor inter-médio (dias)	Valor do ensaio (p)
Controlo (não tratado)	6	10, 11, 11, 11, 12, 12	11	
Anticorpo-anti-M1AL (1 mg/kg; injeção IV; dia 0, 3, 6, 9 e 12)	9	13, 16, 19, 19, 23, 25, 29, 31, 32	23	<0.001
FK-506 (1 mg/kg; injeção IM; dia 0)	8	19, 22, 24, 26, 30, 42, 45, 91	28	<0.001
Anticorpo-anti-M1AL (1 mg/kg; injeção IV; dia 0)	9	17, 35, 38, 41, 47, 56, 58, >100, >100	> 44	<0.001
FK-506 (1 mg/kg; injeção IM; dia 0)	2	45, 69	57	
Anticorpo-anti-M1AL (1 mg/kg; injeção IV; dia 0, 3 e 6)				
FK-506 (1 mg/kg; injeção IM; dia 0)				

Fig. 3

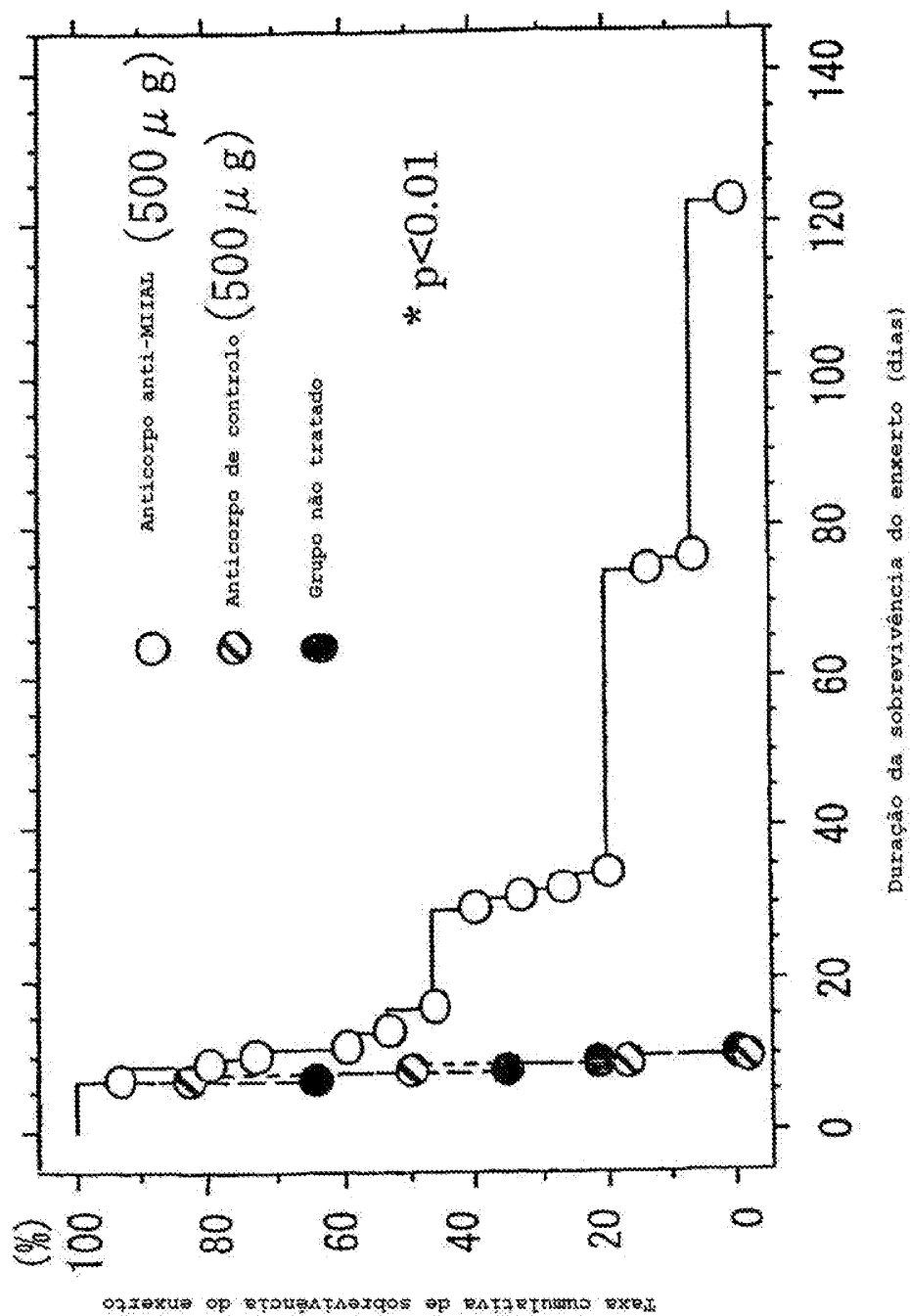


Fig. 4

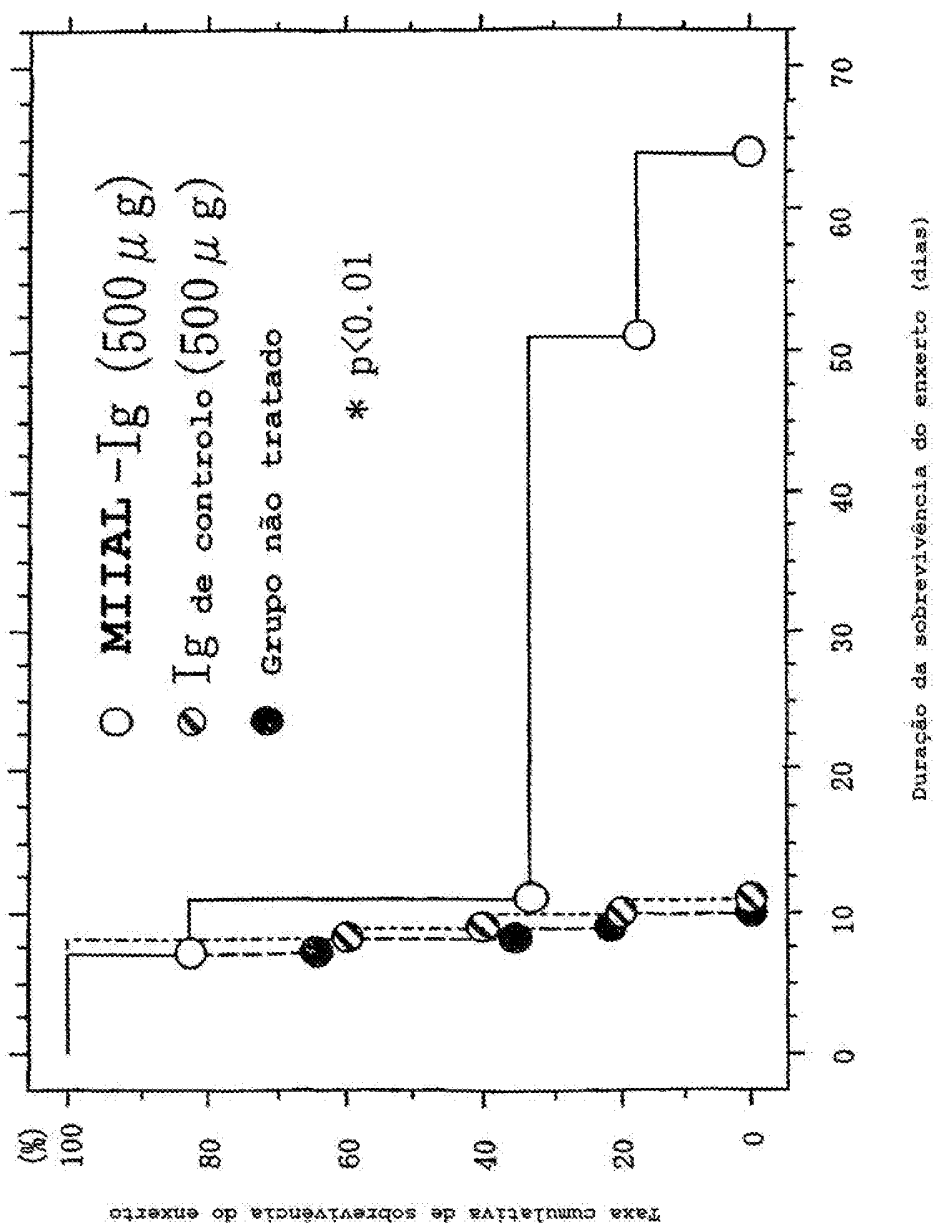


Fig. 5

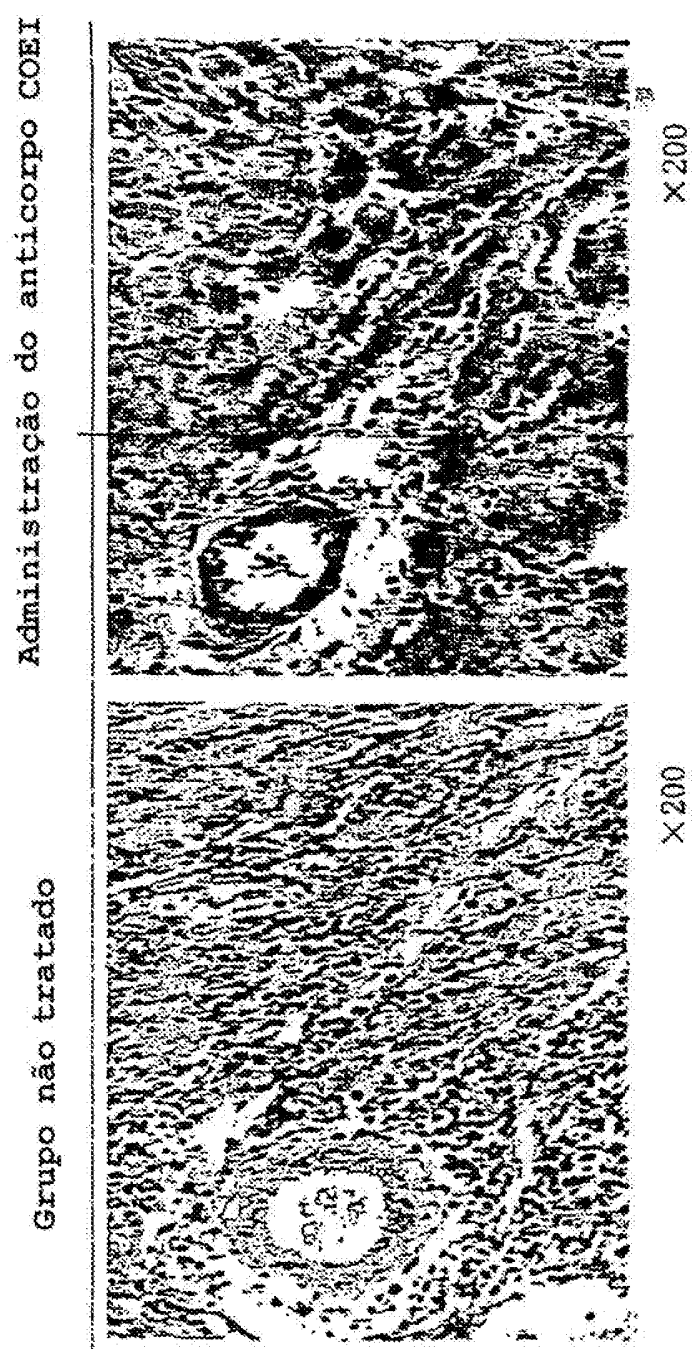


Fig. 6

Tratamento		Duração da sobrevivência do enxerto de coração transplantado (dias)	Valor inter- médio (dias)	Valor do teste (p)
Controlo (não tratado)	10	5, 5, 5, 6, 6, 6, 6, 6, 6	6	
Isotransplante/não tratado	4	>250, >250, >250, >250	>250	
Alotransplante /AdLacZ	7	6, 6, 6, 6, 7, 7, 7	6	
Alotransplante /AdCTLA4-Ig	10	40, 42, 58, 62, 64, 66, 68, 109, 140 <sup>a</sup> , 140 <sup>a</sup>	64	<0.001
Alotransplante / anticorpo anti-MI1A1	7	5, 6, 6, 6, 6, 6	6	
Alotransplante/AdCTLA4-Ig <sup>+</sup> anti-anti-MI1A1	6	>250 <sup>b</sup> , >250 <sup>b</sup> , >250 <sup>b</sup> , >250 <sup>a</sup> , >250 <sup>a</sup>	>250	<0.001

a : Transplante primário de pele                      b : transplante secundário do coração

Fig. 7

Tratamento	Número de animais	Transplante de pele (primário)		Transplante de pele (secundário)		Transplante de pele (primário)	
		Rejeição	Sobr. enxert.	Rejeição	Sobr. enxert.	Rejeição	Sobr. enxert.
Alotransplante / AdCTLA4-Ig	2	2/2	0/2			2/2	0/2
Alotransplante / AdCTLA4-Ig+ anti. anti-M1A1	5	2/2	0/2	0/3	3/3	0/5	5/5