



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0923832-8 B1



(22) Data do Depósito: 29/12/2009

(45) Data de Concessão: 24/09/2019

(54) Título: USO DE UM PEPTÍDEO TIPO APL PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS E DIABETES TIPO 1.

(51) Int.Cl.: A61K 38/17; A61P 1/04; A61P 3/10.

(30) Prioridade Unionista: 29/12/2008 CU 2008-0254.

(73) Titular(es): CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA.

(72) Inventor(es): ARIANA BARBERÁ BETANCOURT; MARIA DEL CARMEN DOMÍNGUEZ HORTA; NORAILYS LORENZO PÉREZ; GABRIEL RAMÓN PADRÓN PALOMARES; VIVIANA FALCÓN CAMA; IVON MENENDEZ VALDES.

(86) Pedido PCT: PCT CU2009000009 de 29/12/2009

(87) Publicação PCT: WO 2010/075824 de 08/07/2010

(85) Data do Início da Fase Nacional: 29/06/2011

(57) Resumo: USO DE UM PEPTÍDEO TIPO APL PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS E DIABETES TIPO I A presente invenção se refere ao campo da medicina, particularmente a utilização de um peptídeo tipo APL, derivado da proteína de stress térmico de 60 kDa humano, ou seus análogos para a fabricação de uma composição farmacêutica para o tratamento da doença de Crohn, a colite ulcerativa e diabetes melito tipo I. O referido peptídeo se biodistribui no trato gastrointestinal e o promove a indução de apoptose de células T ativadas da lâmina própria intestinal e do sangue periférico de pacientes com doença de Crohn. Além disso, este peptídeo a apoptose em células mononucleares de pacientes com diabetes melito.

“USO DE UM PEPTÍDEO TIPO APL PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS E DIABETES TIPO I”

Campo da técnica

5 Apresente invenção se refere ao campo da medicina, particularmente com a utilização de um peptídeo modificado tipo APL (do inglês Altered Peptide Ligand, abreviado APL) ou seus análogos no tratamento de doenças inflamatórias intestinais (como a doença de Crohn e a colite ulcerativa) e do diabetes melito tipo I.

Estado da técnica anterior

10 As doenças inflamatórias intestinais, como a doença de Crohn e a colite ulcerativa, produzem como resultado a ativação dos dois linfócitos T da lâmina própria do trato gastrointestinal que exercem funções efetadoras potentes dirigidas contra a flora bacteriana. No entanto, o mecanismo exato que guia a ativação crônica destes linfócitos não é conhecido (Balfour R
15 (2006) Mechanism of Disease: pathogenesis of Crohn’s disease and ulcerative colitis. Nature clinical practice Gastroenterology and Hepatology 3 (7): 390-407).

Aproximadamente 2×10^4 bactérias residem no trato gastrointestinal, e esta pressão imunológica representa um grande desafio ao
20 sistema imune que tem realizar um equilíbrio entre uma resposta apropriada aos organismos patogênicos e à tolerância aos organismos não patogênicos. O sistema imune da mucosa possui mecanismos para evitar uma resposta inflamatória desnecessária ou descontrolada. Dentro destes mecanismos a diminuição de linfócitos T ativados por apoptose é muito importante
25 (Peppelenbosch MP and van Deventer SJH (2004) T cell apoptosis and inflammatory bowel disease Gut 53: 1556-1558).

O sistema imune em condições normais é capaz de eliminar

rapidamente a infecção de bactérias entéricas patogênicas, diminuir a resposta imune inata e reparar a mucosa afetada sem estimular uma resposta de células T. No entanto, o sistema imune de hospedeiros suscetíveis geneticamente, não é capaz de montar uma resposta inata apropriada e/ou gerar uma resposta imune tolerogênica a agentes microbianos bacterianas, para o qual se ativa a resposta de células T patogênicas a bactérias bacterianas, o que conduz à inflamação intestinal crônica (Podolsky DK (2002) Inflammatory bowel disease N Engl J Med 347: 417-29). Consequentemente, nas doenças inflamatórias intestinais é produzida uma falha nos mecanismos que controlam apropriadamente os processos inflamatórios iniciados por fatores ambientais, como no caso de uma infecção intestinal aguda. A resistência à apoptose das células T, a perda de sinais inibidores e a exposição contínua a antígenos luminais e adjuvantes ajudam a sustentar a resposta inflamatória (Mudter J and Neurath MF (2007) Apoptosis of T cells and the control of inflammatory bowel disease: therapeutic implications Gut 56:293 - 303).

Na doença de Crohn ocorre um recrutamento ativo de macrófagos, neutrófilos e células T para o intestino, o que induz a um incremento na expressão de moléculas co-estimuladoras e de adesão, assim como de citocinas proinflamatórias relacionadas com a resposta celular de tipo TH1 (do inglês T cell helper 1, abreviado TH1), como por exemplo: a interleucina (IL)- 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (do inglês Tumor Necrosis Factor, resumido TNF) TNF- α e com a resposta celular do tipo TH17 (do inglês T cell helper 17, Abreviado TH17) como: IL-12, IL-23 e IL-27 (Balfour R (2006) Mechanism of Disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. Nature clinical practice. Gastroenterology and Hepatology 3 (7): 390-407).

O número de células inflamatórias no intestino é determinado pelo recrutamento, proliferação e morte por necrose ou apoptose destas células. Na mucosa intestinal normal, as células T da lâmina própria são

suscetíveis de morte celular induzida por ativação (ou através do sistema do Fas/Fas ligante), ou que consegue controlar a proliferação o linfocitária (Bu P et al. (2001) Apoptosis: one of the mechanisms that maintains unresponsiveness of the intestinal mucosal immune system. *J Immunol* 166: 6399-6403). No entanto, existem numerosos relatos na literatura que indicam que as células T da lâmina própria de pacientes com a doença de Crohn são resistentes à apoptose, o que pode conduzir a uma população expandida de células TH1 efetoras ativadas que podem contribuir para perpetuar a doença e inflamação crônica (Boirivant M et al. (1999) Lamina propia T células in Crohn's disease and other gastrointestinal inflammation show defective CD2 pathway-induced apoptosis. *Gastroenterology* 116: 557-565).

Por um lado, nas células T de mucosas pacientes com a doença de Crohn existe um desequilíbrio entre a proporção de moléculas anti-apoptóticas como Bcl-2 e pro-apoptóticas como Bax, a favor das moléculas anti-apoptóticas, o que favorece a sobrevivência destas células (Ina K et al. (1999) Resistance of Crohn's disease T cells to multiple apoptotic is associated with Bcl2/Bax. *mucosal J Immunol* 163:1081 - 90; Itoh J et al. (2001) Decrease Bax expression by mucosal T cells favours resistance to apoptosis in Crohn's disease. *Gut* 49: 35-41). Por outro lado, Sturm e colaboradores estudaram as propriedades do ciclo celular de células T de mucosas de pacientes com a doença de Crohn, com colite ulcerativa e de controles saudáveis. Eles comprovaram que as células T das mucosas de pacientes com doença de Crohn tem uma grande capacidade para se expandir porque seu ciclo celular progride mais rapidamente do que as células dos pacientes com colite ulcerativa ou de controles saudáveis. Isso poderia explicar porque a mucosa de pacientes com a doença de Crohn possuem um excesso de células T, o que indica um estado de hiperreatividade e de que produza a perda de tolerância às bactérias bacterianas. Sturm A et al. (2004) Divergent cell cycle kinetics underlies the distinct functional capacity of mucosal T cells in Crohn's disease

and ulcerative colitis. Gut 53:1624-1631).

Essas evidências experimentais suportam o fato de que a doença de Crohn é uma doença em que os eventos da proliferação celular ultrapassa o de morte por apoptose, o que implica na acumulação de células T reativas no local da inflamação, que parece ser um fator importante na patogênese da doença. Neste sentido, os agentes terapêuticos mais poderosos utilizados no tratamento desta doença são aqueles que induzem a apoptose das células T e em alguns casos monócitos, como por exemplo: anti-TNF α (Lügering A et al (2001) Influximab induces apoptosis in monocytes from patients with chronic active Crohn's disease by using a caspase dependent pathway. Gastroenterology 121: 1145-57), anti-IL-12 (Stallmach A et al (2004). An interleukin 12 p40-IgG2b fusion protein abrogates T cell mediated inflammation: anti-inflammatory activity in Crohn's disease and experimental colitis in vivo. Gut 53: 339-45) ou anticorpos contra o receptor de IL-6 (Atreya R et al. (2000) Blockade of interleukin 6 trans-signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in Crohn's disease and experimental colitis in vivo. Nat Med 6: 583-588). Em particular, os anticorpos anti-TNF α são uma opção importante para induzir longos períodos de remissão em pacientes refratários ao tratamento com esteróides.

O Influximab é um anticorpo monoclonal (AcM) quimérico que contém a região murina variável e a região constante da molécula IgG1 humana que se une com grande afinidade e especificidade ao TNF α e ao que é produzido nas membranas circulante (Knight DM et al. (1993) Construction and initial characterization of a mouse-human chimeric anti-TNF antibody. Mol Immunol 30: 1443-1453).

O Etanercept é uma proteína de fusão recombinante que contém duas cadeias monoméricas da parte solúvel do receptor do tipo II TNF α humano, unidas à porção Fc da imunoglobulina G1 (IgG1) humana

(Mohler KM et al. (1993) Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists. *J Immunol* 151: 1548-1561). A referida molécula de fusão tem sido utilizada com sucesso no tratamento de outras doenças inflamatórias, como artrite reumatóide (AR) (Moreland LW et al. (1999) Etanercept therapy in rheumatoid arthritis. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 130: 478-486). No entanto, o Etanercept ao contrário do Infliximab não oferece nenhum benefício clínico na doença de Crohn. Van den Brande e colaboradores mostraram que a diferença na eficácia de ambas as drogas no tratamento da doença de Crohn se deve à capacidade do Infliximab para induzir a apoptose de monócitos e de células T ativadas na lâmina própria (Van den Brande JMH et al. (2003) Infliximab but not Etanercet induces apoptosis in lamina propria T-Lymphocytes from patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 124: 1774-1785). O Etanercept não induz a apoptose dessas células, o, que sugere que o Infliximab seja eficaz na doença de Crohn por causa de seus efeitos pró-apoptóticos.

Os resultados obtidos na clínica, em pacientes com doença de Crohn com o uso do Infliximab e outras drogas que induzem apoptose das células T sugeriram que o restabelecimento deste mecanismo no compartimento de células T da mucosa pode ser um fator importante o sucesso do tratamento da doença de Crohn.

Atualmente, a terapia de maior sucesso que se aplica ao tratamento de pacientes com doença de Crohn é precisamente a administração do Infliximab. Esta terapia também foi aplicada com resultados animadores em pacientes com colite ulcerativa. No entanto, esta terapia produz um conjunto de reações adversas como o aumento da incidência nestes doentes de doenças como a tuberculose e a microplasmose devido à imunossupressão generalizada que produz (Kooloos WM. (2007) Potential role of

pharmacogenetics in anti-TNF treatment of rheumatoid arthritis and Crohn's disease. *Drug Discovery Today* 12: 125-31). É por isso que é um desafio, no momento, o desenvolvimento de variantes terapêuticas que podem eliminar especificamente células patogênicas sem causar uma imunossupressão generalizada.

Com este fim, nos últimos anos retomou-se o uso de estratégias antígenos-específicos tratando de regular a resposta imune, e não de suprimi-la. Neste linha de trabalho, empregou-se peptídeos de autoantígenos nativos ou modificados tipo APL, administrados em condições tais que permitem a indução de mecanismos de regulação da tolerância periférica (Prakken B et al. (2004) Epitope-specific immunotherapy induces immune deviation of proinflammatory T cells in RA. *PNAS* 12 (101): 4228-33; Ben-David H et al. (2005) Down-regulation of myasthenogenic T cell response by a dual altered peptide ligand via CD4+CD25+-regulated events leading to apoptosis. *PNAS* 102 (6): 2028-33; Paas-Rozner M et al. (2001) The nature of the active suppression of responses associated with experimental autoimmune myasthenia gravis by a dual altered peptide ligand administered by different routes. *PNAS* 98 (22): 12642-7).

Os APL são análogos de peptídeos imunogênicos com uma ou mais substituições em posições chave de contato com o receptor de células T ou o Complexo Principal de Histocompatibilidade, o que interfere ou modifica a cascata de eventos necessários para a ativação completa das células T (Bielekova B y Martin R (2001) Antigen-specific immunomodulation via altered peptide ligands. *J Mol Med* 79: 552-65). A capacidade de manipular experimentalmente as propriedades intrínsecas de ligantes peptídeo conhecidos permite alterar corretamente a natureza, o curso e a potência da resposta imune celular. O pedido internacional da patente No. WO 2006/032216 são reivindicados peptídeos tipo APL, derivados da proteína de estresse térmico de 60 kDa humano (abreviado Hsp60, do Inglês

60kDa heat shock protein) assim como o uso de uma preparação farmacêutica compreende estes peptídeos no tratamento da AR.

O diabetes melito tipo I, é uma doença auto-imune órgão específico mediada por células T que destroem as células β do pâncreas que produzem a insulina, o que conduz a uma desregulamentação do metabolismo da glicose (Casta no L y Eisenbarth GS (1990) Type-I diabetes: a chronic autoimmune disease of human, mouse, and rat. Annu Rev Immunol 8: 647-79). Os Sintomas clínicos desta doença ocorrem depois de inativarem pelo sistema imunológico cerca de 80-90% das células β do pâncreas. É por isso que a terapia atual se direciona a encontrar um método seguro, específico e eficaz para apagar o processo autoimune antes que ocorre um dano permanente nas células β do pâncreas e para preservar a produção endógena de insulina. A indução de tolerância foi um conceito que se estendeu ao tratamento de diabetes tipo I. Irun Cohen e colaboradores protegeram o uso de peptídeos da Hsp60 humana para o diagnóstico e o tratamento desta doença (Patente No. US 6682897).

Explicação da invenção

A presente invenção resolve o problema acima, fornecendo um novo agente terapêutico para o tratamento de doenças inflamatórias intestinais (doença de Crohn e a colite ulcerativa) e o diabetes melito tipo I. A essência da invenção é a utilização de um peptídeo imunomodulador tipo APL, derivado da Hsp60 humana ou seus análogos para a fabricação de uma composição farmacêutica para o tratamento de doenças inflamatórias intestinais e diabetes melito tipo I. O referido peptídeo, cuja seqüência é SIDLKDKYKNIGAKLVQLVANNTNEEA é identificado na listagem de seqüências como SEQ ID No. 1.

Este peptídeo promove a indução de apoptose de células T ativadas na lâmina própria intestinal e do sangue periférico de pacientes com doença de Crohn, o que resulta na inibição de clones de células T envolvidas

na patogênese desta doença, sem causar uma imunossupressão inespecífica como ocorre com o uso de drogas que bloqueiam o TNF- α .

5 O uso de peptídeo imunomodulador tipo APL, ou de seus análogos no tratamento de doenças inflamatórias intestinais, se destina a neutralizar clones de células T envolvidas no processo inflamatório característico desse tipo de doença. A preparação farmacêutica da invenção é caracterizada por sua alta especificidade, já que é direcionada para a neutralização de células T patogênicas, quando estas estão em um estado de ativação. Isso contribui marcadamente para a segurança desta preparação, já que minimiza reações adversas como infecções oportunistas causadoras de tuberculose e microplasmose associadas à imunossupressão generalizada que causadas por drogas como o Infliximab, ou o desenvolvimento de processos neoplásicos, como por exemplo os linfomas, causados pelo uso de metotrexato.

15 O uso do referido peptídeo imunomodulador na fabricação de um medicamento para o tratamento das doenças inflamatórias intestinais também tem a vantagem de que independentemente de se empregar a via de administração parenteral (intradérmica, subcutânea ou intravenosa, por exemplo), seu princípio ativo se biodistribui principalmente para o trato gastrointestinal: estômago, intestino delgado e cólon. Além disso, o peptídeo permanece nesses órgãos o tempo necessário para exercer seus mecanismos biológicos. Como se discutiu, nas doenças inflamatórias intestinais a ativação não controlada de células T efetoras dirigidas contra a flora bacteriana, ocorre precisamente no trato gastrointestinal. A biodistribuição do peptídeo para este lugar, juntamente com a capacidade que tem de induzir a apoptose de células T patogênicas luminais justifica a razão para a utilização deste peptídeo tipo APL para o tratamento da doença de Crohn e a colite ulcerativa. A utilização da preparação farmacêutica da invenção se estende a outras doenças inflamatórias que passam por períodos de crise-remissão, onde as células T

auto-reativas também desempenham um papel fundamental, como o diabetes tipo I.

O pedido internacional de patente No. WO 2006/032216 reivindica o peptídeo tipo APL identificado na listagem de sequências como SEQ ID No. 1 assim como o uso de uma preparação farmacêutica que compreende o peptídeo no tratamento da AR. No entanto, este pedido de patente não reivindica e nem sugere que esse peptídeo possa ser empregado para o tratamento de doenças inflamatórias intestinais e diabetes melito tipo I.

As doenças inflamatórias intestinais não são consideradas doenças autoimunes, pois a resposta imune dirigida contra autoantígenos não é a responsável pelo início e manutenção da inflamação, pelo menos até agora não se sabe se existem uma relação causal com autoantígenos. A origem destas doenças depende da presença de flora bacteriana e a resposta imune é dirigida contra organismos bacterianas. Uma das evidências experimentais de sustentam este fato é que em animais livres de agentes patogênicos não é possível induzir este tipo de doença a menos que a flora intestinal seja reconstituída (Chandran et al. (2003) Inflammatory bowel disease: dysfunction of GALT and gut bacterial flora (II). Surgeon 1 :125-136; Strober et al. (2002) The immunology of mucosal models of inflammation. Annu. Rev. Immunol 20:495-549).

Na patente no US 6682897, Irun Cohen e colaboradores revelaram o uso de peptídeos da Hsp60 humana para o diagnóstico e tratamento do diabetes tipo I. Nenhum destes peptídeos compreende a sequência identificada como SEQ ID No. 1, e nem se descreve atividade biológica semelhante à do peptídeo de Seq ID No. 1. Ao contrário desses autores, na presente invenção revela-se o uso do peptídeo Seq ID No. 1, que é um peptídeo tipo APL derivado da Hsp60 para induzir a apoptose em células T patogênicas envolvidos no desenvolvimento dessa patologia.

Os exemplos da presente invenção são os primeiros a revelar

propriedades do peptídeo de Seq ID No. 1, relacionadas com sua biodistribuição para o trato gastrointestinal e com sua capacidade de induzir a apoptose em clones de células T patogênicas, que tornam possível sua utilização no tratamento da doença de Crohn, a colite ulcerativa e o diabetes tipo I Com base nos elementos fornecidos no pedido de patente internacional No. WO 2006/032216, àqueles qualificados neste domínio técnico, não foram incapazes de prever o novo uso do peptídeo que se reivindica nesta invenção.

O peptídeo de sequência identificada como SEQ ID No. 1 ou seus análogos podem ser produzidos pelos métodos de rotina de síntese de peptídeos e avaliados pelo nível e qualidade da resposta imune que induzem, em experimentos como os que são descritos nos exemplos que serão apresentados posteriormente.

No contexto desta invenção, o termo análogo se refere a peptídeos tipo APL que compreendem um ou mais desvios da sequência descrita (Seq ID. NO. 1), mas mantêm a mesma atividade biológica que o peptídeo descrito. O desvio pode ser uma substituição, deleção ou inserção de um único aminoácido. De preferência, o desvio é uma substituição. O análogo compreenderá de preferência menos de 9 desvios, mais preferivelmente menos do 6 desvios e mais preferivelmente menos de 2 desvios do peptídeo descrito.

Outro objeto da invenção é também uma composição farmacêutica para o tratamento de doenças inflamatórias intestinais e diabetes tipo I compreendendo um peptídeo tipo APL derivado da Hsp60 humana e identificado como Seq. ID. No. 1, ou seus análogos. As quantidades de peptídeo presentes nas composições farmacêuticas da presente invenção são aqueles que produzem a resposta imune eficaz no hospedeiro. O quantidade efetiva é a quantidade que ao ser administrada resulta na indução de apoptose nos linfócitos T que diminuem significativamente os sinais inflamatórios característicos da doença de Crohn e detém os focos inflamatórios do trato

gastrointestinal característicos do decurso dessas doenças. No decorrer do tratamento, a quantidade de composição farmacêutica administrada ao paciente pode variar de acordo com determinados fatores como: idade, sexo, saúde geral, assim como o nível de resposta imunológica em geral.

5 A presente invenção também revela um método de tratamento de doenças inflamatórias intestinais (como a doença de Crohn e a colite ulcerativa) e o diabetes tipo I, mediante a administração a um paciente de quantidades eficazes de composições farmacêuticas que compreendem o peptídeo identificado como Seq ID No. 1 ou seus análogos.

10 Em uma realização da invenção, no decurso do tratamento das doenças inflamatórias intestinais (doença de Crohn e a colite ulcerativa) e o diabetes tipo I, a composição farmacêutica é administrada por via parentérica ou por via mucosa. Em uma materialização da invenção, a composição farmacêutica é administrada por via parenteral selecionada do grupo que
15 compreende a via intradérmica, a via subcutânea, a via intramuscular e a via intravenosa. Em outra modalidade, a composição farmacêutica é administrada por uma via mucosa selecionada do grupo compreendendo a via retal e a via oral. Devido à natureza dessas doenças, o peptídeo tipo APL ou seus análogos podem fazer parte de formulações que são administradas como **lavagem**, ou
20 como formas farmacêuticas apropriadas para a administração por via oral.

DESCRIÇÃO SUMÁRIA DAS FIGURAS

Figura 1. Efeito do peptídeo Seq ID No. 1 sobre a viabilidade das células mononucleares do sangue periférico de pacientes com doença de Crohn (A) e doadores saudáveis (B). Letras diferentes indicam diferenças
25 estatisticamente significativas entre o controle negativo (0 ug/mL) e cada uma das concentrações do peptídeo avaliadas neste grupo.

Figura 2. Demonstração por microscopia eletrônica de transmissão da indução de apoptose pelo peptídeo de Seq ID No. 1 em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com doença de Crohn.

Painéis A, B: células mononucleares não-estimuladas (controle negativo). Painéis C-H: células mononucleares estimuladas com o peptídeo de Seq ID No. 1 (40 mg/mL). Vacuolização abundante (VA), fragmentação nuclear (FN) condensação e migração perinuclear da cromatina (CCM), orgânulos citoplasmáticos intactos (OCI), corpo apoptótico (CA), fagocitose de corpos apoptóticos (FCA).

Figura 3. Demonstração por microscopia eletrônica da transmissão da indução de apoptose pelo peptídeo de Seq ID No. 1 em células mononucleares da lâmina própria intestinal de pacientes com doença de Crohn. Painéis A, B: células mononucleares não-estimuladas (controle negativo). Painéis C-E: células mononucleares estimuladas com o peptídeo de Seq ID No. 1 (40 mg/mL). Fragmentação nuclear (FN); condensação e migração perinuclear da cromatina (CCM), corpo de apoptose (CA).

Figura 4. Efeito do peptídeo Seq ID No. 1 sobre a viabilidade de células mononucleares de um paciente com doença de Crohn em estado de remissão. No eixo X, A: células não ativadas com o anticorpo anti-CD3, B: células ativadas com o anticorpo anti-CD3. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre o controle negativo (0 ug/mL) e cada uma das concentrações do peptídeo avaliadas neste grupo.

Figura 5. Demonstração por microscopia eletrônica de transmissão da indução de apoptose pelo peptídeo de Seq ID No. 1 em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com diabetes melito tipo I. Painéis A, B: células mononucleares não-estimuladas (controle negativo). Painéis C-D: células mononucleares estimuladas com o peptídeo de Seq ID No. 1 (40 mg/mL). Fragmentação nuclear (FN), condensação e migração perinuclear da cromatina (CCM), corpo de apoptose (CA), fagocitose de corpos apoptóticos (FCA).

Figura 6. Estudo de biodistribuição de peptídeo Seq ID No. 1 em ratos Lewis. A: via intravenosa de 0,25 mg/kg. B: via intravenosa de 1

mg/kg. C: via intradérmica de 0,25 mg/kg. D: via intradérmica 1 mg/kg. Os tecidos analisados são: 1. Fígado 2. Baço 3. Rins 4. Coração 5. Pulmões 6. Gânglios cervicais, 7. Gânglios axilares-braquiais, 8. Cadeia ganglionar mesentérica, 9. Gânglios pélvicos, 10. Tireóide, 11. Estômago, 12. Intestino delgado; 13. Intestino grosso.

Descrição detalhada de modos de realização/Exemplos de realização Exemplo
1. Avaliação do efeito do peptídeo tipo APL sobre a viabilidade das células mononucleares do sangue periférico de pacientes com doença de Crohn e de doadores saudáveis.

10 O sangue proveniente de pacientes com doença de Crohn e de doadores saudáveis foi obtido por punção venosa e colocados em tubos estéreis, contendo uma solução usada como anticoagulante (citrato de sódio 123 mM, fosfato de sódio monobásico 18,5 milímetros, ácido cítrico 17 mM e dextrose 141,5 mM). O sangue foi diluído 1: 2 em solução salina tamponada com fosfato (abreviado PBS, do Inglês Phosphate Buffered Saline) 1 X e
15 acrescentou-se 5 mL da mesma com 3 mL de Ficoll-Paque™ PLUS (Amersham Biosciences AB, Suécia) tubos de centrifugação de 15 mL. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 1200 rpm por 30 minutos. Posteriormente, se extraiu o anel correspondente às células mononucleares e
20 realizaram duas lavagens com PBS 1 X. Posteriormente, o precipitado celular foi ressuspenso em meio RPMI 1640 contendo soro fetal bovino (SFB) a 10% e suplementado com gentamicina (100 U/mL) e L-glutamina (2 mM) (Gibco BRL, EEUU). O número de células foi contado em câmara de Neubauer a partir de uma diluição 1:20 em meio RPMI suplementado e 1: 2 com azul de
25 tripano (Boehringer Mannheim, Alemanha).

As células mononucleares foram semeadas (1×10^5 células/poço) em placas 96 poços com fundo plano (Costar, EEUU) em um volume final de 100 ul e foram estimuladas (por triplicata) com o peptídeo tipo APL (SEQ ID No. 1) em diferentes concentrações: 10, 40 e 160 ug/mL

por 72 horas. As células não estimuladas com o peptídeo são empregadas como controle do crescimento celular basal.

O efeito do peptídeo sobre a viabilidade das células foi determinado com o ensaio do brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol 2-il]-2,5 difenil tetrazólio (MTT, Sigma, EEUU) seguindo o protocolo descrito por fabricante. O MTT é reduzido pela ação de uma desidrogenase mitocondrial em um produto colorido (formazan), que não é solúvel no meio de cultura. A quantidade de produto formado é diretamente proporcional à quantidade de células vivas em cultura celular. Ao final de 24 horas de cultura adicionou-se 20 uL/poço de MTT preparado em uma concentração de 5 mg/mL. Em seguida, as placas foram incubadas durante 4 horas sob as mesmas condições de cultura. Uma vez terminado este tempo, adicionou-se 100 uL de uma solução de 2-butanol (SDS 20% (do Inglês, sódio dodecil sulfato), 2-butanol a 50% e 5 mL de ácido clorídrico 2N) e homogeneizou-se o conteúdo dos poços por pipetagem suave. Para dissolver completamente o precipitado, as placas foram mantidas sob agitação contínua por 30 minutos a 37 °C. Finalmente, as placas foram lidas em um comprimento de onda de 562 nm em um leitor de placas.

A média das densidades ópticas das células não estimuladas com o peptídeo considerou 100% de viabilidade celular. A partir deste valor foi calculado o percentual de viabilidade das células cultivadas com o peptídeo de acordo com a média das densidades ópticas em cada caso. Para a análise dos resultados foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism Software. O teste estatístico utilizado foi o de Kruskal-Wallis que é um teste de comparação múltipla não paramétrica. Em seguida, utilizou-se o teste de Dunn para identificar os grupos cujas médias se diferenciaram estatisticamente.

Como se pode ver na Figura 1, a diminuição da viabilidade celular nas células de pacientes com doença de Crohn é bastante significativa

para todos os três níveis de dose do peptídeo que foram avaliados no estudo, em comparação com as células não estimuladas [$p < 0,001$]. No entanto, o tratamento com este peptídeo não afeta a viabilidade das células mononucleares de doadores saudáveis (em nenhuma das concentrações do peptídeo testadas). Esse resultado reflete uma especificidade no mecanismo de morte celular induzida por esse peptídeo nas células de pacientes com doença de Crohn. Os resultados apresentados são representativos de cinco pacientes com doença de Crohn (em crise) e cinco doadores saudáveis.

Exemplo 2. Identificação do mecanismo de morte celular induzida pelo peptídeo tipo APL em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com doença de Crohn, mediante microscopia eletrônica de transmissão.

Com o objetivo de identificar se o mecanismo de morte celular induzida pelo peptídeo tipo APL (identificado como SEQ ID No. 1 nesta invenção) em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com doença de Crohn é mediado por apoptose, foi realizada a análise das amostras por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Esta técnica permite visualizar as características morfológicas das células apoptóticas que, uma vez identificadas, são uma prova irrefutável da ocorrência de apoptose nas mesmas. Essas características são: núcleo elétron-denso (migração perinuclear da cromatina na fase inicial), fragmentação nuclear, orgânulos citoplasmáticos desorganizados e intactos, vacúolos grandes e distinguíveis, mudança da superfície celular e desintegração da célula em corpos apoptóticos. O processo de fagocitose dos corpos apoptóticos pelas células vizinhas pode também ser observado com esta técnica (White M et al. (2004) A morphologic approach to detect apoptosis based on electron microscopy. *Methods Mol Biol* 285: 105-11).

As células mononucleares de pacientes com doença de Crohn, isoladas do sangue periférico (10×10^6 células) foram cultivados com e sem

peptídeo tipo APL em uma concentração de 40 ug/mL durante 72 horas. As células cultivadas sem peptídeo foram utilizadas como controle do teste. Após 72 horas de incubação, as amostras foram fixadas empregando uma solução de glutaraldeído a 1% e paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1 M durante 1 hora. Em seguida, as células foram lavadas em PBS 1X e tratadas com uma solução de tetróxido de ósmio a 2% por 1 h. Posteriormente, foram realizadas duas lavagens com tampão cocodilato 0,1 M e as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de álcoois (30-100%). Em seguida, as células foram infiltradas empregando uma resina epóxica Spurr (Spurr AR (1969) A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. J Ultrastruct Res 26(1): 31-43) e a polimerização foi realizada a 70°C por 24 h. As seções ultrafinas (40 nm) foram cortadas empregando um ultramicrotomo (Nova, LKB) e foram montadas em redes de níquel. Posteriormente, as amostras foram tingidas com uma solução de acetato de uranila sobressaturado em metanol por 5 minutos. A análise das amostras foi realizada em um microscópio eletrônico JEOL/JEM 2000 EX (JEOL, Japão).

Na Figura 2 mostram-se os resultados obtidos por MET em células mononucleares de pacientes com doença de Crohn. Como pode-se ver as células sem se estimularem com o peptídeo têm uma morfologia normal (A, B). No entanto, nas células cultivadas com peptídeo tipo APL (SEQ ID No. 1), podem-se ver as mudanças morfológicas características de um processo apoptótico (C-H). Em particular, pode-se observar nestas amostras a condensação e a migração da cromatina para a periferia do núcleo (CCM), que é uma das primeiras mudanças morfológicas que ocorrem durante a apoptose no núcleo (N) das células. Além disso, ocorre a fragmentação nuclear (NF) e a formação de corpos apoptóticos (CA). Inclusive, pela presença de restos celulares pode-se saber que ocorreu a fagocitose destes corpos apoptóticos (FCA). Os orgânulos citoplasmáticos permanecem intactos (OIC) como se pode ver na Figura 2F, que é característica da morte celular

por apoptose. Estes resultados demonstram que o mecanismo de morte celular induzida por esse peptídeo tipo APL em células mononucleares de pacientes com doença de Crohn é mediada por apoptose.

5 A análise das células desses pacientes por MET permitiu também identificar a população de células dentro das células mononucleares que caem em apoptose. Isso foi possível porque diferentes tipos de leucócitos (monócitos, linfócitos e polimorfonucleares) têm morfologias diferentes.

10 Dentro das células mononucleares, os linfócitos foram identificados como a população que cai em apoptose. Do ponto de vista morfológico, os linfócitos são menores do que os monócitos, seu núcleo é redondo e possuem menos citoplasma. Além disso, os linfócitos não têm núcleo com cromatina frouxa e em ferradura, o que é característico dos monócitos (LC Junqueira e Carneiro J (2005) *Histología Básica*. Sexta edição. Editorial Masson, Barcelona, Espanha).

15 Exemplo 3. Identificação do mecanismo de morte celular induzida pela peptídeo tipo APL em células mononucleares da lâmina própria de pacientes com doença de Crohn.

As amostras de tecido intestinal correspondentes a emplastos de inflamação foram obtidas com o consentimento informado dos pacientes.
20 Estas amostras foram transportadas para o laboratório em solução salina balanceada de Hank (do Inglês Hank's balanced salt solution, abreviado HBSS), fria, livre de magnésio e cálcio. As células mononucleares da lâmina própria foram isoladas destes tecidos empregando o método do ditiotreitol/Ácido etilediamino tetraacético/Colagenase descrito por Bull e
25 Bookman (Bull DM and Bookman MA (1977) Isolation and functional characterization of human intestinal mucosal lymphoid cells. *J Clin Invest* 59: 966-974), com as modificações realizadas por Van Tol e colaboradores (Van Tol EA et al (1992). The CD56 adhesion molecule is the major determinant for detecting non-major histocompatibility complex-restricted cytotoxic

mononuclear cells from the intestinal lamina propria. Eur J Immunol 22: 23-29).

As células mononucleares da lâmina própria de pacientes com a doença de Crohn (10×10^6 células) foram cultivadas com e sem o peptídeo tipo APL (SEQ ID No. 1) em uma concentração de 40 ug/mL durante 72 horas. A análise por MET (Figura 3) revelou que esse peptídeo induz a morte por apoptose de uma grande parte desta população, ao observar nas células cultivadas com este peptídeo algumas das características morfológicas deste tipo de morte celular (C-E), como: a migração da cromatina para a periferia do núcleo (CCM), a fragmentação nuclear (FN) e a formação de corpos apoptóticos (CA). As células que são empregadas como controle de teste (células não estimuladas com o peptídeo) têm uma morfologia normal (A-B).

Exemplo 4. Diminuição da viabilidade de células mononucleares do sangue periférico de pacientes com doença de Crohn em estado de remissão, após ativadas com um anti-CD3.

As células mononucleares do sangue periférico de um paciente com doença de Crohn em estado de remissão (também chamados não ativo), foram ativadas com um anticorpo anti-CD3 (e-Biosciences) durante 72 h. A adição do anticorpo anti-CD3 produz a ativação policlonal dos linfócitos presentes nesta população celular. Os linfócitos ativados foram lavados com solução de PBS 1X e incubados (1×10^5 células) por 1 h com diferentes concentrações (10, 40 e 160 ug/ml) do peptídeo tipo APL (SEQ ID No. 1). Como controle do ensaio de ativação foram usadas as células deste paciente cultivadas nas primeiras 72 h sem o anticorpo anti-CD3 (células não ativadas). Após este tempo as células foram cultivadas com as mesmas concentrações do peptídeo.

A viabilidade celular foi determinada pelo método do MTT como descrito no Exemplo 1. Conforme mostrado na Figura 4, o peptídeo tipo APL não afeta a viabilidade das células não estimuladas com o anticorpo anti-

CD3. Neste caso, é importante assinalar que no momento da tomada de amostra o paciente se encontravam em remissão dos sinais e sintomas da doença. No entanto, esse peptídeo afetou de forma muito significativa a viabilidade dessas células ativadas previamente com o anti-CD3. Este resultado, juntamente com os apresentados no Exemplo 1, onde se evidencia que este peptídeo não afeta a viabilidade de células mononucleares de doadores saudáveis, podemos afirmar que o peptídeo tipo APL (SEQ ID No. 1) induz a apoptose de células T patogênicas ativadas com uma alta especificidade.

10 Exemplo 5. Avaliação do efeito do peptídeo tipo APL sobre a viabilidade das células mononucleares do sangue periférico de pacientes com diabetes melito tipo I.

As células mononucleares do sangue periférico de pacientes com diabetes melito tipo I foram isoladas mediante um gradiente de densidade com Ficoll-Paque™ PLUS, como descrito no Exemplo 1. Para realizar a análise dessas células por MET, foram cultivadas 10×10^6 células com o peptídeo tipo APL em uma concentração de 40 ug/mL durante 72 horas. As células não estimuladas com peptídeo foram utilizadas como controle do teste. Conforme mostrado na Figura 5, as células cultivadas com este peptídeo têm a morfologia descrita anteriormente (no Exemplo 2) das células em apoptose (painéis C-D), enquanto as células sem estimular (Painéis A-B) têm uma morfologia normal. Este resultado demonstra que esse peptídeo tipo APL induz a apoptose em células de mononucleares de pacientes com diabetes melito tipo I.

25 Exemplo 6. Estudo de biodistribuição do peptídeo tipo APL (identificado como SEQ ID No. 1) em ratos Lewis.

O peptídeo APL tipo (identificado como SEQ ID N ° 1) foi marcado com o isótopo I^{125} e foi administrado em ratos Lewis, em doses de 0,25 mg e 1 mg/kg de peso corporal, por intravenosa e intradérmica. Seis

animais foram sacrificados de cada grupo experimental, em 4 e 24 h após a inoculação do peptídeo e determinou-se os níveis de radioatividade nos diferentes órgãos. Os resultados são expressos em porcentagem de dose de radioatividade/grama de tecido.

5 Este estudo indicou que este peptídeo se biodistribui principalmente para o trato gastrointestinal: estômago, intestino delgado e cólon, permanecendo nestes órgãos em um tempo que o possibilita exercer seus mecanismos biológicos. Este resultado suporta a utilização desse peptídeo no tratamento de doenças inflamatórias intestinais como a doença de
10 Crohn e a colite ulcerativa. Além disso, esse peptídeo pode ser empregado para o tratamento de outras doenças autoimunes como o diabetes melito tipo I, porque o trato gastrointestinal é o local por excelência de indução de tolerância periférica.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de um peptídeo tipo APL, derivado da hsp60 humana e identificado como Seq. ID. No. 1, caracterizado pelo fato de que é para a fabricação de uma composição farmacêutica para o tratamento das doenças inflamatórias intestinais e Diabetes tipo I.
2. Uso do peptídeo tipo APL de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato de que as doenças inflamatórias intestinais são selecionadas do grupo que compreende a doença de Crohn e a colite ulcerativa.
3. Uso do peptídeo tipo APL de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a composição farmacêutica compreende um veículo ou excipiente farmacêuticamente aceitável.
4. Uso de um peptídeo tipo APL, derivado da hsp60 humana e identificado como Seq. ID. No. 1, caracterizado pelo fato de ser para a indução de apoptoses em clones de células patogênicos de pacientes com doenças inflamatórias intestinais e Diabetes tipo I.
5. Uso de um peptídeo tipo APL de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que as doenças inflamatórias intestinais são selecionadas do grupo que compreende a doença de Crohn e a colite ulcerativa.
6. Uso do peptídeo tipo APL de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a composição farmacêutica é administrada por via parenteral ou da mucosa.
7. Uso do peptídeo tipo APL de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que a composição farmacêutica é administrada por via parenteral selecionada do grupo que compreende a via intradérmica, a via subcutânea, a via intramuscular e a via intravenosa.
8. Uso do peptídeo tipo APL de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que a composição farmacêutica é administrada pela

via mucosa seleccionada do grupo que comprende a via retal e a via oral.

Figura 1

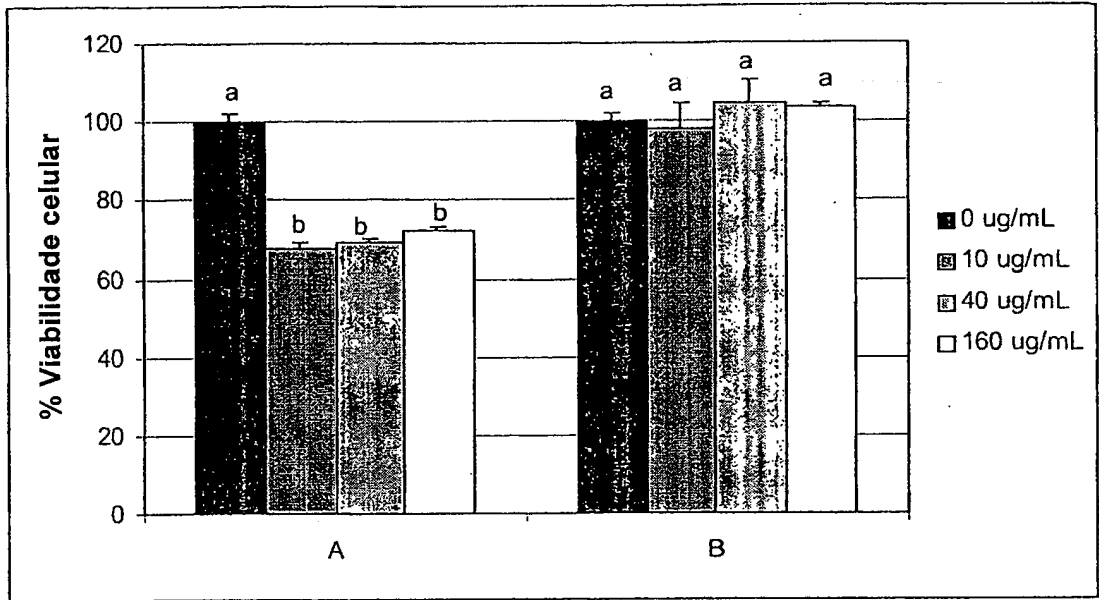


Figura 2

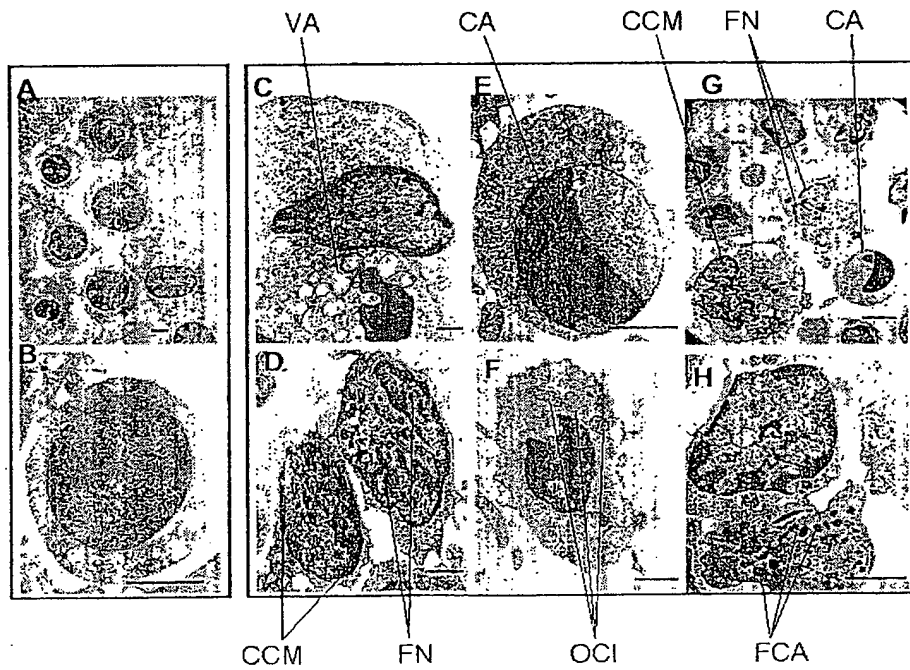


Figura 3



Figura 4

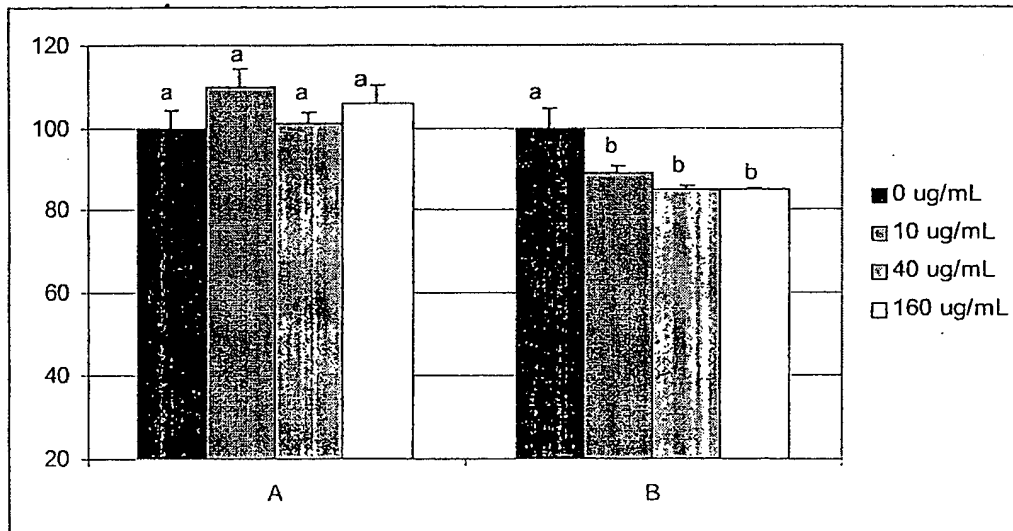


Figura 5

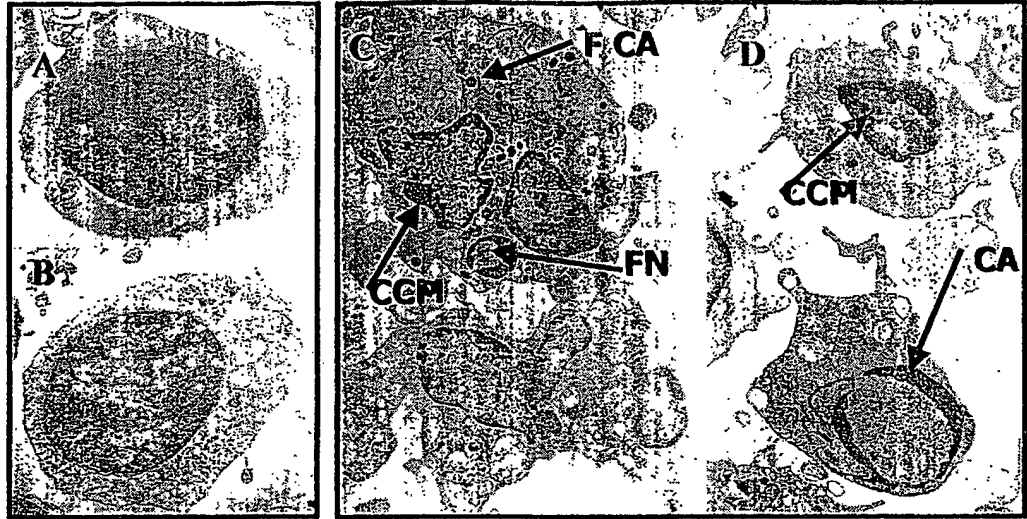


Figura 6

A

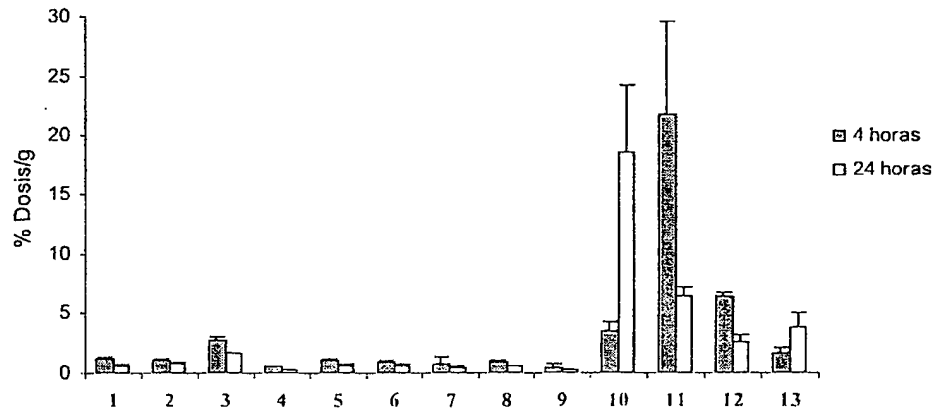
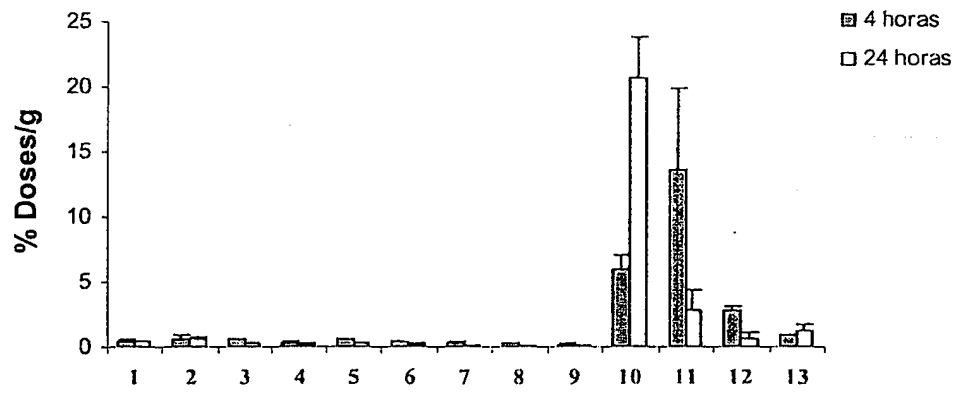
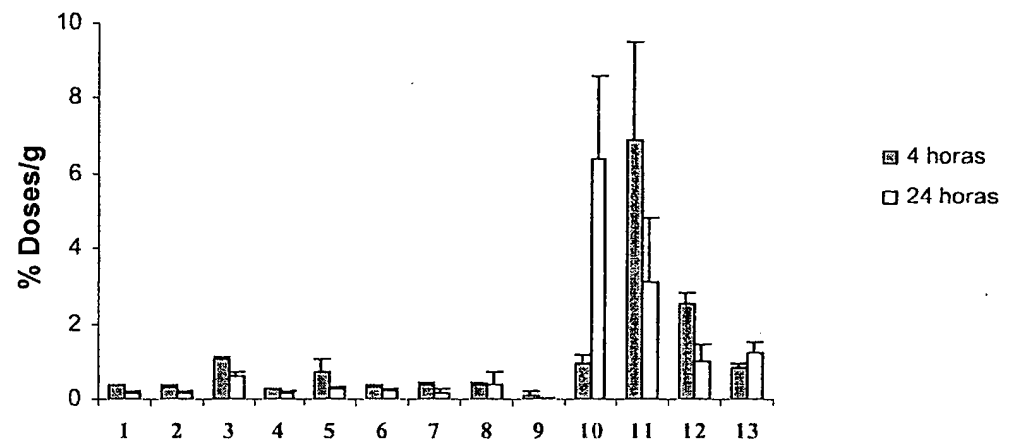


Figura 6

B



C



D

