



República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0708503-6 A2**

(22) Data de Depósito: 01/03/2007  
(43) Data da Publicação: 31/05/2011  
(RPI 2108)



(51) *Int.Cl.:*  
A61K 38/16 2006.01  
A61P 37/02 2006.01

(54) Título: **REGULAÇÃO DAS RESPOSTAS IMUNE POR MODULAÇÃO DA FUNÇÃO DO ANTÍGENO PRESENTE EM CÉLULAS**

(30) Prioridade Unionista: 02/03/2006 AU 20069001058

(73) Titular(es): CBIO Limited

(72) Inventor(es): Barbara Jane johnson, Caroline Amanda Dobbins, Inge E. A. Flesch

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemens, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT AU2007000254 de 01/03/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/098557 de 07/09/2007

(57) Resumo: REGULAÇÃO DAS RESPOSTAS IMUNE POR MODULAÇÃO DA FUNÇÃO DO ANTÍGENO PRESENTE EM CÉLULAS A presente invenção refere-se ao uso de chaperonina 10 para modular a função de células apresentando antígeno. Mais particularmente a invenção reside na modulação de expressão em superfície de célula de moléculas de MHC tal como HLA.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**REGULAÇÃO DAS RESPOSTAS IMUNE POR MODULAÇÃO DA FUNÇÃO DO ANTÍGENO PRESENTE EM CÉLULAS**".

Campo da Invenção

5 A presente invenção refere-se genericamente à regulação de respostas imunes através de modulação da função de células apresentando antígeno (APCs). Em particular, a presente invenção refere-se ao uso de chaperonina 10 na modulação de função de APC tal como expressão de superfície de célula de principais moléculas de complexo de histocompatibilidade (MHC), por exemplo, HLA, e a métodos associados, usos e composições para o tratamento de doenças, e a métodos para seleção de moduladores de função de APC.

Antecedentes da Invenção

15 Um componente central de sistemas de defesa de hospedeiros contra patógenos virais e bacterianos invasores envolve o reconhecimento bem-sucedido do patógeno, ou seus componentes, através de receptores celulares que induzem uma cascata sinalizante resultando em estimulação do sistema imune. Um aspecto essencial deste sistema é o reconhecimento de célula T de principais complexos de complexo de histocompatibilidade principal-(MHC)-peptídeo.

20 Células T CD4<sup>+</sup> são capazes de reconhecer peptídeos derivados de patógenos quando tais peptídeos são mostrados no contexto de moléculas classe II MHC, que são compostas por uma cadeia  $\alpha$ - e  $\beta$ - originalmente montada no retículo endoplásmico. Estas cadeias  $\alpha$ - e  $\beta$ - associam com a cadeia invariante (Ii) que protege a ranhura de ligação de peptídeo e facilita trânsito de moléculas classe II MHC para compartimentos endossomais. Nos compartimentos endossomais, Ii é limpa, deixando um peptídeo (CLIP) na ranhura de ligação. A molécula chaperona HLA-DM facilita substituição de CLIP por peptídeos antigênicos. Moléculas classe II MHC maduras carregadas com peptídeo antigênico então migram para a superfície de célula onde elas podem ser apresentadas a células T CD4<sup>+</sup>.

Este sistema de processamento de antígeno e apresentação de

moléculas classe II MHC maduras ocorre em células dendríticas (DC), que são as únicas APCs que podem estimular células T simples e induzem uma resposta imune primária. Assim, DC desempenha um papel central em apresentação de antígeno e a indução de imunidade adaptativa. A capacidade de DC induzir uma resposta imune é dependente de seu estado de maturação. É pensado que DC imatura expressando baixos níveis de MHC e moléculas co-estimuladoras de célula T tais como CD40, CD80, CD83 e CD86 sobre a superfície de célula captura antígenos na periferia. Elas então migram para tecidos linfóides secundários e sofrem um método de maturação. Com maturação, molécula MHC são redistribuídas a partir de compartimentos intracelulares para a superfície de célula o que resulta em uma aumentada capacidade para apresentar antígenos. Concomitantemente, a expressão em superfície de moléculas co-estimuladoras que promovem ativação de célula T é regulada ascendentemente. O perfil de citocina secretada por DC é também dependente de seu estágio de maturação. Citocinas produzidas por DC madura incluem IL-12, IL-1 $\alpha/\beta$ , IL-18, IFN- $\alpha/\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10, e TGF- $\beta$ . O perfil de citocina de DC finalmente determina o resultado-Th1/Th2 da resposta imune. Ou seja, antígenos que induzem secreção de IL-12 por DC induzem diferenciação Th1 enquanto antígenos que não induzem produção de IL12 promovem diferenciação Th2.

Muitos dos métodos reguladores envolvidos em maturação de DC permanecem desconhecidos. Em particular, muitos dos caminhos sinalizantes moleculares que são envolvidos quando moléculas classe II MHC sofrem mudanças em localização a partir de estruturas endossomais em DC imatura para a membrana de plasma em DC madura permanecem incertos.

Chaperonina 10 (Cpn10) é uma chaperona mitocondrial altamente conservada desempenhando um papel essencial em dobra de proteína. Cpn10 também foi mostrada estar envolvida em um número de atividades imuno moduladoras, por exemplo, inibição de ativação de fator- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) e produção de citocinas pró-inflamatórias, ambos, in vitro e in vivo. A presente invenção é baseada na surpreendente e inesperada verificação de que Cpn10 tem a capacidade de modular função de APC, incluindo redistribuição

de moléculas MHC a partir de compartimentos intracelulares para a superfície de célula em DC, e ativação mediada por APC de células T.

### Sumário da Invenção

5 De acordo com um primeiro aspecto da presente invenção, é provido um método para modulação de uma resposta imune em um sujeito ou em pelo menos uma célula da mesma, tecido ou órgão, através de modulação de nível de expressão em superfície de célula de pelo menos uma molécula MHC, onde o dito método compreende administração de uma quantidade efetiva de chaperonina 10.

10 O método ainda pode compreender modulação de uma resposta imune em um sujeito ou em pelo menos uma célula da mesma, tecido ou órgão, através de modulação de nível de expressão em superfície de célula de pelo menos uma outra molécula de superfície de célula, compreendendo administração de uma quantidade efetiva de chaperonina 10.

15 A molécula MHC pode ser uma molécula Classe I MHC, uma molécula Classe II MHC, ou uma molécula MHC não-clássica. A molécula Classe II MHC pode ser HLA. O HLA pode ser HLA-DR, HLA-DP, ou HLA-DQ.

20 A expressão em superfície de célula pode ser aquela de uma célula apresentando antígeno. A célula apresentando antígeno pode ser selecionada do grupo compreendendo um macrófago, célula dendrítica ou célula B.

25 A chaperonina 10 pode ser uma chaperonina 10 derivada naturalmente, produzida recombinantemente ou produzida sinteticamente. A chaperonina 10 pode ser de origem eucariótica. A chaperonina 10 pode ser de origem mamífera. A chaperonina 10 pode ser chaperonina 10 humana.

A chaperonina 10 pode compreender a seqüência de polipeptídeo como mostrada em SEQ ID Nº: 1, SEQ ID Nº: 2 ou SEQ ID Nº: 3. A chaperonina 10 pode ser acetilada ou não-acetilada.

30 A chaperonina 10 pode ser administrada na forma de um polinucleotídeo codificando chaperonina 10. O polinucleotídeo codificando chaperonina 10 pode estar localizado em uma construção genética, ligada opera-

velmente a um promotor. O polinucleotídeo pode compreender a seqüência mostrada em SEQ ID N°: 4.

De acordo com um segundo aspecto da presente invenção, é provido um método para tratamento ou prevenção de uma doença ou condição em um sujeito através de modulação de nível de expressão em superfície de célula de pelo menos uma molécula MHC, onde o dito método compreende administração ao sujeito de uma quantidade efetiva de chaperonina 10.

O método ainda pode compreender tratamento ou prevenção de uma doença ou condição em um sujeito através de modulação de nível de expressão em superfície de célula de pelo menos uma outra molécula de superfície de célula, compreendendo administração de uma quantidade efetiva de chaperonina 10.

A molécula MHC pode ser uma molécula Classe I MHC, uma molécula Classe II MHC, ou uma molécula MHC não-clássica. A molécula classe II MHC pode ser HLA. O HLA pode ser HLA-DR, HLA-DP ou HLA-DQ.

A expressão em superfície de célula pode ser aquela de uma célula apresentando antígeno. A célula apresentando antígeno pode ser selecionada do grupo compreendendo um macrófago, célula dendrítica ou célula B.

A doença ou condição pode resultar de, ou de outro modo ser associada com, infecção do sujeito por um patógeno viral ou bacteriano. A doença ou condição pode ser câncer, um distúrbio autoimune, inflamação, alergia, asma ou doença infecciosa.

A chaperonina 10 pode ser uma chaperonina 10 derivada naturalmente, produzida recombinantemente ou produzida sinteticamente. A chaperonina 10 pode ser de origem eucariótica. A chaperonina 10 pode ser chaperonina 10 humana.

A chaperonina 10 pode compreender a seqüência de polipeptídeos como mostrada em SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 2 ou SEQ ID N°: 3. A chaperonina 10 pode ser acetilada ou não-acetilada.

A chaperonina 10 pode ser administrada na forma de um polinucleotídeo codificando chaperonina 10. O polinucleotídeo codificando chaperonina 10 pode estar localizado em uma construção genética, ligada operavelmente a um promotor. O polinucleotídeo pode compreender a seqüência  
5 como mostrada em SEQ ID Nº: 4.

De acordo com um terceiro aspecto da presente invenção, é provido um método para modulação de nível de expressão em superfície de célula de pelo menos uma molécula MHC em um sujeito, ou em pelo menos uma célula da mesma, tecido ou órgão, onde o dito método compreende  
10 administração de uma quantidade efetiva de chaperonina 10.

O método ainda pode compreender modulação de nível de expressão em superfície de célula de pelo menos uma outra molécula de superfície de célula em um sujeito, ou em pelo menos uma célula da mesma, tecido ou órgão, compreendendo administração de uma quantidade efetiva  
15 de chaperonina 10.

A molécula MHC pode ser uma molécula Classe I MHC, uma molécula Classe II MHC, ou uma molécula MHC não-clássica. A molécula Classe II MHC pode ser HLA. O HLA pode ser HLA-DR, HLA-DP, ou HLA-DQ.

A expressão em superfície de célula pode ser aquela de uma célula apresentando antígeno. A célula apresentando antígeno pode ser selecionada do grupo compreendendo um macrófago, célula dendrítica ou célula B.  
20

De acordo com um quarto aspecto da presente invenção, é provido um método para modulação de função de uma célula apresentando antígeno em um sujeito, ou em pelo menos um seu tecido ou órgão, onde o dito método compreende administração de uma quantidade efetiva de chaperonina 10.  
25

A célula apresentando antígeno pode ser selecionada do grupo compreendendo um macrófago, célula dendrítica ou célula B.

A função pode ser selecionada do grupo compreendendo migração para um nódulo linfático, ativação de célula T ou proliferação de célula T.  
30

De acordo com um quinto aspecto da presente invenção, é provida uma composição quando usada para o tratamento ou prevenção de uma doença ou condição, onde a dita composição compreende chaperonina 10 junto com pelo menos um carreador, diluente ou adjuvante farmacêutica-  
5 mente aceitável, e onde a chaperonina 10 modula o nível de expressão em superfície de célula de pelo menos uma molécula MHC.

A chaperonina 10 ainda pode modular o nível de expressão em superfície de célula de pelo menos uma outra molécula de superfície de célula.

10 A molécula MHC pode ser uma molécula Classe I MHC, uma molécula Classe II MHC, ou uma molécula MHC não-clássica. A molécula Classe II MHC pode ser HLA. O HLA pode ser HLA-DR, HLA-DP, ou HLA-DQ.

A expressão em superfície de célula pode ser aquela de uma célula apresentando antígeno. A célula apresentando antígeno pode ser se-  
15 lecionada do grupo compreendendo um macrófago, célula dendrítica ou célula B.

De acordo com um sexto aspecto da presente invenção, é provida uma composição quando usada para o tratamento ou prevenção de uma doença ou condição, onde a dita composição compreende chaperonina 10  
20 junto com pelo menos um carreador, diluente ou adjuvante farmacêutica-mente aceitável, e onde a chaperonina 10 modula a função de uma célula apresentando antígeno em um sujeito, ou em pelo menos um seu tecido ou órgão.

A célula apresentando antígeno pode ser selecionada do grupo  
25 compreendendo um macrófago, célula dendrítica ou célula B. A função pode ser selecionada do grupo compreendendo migração para um nódulo linfático, ativação de célula T ou proliferação de célula T.

De acordo com um sétimo aspecto da presente invenção, é provido o uso de chaperonina 10 para a fabricação de um medicamento para o  
30 tratamento ou prevenção de uma doença ou condição, onde a chaperonina 10 modula o nível de expressão em superfície de célula de pelo menos uma molécula MHC.

A chaperonina 10 ainda pode modular o nível de expressão em superfície de célula de pelo menos uma outra molécula de superfície de célula.

5 A molécula de MHC pode ser uma molécula Classe I MHC, uma molécula Classe II MHC, ou uma molécula MHC não-clássica. A molécula Classe II MHC pode ser HLA. O HLA pode ser HLA-DR, HLA-DP ou HLA-DQ.

10 A expressão em superfície de célula pode ser aquela de uma célula apresentando antígeno. A célula apresentando antígeno pode ser selecionada do grupo compreendendo um macrófago, célula dendrítica ou célula B.

De acordo com um oitavo aspecto da presente invenção, é provido o uso de chaperonina 10 para a fabricação de um medicamento para o tratamento ou prevenção de uma doença ou condição, onde a chaperonina 15 10 modula a função de uma célula apresentando antígeno em um sujeito, ou em pelo menos um seu tecido ou órgão.

A célula apresentando antígeno pode ser selecionada do grupo compreendendo um macrófago, célula dendrítica ou célula B.

20 A função pode ser selecionada do grupo compreendendo migração para um nódulo linfático, ativação de célula T, ou proliferação de célula T.

De acordo com um nono aspecto da presente invenção, é provido um método para modulação de produção, localização dentro de uma célula e/ou expressão em superfície de célula de um ou mais imuno – moduladores em um sujeito, ou pelo menos uma célula da mesma, tecido ou órgão, 25 onde o dito método compreende administração de uma quantidade efetiva de chaperonina 10, e onde a chaperonina 10 modula o nível de expressão em superfície de célula de pelo menos uma molécula MHC ou pelo menos uma outra molécula de superfície de célula.

30 A molécula MHC pode ser uma molécula Classe I MHC, uma molécula Classe II MHC, ou uma molécula MHC não-clássica. A molécula Classe II MHC pode ser HLA. O HLA pode ser HLA-DR, HLA-DP, ou HLA-DQ.

A expressão em superfície de célula pode ser aquela de uma

célula apresentando antígeno. A célula apresentando antígeno pode ser selecionada do grupo compreendendo um macrófago, célula dendrítica ou célula B.

De acordo com um décimo aspecto da presente invenção, é provido um método para identificação de um composto que modula uma resposta imune, onde o dito método compreende:

- (a) contato de uma célula ou extrato de célula com um composto candidato na presença de Cpn10; e
- (b) determinação de se expressão sobre a superfície da dita célula de pelo menos uma molécula MHC é modulada com contato com o dito composto candidato.

O método ainda pode compreender:

- (c) determinação de se expressão sobre a superfície da dita célula de pelo menos uma outra molécula de superfície de célula é modulada com contato com o dito composto candidato.

A molécula MHC pode ser uma molécula Classe I MHC, uma molécula Classe II MHC, ou uma molécula MHC não-clássica. A molécula Classe II MHC pode ser HLA. O HLA pode ser HLA\_DR, HLA-DP ou HLA-DQ.

A expressão em superfície de célula pode ser aquela de uma célula apresentando antígeno. A célula apresentando antígeno pode ser selecionada do grupo compreendendo um macrófago, célula dendrítica ou célula B.

De acordo com um décimo primeiro aspecto da presente invenção, é provido um método para seleção de uma pluralidade de compostos para identificar um composto que modula uma resposta imune, onde o dito método compreende:

- (a) contato de uma célula ou extrato de célula com a dita pluralidade de compostos na presença de Cpn10; e
- (b) determinação de se expressão sobre a superfície da dita célula de pelo menos uma molécula MHC é modulada com contato com a dita pluralidade de compostos.

O método ainda pode compreender:

(c) determinação de se expressão sobre a superfície da dita célula de pelo menos uma outra molécula de superfície de célula é modulada com contato com a dita pluralidade de compostos.

5 A molécula MHC pode ser uma molécula Classe I MHC, uma molécula Classe II MHC, ou uma molécula MHC não-clássica. A molécula Classe II MHC pode ser HLA. O HLA pode ser HLA-DR, HLA-DP, ou HLA-DQ.

A expressão em superfície de célula pode ser aquela de uma célula apresentando antígeno. A célula apresentando antígeno pode ser selecionada do grupo compreendendo um macrófago, célula dendrítica ou célula B.

10

De acordo com um décimo primeiro aspecto da presente invenção, é provido um método para indução de modulação do nível de expressão em superfície de célula de pelo menos uma molécula MHC em um sujeito, ou em pelo menos uma célula da mesma, tecido ou órgão, onde o dito método compreende administração de uma quantidade efetiva de chaperonina 10.

15

O método ainda pode compreender modulação do nível de expressão em superfície de célula de pelo menos uma outra molécula de superfície de célula em um sujeito, ou em pelo menos uma célula da mesma, tecido ou órgão, compreendendo administração de uma quantidade efetiva de chaperonina 10.

20

A molécula MHC pode ser uma molécula Classe I MHC, uma molécula Classe II MHC, ou uma molécula MHC não-clássica. A molécula Classe II MHC pode ser HLA. O HLA pode ser HLA-DR, HLA-DP, ou HLA-DQ.

25 A expressão em superfície de célula pode ser aquela de uma célula apresentando antígeno. A célula apresentando antígeno pode ser selecionada do grupo compreendendo um macrófago, célula dendrítica ou célula B.

De acordo com um décimo terceiro aspecto da presente invenção, é provido um método para identificação de um composto que modula uma resposta imune, onde o dito método compreende:

30

(a) contato de uma célula ou extrato de célula com um com-

posto candidato na presença de Cpn10; e

(b) determinação de se a migração da dita célula para um nódulo linfático ou a habilidade para ativar e/ou causar proliferação de células T é modulada com contato com o dito composto candidato.

5 A célula pode ser uma célula apresentando antígeno. A célula apresentando antígeno pode ser selecionada do grupo compreendendo um macrófago, célula dendrítica ou célula B.

De acordo com um décimo quarto aspecto da presente invenção, é provido um método para seleção de uma pluralidade de compostos para identificar um composto que modula uma resposta imune, onde o dito método compreende:

(a) contato de uma célula ou extrato de célula com a dita pluralidade de compostos na presença de Cpn10; e

(b) determinação de se a migração da dita célula para um nódulo linfático ou a habilidade para ativar e/ou causar proliferação de células T é modulada com contato com a dita pluralidade de compostos.

A célula pode ser uma célula apresentando antígeno. A célula apresentando antígeno pode ser selecionada do grupo compreendendo um macrófago, célula dendrítica ou célula B.

20 De acordo com um décimo quinto aspecto da presente invenção, é provido um método para modulação de função de uma célula apresentando antígeno em um sujeito, ou em pelo menos um seu tecido ou órgão, onde o dito método compreende administração de uma quantidade efetiva de chaperonina 10.

25 A célula apresentando antígeno pode ser selecionada do grupo compreendendo um macrófago, célula dendrítica ou célula B.

A função pode ser selecionada do grupo compreendendo migração para um nódulo linfático ou ativação de célula T.

#### Definições

30 No contexto deste relatório descritivo, o termo "compreendendo" significa "incluindo principalmente, mas não necessariamente unicamente". Além disso, variações da palavra "compreendendo", tal como "compreende",

têm correspondentemente significados variados.

Como aqui usados os termos “tratamento”, “tratando” e suas variações, referem-se a quaisquer e todos os usos que remédiam um estado ou sintomas de doença, previnem o estabelecimento de doença, ou de outro modo previnem, impedem, retardam, ou revertem a progressão de doença ou outros sintomas indesejáveis de qualquer outro modo.

Como aqui usado o termo “quantidade efetiva” inclui em seu significado uma quantidade não-tóxica mas suficiente de um agente ou composto para prover o desejado efeito terapêutico ou profilático. A exata quantidade requerida variará de sujeito para sujeito dependendo de fatores tais como as espécies sendo tratadas, a idade e condição genérica do sujeito, a severidade da condição sendo tratada, o particular agente sendo administrado e o modo de administração e assim por diante. Assim, não é possível especificar uma exata “quantidade efetiva”. Entretanto, para qualquer caso dado, uma apropriada “quantidade efetiva” pode ser determinada por aqueles versados na técnica usando somente experimentação rotineira.

O termo “polipeptídeo” significa um polímero constituído de aminoácidos ligados por ligações peptídicas. Os termos “polipeptídeo” e “proteína” são usados intercambiavelmente, embora para os propósitos da presente invenção um “polipeptídeo” pode constituir uma porção de uma proteína de inteiro comprimento.

O termo “polinucleotídeo” como aqui usado refere-se a um polímero de fita simples ou dupla de desoxirribonucleotídeo, bases ribonucleotídeo ou análogos conhecidos ou nucleotídeos naturais, ou suas misturas.

Como aqui usados, os termos “modulação”, “modula” e suas variações referem-se a aumento ou diminuição de nível de atividade, produção, secreção ou funcionamento de uma molécula na presença de uma particular molécula moduladora ou agente da invenção comparado ao nível de atividade, produção, secreção ou outro seu funcionamento na ausência da molécula ou agente modulador. Estes termos não implicam quantificação do aumento ou diminuição. A modulação pode ser de qualquer magnitude suficiente para produzir o desejado resultado e pode ser direta ou indireta.

O termo “imunomodulador” como aqui usado refere-se a um mediador molecular que desempenha um papel na ativação, manutenção, maturação, inibição, supressão ou aumento de uma resposta imune.

O termo “molécula de MHC” refere-se a qualquer molécula complexada a, associada com ou formando uma parte de um principal complexo de histocompatibilidade. Uma “molécula MHC” por isso pode incluir um antígeno leucócito humano (HLA) de qualquer descrição, por exemplo, incluindo mas não limitado a HLA-DR (classe II MHC), moléculas classe I MHC, ou moléculas MHC não-clássicas tais como, por exemplo, CD1a, CD1b ou CD1c.

O termo “outra molécula de superfície de célula” refere-se a qualquer molécula expressa sobre a superfície de uma célula, e pode ou não incluir uma molécula co-estimuladora. O termo “molécula co-estimuladora” refere-se a qualquer molécula capaz de contribuir para, direta ou indiretamente, a transdução de sinalização envolvendo uma molécula MHC.

#### Breve Descrição dos Desenhos

A presente invenção será agora descrita, por meio de somente exemplo não-limitante, com referência aos desenhos acompanhantes.

Figura 1 Cpn10 reduz significativamente expressão de HLA-DR em DC

DCs humanas foram diferenciadas de monócitos na presença de GM-CSF e IL-4 por 5 dias. Conversão de monócitos em DC com LPS foi verificada por análises citométricas de fluxo de expressão em superfície de célula de CD1a e CD14. DC CD1a<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup> foram ainda analisadas para expressão em superfície de célula do marcador de maturação HLA-DR. DC derivadas de monócitos cultivadas foram usadas para avaliar a capacidade de Cpn10 modular maturação de DC induzida por LPS. A expressão de HLA-DR foi inalterada sobre DC madura incubada com Cpn10 (A). Entretanto, regulação ascendente induzida por LPS sobre expressão de HLA-DR foi significativamente reduzida por Cpn10 (A vs. B, p = 0,0408; A vs. C, p = 0,0324; A vs. D, p = 0,0161) (B). Representativo de 3 experimentos independentes.

Figura 2 Cpn10 diminui liberação de TNF- $\alpha$  constitutivo por DC

DC derivadas de monócitos cultivadas foram usadas para avaliar a capacidade de Cpn10 modular liberação de TNF- $\alpha$  constitutivo. DC foram incubadas com uma faixa de concentração de Cpn10 por 20 horas. Acumulação de TNF- $\alpha$  em sobrenadantes de cultura foi medida através de ELISA. Dados mostrados são representativos de 4 experimentos independentes.

Figura 3 Cpn10 reduz produção de IFN- $\gamma$  em uma reação de leucócito – mista primária (MLR)

DC derivadas de monócitos cultivadas foram usadas para avaliar a capacidade de Cpn10 modular ativação de célula T através de DC em uma reação leucócito - mista primária (MLR). DCs foram co-cultivadas com células T CD<sup>+</sup> por 6 dias e produção de IFN- $\gamma$  foi medida nos sobrenadantes de cultura através de ELISA. Acumulação de IFN- $\gamma$  foi significativamente reduzida por Cpn10. Dados são representativos de 2 experimentos independentes.

Figura 4 Cpn10 não afeta proliferação de célula T em uma reação de leucócito – mista primária (MLR)

DCs derivadas de monócitos cultivadas e células T CD<sup>4+</sup> alogênicas isoladas foram co-cultivadas na presença ou ausência de Cpn10 por 6 dias. Proliferação foi medida usando um kit de ensaio de proliferação de células CyQUANT de acordo com as instruções do fabricante. Representativo de 2 experimentos independentes.

#### Melhor Modo de Realização da Invenção

Usando uma proteína marcada com fluorocromo, os inventores mostraram que Cpn10 interage fortemente com células apresentando antígeno, principalmente células dendríticas. Dados de experimentos in vitro, nos quais tanto células dendríticas (DC) mielóides como plasmacitóides de PBMC foram especificamente suprimidas antes de estimulação com uma faixa de ligantes TLR, mostraram dinâmicas apreciavelmente alteradas de produção de citocina na presença de Cpn10. Além disso, os inventores demonstraram que DCs derivadas de monócitos maturadas junto com Cpn10 redistribuíram um reduzido nível de HLA-DR e outras moléculas co-

estimuladoras a partir de compartimentos intracelulares para a superfície de célula. Esta modulação descendente de expressão de molécula classe II MHC e reduzida capacidade de apresentação de antígeno podem contribuir para os efeitos antiinflamatórios totais de Cpn10.

5                   Em particular, para avaliar o efeito de Cpn10 sobre maturação de DC, os inventores usaram DC derivada de monócito que foi extensivamente caracterizada no passado (J. Exp. Med. 1994; 179:1109; Blood 2002; 99: 993; PNAS 1996; 93; 2588; Int. Immunol. 2004; 16: 767). DCs derivadas de monócitos imaturas são células CD14<sup>-</sup> HLA-DR<sup>+</sup> CD1a<sup>+</sup>. Com ativação com  
10 LPS, elas regulam ascendente HLA-DR e expressam ligantes estimuladores para células T sobre a superfície de célula. Aqui é mostrado que Cpn10 modula a extensão de maturação de DC in vitro.

Os inventores por isso mostraram que Cpn10 regula descendente expressão de HLA-DR induzida por LPS na superfície de célula.  
15 Esta reduzida expressão de HLA-DR pode ser conseqüente para reduzida produção de IFN- $\gamma$  por DC maturando (descrito em J. Immunol. 1989; 143:3781). Por outro lado, regulação descendente de HLA-DR induzida por Cpn10 pode refletir uma mudança na eficiência do caminho endocítico para transporte de moléculas classe II MHC carregadas com antígeno para a su-  
20 perfície de célula. Entretanto, dados aqui apresentados proporcionam clara evidência de que a prevenção de maturação de DC e uma reduzida capacidade de apresentação de antígeno de DC e células B são um provável modo de ação de Cpn10 no melhoramento de doença autoimune.

Da mesma maneira, a presente invenção provê métodos para  
25 modulação de uma resposta imune em um sujeito ou em pelo menos uma célula da mesma, tecido ou órgão, através de modulação de nível de expressão em superfície de célula de pelo menos uma molécula MHC, onde os ditos métodos compreendem administração de uma quantidade efetiva de chaperonina 10.

30 Os métodos ainda podem compreender modulação de uma resposta imune em um sujeito ou em pelo menos uma célula da mesma, tecido ou órgão, através de modulação de nível de expressão em superfície de cé-

lula de pelo menos um outra molécula de superfície de célula, compreendendo administração de uma quantidade efetiva de chaperonina 10.

A molécula MHC pode ser uma molécula Classe I MHC, uma molécula Classe II MHC, ou uma molécula MHC não-clássica. A molécula Classe II MHC pode ser HLA. O HLA pode ser HLA-DR, HLA-DP, ou HLA-DQ.

A expressão em superfície de célula pode ser aquela de uma célula apresentando antígeno. A célula apresentando antígeno pode ser selecionada do grupo compreendendo um macrófago, célula dendrítica ou célula B.

A chaperonina 10 pode ser uma chaperonina 10 derivada naturalmente, produzida recombinantemente ou produzida sinteticamente. A chaperonina 10 pode ser de origem eucariótica. A chaperonina 10 pode ser de origem mamífera. A chaperonina 10 pode ser chaperonina 10 humana.

A chaperonina 10 pode compreender a seqüência de polipeptídeos como mostrada em SEQ ID Nº: 1, SEQ ID Nº: 2 ou SEQ ID Nº: 3. A chaperonina 10 pode ser acetilada ou não-acetilada.

A chaperonina 10 pode ser administrada na forma de um polinucleotídeo codificando chaperonina 10. O polinucleotídeo codificando chaperonina 10 pode ser localizado em uma construção genética, ligada operavelmente a um promotor. O polinucleotídeo pode compreender a seqüência como mostrada em SEQ ID Nº: 4.

A presente invenção também provê métodos para tratamento ou prevenção de uma doença ou condição em um sujeito através de modulação de nível de expressão em superfície de célula de pelo menos uma molécula MHC, onde os ditos métodos compreendem administração ao sujeito de uma quantidade efetiva de chaperonina 10.

Os métodos ainda podem compreender tratamento ou prevenção de uma doença ou condição em um sujeito através de modulação de nível de expressão em superfície de célula de pelo menos uma outra molécula de superfície de célula, compreendendo administração de uma quantidade efetiva de chaperonina 10. A molécula MHC pode ser uma molécula Classe I MHC, uma molécula Classe II MHC, ou uma molécula MHC não-

clássica. A molécula Classe II MHC por ser HLA. O HLA pode ser HLA-DR, HLA-DP ou HLA-DQ.

5 A expressão em superfície de célula pode ser aquela de uma célula apresentando antígeno. A célula apresentando antígeno pode ser selecionada do grupo compreendendo um macrófago, célula dendrítica ou célula B.

10 A doença ou condição pode resultar de, ou de outro modo pode estar associada com, infecção do sujeito através de um patógeno viral ou bacteriano. A doença ou condição pode ser câncer, um distúrbio autoimune, inflamação, alergia, asma ou doença infecciosa.

A chaperonina 10 pode ser uma chaperonina 10 derivada naturalmente, produzida recombinantemente ou produzida sinteticamente. A chaperonina 10 pode ser de origem eucariótica. A chaperonina 10 pode ser de origem mamífera. A chaperonina 10 pode ser chaperonina 10 humana.

15 A chaperonina 10 pode compreender a seqüência de polipeptídeos como mostrada em SEQ ID Nº: 1, SEQ ID Nº: 2 ou SEQ ID Nº: 3. A chaperonina 10 pode ser acetilada ou não-acetilada.

20 A chaperonina 10 pode ser administrada na forma de um polinucleotídeo codificando chaperonina 10. O polinucleotídeo codificando chaperonina 10 pode ser localizado em uma construção genética, ligada operavelmente a um promotor. O polinucleotídeo pode compreender a seqüência como mostrada em SEQ ID Nº: 4.

25 A presente invenção adicionalmente provê métodos para modulação de nível de expressão em superfície de célula de pelo menos uma molécula MHC em um sujeito, ou em pelo menos uma célula da mesma, tecido ou órgão, onde os ditos métodos compreendem administração de uma quantidade efetiva de chaperonina 10.

30 Os métodos ainda podem compreender modulação de nível de expressão em superfície de célula de pelo menos uma outra molécula de superfície de célula em um sujeito, ou em pelo menos uma célula da mesma, tecido ou órgão, compreendendo administração de uma quantidade efetiva de chaperonina 10.

A molécula MHC pode ser uma molécula Classe I MHC, uma molécula Classe II MHC, ou uma molécula MHC não-clássica. A molécula Classe II MHC pode ser HLA. O HLA pode ser HLA-DR, HLA-DP ou HLA-DQ.

5 A expressão em superfície de célula pode ser aquela de uma célula apresentando antígeno. A célula apresentando antígeno pode ser selecionada do grupo compreendendo um macrófago, célula dendrítica ou célula B.

10 A presente invenção ainda provê métodos para modulação de função de uma célula apresentando antígeno em um sujeito, ou em pelo menos um seu tecido ou órgão, onde os ditos métodos compreendem administração de uma quantidade efetiva de chaperonina 10.

A célula apresentando antígeno pode ser selecionada do grupo compreendendo um macrófago, célula dendrítica ou célula B.

15 A função pode ser selecionada do grupo compreendendo migração para um nódulo linfático, ativação de célula T ou proliferação de célula T.

20 A presente invenção além disso provê composições quando usadas para o tratamento ou prevenção de uma doença ou condição, onde as ditas composições compreendem chaperonina 10 junto com pelo menos um carreador, diluente ou adjuvante farmacologicamente aceitável, e onde a chaperonina 10 modula o nível de expressão em superfície de célula de pelo menos uma molécula MHC.

25 A chaperonina 10 pode ainda modular o nível de expressão em superfície de célula de pelo menos uma outra molécula de superfície de célula.

A molécula MHC pode ser uma molécula Classe I MHC, uma molécula Classe II MHC, ou uma molécula MHC não-clássica. A molécula Classe II MHC pode ser HLA. O HLA pode ser HLA-DR, HLA-DP ou HLA-DQ.

30 A expressão em superfície de célula pode ser aquela de uma célula apresentando antígeno. A célula apresentando antígeno pode ser selecionada do grupo compreendendo um macrófago, célula dendrítica ou célula B.

A presente invenção também provê composições quando usadas para o tratamento ou prevenção de uma doença ou condição, onde as ditas composições compreendem chaperonina 10 junto com pelo menos um carreador, diluente ou adjuvante farmacêuticamente aceitável, e onde a chaperonina 10 modula a função de uma célula apresentando antígeno em um  
5 sujeito, ou em pelo menos um seu tecido ou órgão.

A célula apresentando antígeno pode ser selecionada do grupo compreendendo um macrófago, célula dendrítica ou célula B.

A função pode ser selecionada do grupo compreendendo migração para um nódulo linfático, ativação de célula T ou proliferação de célula  
10 T.

A presente invenção adicionalmente provê o uso de chaperonina 10 para a fabricação de um medicamento para o tratamento ou prevenção de uma doença ou condição, onde a chaperonina 10 modula o nível de expressão em superfície de célula de pelo menos uma molécula MHC.  
15

A chaperonina 10 ainda pode modular o nível de expressão em superfície de célula de pelo menos uma outra molécula de superfície de célula.

A molécula MHC pode ser uma molécula Classe I MHC, uma molécula Classe II MHC, ou uma molécula MHC não-clássica. A molécula Classe II MHC pode ser HLA. O HLA pode ser HLA-DR, HLA-DP ou HLA-DQ.  
20

A expressão em superfície de célula pode ser aquela de uma célula apresentando antígeno. A célula apresentando antígeno pode ser selecionada do grupo compreendendo um macrófago, célula dendrítica ou célula B.  
25

A presente invenção ainda provê o uso de chaperonina 10 para a fabricação de um medicamento para o tratamento ou prevenção de uma doença ou condição, onde a chaperonina 10 modula a função de uma célula apresentando antígeno em um sujeito, ou em pelo menos um seu tecido ou  
30 órgão.

A célula apresentando antígeno pode ser selecionada do grupo compreendendo um macrófago, célula dendrítica ou célula B.

A função pode ser selecionada do grupo compreendendo migração para um nódulo linfático, ativação de célula T ou proliferação de célula T.

5 A presente invenção além disso provê métodos para modulação de produção, localização dentro de uma célula e/ou expressão em superfície de célula de um ou mais imunomoduladores em um sujeito, ou pelo menos uma célula da mesma, tecido ou órgão, onde os ditos métodos compreendem administração de uma quantidade efetiva de chaperonina 10, e onde a chaperonina 10 modula o nível de expressão em superfície de célula de pelo  
10 menos uma molécula MHC ou pelo menos uma outra molécula de superfície de célula.

A molécula MHC pode ser uma molécula Classe I MHC, uma molécula Classe II MHC, ou uma molécula MHC não-clássica. A molécula Classe II MHC pode ser HLA. O HLA pode ser HLA-DR, HLA-DP ou HLA-DQ.

15 A expressão em superfície de célula pode ser aquela de uma célula apresentando antígeno. A célula apresentando antígeno pode ser selecionada do grupo compreendendo um macrófago, célula dendrítica ou célula B.

A presente invenção também provê métodos para identificação  
20 de um composto que modula uma resposta imune, onde os ditos métodos compreendem:

(a) contato de uma célula ou extrato de célula com um composto candidato na presença de Cpn10; e

(b) determinação de se expressão sobre a superfície da dita  
25 célula de pelo menos uma molécula MHC é modulada com contato com o dito composto candidato.

Os métodos ainda podem compreender:

(c) determinação de se expressão sobre a superfície da dita  
30 célula de pelo menos uma outra molécula de superfície de célula é modulada com contato com o dito composto candidato.

A molécula MHC pode ser uma molécula Classe I MHC, uma molécula Classe II MHC, ou uma molécula MHC não-clássica. A molécula

Classe II MHC pode ser HLA. O HLA pode ser HLA-DR, HLA-DP ou HLA-DQ.

5 A expressão em superfície de célula pode ser aquela de uma célula apresentando antígeno. A célula apresentando antígeno pode ser selecionada do grupo compreendendo um macrófago, célula dendrítica ou célula B.

A presente invenção adicionalmente provê métodos para seleção de uma pluralidade de compostos para identificar um composto que modula uma resposta imune, onde os ditos métodos compreendem:

10 (a) contato de uma célula ou extrato de célula com a dita pluralidade de compostos na presença de Cpn10; e

(b) determinação de se expressão sobre a superfície da dita célula de pelo menos uma molécula MHC é modulada com contato com a dita pluralidade de compostos.

15 Os métodos ainda podem compreender:

(c) determinação de se expressão sobre a superfície da dita célula de pelo menos uma outra molécula de superfície de célula é modulada com contato com a dita pluralidade de compostos.

20 A molécula MHC pode ser uma molécula Classe I MHC, uma molécula Classe II MHC, ou uma molécula MHC não-clássica. A molécula Classe II MHC pode ser HLA. O HLA pode ser HLA-DR, HLA-DP ou HLA-DQ.

25 A expressão em superfície de célula pode ser aquela de uma célula apresentando antígeno. A célula apresentando antígeno pode ser selecionada do grupo compreendendo um macrófago, uma célula dendrítica ou célula B.

30 A presente invenção ainda provê métodos para indução de modulação do nível de expressão em superfície de célula de pelo menos uma molécula MHC em um sujeito, ou em pelo menos uma célula da mesma, tecido ou órgão, onde os ditos métodos compreendem administração de uma quantidade efetiva de chaperonina 10.

Os métodos ainda podem compreender modulação do nível de

expressão em superfície de célula de pelo menos uma outra molécula de superfície de célula em um sujeito, ou em pelo menos uma célula da mesma, tecido ou órgão, compreendendo administração de uma quantidade efetiva de chaperonina 10.

5 A molécula MHC pode ser uma molécula Classe I MHC, uma molécula Classe II MHC, ou uma molécula MHC não-clássica. A molécula Classe II MHC pode ser HLA. O HLA pode ser HLA-DR, HLA-DP ou HLA-DQ.

10 A expressão em superfície de célula pode ser aquela de uma célula apresentando antígeno. A célula apresentando antígeno pode ser selecionada do grupo compreendendo um macrófago, uma célula dendrítica ou célula B.

15 A presente invenção além disso provê métodos para identificação de um composto que modula uma resposta imune, onde os ditos métodos compreendem:

(a) contato de uma célula ou extrato de célula com um composto candidato na presença de Cpn10; e

20 (b) determinação de se a migração da dita célula para um nódulo linfático ou a habilidade para ativar e/ou causar proliferação de células T é modulada com contato com o dito composto candidato.

A célula pode ser uma célula apresentando antígeno. A célula apresentando antígeno pode ser selecionada do grupo compreendendo um macrófago, célula dendrítica ou célula B.

25 A presente invenção também provê métodos para seleção de uma pluralidade de compostos para identificação de um composto que modula uma resposta imune, onde os ditos métodos compreendem:

(a) contato de uma célula ou extrato de célula com a dita pluralidade de compostos na presença de Cpn10; e

30 (b) determinação de se a migração da dita célula para um nódulo linfático ou a habilidade para ativar e/ou causar proliferação de células T é modulada com contato com a dita pluralidade de compostos.

A célula pode ser uma célula apresentando antígeno. A célula

apresentando antígeno pode ser selecionada do grupo compreendendo um macrófago, célula dendrítica ou célula B.

5 A presente invenção adicionalmente provê métodos para modulação de função de uma célula apresentando antígeno em um sujeito, ou em pelo menos um seu tecido ou órgão, onde os ditos métodos compreendem administração de uma quantidade efetiva de chaperonina 10.

A célula apresentando antígeno pode ser selecionada do grupo compreendendo um macrófago, célula dendrítica ou célula B.

10 A função pode ser selecionada do grupo compreendendo migração para um nódulo linfático, ativação de célula T ou proliferação de célula T.

Aqueles versados na técnica apreciarão que de acordo com os métodos da presente invenção Cpn10 pode ser administrada sozinha ou em conjugação com um ou mais agentes adicionais. Por exemplo, Cpn10 pode ser administrada junto com um ou mais agonistas de TLR capazes de estimular um ou mais de TLR3, TLR4, TLR7 e TLR9. Adicionalmente, a presente invenção contempla terapia de combinação usando Cpn10 em conjugação com outras abordagens terapêuticas para o tratamento de doenças e distúrbios. Por exemplo, Cpn10 pode ser útil no tratamento de doenças virais que são responsivas a terapia com interferons Tipo I tais como IFN $\beta$  ou IFN $\alpha$ . Ainda, na medida em que ativação de TLR7 e TLR9 induzida por agonista tenha sido previamente reportada para aperfeiçoar a resposta de tumores para terapia de radiação, Cpn10 pode ser usada em conjugação com terapia de radiação para o tratamento de câncer.

25 Para tais terapias de combinação, cada componente da terapia de combinação pode ser administrado ao mesmo tempo, ou seqüencialmente em qualquer ordem, ou em momentos diferentes, de modo a prover o desejado efeito. Alternativamente, os componentes podem ser formulados juntos em uma unidade de dose simples como um produto combinação. Quando administrados separadamente, pode ser preferido que os componentes sejam administrados através da mesma rota de administração, embora não seja necessário que seja assim.

30

## Cpn10

De acordo com aspectos e realizações da presente invenção, um sujeito em necessidade de tratamento é administrado com uma quantidade efetiva de Cpn10. Em particulares realizações o sujeito a ser tratado é um ser humano, e da mesma maneira, o polipeptídeo Cpn10 é o polipeptídeo Cpn10 humano. Aqueles versados na técnica apreciarão que a precisa identidade do Cpn10 usado de acordo com a presente invenção pode variar dependendo de um número de fatores, por exemplo, as espécies a serem tratadas, de modo que a Cpn10 pode ser selecionada de modo a ser derivada das espécies a serem tratadas.

Cpn10 pode ser Cpn10 nativa, derivada naturalmente, recombinante ou sintética. Métodos descritos em Morton et al., 2000 (Immunol Cell Biol 78:603-607), Ryan et al., 1995 (J Biol Chem 270:22037-22043) e Johnson et al., 2005 (J Biol Chem 280:4037-4047) são exemplos de métodos de produção apropriados para proteína Cpn10 recombinante e sintética enquanto métodos descritos em Somodevilla – Torres et al., 2003 (Protein Expression and Purification 32:276-287), Ryan et al., 1995 (J Biol Chem 270:22037-22043) e Zhang et al., 2000 (J Neurol Sci 182:5-15) são exemplos de apropriados métodos de produção para proteína Cpn10 nativa e derivada naturalmente embora aqueles versados endereçados apreciarão que a presente invenção não é limitada pelo método de purificação ou produção usado e qualquer outro método pode ser usado para produzir Cpn10 para uso de acordo com os métodos e composições da presente invenção.

Polipeptídeos Cpn10 e fragmentos de polipeptídeos para uso de acordo com a presente invenção podem ser obtidos usando técnicas padrões de ácido nucléico recombinante ou podem ser sintetizados, por exemplo, usando convencionais técnicas de síntese de fase líquida ou sólida. Peptídeos Cpn10 podem ser produzidos através de digestão de um polipeptídeo com uma ou mais proteinases como endoLys-C, endoArg-C, endoGlu-C e staphylococcus V8-protease. Os fragmentos de peptídeo digeridos podem ser purificados através de, por exemplo, técnicas cromatográficas líquidas de alta performance (HPLC).

Modalidades da invenção também contemplam a administração de um polinucleotídeo codificando Cpn10. Em tais situações o polinucleotídeo é tipicamente operavelmente ligado a um promotor de modo que a apropriada seqüência de polipeptídeo é produzida seguindo administração do polinucleotídeo ao sujeito. O polinucleotídeo pode ser administrado a sujeitos em um vetor. O vetor pode ser um vetor plasmídeo, um vetor viral, ou qualquer outro veículo apropriado adaptado para a inserção de seqüências estranhas, sua introdução em células eucarióticas e a expressão das seqüências introduzidas. Tipicamente o vetor é um vetor de expressão eucariótico e pode incluir seqüências de controle de expressão e processamento como um promotor, um aperfeiçoador, sítios de ligação de ribossoma, sinais de poliadenilação e seqüências de término de transcrição. A construção de ácido nucléico a ser administrada pode compreender ADN nu ou pode estar na forma de uma composição, junto com um ou mais carreadores farmacologicamente aceitáveis.

O polipeptídeo Cpn10 pode ter a seqüência de aminoácidos como mostrado em SEQ ID Nº: 1. A seqüência de nucleotídeos do polinucleotídeo codificando Cpn10 pode ser como mostrado em SEQ ID Nº: 4 ou mostrar suficiente identidade de seqüência à mesma para hibridizar para a seqüência de SEQ ID Nº: 4. Em realizações alternativas, a seqüência de nucleotídeos do polinucleotídeo pode compartilhar pelo menos 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade com a seqüência mostrada em SEQ ID Nº: 4.

Dentro do escopo dos termos "polipeptídeo" e "polinucleotídeo" como aqui usados estão seus fragmentos e variantes. Somente por exemplo, fragmentos de peptídeos de Cpn10 como descrito em WO 95/15338 (isto é, "Chaperonin 10" PCT application Nº PCT/AU94/00740) podem ser usados de acordo com aspectos e realizações da presente invenção.

O termo "fragmento" refere-se a um ácido nucléico ou seqüência de polipeptídeo que codifica um constituinte ou é um constituinte de proteína Cpn10 de inteiro comprimento. Em termos do polipeptídeo o fragmento possui atividade biológica qualitativa em comum com a proteína de inteiro com-

primento. Um fragmento biologicamente ativo de Cpn10 usado de acordo com a presente invenção tipicamente pode possuir pelo menos cerca de 50% da atividade imunomoduladora da correspondente proteína de inteiro comprimento, mais tipicamente pelo menos cerca de 60% de tal atividade, mais tipicamente pelo menos cerca de 70% de tal atividade, mais tipicamente pelo menos cerca de 80% tal atividade, mais tipicamente pelo menos cerca de 90% de tal atividade, e mais tipicamente pelo menos cerca de 95% de tal atividade.

O termo "variante" como aqui usado refere-se a moléculas substancialmente similares. Genericamente, variantes de seqüência de ácido nucleico codificam polipeptídeos que possuem atividade biológica qualitativa em comum. Genericamente, variantes de seqüência de polipeptídeo também possuem atividade biológica qualitativa em comum. Ainda, estas variantes de seqüência de polipeptídeo podem compartilhar pelo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade de seqüência.

Ainda, um polipeptídeo variante pode incluir análogos, onde o termo "análogo" significa um polipeptídeo que é um derivado de uma Cpn10, cujo derivado compreende adição, supressão, substituição de um ou mais aminoácidos, de modo que o polipeptídeo retenha substancialmente a mesma função como Cpn10 nativa. É bem-conhecido na técnica que alguns aminoácidos podem ser trocados dentro de um polipeptídeo sem alteração de atividade do polipeptídeo (substituições conservativas). O termo "substituição conservativa de aminoácido" refere-se a uma substituição de um aminoácido por outro aminoácido com similares propriedades dentro de uma cadeia de polipeptídeo (seqüência primária de uma proteína). Por exemplo, a substituição do aminoácido carregado ácido glutâmico (Glu) por aminoácido similarmente carregado ácido aspártico (Asp) pode ser uma substituição conservativa de aminoácido. Adições de aminoácidos podem resultar da fusão de um polipeptídeo Cpn10 ou seu fragmento com um segundo polipeptídeo ou peptídeo, tal como um marcador polihistidina, fusão de proteína de ligação de maltose, fusão de glutathione S transferase, fusão de proteína fluo-

rescente verde, ou a adição de um marcador epítopo tal como FLAG ou c-myc. Por exemplo, o polipeptídeo Cpn10 humano tipo selvagem pode compreender uma adicional metade tripeptídeo GSM no terminus-N (SEQ ID N°: 2; vide por exemplo, WO 95/15338, a descrição da qual é aqui incorporada por referência) ou um adicional resíduo alanina (A) no terminus-N (SEQ ID N°: 3; WO 2004/041300 (isto é, "Chaperonin 10 immunosuppression" PCT application N° PCT/AU2003/001467)), a descrição do qual é aqui incorporada por referência) ou um adicional resíduo glicina (G) no terminus-N (SEQ ID N°: 5; PCT/AU2006/001278 ("Modified Chaperonin 10" PCT application)), a descrição do qual é aqui incorporada por referência. A presente invenção também contempla o uso de polinucleotídeos codificando tais formas modificadas de Cpn10.

Variantes de Cpn10 podem ser geradas através de mutagênese de uma proteína Cpn10 ou mutagênese de um ácido nucléico codificante, tal como através de mutagênese randômica ou mutagênese direcionada de sítio usando métodos bem-conhecidos por aqueles versados na técnica. Tais métodos podem ser encontrados, por exemplo, em Current Protocols In Molecular Biology (Chapter 9), Ausubel et al., 1994, John Wiley & Sons, Inc., Nova Iorque, a descrição da qual é aqui incorporada por referência. Variantes e análogos também abrangem polipeptídeos complexados com outras meta-

des químicas, proteínas de fusão ou de outro modo modificadas pós-transicionalmente. Exemplos de apropriadas modificações são descritos no pedido de patente co-pendente N° PCT/AU2005/000041, a descrição da qual é aqui incorporada por referência.

Ainda, o polipeptídeo Cpn10 ou seu fragmento pode possuir outras modificações pós-traducionais, incluindo modificações de cadeia lateral como, por exemplo, acetilação, amidinação, carbamoilação, alquilação redutora e outras modificações como são conhecidas por aqueles versados na técnica.

### 30 Composições e Rotas de Administração

Em geral, composições apropriadas para uso de acordo com os métodos da presente invenção podem ser preparadas de acordo com méto-

dos e procedimentos que são conhecidos por aqueles versados na técnica e da mesma maneira podem incluir um carreador, diluente e/ou adjuvante farmacologicamente aceitável.

5 Composições podem ser administradas através de rotas padrões. Em geral, as composições podem ser administradas através da rota parenteral (por exemplo, intravenosa, intraespinhal, subcutânea ou intramuscular), oral ou tópica. Administração pode ser sistêmica, regional ou local. A particular rota de administração a ser usada em qualquer dada circunstância dependerá de um número de fatores, incluindo a natureza da  
10 condição a ser tratada, a severidade e extensão da condição, a dosagem requerida do particular composto a ser liberado e os potenciais efeitos colaterais do composto.

Em geral, composições apropriadas podem ser preparadas de acordo com métodos que são conhecidos por aqueles versados na técnica e  
15 podem incluir um diluente, adjuvante e/ou excipiente farmacologicamente aceitável. Os diluentes, adjuvantes e excipientes têm de ser "aceitáveis" em termos de serem compatíveis com os outros ingredientes da composição, e não prejudiciais para seu receptor.

Exemplos de carreadores ou diluentes farmacologicamente aceitáveis são água desmineralizada ou destilada; solução salina; óleos de base  
20 vegetal como óleo de amendoim, óleo de açafrão, óleo de oliva, óleo de semente de algodão, óleo de milho, óleos de sésamo como óleo de amendoim, óleo de açafrão, óleo de oliva, óleo de semente de algodão, óleo de milho, óleo de sésamo, óleo arachis ou óleo de coco; óleos de silicone, incluindo  
25 polissiloxanos, como metil polissiloxano, fenil polissiloxano, e metil fenil polissiloxano; silicones voláteis; óleos minerais como parafina líquida, parafina mole ou esqualano; derivados de celulose como metil celulose, etil celulose, carbóxi metil celulose, sódio carbóxi metil celulose ou hidróxi propil metil celulose; alcanóis inferiores, por exemplo, etanol ou isopropanol; aralcanóis  
30 inferiores; polialquilenos glicólicos inferiores ou alquilenos glicólicos inferiores, por exemplo, polietileno glicol, polipropileno glicol, etileno glicol, propileno glicol, 1,3-butileno glicol ou glicerina; ésteres de ácido graxo como palmitato de

isopropila, miristato de isopropila ou oleato de etila; polivinil pirridona; ágar; carrageenan; goma tragacanto ou goma acácia, e geléia de petróleo. Tipicamente, o carreador ou carreadores formarão de 10% a 99,9% em peso das composições.

5                   As composições da invenção podem estar em uma forma apropriada para administração através de injeção, na forma de uma formulação apropriada para ingestão oral (como cápsulas, comprimidos, caplets, elixires, por exemplo), na forma de uma pomada, creme ou loção apropriada para administração tópica, em uma forma apropriada para liberação como uma  
10 gota ocular, em uma forma de aerossol apropriada para administração através de inalação, tal como inalação intranasal ou inalação oral, em uma forma apropriada para administração parenteral, ou seja, injeção subcutânea, intramuscular ou intravenosa.

                  Para administração como uma solução ou suspensão injetável,  
15 diluentes ou carreadores parenteralmente aceitáveis não-tóxicos podem incluir, solução de Ringer, solução salina isotônica, solução salina tamponada com fosfato, etanol e 1,2-propileno glicol. Alguns exemplos de apropriados carreadores, diluentes, excipientes e adjuvantes para uso oral incluem óleo de amendoim, parafina líquida, sódio carbóxi metil celulose, metil celulose,  
20 alginato de sódio, goma acácia, goma tragacanto, dextrose, sacarose, sorbitol, manitol, gelatina e lecitina. Em adição estas formulações orais podem conter apropriados aromatizantes e agentes corantes. Quando usada em forma de cápsula, as cápsulas podem ser revestidas com compostos tais como monoestearato de glicerila ou diestearato de glicerila que retarda de-  
25 sintegração.

Adjuvantes tipicamente incluem emolientes, emulsificantes, agentes espessantes, conservantes, bactericidas e agentes tamponantes.

                  Formas sólidas para administração oral podem conter ligantes aceitáveis em prática farmacêutica humana e veterinária, adoçantes, agentes desintegrantes, diluentes, aromatizantes, agentes de revestimento, conservantes, lubrificantes e/ou agentes de retardo de tempo. Apropriados ligantes incluem goma acácia, gelatina, amido de milho, goma tragacanto, algin-

30

to de sódio, carbóxi metil celulose, ou polietileno glicol. Apropriados adoçantes incluem sacarose, lactose, glucose, aspartame ou sacarina. Apropriados agnetes desintegrantes incluem amido de milho, metil celulose, polivinil pirrolidona, goma guar, goma xantana, bentonita, ácido algínico ou ágar. Apropriados diluentes incluem lactose, sorbitol, manitol, dextrose, caolin, celulose, carbonato de cálcio, silicato de cálcio ou fosfato de dicálcio. Apropriados agentes aromatizantes incluem óleo de hortelã, óleo de gaultéria, aroma de cereja, laranja ou framboesa.

Apropriados agentes de revestimento incluem polímeros ou copolímeros de ácido acrílico e/ou ácido metacrílico e/ou seus ésteres, ceras, álcoois graxos, zeína, shellac ou glúten. Apropriados conservantes incluem benzoato de sódio, vitamina E, alfa tocoferol, ácido ascórbico, metil parabeno, propil parabeno ou bissulfito de sódio. Apropriados lubrificantes incluem estearato de magnésio, ácido esteárico, oleato de sódio, cloreto de sódio ou talco. Apropriados agentes de retardo de tempo incluem monoestearato de glicerila, ou diestearato de glicerila.

Formas líquidas para administração oral podem conter, em adição aos agentes acima, um carreador líquido. Apropriados carreadores líquidos incluem água, óleos tais como óleo de oliva, óleo de amendoim, óleo de sésamo, óleo de girassol, óleo arachis, óleo de coco, parafina líquida, etileno glicol, propileno glicol, polietileno glicol, etanol, propanol, isopropanol, glicerol, álcoois graxos, triglicerídeos, ou suas misturas.

Suspensões para administração oral ainda pode compreender agentes dispersantes e/ou agentes de suspensão. Apropriados agentes de suspensão incluem sódio carbóxi metil celulose, metil celulose, hidróxi propil metil celulose, polivinil pirrolidona, alginato de sódio ou álcool acetílico. Apropriados agentes dispersantes incluem lecitina, polioxietileno ésteres de ácidos graxos como ácido esteárico, mono- ou dioleato, estearato ou laurato de polioxietileno sorbitol, mono- ou dioleato, estearato ou laurato de polioxietileno sorbitano e similares.

As emulsões para administração oral ainda podem compreender um ou mais agentes emulsificantes. Apropriados agentes emulsificantes in-

cluem agentes dispersantes como exemplificado acima ou gomas naturais como goma guar, goma acácia ou goma tragacanto.

Métodos para preparação de composições administráveis parenteralmente são visíveis para aqueles versados na técnica, e são descritos em mais detalhes em, por exemplo, Remington's Pharmaceutical Science, 5 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., aqui incorporado por referência.

As formulações tópicas da presente invenção compreendem um ingrediente ativo junto com um ou mais carreadores aceitáveis, e opcionalmente outros ingredientes terapêuticos. Formulações apropriadas para administração 10 tópica incluem preparações líquidas ou semilíquidas apropriadas para penetração através de pele para o sítio onde o tratamento é requerido, tais como linimentos, loções, cremes, pomadas ou pastas, e gotas apropriadas para administração ao olho, ouvido ou nariz.

15 Gotas de acordo com a presente invenção podem compreender soluções ou suspensões aquosas ou oleosas. Estas podem ser preparadas através de dissolução de ingrediente ativo em uma solução aquosa de um agente bactericida e/ou fungicida e/ou qualquer outro apropriado conservante, e opcionalmente incluindo um agente tensoativo. A resultante solução 20 então pode ser clareada por filtração, transferida para um apropriado recipiente e esterilizada. Esterilização pode ser obtida através de: autoclavagem ou manutenção a 90-100°C por meia hora, ou através de filtração, seguida por transferência para um recipiente através de uma técnica asséptica. Exemplos de agentes bactericidas e fungicidas apropriados para inclusão 25 nas gotas são nitrato ou acetato de fenil mercúrico (0,002%), cloreto de benzalcônio (0,01%) e acetato de clorhexidina (0,01%). Apropriados solventes para a preparação de uma solução oleosa incluem glicerol, álcool diluído e propileno glicol.

Loções de acordo com a presente invenção incluem aquelas apropriadas para aplicação à pele ou olho. Uma loção ocular pode compreender uma solução aquosa estéril opcionalmente contendo um bactericida e 30 pode ser preparada através de métodos similares àqueles descritos acima

em relação à preparação de gotas. Loções ou linimentos para aplicação à pele também podem incluir um agente para acelerar secagem e para resfriar a pele, tal como um álcool ou acetona, e/ou um umectante tal como glicerol, ou óleo como óleo de mamona ou óleo arachis.

5                   Cremes, pomadas ou pastas de acordo com a presente invenção são formulações semi-sólidas do ingrediente ativo para aplicação externa. Elas podem ser fabricadas através de mistura de ingrediente ativo em forma pulverizada ou finamente dividida, sozinho ou em solução ou suspensão em um fluido aquoso ou não-aquoso, com uma base graxa ou não-graxa. A base pode compreender hidrocarbonetos tais como parafina dura,  
10 / mole ou líquida, glicerol, cera de abelha, um sabão metálico; uma mucilagem; um óleo de origem natural como óleo de amêndoa, milho, arachis, mamona ou oliva; gordura de lã ou seus derivados, ou um ácido graxo tal como ácido esteárico ou oléico junto com um álcool tal como propileno glicol  
15 ou macrogols.

A composição pode incorporar qualquer tensoativo apropriado tal como um tensoativo aniônico, catiônico ou não-iônico tal como sorbitano ésteres ou seus derivados polioxietileno. Agentes de suspensão tais como gomas naturais, derivados de celulose ou materiais inorgânicos como sílicas  
20 silicosas, e outros ingredientes como lanolina, também podem ser incluídos.

As composições também podem ser administradas na forma de lipossomas. Lipossomas são genericamente derivadas de fosfolipídeos ou outras substâncias lipídeos, e são formadas por cristais líquidos hidratados mono- ou multilamelares que são dispersos em um meio aquoso. Qualquer  
25 lipídeo metabolizável e fisiologicamente aceitável, não-tóxico, capaz de formar lipossomas pode ser usado. As composições em forma de lipossoma podem conter estabilizantes, conservantes, excipientes e similares. Os lipídeos preferidos são os fosfolipídeos e as fosfatidil colinas (lecitinas), ambas naturais e sintéticas. Métodos para formação de lipossomas são conhecidos  
30 na técnica, e em relação a isto é feita específica referência a: Prescott, Ed., Methods in Cell Biology, Volume XIV, Academic Press, New York, N.Y. (1976), p. 33 et seq., o conteúdo do qual é aqui incorporado por referência.

As composições podem ser conjugadas a um arranjo de derivados de polietileno glicol (PEG). A adição de PEG a proteínas (PEGilação) é um método bem estabelecido para diminuição de taxas de depuração de proteínas em plasma, pelo que aumentando sua eficiência (Nucci et al., 1991, Adv. Drug Del. Vide. 6:133). Adicionais efeitos benéficos de PEGilação podem incluir maior estabilidade de proteínas, diminuída imunogenicidade, aperfeiçoada solubilidade e diminuída susceptibilidade a proteólise (Sheffield W. 2001, Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord. 1:1-22). Moléculas de PEG contêm a estrutura de repetição básica de  $-(OCH_2CH_2)_n-OH$  e são classificadas em grupos de acordo com seu peso molecular. Derivados de PEG são conjugados a proteínas para aumentar seu raio hidrodinâmico e em geral, seu aumento em meia-vida está diretamente relacionado ao tamanho da cadeia PEG ligada (Sheffield W. 2001, Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord. 1:1-22).

As composições também podem ser administradas na forma de micropartículas. Micropartículas biodegradáveis formadas de polilactídeo (PLA), polilactídeo-co-glicolídeo (PLGA), e epsilon-caprolactona (-caprolactona) têm sido extensivamente usadas como carreadores de fármacos para aumento de meia-vida em plasma e pelo que prolongando eficácia (R. Kumar, M., 2000, J Pharm Pharmaceut Sci. 3(2) 234-258). Micropartículas foram formuladas para a liberação de uma faixa de candidatos fármacos incluindo vacinas, antibióticos, e ADN. Além disso, estas formulações foram desenvolvidas para várias rotas de liberação incluindo injeção subcutânea parenteral, injeção intravenosa e inalação.

As composições podem incorporar uma matriz de liberação controlada que é composta por acetato isobutirato de sacarose (SAIB) e solvente orgânico ou mistura de solventes orgânicos. Aditivos polímeros podem ser adicionados ao veículo como um modificador de liberação para ainda aumentar a viscosidade e diminuir a taxa de liberação. SAIB um aditivo de alimento bem-conhecido. Ele é um derivado de sacarose inteiramente esterificada, muito hidrofóbico, em uma razão nominal de seis grupos isobutirato para dois acetato. Como um éster misto, SAIB não cristaliza mas existe co-

mo um líquido viscoso claro. Mistura de SAIB com um solvente orgânico farmacologicamente aceitável como etanol ou álcool benzílico diminui a viscosidade da mistura suficientemente para permitir injeção. Um ingrediente farmacêutico ativo pode ser adicionado ao veículo de liberação SAIB para  
5 formar uma solução de SAIB ou formulações em suspensão. Quando a formulação é injetada subcutaneamente, o solvente difunde a partir da matriz permitindo o fármaco SAIB ou misturas de polímero de SAIB-fármaco estabelecerem-se como um depósito formando in situ.

Para os propósitos da presente invenção moléculas e agentes  
10 podem ser administrados a sujeitos como composições tanto terapêuticamente como preventivamente. Em uma aplicação terapêutica, composições são administradas a um paciente já sofrendo de uma doença, em uma quantidade suficiente para curar ou pelo menos impedir parcialmente a doença e suas complicações.

15 A composição deve prover uma quantidade da molécula ou agente suficiente para tratar efetivamente o paciente.

O nível de dose terapêuticamente efetiva para qualquer paciente particular dependerá de uma variedade de fatores incluindo: o distúrbio sendo tratado e a severidade do distúrbio; atividade da molécula ou agente empregado; a composição empregada; a idade, peso de corpo, saúde geral,  
20 sexo e dieta do paciente; o tempo de administração; a rota de administração; a taxa de seqüestro da molécula ou agente; a duração do tratamento; fármacos usados em combinação ou coincidentes com o tratamento, junto com outros fatores relacionados bem-conhecidos em medicina.

25 Aqueles versados na técnica podem ser capazes, através de experimentação rotineira, de determinar uma quantidade não-tóxica, efetiva, de agente ou composto que pode ser requerida para tratar doenças aplicáveis.

Genericamente, uma dosagem efetiva é esperada estar na faixa  
30 de cerca de 0,0001 mg a cerca de 1000 mg por kg de peso de corpo por 24 horas; tipicamente, cerca de 0,001 mg a cerca de 750 mg por kg de peso de corpo por 24 horas; cerca de 0,01 mg a cerca de 500 mg por kg de peso de

corpo por 24 horas; cerca de 0,1 mg a cerca de 500 mg por kg de peso de corpo por 24 horas; cerca de 0,1 mg a cerca de 250 mg por kg de peso de corpo por 24 horas; cerca de 1,0 mg a cerca de 250 mg por kg de peso de corpo por 24 horas. Mais tipicamente, uma faixa de dose efetiva é esperada  
5 estar na faixa de cerca de 1,0 mg a cerca de 200 mg por kg de peso de corpo por 24 horas; cerca de 1,0 mg a cerca de 100 mg por kg de peso de corpo por 24 horas; cerca de 1,0 mg a cerca de 50 mg por kg de peso de corpo por 24 horas; cerca de 1,0 mg a cerca de 25 mg por kg de peso de corpo por 24 horas; cerca de 5,0 mg a cerca de 50 mg por kg de peso de  
10 corpo por 24 horas; cerca de 5,0 mg a cerca de 20 mg por kg de peso de corpo por 24 horas; cerca de 5,0 mg a cerca de 15 mg por kg de peso de corpo por 24 horas.

Alternativamente, uma dosagem efetiva pode ser até cerca de 500 mg/m<sup>2</sup>. Genericamente, uma dosagem efetiva é esperada estar na faixa  
15 de cerca de 25 a cerca de 500 mg/m<sup>2</sup>, preferivelmente cerca de 25 a cerca de 350 mg/m<sup>2</sup>, mais preferivelmente cerca de 25 a cerca de 300 mg/m<sup>2</sup>, ainda mais preferivelmente cerca de 25 a cerca de 250 mg/m<sup>2</sup>, mesmo mais preferivelmente cerca de 50 a cerca de 250 mg/m<sup>2</sup>, e ainda mesmo mais preferivelmente cerca de 75 a cerca de 150 mg/m<sup>2</sup>.

20 Tipicamente, em aplicações terapêuticas, o tratamento pode ser pela duração do estado de doença.

Ainda, será visível para aqueles versados na técnica que a quantidade e espaçamento otimizado de dosagens individuais serão determinados através da natureza e extensão do estado de doença sendo trata-  
25 do, a forma, rota e sítio de administração, e a natureza do particular ser individual tratado. Também, tais condições ótimas podem ser determinadas através de técnicas convencionais.

Também será visível para aqueles versados na técnica que o curso otimizado de tratamento, tal como, o número de doses da composição  
30 dada por dia para um definido número de dias pode ser determinado por aqueles versados na técnica usando convencional curso de testes de determinação de tratamento.

### Agonistas e antagonistas de Cpn10

A presente invenção também contempla o uso de agonistas e antagonistas de Cpn10 e métodos de seleção e produção de tais agonistas e antagonistas.

- 5                    Agonistas e antagonistas de Cpn10 podem ser especificamente desenhados ou selecionados de acordo com o seu efeito sobre TLR3, TLR4, TLR7 e/ou TLR9 sinalizando e secreção de imunomodulador.

10                    Anticorpos podem atuar como agonistas ou antagonistas de Cpn10, ou seus fragmentos ou análogos. Preferivelmente apropriados anticorpos são preparados a partir de regiões ou fragmentos discretos do polipeptídeo Cpn10, em particular aqueles envolvidos em atribuir atividade protease e/ou ligação de parceiro ou substrato. Um polipeptídeo Cpn10 antigênico contém pelo menos cerca de 5, e preferivelmente pelo menos cerca de 10 aminoácidos.

- 15                    Métodos para geração de apropriados anticorpos serão facilmente apreciados por aqueles versados na técnica. Por exemplo, um anticorpo monoclonal anti-Cpn10, tipicamente contendo porções Fab, pode ser preparado usando a tecnologia de hibridoma descrita em *Antibodies-A Laboratory Manual*, Harlow and Lane, eds., Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1988).

20                    Em essência, na preparação de anticorpos monoclonais direcionados para Cpn10, ou seu fragmento ou análogo, qualquer técnica que proporcione a produção de moléculas de anticorpos através de linhas de células contínuas em cultura pode ser usada. Estas incluem a técnica de hibridoma originalmente desenvolvida por Kohler et al., 1975, *Nature*, 256:495-497, assim como a técnica de trioma, a técnica de hibridoma de célula-B humana (Kozbor et al., 1983, *Immunology Today*, 4:72), e a técnica de hibridoma-EBV para produzir anticorpos monoclonais humanos (Cole et al., in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, pp. 77-96, Alan R. Liss, Inc., (1985)).

25                    Linhas de células produzindo anticorpos, imortais, podem ser criadas através de técnicas outras que não fusão, tal como transformação direta de linfócitos B com ADN oncogênico, ou transfecção com vírus Epstein-Barr. Vide, por

30

exemplo, M. Schreier et al., "Hibridoma Techniques" (1980); Hammerling et al., "Monoclonal Antibodies and T-cell Hybridomas" (1981); Kennett et al., "Monoclonal Antibodies" (1980).

Em suma, um meio de produção de um hibridoma do qual o anticorpo monoclonal é produzido, um mieloma ou outra linha de célula de autoperpetuação é fundida com linfócitos obtidos do baço de um mamífero hiperimunizado com uma sua porção de ligação de fator de reconhecimento ou fator de reconhecimento, ou uma sua porção de ligação de ADN específico de origem. Hibridomas produzindo um anticorpo monoclonal útil na prática desta invenção são identificados por sua habilidade para reação imune com o presente fator de reconhecimento e sua habilidade para inibir especificada atividade transcricional em células alvos.

Um anticorpo monoclonal útil na prática da presente invenção pode ser produzido através de iniciação de uma cultura de hibridoma monoclonal compreendendo um meio nutriente contendo um hibridoma que secreta moléculas de anticorpos da apropriada especificidade de antígeno. A cultura é mantida sob condições e por um tempo suficientes para o hibridoma secretar as moléculas de anticorpo no meio. O meio contendo anticorpo é então coletado. As moléculas de anticorpo então podem ser isoladas através de técnicas bem-conhecidas.

Similarmente, existem vários procedimentos conhecidos na técnica que podem ser usados para a produção de anticorpos policlonais. Para a produção de anticorpo policlonal anti-Cpn10, vários animais hospedeiros podem ser imunizados através de injeção com Cpn10, ou um seu fragmento ou análogo, incluindo mas não limitado a coelhos, galinhas, camundongos, ratos, ovelha, cabras, etc. Ainda, o polipeptídeo Cpn10 ou seu fragmento ou análogo pode ser conjugado a um carreador imunogênico, por exemplo, albumina de soro bovino (BSA) ou hemocianina de limpets fechadura (KLH). Também, vários adjuvantes podem ser usados para aumentar a resposta imunológica, incluindo mas não limitado a Freund's (completo e incompleto), géis minerais como hidróxido de alumínio, substâncias tensoativas como lisolecitina, polióis plurônicos, poliânions, peptídeos, emulsões de óleos, he-

mocianinas de limpeta fechadura, dinitrofenol, e adjuvantes humanos potencialmente úteis como BCG (bacilo Calmette-Guerin) e *Corynebacterium parvum*.

5 Seleção para o anticorpo desejado também pode ser realizada através de uma variedade de técnicas conhecidas. Ensaios para ligação imunoespecífica de anticorpos podem incluir, mas não são limitados a, ensaios rádio – imunes, ELISASs (ensaio imunossorvente ligado a enzima), ensaios imunes de sanduíche, ensaios imunorradiométricos, reações de precipitação de difusão em gel, ensaios de imuno difusão, ensaios imuno in situ,  
10 Western blots, reações de precipitação, ensaios de aglutinação, ensaios de fixação de complemento, ensaios de imunofluorescência, ensaios de proteína A, e ensaios de imunoeletroforese, e similares (vide, por exemplo, Ausubel et al., eds., 1994, Current protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York). Ligação de anticorpo pode ser detectada em  
15 virtude de um marcador detectável sobre o anticorpo primário. Alternativamente, o anticorpo pode ser detectado em virtude de sua ligação com um anticorpo secundário ou reagente que é apropriadamente marcado. Uma variedade de métodos são conhecidos na técnica para detecção de ligação em um ensaio imuno e estão dentro do escopo da presente invenção.

20 O anticorpo (ou seu fragmento) elevado contra Cpn10 ou um seu fragmento ou análogo tem afinidade de ligação para Cpn10. Preferivelmente, o anticorpo (ou seu fragmento) tem afinidade de ligação ou avidez maior que cerca de  $10^5 \text{ M}^{-1}$ , mais preferivelmente maior que cerca de  $10^6 \text{ M}^{-1}$ , mais preferivelmente ainda maior que cerca de  $10^7 \text{ M}^{-1}$  e mais preferivelmente maior  
25 que cerca de  $10^8 \text{ M}^{-1}$ .

Em termos de obtenção de uma quantidade apropriada de um anticorpo de acordo com a presente invenção, pode-se fabricar o anticorpo(s) usando fermentação em batelada com meio isento de soro. Após fermentação o anticorpo pode ser purificado via um procedimento multietapas  
30 incorporando cromatografia e etapas de inativação/remoção viral. Por exemplo, o anticorpo pode ser primeiro separado por cromatografia de afinidade de Proteína A e então tratado com solvente/detergente para inativar quais-

5 quer vírus envelopados em lipídeo. Ainda purificação, tipicamente através de cromatografia de troca de anion e cátion pode ser usada para remover residuais proteínas, solventes/detergentes e ácidos nucléicos. O anticorpo purificado pode ser ainda purificado e formulado em solução salina 0,9% usando colunas de filtração de gel. A preparação volume formulada então pode ser esterilizada e filtrada de vírus e dispensada.

10 Agonistas e antagonistas outros que não anticorpos também são contemplados. Um agonista ou antagonista candidato pode ser identificado através de habilidade para formar um complexo molecular com TLR3, TLR4, TLR7 ou TLR9, e opcionalmente um agonista de TLR3, TLR4, TLR7 ou TLR9. Ainda, um antagonista candidato pode ser identificado por uma habilidade para prevenir ou interromper formação de um complexo molecular compreendendo Cpn10, e TLR3, TLR4, TLR7 ou TLR9, e opcionalmente um agonista de TLR3, TLR4, TLR7 ou TLR9.

15 Técnicas e procedimentos para identificação e produção de agonistas e antagonistas são bem-conhecidas por aqueles versados na técnica, incluindo seleção de bibliotecas de moléculas tais como bibliotecas químicas sintéticas tais como bibliotecas combinatoriais, seleção assistida por computador de bases de dados estruturais, modelagem e/ou desenho assistido por computador, ou técnicas biofísicas mais tradicionais que detectam interações de ligação molecular.

A presente invenção será agora ainda descrita em maiores detalhes por referência aos seguintes exemplos específicos, que não devem ser construídos em qualquer maneira como limitantes do escopo da invenção.

## 25 Exemplos

### Cpn10 humana recombinante

30 Para os experimentos descritos nos exemplos abaixo, Cpn10 humana recombinante (GenBank Accession Nº X75821) foi produzida em *E. coli* como descrito em Johnson et al., 2005 (*J Biol Chem* 280:4037-4047). Pureza foi determinada ser >97% por SDS-PAGE. Alíquotas congeladas de Cpn10 foram descongeladas somente uma vez antes de uso. Todas as bateladas de Cpn10 mostraram a mesma atividade molar como *E. coli* Gro-ES

em ensaios de redobra rhodanese mediada por Gro-EL (dados não mostrados).

### Exemplo 1 – Materiais Genéricos e Métodos

#### Cultura de célula e moléculas sinalizantes de célula

5 RPMI suplementado (SPP-036) contendo 2-mercapto etanol (2-ME) 50  $\mu$ M (Gibco) e aminoácido não-essenciais 1% (Gibco) foi usado em todos os experimentos de cultura de células, junto variadamente com GM-CSF humano recombinante (R&D systems, #215-GM, Lot No AR115021), IL-4 humano recombinante (R&D systems, #204 IL, Lot No. AG235051), micropérolas CD14<sup>+</sup> (Miltenyi #130-050-201, Lot No 5050927008) e LPS de E. coli 10 (Sigma #L6529, Lot No 015K4103).

#### Geração de DC Imatura

PBMCs foram preparadas a partir de voluntários saudáveis (LTP-062.02). Estoques de PBMCs foram estocados em crio-tubos em nitrogênio líquido (LTP-063-03). Monócitos foram purificados através do uso de micropérolas CD14<sup>+</sup> de acordo com as instruções do fabricante. 5x10<sup>7</sup> monócitos CD14<sup>+</sup> foram semeados em frascos de 75 cm<sup>2</sup> em 20 mL de RPMI suplementado contendo 2-ME e aminoácidos não-essenciais. Para gerar DC imatura, GM-CSF (10  $\mu$ g/mL) plus IL-4 (10  $\mu$ g/mL) (GM-CSF/IL-4-DC) foi adicionado às culturas. No dia 4 de cultura, 10 mL de meio recente contendo citocinas foram adicionados. 20

#### Maturação de DC na presença ou ausência de Cpn10

DCs imaturas foram colhidas no dia 5, lavadas e revestidas em placas de 6 cavidades em uma concentração de 1x10<sup>6</sup> células/cavidade em 25 3 mL de RPMI suplementado/cavidade. Maturação de DCs foi induzida por LPS (0,12 ng/mL) por 20 horas. Cpn10 (10  $\mu$ g/mL) foi adicionada 1 hora antes da adição de LPS.

#### Imuno fenotipificação de superfície de célula

30 DCs maduras foram colhidas, lavadas e marcadas por 30 minutos a 4°C usando os seguintes anticorpos monoclonais (mAb) conjugados a -APC-Cy7, -PE ou -APC de BD: CD14-APC-Cy7, HLA-DR-APC, CD1a-PE, CD11c-PE, CD80-PE, CD83-PE, CD86-PE e CD40-PE. Controles isotípicos

usados foram IgG<sub>1</sub>-APC-Cy7, -APC e -PE. Células mortas e debris foram excluídos das análises nas bases de suas propriedades de dispersão de luz. As análises foram realizadas em um citômetro de fluxo BD FACS-Array.

#### Análises de liberação de citocina por DC

5 DCs foram colhidas no dia 5 de cultura, lavadas e revestidas em placas de micro - diluição de fundo chato em  $1 \times 10^6$ /mL. DCs foram maturadas com LPS (0,15 ng/mL) por 20 horas.

Para avaliar o efeito de Cpn10 sobre produção de citocina de DC, Cpn10 (0,1-10 µg/mL) foi adicionada uma hora antes da adição de LPS. 10 Sobrenadantes foram colhidos e estocados a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Acumulação de TNF-alfa em sobrenadantes de cultura seguindo incubação de DCs com Cpn10 por 20 horas foi avaliada por ELISA usando um R&D DuoSet Kit de acordo com instruções do fabricante.

#### Ensaio de reação de leucócito mista primária (MLR)

15 Células T CD4<sup>+</sup> foram purificadas de sangue recente através do uso de CD4 T cell Isolation Kit II (Miltenyi, # 130-091-155, Lot No 5060928051) de acordo com instruções do fabricante. Pureza de células T foi verificada rotineiramente através de citometria de fluxo. Um total de  $1 \times 10^5$  células T foi co-cultivado com  $1 \times 10^4$  DCs na presença ou ausência de Cpn10 20 (0,1-10 µg/mL) por 6 dias. Sobrenadantes foram coletados e analisados para acumulação de IFN-γ através de ELISA. Proliferação de células foi avaliada usando um kit de ensaio de proliferação CyQUANT (Molecular Probes # C35006, Lot N° 45179<sup>A</sup>) de acordo com as instruções do fabricante.

#### Exemplo 2 – Cpn10 reduz maturação de DC in vitro

25 DC derivada de monócito cultivado foram usadas para avaliar a capacidade de Cpn10 modular maturação de DC em resposta a LPS. Conversão de monócitos em DC foi verificada por análises citométricas de fluxo de expressão em superfície de célula de CD1a e CD14. DCs CD1a<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup> foram ainda analisadas para expressão em superfície de célula dos marcadores de maturação HLA-DR, CD40, CD80, CD83 e CD86. A intensidade de 30 fluorescência média (MFI) de HLA-DR em resposta a LPS (Figura 1) foi significativamente reduzida quando Cpn10 foi adicionada durante o período de

maturação ( $p < 0,05$ ). Em contraste, a expressão de HLA-DR foi inalterada sobre DC madura incubada com Cpn10, na ausência de agonista. (Figura 1 é representativa de 3 experimentos independentes).

5 Em adição, foi verificado que quando DCs derivadas de monócito foram incubadas junto com Cpn10 por 20 horas antes de teste de fluido sobrenadante, houve uma significativa e dependente de dose diminuição na liberação constitutiva de TNF-alfa no fluido de cultura de células. Estes resultados podem refletir a habilidade de Cpn10 para reduzir ativação de célula (Figura 2, representativa de 4 experimentos independentes).

#### 10 Exemplo 3 – Modulação de Cpn10 de estimulação de célula T por DC

A capacidade de Cpn10 modular estimulação de célula T por DC em uma reação de leucócito mista primária (MLR) pode ser investigada junto com análises do efeito de Cpn10 sobre maturação de DC em resposta a ligantes como prostaglandina E<sub>2</sub>, IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  ou CD40L trimérico solúvel. Como mostrado na Figura 3, DCs derivadas de monócito cultivadas foram usadas para avaliar a capacidade de Cpn10 modular a ativação de célula T em resposta a co-cultura com células T CD4<sup>+</sup> alogênicas por 6 dias antes de teste de sobrenadante de cultura de célula para produção de IFN- $\gamma$ . Dados mostrados na Figura 3 (representativos de dois experimentos independentes) indicam que acumulação de IFN- $\gamma$  foi significativamente reduzida por Cpn10. Dados mostrados na Figura 4 demonstram que Cpn10 não afeta proliferação de célula T durante uma MLR primária, como determinado através de ensaio de proliferação de célula CyQUANT. (Dados na Figura 3 são representativos de dois experimentos independentes).

#### 25 Exemplo 4 – Composições para tratamento

De acordo com o melhor modo de realização da invenção aqui provida, específicas composições preferidas são esboçadas abaixo. Os seguintes são para serem construídos como exemplos meramente ilustrativos de composições e não como uma limitação do escopo da presente invenção em qualquer maneira.

#### 30 Exemplo 4(a) – Composição para administração parenteral

Uma composição para injeção intramuscular pode ser preparada

para conter 1 mL de água tamponada estéril, e 1 mg de um composto apropriado.

5 Similarmente, uma composição para infusão intravenosa pode compreender 250 mL de solução de Ringer estéril, e 5 mg de um composto apropriado.

Exemplo 4(b) – Composição injetável parenteral

10 Uma composição apropriada para administração através de injeção pode ser preparada através de mistura de 1% em peso de um composto apropriado em 10% em volume de propileno glicol e água. A solução é esterilizada através de filtração.

Exemplo 4(c) – Composição de cápsula

15 Uma composição de um composto apropriado na forma de uma cápsula pode ser preparada através de enchimento de uma cápsula de gelatina dura de duas peças padrão com 50 mg do agente ou composto, em forma pulverizada, 100 mg de lactose, 35 mg de talco e 10 mg de estearato de magnésio.

Exemplo 4(d) – Composição de gota ocular

Uma composição típica para liberação como uma gota ocular é esboçada abaixo:

20	Composto apropriado	0,3 g
	Hidróxi benzoato de metila	0,005 g
	Hidróxi benzoato de propila	0,06 g
	Água purificada para cerca de	100,00 mL

25 Os hidróxi benzoatos de metila e propila são dissolvidos em 70 mL de água purificada a 75°C, e a resultante solução é deixada resfriar. O apropriado composto é então adicionado, e a solução esterilizada por filtração através de um filtro membrana (0,22 µm de tamanho de poro), e asépticamente embalado em recipientes estéreis.

Exemplo 4(e) – Composição para administração por inalação

30 Para um recipiente de aerossol com uma capacidade de 20-30 mL: uma mistura de 10 mg de um composto apropriado com 0,5-0,8% em peso de um agente lubrificante, tal como polissorbato 85 ou ácido oléico, é

dispersa em um propelente, tal como freon, e colocado em um recipiente de aerossol apropriado para administração de inalação oral ou intranasal.

Exemplo 4(f) – Composição de pomada

Uma típica composição para liberação como uma pomada inclui

- 5 1,0 g de um composto apropriado, junto com parafina mole branca para 100,0 g, dispersa para produzir um produto homogêneo, uniforme.

## REIVINDICAÇÕES

1. Método para modulação de uma resposta imune em um sujeito ou em pelo menos uma célula da mesma, tecido ou órgão, através de modulação de nível de expressão em superfície de célula de pelo menos uma molécula MHC, em que o dito método compreende administração de uma quantidade efetiva de chaperonina 10.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o dito método ainda compreende modulação de uma resposta imune em um sujeito ou em pelo menos uma célula da mesma, tecido ou órgão, através de modulação de nível de expressão em superfície de célula de pelo menos uma outra molécula de superfície de célula, compreendendo administração de uma quantidade efetiva de chaperonina 10.

3. Método para tratamento ou prevenção de uma doença ou condição em um sujeito através de modulação de nível de expressão em superfície de célula de pelo menos uma molécula MHC, em que o dito método compreende administração ao sujeito de uma quantidade efetiva de chaperonina 10.

4. Método de acordo com a reivindicação 3, em que o dito método ainda compreende tratamento ou prevenção de uma doença ou condição em um sujeito através de modulação de nível de expressão em superfície de célula de pelo menos uma outra molécula de superfície de célula, compreendendo administração de uma quantidade efetiva de chaperonina 10.

5. Método para modulação de nível de expressão em superfície de célula de pelo menos uma molécula MHC em um sujeito, ou em pelo menos uma célula da mesma, tecido ou órgão, em que o dito método compreende administração de uma quantidade efetiva de chaperonina 10.

6. Método de acordo com a reivindicação 5, em que o dito método ainda compreende modulação de nível de expressão em superfície de célula de pelo menos uma outra molécula de superfície de célula em um sujeito, ou em pelo menos uma célula da mesma, tecido ou órgão, compreendendo administração de uma quantidade efetiva de chaperonina 10.

7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 2, 4

ou 6, em que a outra molécula de superfície de célula é uma molécula co-estimuladora.

8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, em que a molécula MHC é selecionada do grupo compreendendo uma molécula Classe I MHC, uma molécula Classe II MHC, e uma molécula MHC não-clássica.

9. Método de acordo com a reivindicação 8, em que a molécula Classe II MHC é selecionada do grupo compreendendo HLA-DR, HLA-DP e HLA-DQ.

10. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, em que a expressão em superfície de célula é aquela de uma célula apresentando antígeno.

11. Método de acordo com a reivindicação 10, em que a célula apresentando antígeno é selecionada do grupo compreendendo um macrófago, uma célula dendrítica e uma célula B.

12. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, em que a chaperonina 10 é uma chaperonina 10 derivada naturalmente, produzida recombinantemente ou produzida sinteticamente.

13. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, em que chaperonina 10 é de origem eucariótica.

14. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, em que chaperonina 10 é de origem mamífera.

15. Método de acordo com a reivindicação 14, em que a chaperonina 10 é chaperonina 10 humana.

16. Método de acordo com a reivindicação 15, em que a chaperonina 10 compreende a seqüência de polipeptídeos como mostrada em SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 2 ou SEQ ID N°: 3.

17. Método de acordo com a reivindicação 16, em que a chaperonina 10 é acetilada ou não-acetilada.

18. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, em que chaperonina 10 é administrada na forma de um polinucleotídeo codificando chaperonina 10.

19. Método de acordo com a reivindicação 18, em que o polinucleotídeo codificando chaperonina 10 está localizado em uma construção genética, ligada operavelmente a um promotor.

5 20. Método de acordo com a reivindicação 18 ou reivindicação 19, em que o polinucleotídeo compreende a seqüência como mostrada em SEQ ID N°: 4.

21. Método para modulação de função de uma célula apresentando antígeno em um sujeito, ou em pelo menos um seu tecido ou órgão, em que o dito método compreende administração de uma quantidade efetiva  
10 de chaperonina 10.

22. Método de acordo com a reivindicação 21, em que a célula apresentando antígeno é selecionada do grupo compreendendo um macrófago, célula dendrítica ou célula B.

23. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 21  
15 ou 22, em que a função é selecionada do grupo compreendendo migração para um nódulo linfático, ativação de célula T ou proliferação de célula T.

24. Composição quando usada para o tratamento ou prevenção de uma doença ou condição, em que a dita composição compreende chaperonina 10 junto com pelo menos um carreador, diluente ou adjuvante farmacologicamente aceitável, e em que a chaperonina 10 modula o nível de expressão em superfície de célula de pelo menos uma molécula MHC.  
20

25. Composição de acordo com a reivindicação 24, em que a chaperonina 10 ainda modula o nível de expressão em superfície de célula de pelo menos uma outra molécula de superfície de célula.

26. Composição de acordo com a reivindicação 25, em que a  
25 outra molécula de superfície de célula é uma molécula co-estimuladora.

27. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 24 a 26, em que a molécula de MHC é selecionada do grupo compreendendo molécula Classe I MHC, uma molécula Classe II MHC, e uma molécula MHC não-clássica.  
30

28. Composição de acordo com a reivindicação 27 em que a molécula Classe II MHC é selecionada do grupo compreendendo HLA-DR,

HLA-DP e HLA-DQ.

29. Composição de acordo com a qualquer uma das reivindicações 24 a 28, em que a expressão em superfície de célula é aquela de uma célula apresentando antígeno.

5 30. Composição de acordo com a reivindicação 29, em que a célula apresentando antígeno é selecionada do grupo compreendendo um macrófago, uma célula dendrítica e uma célula B.

31. Composição quando usada para o tratamento ou prevenção de uma doença ou condição, em que a dita composição compreende chaperonina 10 junto com pelo menos um carreador, diluente ou adjuvante farmacologicamente aceitável, e em que a chaperonina 10 modula a função de uma célula apresentando antígeno em um sujeito, ou em pelo menos um seu tecido ou órgão.

15 32. Composição de acordo com a reivindicação 31, em que a célula apresentando antígeno é selecionada do grupo compreendendo um macrófago, uma célula dendrítica ou célula B.

33. Composição de acordo com a reivindicação 31 ou reivindicação 32, em que a função é selecionada do grupo compreendendo migração para um nódulo linfático, ativação de célula T ou proliferação de célula T.

20 34. Uso de chaperonina 10 para a fabricação de um medicamento para o tratamento ou prevenção de uma doença ou condição, em que a chaperonina 10 modula o nível de expressão em superfície de célula de pelo menos uma molécula de MHC.

25 35. Uso de acordo com a reivindicação 34, em que a chaperonina 10 ainda modula o nível de expressão em superfície de célula de pelo menos uma outra molécula de superfície de célula.

36. Uso de acordo com a reivindicação 35, em que a outra molécula de superfície de célula é uma molécula co-estimuladora.

30 37. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 34 a 36, em que a molécula MHC é selecionada do grupo compreendendo uma molécula Classe I MHC, uma molécula Classe II MHC, e uma molécula MHC não-clássica.

38. Uso de acordo com a reivindicação 37 em que a molécula Classe II MHC é selecionada do grupo compreendendo HLA-DR, HLA-DP e HLA-DQ.

5 39. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 34 a 38, em que a expressão em superfície de célula é aquela de uma célula apresentando antígeno.

40. Uso de acordo com a reivindicação 39, em que a célula apresentando antígeno é selecionada do grupo compreendendo um macrófago, uma célula dendrítica e uma célula B.

10 41. Uso de chaperonina 10 para a fabricação de um medicamento para o tratamento ou prevenção de uma doença ou condição, em que a chaperonina 10 modula a função de uma célula apresentando antígeno em um sujeito, ou em pelo menos um seu tecido ou órgão.

15 42. Uso de acordo com a reivindicação 41, em que a célula apresentando antígeno é selecionada do grupo compreendendo um macrófago, uma célula dendrítica ou uma célula B.

43. Uso de acordo com a reivindicação 41 ou reivindicação 42, em que a função é selecionada do grupo compreendendo migração para um nódulo linfático, ativação de célula T ou proliferação de célula T.

20 44. Método para modulação de produção, localização dentro de uma célula e/ou expressão em superfície de célula de um ou mais imunomoduladores em um sujeito, ou pelo menos uma célula da mesma, tecido ou órgão, em que o dito método compreende administração de uma quantidade efetiva de chaperonina 10, e em que a chaperonina 10 modula o nível de  
25 expressão em superfície de célula de pelo menos uma molécula MHC ou pelo menos uma outra molécula de superfície de célula.

45. Método de acordo com a reivindicação 44, em que a outra molécula de superfície de célula é uma molécula co-estimuladora.

30 46. Método de acordo com a reivindicação 44 ou reivindicação 45, em que a molécula MHC é selecionada do grupo compreendendo uma molécula Classe I MHC, uma molécula Classe II MHC, e uma molécula MHC não-clássica.

47. Método de acordo com a reivindicação 46 em que a molécula Classe II MHC é selecionada do grupo compreendendo HLA-DR, HLA-DP e HLA-DQ.

5 48. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 44 a 47, em que a expressão de superfície de célula é aquela de uma célula apresentando antígeno.

49. Método de acordo com a reivindicação 48, em que a célula apresentando antígeno é selecionada do grupo compreendendo um macrófago, uma célula dendrítica e uma célula B.

10 50. Método para identificação de um composto que modula uma resposta imune, em que o dito método compreende:

(a) contato de uma célula ou extrato de célula com um composto candidato na presença de Cpn10; e

15 (b) determinação de se expressão sobre a superfície da dita célula de pelo menos uma molécula MHC é modulada com contato com o dito composto candidato.

51. Método de acordo com a reivindicação 50, em que o dito método ainda compreende:

20 (c) determinação de se expressão sobre a superfície da dita célula de pelo menos uma outra molécula de superfície de célula é modulada com contato com o dito composto candidato.

52. Método para seleção de uma pluralidade de compostos para identificar um composto que modula uma resposta imune, em que o dito método compreende:

25 (a) contato de uma célula ou extrato de célula com a dita pluralidade de compostos na presença de Cpn10; e

(b) determinação de se expressão sobre a superfície da dita célula de pelo menos uma molécula MHC é modulada com contato com a dita pluralidade de compostos.

30 53. Método de acordo com a reivindicação 52, em que o dito método ainda compreende:

(c) determinação de se expressão sobre a superfície da dita cé-

lula de pelo menos uma outra molécula de superfície de célula é modulada com contato com a dita pluralidade de compostos.

54. Método para indução de modulação do nível de expressão em superfície de célula de pelo menos uma molécula MHC em um sujeito, ou em pelo menos uma célula da mesma, tecido ou órgão, em que o dito método compreende administração de uma quantidade efetiva de chaperonina 10.

55. Método de acordo com a reivindicação 54, em que o dito método ainda compreende modulação do nível de expressão em superfície de célula de pelo menos uma outra molécula de superfície de célula em um sujeito, ou em pelo menos uma célula da mesma, tecido ou órgão, compreendendo administração de uma quantidade efetiva de chaperonina 10.

56. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 51, 53 ou 55, em que a outra molécula de superfície de célula é uma molécula co-estimuladora.

57. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 50 a 56, em que a molécula de MHC é selecionada do grupo compreendendo uma molécula Classe I MHC, uma molécula Classe II MHC, e uma molécula MHC não-clássica.

58. Método de acordo com a reivindicação 57, em que a molécula Classe II MHC é selecionada do grupo compreendendo HLA-DR, HLA-DP e HLA-DQ.

59. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 50 a 58, em que a expressão em superfície de célula é aquela de uma célula apresentando antígeno.

60. Método de acordo com a reivindicação 59, em que a célula apresentando antígeno é selecionada do grupo compreendendo um macrófago, uma célula dendrítica, e uma célula B.

61. Método para identificação de um composto que modula uma resposta imune, em que o dito método compreende:

(a) contato de uma célula ou extrato de célula com um composto candidato na presença de Cpn10; e

(b) determinação de se a migração da dita célula para um nódulo linfático ou a habilidade para ativar e/ou causar proliferação de células T é modulada com contato com o dito composto candidato.

5 62. Método para seleção de uma pluralidade de compostos para identificação de um composto que modula uma resposta imune, em que o dito método compreende:

(a) contato de uma célula ou extrato de célula com a dita pluralidade de compostos na presença de Cpn10; e

10 (b) determinação de se a migração da dita célula para um nódulo linfático ou a habilidade para ativar e/ou causar proliferação de células T é modulada com contanto com a dita pluralidade de compostos.

63. Método de acordo com a reivindicação 61 ou reivindicação 62, em que a célula é uma célula apresentando antígeno.

15 64. Método de acordo com a reivindicação 63, em que a célula apresentando antígeno é selecionada do grupo compreendendo um macrófago, uma célula dendrítica ou célula B.

20 65. Método para modulação de função de uma célula apresentando antígeno em um sujeito, ou em pelo menos um seu tecido ou órgão, em que o dito método compreende administração de uma quantidade efetiva de chaperonina 10.

66. Método de acordo com a reivindicação 65, em que a célula apresentando antígeno é selecionada do grupo compreendendo um macrófago, célula dendrítica, ou célula B.

25 67. Método de acordo com a reivindicação 65 ou reivindicação 66, em que a função é selecionada do grupo compreendendo migração para um nódulo linfático, ativação de célula T, ou proliferação de célula T.

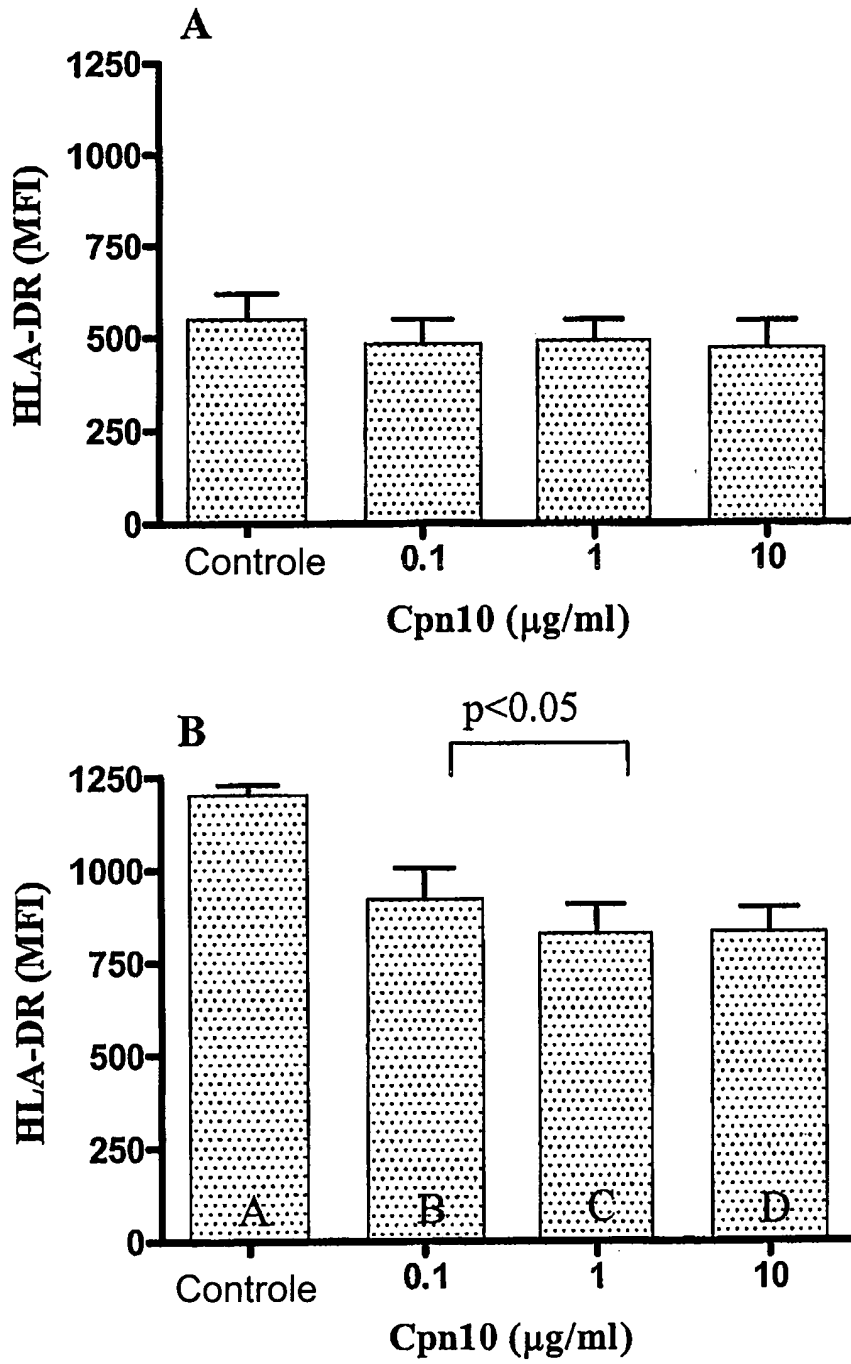


FIG. 1

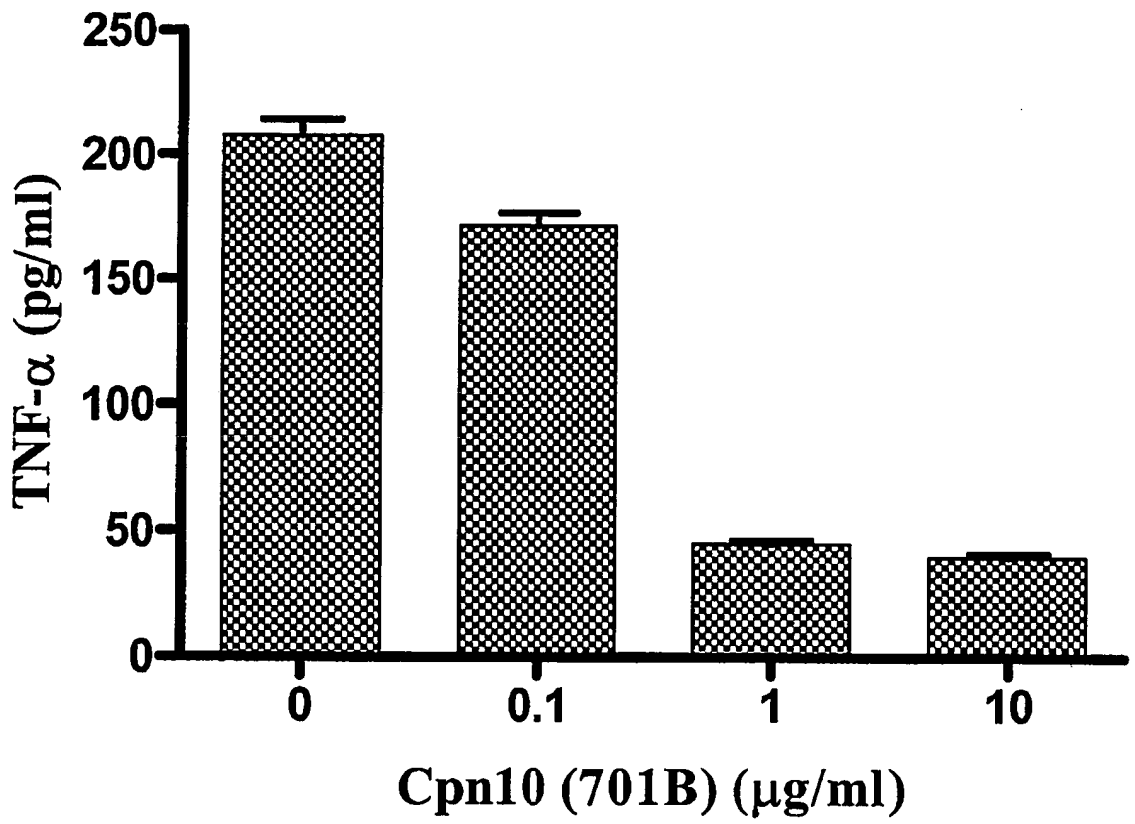


FIG. 2

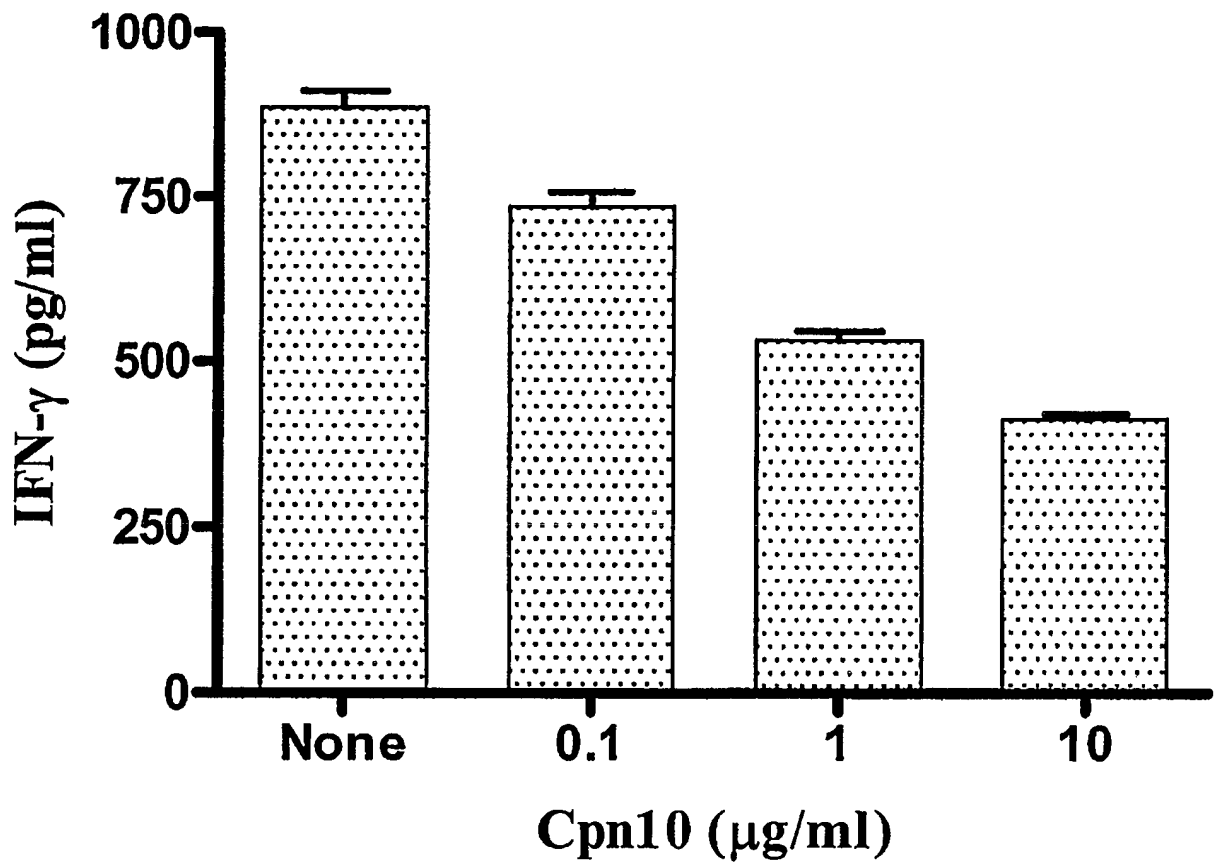


FIG. 3

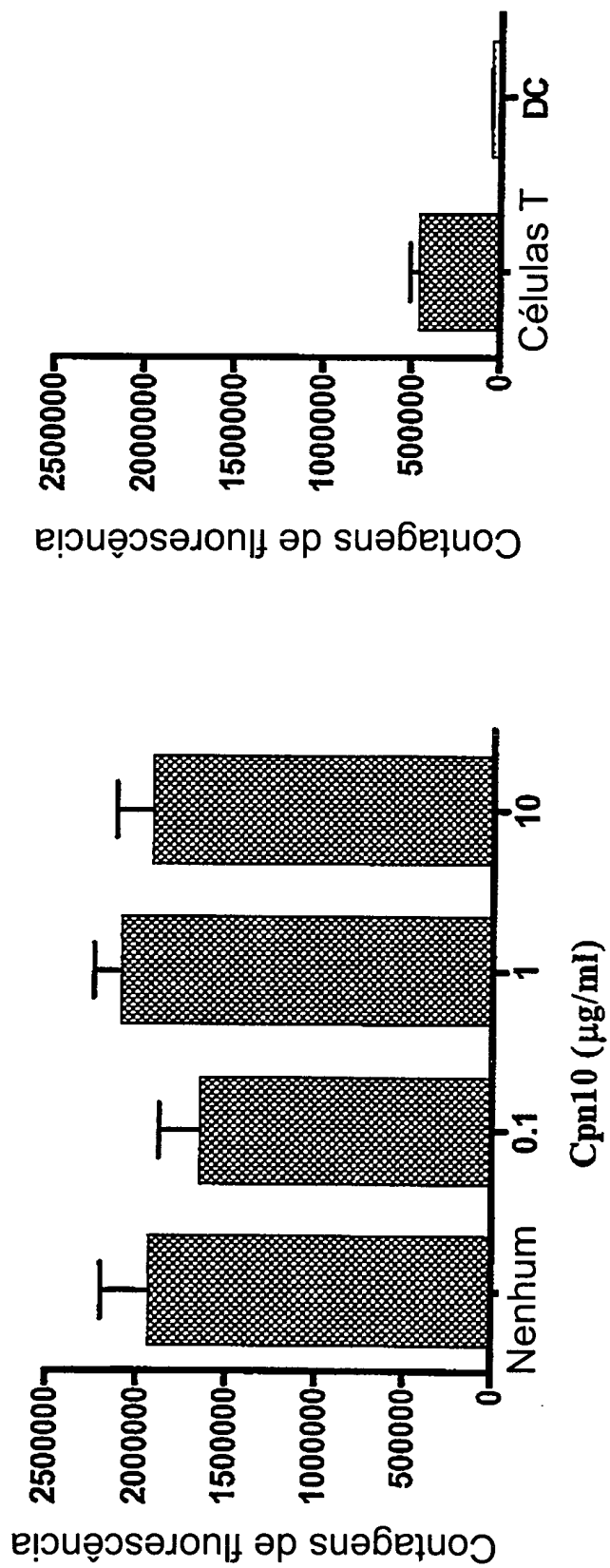


FIG. 4

## RESUMO

Patente de Invenção: "REGULAÇÃO DAS RESPOSTAS IMUNE POR MODULAÇÃO DA FUNÇÃO DO ANTÍGENO PRESENTE EM CÉLULAS".

5 A presente invenção refere-se ao uso de chaperonina 10 para modular a função de células apresentando antígeno. Mais particularmente a invenção reside na modulação de expressão em superfície de célula de moléculas de MHC tal como HLA.