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

(21) BR 112020010180-0 A2

(22) Data do Depósito: 21/11/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 12/01/2021

(54) Título: B-DEFENSINA E/OU A-DEFENSINA HUMANA PARA USO NA PREVENÇÃO OU NO TRATAMENTO DE DOENÇA DO ENXERTO CONTRA HOSPEDEIRO AGUDA

(51) Int. Cl.: A61K 38/17; A61P 37/06.

(30) Prioridade Unionista: 24/11/2017 EP 17203527.1; 31/08/2018 EP 18191954.9.

(71) Depositante(es): DEFENSIN THERAPEUTICS APS.

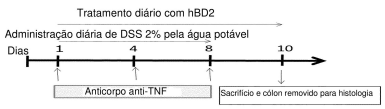
(72) Inventor(es): PETER NORDKILD.

(86) Pedido PCT: PCT EP2018082022 de 21/11/2018

(87) Publicação PCT: WO 2019/101773 de 31/05/2019

(85) Data da Fase Nacional: 21/05/2020

(57) Resumo: A presente invenção refere-se a métodos para tratamento e/ou prevenção de doença do enxerto contra hospedeiro (GVHD) aguda, assim como crônica, e, em particular, a métodos para diminuir mortalidade e aumentar especialmente a sobrevivência a longo prazo; complicações agudas associadas à GVHD tal como diarreia, perda de peso e sepse com base em normalização de microbiota de intestino, fígado, pulmão e pele e defesa mucosal; reequilíbrio do sistema imune com normalização de produção de citocinas de IFN-¿, TNF-a, Il-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10 e IL-13 e prevenção e/ou tratamento de tempestade de citocinas; complicações crônicas associadas à GVHD, tal como bronquiolite obliterante e escleroderma, o método compreendendo administração oral, subcutânea, intrapulmonar e/ou dérmica/transdérmica de uma ou mais defensinas de mamíferos selecionadas dentre o grupo de a- e ß-defensinas em um paciente que recebeu ou está prestes a receber um transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênicas.



B-DEFENSINA E/OU A-DEFENSINA HUMANA PARA USO NA PREVENÇÃO OU NO TRATAMENTO DE DOENÇA DO ENXERTO CONTRA HOSPEDEIRO AGUDA

Campo da Invenção

[001] A presente invenção refere-se a métodos para tratamento e/ou prevenção de doença do enxerto contra hospedeiro (*graft-versus-host-disease*, GVHD) aguda, assim como crônica e complicações associadas com GVHD em um paciente que recebeu ou está prestes a receber um transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênicas por administração de uma ou mais defensinas de mamíferos. Os métodos atuais podem levar ao tratamento de sintomas de GVHD, como diarreia e sepse, com base em normalização da microbiota do intestino e pulmão e reequilíbrio do sistema imune com produção reduzida de citocinas eliminando o risco de uma tempestade de citocinas.

Fundamentos

[002] A doença do enxerto contra hospedeiro continua a ser uma causa líder de morbidade e mortalidade após o transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênicas. A GVHD gastrointestinal é a causa principal de mortalidade (Teshima, 2016). A fase inicial de GVHD aguda é desencadeada por dano ao tecido e perda associada da função de barreira mucosal, primariamente no trato gastrointestinal, que é causada pelos regimes condicionantes necessários para levar a doença maligna a um nível mínimo residual apropriado para o subsequente controle imune e para eliminar a função imune existente, seguindo o enxerto do inóculo do doador sem tratamento prévio. Transplante de células-tronco tipicamente usa irradiação total do corpo, imunossupressão e quimioterapia para alcançar estes objetivos duplos, no entanto, eles também resultam em dano à mucosa do trato GI e outras células que contribuem para a “tempestade de citocinas”, que é distinguida pela liberação de citocinas proinflamatórias; classicamente

citocinas Th1: IFNγ, IL-2 e TNF-α e citocinas Th2: IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (Henden, 2015). As terapias de GVHD, pilares de base atuais, focalizam em uma ampla imunossupressão, o que pode afetar os enxertos e, em alguns contextos, reduzir a desejada atividade de enxerto-versus-tumor (Nalle, 2015). Uma redução na carga bacteriana pelo uso de descontaminação antimicrobiana no período pós-transplante pode reduzir a gravidade de GVHD. O pulmão e a pele são os órgãos alvo primários em GVHD crônica, se manifestando como fibrose - bronquiolite obliterante e escleroderma (Henden, 2015). A GVHD aguda permanece uma causa principal de falha do tratamento resultando em mortalidade em 20% de recipientes e 60-80% de sobreviventes experimentam algum grau de GVHD crônica (Markey, 2014).

Sumário

[003] O inventor demonstrou de modo surpreendente em um modelo camundongo de doença do enxerto contra hospedeiro aguda surgindo de transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênicas que uma dose profilática de hBD2 ou HD5 oral é capaz de diminuir a mortalidade dramaticamente e em uma maior extensão que ciclosporina, o tratamento mais comumente usado de GVHD. Também foi demonstrado neste modelo que hBD2 foi capaz de diminuir a produção de IL-1β em células mieloides (CD11c+ células dendríticas e células CD11b+ Ly6FG). IL-1β sendo um condutor principal para GvHD intestinal.

[004] O inventor também demonstrou de modo surpreendente em modelos de camundongo, tanto preventivos como terapêuticos de inflamação intestinal grave (DSS, TNBS, transferência de células T), que β-defensinas mitigam diarreia e perda de peso através de uma saúde intestinal melhorada e diminuem o índice de atividade da doença em equivalência com imunosupressores padrões, tal como prednisolona/dexametasona e ciclosporina, assim como anti TNF-α, todos usados rotineiramente na prevenção e/ou tratamento de GVHD.

[005] Foi demonstrado de modo surpreendente que β-defensinas podem reequilibrar o sistema imune através da normalização de citocinas de IFN-γ, TNF-α, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13. Embora alguns fármacos, por exemplo, anti TNF-α, possam normalizar uma ou umas poucas citocinas, não foram identificados outros fármacos que possam normalizar todas estas citocinas e prevenir uma tempestade de citocinas. A liberação de citocinas inflamatórias ou tempestade de citocinas foi implicada como o mediador primário da ocorrência e gravidade de GVHD aguda (Ball & Egeler, 2008).

[006] Além disso, foi demonstrado tanto em um modelo camundongo preventivo como em um terapêutico que ambas as defensinas α e β tem uma forte influência sobre a composição da microbiota. Por exemplo, defensinas podem aumentar a variedade de micróbios, isto é, melhorar/normalizar a microbiota, mas também que defensinas podem aumentar a abundância de bactérias produzindo ácido graxo de cadeia curta. Ácido graxo de cadeia curta, que desempenha um papel chave na homeostase de células T reguladoras colônicas, é perturbado em GVHD aguda. Os efeitos de defensinas são diferentes de uma defensina para outra e a combinação de uma α- e de um β-defensina são, de fato, novamente diferentes dos efeitos individuais.

[007] Foi ainda e de modo surpreendente demonstrado em um modelo camundongo de asma aguda que uma dosagem de beta-defensina humana 2 (hBD2) seja administrada oralmente ou intranasalmente é capaz de prevenir o início de uma tempestade de citocinas e o desenvolvimento de asma, assim como melhorar a função do pulmão dramaticamente. Contrário à profilaxia de asma convencional, onde supressão imunológica geral é o alvo, profilaxia com hBD2 reequilibra o sistema imune.

[008] Foi ainda demonstrado de modo surpreendente em um modelo camundongo de asma aguda que uma dosagem de beta-defensina humana 2

(hBD2) seja administrada oralmente ou intranasalmente é também capaz de tratar asma normalizando a hiper-responsividade das vias aéreas e adesão.

[009] Em conclusão, o inventor demonstrou que alfa- e beta-defensinas têm todas as propriedades necessárias para ser um tratamento seguro e eficaz das complicações decorrentes do transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênicas. Os peptídeos são seguros, pois são peptídeos endógenos, fisiológicos e humanos. Defensinas podem ser usadas em quantidades que não excedem a quantidade presente no colostro recebido por uma criança recém-nascida a termo. Defensinas podem ser administradas através de administração oral, subcutânea ou intrapulmonar. Defensinas podem reequilibrar o sistema imune sem suprimir o sistema imune. Defensinas podem prevenir uma tempestade de citocinas, o principal culpado da GVHD aguda. Defensinas podem normalizar a microbiota e o metaboloma e promover a produção de ácidos graxos de cadeia curta, que preservam a homeostase das células T reguladoras colônicas. Defensinas podem tratar inflamações intestinais, hepáticas e pulmonares graves.

[0010] Assim, em um aspecto, a descrição refere-se a um método para prevenção ou tratamento de doença do enxerto contra hospedeiro aguda em um paciente que tinha recebido ou está prestes a receber um transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênicas, o método compreendendo administração de pelo menos uma defensina de mamífero do grupo consistindo em α-defensinas e β-defensinas no dito paciente.

[0011] O paciente pode ter grave inflamação intestinal e fígado (por exemplo, distinguida por dor abdominal, náusea, vômitos e icterícia) e perda da defesa mucosal, tempestade de citocinas, perda de peso, ou sepse, erupção cutânea, comichão e vermelhidão.

[0012] O efeito do tratamento pode compreender reequilibrar o sistema imune e prevenir ou tratar a tempestade de citocinas através da normalização da produção de citocinas no tecido.

[0013] O efeito do tratamento pode compreender tratamento de permeabilidade intestinal e sepse através da normalização da defesa mucosal ou atividade de mieloperoxidase nos intestinos.

[0014] O efeito do tratamento pode compreender tratamento de complicações respiratórias, inflamação do pulmão e sepse.

[0015] O efeito do tratamento pode compreender reduzir inflamação pulmonar histológica, inflamação peribronquial, e bem como perivascular e migração de células inflamatórias no fluido de lavagem broncoalveolar.

[0016] O efeito do tratamento pode compreender tratamento e/ou prevenção de inflamação e fibrose dos pulmões e pele, tal como bronquiolite obliterante e escleroderma.

[0017] O efeito do tratamento pode compreender aumentar a riqueza dos genes, aumentar o número de filos, aumentar a presença bacteriana, aumentar a abundância bacteriana e/ou aumentar a produção de ácido graxo de cadeia curta, produção de butirato e/ou diminuir a produção de acetato a partir da microbiota de intestino ou pulmão de dito paciente.

[0018] O efeito do tratamento pode compreender amadurecer, manter e/ou estabilizar uma microbiota normal no intestino ou pulmão ou pele de dito paciente.

[0019] O efeito do tratamento pode compreender aumentar a abundância de Allobaculum, Alloprevotella, Akkermansia, Barnesiella, Bifidobacteriaceae, Faecalibacterium, Lachnospira, Rothia e Veillonella no intestino ou pulmão de dito paciente.

[0020] O efeito do tratamento pode compreender aumentar ingestão de alimentos e ganho de peso no dito paciente.

[0021] A defensina de mamífero pode ser selecionada dentre um grupo consistindo em HD5, HD6, hBD1, hBD2, hBD3 e hBD4, preferivelmente HD5 ou hBD2.

[0022] As defensinas podem ser administradas sozinhas ou em uma

composição, em que dita composição compreende mais do que uma defensina, tal como duas defensinas, tal como três defensinas, tal como quatro defensinas, tal como cinco defensinas. Preferivelmente, as duas defensinas são hBD2 e HD5.

[0023] A defensina de mamífero pode compreender adicionalmente pelo menos uma porção adicional selecionada dentre um grupo consistindo em um peptídeo de penetração celular (CPP), uma porção de ligação à albumina (ABM), uma porção detectável (Z), e um peptídeo de extensão de meia-vida.

[0024] A defensina de mamífero pode ser administrada sozinha ou em combinação com prebióticos, probióticos, triptofano, ácidos graxos de cadeia curta, glucocorticoides, ciclosporina, anti TNF-α, integrinas, antibióticos, imunosupressores, transplante fecal, irradiação ou uma combinação dos mesmos.

[0025] Em aspectos adicionais, a descrição refere-se a polipeptídeos de defensina de mamíferos para uso em um método de tratamento de acordo com a descrição e ao uso de um polipeptídeo de defensina de mamíferos para a preparação de um medicamento para o tratamento de um distúrbio como definido na descrição.

Descrição dos desenhos

[0026] Figura 1. Esboço esquemático da configuração experimental para investigar o efeito de defensinas em um modelo profilático de dextrano sulfato de sódio de colite.

[0027] Figura 2. Esboço esquemático da configuração experimental para investigar o efeito de defensinas em um modelo terapêutico de dextrano sulfato de sódio de colite.

[0028] Figura 3. Esboço esquemático da configuração experimental para investigar os efeitos de defensina de mamíferos (HD5, hBD2 e HD5+hBD2) sobre a composição da microbiota em um modelo murino de

dieta de alto teor de gordura.

[0029] Figura 4. Esboço esquemático da configuração experimental para investigar os efeitos de defensina de mamíferos em um modelo murino sensível a esteroides para prevenção de asma, onde os camundongos são imunizados por ácaro de poeira doméstica (HDM) + adjuvante de Freund e desafiados com HDM.

[0030] Figura 5. Esboço esquemático da configuração experimental para investigar os efeitos de defensina de mamíferos em um modelo murino sensível a esteroides para tratamento de asma, onde os camundongos são imunizados por ácaro de poeira doméstica (HDM) + adjuvante de Freund e desafiados com HDM.

[0031] Figura 6a. Alinhamento de sequência múltipla Clustal W (2.1) de beta defensina humana 1 a 4:

[0032] Nos alinhamentos Clustal W:

* indica posições que tem um único resíduo completamente conservado.

: indica que um dos seguintes grupos ‘fortes’ é completamente conservado:

-S,T,A; N,E,Q,K; N,H,Q,K; N,D,E,Q; Q,H,R,K; M,I,L,V; M,I,L,F; H,Y; F,Y,W.

. indica que um dos seguintes grupos ‘mais fracos’ é completamente conservado:

-C,S,A; A,T,V; S,A,G; S,T,N,K; S,T,P,A; S,G,N,D; S,N,D,E,Q,K; N,D,E,Q,H,K; N,E,Q,H,R,K; V,L,I,M; H,F,Y.

[0033] Figura 6b. Alinhamento Clustal de HD5 e HD6.

[0034] Figura 6c. Alinhamento Clustal de HD5, HD6, e hBD1, hBD2, hBD3, e hBD4.

[0035] Figura 7. Descrição do Sistema de pontuação do índice de atividade da doença para estudos de colite

[0036] Figura 8. Descrição do Sistema de pontuação histológica para estudos de colite.

[0037] Figura 9. Pontuação histológica do cólon distal em estudo profilático de colite induzida por dextrano sulfato de sódio, 10 dias, de murino, mostrando superioridade estatisticamente significante de HBD2 (NZ39000) sobre administração subcutânea de hBD2 e anti TNF-α de camundongo, mostrando superioridade sobre administração i.v. de HBD2. Legenda:

A: Veículo de controle i.v. uma vez por dia

B: Anti-TNF alfa (300 µg/camundongo i.p. 3 vezes)

C: hBD2 (0,1 mg/kg i.v. uma vez por dia)

D: hBD2 (0,1 mg/kg s.c. uma vez por dia)

E: hBD2 (0,1 mg/kg i.v. + s.c. duas vezes por dia)

F: hBD2 (0,1 mg/kg s.c. + s.c. duas vezes por dia)

K: animais sem tratamento prévio.

[0038] Figura 10. Mudança do peso corporal do animal em um estudo profilático de colite induzida por dextrano sulfato de sódio, 10 dias, de murino, mostrando um efeito de preservação do peso para todas as doses de HBD2hBD2 oralmente administradas versus 1 mg/kg de prednisolona oral. Grupos de tratamento: A: veículo de controle PBS duas vezes por dia p.o. B: prednisolona 1mg/kg duas vezes por dia p.o. C: hBD2 duas vezes por dia a 0,05 mg/kg p.o. D: hBD2 duas vezes por dia a 0,5 mg/kg p.o.; E: hBD2 duas vezes por dia a 5 mg/kg p.o. Diferenças significantes dos valores do grupo de controle (veículo) são mostradas como **P<0,01; ***P<0,001 (teste Kruskal-Wallis + pós –teste de Dunn para dados não paramétricos).

[0039] Figura 11. Pontuação do índice de atividade de doença em um estudo profilático de colite induzida por dextrano sulfato de sódio, 10 dias, de murino, mostrando superioridade estatisticamente significante de hBD2 oralmente administrada sobre prednisolona 1 mg/kg. Grupos de tratamento e

significância mostrados como para Figura 10.

[0040] Figura 12. Pontuação histológica em um estudo profilático de colite induzida por dextrano sulfato de sódio, 10 dias, de murino, mostrando efeito estatístico significante de todas as doses de HBD2 oral em equivalência com prednisolona 1 mg/kg. Grupos de tratamento e significância mostrados como para Figura 10.

[0041] Figura 13. Pontuação histológica em um estudo profilático de colite induzida por ácido trinitrobenzeno sulfônico de 8 dias mostrando efeito estatístico significante de 0,03 e 0,1 mg/kg hBD2 (Grupo E e F) em equivalência com prednisolona 10 mg/kg.

A: Controle de veículo s.c. 1 x diariamente

B: prednisolona 10 mg/kg s.c. 1 x diariamente

C: hBD2, s.c. 1 x diariamente = 1 mg/kg

D: hBD2, s.c. 1 x diariamente = 0.3 mg/kg

E: hBD2, s.c. 1 x diariamente = 0,1 mg/kg

F: hBD2, s.c. 1 x diariamente = 0,03 mg/kg

G: hBD2, s.c. 1 x diariamente = 0,1 mg/kg

[0042] Figura 14. Comprimento do cólon em um estudo profilático de colite induzida por dextrano sulfato de sódio de 7 dias de murino, mostrando efeito estatístico significante de hBD2 em equivalência com ciclosporina. *p<0,05 versus DSS, teste de Mann Whitney.

[0043] Figura 15. Pontuação clínica (Pontuação de fezes: 0=normal; 1=fezes úmidas/pegajosas; 2=fezes moles; 3=diarreia; Pontuação de sangue nas fezes: 0=sem sangue; 1=evidência de sangue nas fezes ou em torno do ânus; 2= sangramento grave; Aparência do camundongo: 0=normal; 1=pelo arrepiado ou postura alterada; 2=letárgico) em um estudo profilático de colite induzida por dextrano sulfato de sódio de 7 dias de murino, mostrando efeito estatístico significante de hBD2 em equivalência com ciclosporina assim como superioridade de dosagem TID de hBD2 sobre dosagem BID sem levar

em conta a via de dosagem. * p<0,05 versus DSS; testes de comparações múltiplas ANOVA e Bonferroni de duas-vias.

[0044] Figura 16. Pontuação histológica em um estudo terapêutico de colite induzida por dextrano sulfato de sódio de 14 dias de murino, mostrando efeito estatístico significante de hBD2 0,1 mg/kg em equivalência com dexametasona 1 mg/kg e superior a anti TNF-α camundongo 300µg/camundongo.

[0045] Figura 17. Pontuação clínica (perda de peso corporal, consistência das fezes e presença de sangue pelo reto) em um modelo terapêutico de colite com transferência de células T CD4+CD25+ SCID de 14 semanas de murino, mostrando efeito de hBD2 1 mg/kg s.c. OD em equivalência com 100 µg/ anti TNF-α de camundongo s.c. duas vezes semanalmente (Enbrel) e 0,3 mg/kg dexametasona intraperitonealmente OD.

[0046] Figura 18. Peso de cólon em um modelo terapêutico de colite de transferência de células T CD4+CD25+ SCID de 14 semanas de murinos mostrando efeito de hBD2 1 mg/kg s.c. OD em equivalência com 100 µg/camundongo anti TNF-α s.c. duas vezes semanalmente (Enbrel) e 0,3 mg/kg dexametasona intraperitonealmente OD. *p<0,05; **p<0,01 versus veículo por teste t.

[0047] Figura 19. Atividade de mieloperoxidase em um modelo terapêutico de transferência de células T CD4+CD25+ SCID de 14 semanas de murino, mostrando efeito de 1 mg/kg s.c. hBD2 em equivalência com 100 µg/ anti TNF-α de camundongo s.c. duas vezes semanalmente (Enbrel) e 0,3 mg/kg dexametasona intraperitonealmente OD. *p<0,05; **p<0,01 versus veículo por teste t.

[0048] Figura 20. Análise unifrac não ponderada e ponderada de presença e abundância microbiana após tratamento profilático com HD5, hBD2 e HD5+hBD2 oral em um modelo murino com dieta de alto teor de gordura.

[0049] Figura 21. Abundância de Allobaculum no intestino delgado após tratamento profilático com HD5 e hBD2 oral em um modelo murino com dieta de alto teor de gordura.

[0050] Figura 22. Análise do gênero da abundância microbiana após tratamento profilático com HD5, hBD2 e HD5+hBD2 oral em um modelo murino com dieta de alto teor de gordura.

[0051] Figura 23. Abundância de Lactobacillaceae no cólon após tratamento profilático com hBD2 oral em um modelo murino de alto teor de gordura.

[0052] Figura 24. Abundância relativa de Barnesiella no cólon após 4 (painel esquerdo) e 10 semanas (painel direito) de tratamento profilático com hBD2 oral em um modelo murino com dieta de alto teor de gordura.

[0053] Figura 25. Análise unifrac não ponderada de presença e abundância microbiana após tratamento terapêutico com HD5 ou hBD2 em um modelo murino com dieta de alto teor de gordura. Painel superior mostra os dados em semana 0. O painel inferior em semana 10.

[0054] Figura 26. Abundância relativa de Alloprevotella no cólon após intervenção terapêutica com HD5 e hBD2 oral em um modelo murino com dieta de alto teor de gordura.

[0055] Figura 27. Abundância relativa de Bifidobacteriaceae no intestino delgado e cólon após intervenção terapêutica com HD5 ou hBD2 em um modelo murino com dieta de alto teor de gordura.

[0056] Legenda de Figura para as figuras 28-31. Solução salina IN é o controle não desafiado e não tratado. HDM/Veículo representam os animais não tratados, mas desafiados com HDM. HDM são os animais desafiados com ácaros de poeira doméstica. PO é administração peroral e IN é administração intranasal. Colunas rotuladas * são estatisticamente significantemente diferentes do controle tratado com veículo.

[0057] Figura 28: Hiper-responsividade das vias aéreas no modelo

murino de asma sensível a esteroide de ácaro da poeira doméstica após profilática intranasal e administração oral de hBD2 respectivamente.

[0058] Figura 29: Adesão pulmonar no modelo murino de asma sensível a esteroide de ácaro da poeira doméstica após profilática intranasal e administração oral de hBD2 respectivamente.

[0059] Figura 30: Contagem de células neutrófilas em BALF no modelo murino de asma sensível a esteroide de ácaro da poeira doméstica após administração oral profilática de hBD-2. Os resultados são mostrados como média +/- SEM.

[0060] Figura 31a-f. Concentrações de citocinas de TNF-α (31a), IL-4 (31b), IL-5 (31c), IL-6 (31d), IL-9 (31e) e IL-13 (31f) em homogenado de pulmão no modelo murino de asma sensível a esteroide de ácaro da poeira doméstica após administração oral profilática de hBD-2. # $p<0,05$ versus HDM/veículo PO, Mann Whitney test. Os resultados são mostrados como média +/- SEM.

[0061] Figura 32a e 32b: Hiper-responsividade das vias aéreas no modelo murino de asma sensível a esteroide de ácaro da poeira doméstica após administração terapêutica intranasal (figura 32a) e oral (figura 32b) de hBD2 respectivamente. Solução salina é o controle não desafiado. HDM/Veículo é o controle desafiado com ácaro de poeira doméstica tratado com veículo. “hBD2 IN 1,2 mpk” é hBD2 administrada intranasalmente a 1,2 mg/kg. 5mpk é 5 mg/kg.

[0062] Figura 33a e 33b: Adesão pulmonar no modelo murino de asma sensível a esteroide de ácaro da poeira doméstica após administração terapêutica intranasal (figura 33a) e oral (figura 33b) de hBD2 respectivamente.

[0063] Figura 34: Contagem celular total (34a), neutrófilos (34b) e macrófagos (34c) em BALF no modelo murino de asma sensível a esteroide de ácaro da poeira doméstica após administração terapêutica intranasal de

hBD-2. *p<0,05 versus veículo; teste de Mann-Whitney. Os resultados são mostrados como média +/- SEM.

[0064] Figura 35-42. Concentrações de citocinas de IFN-γ (Figura 35), TNF-α (Figura 36), IL-4 (Figura 37), IL-5 (Figura 38), IL-6 (Figura 39), IL-9 (Figura 40), IL-10 (Figura 41) e IL-13 (Figura 42) em homogenado do pulmão no modelo murino de asma sensível a esteroide de ácaro da poeira doméstica após administração terapêutica intranasal e oral de hBD-2 respectivamente. Cada figura tem dados do braço intranasal à esquerda e do braço peroral à direita nas figuras onde ambos os braços são mostrados. ‘p<0,05 versus veículo correspondente; teste de Mann-Whitney. Os resultados são mostrados como média +/- SEM.

[0065] Figura 43. Histologia pulmonar com preparação H&E/PAS no modelo murino de asma sensível a esteroide de ácaro da poeira doméstica após administração terapêutica intranasal e oral de hBD2 respectivamente. Painel superior esquerdo: controle não tratado e não desafiado. Painel superior direito: controle não tratado e desafiado com HDM. Painel inferior esquerdo: desafiado com HDM tratado com hBD2 PO. Painel inferior direito: desafiado com HDM tratado com hBD2 IN. Ampliação de 50X.

[0066] Figura 44. Gravidade da inflamação pulmonar no modelo murino de asma sensível a esteroide de ácaro da poeira doméstica após administração terapêutica intranasal e oral de hBD2 respectivamente. *p<0,05 versus veículo, teste de Mann Whitney; #p<0,05 versus veículo, teste de postos sinalizados de Wilcox.

[0067] Figura 45. Inflamação perivascular e peribronquial no modelo murino de asma sensível a esteroide de ácaro da poeira doméstica após administração terapêutica intranasal e oral de hBD2 respectivamente. *p<0,05 versus veículo para infiltração perivascular de eosinófilos, teste de Mann Whitney; #p<0,05 versus veículo para infiltração perivascular/peribronquial de eosinófilos e monócitos, teste de postos sinalizados de Wilcox. □

monócitos; ♦ eosinófilos.

[0068] Figura 46. Atividade de mieloperoxidase em um modelo terapêutico de transferência de células T CD4+CD25+ SCID de 14 semanas de murinos mostrando efeito de 1 mg/kg s.c. hBD2 em equivalência com 100 µg/ anti TNF-α de camundongo s.c. duas vezes semanalmente (Enbrel) e 0,3 mg/kg dexametasona intraperitonealmente OD. *p<0,05; **p<0,01 versus veículo por teste t.

[0069] Figura 47. Gráfico de Kaplan-Meyer mostrando sobrevivência dramaticamente aumentada (p<0,0001) em um modelo de doença do enxerto contra hospedeiro de murino após transplante de células-tronco em dia 0 e tratamento com hBD2 de 1,2 mg/kg/dia ou veículo (PBS 100 µL/dia) de dia 0 a dia 10 (n=15).

Figura 48.

[0070] Uma redução estatisticamente significante de pontuação de histologia do intestino delgado, cólon e fígado em 10 camundongos tratados com hBD-2 oral durante 10 dias a partir do dia de transplante de células-tronco.

Figura 49.

[0071] Perda de peso em % da linha base (a) e em gramas (b) em camundongos tratados com hBD-2 oral durante 10 dias desde o dia de transplante de células-tronco.

Figura 50.

[0072] Migração reduzida de células de leucócitos CD45+ em *lamina propria* de cólon e intestino delgado em 10 camundongos tratados com hBD-2 oral durante 10 dias desde o dia de transplante de células-tronco.

Figura 51 a-c.

[0073] Redução de infiltração intestinal de células T e células mieloides da *lamina propria* do cólon e intestino delgado em 10 camundongos tratados com hBD-2 oral durante 10 dias desde o dia do

transplante de células-tronco.

Figura 52 a-c.

[0074] Concentrações de citocinas de TNF-α (a), IL-6 (b) e IL-10 (c) no soro de 10 camundongos tratados com hBD-2 oral durante 10 dias desde o dia do transplante de células-tronco.

Figura 53 a-c.

[0075] Produção reduzida de IL-1β em células mieloides em 10 camundongos tratados com hBD-2 oral durante 10 dias desde o dia de transplante de células-tronco.

Figura 54 a-f.

[0076] Proporção reduzida de neutrófilos (a) e produção reduzida de citocinas Th 1 – IFN-γ em células T CD4 (b) e células T CD8 (c) e células T CD69+CD4 (d); TNF-α em células T CD4 (e) e células T CD8 (f) em 10 camundongos tratados com hBD-2 oral durante 10 dias desde o dia de transplante de células-tronco.

Figura 55.

[0077] Inflamação aumentada, infiltração de células mieloides e leucócitos assim como reparo de tecido aumentado no cólon em 10 camundongos tratados com PBS oral durante 10 dias desde o dia de transplante de células-tronco.

Figura 56.

[0078] Uma redução estatisticamente significante de mortalidade (p = 0,03) em 7 camundongos tratados com hBD-2 oral durante 10 dias desde o dia de transplante de células-tronco comparados com 13 camundongos tratado com ciclosporina e PBS respectivamente.

Figura 57.

[0079] Perda de peso em % de linha base em camundongos tratados com hBD-2 oral, ciclosporina ou PBS durante 10 dias desde o dia de transplante de células-tronco.

Figura 58.

[0080] Uma redução significante de mortalidade em 22 camundongos tratados com hBD-2 oral, HD5 oral ou PBS respectivamente durante 10 dias desde o dia de transplante de células-tronco.

Figura 59.

[0081] Controle da população bacteriana exercido por HD5 e hBD-2 oralmente administradas, medido como a distância do forro intestinal para a população bacteriana (zona de lise) em μm em camundongos comparados com camundongos em uma dieta de baixo teor de gordura ou dieta ocidental. Este experimento demonstra que hBD-2 e HD5 humanas oralmente administradas para um camundongo exercem de modo surpreendente seu efeito modulador da microbiota na superfície epitelial como se elas fossem defensinas de camundongos produzidas pelas células epiteliais do próprio camundongo e não primariamente no lúmen do intestino, como seria de se esperar após administração oral.

Figura 60.

[0082] Coloração de hematoxilina/eosina de fígado após tratamento profilático com hBD2 em um modelo murino com dieta de alto teor de gordura. Não foi notado acúmulo de gordura nos hepatócitos nos camundongos em dieta de baixo teor de gordura, enquanto uma esteatose extensiva (acúmulo de gordura nos hepatócitos) é notada em camundongos alimentados com uma dieta ocidental de alto teor de gordura e acúmulo mínimo de gordura intra-hepatócitos é notado no grupo de camundongos alimentados com uma dieta ocidental de alto teor de gordura suplementada por administração profilática diária de 1,2 mg/kg hBD-2 oral.

Descrição Detalhada

Definições:

[0083] Defensina: O termo “defensina” como usado aqui refere-se a polipeptídeos pertencendo a uma classe de defensina de peptídeos

antimicrobianos. Defensinas representam uma das defesas do hospedeiro inatas dominantes que servem para manter um microbioma saudável e repelir patógenos potenciais (Wehkamp et al.et al., 2002 e Salzman et al., 2007). Defensinas são peptídeos possuindo atividade antimicrobiana contra bactérias Gram positiva e negativa, fungos e arqueas, assim como exercendo atividade anti-inflamatória.

[0084] As defensinas humanas são peptídeos catiônicos pequenos divididos em α- e β-defensinas com base na topologia de suas uniões dissulfeto de cisteína intramoleculares (Figura 6). As defensinas de mamífero têm características estruturais bem definidas: os peptídeos maduros são pequenos (3–6 kDa, comprimento de 28–42 aminoácidos), catiônicos (carga líquida +1 a +11), anfipáticos e têm uma estrutura terciária altamente conservada de uma folha β de fita antiparalela tripla. A conservação da estrutura dentre as defensinas é de alguma forma surpreendente considerando a variabilidade na sequência de aminoácido e é devida a seis resíduos de cisteína conservados em toda uma família de defensinas. Estes seis resíduos de cisteína forma três uniões dissulfeto, que estabilizam a estrutura do núcleo de folha β de fita tripla (Mammalian Antimicrobial Peptides; Defensins and Cathelicidins Dorin et al, in Molecular Medical Microbiology (2a. ed), 2015.

[0085] α-defensinas são as expressadas pelas células Paneth nas criptas do intestino delgado (HD5 e HD6 ou DEFA5 e DEFA6). β-defensinas (DEFBn) são principalmente produzidas por células epiteliais em vários tecidos e órgãos incluindo pele, olho, ouvido médio, boca, traqueia, pulmões, trato gastrointestinal, sistema urogenital, rins, vagina, fígado, pâncreas e glândulas mamárias. Exemplos de defensinas incluem alfa defensina 5 intestinal humana (HD5; SEQ ID NO: 5); alfa defensina 6 intestinal humana (HD6; SEQ ID NO: 6); ambas pertencendo à classe de alfa defensina; e também beta defensina humana 1 (hBD1; SEQ ID NO: 1); beta defensina humana 2 (hBD2; SEQ ID NO: 2); beta defensina humana 3 (hBD3; SEQ ID

NO: 3); beta defensina humana 4 (hBD4; SEQ ID NO: 4); beta defensina humana 2 truncada (SEQ ID NO: 7). Defensinas são expressadas como precursores e são processadas por clivagem do peptídeo sinal e, em alguns casos, pro-peptídeos assim como antes da secreção no espaço extracelular. Algumas das defensinas humanas, por exemplo, hBD1, são produzidas constitutivamente, enquanto outras, por exemplo, hBD2, hBD3 e hBD4, são induzidas por citocinas pro-inflamatórias ou produtos microbianos exógenos. As sequências acima identificadas representam as defensinas bioativas maduras previstas. Será entendido por um versado na técnica que o processamento pode diferir de célula a célula e que o peptídeo maduro secretado resultante por diferir por um ou dois aminoácidos C- ou N-terminais a partir das sequências previstas e ainda reter bioatividade.

[0086] Identidade: A relação entre duas sequências de aminoácidos ou entre duas sequências de nucleotídeos é descrita pelo parâmetro "identidade". O grau de identidade entre duas sequências de aminoácidos é determinado usando o algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman e Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48: 443-453) como implementado no programa Needle do pacote EMBOSS (Rice *et al.*,2000, http://emboss.org), preferivelmente a versão 3.0,0 ou posterior. Os parâmetros opcionais usados são penalidade de abertura de lacuna de 10, penalidade de extensão de lacuna de 0,5, e a matriz de substituição EBLOSUM62 (EMBOSS versão de BLOSUM62). A saída de Needle rotulada "identidade mais longa" (obtida usando a opção *nobrief*) é usada como uma identidade percentual e é calculada como a seguir: (Resíduos Idênticos x 100)/(Comprimento de Alinhamento – Número Total de Lacunas no Alinhamento).

[0087] Microbiota normal: O termo "microbiota normal" é usado aqui para indicar uma microbiota que não é disbiótica. A microbiota normal é distinguida por ter uma grande riqueza de genes. A microbiota intestinal normal é distinguida por compreender bactérias pertencendo aos gêneros

Bacteriodetes, *Faecalibacterium*, *Roseburia*, *Blautia, Ruminococcus*, *Coprococcus*, *Bifidobacterium*, *Metanobrevibacter*, *Lactobacillus*, *Coprococcus*, *Clostridium*, *Akkermansia, Eubacterium.*

[0088] Microbiota normal do pulmão é distinguida por compreender bactérias pertencendo aos gêneros *Bacteroidetes, Firmicutes*, e *Proteobacteria com* o núcleo de microbiota consistindo em *Pseudomonas, Streptococcus, Prevotella, Fusobacteria, Veillonella, Haemophilus, Neisseria e Porphyromonas*

[0089] Tratamento: Os termos "tratamento" e "tratar" como usados aqui referem-se à gestão e cuidado de um paciente com a finalidade de combater uma condição, doença ou distúrbio. O termo é destinado a incluir o espectro completo de tratamentos para uma dada condição da qual o paciente está sofrendo, tal como a administração do composto ativo para a finalidade de: aliviar ou atenuar sintomas ou complicações; retardar a progressão da condição, doença ou distúrbio; curar ou eliminar a condição, doença ou distúrbio; e/ou prevenir a condição, doença ou distúrbio, em que "prevenir" ou "prevenção" deve ser entendido para fazer referência à gestão e cuidados de um paciente com a finalidade de impedir, reduzir os compostos ativos para prevenir ou reduzir o risco do início dos sintomas ou complicações. O paciente a ser tratado é preferivelmente um mamífero, em particular um ser humano.

[0090] Paciente: Um paciente é um indivíduo, que foi tratado com ou está prestes a receber um transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênicas.

Alfa defensinas de mamífero e beta defensinas de mamífero.

[0091] Esta descrição refere-se aos usos de alfa defensinas e/ou beta defensinas de mamíferos, tal como alfa e beta defensinas humanas, mais preferivelmente *Hominidae*, no tratamento ou profilaxia de um indivíduo que

foi ou está prestes a ser tratado com transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênicas.

[0092] Em uma modalidade, a alfa e/ou beta defensinas de mamíferos têm um grau de identidade de pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 85%, mais preferivelmente pelo menos 90%, e o mais preferivelmente pelo menos 95% para qualquer uma das sequências de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7. Em outra modalidade, uma defensina difere de uma das SEQ ID NO: 1 a 7 em menos do que 10, tal como menos que 8, por exemplo, menos do que 5, tal como menos que 4, por exemplo, menos do que 3, tal como menos que 2 aminoácidos.

[0093] Em uma modalidade preferida, as alfa defensinas humanas consistem em (alfa defensina 5 (SEQ ID NO: 5) e/ou alfa defensina 6 (SEQ ID NO: 6). Em uma modalidade preferida, as beta defensinas de mamífero consistem em beta defensina humana 1 (SEQ ID NO: 1), beta defensina humana 2 (SEQ ID NO: 2), beta defensina humana 2 truncada (SEQ ID NO: 7), beta defensina humana 3 (SEQ ID NO: 3) e/ou beta defensina humana 4 (SEQ ID NO: 4).

[0094] Em uma modalidade preferida, uma alfa defensina humana tem um grau de identidade de pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 85%, mais preferivelmente pelo menos 90%, e o mais preferivelmente pelo menos 95% para a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 5. Em uma modalidade preferida, as alfa defensinas de mamífero humano consistem em alfa defensina 5 (SEQ ID NO: 5).

[0095] Em uma modalidade preferida, a beta defensina humana tem um grau de identidade de pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 85%, mais preferivelmente pelo menos 90%, e o mais preferivelmente pelo menos 95% para a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 2. Em uma modalidade preferida, as beta defensinas humanas consistem em beta defensina humana 2

(SEQ ID NO: 2).

[0096] Em ainda outra modalidade, as alfa defensinas de mamífero compreendem alfa defensinas humanas e/ou alfa defensinas de camundongos, e variantes funcionalmente equivalentes das mesmas. Preferivelmente, a alfa defensina de mamífero consiste em alfa defensina humana 5, alfa defensina humana 6 e variantes funcionalmente equivalentes das mesmas. Mais preferivelmente, as alfa defensinas de mamífero consistem em alfa defensina humana 5, e variantes funcionalmente equivalentes ou ortólogos das mesmas.

[0097] Em ainda uma modalidade adicional, as beta defensinas de mamífero consistem em beta defensinas humanas e/ou beta defensinas de camundongo, e variantes funcionalmente equivalentes das mesmas. Preferivelmente, as beta defensinas de mamífero consistem em beta defensina humana 1, beta defensina humana 2, beta defensina humana 2 truncada, beta defensina humana 3, beta defensina humana 4, e variantes funcionalmente equivalentes das mesmas. Mais preferivelmente, as beta defensinas de mamífero consistem em beta defensina humana 2, e variantes funcionalmente equivalentes ou ortólogos das mesmas.

[0098] Uma "variante funcionalmente equivalente" de uma alfa ou beta defensina de mamífero (por exemplo, humano) é uma alfa ou beta defensina de mamífero (por exemplo, humano) modificada exibindo aproximadamente o mesmo efeito na microbiota no pulmão ou no intestino ou na pele como o parental de alfa e/ou beta defensinas de mamífero (por exemplo, humano). Uma variante funcionalmente equivalente de uma defensina de mamífero (por exemplo, humano) pode compreender 1 a 5 modificações de aminoácido, preferivelmente 1 a 4 modificações de aminoácido, mais preferivelmente 1 a 3 modificações de aminoácido, o mais preferivelmente 1 a 2 modificação(ões) de aminoácido, e em particular uma modificação de aminoácido, como comparada com a sequência de aminoácido de defensina de mamífero (por exemplo, humano) (por exemplo, qualquer

uma de SEQ ID NO 1 a 6). Preferivelmente, para beta defensina de mamíferos, comparada com a beta defensina humana 2, tendo SEQ ID NO 2 e para alfa defensinas comparadas com HD5 (SEQ ID NO 5).

[0099] O termo “modificação” significa aqui qualquer modificação química de uma defensina de mamífero (por exemplo, humana). A(s) modificação(ões) pode(m) ser substituição(ões), deleção(ões) e/ou inserção(ões) do(s) aminoácido(s) assim como substituição(ões) de cadeia(s) lateral(ais) de aminoácido; ou uso de aminoácidos não naturais com características similares na sequência de aminoácido. Em particular, a(s) modificação(ões) pode(m) ser amidações, tal como amidação do término C. Preferivelmente, modificações de aminoácido são de uma natureza menor, isto é, substituições ou inserções de aminoácido conservativo que não afetam significativamente a duplicação e/ou atividade do polipeptídeo; deleções únicas; extensões pequenas amino- ou carbóxi-terminais; ou uma extensão pequena que facilita a purificação por mudança da carga líquida ou outra função, tal como uma etiqueta poli-histidina, um epítopo antigênico ou um domínio de ligação. Em uma modalidade a extensão pequena, tal como uma etiqueta poli-histidina, um epítopo antigênico ou um domínio de ligação é fixado à alfa ou beta defensina de mamífero (por exemplo, humana) através de um ligante de peptídeo pequeno de até cerca de 20-25 resíduos e dito ligante pode conter um sítio de clivagem de enzima de restrição.

[00100] Os alinhamentos Clustal W na Figura 6 podem ser usados para prever quais resíduos de aminoácidos podem ser substituídos sem afetar substancialmente a atividade biológica da proteína. As sequências foram alinhadas usando Clustal W 2.1 (http://www.geno,me.jp/tools/clustalw/) e os seguintes ajustes: Penalidade de abertura de lacuna:10, Penalidade de extensão de lacuna: 0,05, Transição de peso: NÃO, Resíduos hidrofílicos para proteínas: GPSNDQE, Lacunas hidrofílicas: SIM, Matriz de peso: BLOSUM (para PROTEÍNA). Substituições dentro do seguinte grupo (Clustal W, grupo

de conservação ‘forte’) devem ser considerados como substituições conservativas: -S,T,A; N,E,Q,K; N,H,Q,K; N,D,E,Q; Q,H,R,K; M,I,L,V; M,I,L,F; H,Y; F,Y,W. Substituições dentro do seguinte grupo (Clustal W, grupo de conservação ‘fraca’) devem ser considerados como substituições semiconservativas: -C,S,A; A,T,V; S,A,G; S,T,N,K; S,T,P,A; S,G,N,D; S,N,D,E,Q,K; N,D,E,Q,H,K; N,E,Q,H,R,K; V,L,I,M; H,F,Y.

[00101] Exemplos de substituições conservativas são substituições feitas dentro do grupo de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutâmico e ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina e asparagina), aminoácidos hidrofóbicos (leucina, isoleucina e valina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptofano e tirosina), e aminoácidos pequenos (glicina, alanina, serina, treonina e metionina).

[00102] As substituições de aminoácidos que geralmente não alteram a atividade específica são conhecidas na técnica. As trocas que ocorrem mais comumente são Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, e Asp/Gly.

[00103] Além dos 20 aminoácidos padrões, aminoácidos não padrões (tal como, 4-hidroxiprolina, 6-*N*-metil lisina, ácido 2-aminoisobutírico, isovalina, e alfa-metil serina) podem ser substituídos por resíduos de aminoácidos de um polipeptídeo de tipo selvagem. Um número limitado de aminoácidos não conservativos, aminoácidos que não são codificados pelo código genético e aminoácidos não naturais podem ser substituídos por resíduos de aminoácidos. “Aminoácidos não naturais” foram modificados após a síntese de proteína, e/ou tem uma estrutura química em sua(s) cadeia(s) lateral(ais) diferente(s) das dos aminoácidos padrões. Os aminoácidos não naturais podem ser quimicamente sintetizados e, preferivelmente, são comercialmente disponíveis, e incluem ácido pipecolico, ácido tiazolidina carboxílico, desidroprolina, 3- e 4-metilprolina, e 3,3-dimetilprolina.

[00104] Os aminoácidos essenciais em uma alfa e/ou beta defensina de mamífero podem ser identificados de acordo com procedimentos conhecidos na técnica, tal como mutagenese dirigida ao sítio ou mutagenese de varredura de alanina (Cunningham e Wells, 1989, *Science* 244: 1081-1085). Na última experiência, mutações de alanina única são introduzidas em cada resíduo na molécula, e as moléculas mutantes resultantes são testadas para atividade biológica (*isto é.*, atividade contra a hiper-responsividade das vias aéreas ou supressão de citocinas, por exemplo, atividade TNF-alfa) para identificar resíduos de aminoácidos que são críticos para a atividade da molécula. Ver, também, Hilton *et al.*, 1996, *J. Biol. Chem.* 271: 4699-4708. As identidades de aminoácidos essenciais também podem ser inferidas de análise de identidades com polipeptídeos que são relacionados com alfa e/ou beta defensina de mamíferos (ver alinhamento Clustal W em figura 5).

[00105] As substituições de aminoácidos únicas ou múltiplas podem ser feitas e testadas usando métodos conhecidos de mutagenese, recombinação, e/ou embaralhamento, seguido por um procedimento de triagem relevante, tal como o descrito por Reidhaar-Olson e Sauer, 1988, *Science* 241: 53-57; Bowie e Sauer, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2152-2156; WO 95/17413; ou WO 95/22625. Outros métodos que podem ser usados incluem *error-prone PCR*, exibição de fagos (por exemplo, Lowman *et al.*, 1991, *Biochem.* 30:10832-10837; Patente norte-americana Nº 5.223.409; WO 92/06204), e mutagenese dirigida para região (Derbyshire *et al.*, 1986, *Gene* 46:145; Ner *et al.*, 1988, *DNA* 7:127). Quando o resultado de uma dada substituição não pode ser previsto com certeza, os derivados podem ser prontamente testados de acordo com os métodos descritos aqui acima para determinar a presença ou ausência de atividade biológica.

Defensinas de longa ação

[00106] A meia-vida de uma α- ou β-defensina de mamífero pode ser estendida por fusão ou conjugação da α- ou β-defensina com outra porção,

isto é, construção de uma α- ou β-defensina de longa ação e biologicamente ativa conectada a uma molécula farmaceuticamente aceitável provendo uma meia-vida plasmática *in vivo* da α- ou β-defensina, que é aumentada substancialmente comparada com a meia-vida plasmática *in vivo* da α- ou β-defensina administrada do mesmo modo que a α- ou β-defensina.

[00107] Uma α- ou β-defensina biologicamente ativa de longa ação compreende uma α-defensina de mamífero ou análogo da mesma ou uma β-defensina de mamífero ou análogo da mesma conectada a uma molécula farmaceuticamente aceitável selecionada dentre o grupo consistindo em uma molécula tendo ligação a um receptor Fc neonatal (FcRn), transferrina, albumina (HAS), XTEN® ou PEG, um polímero homo-aminoácido (HAP), um polímero prolina-alanina-serina (PAS), ou um peptídeo semelhante a elastina (ELP), ácido hialurônico, um peptídeo altamente sialilado, negativamente carregado, tal como o peptídeo carbóxi-terminal (CTP) de cadeia β de gonadotropina coriônica (CG) , IgG humana, e $CH3(CH2)_nCO$- em que n é 8 a 22.

[00108] O análogo de α- ou β-defensina também pode ser de origem não mamífero, e pode ser selecionado dentre peptídeos, polipeptídeos e proteínas.

[00109] O agonista de α- ou β-defensina pode ser conectado à molécula farmaceuticamente aceitável de vários modos, como descrito na literatura da técnica anterior, tal como sem limitação acoplamento químico através de um ligante bifuncional, tecnologia de engenharia genética, por acoplamento do N-terminal ou C-terminal da defensina, tal como α-defensina ou β-defensina, para a molécula farmaceuticamente aceitável, tal como albumina ou um análogo de albumina. Em particular, o N-terminal de albumina ou um análogo de albumina, por exemplo, albumina humana, pode ser acoplado ao C-terminal de uma α-defensina ou β-defensina, ou o N-terminal de uma α- ou β-defensina; ou um C-terminal de albumina, por exemplo, albumina humana,

pode ser acoplado ao C-terminal de uma α-defensina ou β-defensina, ou ao N-terminal de α- ou β-defensina. Uma sequência de ligante pode ser inserida entre a albumina e a cadeia de α- ou β-defensina.

[00110] O agonista de α- ou β-defensina pode ser conectado à molécula farmaceuticamente aceitável através de um ligante estável ou um ligante mais lábil. Vários ligantes são conhecidos na técnica, incluindo moléculas PEG bifuncionais (por exemplo, ver Paige et. al. Pharmaceutical Research, vol. 12, no. 12, 1995), ligantes hidrolisáveis (Shechter *et al*. Bioconjugate Chem. 2005,16: 913- 920 e International Journal of Peptide Research and Therapeutics, Vol. 13, Nos. 1-2, Junho 2007 e W02009095479), PDPH e EMCH, ver, por exemplo, em W02010092135. No caso especial em que a conjugação química (conexão de duas ou mais moléculas) do agonista de α- ou β-defensina, para a molécula farmaceuticamente aceitável, reduz fortemente a atividade funcional da α- ou β-defensina, pode ser preferível usar um ligante mais lábil que pode liberar o agonista funcional de α- ou β-defensina.

[00111] A extensão de meia-vida também pode ser obtida através da acilação da espinha dorsal do peptídeo com um espaçador, por exemplo, espaçador γ-L-glutamila e uma cadeia de di-ácido graxo C-18 para Lisina. A cadeia do sítio di-ácido graxo e o espaçador medeia uma ligação forte, porém reversível, retardando a liberação do sítio de injeção e reduzindo depuração renal.

Métodos e usos

[00112] HD5 e beta defensina humana-2 foram testadas em modelos de animal tanto preventivos como terapêuticos de inflamação intestinal grave e disbiose (Dextrano sulfato de sódio, ácido trinitrobenzeno sulfônico e transferência de células T CD4+CD25+). α- e β-defensinas sejam administradas oralmente sejam subcutaneamente mitigam a diarreia e a perda de peso induzidas por estes produtos químicos através de uma saúde intestinal

melhorada. Importante notar, as defensinas diminuem o índice de atividade da doença e atividade de mieloperoxidase como um marcador de inflamação em equivalência com fortes imunosupressores de GVHD padrões, tal como prednisolona/dexametasona e ciclosporina, assim como anti TNF-α, todos usados como rotina no tratamento de GVHD. As defensinas mostram, assim, potente atividade como um tratamento profilático e/ou terapêutico de pacientes que têm ou estão prestes a ter um transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênicas.

[00113] Foi demonstrado que as β-defensinas podem reequilibrar o sistema imune através da normalização de concentrações em tecido de IFN-γ, TNF-α, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13, assim evitando ou tratando a tempestade de citocinas levando a GVHD aguda e, assim, mostrando atividade potente como um tratamento profilático e/ou terapêutico de pacientes que têm ou estão prestes a receber um transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênicas.

[00114] Foi demonstrado em tanto um modelo preventivo como em um terapêutico de camundongo de dieta com alto teor de gordura que ambas as α- e β- defensinas têm uma forte influência sobre a composição da microbiota aumentando a variedade de micróbios, isto é preservar/normalizar/reestabelecer a microbiota, assim como promover a abundância de bactérias comensais chave, assim apresentando um método para o tratamento de disbiose, uma característica comum de GVHD comum.

[00115] Foi demonstrado que β-defensinas podem normalizar a saúde, inflamação e função intestinal através de uma diminuição da atividade de mieloperoxidase, assim apresentando um método para melhorar a saúde intestinal em pacientes que passaram por um transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênicas.

[00116] Foi demonstrado adicionalmente, em um modelo camundongo de asma alérgica aguda, que uma dosagem de beta-defensina humana 2

(hBD2), administrada oralmente ou intranasalmente, é capaz de prevenir o desenvolvimento de asma, assim apresentando um método para a prevenção de complicações no pulmão e capacidade pulmonar diminuída, com frequência associadas à GVHD aguda e crônica.

[00117] Foi também demonstrado em um modelo camundongo de asma alérgica aguda que uma dosagem de beta-defensina humana 2 (hBD2), administrada oralmente ou intranasalmente, é também capaz de tratar asma, assim apresentando um método para o tratamento de complicações do pulmão e capacidade pulmonar reduzida com frequência associadas à GVHD aguda e crônica.

[00118] Assim, em um aspecto, é provido um método para tratamento de inflamação intestinal grave e tempestade de citocinas, o método compreendendo administração oral ou subcutânea de uma ou mais defensinas de mamífero em que o indivíduo foi tratado ou está prestes a ser tratado com transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênicas.

[00119] Assim, em um aspecto, é provido um método de preservação/normalização/reestabelecimento da microbiota intestinal englobando a presença e abundância aumentadas de bactérias comensais chave, por exemplo, Bifidobacteriaceae, o método compreendendo administração oral de uma ou mais defensinas de mamífero em que o indivíduo foi tratado ou está prestes a ser tratado com transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênicas.

[00120] Em outros aspectos é provido um método de tratamento e/ou prevenção de inflamação e fibrose dos pulmões e intestinos prevenindo bronquiolite obliterante e escleroderma, o método compreendendo administração oral, subcutânea, intrapulmonar, dérmica ou transdérmica de pelo menos uma defensina, em que o indivíduo foi tratado ou está prestes a ser tratado com transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênicas.

[00121] São providos adicionalmente métodos de reduzir a inflamação

pulmonar histológica, inflamação perivascular e bronquiovascular, contagem de células inflamatórias BALF, e/ou produção de citocinas inflamatórias de IFN-γ, TNF-α, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 em tecido do pulmão em um indivíduo que foi ou está prestes a ser tratado com transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênicas, dito método compreendendo administração de pelo menos uma defensina para dito indivíduo.

[00122] Em outros aspectos, a descrição refere-se a uma defensina para uso em um método de tratamento de acordo com qualquer um dos métodos descritos aqui e ao uso de uma defensina para a preparação de um medicamento para o tratamento de um distúrbio de um indivíduo que foi tratado ou está prestes a ser tratado com transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênicas.

[00123] Os métodos providos podem tratar ou prevenir inflamação do pulmão e/ou do intestino e/ou inflamação do fígado por mudança dos fenótipos bacterianos através de uma mudança no nível transcripcional, assim como estrutura e composição da flora bacteriana do pulmão e/ou intestino e/ou fígado ou a metaboloma do pulmão e/ou intestino em um indivíduo que foi tratado ou está prestes a ser tratado com transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênicas.

[00124] Sem ser limitado por teorias, os efeitos observados usando administração oral podem ser atribuídos a uma mudança na microflora do intestino e metaboloma do intestino que podem ter um efeito sobre os pulmões através do assim chamado eixo intestino-pulmão. Os distúrbios crônicos do pulmão, tal como asma, COPD e GVHD crônica exibem, todos, um componente de manifestação de doença intestinal indicando que se tem uma “conversa cruzada” vital entre estes dois sítios mucosais do corpo humano e uma variedade de doenças respiratórias tem sido associada a uma disbiose, não somente da microbiota das vias aéreas, mas também da microbiota intestinal.

[00125] Os micróbios comensais calibram as respostas imunes inatas e adaptativas e impactam os limiares de ativação para estimulações patogênicas, em grande parte por produção de moléculas pequenas que medeiam as interações microbianas-hospedeiro (Donia e Fishback, 2015). Embora a barreira epitelial assegure que os microrganismos sejam grandemente confinados ao intestino, os metabólitos microbianos podem penetrar na barreira epitelial, deixando os mesmos entrar e se acumular no sistema circulatório do hospedeiro, onde eles são sentidos pelas células imunes (Dorrestein, 2014). Trompette, 2013 demonstraram em camundongos que as fibras fermentáveis na dieta mudaram a composição não somente da microbiota do intestino mas também da microbiota do pulmão, em particular a razão de *Firmicutes* para *Bacteriodetes,* o último levando a níveis aumentados locais e sistêmicos de ácidos graxos de cadeia curta, que, por sua vez, influenciaram a hematopoiese de células dendríticas e funcionalidade, assim conformando o ambiente imunológico no pulmão e influenciando a gravidade de inflamação alérgica. Schirmer et al (2016) demonstraram adicionalmente no Projeto Genômico Funcional Humano que a variação inter-individual em resposta de citocinas está conectada a organismos microbianos específicos, assim como funções microbianas. A maioria das associações detectadas foram, ambas, específicas de citocinas e estímulos, sugerindo que o sistema imune reconhece e interage com organismos e produtos microbianos com elevada especificidade e que estes fatores microbianos são associados a um fenótipo imunológico particular. A capacidade de produção de TNF-α e IFN-γ pareceu ser mais fortemente influenciada pelo microbioma, enquanto outras citocinas, tal como IL-1β, IL-6 e Th17 derivadas de IL-17 e IL-22 exibiram menos associações, porém mais específicas, com a microbiota do intestino.

[00126] Os métodos de tratamento descritos aqui podem ser realizados por administração de uma composição compreendendo pelo menos uma α- e/ou β-defensina de mamífero em combinação com ou prebióticos,

probióticos, triptofano, glucocorticoides, ciclosporina, anti TNF-α, integrinas, antibióticos, imunossupressores, transplante fecal ou uma combinação dos mesmos. As defensinas podem ser administradas separadamente ou junto com uma ou mais destas terapias. As defensinas também podem ser administradas junto com outros medicamentos, que podem ser usados no tratamento de pacientes que têm ou estão prestes a ter um transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênicas.

[00127] É importante notar que os métodos descritos podem ser usados para o tratamento, reestabelecimento ou normalização de uma microbiota disbiótica/metaboloma no intestino e/ou pulmão de um indivíduo que passou por e/ou está passando por um tratamento com antibióticos, descontaminação microbiana ou terapia imunossupressiva, ou outro tratamento que tem efeitos negativos sobre a microbiota do pulmão ou intestino.

[00128] A normalização da microbiota do intestino e/ou pulmão também pode envolver a mudança do metaboloma para um que produza relativamente mais butirato ou triptofano e relativamente menos acetato.

Síntese *in vitro*

[00129] Peptídeos antimicrobianos de mamíferos, incluindo alfa-defensinas de mamíferos e beta-defensinas de mamíferos, podem ser preparados por síntese *in vitro*, usando métodos convencionais, como conhecidos na técnica. Vários aparelhos sintéticos comerciais estão disponíveis, por exemplo, sintetizadores automáticos da Applied Biosystems Inc., Beckman, etc. Ao usar sintetizadores, os aminoácidos que ocorrem naturalmente podem ser substituídos por aminoácidos não naturais, particularmente D-isômeros (ou formas D), por exemplo. D-alanina e D-isoleucina, diastereoisômeros, cadeias laterais tendo diferentes comprimentos ou funcionalidades, e similares. A sequência particular e o modo de preparação serão determinados por conveniência, economia, pureza requerida e similares. A conexão química pode ser provida a vários peptídeos ou

proteínas compreendendo funcionalidades convenientes para união, tais como grupos amino para formação de amida ou amina substituída, por exemplo, aminação redutora, grupos tiol para a formação de tioéter ou dissulfeto, grupos carboxila para a formação de amida e similares. Se desejado, vários grupos podem ser introduzidos no peptídeo durante síntese ou durante expressão, o que permite a conexão a outras moléculas ou a uma superfície. Assim, cisteínas podem ser usadas para obter tioéteres, histidinas para conexão a um complexo de íons metálicos, grupos carboxila para formar amidas ou ésteres, grupos amino para formar amidas e similares.

[00130] Peptídeos antimicrobianos de mamíferos, incluindo alfa-defensinas de mamíferos, beta-defensinas de mamíferos ou equivalentes funcionais dos mesmos, também podem ser isolados e purificados de acordo com métodos convencionais de síntese recombinante. A síntese recombinante pode ser realizada usando vetores de expressão apropriados e um sistema de expressão eucariótico ou procariótico. Uma solução pode ser preparada do hospedeiro de expressão e o meio e as defensinas presentes purificados usando HPLC, cromatografia de exclusão, eletroforese em gel, cromatografia de afinidade ou outra experiência de purificação. Métodos para expressão recombinante de beta defensina humana-2 em *E. coli* são descritos em WO 2010/007166 (Novozymes).

[00131] As alfa e beta defensinas de mamífero também podem ser induzidas por administração do mRNA correspondente.

Dosagens

[00132] Uma alfa defensina de mamífero ou uma beta defensina de mamífero, tal como uma alfa defensina humana ou uma beta defensina humana são preferivelmente empregadas em composições farmacêuticas em uma quantidade que é eficaz para prevenir ou tratar doença do enxerto contra hospedeiro em um paciente que tinha sofrido um transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênicas preferivelmente com toxicidade aceitável para o

paciente. Uma alfa defensina de mamífero e uma beta defensina de mamífero, tal como alfa defensina humana e beta defensina humana são também preferivelmente empregadas em composições farmacêuticas em uma quantidade que é eficaz para manter uma composição de microbiota normal no pulmão e/ou no intestino ou para tratar ou normalizar uma microbiota disbiótica no pulmão e/ou no intestino, preferivelmente com toxicidade aceitável para o paciente em necessidade do tratamento.

[00133] Para tais tratamentos, a dosagem apropriada irá, como evidente, variar dependendo de, por exemplo, a natureza química e os dados de farmacocinética de um composto usado, o hospedeiro individual, o modo de administração e a natureza e gravidade das condições sendo tratadas.

[00134] No entanto, em geral, para resultados satisfatórios em mamíferos, por exemplo, humanos, uma dosagem diária indicada de uma alfa defensina humana é preferivelmente de cerca de 0,1 mg HD5 /kg peso corporal a cerca de 10 mg HD5 /kg peso corporal, mais preferivelmente de cerca de 0,5 mg HD5 /kg peso corporal a cerca de 10 mg HD5 /kg peso corporal; tal como 1 mg HD5 /kg peso corporal a 10 mg HD5 /kg peso corporal, mais preferivelmente de cerca de 1,2 mg HD5 /kg peso corporal a cerca de 10 mg HD5 /kg peso corporal, preferivelmente de cerca de 1,2 mg HD5 /kg peso corporal a cerca de 5 mg HD5 /kg peso corporal, ainda mais preferivelmente 1,2 mg HD5 /kg peso corporal, por exemplo, administrada em doses divididas de até uma, duas ou três vezes por dia.

[00135] Em uma modalidade, uma dosagem diária indicada de uma beta defensina humana é preferivelmente de cerca de 0,1 mg hBD2 /kg peso corporal a cerca de 10 mg hBD2 /kg peso corporal, mais preferivelmente de cerca de 0,5 mg hBD2 /kg peso corporal a cerca de 10 mg hBD2 /kg peso corporal; tal como 1 mg hBD2 /kg peso corporal a 10 mg hBD2/kg peso corporal, mais preferivelmente de cerca de 1,2 mg hBD2 /kg peso corporal a cerca de 10 mg hBD2 /kg peso corporal, preferivelmente de cerca de 1,2 mg

hBD2 /kg peso corporal a cerca de 5 mg hBD2 /kg peso corporal, ainda mais preferivelmente 1,2 mg hBD2 /kg peso corporal, por exemplo, administrada em doses divididas de até uma, duas ou três vezes por dia.

[00136] Quando duas diferentes defensinas são administradas em uma dosagem, a dosagem pode compreender quantidades iguais ou aproximadamente iguais das duas defensinas determinadas em uma base em peso ou em uma base molar. A razão também pode diferir, de modo que a razão de alfa defensina para beta-defensina varia de 10:1 a 1:10, tal como 5:1 a 1:5, por exemplo, 2:1 a 1:2 determinada em uma base em peso ou molar.

[00137] Os compostos de modalidades preferidas podem ser administrados a mamíferos, por exemplo, humanos, por modos similares de administração em dosagens similares do que as convencionalmente usadas.

[00138] Em uma modalidade, métodos são providos como descritos aqui, em que a dosagem diária está entre 0,1 e 10 mg defensina/kg, tal como entre 0,5 e 5 mg defensina/kg, tal como entre 1 e 2 mg defensina/kg, tal como 1,2 mg defensina/kg por dia.

[00139] Em certas modalidades, as composições farmacêuticas das modalidades preferidas podem incluir uma alfa defensina de mamífero e/ou uma beta defensina de mamífero, tal como uma alfa defensina humana e/ou uma beta defensina humana em uma quantidade de cerca de 0,1 mg ou menos a cerca de 1500 mg ou mais por forma de dosagem unitária, preferivelmente de cerca de 0,1, 0.2, 0.3, 0.4, ou 0,5 mg a cerca de 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, ou 1000 mg, e mais preferivelmente de cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, ou 25 mg a cerca de 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, ou 100 mg. Em certas modalidades, no entanto, dosagens menores ou maiores do que as mencionadas acima podem ser preferidas. As concentrações e dosagens apropriadas podem ser prontamente determinadas por um versado na técnica. Em certas modalidades, as composições farmacêuticas das modalidades preferidas incluem uma alfa

defensina de mamífero, tal como uma alfa defensina humana. Em outras modalidades, as composições farmacêuticas de modalidades preferidas incluem uma beta defensina de mamífero, tal como uma beta defensina humana. Em modalidades adicionais, as composições farmacêuticas de modalidades preferidas incluem uma alfa defensina de mamífero e uma beta defensina de mamífero, tal como uma alfa defensina humana e uma beta defensina humana, em que a alfa e a beta defensinas estão presentes em quantidades iguais em uma base de molaridade ou em uma base de mg/mL.

[00140] Em uma modalidade, a alfa e/ou beta defensinas de mamífero é(são) administrada(s) pelo menos uma vez diariamente, tal como pelo menos duas vezes diariamente, por exemplo, pelo menos 3 vezes diariamente ou continuamente.

Administração

[00141] Em uma modalidade, a defensina de mamífero é administrada a um paciente durante um período antes do paciente receber o transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênicas.

[00142] Neste caso, a administração de defensina pode ser continuada durante o transplante e pode ser administrada adicionalmente após o transplante estar completo. Em uma modalidade, a defensina de mamífero de acordo com a presente descrição é administrada a um paciente no momento de receber o transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênicas. Por exemplo, a defensina pode ser administrada na mesma data que o transplante. A administração de defensinas pode ser continuada após o transplante.

[00143] Em uma modalidade, a defensina de mamífero é administrada após o transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênicas. Nesta modalidade, administração da defensina pode ser continuada uma vez que o transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênicas é completado. Por exemplo, a defensina pode ser administrada na mesma data que o transplante e uma ou mais vezes cada dia subsequente após o transplante. Em uma

modalidade, o tratamento continua após o transplante por administração em intervalos, tal como a cada dia, a cada segundo dia, a cada terceiro dia, a cada quarto dia, a cada quinto dia, a cada sexto dia ou a cada sétimo dia. Como exemplificado em exemplo 13, o tratamento pode começar no dia do transplante e ser continuado por dias após o transplante, tal como 1 dia ou mais, por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 dias após o transplante. O tratamento também pode ter começado antes do transplante e continuado por dias após o transplante, tal como 1 dia ou mais, por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 dias após o transplante.

Formulações para administração oral ou parenteral

[00144] Alfa defensinas e beta defensinas de mamíferos podem ser empregadas terapeuticamente em composições formuladas para administração por qualquer via convencional.

[00145] Em uma modalidade, a administração é oral, bucal, sublingual, retal, vaginal, intratraqueal, intrapulmonar, intranasal, intracraniana, subcutânea, intravenosa, dérmica ou transdérmica. Preferivelmente a administração é oral.

[00146] Em uma modalidade, a administração de pelo menos uma α-defensina de mamífero e/ou pelo menos uma β-defensina de mamífero de acordo com os métodos descritos, é oral.

[00147] Em uma modalidade, a administração de pelo menos uma β-defensina de mamífero, de acordo com os métodos descritos, é geralmente intranasal ou intrapulmonar. Administração intranasal e intrapulmonar é normal para liberação pulmonar de fármacos.

[00148] Em uma modalidade, a administração de pelo menos uma α-defensina de mamífero e/ou pelo menos uma β-defensina de mamífero, de acordo com os métodos descritos, é subcutânea ou intravenosa.

[00149] Em algumas modalidades, composições, de modalidades

preferidas, podem ser formuladas como um liofilizado, usando excipientes apropriados, que proveem estabilidade como um liofilizado, e subsequente à reidratação. As composições farmacêuticas contendo uma alfa defensina de mamífero e/ou uma beta defensina de mamífero, tal como uma alfa defensina humana e/ou uma beta defensina humana, podem ser fabricadas de acordo com métodos convencionais, por exemplo, por processos de mistura, granulação, revestimento, dissolução ou liofilização. Em uma modalidade preferida, composições farmacêuticas contendo uma alfa defensina de mamífero e/ou uma beta defensina de mamífero são formuladas como uma solução estéril e isotônica.

[00150] Carreadores e/ou diluentes farmaceuticamente aceitáveis são familiares dos versados na técnica. Para composições formuladas como soluções líquidas, carreadores e/ou diluentes aceitáveis incluem solução salina e água estéril deve ser incluída, e a composição pode opcionalmente incluir antioxidantes, tampões, bacteriostatos, e outros aditivos comuns.

[00151] O composto descrito pode ser formulado em uma ampla variedade de formulações para administração oral. As preparações na forma sólida podem incluir pós, comprimidos, gotas, cápsulas, hóstias, pastilhas e grânulos dispersáveis. Outras formas apropriadas para administração oral podem incluir preparações na forma líquida, incluindo emulsões, xaropes, elixires, soluções aquosas, suspensões aquosas, pasta de dentes, dentifrício em gel, goma de mascar ou preparações em forma sólida que se destinam a ser convertidas pouco antes do uso em preparações na forma líquida, como soluções, suspensões e emulsões.

[00152] As composições descritas podem ser formuladas em uma ampla variedade de formulações para administração bucal, sublingual, oral, retal, vaginal, dérmica, transdérmica, intracraniana, subcutânea ou intravenosa. A formulação pode conter (além de alfa defensina de mamífero e/ou beta defensina de mamífero e outros ingredientes ativos opcionais)

carreadores, enchimentos, desintegrantes, condicionadores de fluxo, açúcares e adoçantes, fragrâncias, conservantes, estabilizadores, agentes umectantes, emulsificantes, solubilizadores, sais para regular pressão osmótica, tampões, diluentes, dispersantes e agentes tensoativos, aglutinantes, lubrificantes e/ou outros excipientes farmacêuticos, como são conhecidos na técnica. Um versado nesta técnica pode formular adicionalmente alfa-defensinas de mamíferos, beta-defensinas de mamíferos, de modo apropriado e de acordo com práticas aceitas, como as descritas em Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro (1990).

[00153] Uma alfa defensina de mamífero ou uma beta defensina de mamífero, tal como uma alfa defensina humana ou uma beta defensina humana, pode ser usada sozinha, ou em terapias de combinação com um, dois, ou mais de outros compostos farmacêuticos, ou substâncias de fármacos, por exemplo, com prebióticos, probióticos, glucocorticoides, ciclosporina, anti TNF-α, integrinas, antibióticos, imunosupressores ou uma combinação dos mesmos e/ou com um ou mais excipiente(s) farmaceuticamente aceitáveis.

Administração nas vias aéreas

[00154] Administração nas vias aéreas pode ser usada para administrar as composições da invenção. Por administração intrapulmonar, entende-se administração tópica nos pulmões. Quando aqui usados, os termos “administração intratraqueal, intrabrônquica ou intraalveolar” incluem todas as formas dessa administração, pela qual uma defensina é aplicada na traqueia, brônquios ou alvéolos, respectivamente, seja por instilação de uma solução de uma defensina, aplicação de uma defensina na forma de pó ou deixando a defensina alcançar a parte relevante das vias aéreas por inalação de uma defensina como solução ou suspensão em aerossol ou nebulizado ou suspensão ou pó inalado ou gel, com ou sem estabilizadores ou outros excipientes adicionados.

[00155] Métodos de administração intrabrônquica/alveolar incluem,

mas não são limitados a, lavagem broncoalveolar (BAL) de acordo com métodos bem conhecidos dos versados na técnica, usando, como um fluido de lavagem, uma composição fisiologicamente aceitável na qual uma defensina foi dissolvida ou mesmo por qualquer outra forma eficaz de administração intrabronquial, incluindo o uso de pós inalados contendo defensinas na forma seca, com ou sem excipientes, ou a aplicação direta de uma defensina, em solução ou suspensão ou em forma de pó durante broncoscopia. Métodos para administração intratraqueal incluem, mas não são limitados a, lavagem traqueal às cegas com uma solução similar de defensinas dissolvidas ou uma suspensão de defensina, ou a inalação de gotículas de fluido nebulizadas contendo defensinas dissolvidas ou uma suspensão de defensinas obtida pelo uso de qualquer aparelho de nebulização adequado para este propósito.

[00156] Em outra modalidade, administração intratraqueal, intrabronquial ou intraalveolar não inclui a inalação do produto, mas a instilação ou aplicação de uma solução de uma defensina ou um pó ou um gel contendo defensina na traqueia ou nas vias aéreas inferiores.

[00157] Outros métodos de administração preferidos podem incluir os seguintes dispositivos:

1. Nebulizadores pressurizados usando mistura de ar/oxigênio comprimido
2. Nebulizadores ultrassônicos
3. Nebulizadores de microbombas eletrônicos
4. Inalador de dose medida (MDI)
5. Sistemas de inalador de pó seco (DPI)

[00158] O aerossol pode ser entregue via a) máscaras faciais ou b) via tubos endotraqueais em pacientes intubados durante ventilação mecânica (dispositivos 1, 2 e 3). Os dispositivos 4 e 5 também podem ser usados para o paciente sem assistência, desde que o paciente seja capaz de auto-ativar o dispositivo de aerossol.

[00159] As concentrações preferidas para uma solução compreendendo uma defensina e/ou homólogos funcionais ou variantes de uma defensina estão na faixa de cerca de 0,1 µg a 1000 µg por ml de solução, tal como na faixa de cerca de 0,1 µg a 250 µg por ml de solução.

Composição farmacêutica para administração intrapulmonar

[00160] As composições ou formulações farmacêuticas para uso na presente descrição incluem defensinas em combinação com, preferivelmente dissolvidas em, um carreador farmaceuticamente aceitável, preferivelmente um carreador aquoso ou diluente, ou carregado para as vias aéreas inferiores como uma preparação peguilada ou como uma preparação lipossomal ou nanopartícula administrada como um aerossol via inalação, ou como um fluido de lavagem administrado via um broncoscópio ou como uma lavagem broncoalveloar ou como uma lavagem intratraqueal às cegas ou lavagem com medicamento. Vários carreadores aquosos podem ser usados, incluindo, mas não limitados a, solução salina a 0,9%, solução salina tamponada, tampões fisiologicamente compatíveis e similares. As composições podem ser esterilizadas por experiências convencionais, bem conhecidas do versado na técnica. As soluções aquosas resultantes podem ser embaladas para uso ou filtradas sob condições assépticas e secadas por congelamento, a preparação secada por congelamento sendo dissolvida em uma solução aquosa estéril antes da administração

[00161] Em uma modalidade, uma preparação de defensina pode ser pré-embalada, por exemplo, em unidade de dose única. Em uma modalidade ainda mais preferida, a unidade de dose única é ajustada para o paciente.

[00162] As composições podem conter substâncias auxiliares ou adjuvantes farmaceuticamente aceitáveis, incluindo, sem limitação, agentes de ajuste do pH e tamponantes e/ou agentes de ajuste da tonicidade, tal como, por exemplo, acetato de sódio, lactato de sódio, cloreto de sódio, cloreto de

potássio, cloreto de cálcio, etc.

[00163] As formulações podem conter carreadores e excipientes farmaceuticamente aceitáveis incluindo microesferas, lipossomas, microcápsulas, nanopartículas ou similares. Lipossomas convencionais são tipicamente compostos de fosfolipídeos (neutros ou negativamente carregados) e/ou colesterol. Os lipossomas são estruturas vesiculares com base em bicamadas de lipídeos circundando compartimentos aquosos. Eles podem variar em suas propriedades fisicoquímicas tal como tamanho, composição do lipídeo, carga de superfície e número e fluidez das bicamadas de fosfolipídeos. Os lipídeos mais frequentemente usados para a formação de lipossomas são: 1,2-Dilauroil-*sn*-Glicero-3-Fosfocolina (DLPC), 1,2-Dimiristoil-*sn*-Glicero-3-Fosfocolina (DMPC), 1,2-Dipalmitoil-*sn*-Glicero-3-Fosfocolina (DPPC), 1,2-Distearoil-*sn*-Glicero-3-Fosfocolina (DSPC), 1,2-Dioleoil-*sn*-Glicero-3-Fosfocolina (DOPC), 1,2-Dimiristoil-*sn*-Glicero-3-Fosfoetanolamina (DMPE), 1,2-Dipalmitoil-*sn*-Glicero-3-Fosfoetanolamina (DPPE), 1,2-Dioleoil-*sn*-Glicero-3-Fosfoetanolamina (DOPE), 1,2-Dimiristoil-*sn*-Glicero-3-Fosfato (Sal de monossódio) (DMPA), 1,2-Dipalmitoil-*sn*-Glicero-3-Fosfato (Sal de monossódio) (DPPA), 1,2-Dioleoil-*sn*-Glicero-3-Fosfato (Sal de monossódio) (DOPA), 1,2-Dimiristoil-*sn*-Glicero-3-[Fosfo-*rac*-(1-glicerol)] (Sal de sódio) (DMPG), 1,2-Dipalmitoil-*sn*-Glicero-3-[Fosfo-*rac*-(1-glicerol)] (Sal de sódio) (DPPG), 1,2-Dioleoil-*sn*-Glicero-3-[Fosfo-*rac*-(1-glicerol)] (Sal de sódio) (DOPG), 1,2-Dimiristoil-*sn*-Glicero-3-[Fosfo-L-Serina] (Sal de sódio) (DMPS), 1,2-Dipalmitoil-*sn*-Glicero-3-[Fosfo-L-Serina) (Sal de sódio) (DPPS), 1,2-Dioleoil-*sn*-Glicero-3-[Fosfo-L-Serina] (Sal de sódio) (DOPS), 1,2-Dioleoil-*sn*-Glicero-3-Fosfoetanolamina-N-(glutaril) (Sal de sódio) e 1,1',2,2'-Tetramiristoil Cardiolipina (Sal de amônio). Formulações compostas de DPPC em combinação com outros lipídeos ou modificadores de lipossomas são preferidos, por exemplo, em combinação com colesterol e/ou fosfatidilcolina.

[00164] Os lipossomas de longa circulação são distinguidos por sua capacidade de extravasar em sítios corporais onde a permeabilidade da parede vascular é aumentada. O modo mais popular de produzir lipossomas de longa circulação é fixando o polímero hidrofílico polietileno glicol (PEG) covalentemente à superfície externa do lipossoma. Alguns dos lipídeos preferidos são: 1,2-Dipalmitoil-*sn*-Glicero-3-Fosfoetanolamina-N-[Metoxi (Polietileno glicol)-2000] (Sal de amônio), 1,2-Dipalmitoil-*sn*-Glicero-3-Fosfoetanolamina-N-[Metoxi(Polietileno glicol)-5000] (Sal de amônio), 1,2-Dioleoil-3-Trimetilamônio-Propano (Sal de cloreto) (DOTAP).

[00165] Os possíveis lipídeos aplicáveis para os lipossomas são fornecidos por Avanti, Polar Lipids, Inc, Alabaster, AL. Além disso, a suspensão de lipossomas pode incluir agentes protetores de lipídios que protegem lipídios contra danos de radicais livres e peroxidantes lipídicos em armazenamento. Os extintores de radicais livres lipofílicos, como alfa-tocoferol e quelantes específicos de ferro solúveis em água, como ferrioxianina, são preferidos.

[00166] Vários métodos são disponíveis para preparar lipossomas, como descritos em, por exemplo, Szoka et al., Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9:467 (1980), Patentes norte-americanas Nºs. 4. 235.871, 4.501.728 e 4.837.028, todos sendo incorporados aqui por referência. Outro método produz vesículas multilamelares de tamanhos heterogêneos. Neste método, os lipídios formadores de vesículas são dissolvidos em um solvente orgânico apropriado ou sistema de solventes e secados sob vácuo ou um gás inerte para formar uma fina película de lipídeos. Se desejado, a película pode ser redissolvida em um solvente apropriado, como butanol terciário, e depois liofilizada para formar uma mistura de lipídeos mais homogênea, que está na forma de pó mais facilmente hidratado. Esta película é coberta com uma solução aquosa do fármaco alvo e do componente de alvo e deixada hidratar, tipicamente durante um período de 15 a 60 minutos com agitação. A

distribuição de tamanho das vesículas multilamelares resultantes pode ser alterada para tamanhos menores, hidratando os lipídios sob condições de agitação mais vigorosas ou adicionando detergentes solubilizantes, como desoxicolato.

[00167] Micelas são formadas por tensoativos (moléculas que contêm uma porção hidrofóbica e um ou mais grupos iônicos ou de outra forma fortemente hidrofílicos) em solução aquosa.

[00168] Tensoativos comuns bem conhecidos dos versados na técnica podem ser usados nas micelas da presente invenção. Os tensoativos apropriados incluem laureato de sódio, oleato de sódio, lauril sulfato de sódio, monododecil éter de octaoxietileno glicol, octoxinol 9 e PLURONIC F-127 (Wyandotte Chemicals Corp.). Os tensoativos preferidos são os detergentes de polioxietileno e polioxipropileno não iônicos compatíveis com injeção IV, como TWEEN-80, PLURONIC F-68, n-octil-beta-D-glucopiranosídeo e similares. Além disso, fosfolipídeos, tal como os descritos para uso na produção de lipossomas, também podem ser usados para a formação de micelas.

Exemplos

Exemplo 1.

Efeito anti-inflamatório de administração s.c. e i.v. de hBD2 versus anti-TNF-α de camundongo intraperitonealmente em um modelo profilático de colite induzida por dextrano sulfato de sódio oral, 10 dias, de murino.

Regime de tratamento:

[00169] Figura 1 ilustra o projeto do estudo.

[00170] 70 camundongos C57BL/6 machos alojados em grupos de cinco por gaiola foram distribuídos em 7 grupos de tratamento diferentes. Todos os animais tiveram sua água potável suplementada com DSS a 2% por 7 dias para induzir colite resultando em inflamação e lesão significativas do

tecido colônico. Os animais foram tratados com hBD2 dosado intravenosamente na veia da cauda ou subcutaneamente sob a pele do dorso, com anti-TNF-α de camundongo intraperitonealmente ou PBS como veículo por 10 dias.

Testes:

[00171] Um sistema de pontuação de índice de atividade da doença (DAI) foi aplicado para avaliação clínica (Figura 7). Os animais foram sacrificados no dia 10 e cólon removido para avaliação histológica empregando um sistema de pontuação histológica (Figura 8).

Resultados:

[00172] O efeito mais significativo foi obtido quando hBD2 foi administrada por via subcutânea, ou uma ou duas vezes diariamente, mas administração intravenosa de hBD2 também resultou em redução significativa de DAI. Tanto anti-TNFα como hBD2 mostraram um efeito similar e estatisticamente significativo no DAI. hBD2 especialmente quando administrada s.c. duas vezes diariamente teve um efeito estatístico altamente significativo na pontuação histológica enquanto anti-TNF-α não mostrou nenhum efeito significativo nesta pontuação (Figura 9).

[00173] A GVHD aguda é distinguida por necrose das células da cripta e em casos graves perda total de epitélio nos intestinos. O modelo DSS murino quimicamente induzido, que causa perda de epitélio, parece ser, assim, relevante para testar o efeito profilático de compostos em GVHD. Os resultados no exemplo 1 demonstram que especialmente administração s.c. de hBD2 é tão eficaz quanto o tratamento anti-TNF-α. Algumas publicações relataram um efeito positivo de anti-TNF-α em GVHD.

Exemplo 2.

Efeito anti-inflamatório de administração oral de hBD2 versus prednisolona oral em um modelo profilático de colite induzida por dextrano sulfato de sódio oral, 10 dias, de murino.

Regime de tratamento:

[00174] 50 camundongos C57BL/6 machos alojados em grupos de cinco por gaiola foram distribuídos em 5 grupos de tratamento diferentes. Todos os animais tiveram sua água potável suplementada com DSS a 2% por 7 dias para induzir colite resultando em inflamação e lesão significativas do tecido colônico. Os animais foram tratados com hBD2 oral dosada em três níveis diferentes de dose duas vezes por dia ou prednisolona 1 mg/kg duas vezes por dia ou PBS como veículo por 10 dias.

Testes:

[00175] Um sistema de pontuação de índice de atividade da doença (DAI) foi aplicado para avaliação clínica (Figura 7). Os animais foram sacrificados no dia 10 e cólon removido para avaliação histológica empregando um sistema de pontuação histológica (Figura 8).

Resultados:

[00176] Uma perda dramaticamente reduzida de peso corporal indicando que estes animais estavam comendo mais e experimentando um estado de saúde melhor, foi notada para todos os três níveis de dose de hBD2, mas mais pronunciado no grupo com alta dose recebendo 5 mg/kg BID (Figura 10). Os dois níveis menores de doses de hBD2 tiveram um efeito estatisticamente significativo no DAI no mesmo nível que com Prednisolona, enquanto a alta dose de hBD2 (5 mg/kg BID) teve um efeito significativamente melhor em DAI do que estes (Figura 11). Tanto Prednisolona como hBD2 mostraram um efeito estatisticamente significativo na pontuação histológica, mas o efeito de todos os três grupos de dose de hBD2 foi significativamente melhor do que Prednisolona (Figura 12).

[00177] A GVHD aguda é distinguida por necrose das células da cripta e, em casos graves, perda total de epitélio nos intestinos. O modelo DSS murino quimicamente induzido, que causa perda de epitélio, parece assim relevante para testar o efeito profilático de compostos em GVHD. Os

resultados de exemplo 2 demonstram que administração oral de hBD2 é tão eficaz quanto o tratamento profilático padrão de GVHD com prednisolona oral.

Exemplo 3.

Efeito anti-inflamatório de administração s.c. de hBD2 versus prednisolona s.c. em um modelo profilático de colite induzida por ácido trinitrobenzeno sulfônico, 8 dias, de murino.

Regime de tratamento:

[00178] 105 camundongos BALB/cByJ machos alojados em grupos de cinco por gaiola foram distribuídos em 7 grupos de tratamento diferentes. Colite foi induzida por administração intracolônica de ácido trinitrobenzeno sulfônico no dia 0 sob anestesia leve resultando em inflamação e lesão significativas do tecido colônico. Os animais foram tratados com hBD2 em quatro níveis diferentes de dosagem uma vez diariamente (1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,1 mg/kg, e 0,03 mg/kg) ou Prednisolona 10 mg/kg uma vez diariamente dosada subcutaneamente sob a pele do dorso ou PBS como veículo por 7 dias.

Testes:

[00179] Um sistema de pontuação de índice de atividade da doença (DAI) foi aplicado para avaliação clínica (Figura 7). Os animais foram sacrificados no dia 10 e o cólon removido para avaliação histológica empregando um sistema de pontuação histológica (Figura 8).

Resultados:

[00180] Um aumento estatisticamente altamente significativo no peso corporal indicando que estes animais estavam comendo mais e experimentando um estado de saúde melhor foi visto para os dois níveis mais baixos de doses de hBD2 (0,03 e 0,1 mg/kg OD) hBD2. Tanto Prednisolona como hBD2 (a 0,1, 0,3 e 1 mg/kg) mostraram um efeito clínico estatisticamente altamente significativo na pontuação histológica (Figura 13).

[00181] A GVHD aguda é distinguida por necrose das células da cripta e em casos graves perda total de epitélio nos intestinos. O modelo TNBS murino induzido quimicamente, que causa uma perda grave de epitélio, parece assim relevante para testar o efeito profilático de compostos em GVHD. Os resultados de exemplo 3 demonstram que administração s.c. de hBD2 é tão eficaz quanto o tratamento preventivo padrão com prednisolona.

Exemplo 4.

Efeito anti-inflamatório de administração oral e s.c. de hBD2 versus ciclosporina oral em um modelo profilático de colite induzida por dextrano sulfato de sódio, 7 dias, de murino.

Regime de tratamento:

[00182] 80 camundongos C57BL/6 machos alojados em grupos de cinco por gaiola foram distribuídos em 7 grupos de tratamento diferentes. Todos os animais tiveram sua água potável suplementada com DSS a 3% por 7 dias para induzir colite distinguida por dano epitelial, rompimento da arquitetura da cripta e uma inflamação moderada distinguida por acúmulo de mononucleares e neutrófilos na mucosa e submucosa. Os animais foram tratados com hBD2 oral dosada a 0,6 mg/kg BID ou 0,4 mg/kg TID; hBD2 dosada s.c. a 0,15 mg/kg BID ou 0,1 mg/kg TID; ou ciclosporina 50 mg/kg OD ou água por 7 dias.

Testes:

[00183] Avaliação clínica foi conduzida de acordo com um sistema de pontuação (0 = nenhum sangue nas fezes; 1 = evidência de sangue nas fezes e 2 = sangramento grave). Os animais foram sacrificados no dia 7 e cólon removido para avaliação histológica.

Resultados:

[00184] Uma melhora estatisticamente altamente significativa na manutenção de comprimento do cólon (Figura 14) e pontuações clínicas (Figura 15) foi observada para todos os quatro grupos de dosagem de hBD2,

assim como para Ciclosporina. Dosagem TID de hBD2 foi mais eficaz do que a dosagem BID com ambas as vias de administração, e a dosagem s.c. pareceu mais eficaz do que dosagem oral (Figura 15).

[00185] A GVHD aguda é distinguida por necrose das células da cripta e, em casos graves, perda total de epitélio nos intestinos. O modelo DSS murino quimicamente induzido, que causa perda grave de epitélio, parece assim relevante para testar o efeito profilático de compostos em GVHD. Os resultados de exemplo 4 demonstram que tanto a administração s.c. como a oral de hBD2 é eficaz, especialmente na avaliação clínica como o tratamento profilático padrão de GVHD com ciclosporina.

Exemplo 5.

Efeito anti-inflamatório de administração s.c. de hBD2 versus anti-TNF-α intraperitoneal e dexametasona intraperitoneal em um modelo terapêutico de colite induzida por dextrano sulfato de sódio, 14 dias, de murino.

Regime de tratamento:

[00186] 70 camundongos C57BL/6 machos alojados em grupos de cinco por gaiola foram distribuídos em 7 grupos de tratamento diferentes. Todos os animais tiveram sua água potável suplementada com DSS a 2% por 14 dias para induzir colite resultando em inflamação e lesão significativas do tecido colônico. Os animais foram tratados com hBD2, 0,1 mg/kg s.c. BID; 0,1 mg/kg s.c. OD ou 1,2 mg/kg i.v. OD do dia 8 ao dia 14 ou com anti-TNFα de camundongo 250 µg/camundongo intraperitonealmente no dia 8, 10 e 13 ou com dexametasona 1 mg/kg intraperitonealmente de OD ou PBS s.c. como veículo.

Testes:

[00187] Um sistema de pontuação de índice de atividade da doença (DAI) foi aplicado para avaliação clínica (Figura 7). Os animais foram sacrificados no dia 14 e cólon removido para avaliação histológica

empregando um sistema de pontuação histológica (Figura 8).

Resultados:

[00188] Um efeito estatisticamente significativo em DAI foi observado para hBD2 0,1 mg s.c. OD e Dexametasona 1 mg/kg i.p. OD. Similarmente um efeito estatisticamente significativo na pontuação histológica (Figura 16) foi observado tanto para hBD2 0,1 mg/kg s.c. OD como Dexametasona.

[00189] A GVHD aguda é distinguida por necrose das células da cripta e, em casos graves, perda total de epitélio nos intestinos. O modelo DSS murino quimicamente induzido, que causa perda grave de epitélio, parece assim relevante para testar o efeito do tratamento de compostos em GVHD. Os resultados do exemplo 5 demonstram que administração s.c. de hBD2 é tão eficaz quanto o tratamento padrão de GVHD com dexametasona.

Exemplo 6.

Eficácia de administração s.c. de hBD2 versus anti-TNF-α s.c. (Enbrel) e dexametasona intraperitoneal em um modelo terapêutico de colite induzida por transferência de células T CD4+CD25+, 14 semanas, de murino.

Regime de tratamento:

[00190] 70 camundongos BALB/c fêmeas alojados em grupos de cinco por gaiola foram distribuídos em 7 grupos de tratamento diferentes. Colite foi induzida em camundongos SCID por transplante de células T CD4+CD25+ de camundongos BALB/c. Linfócitos isolados do baço e linfonodos de camundongos BALB/c foram submetidos à seleção negativa de células T CD4+. Posteriormente, células CD4+CD25+ foram isoladas positivamente por ligação às contas das suspensões de célula T CD4+ e as CD4+CD25- foram coletadas do sobrenadante. Os animais foram tratados com hBD2, 0,1 mg/kg s.c. OD; 1 mg/kg s.c. OD ou 3 mg/kg s.c. OD ou com anti-TNFα de camundongo 100 µg/camundongo s.c. duas vezes semanalmente ou com dexametasona 0,3 mg/kg intraperitonealmente OD ou PBS s.c. como veículo a partir do dia 7 e 86 dias consecutivos.

Testes:

[00191] Avaliação clínica foi com base em perda de peso corporal, consistência das fezes e presença de sangue por reto. Os animais foram sacrificados no dia 95 e cólon removido para avaliação de peso e atividade de mieloperoxidase.

Resultados:

[00192] Um efeito estatisticamente significativo e similar na pontuação clínica foi observado para hBD2 1 mg/kg s.c. OD, para Dexametasona 0,3 mg/kg i.p. OD e para Enbrel (Figura 17). Similarmente, estes três regimes de dosagem mostraram um efeito estatisticamente significativo e similar no peso do cólon (Figura 18) e atividade de mieloperoxidase (Figura 19).

[00193] Acredita-se que GVHD aguda seja uma síndrome mediada por células T distinguida por necrose das células da cripta e, em casos graves, perda total de epitélio nos intestinos e especialmente as células T reguladoras CD4+CD25+ receberam muita atenção como parte da patogênese de GVHD aguda (Ball & Egeler, 2008). O modelo de transferência de células T CD4+CD25+ de murino, que causa perda grave de epitélio, parece assim relevante para testar o efeito do tratamento de compostos em GVHD grave e persistente. Mieloperoxidase é uma enzima humana, que desempenha um papel importante na iniciação e progressão de inflamação e é um biomarcador de estresse oxidativo e inflamação e foi recentemente relatada como um biomarcador potencial de GVHD (Ge e Ye, 2013). Os resultados de exemplo 6 demonstram que a administração de hBD2 é tão eficaz quanto o tratamento anti-inflamatório padrão de GVHD com dexametasona, mas também o tratamento menos estabelecido com anti-TNF-α.

Exemplo 7.

Proteção e preservação de microbiota intestinal por tratamento profilático com defensinas.

[00194] Camundongos: Camundongos foram alojados em trios, 4

gaiolas por grupo. A ingestão de ração foi registrada diariamente logo antes das luzes serem apagadas às 18h. Camundongos individuais foram submetidos a procedimentos experimentais em ordem alterada, tanto em grupo como em gaiola. Os camundongos foram mantidos a temperatura ambiente sob um ciclo claro/escuro de 12 horas em condições padrão de SPF.

[00195] Dietas: Para dosagem, o peso médio foi estimado como sendo 25 gramas por camundongo. Os camundongos comeram aproximadamente 3 gramas de ração por camundongo por dia.

[00196] Regime de tratamento: Camundongos foram alimentados com ou uma dieta com alto teor de gordura (HFD) ou com uma dieta de controle com baixo teor de gordura (LF). A HFD continha 4 subgrupos; 1 hBD2, 1 HD5, 1 hBD2/HD5 e 1 HFD padrão sem suplementação de defensinas (Figura 3). A concentração de defensina era 1,2 mg hBD2 por kg de camundongo por dia. HD5 foi dado em concentração equimolar para hBD2. O grupo combinatório recebeu 50% hBD2 + 50% HD5, consequentemente uma quantidade total de defensinas equivalente aos grupos de teste restantes.

Testes:

[00197] Análises microbianas foram realizadas para estudar a microbiota do intestino. Caracterização longitudinal 16S foi conduzida em 4 amostras pareadas de 60 camundongos, 240 amostras no total. Cada camundongo foi amostrado antes da mudança da dieta, 1 semana após a mudança da dieta, 4 semanas após a mudança da dieta e no término, assegurando assim uma caracterização completa da microbiota fecal como um resultado de tratamento com defensina.

Resultados

[00198] Mudança de peso. Embora a ingestão de ração fosse similar em todos os três grupos de dieta experimental, ambos os grupos de Dieta com Alto Teor de Gordura (HFD) ganharam significativamente mais peso do que o grupo de referência de Dieta com Baixo Teor de Gordura (LFD) em relação

ao período de estudo de 10 semanas (*p<0,0001, ANOVA de duas vias, Teste de Tukey). O grupo HFD mais hBD2, no entanto, ganhou significativamente menos peso do que o grupo de referência HFD (*p= 0,0028).

[00199] Microbiota. hBD2 afetou principalmente a presença microbiana, enquanto HD5 e hBD2+HD5 afetaram principalmente a abundância microbiana (Figura 20). Um aumento estatisticamente significativo de abundância de *Alobaculum* foi visto no intestino delgado após profilaxia com HD5 (p<0,02; Figura 21). *Alobaculum* é uma espécie produtora de ácidos graxos de cadeia curta. Ácidos graxos de cadeia curta desempenham um papel importante na regulação de homeostase de células T reguladoras colônicas, mediada por GPCR43. Hipoplasia de células T e homeostase de células T perturbadas é uma parte central tanto de GVHD aguda como crônica. A Figura 22 é uma análise de gênero que mostra a abundância relativa de espécies nos grupos de tratamento diferentes e ilustra o efeito de hBD2 e HD5 na flora intestinal. Um aumento estatisticamente significativo na abundância de *Barnesiella* no cólon foi observado após tratamento profilático com hBD2 (p<0,03; Figura 24). *Barnesiella* é uma bactéria que é capaz de eliminar e proteger contra o domínio intestinal de bactérias patogênicas resistentes a antibióticos que podem ser observadas em pacientes hospitalizados. A abundância de *Barnesiella* corresponde à quantidade de várias células imunorregulatórias. Quanto mais alto o nível de *Barnesiella* no cólon, mais células B da zona marginal e células T assassinas naturais invariantes enumeradas no baço e fígado. No desenvolvimento de colite em camundongos IL-10-/-, níveis mais altos de um filótipo de *Barnesiella* estão correlacionados com níveis mais baixos de atividade da doença. Uma tendência para abundância menor de *Lactobacillaceae* foi observada no cólon após tratamento profilático com hBD2 (p=0,1; Figura 23).

[00200] O grupo HFD de camundongos desenvolveu esteatose extensiva (acúmulo de gordura intra-hepatocítica) enquanto o grupo HFD de

camundongos tratados profilaticamente com hBD-2 desenvolveu esteatose mínima (Figura 60).

[00201] Microbiota parece desempenhar um papel importante no desenvolvimento de GVHD especialmente após a descontaminação bacteriana dramática realizada logo após o transplante de células-tronco. Em particular, microbiota parece desempenhar um papel importante no desenvolvimento de GVHD especialmente após a descontaminação bacteriana dramática realizada logo antes do transplante de células-tronco. Este exemplo 7 demonstra que defensinas têm uma profunda influência na composição da microbiota em termos de números de espécies presentes, assim como número total de bactérias e, assim, parecem proteger e preservar uma microbiota saudável. Mais especificamente defensinas parecem promover bactérias produtoras de ácido graxo de cadeia curta, SCFA que desempenham um papel fundamental na homeostase de células T reguladoras colônicas. Além disso, defensinas parecem proteger contra inflamação e esteatose hepática.

Exemplo 8. Tratamento de disbiose por tratamento de intervenção com defensinas.

[00202] Camundongos e dietas. O experimento elucida o efeito de hBD2 e HD5 na microbiota em camundongos obesos induzidos pela dieta. Um período pré-tratamento de 13 semanas em que camundongos foram alimentados com HFD de teor muito alto (60% de energia da gordura) precedeu a intervenção. Apenas camundongos atendendo ao critério de um ganho mínimo de peso de 12 gramas (aproximadamente 50% de peso corporal inicial) durante o período pré-tratamento foram incluídos nas análises finais. Camundongos que não atenderam a estes critérios permaneceram em suas gaiolas respectivas como ‘guardiões’ da hierarquia. Eles foram expostos a todos os testes experimentais, mas excluídos das análises.

[00203] Regime de tratamento. Antes da intervenção, todos os camundongos foram examinados por varredura MR. Gaiolas de camundongos

foram distribuídas em grupos experimentais com base em sua massa de gordura. Todas as medidas subsequentes foram pareadas com dados do mesmo camundongo antes da intervenção. Um grupo de referência LFD (dieta com baixo teor de gordura) foi mantido em ciclo paralelo. Como controles para a intervenção 2 grupos adicionais foram incluídos: 1 com HFD de teor muito alto e 1 LFD. Camundongos experimentais permaneceram em HFD de teor muito alto durante a intervenção (Figura 3). Os camundongos estavam na dieta experimental por 10 semanas. Eles foram co-alojados durante todo o experimento, 4 camundongos por gaiola, 3 gaiolas por grupo. Todos os testes foram realizados durante 3 dias, 1 gaiola por grupo por dia.

[00204] Testes. Análises microbianas foram realizadas para estudar a microbiota do intestino. Caracterização longitudinal 16S foi conduzida em 4 amostras pareadas de 60 camundongos, 240 amostras no total. Cada camundongo foi amostrado antes da mudança da dieta, 1 semana após a mudança da dieta, 4 semanas após a mudança da dieta e no término, assegurando assim, uma caracterização completa da microbiota fecal como um resultado do tratamento com defensina.

Resultados

[00205] Mudança de peso – hBD2. Os grupos alimentados com dieta padrão com alto teor de gordura (HFD) tiveram uma ingestão de alimentos igual durante todo o período do estudo, e tiveram o mesmo desenvolvimento de peso com massa gordurosa e magra igual nas primeiras 13 semanas, tendo assim, o mesmo ponto de partida antes da intervenção em dieta. O ganho de peso foi significativamente maior do que no grupo alimentado com dieta com baixo teor de gordura (LFD) (*$p<0,05$ ANOVA de 2 vias). Após a intervenção na dieta os grupos HFD continuaram a aumentar de peso, no entanto, o grupo HFD mais hBD2 tendeu a ganhar menos peso nas primeiras 4 semanas após a intervenção em dieta, embora não significativo (*$p=0,07$, ANOVA de duas vias). A partir da 4 semana até o final do período de estudo,

o grupo HFD mais hBD2 ganhou peso similar ao do grupo HFD padrão (*p=0,82, ANOVA de duas vias).

[00206] Mudança de peso – HD5. Todos os grupos alimentados com HFD tiveram a mesma ingestão de alimentos durante o período de estudo e ganho de peso igual durante o período pré-tratamento de 13 semanas. Após a intervenção da dieta o grupo alimentado com HFD mais HD5 ganhou significativamente menos peso do que o controle HFD (*p<0,05, ANOVA de duas vias). Além disso, uma tendência de diminuição no percentual de gordura no grupo HFD mais HD5 foi observada, e um percentual de gordura significativamente menor no HFD mais HD5 foi medido 4 semanas após a mudança da dieta em comparação com o controle HFD (*p=0,009 ANOVA de duas vias).

Microbiota.

[00207] Ambas as defensinas mostraram ter uma influência profunda na presença bacteriana, assim como na ausência bacteriana (Figura 25). HD5 aumentou a abundância de *Alloprevotella* estatisticamente significativamente no cólon (p<0,02) (Figura 26) enquanto hBD2 não teve influência na abundância de *Alloprevotella*. hBD2 aumentou de modo dramaticamente e estatisticamente significativo a abundância relativa de Bifidobacteriaceae tanto no intestino delgado como no cólon (p<0,0001 e p<0,04 respectivamente; Figura 27). Houve uma tendência para HD5 aumentar a abundância de *Bifidobacteriaceae* no intestino delgado (Figura 27).

[00208] Microbiota parece desempenhar um papel importante em GVHD especialmente após a descontaminação bacteriana dramática realizada logo após o transplante de células-tronco. Tratamento experimental com transplantes fecais estão atualmente em andamento em diversos centros ao redor do mundo, por exemplo, com o Prof. Holler em Regensburg, Alemanha para tentar reestabelecer uma microbiota normal após a descontaminação bacteriana. Este exemplo 8 demonstra que defensinas têm uma influência

profunda na composição da microbiota em termos e diversas espécies presentes e número total de bactérias e, assim, parece ser capaz de tratar uma condição disbiótica e reestabelecer uma microbiota normal, que é fundamental para preservar, por exemplo, a homeostase de células T reguladoras colônicas.

Exemplo 9.

[00209] Para determinar e avaliar a eficácia de tratamento profilático com defensinas intranasal (IN) versus oral em um modelo murino dirigido por ácaro da poeira doméstica de asma alérgica.

Materiais e métodos

[00210] Regime de tratamento: Camundongos BALB/c fêmeas de 7 a 10 semanas de idade foram distribuídos aleatoriamente em 5 grupos de estudo um dia antes do início do estudo e subcutaneamente (SC) sensibilizados para ácaro de poeira doméstica (100 µg HDM em 200 µL de solução salina mais adjuvante completo de Freund em solução salina a 0,9%). Os camundongos foram tratados com hBD2 oralmente e intranasalmente, respectivamente, a uma dose de 1,2 mg/kg/dia (0,4 mg/kg TID) iniciando na manhã do dia 12 e TID continuada em intervalos de aproximadamente 6 horas. A última dose foi administrada no dia 14 uma hora antes do desafio. O número total de doses foi 8 doses ou um total de 2 mg/kg hBD2. Camundongos foram então desafiados intranasalmente (IN) com HDM no dia 14 (HDM 25 µg em 50µL de solução salina) (Figura 4).

Testes:

[00211] Inflamação das vias aéreas: 48 horas após o desafio, lavagem broncoalveolar lavando os pulmões com 3 volumes de PBS frio (0,4; 0,3 e 0,3 mL, total 1 mL). Contagens totais e diferenciais de células de leucócitos foram determinadas em um analisador hematológico automatizado Sysmex XT-2000iV.

[00212] Função pulmonar: Começando 48 horas após desafio com

HDM, medidas de resistência do pulmão e adesão do pulmão foram realizadas após desafio com metacolina (3,125 MCH1; 6,25 MCH2; 12,5 MCH3 e 25 mg/mL MCH4) por camundongos anestesiados e canulados usando o sistema Buxco Finepoint RC de DSI. Dados são representados como resistência das vias aéreas em metacolina de 10 mg/kg e como curvas responsivas à dose.

[00213] Amostragem de pulmão para análise de citocina: Após o término de cada BAL, os pulmões foram removidos do tórax, congelados rapidamente em nitrogênio líquido e armazenados congelados a –80º Celsius até análise de concentração de citocina de TNF-α, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13 e IL-33 no homogenado de pulmão por ELISA.

Resultados

[00214] Um aumento de valores de resistência do pulmão e diminuição de valores de adesão pulmonar em animais tratados com o veículo desafiado com HDM em comparação com camundongos desafiados com solução salina (não asmáticos) foi observado. Uma resposta inflamatória em ambos os grupos de camundongos tratados com veículo (oral e intranasal) foi induzida por um único desafio com HDM 14 dias após sensibilização com HDM. Foi distinguida por um aumento estatisticamente significativo nas contagens totais de células, eosinófilos, neutrófilos, macrófagos e linfócitos em BALF ($p<0,05$) em comparação com controles desafiados com solução salina. Também, análise da concentração de sete citocinas TNF-α, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13 e IL-33 nos homogenados de tecido pulmonar revelou níveis significativamente mais altos em animais desafiados com HDM em comparação com controles desafiados com solução salina.

[00215] hBD2, após aplicação de TID tanto oral como intranasal, administrada do dia 12 ao dia 14 (um total de 2,0 mg/kg em 8 administrações), inibiu eficazmente o aumento de resistência das vias aéreas (Figura 28) e diminuiu a adesão pulmonar (Figura 29) em comparação com animais tratados com veículo desafiados com HDM. Um efeito no influxo

celular em BALF foi observado após aplicação oral, que inibiu significativamente as contagens de neutrófilos (Figura 30). Um reequilíbrio do sistema imune com uma normalização completa de concentrações de citocina nos homogenados do tecido pulmonar foi observado nos níveis de citocina em TNF-α (Figura 31a), IL-4 (31b), L-5 (31c), IL-6 (31d), IL-9 (31e) e IL-13 (31f) após administração oral. Notou-se uma tendência para diminuição de TNF-α, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 e IL-13 após hBD2 ser administrada intranasalmente, mas isto não foi estatisticamente significativamente diferente do controle. Todos os resultados obtidos indicam efeitos preventivos e anti-inflamatórios claros de hBD2 no modelo camundongo dirigido por ácaro de poeira doméstica de asma alérgica.

[00216] O pulmão é o quarto órgão envolvido em GVHD após o intestino, o fígado e a pele. Este exemplo demonstra que defensinas não são apenas capazes de preservar um sistema imune intacto, mas evitam crucialmente um aumento de uma tempestade de citocinas de todas as citocinas chave de GVHD, TNF-α, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 e IL-13, que é uma característica de GVHD aguda. A liberação de citocina inflamatória ou tempestade de citocinas foi implicada como o mediador primário da ocorrência e gravidade de GVHD aguda (Ball & Egeler, 2008).

Exemplo 10.

[00217] Para determinar e avaliar a eficácia de intervenção terapêutica IN versus oral com defensinas em um modelo murino de ácaro da poeira doméstica de asma alérgica.

Materiais e Métodos

[00218] Regime de tratamento: Camundongos BALB/c de 7 a 10 semanas de idade, fêmeas, foram distribuídos aleatoriamente em 7 grupos de estudo um dia antes do início do estudo e subcutaneamente (SC) sensibilizados para ácaro de poeira doméstica (100 µg HDM em 200 µL de solução salina mais adjuvante completo de Freund em solução salina a 0,9%).

Os camundongos foram então desafiados intranasalmente (IN) com HDM no dia 14 (HDM 25 µg em 50 µL de solução salina). Dexametasona foi administrada oralmente (1 mg/kg BID; 50 µL de solução salina tamponada com fosfato (PBS)) no dia 14. hBD2 foi administrada IN ou oralmente (1,7 mg/kg TID IN; 0,4 mg/kg TID IN; 0,4 mg/kg TID oralmente, 50 µL de solução salina tamponada com fosfato) no dia 14. A dose inicial foi administrada 60 minutos antes do desafio, e as doses subsequentes aproximadamente com 6 horas de intervalo (Figura 5).

Testes:

[00219] Inflamação de vias aéreas: 48 horas após o desafio, lavagem broncoalveolar foi realizada lavando os pulmões com 3 volumes de PBS frio (0,4; 0,3 e 0,3 mL, total 1 mL). Contagens totais e diferenciais de células de leucócitos foram determinadas em um analisador hematológico automatizado Sysmex XT-2000iV.

[00220] Função pulmonar: Começando 48 horas após o desafio com HDM, medições de resistência do pulmão e adesão do pulmão foram realizadas após desafio com metacolina (3,125 MCH1; 6,25 MCH2; 12,5 MCH3 e 25 mg/mL MCH4) por camundongos anestesiados, canulados usando o sistema RC Buxco Finepoint de DSI. Os dados são representados como resistência das vias aéreas a 10 mg/kg metacolina e como curvas responsivas à dose.

[00221] Amostragem de pulmão para análise de citocina: Após o término de cada BAL, os pulmões foram removidos do tórax, resfriados rapidamente em nitrogênio líquido e armazenados congelados a –80º Celsius até a análise de concentração de citocina de IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-10 e IFNγ por ELISA.

Resultados

[00222] Um aumento de valores de resistência do pulmão e uma diminuição de valores de adesão pulmonar em animais tratados com veículo

desafiado com HDM em comparação com camundongos desafiados com solução salina (não asmáticos) foram observados. Uma resposta inflamatória em ambos os grupos de camundongos tratados com veículo (oral e intranasal) foi induzida por um único desafio com HDM 14 dias após sensibilização com HDM e adjuvante. Foi distinguida por um aumento estatisticamente significativo nas contagens totais de células, eosinófilos, neutrófilos, macrófagos e linfócitos em BALF ($p<0,05$) em comparação com os controles desafiados com solução salina. Igualmente, a análise da concentração de cinco citocinas IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-10 e IFN-γ nos homogenados do tecido pulmonar revelou níveis significativamente mais altos em animais desafiados com HDM em comparação com controles desafiados com solução salina.

[00223] Tratamento com dexametasona inibiu significativamente as contagens totais de células e eosinófilos, mas não as contagens de neutrófilos, macrófagos e linfócitos em BALF. De acordo com os dados celulares, dexametasona não influenciou os níveis de IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-10 e IFN-γ nos homogenados do tecido pulmonar em comparação com o controle HDM/veículo. No entanto, influenciou medições de AHR relacionadas às contagens de eosinófilos. Os resultados obtidos indicam que este modelo é resistente a esteroide até um certo grau.

[00224] hBD2, após aplicação de TID tanto oral como intranasal, no dia 14, inibiu eficazmente o aumento de resistência das vias aéreas (Figura 32a e 32b) e diminuição de adesão pulmonar (Figura 33a e 33b) em comparação com animais tratados com veículo desafiado com HDM. Um efeito mais proeminente foi observado em alguns parâmetros medidos após aplicação intranasal, de modo que influxo celular em BALF, onde ambas as doses IN (0,4 mg/kg/dia TID e 1,7 mg/kg/dia TID) inibiram significativamente as contagens totais de células de neutrófilos e macrófagos (Figura 34 a, b e c) e uma tendência para diminuição de eosinófilos, enquanto a dexametasona esteroide padrão falhou em inibir os mesmos. Efeitos

significativos similares foram observados em níveis de citocina de IFN-γ (Fig. 35), IL-4 (Fig. 37), IL-5 (Fig. 38), IL-6 (Fig. 39), IL-9 (Fig. 40), e IL-10 (Fig. 41) em homogenados do tecido pulmonar com ambas as vias de dosagem. hBD2 administrada oralmente reduziu significativamente TNF-α (Figura 36), enquanto a hBD2 administrada intranasalmente diferiu do controle, mas não significativamente. Todos os resultados obtidos indicam efeitos anti-inflamatórios claros de hBD2 no modelo camundongo dirigido de ácaro de poeira doméstica/adjuvante completo de Freund de asma alérgica.

[00225] O pulmão é o quarto órgão envolvido em GVHD após o intestino, o fígado e a pele. Este exemplo 10 mostra que defensinas não são capazes apenas de reequilibrar o sistema imune, mas crucialmente tratar ou evitar uma tempestade de citocinas de citocinas chave de GVHD IFN-γ, TNF-α e IL-6, que é uma marca característica de GVHD aguda. De fato, liberação de citocinas inflamatórias ou tempestade de citocinas tem sido implicada como o mediador primário da ocorrência e gravidade de GVHD aguda (Ball & Egeler, 2008).

Exemplo 11.

[00226] Para determinar e avaliar a eficácia de intervenção terapêutica IN versus oral com administração de defensinas em um modelo murino de ácaro da poeira doméstica de asma alérgica.

Materiais e Métodos

[00227] Regime de tratamento: Camundongos BALB/c de 7 a 10 semanas de idade, fêmeas distribuídos em 4 grupos de estudo um dia antes do início do estudo foram subcutaneamente (SC) sensibilizados ao ácaro de poeira doméstica (100 µg HDM em 200 µL de solução salina mais adjuvante completo de Freund em solução salina a 0,9%). Os camundongos foram intranasalmente (IN) desafiados com HDM no dia 14 (HDM 25 µg em 50 µL de solução salina). hBD2 foi administrada IN ou oralmente (0,4 mg/kg TID IN; 0,4 mg/kg TID oralmente, 50 µL de solução salina tamponada com

fosfato) no dia 14. A dose inicial foi administrada 60 minutos antes do desafio, e as doses subsequentes aproximadamente com 6 horas de intervalo.

Testes:

[00228] Amostragem de tecido pulmonar: Os pulmões foram removidos do tórax, congelados rapidamente em nitrogênio líquido e armazenados congelados a –80º Celsius até a análise de concentração de citocina de IL-4, IL-5, IL-8 (KC), IL-9 e IL-13 no homogenado do pulmão por ELISA.

[00229] Os pulmões foram inflados *in situ* em formalina tamponada a 10%, removidos do tórax, colocados individualmente em formalina tamponada a 10%, parafina embebida *in toto*, seccionados e coloridos com H&E/PAS.

[00230] Amostragem de sangue: Todas as amostras de sangue terminais foram coletadas através de sangramentos da veia jugular. Sangue foi amostrado em tubos de Li-heparina, colocados no gelo e imediatamente centrifugados a 4ºC. Plasma foi separado e armazenado a -80ºC até análise de SCFA potencial.

[00231] Amostragem de tecido pulmonar: Os pulmões foram expostos e excisados, abrindo suavemente o tórax e cortando ambos os lados do esterno e costelas e aparando atrás. Os pulmões dos primeiros 6 animais por grupo foram removidos do tórax, congelados rapidamente em nitrogênio líquido e armazenados congelados a -80°C até análise de concentração de citocinas por ELISA.

[00232] Pulmões de outros 8 animais por grupo foram inflados *in situ* com formalina tamponada a 10%, removidos do tórax, colocados individualmente em formalina tamponada a 10%, parafina embebida *in toto*, seccionados e coloridos com H&E/PAS. Os blocos de parafina foram retidos para a análise IHC.

Leituras

• Histopatologia (H&E; PAS) (N = 8/grupos; total N = 32)

• Citocinas nos homogenados do tecido pulmonar (IL-4, IL-5, IL-8 (KC), IL-9 e IL-13) (N=6/grupo; total N=24)

Histopatologia

[00233] Influxo celular (mononucleares, eosinófilos, neutrófilos) foi avaliado semiquantitativamente em lâminas coloridas com H&E separadamente para o espaço peribrônquico/bronquiolar e perivascular como a seguir:

0 ausente

1 poucas células inflamatórias espalhadas

2 agregados maiores

3 acúmulo marcado de células

[00234] A pontuação total para inflamação foi calculada como a soma de todos as pontuações individuais.

[00235] Metaplasia de células *Goblet*, separadamente em um nível de grandes vias aéreas e vias aéreas distais, foi avaliada em lâminas coloridas com PAS como a seguir:

0 nenhuma célula contendo muco ao longo da membrana basal

1 poucas células positivas ao longo da membrana basal com menos do que 75% do citoplasma colorido

2 poucas células positivas ao longo da membrana basal com mais do que 75% do citoplasma colorido

3 numerosas células positivas ao longo da membrana basal com menos do que 75% do citoplasma colorido

4 numerosas células positivas ao longo da membrana basal com mais do que 75% do citoplasma colorido

Avaliação estatística

[00236] Os dados foram processados usando MS Excel. Análise estatística foi realizada usando o *software* GraphPad Prism (versão 5.04).

Diferenças entre grupos são consideradas estatisticamente significativas quando $p<0,05$.

[00237] Análise estatística de dados de valores de pontuação histológica selecionados foi realizada usando o teste Mann-Whitney mediano e não paramétrico.

Resultados

[00238] Uma resposta anti-inflamatória em ambos os grupos de camundongos tratados com veículo (oral e intranasal) foi induzida por um único desafio com HDM, 14 dias após sensibilização com HDM e adjuvante. Foi distinguida por um aumento estatisticamente significativo na concentração de cinco citocinas IL-4, IL-5, IL-8, IL-9 e IL-13 nos homogenados do tecido pulmonar e por mudanças inflamatórias histológicas graves de tecido pulmonar em animais desafiados com HDM em comparação com controles desafiados com solução salina.

[00239] hBD2, tanto após aplicação de TID oral como intranasal, no dia 14, inibiu eficazmente o aumento na inflamação histológica de tecido pulmonar em comparação com animais tratados com veículo desafiado com HDM (Figura 43, 44, 45). Efeitos significativos foram observados nos níveis de citocina IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 nos homogenados do tecido pulmonar após administração oral e em IL-9 e IL-13 após administração IN. Todos os resultados obtidos indicam efeitos anti-inflamatórios claros de hBD2 no modelo camundongo de ácaro de poeira doméstica/adjuvante completo de Freund de asma alérgica.

[00240] O pulmão é o quarto órgão envolvido em GVHD após o intestino, o fígado e a pele. Este exemplo mostra que defensinas são capazes não apenas de reequilibrar o sistema imune, mas crucialmente tratar ou evitar uma tempestade de citocinas de citocinas chave de GVHD IL-4, IL-5, IL-8, IL-9 e IL-13, que é uma característica da GVHD aguda. De fato, liberação de citocinas inflamatórias ou tempestade de citocinas tem sido implicada como o

mediador primário da ocorrência e gravidade de GVHD aguda (Ball & Egeler, 2008).

Exemplo 12.

Sequências

SEQ ID NO:	Nome	Sequência
1	hBD1	DHYNCVSSGGQCLYSACPIFTKIQGTCYRGKAKCCK
2	hBD2	GIGDPVTCLKSGAICHPVFCPRRYKQIGTCGLPGTKCCKKP
3	hBD3	GIINTLQKYYCRVRGGRCAVLSCLPKEEQIGKCSTRGRKCCRRKK
4	hBD4	ELDRICGYGTARCRKKCRSQEYRIGRCPNTYACCLRK
5	HD5	ATCYCRTGRCATRESLSGVCEISGRLYRLCCR
6	HD6	AFTCHCRRSCYSTEYSYGTCTVMGINHRFCCL
7	hBD2 truncado	PVTCLKSGAICHPVFCPRRYKQIGTCGLPGTKCCKKP

Exemplo 13.

[00241] Para determinar e avaliar a eficácia de tratamento profilático com hBD-2 oral em um modelo murino de doença do enxerto contra hospedeiro aguda após transplante de células-tronco.

Materiais e métodos

[00242] Regime de tratamento: 12 camundongos BALB/c fêmeas foram irradiados com 4,5 Gy (2 x 498 seg.) em intervalos de pelo menos 4 horas no dia 0. Medula óssea foi coletada: membros traseiros retirados assepticamente de 2 camundongos WT C57BL/6, fêmeas. O músculo esquelético foi removido e epífise cortada. Lúmen do osso foi lavado com PBS e as células granuladas e coletadas. Coleta de células T: baços de 2 camundongos fêmeas WT C57BL/6, foram peneiradas através de um filtro de células de 100 µM em um disco cheio com PBS. As células foram coletadas em PBS e transferidas para um tubo falcon de 50 mL e centrifugadas. Células foram coletadas em 1 mL de PBS e 20 µL de microcontas de CD4 + 20 µL de microcontas de CD8 por baço adicionadas para incubação por 20 min. a 4ºC. As células foram lavadas com PBS e aplicadas à separação MACS a fim de selecionar positivamente células CD4+ e CD8+. Células T selecionadas positivamente foram contadas e coletadas. Transplante: imediatamente após a segunda irradiação, todos os camundongos recipientes WT BALB/c foram

injetados com 5 x 1.000.000 células BM (50 µL) i.v. no plexo venoso retro-orbital sob anestesia com isoflurano. 15 camundongos BALB/c foram tratados com 1,2 mg de hBD2/kg BW/dia em 100 µL PBS por dia via sonda oral de dia 0 a 10.

[00243] 15 camundongos BALB/c receberam 100 µL de veículo PBS por dia via sonda oral do dia 0 a 10.

Testes:

[00244] Os camundongos foram pesados diariamente durante os 7 dias iniciais e a sobrevivência foi monitorada por 100 dias.

Resultados

[00245] Todos os 15 camundongos no grupo veículo tinham morrido no dia 35 enquanto apenas 4 ou menos do que 30% dos camundongos tratados com hBD2 tinham morrido no dia 35 e 8 camundongos ainda estavam vivos no dia 100 $p<0,0001$ (Figura 47). A pontuação histológica do intestino delgado, cólon e fígado foi, toda, altamente mais baixa estatisticamente para o grupo tratado com hBD-2 em comparação com PBS (Figura 48). Os camundongos tratados com hBD2 perderam estatisticamente menos peso significativamente nos primeiros 7 dias após transplante de medula óssea sugerindo saúde intestinal e integridade intestinal melhoradas (Figura 49). O tratamento com hBD2 reduziu a infiltração com leucócitos CD45+ (análise FACS na Figura 50); infiltração de células T e células mieloides (Figura 51 a-c) em *lamina propria* do cólon. O tratamento profilático com hBD2 também mostrou reduções de concentrações de TNF-α e IL-6 e concentração aumentada de IL-10 (Figura 52 a-c). O tratamento com hBD-2 mostrou adicionalmente redução de IL-1β de células mieloides (análise FACS do baço na Figura 53 a-c). Análise FACS do baço também mostrou número de neutrófilos reduzidos (Figura 54 a); produção de citocina Th1 reduzida especialmente de TNF-α e IFN-γ (Figura 54 b-f). Análise por microarranjos de amostras do cólon mostrou inflamação diminuída, migração de células de

leucócitos e mieloides e remodelagem de tecido no grupo tratado com hBD-2 versus PBS (Figura 55).

Conclusão

[00246] Este exemplo 13 demonstra que tratamento profilático com hBD-2 por 10 dias a partir do dia de transplante de células-tronco reduz mortalidade e aumenta sobrevivência a longo prazo dramaticamente.

Exemplo 14.

[00247] Para determinar e avaliar a eficácia de tratamento profilático com hBD-2 oral versus ciclosporina em um modelo murino de doença do enxerto contra hospedeiro aguda após transplante de células-tronco.

Materiais e métodos

[00248] Regime de tratamento: 20 camundongos BALB/c fêmeas foram irradiados com 4,5 Gy (2 x 498 seg.) a intervalos de pelo menos 4 horas no dia 0. Medula óssea foi coletada: membros traseiros retirados assepticamente de 2 camundongos WT C57BL/6 fêmeas. Músculo esquelético foi removido e epífise cortada. Lúmen do osso lavado com PBS e células granuladas e coletadas. Coleta de células T: baços de 2 camundongos WT C57BL/6, fêmeas foram peneirados através de um filtro de células de 100 µM em um disco cheio com PBS. As células foram coletadas em 1 mL PBS e transferidas para um tubo falcon de 50 mL e centrifugadas. As células foram coletadas em 1 mL PBS e 20 µL de microcontas de CD4 + 20 µL de microcontas de CD8 por baço adicionados para incubação por 20 min. a 4ºC. As células foram lavadas com PBS e aplicadas à separação MACS a fim de selecionar positivamente células CD4+ e CD8+. Células T selecionadas positivamente foram contadas e absorvidas. Transplante: imediatamente após a segunda irradiação, todos os camundongos recipientes WT BALB/c foram injetados com 5 x 1.000.000 células BM (50 µL) i.v. no plexo venoso retro-orbital sob anestesia com isoflurano. 20 camundongos BALB/c foram tratados com 1,2 mg de hBD2/kg BW/dia (n=7); 50 mg ciclosporina/kg BW nos dias

0, 3, 6 e 9 (n=7) ou com frasco de 100 µL PBS por dia via sonda oral (n=6) do dia 0 a 10.

Testes:

[00249] Os camundongos foram pesados em intervalos regulares durante o estudo e sobrevivência foi monitorada por 90 dias.

Resultados

[00250] Todos os, exceto um, camundongos tratados com PBS morreram no dia 90, enquanto apenas 1 dos camundongos tratados com hBD-2 morreu no dia 90 (p = 0,03, Figura 56) e 3 animais dos animais tratados com ciclosporina morreram (p=0,16, Figura 56). Os camundongos tratados com hBD2 e ciclosporina perderam estatisticamente menos peso significativamente após transplante de medula óssea em comparação com os camundongos tratados com PBS sugerindo saúde intestinal e integridade intestinal melhoradas (Figura 57).

Conclusão

[00251] Este exemplo 14 serve para demonstrar que tratamento profilático com hBD-2 por 10 dias a partir do dia de transplante de células-tronco reduz mortalidade pelo menos no mesmo nível que tratamento anti-GVHD padrão com ciclosporina.

Exemplo 15.

[00252] Para determinar e avaliar a eficácia de tratamento profilático com HD5 oral em um modelo murino de doença do enxerto contra hospedeiro aguda após transplante de células-tronco.

Materiais e métodos

[00253] Regime de tratamento: 22 camundongos BALB/c fêmeas foram irradiados com 4,5 Gy (2 x 498 seg.) a intervalos de pelo menos 4 horas no dia 0. Medula óssea foi coletada: membros traseiros retirados assepticamente de 2 camundongos WT C57BL/6 fêmeas. Músculo esquelético foi removido e epífise cortada. Lúmen de osso lavado com PBS e

células granuladas e coletadas. Coleta de células T: baços de 2 camundongos WT C57BL/6 fêmeas foram peneiradas em um filtro de células de 100 µM em um disco cheio de PBS. Células foram coletadas em PBS e transferidas para um tubo falcon de 50 mL e centrifugadas. Células foram coletadas em 1 mL de PBS e 20 µL de microcontas de CD4 + 20 µL de microcontas de CD8 por baço adicionados para incubação por 20 min. a 4ºC. Células foram lavadas com PBS e aplicadas para separação MACS a fim de selecionar positivamente células CD4+ e CD8+. Células T selecionadas positivamente foram contadas e coletadas. Transplante: imediatamente após a segunda irradiação, todos os camundongos recipientes WT BALB/c foram injetados com 5 x 1.000.000 de células BM (50 µL) i.v. no plexo venoso retro-orbital sob anestesia de isoflurano. 22 camundongos BALB/c foram tratados com 1,2 mg HD5/kg BW/dia; 1,2 mg hBD-2/kg BW/dia ou com frasco de 100 µL PBS por dia via sonda oral do dia 0 a 10.

Testes:

[00254] Sobrevivência foi monitorada por 60 dias.

Resultados

[00255] Seis dos oito camundongos tratados com PBS morreram no dia 60, enquanto 2 dos 8 animais tratados com HD5 morreram (p=0,06, Figura 58) e nenhum dos animais tratados com hBD-2 morreu no dia 60 (p=0,008, Figura 58).

Conclusão

[00256] Este exemplo 15 serve para demonstrar que tratamento profilático por 10 dias a partir do dia de transplante de célula-tronco ou com HD5 ou hBD-2 reduz a mortalidade dramaticamente.

Exemplo 16.

Efeito antimicrobiano de defensinas administradas oralmente (HD5 e hBD-2).

Método:

Imunocoloração de mucinas e localização de bactérias por FISH

[00257] Imunocoloração de muco foi pareada com hibridização fluorescente *in situ* (FISH), como previamente descrito a fim de analisar a localização de bactérias na superfície da mucosa intestinal. Resumidamente, tecidos colônicos (cólon proximal, 2 cm do ceco) sem material fecal foram colocados em solução fixadora de metanol-Carnoy (60% metanol, 30% clorofórmio, 10% ácido acético glacial) por um mínimo de 3 horas a temperatura ambiente. Tecidos foram então lavados em metanol 2 x 30 min, etanol 2 x 15 min, etanol/xileno (1:1), 15 min. e xileno 2 x 15 min, seguido por embebimento em parafina com uma orientação vertical. Seções de 5 µm foram obtidas e a cera removida por pré-aquecimeto a 60°C por 10 min., seguido por xileno a 60°C por 10 min., xileno por 10 min. e etanol a 99,5% durante 10 minutos. Etapa de hibridização foi realizada a 50°C durante a noite com sonda EUB338 (5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3', com um marcador 5' usando Alexa 647) diluído a uma concentração final de 10 µg/mL em tampão de hibridização (20 mM Tris–HCl, pH 7,4, 0,9 M NaCl, SDS a 0,1%, formamida a 20%). Após lavagem de 10 min. em tampão de lavagem (20 mM Tris–HCl, pH 7,4, 0,9 M NaCl) e 3 x 10 min. em PBS, caneta PAP (Sigma-Aldrich) foi usada para marcar em torno da seção e solução de bloqueio (soro bovino fetal a 5% em PBS) foi adicionada por 30 min. a 4°C. Anticorpo primário mucina-2 (coelho H-300, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) foi diluído 1:1500 em solução de bloqueio e aplicado durante a noite a 4°C. Após lavagem 3 x 10 min. em PBS, solução de bloqueio contendo anticorpo anti-coelho secundário Alexa 488 diluído 1:1500, isotiocianato de faloidina-tetrametil rodamina B (Sigma-Aldrich) a 1µg/mL e Hoechst 33258 (Sigma- Aldrich) a 10 µg/mL foi aplicada na seção por 2h. Após lavagem 3 x 10 min. em PBS, lâminas foram montadas usando meio de montagem anti-esmaecimento (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Observações foram

realizadas com um microscópio confocal Zeiss LSM 700 com *software* Zen 2011 versão 7.1. Este *software* foi usado para determinar a distância entre bactérias e monocamadas de células epiteliais, assim como a espessura do muco.

Resultados:

[00258] Uma diferença altamente significativa estatisticamente na zona de lise entre a parede intestinal e a população bacteriana foi observada. A distância foi pequena para camundongos alimentados tanto com uma dieta com baixo teor de gordura, assim como uma dieta ocidental, enquanto HD5 e, em particular, hBD-2 tiveram um efeito profundo na distância (Figura 59).

Conclusão

[00259] Este experimento demonstra que HD5 e hBD-2 humanas administradas oralmente em um camundongo exerce seu efeito modulador da microbiota na superfície epitelial do camundongo como se fossem produzidas pelas células epiteliais do próprio camundongo e não primariamente no lúmen do intestino, como se poderia esperar após administração oral.

REFERÊNCIAS

Ball, L.M. and Egeler, R.M. Acute GvHD: pathogenesis and classification. Bone Marrow Transplantation 2008; 41: S58-S64.

Donia, M.S. and Fischbach, M.A. 2015. Small molecules from the human microbiota. Science 349, 1254766

Dorrestein, P.C. et al., 2014. Finding the missing links among metabolites, microbes, and the host. Immunity 40: 824-832.

Ge et Ye. MPO is a potential biomarker of graft-versus-host-disease. Biomark Med 2013; 7: 391-393.

Henden and Hill. Cytokines in graft-versus-host-disease. J Immunol 2015; 194: 4604-4612.

Markey et al. The biology of graft-versus-host-disease: experimental systems instructing clinical practice. Blood 2014; 124: 354362.

Nalle and Turner. Intestinal barrier loss as a critical pathogenic link between inflammatory bowel disease and graft-versus-host-disease. Nature Mucosa Immunology 2015; 8: 720-730.

Salzman NH, Underwood MA and Bevins CL, 2007. Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: a hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa. Semin Immunol 19(2):70-83.

Schirmer, M. et al., 2016. Linking the human gut microbiome to inflammatory cytokine production capacity. Cell 167: 1125-1136

Teshima et al. Acute graft-versus-host-disese: Novel biological insights. Biol Blood Marrow Transplant 2016; 22: 53-58.

Trompette, A. et al., 2013. Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. Nature Medicine 20: 159-168.

Wehkamp J, et al., 2002. Innate immunity and colonic inflammation: enhanced expression of epithelial alpha-defensins. Dig Dis Sci. 47(6):1349-55.

WO 2010/007166

WO 92/06204

WO 95/17413

WO 95/22625

US 5.223.409

REIVINDICAÇÕES

1. β-defensina e/ou α-defensina humana para uso na prevenção ou no tratamento de doença do enxerto contra hospedeiro (GVHD) aguda em um paciente que recebeu ou está prestes a receber um transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênicas, caracterizada pelo fato de que a β-defensina e/ou α-defensina humana é administrada por administração oral, bucal, sublingual, retal, vaginal, intratraqueal, intrapulmonar, intranasal ou dérmica..

2. β-defensina e/ou α-defensina humana para uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a β-defensina e/ou a α-defensina humana é selecionada dentre SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, e SEQ ID NO: 7 e variantes de sequência diferindo a partir de SEQ ID NO em menos do que 5, tal como menos que 4, por exemplo, menos que 3, tal como menos que 2 aminoácidos.

3. β-defensina e/ou α-defensina humana para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que dita β-defensina e/ou α-defensina humana é selecionada dentre um grupo consistindo em hBD2 (SEQ ID NO: 2), HD5 (SEQ ID NO: 5), HD6 (SEQ ID NO: 6), hBD1 (SEQ ID NO: 1), hBD2 truncado (SEQ ID NO: 7), hBD3 (SEQ ID NO: 3) e hBD4 (SEQ ID NO: 4).

4. β-defensina e/ou α-defensina humana para uso de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato de que dita β-defensina e/ou α-defensina humana é hBD2, hBD2 truncada, ou HD5.

5. β-defensina e/ou α-defensina humana para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que mais do que uma β-defensina e/ou α-defensina humana, tal como duas β-defensina e/ou α-defensinas humanas, tal como três β-defensina e/ou α-defensinas humanas, tal como quatro β-defensina e/ou α-defensinas humanas,

tal como cinco β-defensina e/ou α-defensinas humanas são administradas.

6. β-defensina e/ou α-defensina humana para uso de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que ditas duas β-defensina e/ou α-defensinas humanas são hBD2 e HD5.

7. β-defensina e/ou α-defensina humana para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que administração de dita β-defensina e/ou α-defensina humana ao paciente é iniciada no dia de transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênicas.

8. β-defensina e/ou α-defensina humana para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizada pelo fato de que administração de dita β-defensina e/ou α-defensina humana ao paciente é iniciada quando sintomas de GVHD aparecem após o transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênicas.

9. β-defensina e/ou α-defensina humana para uso de acordo com a reivindicação 7 ou 8, caracterizada pelo fato de que administração de β-defensina e/ou α-defensina humana é continuada até o paciente estar livre de sintomas causados pelo transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênicas, tal como durante pelo menos uma semana, por exemplo, pelo menos duas semanas, tal como pelo menos 3 semanas, por exemplo, pelo menos 4 semanas, tal como pelo menos 2 meses, por exemplo, pelo menos 3 meses, pelo menos 4 meses, pelo menos 6 meses.

10. β-defensina e/ou α-defensina humana para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que dita β-defensina e/ou α-defensina humana compreende adicionalmente pelo menos uma porção adicional selecionada dentre um grupo consistindo em um peptídeo de penetração celular (CPP), uma porção de ligação à albumina (ABM), uma porção detectável (Z), e um peptídeo de extensão de meia-vida.

11. β-defensina e/ou α-defensina humana para uso de acordo

com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que a porção adicional é um peptídeo de extensão de meia-vida.

12. β-defensina e/ou α-defensina humana para uso de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelo fato de que o peptídeo de extensão de meia-vida é selecionado dentre um grupo consistindo em uma molécula capaz de ligação a um receptor de Fc neonatal (FcRn), transferrina, albumina (HAS), XTEN® ou PEG, um polímero de homo-aminoácido (HAP), um polímero prolina-alanina-serina (PAS), ou um peptídeo semelhante a elastina (ELP), ácido hialurônico, um peptídeo altamente sialilado negativamente carregado, tal como o peptídeo carbóxi-terminal (CTP) de cadeia β de gonadotropina coriônica (CG), IgG humana, e CH3(CH2)nCO- em que n é 8 a 22.

13. β-defensina e/ou α-defensina humana para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a β-defensina e/ou a α-defensina humana é administrada em combinação com prebióticos, probióticos, triptofano, ácidos graxos de cadeia curta, glucocorticoides, ciclosporina, anti TNF-α, integrinas, antibióticos, imunossupressores, transplante fecal, irradiação ou uma combinação dos mesmos.

14. β-defensina e/ou α-defensina humana para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a dosagem diária é entre 0,1 e 10 mg defensina/kg, tal como entre 0,5 e 5 mg defensina/kg, tal como entre 1 e 2 mg defensina/kg, tal como 1,2 mg defensina/kg por dia.

15. β-defensina e/ou α-defensina humana para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que dita β-defensina e/ou α-defensina humana é administrada pelo menos uma vez por dia, tal como pelo menos duas vezes por dia, tal como pelo menos três vezes por dia, tal como pelo menos quatro vezes por dia, tal como cinco vezes

por dia ou continuamente

16. β-defensina e/ou α-defensina humana para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que dita administração é oral, intrapulmonar ou dérmica.

17. β-defensina e/ou α-defensina humana para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que dita administração intrapulmonar, intratraqueal ou intranasal é por um inalador, nebulizador ou vaporizador.

18. β-defensina e/ou α-defensina humana para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a administração é oral.

19. β-defensina e/ou α-defensina humana para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que o paciente tem um ou mais sintomas selecionados dentre: severa inflamação intestinal e do fígado (por exemplo, distinguida por dor abdominal, náusea, vômito e icterícia) e perda da defesa mucosal, tempestade de citocinas, perda de peso, sepse, erupção cutânea, comichão e vermelhidão.

20. β-defensina e/ou α-defensina humana para uso de acordo com a reivindicação 19, caracterizada pelo fato de que um ou mais de ditos sintomas são melhorados após tratamento.

21. β-defensina e/ou α-defensina humana para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que o tratamento diminui mortalidade e aumenta a sobrevivência a longo prazo.

22. β-defensina e/ou α-defensina humana para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que o tratamento reequilibra o sistema imune e previne ou trata a tempestade de citocinas através da normalização da produção de citocinas no tecido.

23. β-defensina e/ou α-defensina humana para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a permeabilidade intestinal e sepse são tratadas através da normalização da defesa mucosal ou atividade de mieloperoxidase nos intestinos.

24. β-defensina e/ou α-defensina humana para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que complicações respiratórias, capacidade pulmonar, inflamação pulmonar e sepse são tratadas.

25. β-defensina e/ou α-defensina humana para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que inflamação pulmonar histológica, inflamação peribronquial e perivascular, assim como migração de células inflamatórias em fluido de lavagem broncoalveolar são reduzidas.

26. β-defensina e/ou α-defensina humana para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que inflamação e fibrose dos pulmões e pele, tal como bronquiolite obliterante e escleroderma, são tratadas ou evitadas.

27. β-defensina e/ou α-defensina humana para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a riqueza de genes, o número de filos, a presença bacteriana, a abundância bacteriana e/ou a produção de ácido graxo de cadeia curta, e/ou produção de butiratos são aumentados e/ou em que a produção de acetato a partir da microbiota do intestino ou pulmão de dito paciente é diminuída.

28. β-defensina e/ou α-defensina humana para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que uma microbiota normal no intestino ou pulmão ou pele de dito paciente é amadurecida, mantida ou estabilizada.

29. β-defensina e/ou α-defensina humana para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de

que a abundância de *Allobaculum*, *Alloprevotella*, *Akkermansia*, *Barnesiella*, *Bifidobacteriaceae*, *Faecalibacterium*, *Lachnospira*, *Rothia* e *Veillonella* no intestino ou pulmão de dito paciente é aumentada.

30. β-defensina e/ou α-defensina humana para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a ingestão de alimentos e ganho de peso no dito paciente são aumentados.

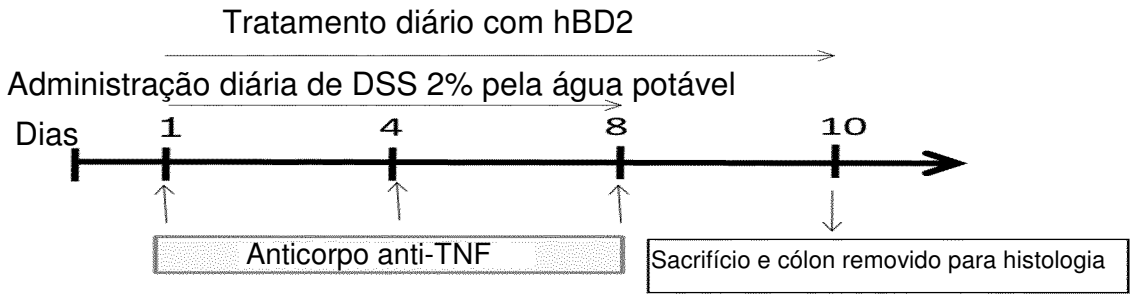

Tratamento diário com hBD2
Administração diária de DSS 2% pela água potável
Dias
1
4
8
10
Anticorpo anti-TNF
Sacrifício e cólon removido para histologia

Fig. 1

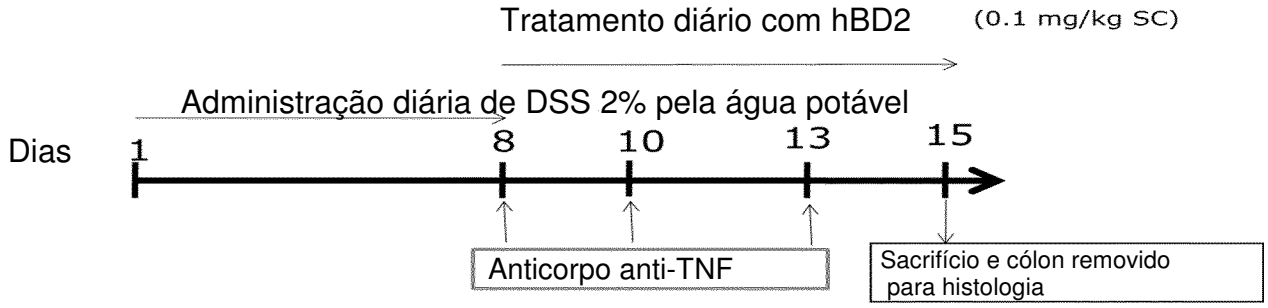
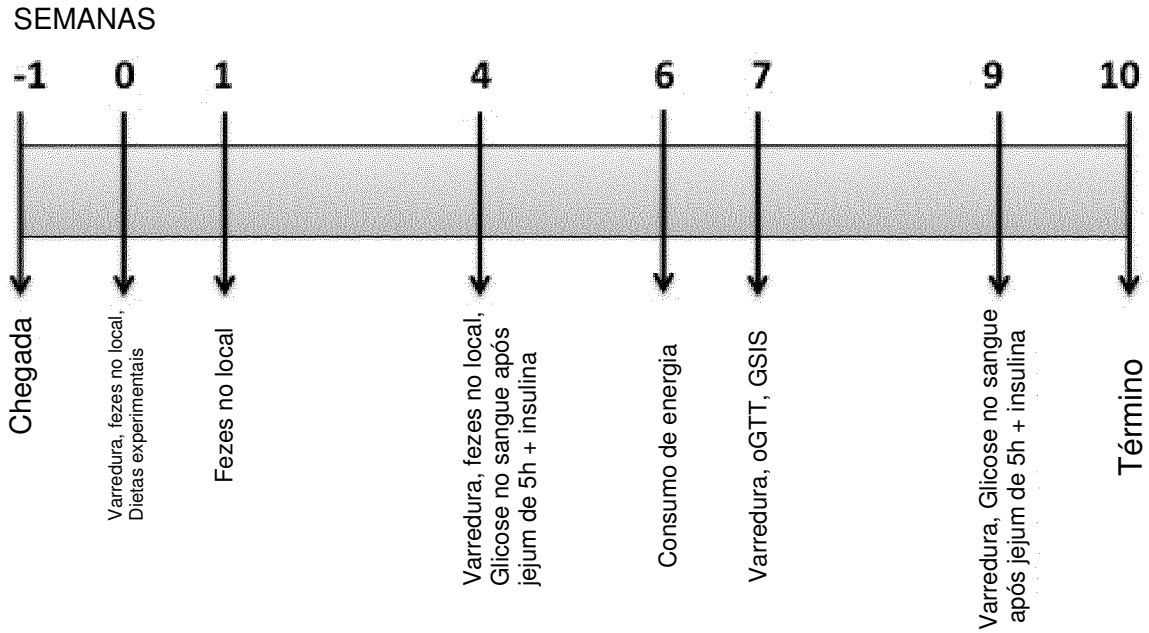

Tratamento diário com hBD2
(0.1 mg/kg SC)
Administração diária de DSS 2% pela água potável
Dias
1
8
10
13
15
Anticorpo anti-TNF
Sacrifício e cólon removido
para histologia

Fig. 2

Estudo profilático



Estudo terapêutico

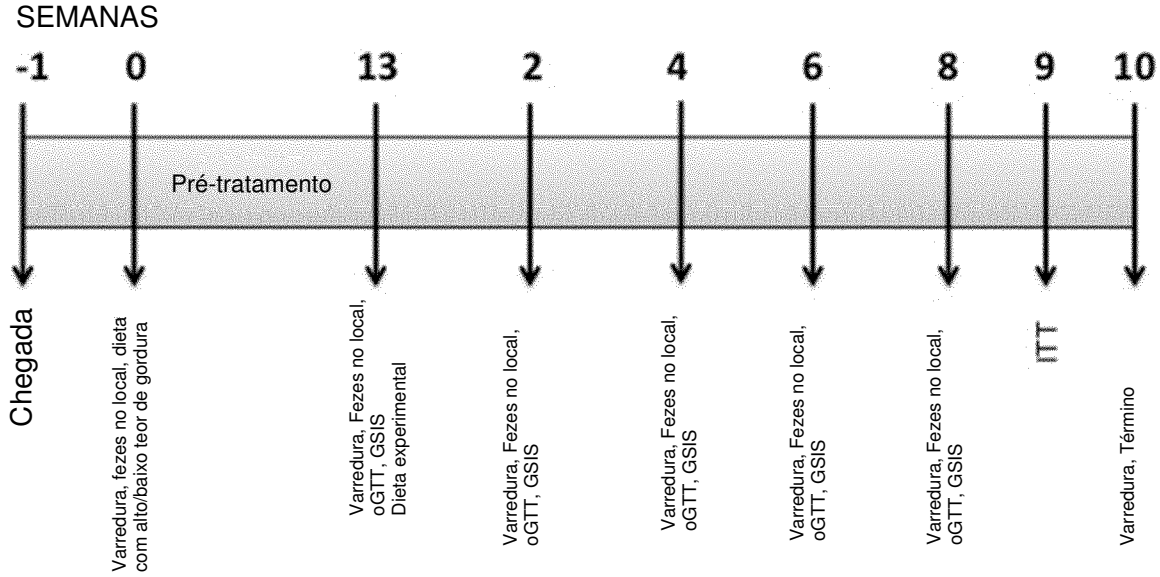


Fig. 3

Grupo #	N	Sensibilização *s.c.* (dia 0)	Desafio i.n/camundongo Dia 14	Tratamento Dias 11, 12 e 13	Medições e amostragem 48 h após desafio (dia 16)
1	12	100 µL de CFA dissolvido em solução salina	50 µL de solução salina	-	• AHR (resistência e adesão; Buxco) N=6/grupo • BAFL (contagens de células totais e diferenciais) N=12/grupo • Pulmões (congelados para concentração de citocinas) N=12/grupo
2	12	100 µg HDM/0.2 mL de solução salina + CFA/ camundongo	25µg HDM/50µL de solução salina	Veículo *i.n.*	
3	12			Veículo *p.o.*	
4	12			hbD2 *i.n.* 1.2 mg/kg/dia (0.4 mg/kg TID)	
5	12			hbD2 *p.o.* 1.2 mg/kg/dia (0.4 mg/kg TID)	

Fig. 4

Grupo #	N	Sensibilização *s.c.* (dia 0)	Desafio i.n/camundongo Dia 14	Tratamento Dia 14 Regime de dosagem e via a ser combinada	Medições e amostragem 48 h após desafio (dia 16)
1	14	100 µL de CFA em solução salina	50 µL de solução salina	-	• Sangue para plasma (N =14) • Pulmões para histopatologia (N=8) • Pulmões congelados para determinação de citocinas (N=6)
2	14	100 µg HDM/0.2 mL de solução salina + CFA/ camundongo	25µg HDM/50µL de solução salina	Veículo	
3	14			hbD2 *p.o.* 1.2 mg/kg/dia (0.4 mg/kg TID)	
4	14			hbD2 *i.n.* 1.2 mg/kg/dia (0.4 mg/kg TID)	

Fig. 5

```
HBD1            ------DHYNCVSSGGQCLYSACPIFTKIQGTCYRGKAKCCK---
HBD2            ---GIGDPVTCLKSGAICHPVFCPRRYKQIGTCGLPGTKCCKKP-
HBD3            GIINTLQKYYCRVRGGRCAVLSCLPKEEQIGKCSTRGRKCCRRKK
HBD4            -----ELDRICGYGTARCR-KKCRSQEYRIGRCPN-TYACCLRK-
                          *    . *    *       * *      **
```

Fig. 6a

```
HD5             -ATCYCRTGRCATRESLSGVCEISGRLYRLCCR
HD6             AFTCHCRR-SCYSTEYSYGTCTVMGINHRFCCL
                  **:**   * : *   *.* : *  :*:**
```

Fig. 6b

```
HD6       -------AFTCH-----CR-RSCYSTEYSYGTCTVMGINHRFCCL---
HD5       --------ATCY-----CRTGRCATRESLSGVCEISGRLYRLCCR---
HBD1      ------DHYNCVSSGGQCLYSACPIFTKIQGTCYRGK---AKCCK---
HBD2      ---GIGDPVTCLKSGAICHPVFCPRRYKQIGTCGLPG---TKCCKKP-
HBD3      GIINTLQKYYCRVRGGRCAVLSCLPKEEQIGKCSTRG---RKCCRRKK
HBD4      -----ELDRICGYGTARCR-KKCRSQEYRIGRCPN-T---YACCLRK-
                    *      *    *       * *         **
```

Fig. 6c

Descrição	Pontuação
Mudança em peso corporal:	
<1%	0
1-5%	1
>5-10%	2
>10-15%	3
>15%	4
Sangramento retal:	
Negativo	0
Positivo	4
Consistência das fezes:	
Normal	0
Fezes soltas	2
Diarréia	4

Fig. 7

Descrição	Pontuação
Não foram observadas mudanças	0
Infiltrados de células inflamatórias mucosais, espalhadas, mínimas, com ou sem hiperplasia epitelial mínima.	1
Infiltrados de células inflamatórias espalhadas leves a difusas, às vezes se estendendo na submucosa e associadas a erosões, com hiperplasia epitelial mínima a leve e depleção de mucina mínima a leve de células goblet.	2
Infiltrados de células inflamatórias leves a moderados que eram às vezes transmurais, com frequência associados à ulceração, hiperplasia epitelial moderada e depleção de mucina.	3
Infiltrados de células inflamatórias marcados que eram com frequência transmurais e associados à ulceração, hiperplasia epitelial moderada e depleção de mucina.	4
Inflamação transmural marcada com severa ulceração e perda de glândulas intestinais.	5

Fig. 8

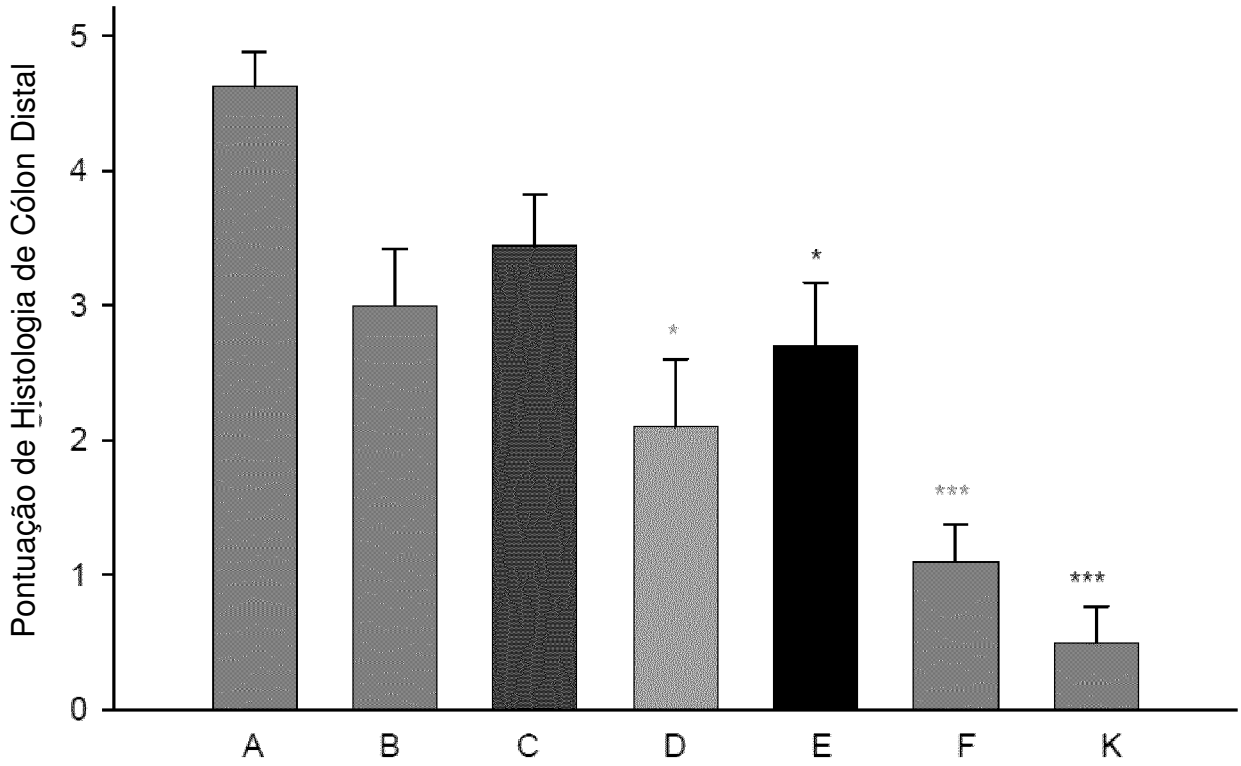

Pontuação de Histologia de Cólon Distal
0
1
2
3
4
5
A
B
C
D
E
F
K
*
*
***
***

Fig. 9

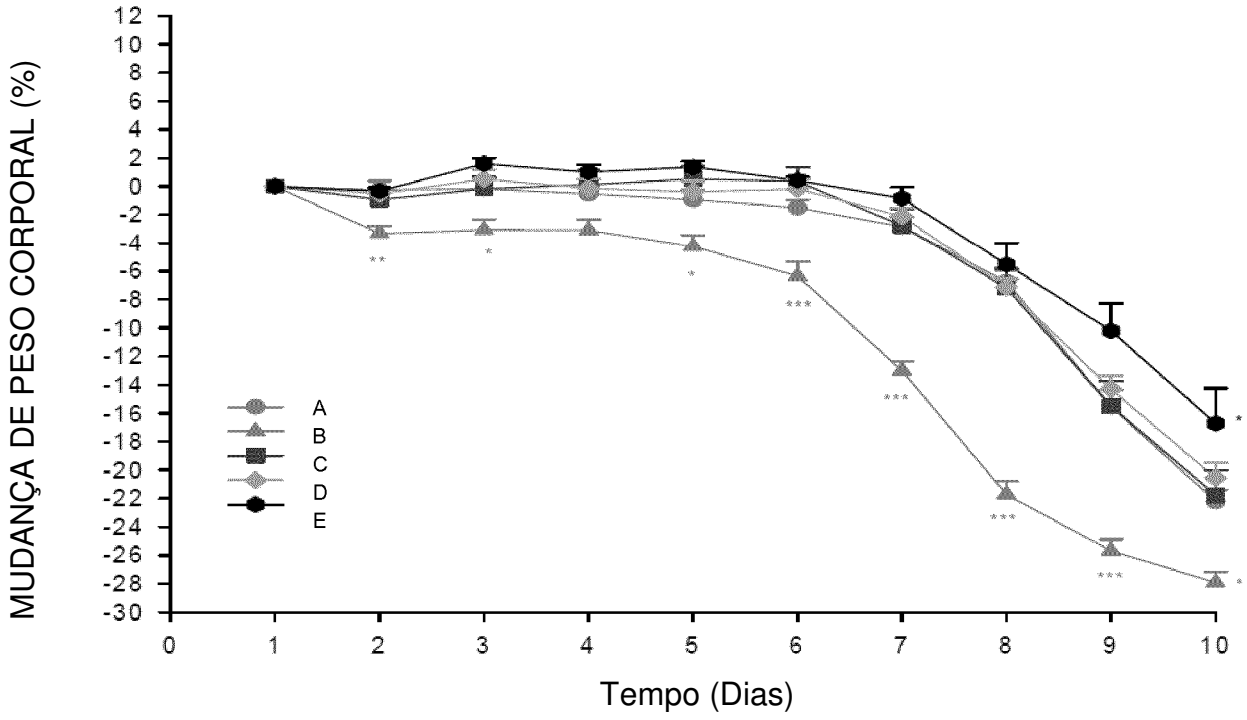

MUDANÇA DE PESO CORPORAL (%)
12
10
8
6
4
2
0
-2
-4
-6
-8
-10
-12
-14
-16
-18
-20
-22
-24
-26
-28
-30
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
Tempo (Dias)
A
B
C
D
E

Fig. 10

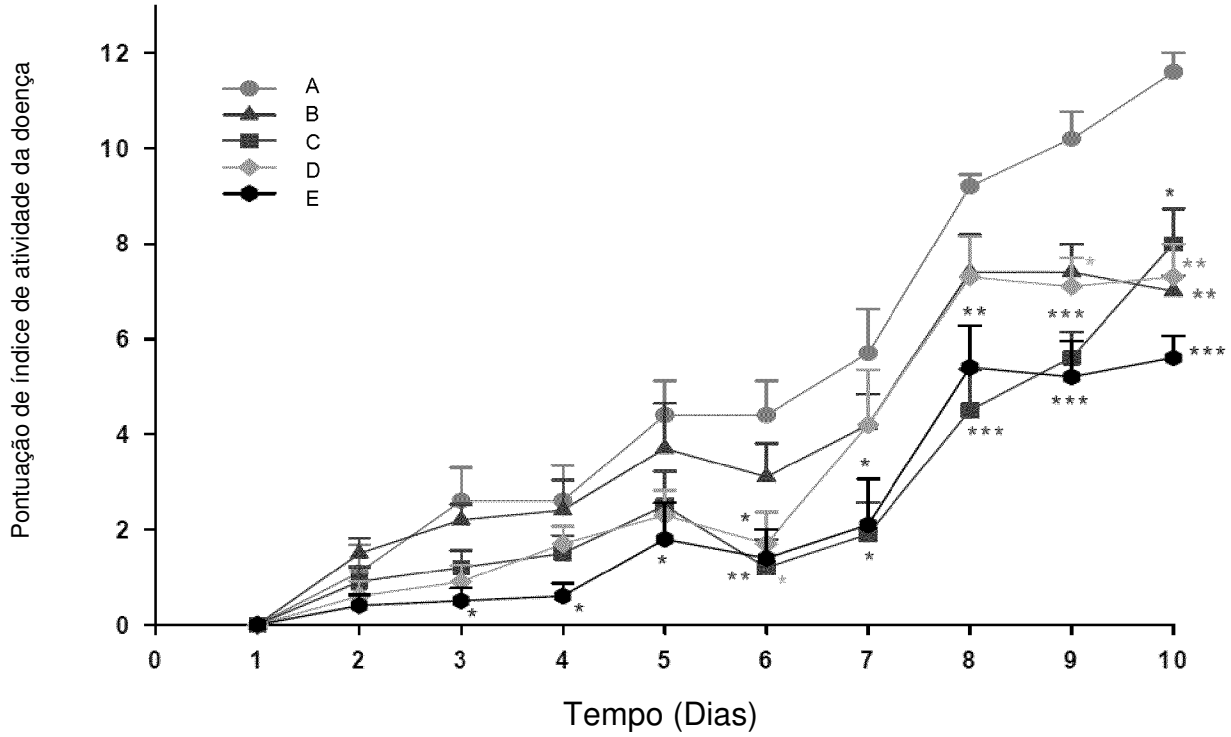

Pontuação de índice de atividade da doença
Tempo (Dias)
A
B
C
D
E
0
2
4
6
8
10
12
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10

Fig. 11

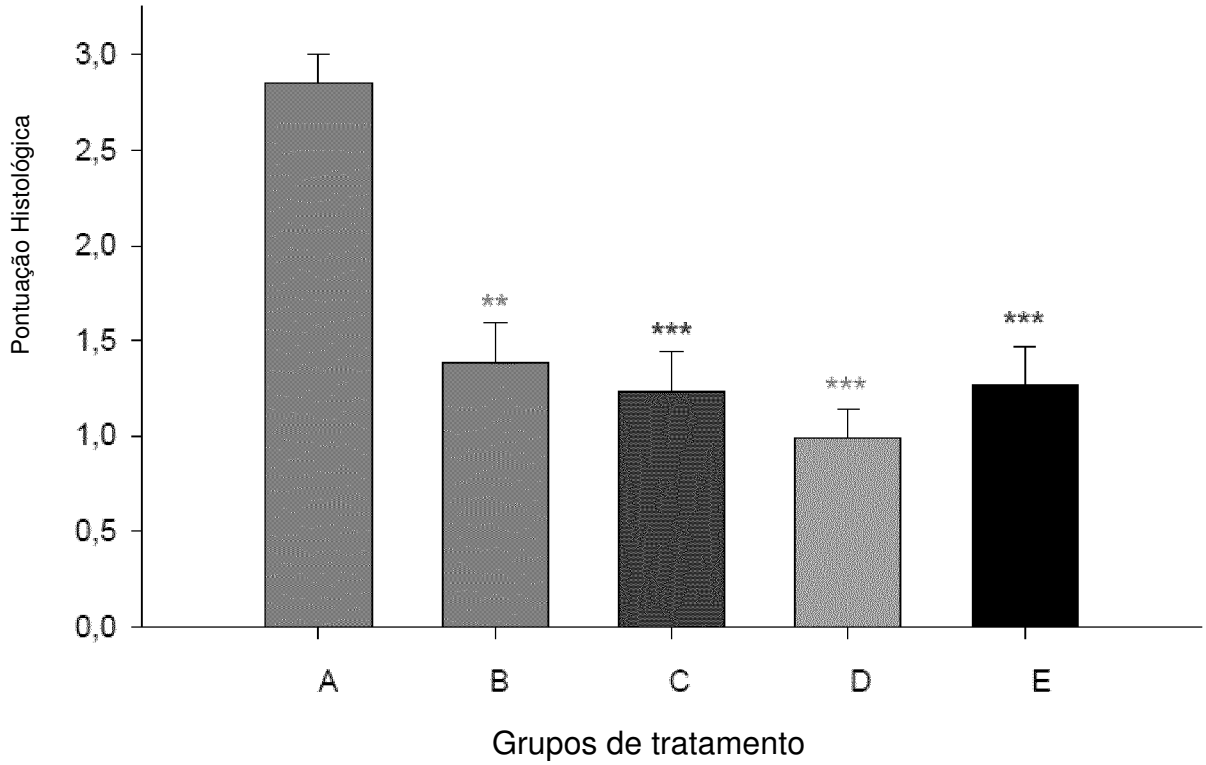

Pontuação Histológica
Grupos de tratamento
A
B
C
D
E
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5
3,0

Fig. 12

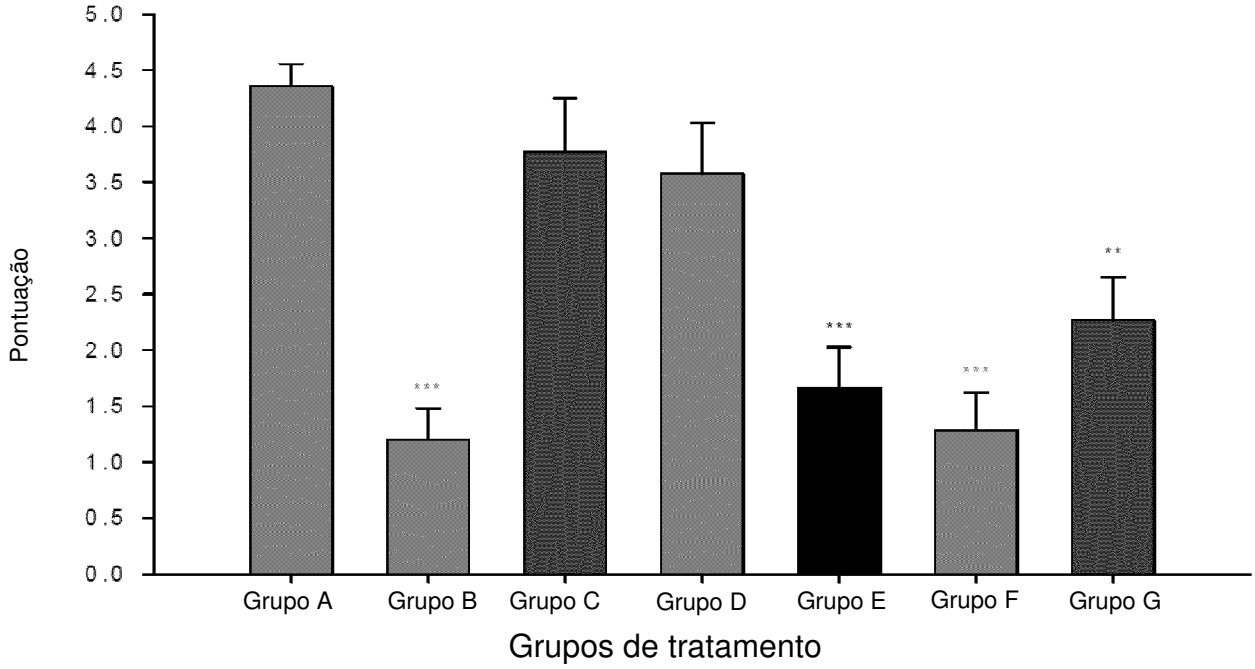

5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Pontuação
***
***
***
**
Grupo A
Grupo B
Grupo C
Grupo D
Grupo E
Grupo F
Grupo G
Grupos de tratamento

Fig. 13

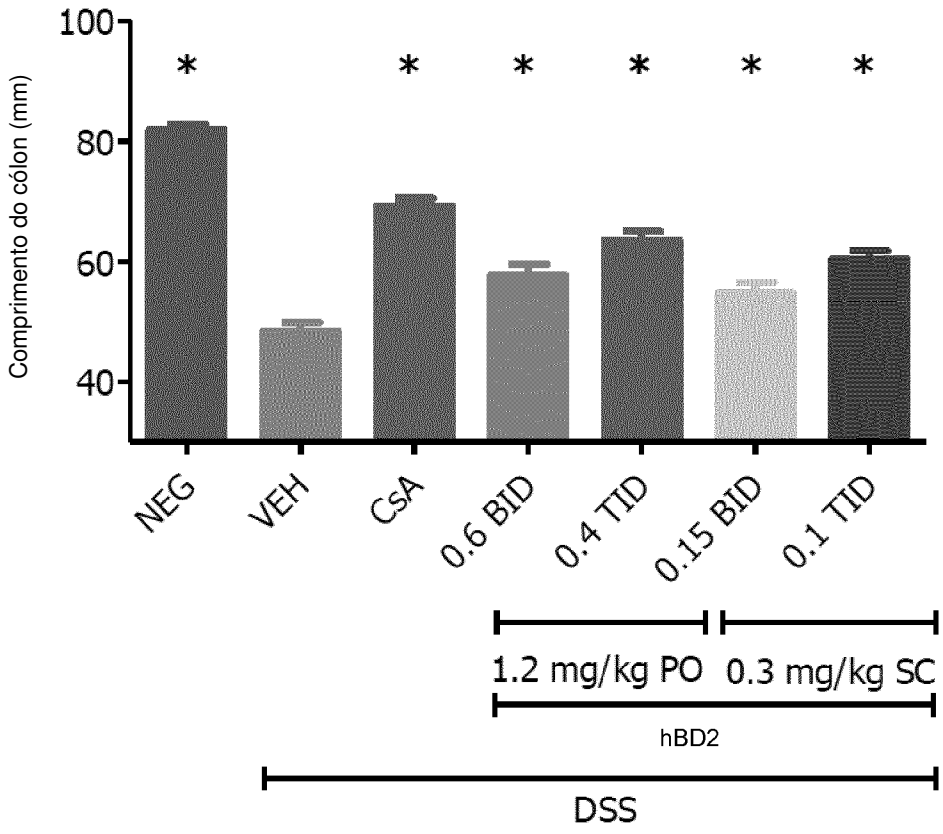

100
80
60
40
Comprimento do cólon (mm)
*
*
*
*
*
*
NEG
VEH
CsA
0.6 BID
0.4 TID
0.15 BID
0.1 TID
1.2 mg/kg PO
0.3 mg/kg SC
hBD2
DSS

Fig. 14

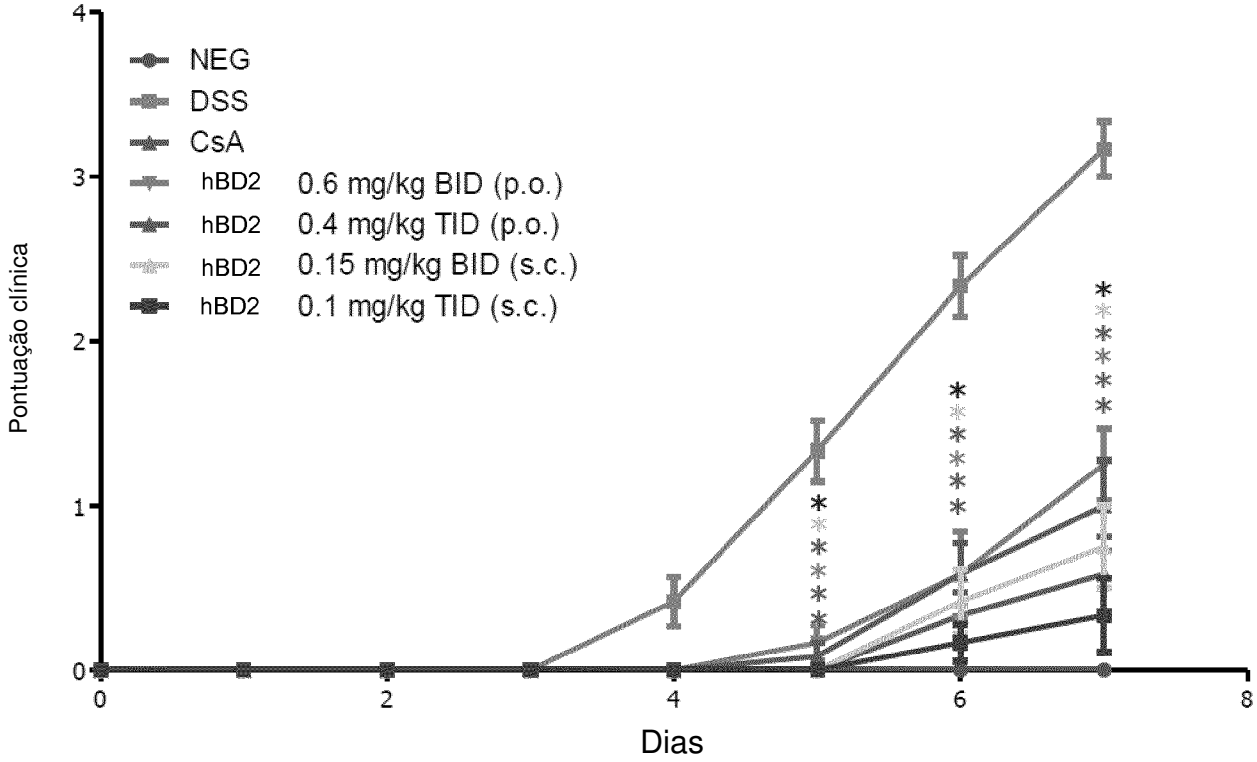

NEG
DSS
CsA
hBD2 0.6 mg/kg BID (p.o.)
hBD2 0.4 mg/kg TID (p.o.)
hBD2 0.15 mg/kg BID (s.c.)
hBD2 0.1 mg/kg TID (s.c.)
Pontuação clínica
Dias
0
1
2
3
4
0
2
4
6
8

Fig. 15

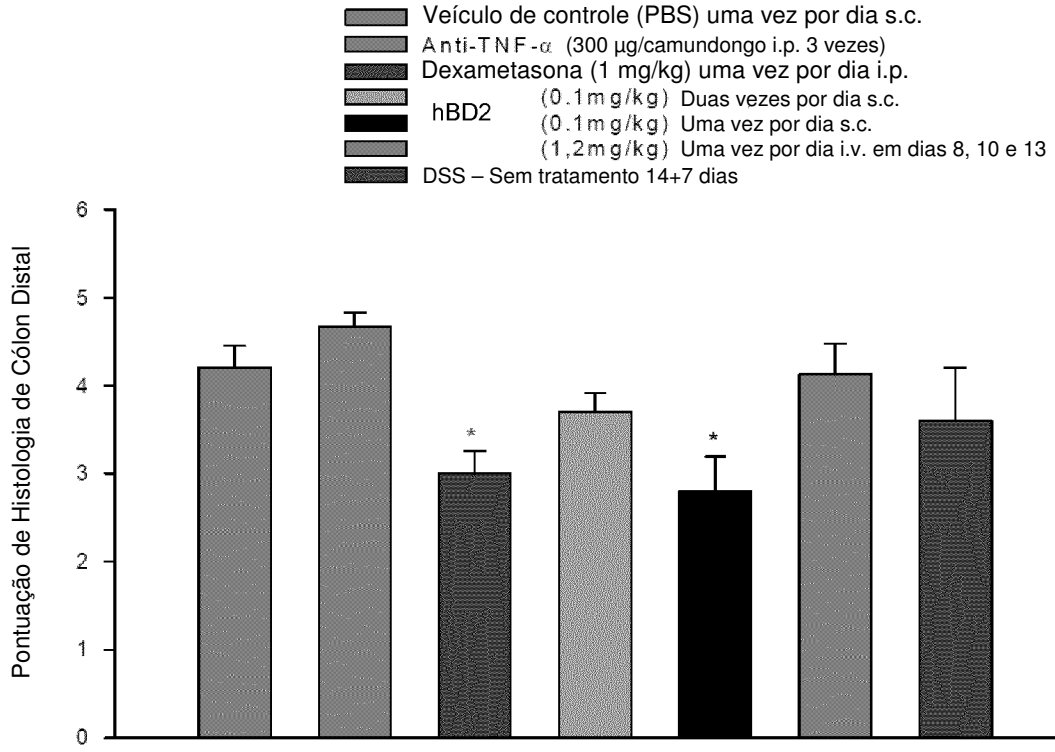

Veículo de controle (PBS) uma vez por dia s.c.
Anti-TNF-α (300 µg/camundongo i.p. 3 vezes)
Dexametasona (1 mg/kg) uma vez por dia i.p.
hBD2 (0.1mg/kg) Duas vezes por dia s.c.
(0.1mg/kg) Uma vez por dia s.c.
(1,2mg/kg) Uma vez por dia i.v. em dias 8, 10 e 13
DSS – Sem tratamento 14+7 dias
Pontuação de Histologia de Cólon Distal
0
1
2
3
4
5
6

Fig. 16

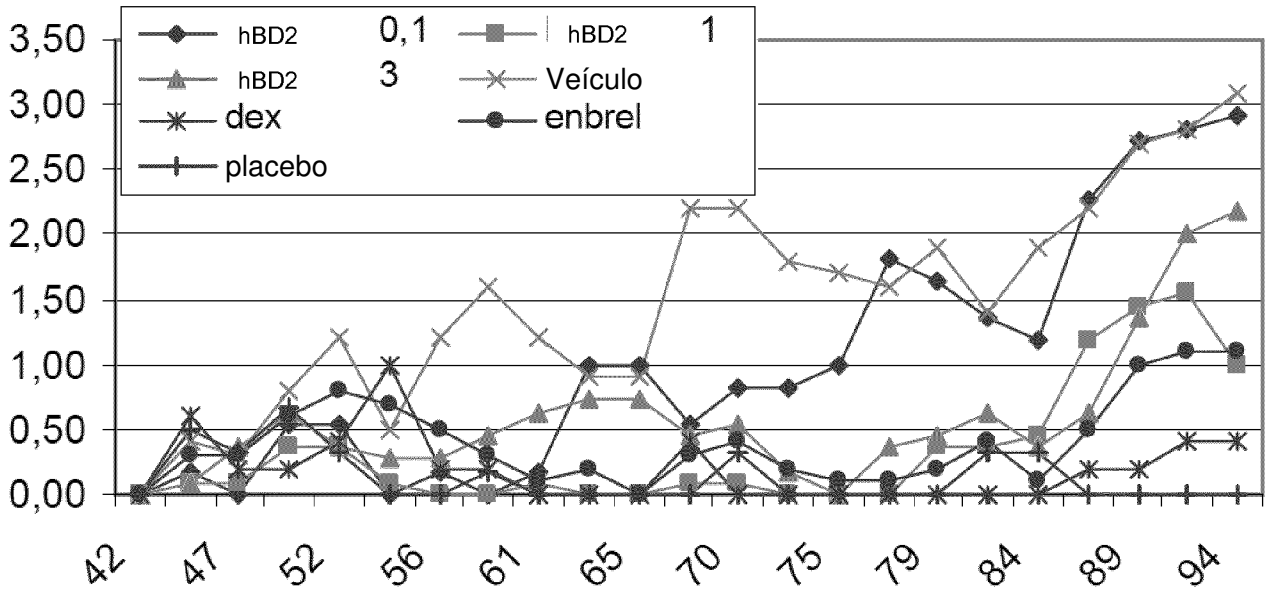

hBD2 0,1
hBD2 1
hBD2 3
Veículo
dex
enbrel
placebo
3,50
3,00
2,50
2,00
1,50
1,00
0,50
0,00
42
47
52
56
61
65
70
75
79
84
89
94

Fig. 17

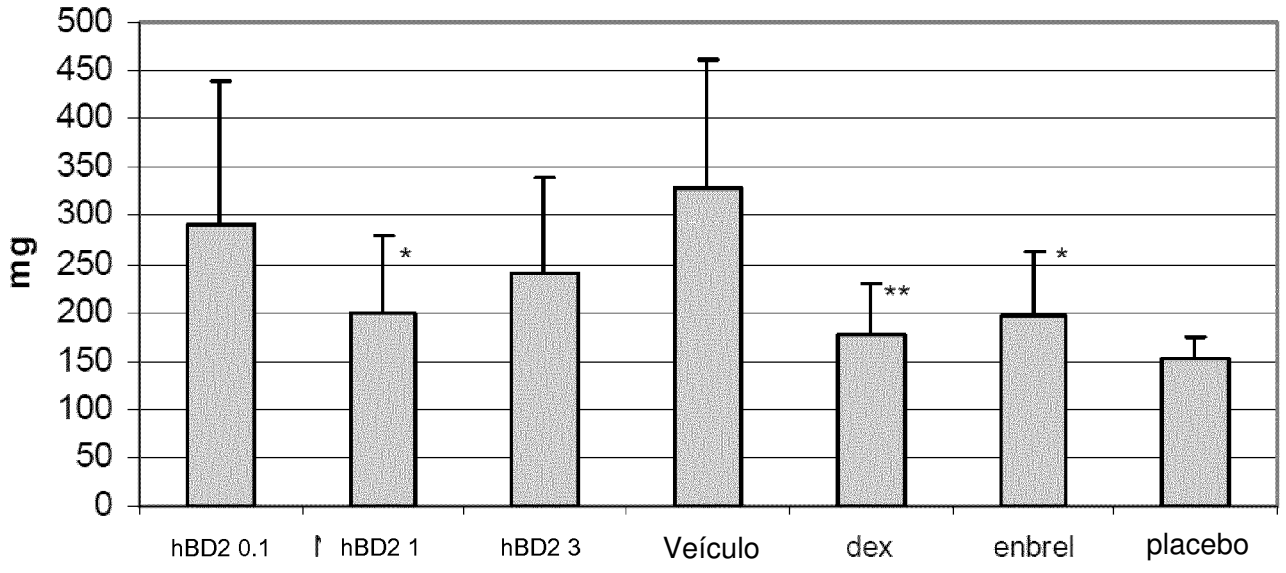

mg
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
*
**
*
hBD2 0.1
hBD2 1
hBD2 3
Veículo
dex
enbrel
placebo

Fig. 18

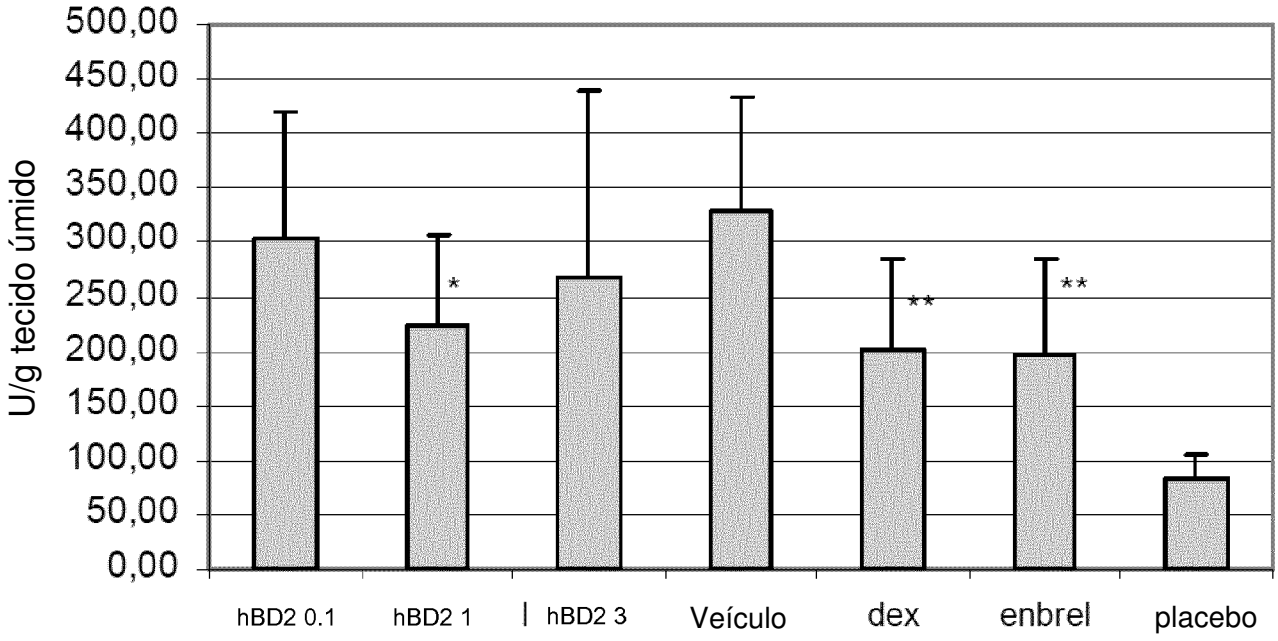

500,00
450,00
400,00
350,00
300,00
250,00
200,00
150,00
100,00
50,00
0,00
U/g tecido úmido
*
**
**
hBD2 0.1
hBD2 1
hBD2 3
Veículo
dex
enbrel
placebo

Fig. 19

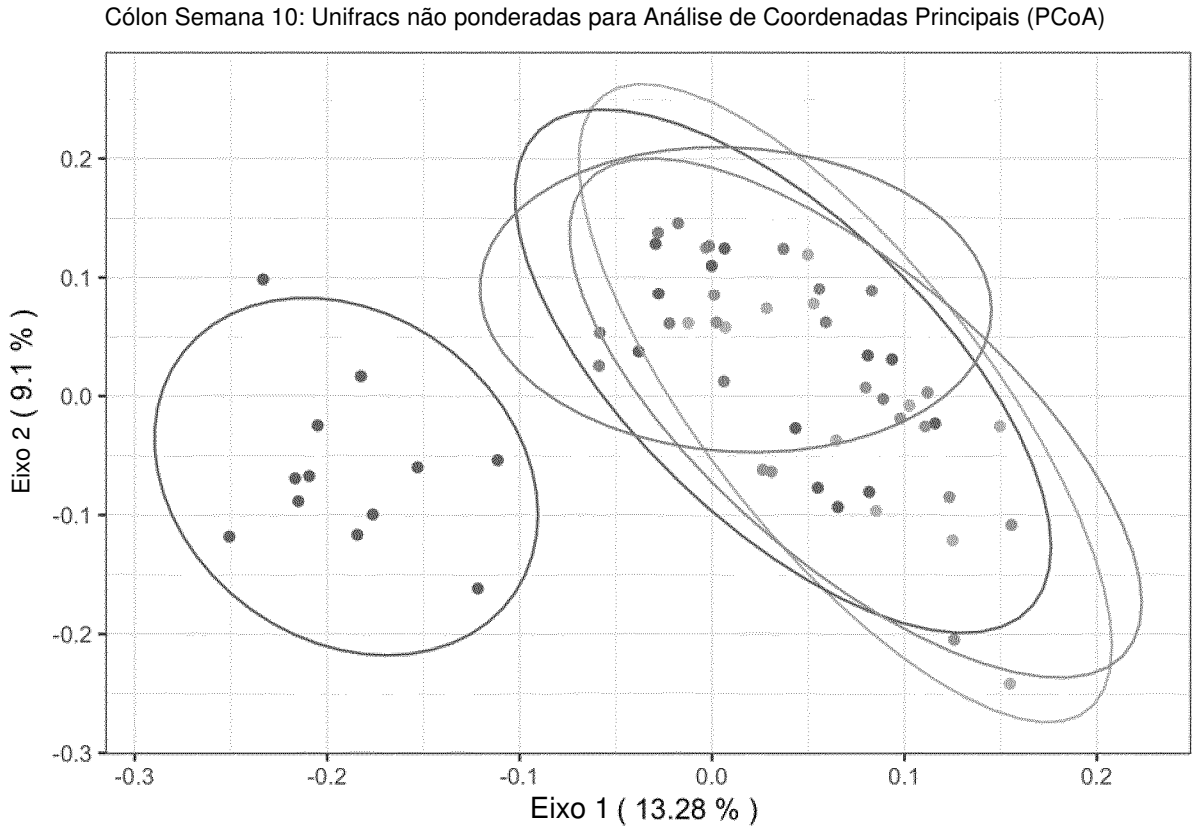

Cólon Semana 10: Unifracs não ponderadas para Análise de Coordenadas Principais (PCoA)
0.2
0.1
0.0
-0.1
-0.2
-0.3
Eixo 2 (9.1 %)
-0.3
-0.2
-0.1
0.0
0.1
0.2
Eixo 1 (13.28 %)

Fig. 20

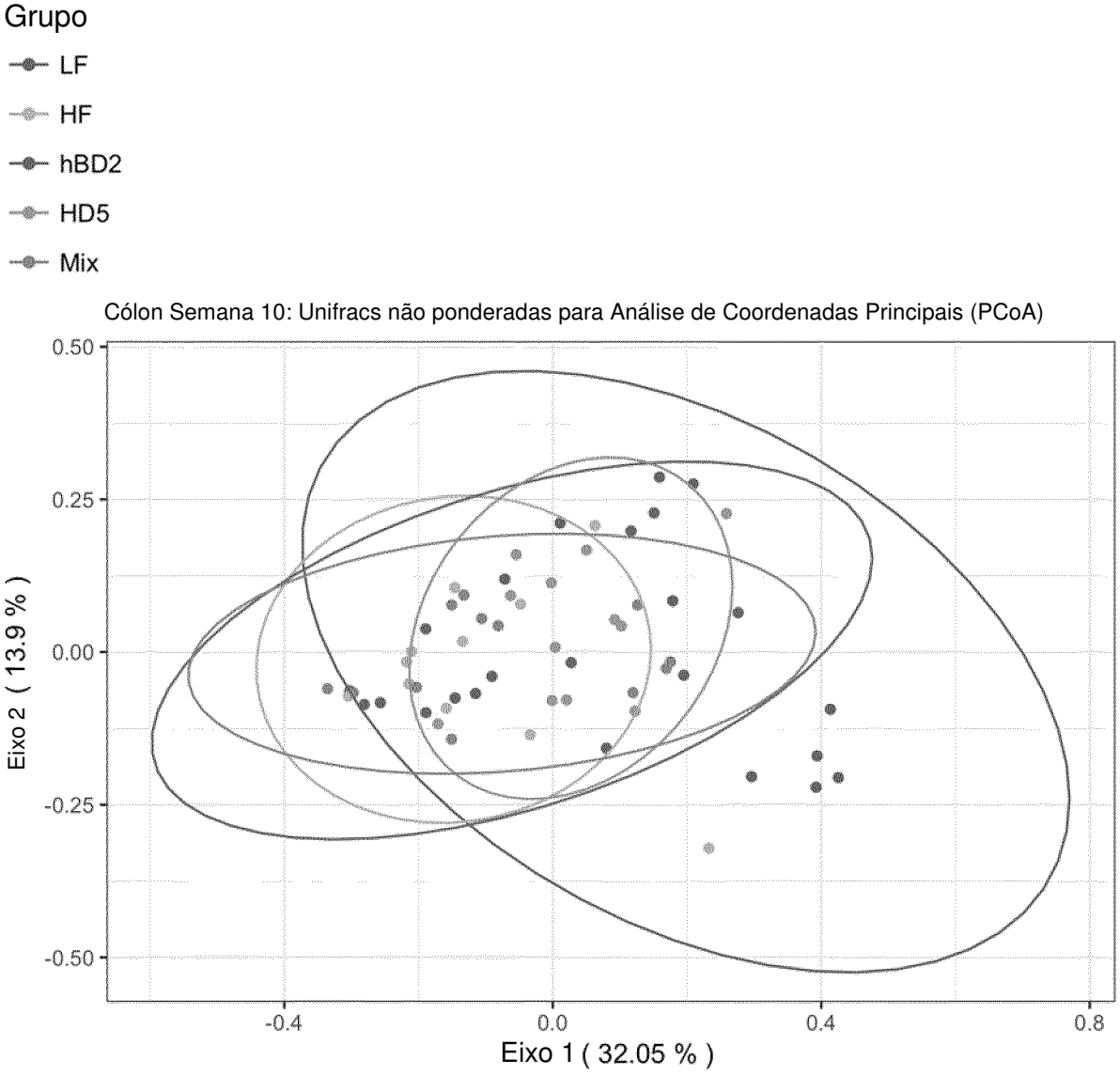


Figura 20 cont.

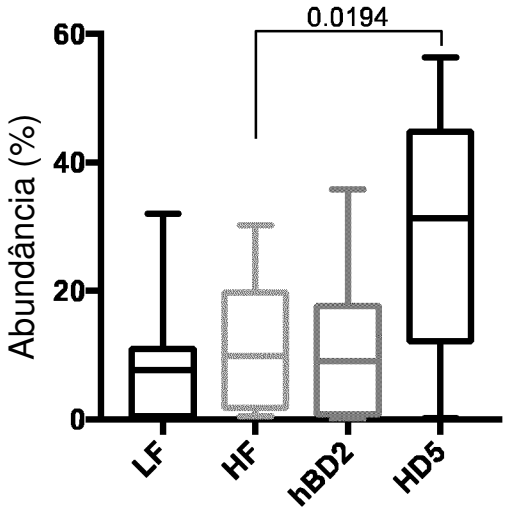

0.0194
60
40
20
0
Abundância (%)
LF
HF
hBD2
HD5

Fig. 21

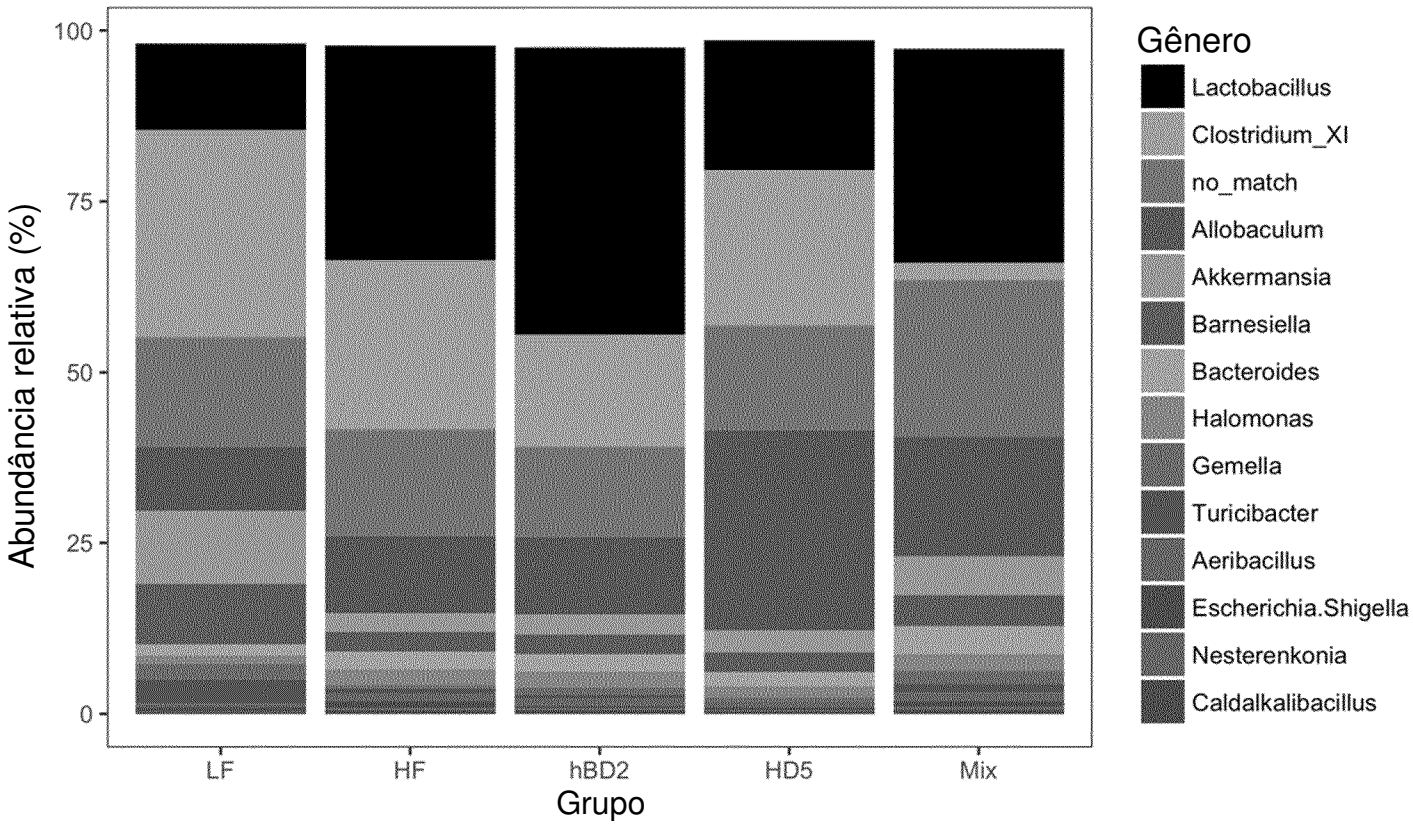

100
75
50
25
0
Abundância relativa (%)
LF
HF
hBD2
HD5
Mix
Grupo
Gênero
Lactobacillus
Clostridium_XI
no_match
Allobaculum
Akkermansia
Barnesiella
Bacteroides
Halomonas
Gemella
Turicibacter
Aeribacillus
Escherichia.Shigella
Nesterenkonia
Caldalkalibacillus

Fig. 22

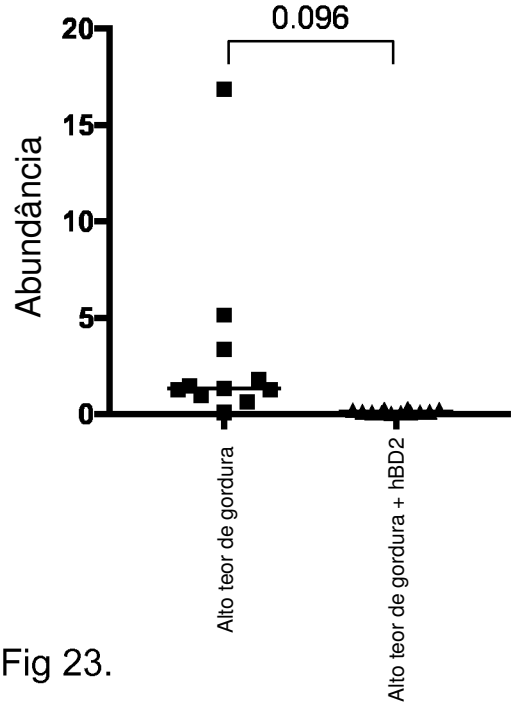

0.096
Abundância
20
15
10
5
0
Alto teor de gordura
Alto teor de gordura + hBD2

Fig 23.

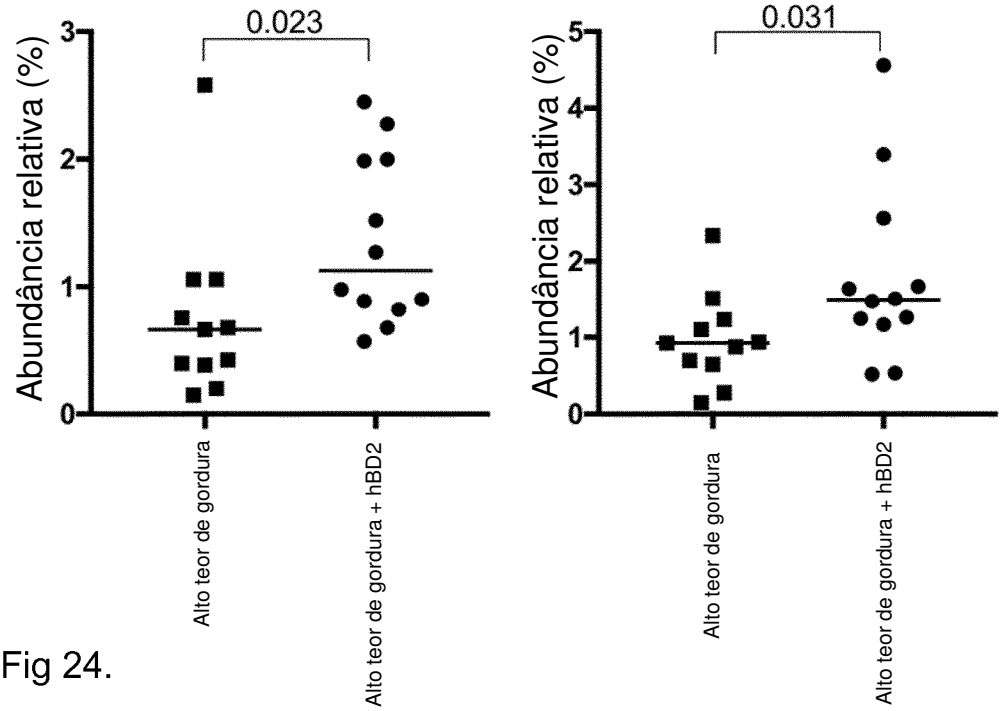

0.023
Abundância relativa (%)
3
2
1
0
Alto teor de gordura
Alto teor de gordura + hBD2
0.031
Abundância relativa (%)
5
4
3
2
1
0
Alto teor de gordura
Alto teor de gordura + hBD2

Fig 24.

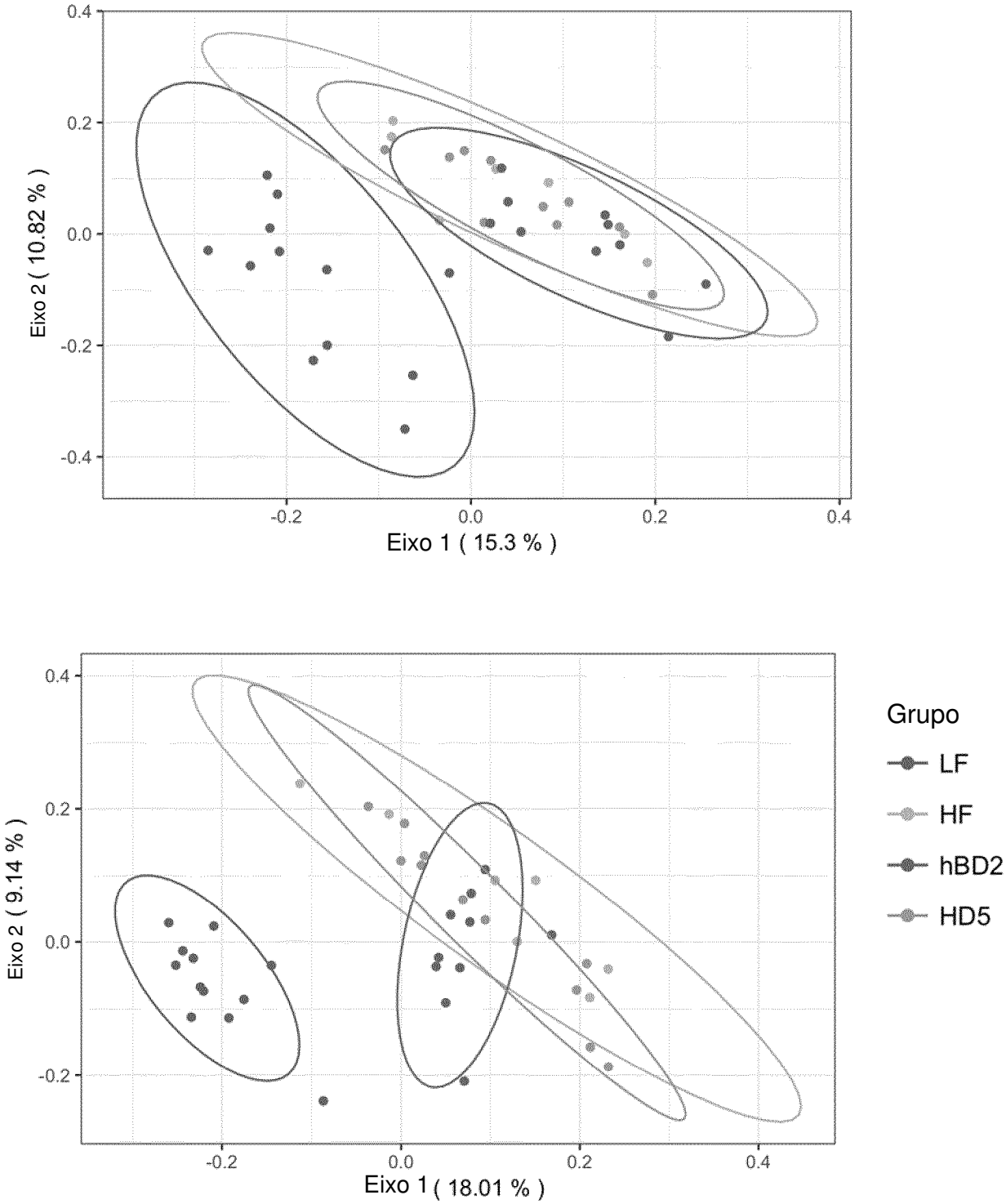

0.4
0.2
0.0
-0.2
-0.4
Eixo 2 (10.82 %)
-0.2
0.0
0.2
0.4
Eixo 1 (15.3 %)
0.4
0.2
0.0
-0.2
Eixo 2 (9.14 %)
-0.2
0.0
0.2
0.4
Eixo 1 (18.01 %)
Grupo
LF
HF
hBD2
HD5

Fig 25

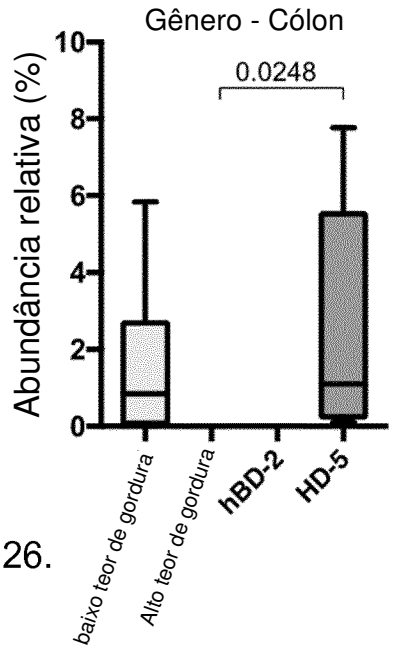

Gênero - Cólon
Abundância relativa (%)
10
8
6
4
2
0
0.0248
baixo teor de gordura
Alto teor de gordura
hBD-2
HD-5

Fig 26.

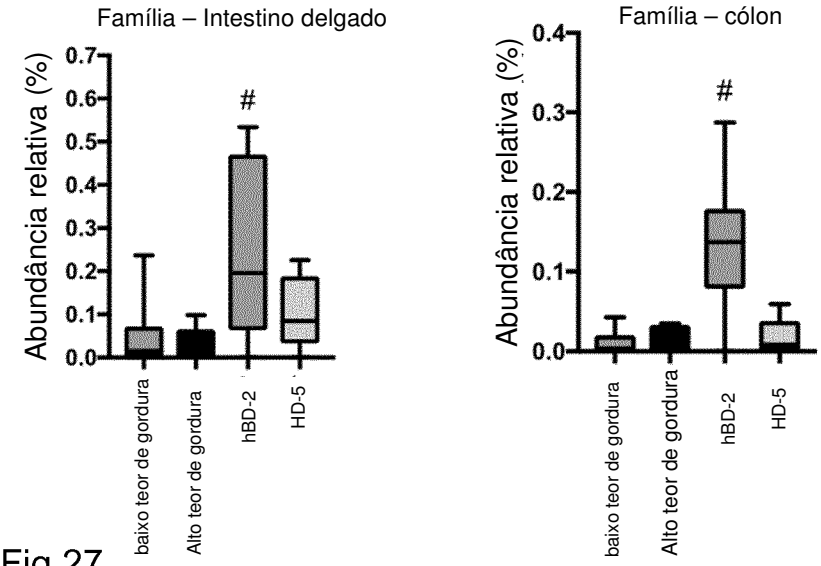

Família – Intestino delgado
Abundância relativa (%)
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
#
baixo teor de gordura
Alto teor de gordura
hBD-2
HD-5
Família – cólon
Abundância relativa (%)
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
#
baixo teor de gordura
Alto teor de gordura
hBD-2
HD-5

Fig 27.

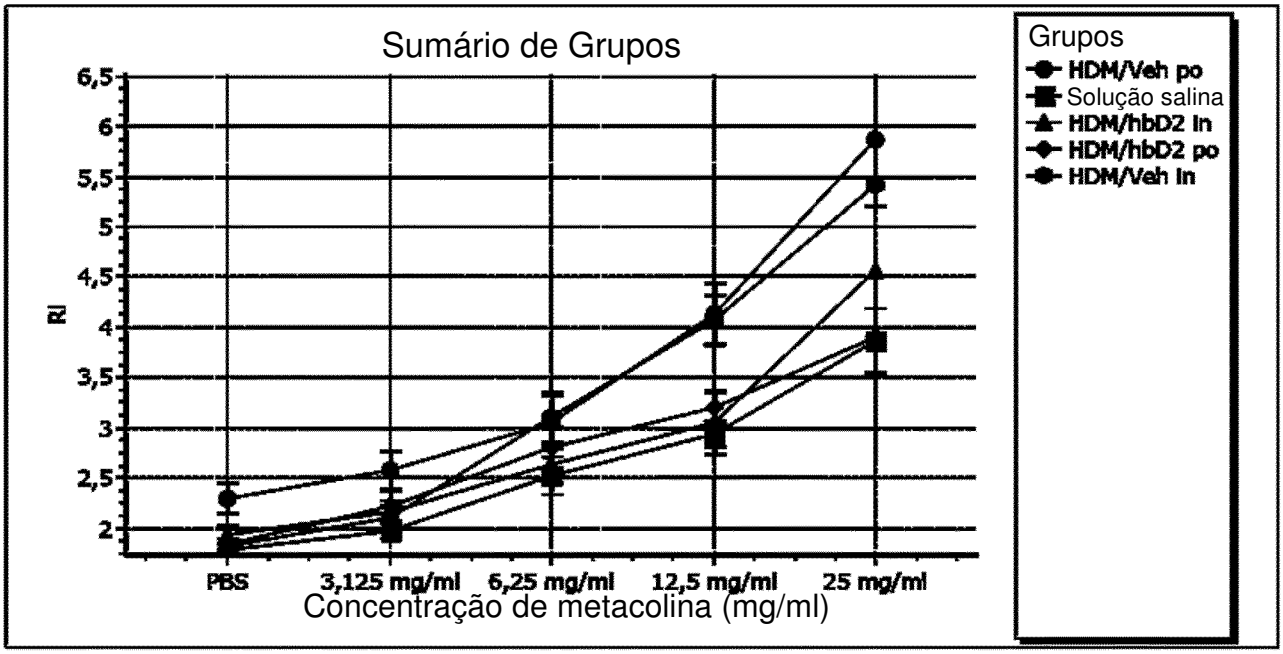

Sumário de Grupos
Grupos
HDM/Veh po
Solução salina
HDM/hbD2 in
HDM/hbD2 po
HDM/Veh in
RI
6,5
6
5,5
5
4,5
4
3,5
3
2,5
2
PBS
3,125 mg/ml
6,25 mg/ml
12,5 mg/ml
25 mg/ml
Concentração de metacolina (mg/ml)

Fig. 28

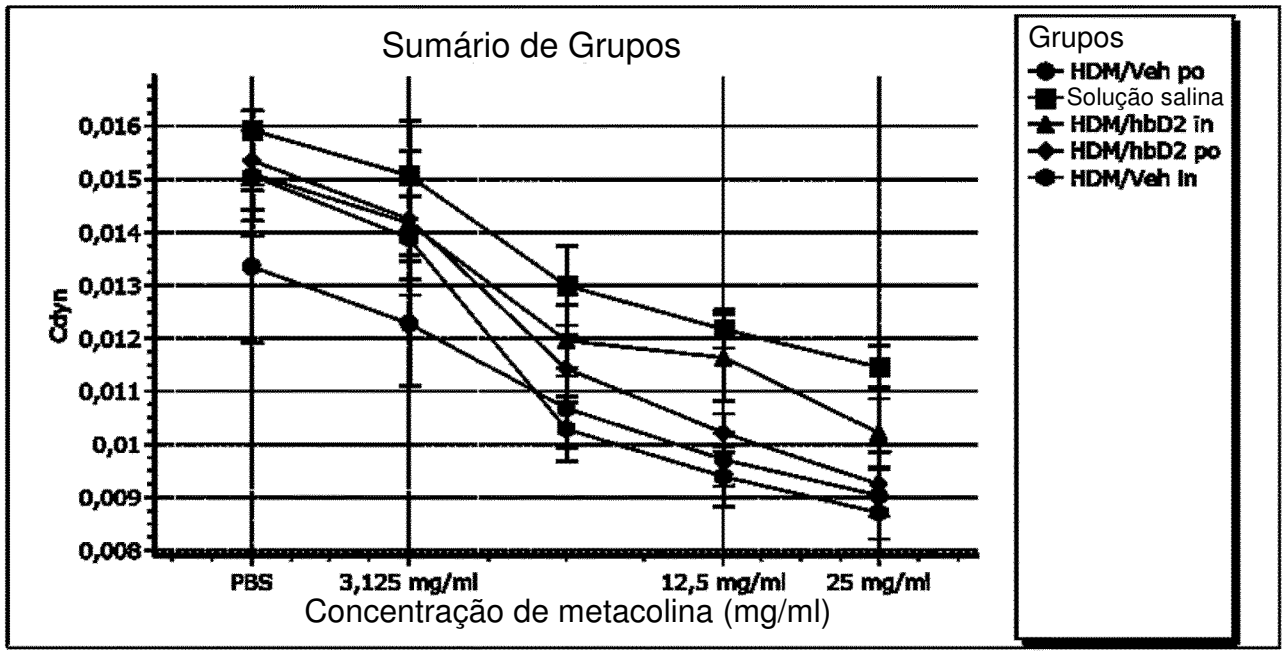

Sumário de Grupos
Grupos
HDM/Veh po
Solução salina
HDM/hbD2 in
HDM/hbD2 po
HDM/Veh in
Cdyn
0,016
0,015
0,014
0,013
0,012
0,011
0,01
0,009
0,008
PBS
3,125 mg/ml
12,5 mg/ml
25 mg/ml
Concentração de metacolina (mg/ml)

Fig. 29

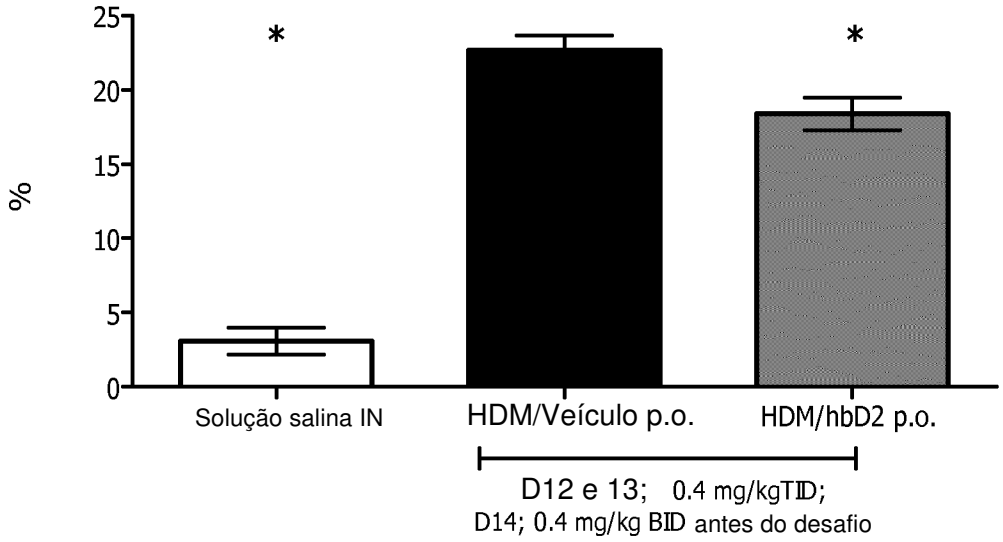


Fig. 30

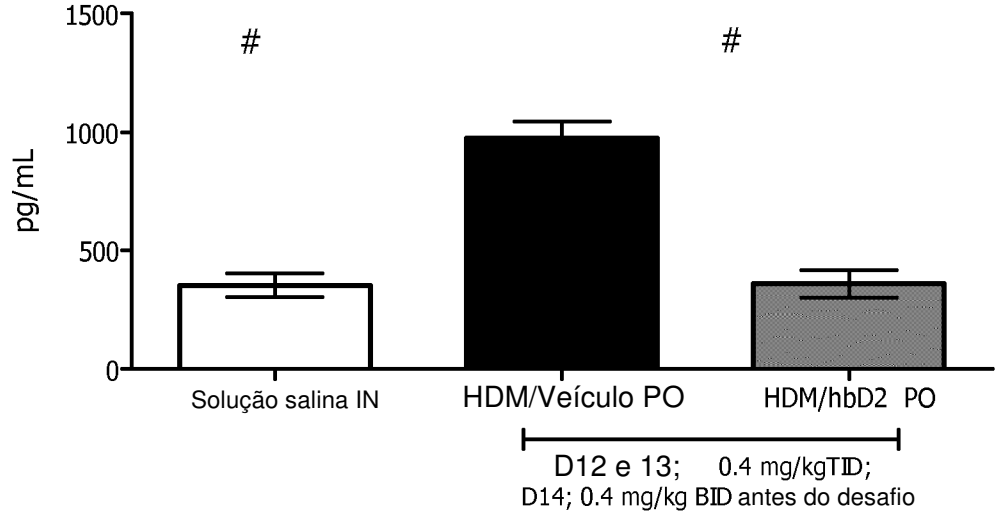


Fig. 31a

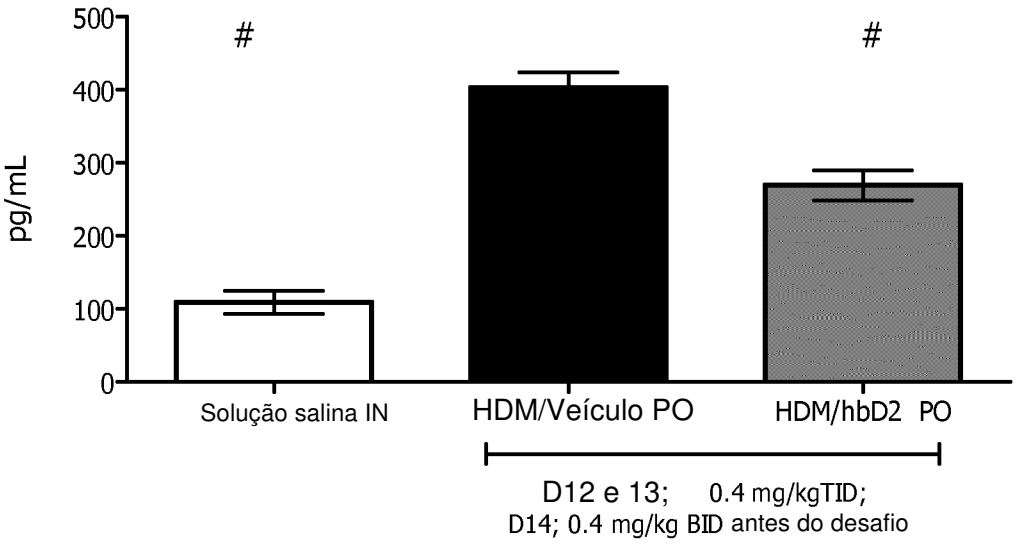


Fig. 31b

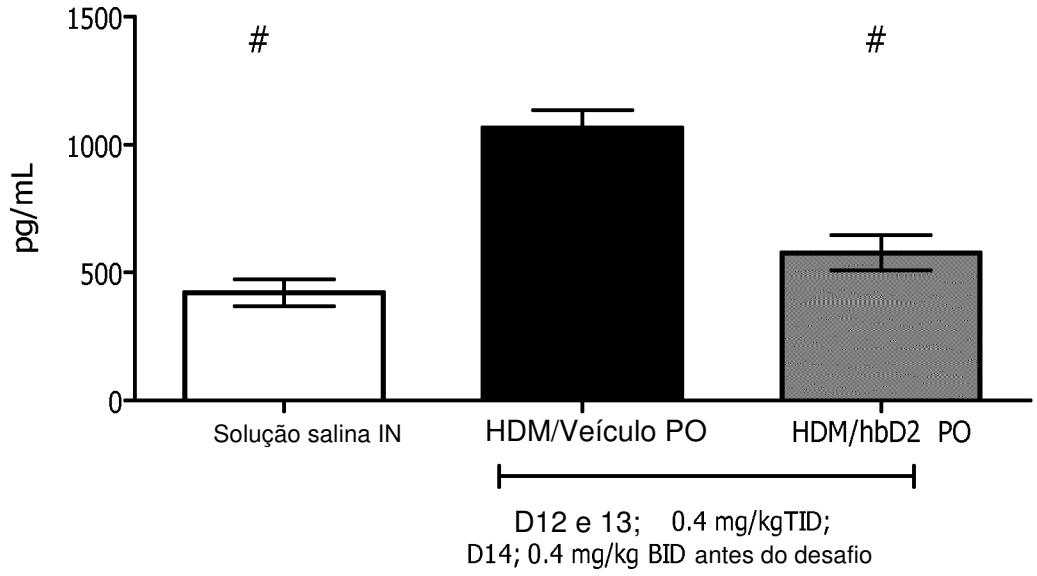


Fig. 31c

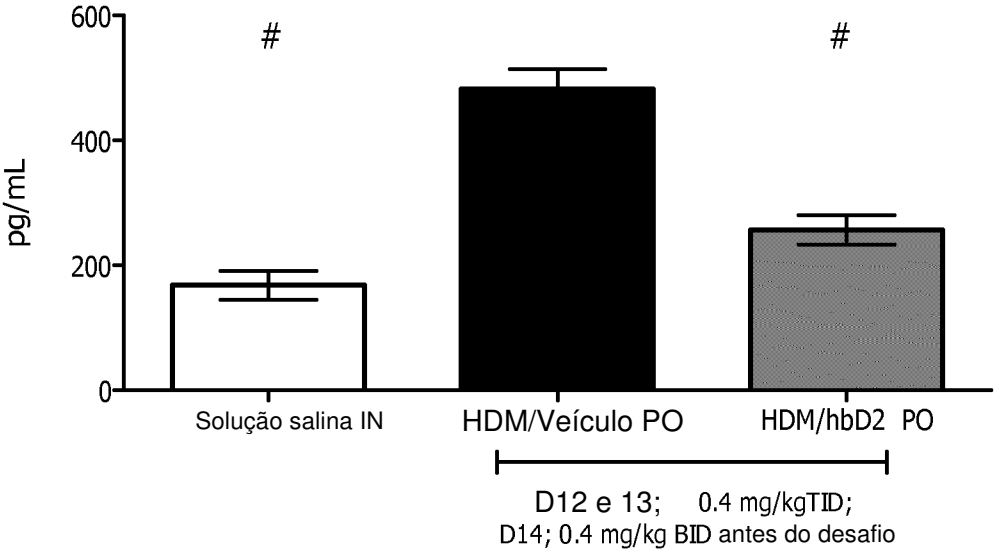


Fig. 31d

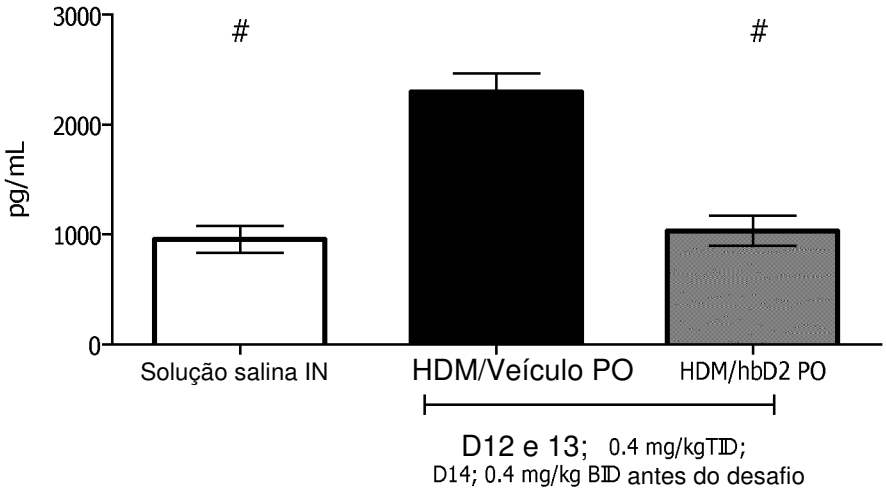


Fig. 31e

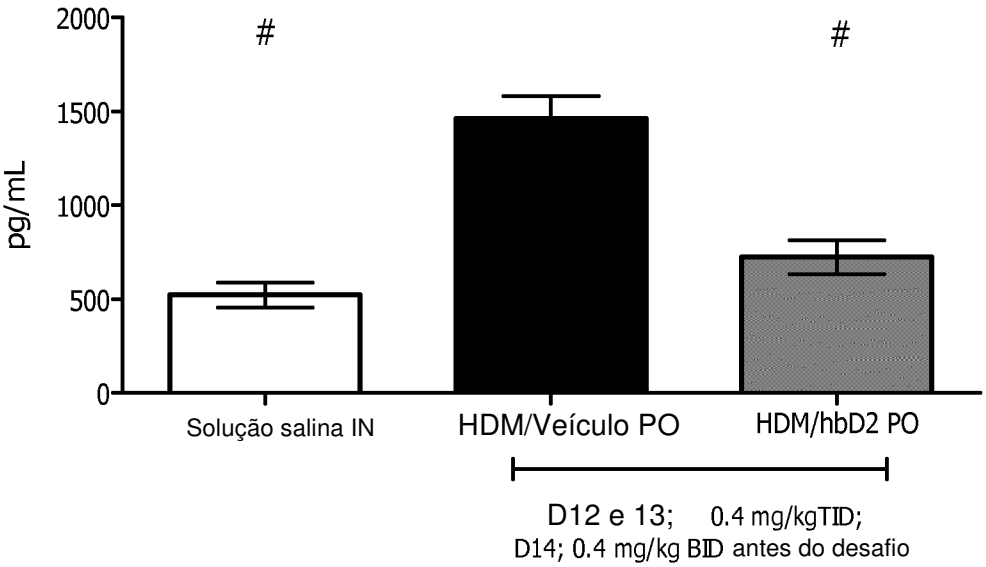

2000
1500
1000
500
0
pg/mL
#
#
Solução salina IN
HDM/Veículo PO
HDM/hbD2 PO
D12 e 13; 0.4 mg/kg TID;
D14; 0.4 mg/kg BID antes do desafio

Fig. 31f

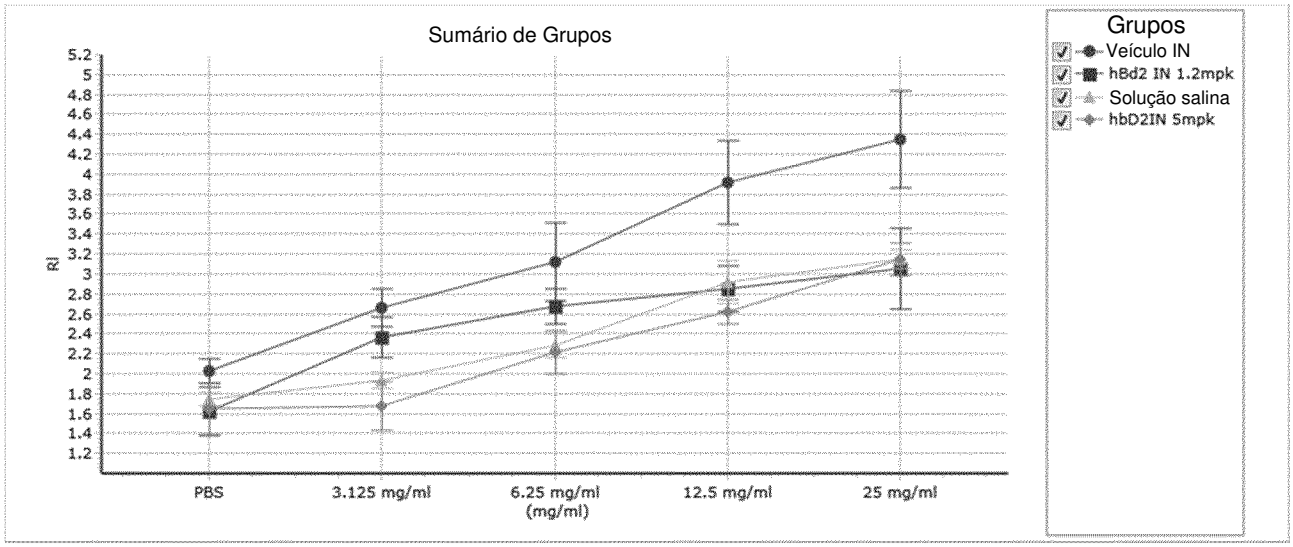


Fig. 32a.

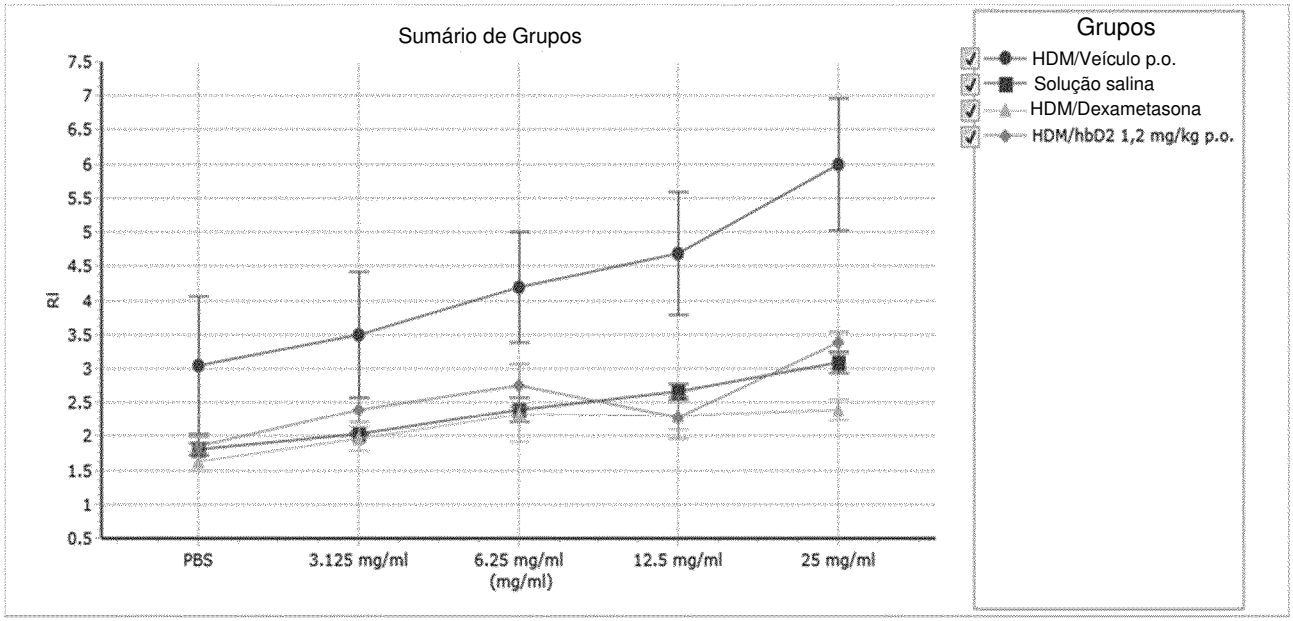


Fig. 32b.

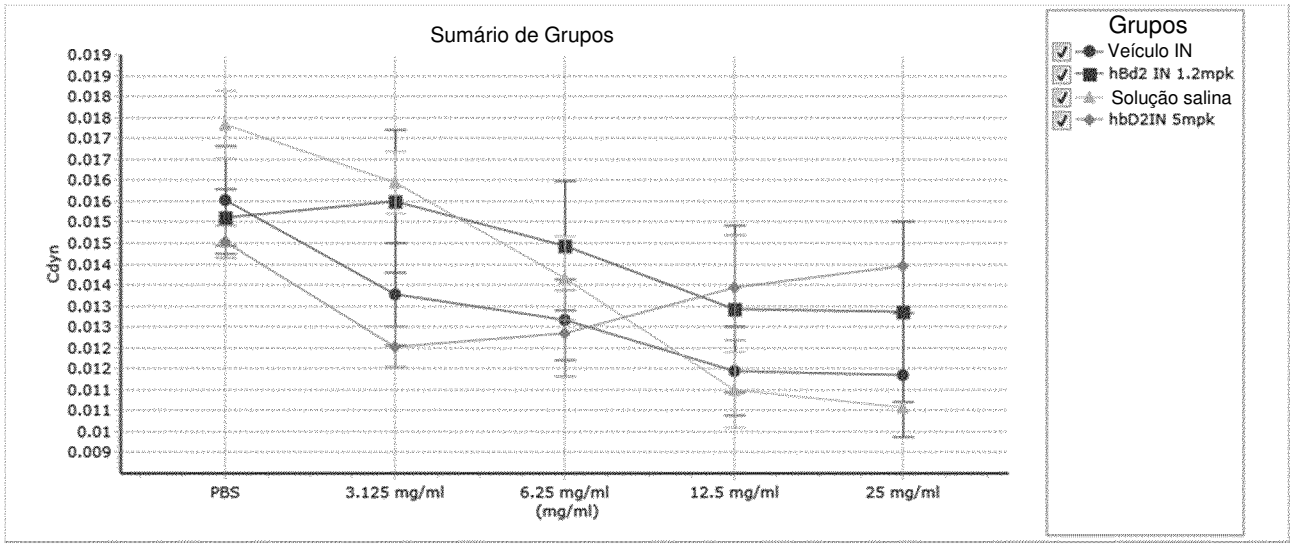


Fig. 33a

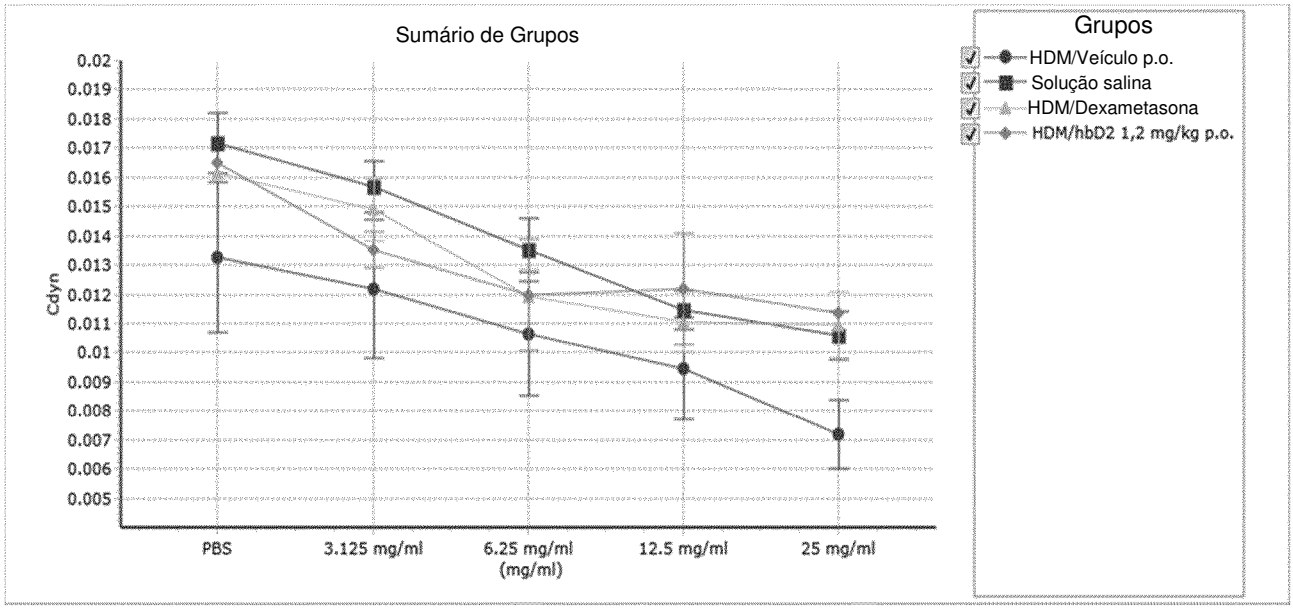


Fig. 33b

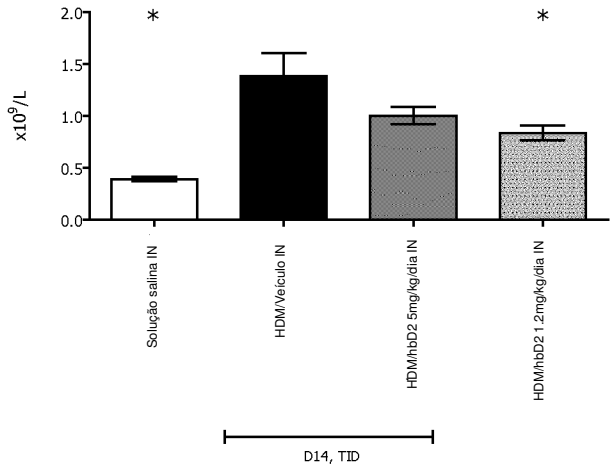


Fig 34a

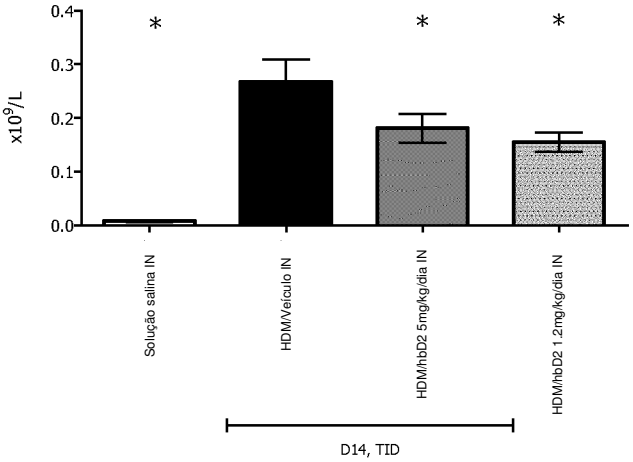


Fig 34b

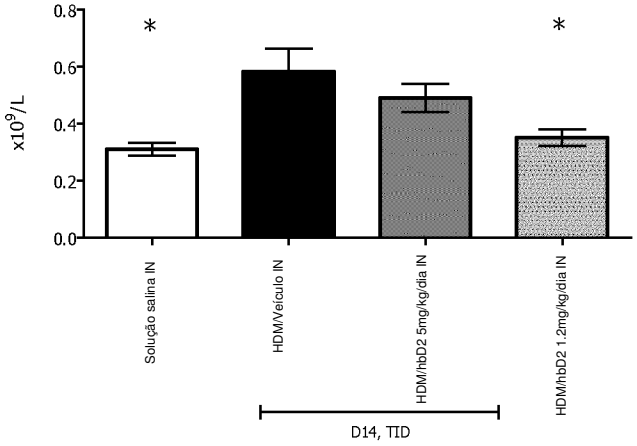


Fig. 34c

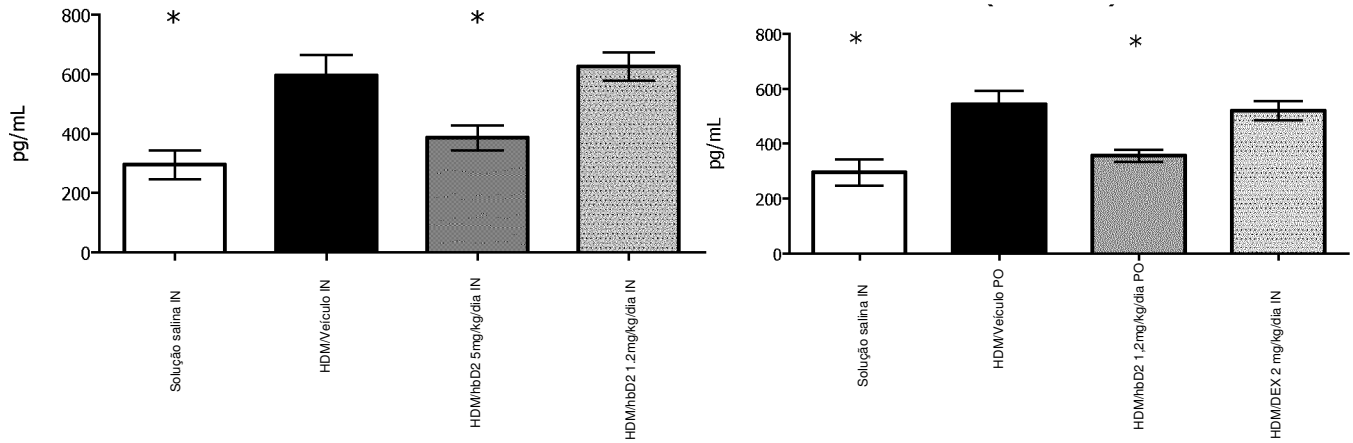

pg/mL
800
600
400
200
0
*
*
Solução salina IN
HDM/Veículo IN
HDM/hbD2 5mg/kg/dia IN
HDM/hbD2 1.2mg/kg/dia IN
pg/mL
800
600
400
200
0
*
*
Solução salina IN
HDM/Veículo PO
HDM/hbD2 1.2mg/kg/dia PO
HDM/DEX 2 mg/kg/dia IN

Fig. 35

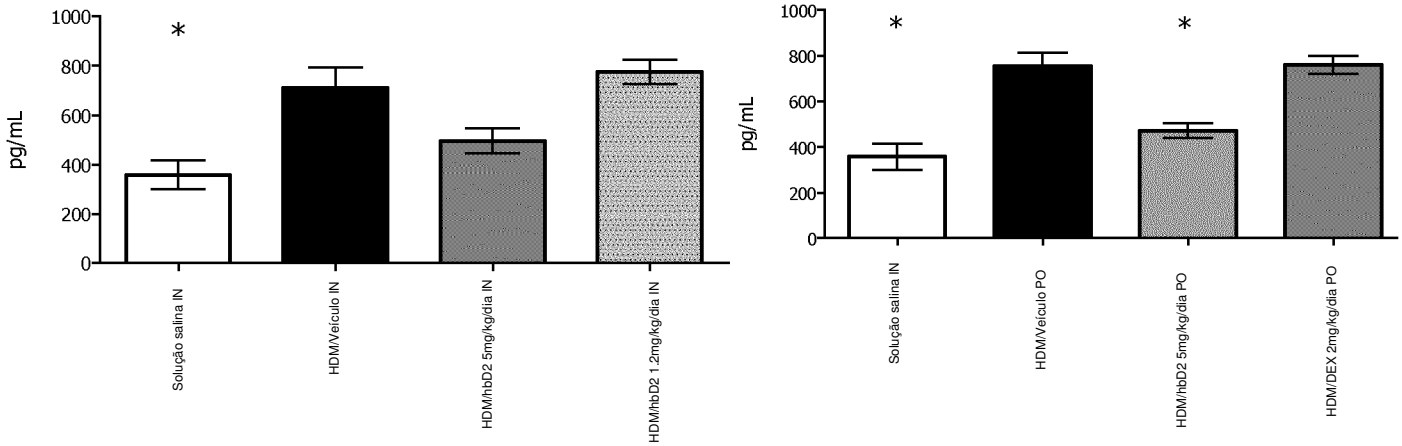

pg/mL
1000
800
600
400
200
0
*
Solução salina IN
HDM/Veículo IN
HDM/hbD2 5mg/kg/dia IN
HDM/hbD2 1.2mg/kg/dia IN
pg/mL
1000
800
600
400
200
0
*
*
Solução salina IN
HDM/Veículo PO
HDM/hbD2 5mg/kg/dia PO
HDM/DEX 2mg/kg/dia PO

Fig. 36

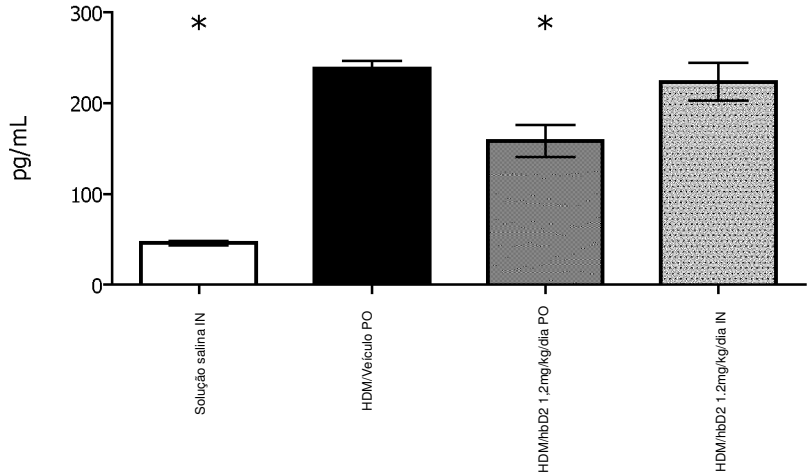

300
200
100
0
pg/mL
*
*
Solução salina IN
HDM/Veículo PO
HDM/hbD2 1,2mg/kg/dia PO
HDM/hbD2 1.2mg/kg/dia IN

Fig. 37

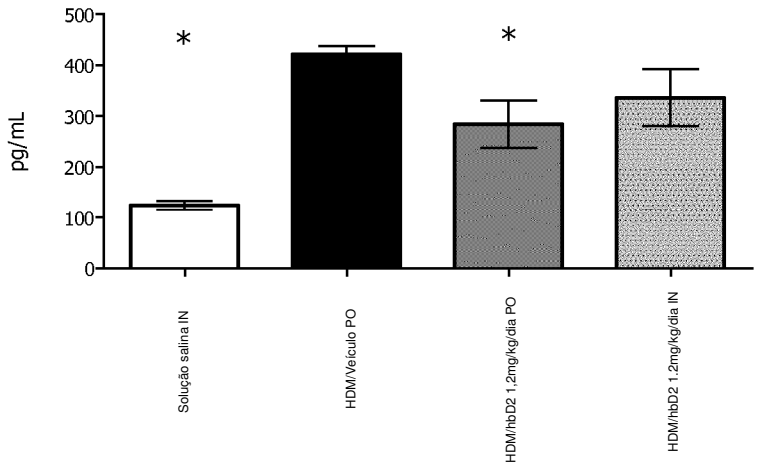

500
400
300
200
100
0
pg/mL
*
*
Solução salina IN
HDM/Veículo PO
HDM/hbD2 1,2mg/kg/dia PO
HDM/hbD2 1.2mg/kg/dia IN

Fig. 38

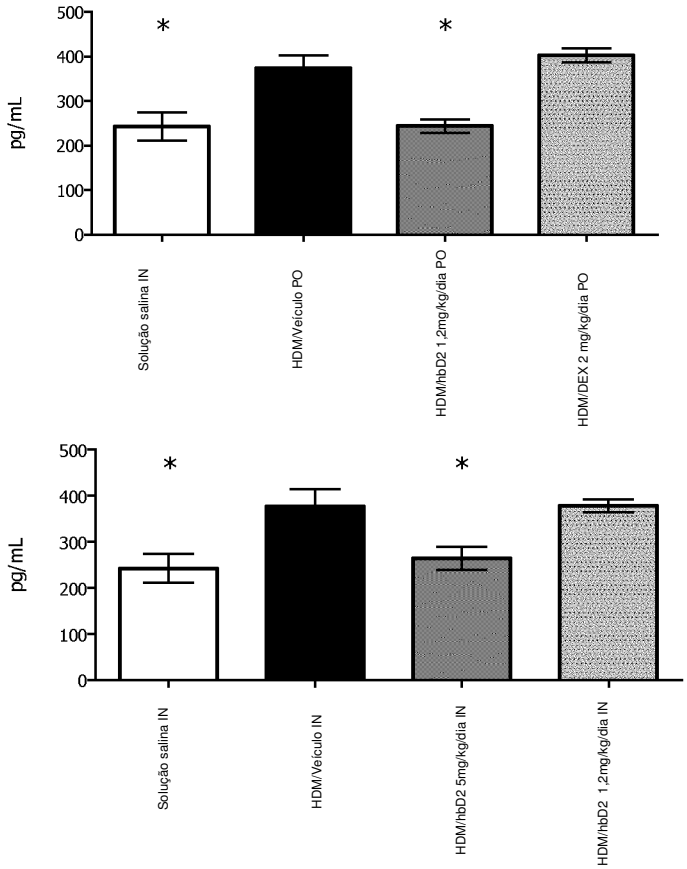

500
400
300
200
100
0
pg/mL
*
*
Solução salina IN
HDM/Veículo PO
HDM/hbD2 1,2mg/kg/dia PO
HDM/DEX 2 mg/kg/dia PO
500
400
300
200
100
0
pg/mL
*
*
Solução salina IN
HDM/Veículo IN
HDM/hbD2 5mg/kg/dia IN
HDM/hbD2 1,2mg/kg/dia IN

Fig. 39

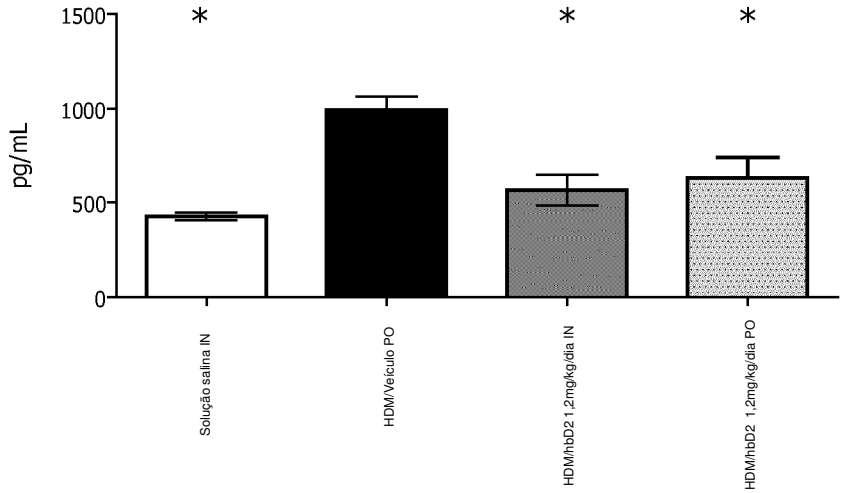

1500
1000
500
0
pg/mL
*
*
*
Solução salina IN
HDM/Veículo PO
HDM/hbD2 1,2mg/kg/dia IN
HDM/hbD2 1,2mg/kg/dia PO

Fig. 40

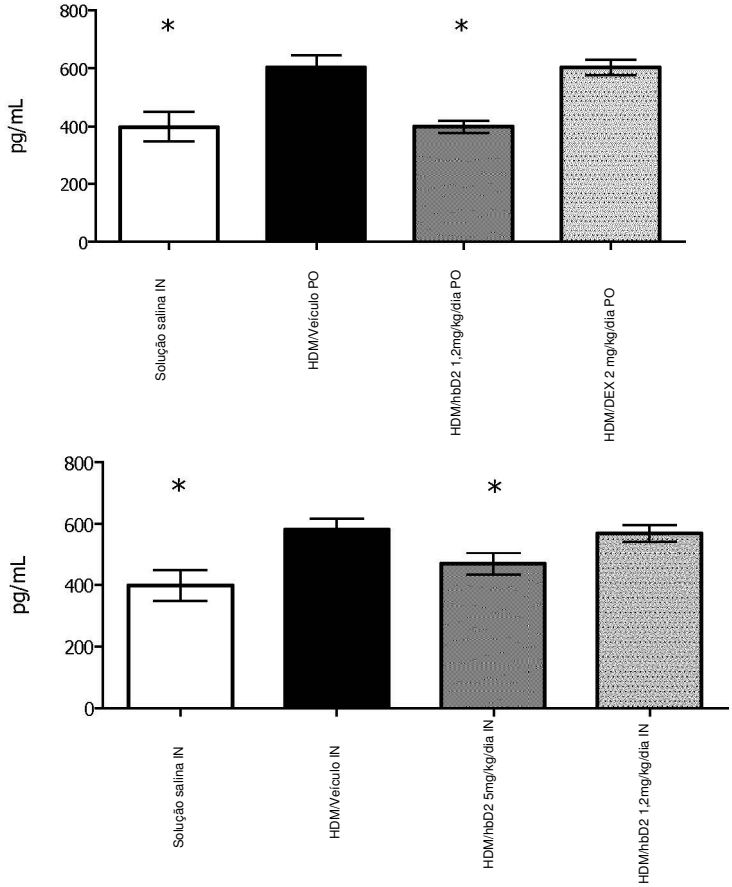

800
600
400
200
0
pg/mL
*
*
Solução salina IN
HDM/Veículo PO
HDM/hbD2 1,2mg/kg/dia PO
HDM/DEX 2 mg/kg/dia PO
800
600
400
200
0
pg/mL
*
*
Solução salina IN
HDM/Veículo IN
HDM/hbD2 5mg/kg/dia IN
HDM/hbD2 1,2mg/kg/dia IN

Fig. 41

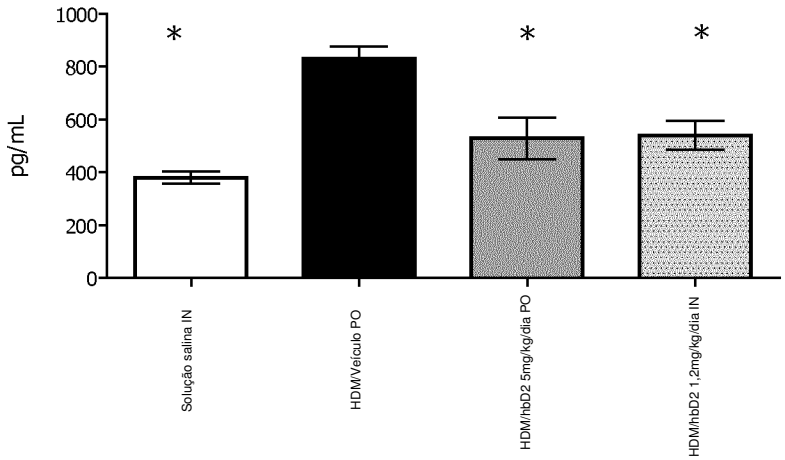

1000
800
600
400
200
0
pg/mL
*
*
*
Solução salina IN
HDM/Veículo PO
HDM/hbD2 5mg/kg/dia PO
HDM/hbD2 1,2mg/kg/dia IN

Fig. 42

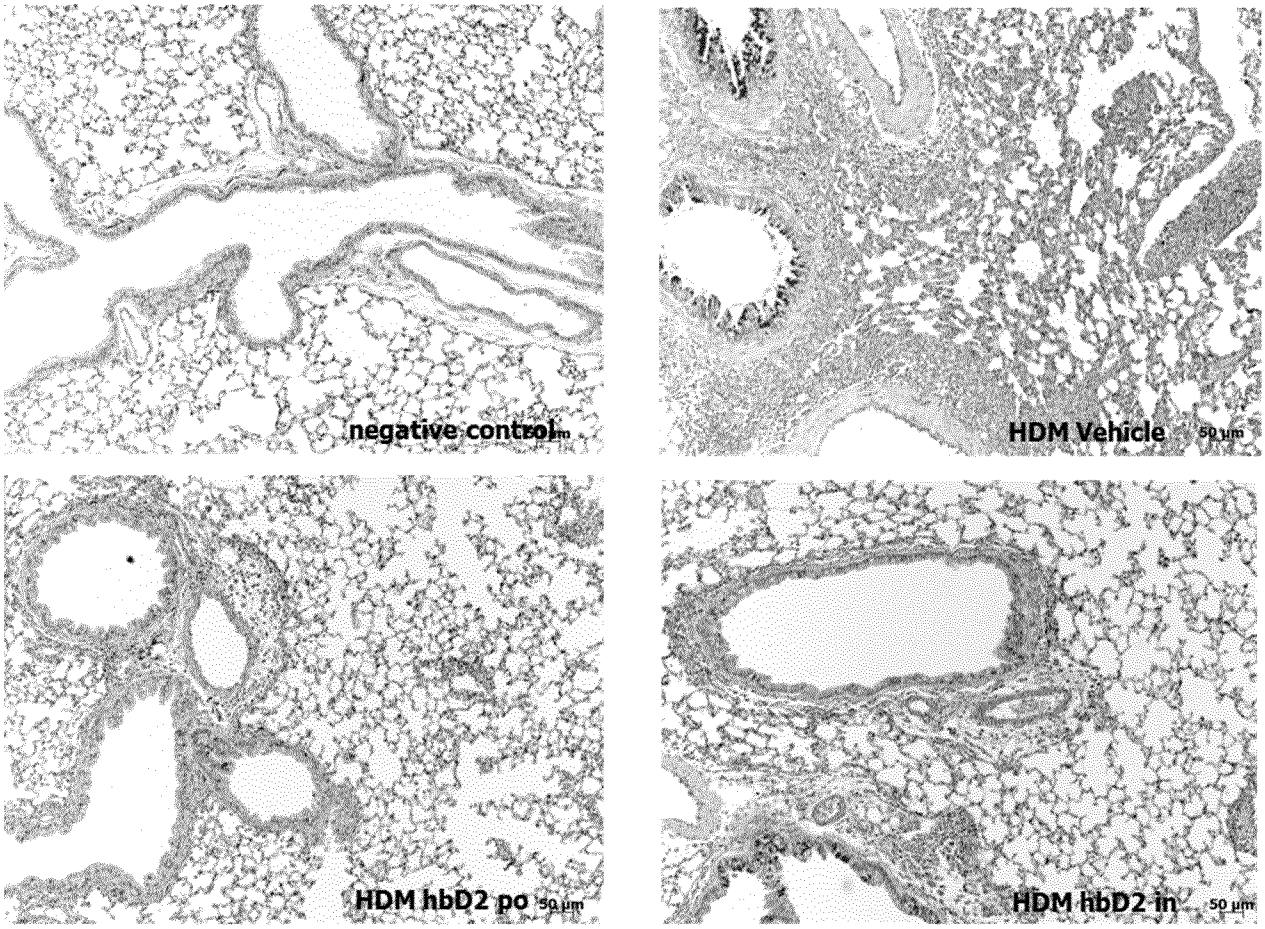

negative control
50 µm
HDM Vehicle
50 µm
HDM hbD2 po
50 µm
HDM hbD2 in
50 µm

Fig. 43

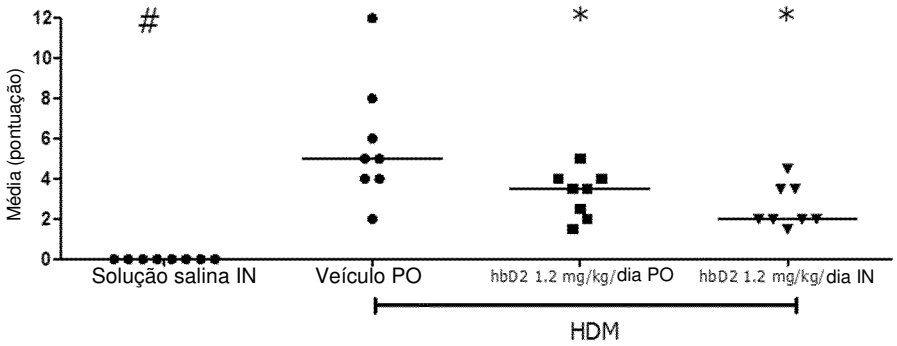

Média (pontuação)
12
10
8
6
4
2
0
#
*
*
Solução salina IN
Veículo PO
hbD2 1.2 mg/kg/dia PO
hbD2 1.2 mg/kg/dia IN
HDM

Fig. 44

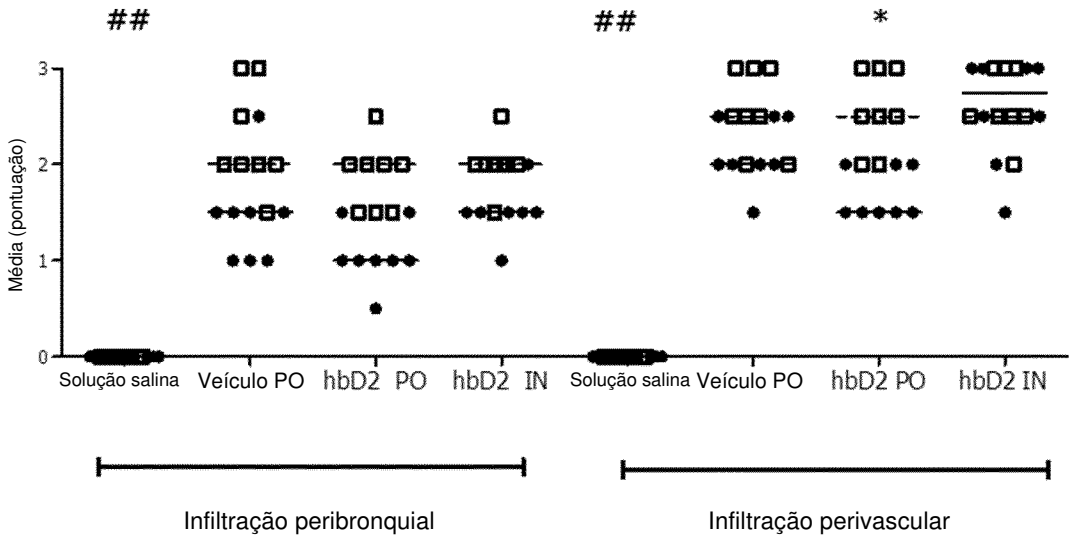

##
##
*
Média (pontuação)
3
2
1
0
Solução salina
Veículo PO
hbD2 PO
hbD2 IN
Solução salina
Veículo PO
hbD2 PO
hbD2 IN
Infiltração peribronquial
Infiltração perivascular

Fig. 45

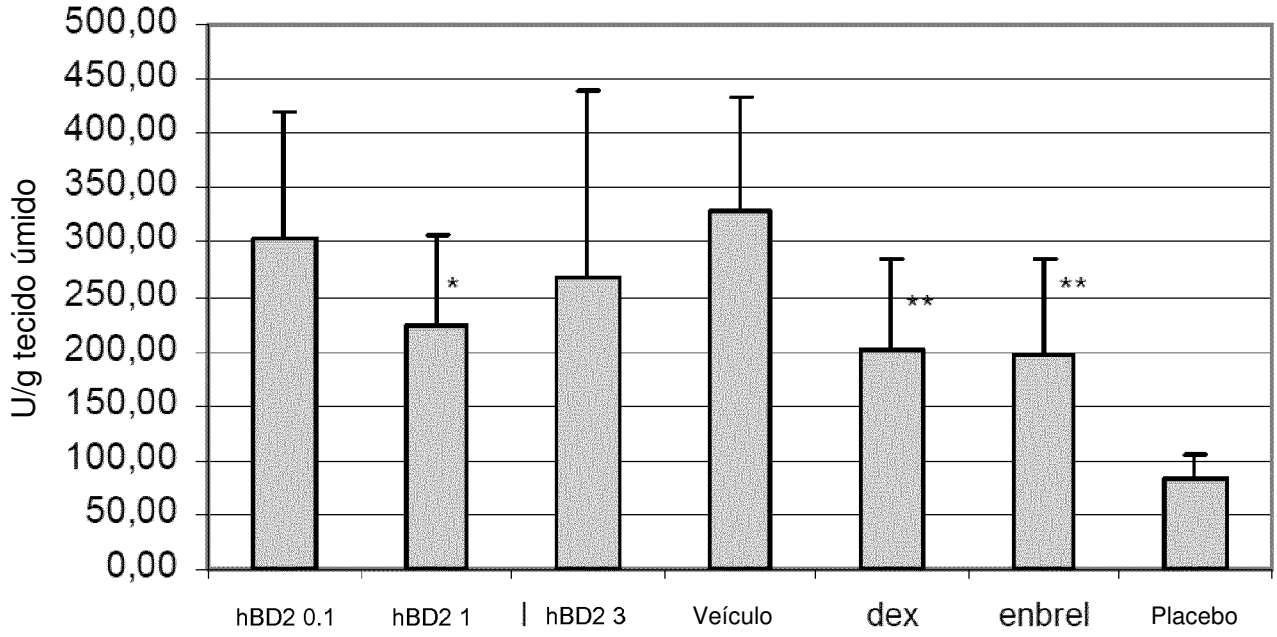

500,00
450,00
400,00
350,00
300,00
250,00
200,00
150,00
100,00
50,00
0,00
U/g tecido úmido
*
**
**
hBD2 0.1
hBD2 1
hBD2 3
Veículo
dex
enbrel
Placebo

Fig. 46

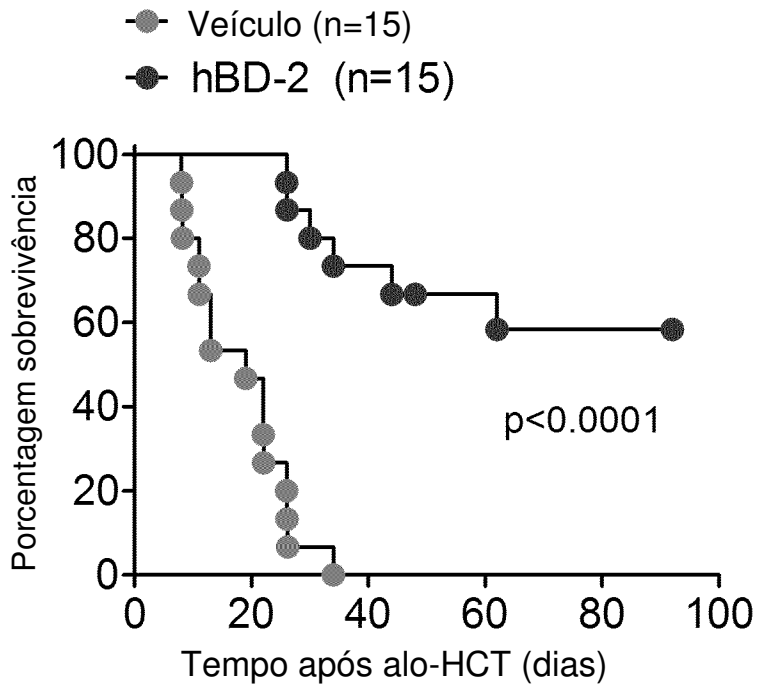

Veículo (n=15)
hBD-2 (n=15)
100
80
60
40
20
0
Porcentagem sobrevivência
p<0.0001
0
20
40
60
80
100
Tempo após alo-HCT (dias)

Fig. 47

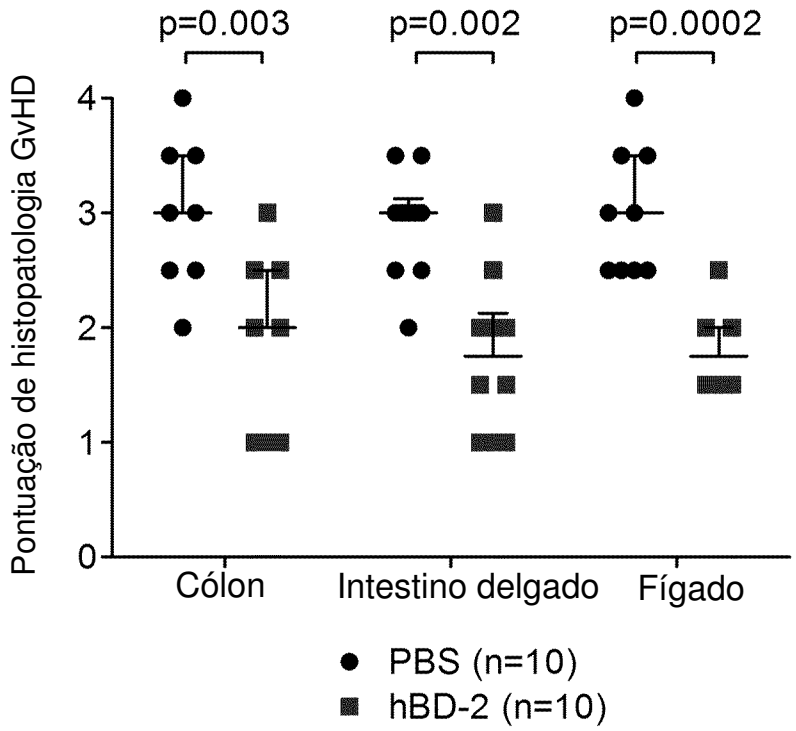

p=0.003
p=0.002
p=0.0002
Pontuação de histopatologia GvHD
4
3
2
1
0
Cólon
Intestino delgado
Fígado
PBS (n=10)
hBD-2 (n=10)

Fig 48

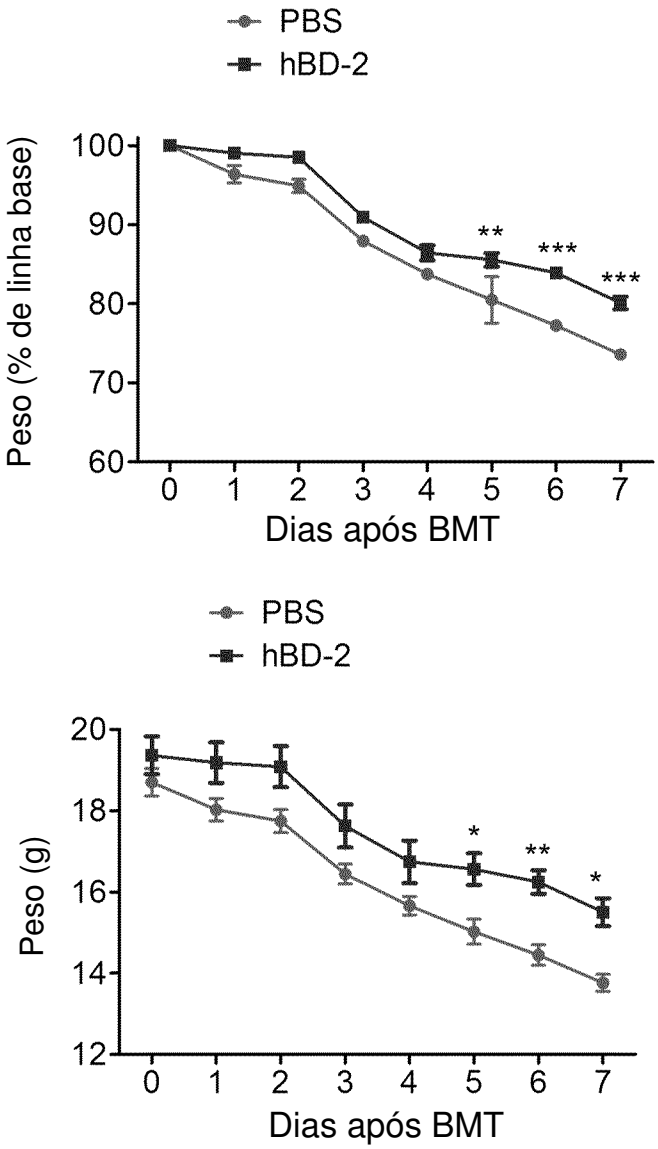

PBS
hBD-2
Peso (% de linha base)
100
90
80
70
60
0 1 2 3 4 5 6 7
Dias após BMT
**
***
***
PBS
hBD-2
Peso (g)
20
18
16
14
12
0 1 2 3 4 5 6 7
Dias após BMT
*
**
*

Fig 49 a e b

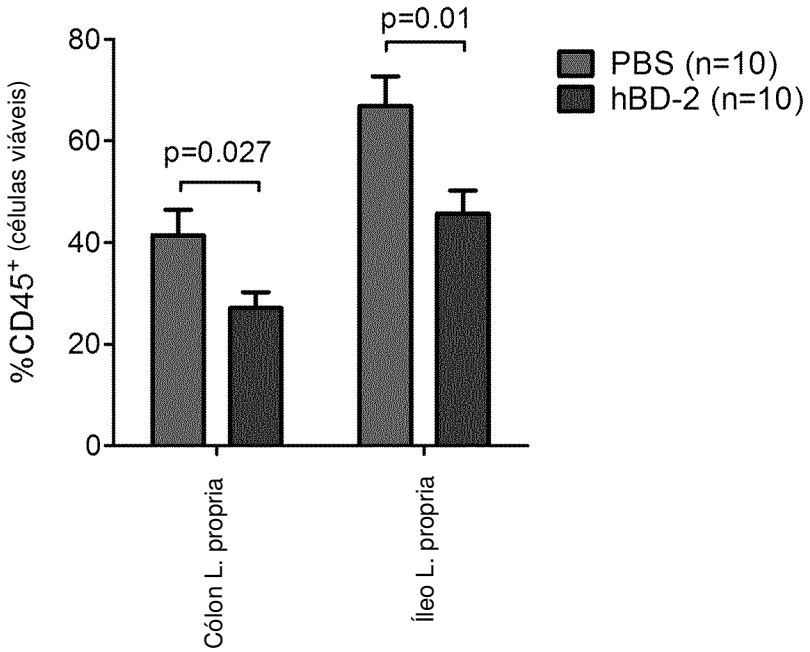


Fig 50

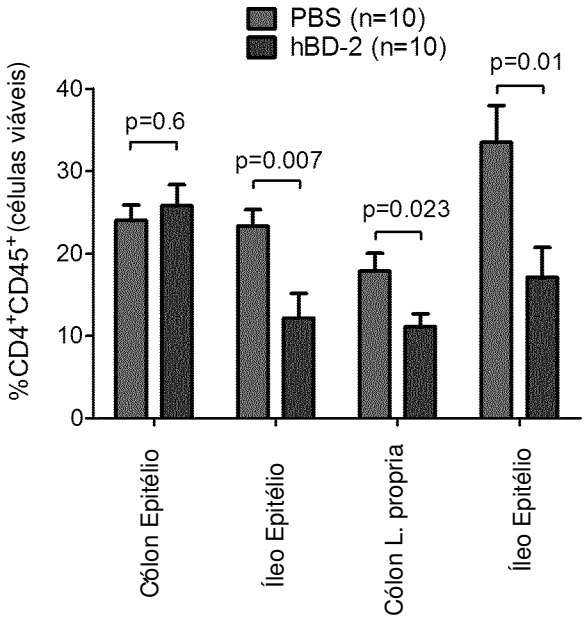


Fig 51a

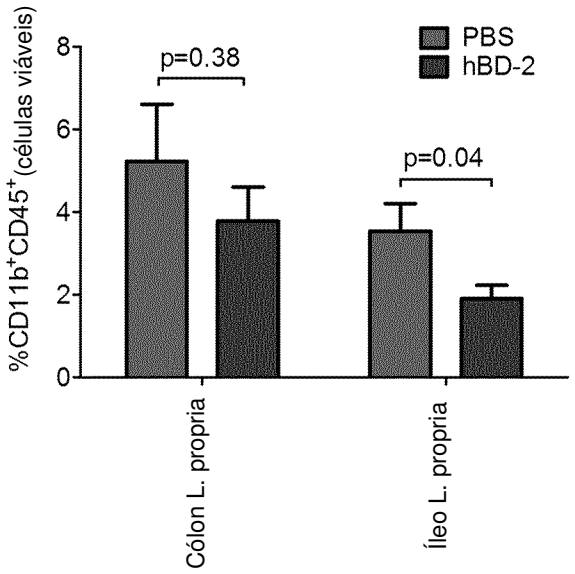


Fig 51b

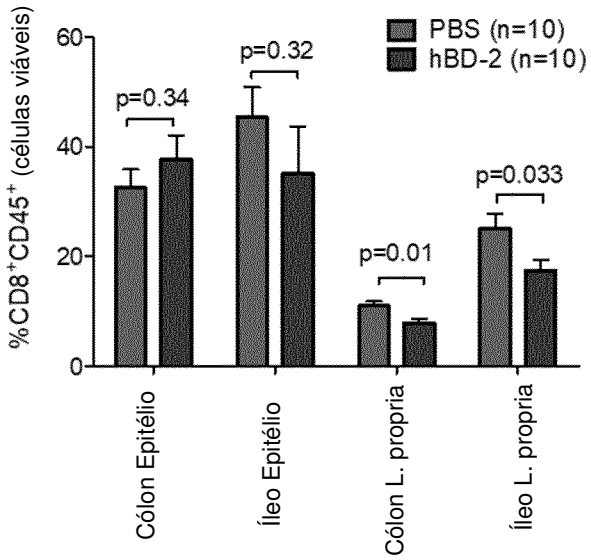


Fig 51c

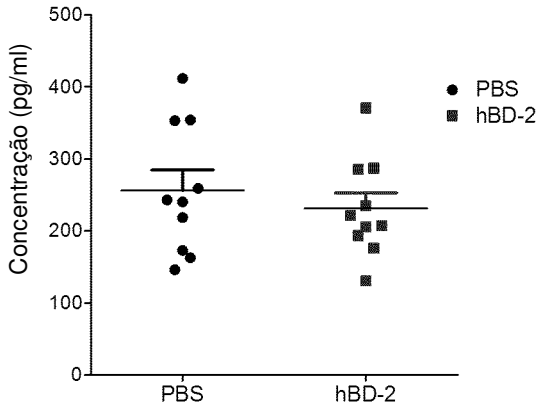


Fig 52a

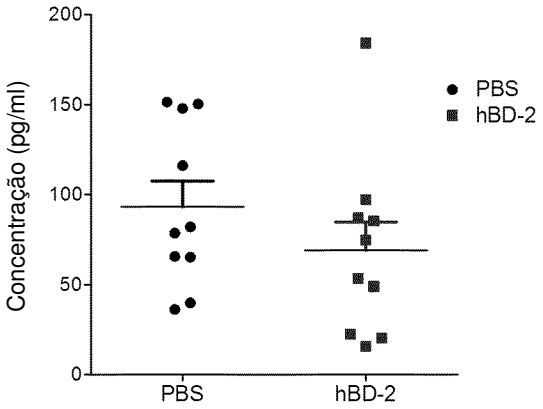


Fig 52b

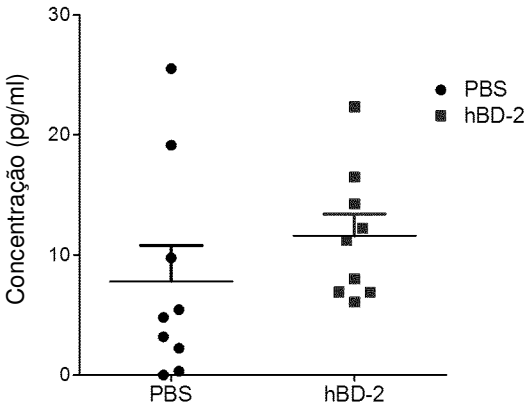


Fig 52c

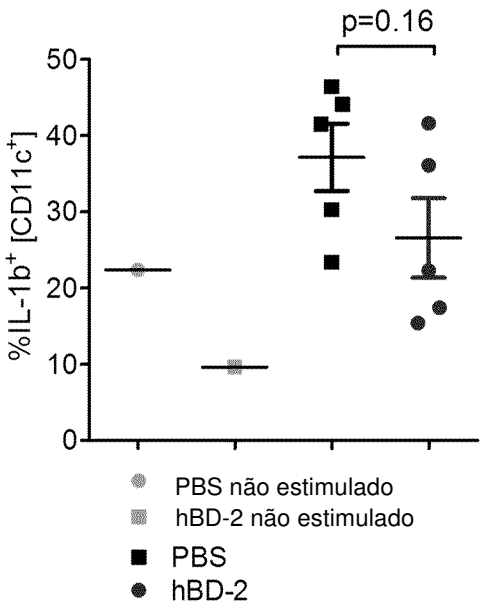


Fig 53a

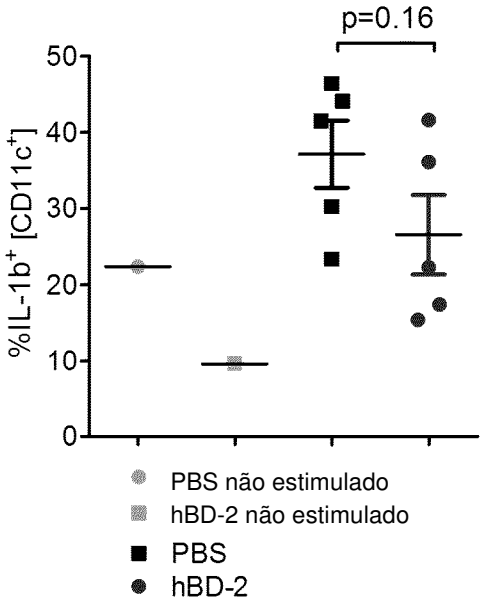


Fig 53b

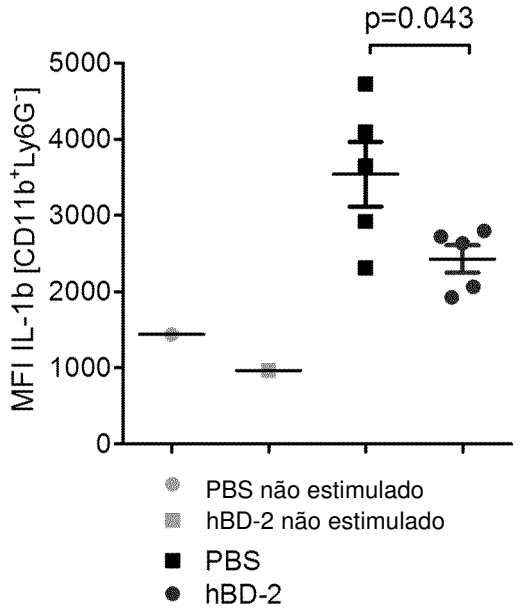
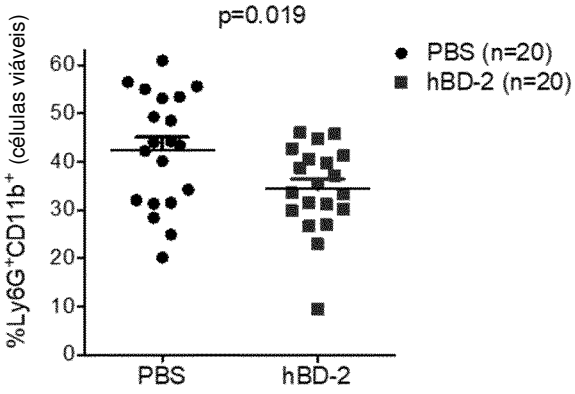


Fig 53c



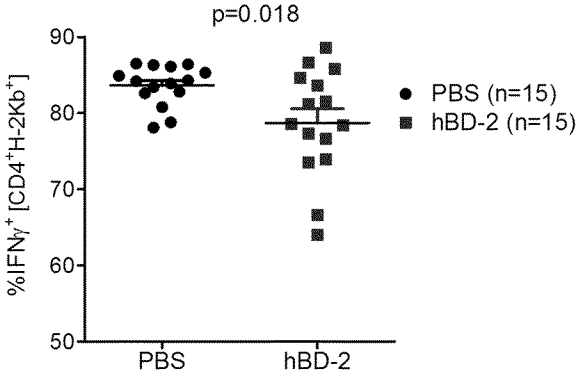
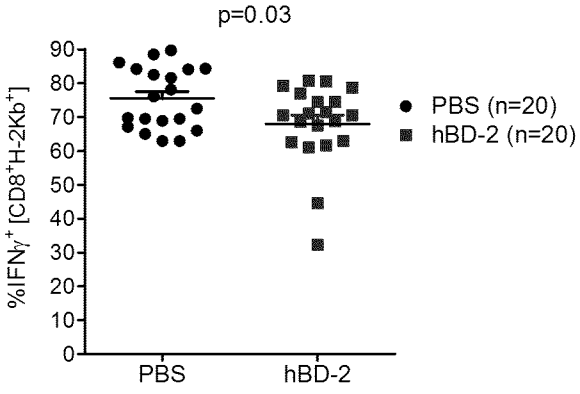


Fig 54 a e b



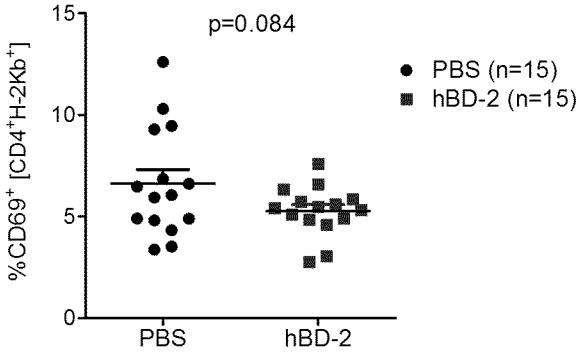


Fig 54 c e d

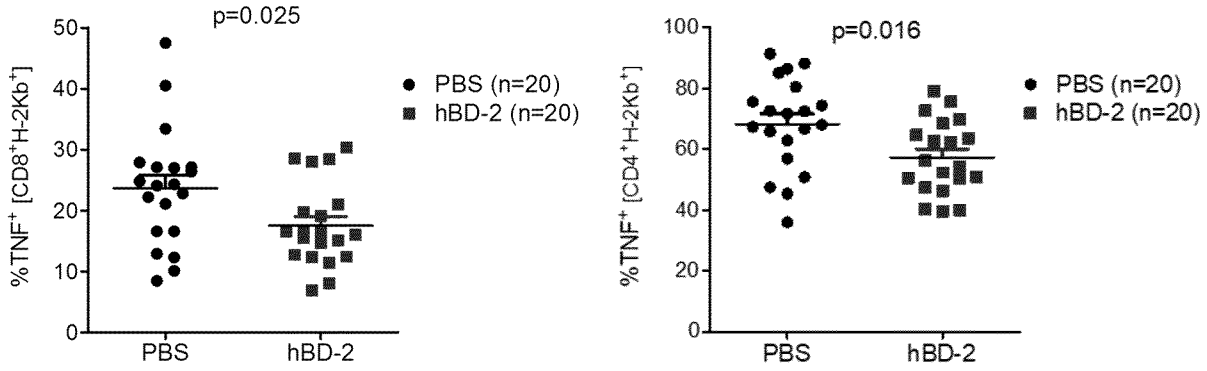


Fig 54 e e f

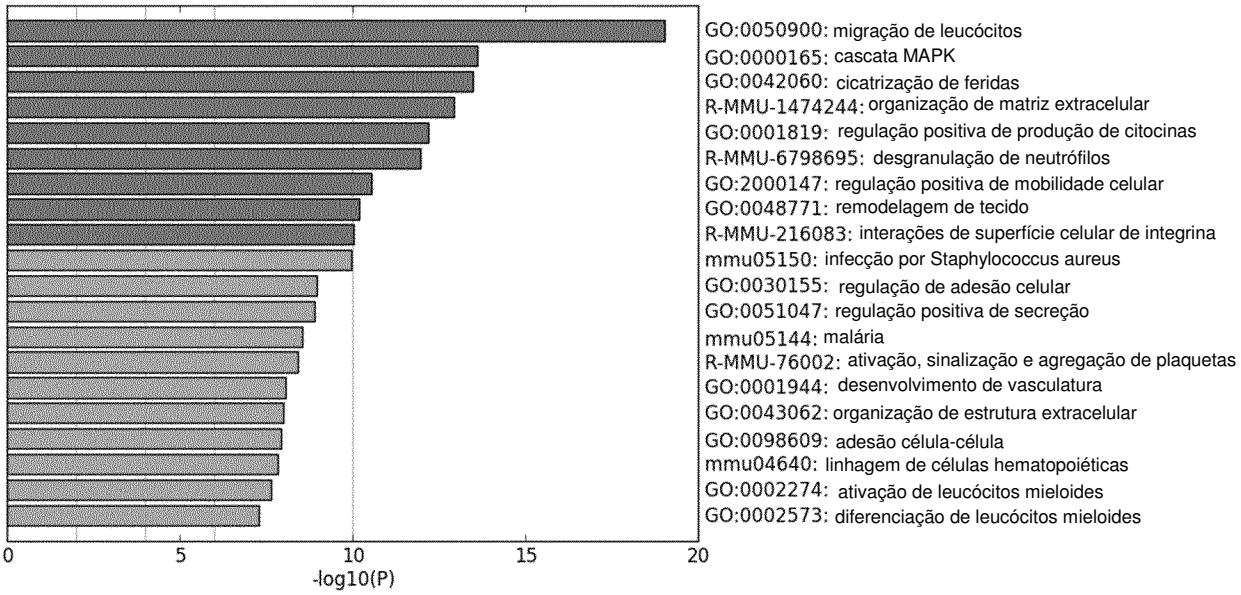


Fig 55

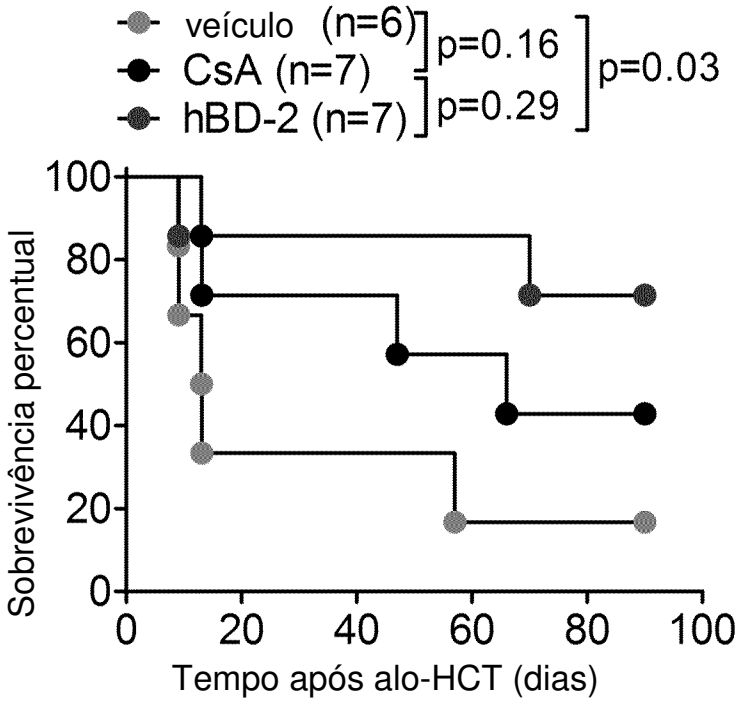

veículo (n=6)
CsA (n=7)
hBD-2 (n=7)
p=0.16
p=0.29
p=0.03
Sobrevivência percentual
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
80
100
Tempo após alo-HCT (dias)

Fig 56

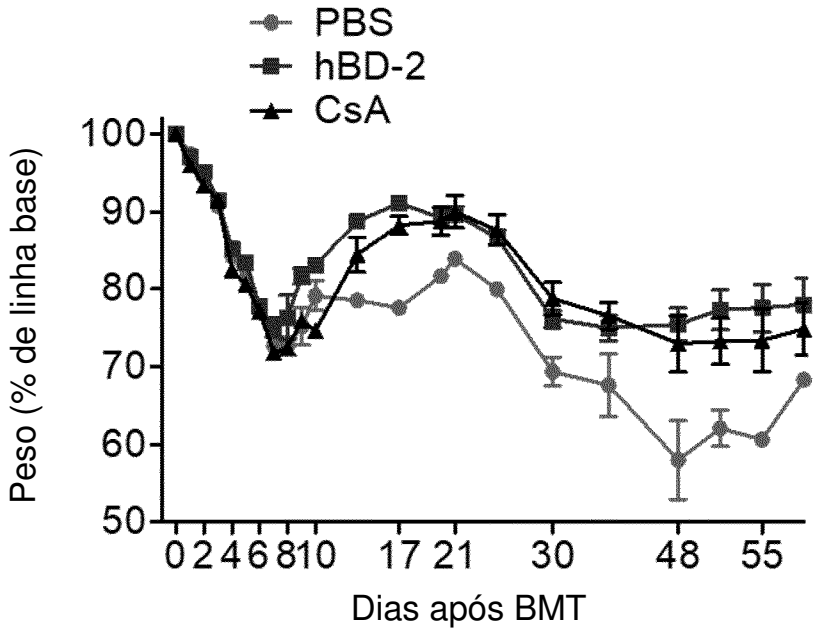

PBS
hBD-2
CsA
Peso (% de linha base)
100
90
80
70
60
50
0 2 4 6 8 10
17 21
30
48
55
Dias após BMT

Fig 57

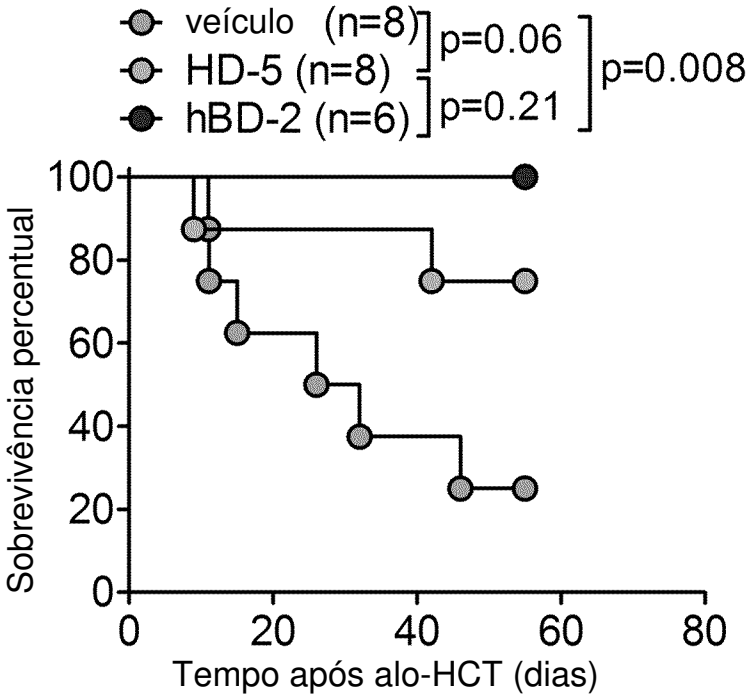


Fig 58

Medições múltiplas por camundongo

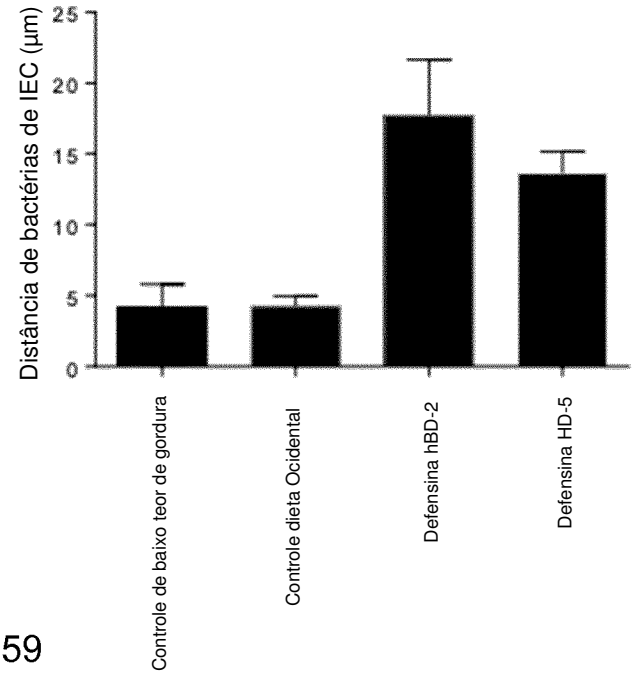


Fig 59

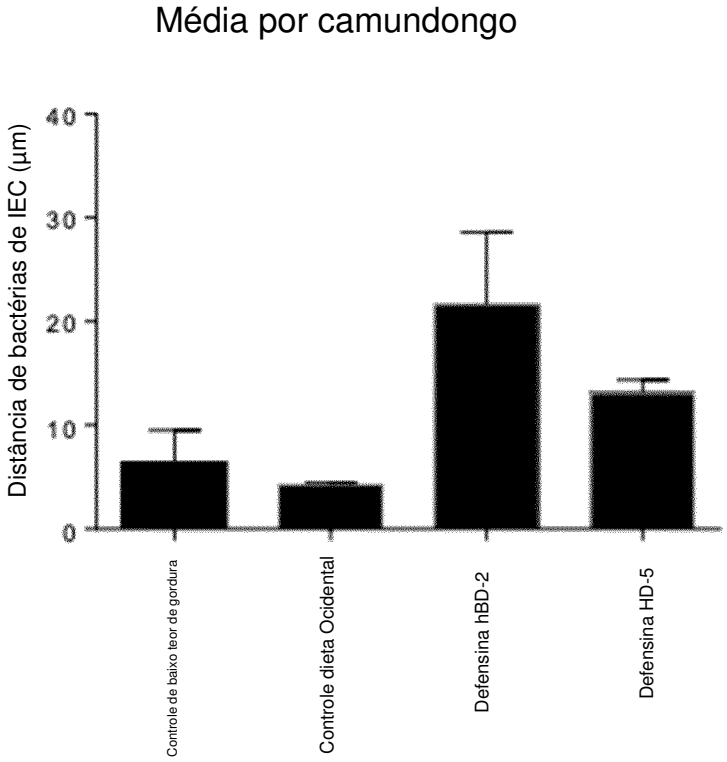


Fig 59 continuação

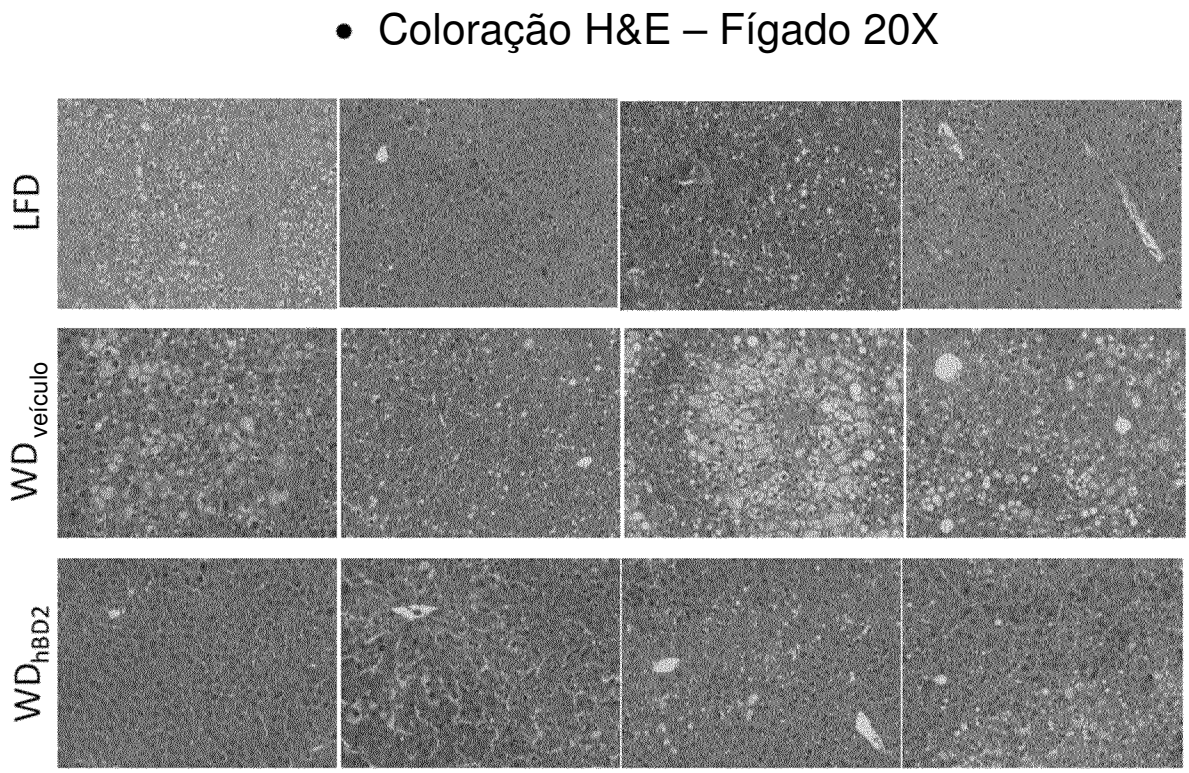


Fig 60

RESUMO

B-DEFENSINA E/OU A-DEFENSINA HUMANA PARA USO NA PREVENÇÃO OU NO TRATAMENTO DE DOENÇA DO ENXERTO CONTRA HOSPEDEIRO AGUDA

A presente invenção refere-se a métodos para tratamento e/ou prevenção de doença do enxerto contra hospedeiro (GVHD) aguda, assim como crônica, e, em particular, a métodos para diminuir mortalidade e aumentar especialmente a sobrevivência a longo prazo; complicações agudas associadas com GVHD tal como diarreia, perda de peso e sepse com base em normalização de microbiota de intestino, fígado, pulmão e pele e defesa mucosal; reequilíbrio do sistema imune com normalização de produção de citocinas de IFN-γ, TNF-α, Il-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10 e IL-13 e prevenção e/ou tratamento de tempestade de citocinas; complicações crônicas associadas com GVHD, tal como bronquiolite obliterante e escleroderma, o método compreendendo administração oral, subcutânea, intrapulmonar e/ou dérmica/transdérmica de uma ou mais defensinas de mamíferos selecionadas dentre o grupo de α- e β-defensinas em um paciente que recebeu ou está prestes a receber um transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênicas.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 58487632.txt
- Data de Geração do Código: 21/12/2020
- Hora de Geração do Código: 14:44:31
- Código de Controle:
  - Campo 1: 97B47BE1527551AE
  - Campo 2: 0B783BC1C5746714