

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 100 766

REQUERENTE: SOCIÉTÉ DES PRODUITS NESTLÉ S.A., suíça,
industrial e comercial, com sede Vevey,
Suíça

EPÍGRAFE: "COMPOSIÇÃO ALIMENTAR CONTENDO FACTOR DE
CRESCIMENTO DO LEITE (MGF)"

INVENTORES: ATHONY C. HUGGETT, ANNE HUGHES E EDUARDO
SCHIFFRIN

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4.º da Convenção de Paris
de 20 de Março de 1883.

Suíça, 12 de Agosto de 1991, sob o n.º 91810629.5.



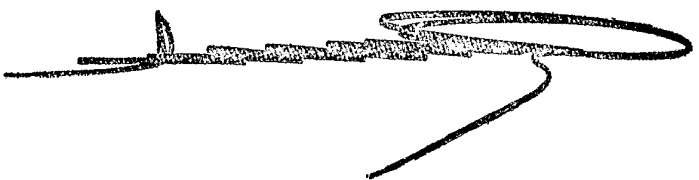
Descrição referente à patente de invenção de SOCIÉTÉ DES PRODUITS NESTLÉ S.A, suíça, industrial e comercial, com sede em Vevey, Suíça, (inventores: Athony C. Huggett, Anne Hughes e Edwardo Schifffrin, residentes na Suíça)
"COMPOSIÇÃO ALIMENTAR CONTENDO FACTOR DE CRESCIMENTO DO LEITE (MGF)"

DESCRIÇÃO

Âmbito da Invenção

A presente invenção refere-se à utilização de polipéptidos derivados do leite da família beta do factor de crescimento transformante para a regulação da resposta imune ao nível do intestino associada com MHC (complexo principal da histocompatibilidade).

A presente invenção refere-se especialmente à utilização de MGF (factor de crescimento do leite) do tipo TGF- β derivado de leite de mamíferos ou colostro para a preparação de uma composição alimentar, uma preparação entérica ou uma composição farmacêutica, bem como a uma



composição alimentar ou a uma composição entérica contendo uma quantidade eficaz de MGF do tipo TGF- β derivado de leite de mamíferos ou colostro.

Antecedentes da Invenção e Técnica Anterior

O leite humano e de bovinos contem muitos polipéptidos biologicamente activos incluindo factores de crescimento (West, D.W. Exp.Clin.Endocrinol. 8 145-146, 1989). Um destes factores, MGF (factor do crescimento do leite) foi recentemente identificado como sendo idêntico ou como tendo uma homologia muito grande com um elemento da família do factor de crescimento transformante β (TGF- β), notavelmente o TGF- β 2 (Cox D.A. e col. Eur. J. Biochem. 197 353-358, 1991). O TGF- β é o nome genérico para uma família de polipéptidos consistindo em pelo menos 5 elementos distintos mas muito relacionados, que têm homologias estruturais e biológicas consideráveis (Roberts, A.B. e col. Em: Peptide Growth Factors and their Receptors Vol. 1, pg. 419-472, Eds. Sporn M.B. e col., Springer, 1990). Os TGF- β são proteínas homodiméricas com cerca de 25 kDa consistindo de cadeias de polipéptido de 12,5 kDa idênticas ligadas entre si através de pontes de dissulfureto. Eles podem formar complexos latentes com outras proteínas e estes complexos podem ser activados por tratamento com ácido ou por uma proteólise moderada (Roberts, A.B. e col.). Eles são multipotentes, possuem várias actividades biológicas dependendo do tipo de célula alvo, do seu estado de diferenciação e da presença de outros factores. Estas



actividades incluem a estimulação ou a inibição da proliferação e diferenciação das células, regulação da deposição extracelular da matriz, imunomodulação, esteroidogénese e angiogénese (Roberts, A.B. e col.).

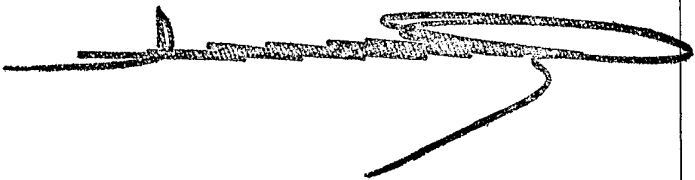
A expressão de MHC-Classe II à superfície das células que apresentam antígeno é um pré-requisito para a apresentação de antígeno exógeno às células-T (Benacerraf, B., Science 212 1229, 1981). As células epiteliais no villus intestinal de roedores adultos expressam constitutivamente o MHC-Classe II enquanto que a sua expressão por células cripto depende em parte da sua localização espacial no intestino (Hughes, A., e col. Immunol. 72 491, 1991). No período após parto nos roedores existe pouca ou nenhuma expressão de MHC-Classe II por enterócitos até o desmamar, indicando assim a presença de um factor supressivo no leite (Hughes, A., e col.).

Os TGF- β , incluindo o TGF- β 2, têm várias propriedades imunorreguladoras e actuam em várias fases da reacção inflamatória e imune. Por exemplo eles inibem a proliferação de linfócitos T e B (Kerhl, J.H., e col. J.Immunol. 137:3855-3860, 1986; Kerhl, J.H., e col. J.Exp.Med. 163:1037-1050, 1986) e timócitos (Ristow, H.J. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 83 5531-5534,1986). Eles também antagonizam os efeitos das interleucinas incluindo IL-1, IL-2 e IL-3 e outros agentes imunorreguladores como por exemplo o factor da necrose de tumores e interferões (Roberts, A.B. e col.). Embora a maior parte dos seus



efeitos nas células imunes sejam inibidores, os TGF- β parecem jogar um papel crítico na alteração do isotipo das células que segregam IgG e IgM para células que segregam IgA (Lebman, D.A., e col. J.Immunol. 144:952-959, 1990). Com particular referência aos efeitos de imunossupressivas referidos de MGF, este factor revelou diminuir a proliferação de linfócitos humanos induzidos por anti-CD3 ou interleucinas (Stoeck, M., e col. FEBS Lett. 249 289-292, 1989); Stoeck, M., e col. J.Immunol. 143 3258-3265, 1989). Os TGF- β interferem com algumas funções celulares acessórias importantes na apresentação de antigénio e revelaram especificamente suprimir a expressão de MHC-Classe II por melanomas, células gliais e astrócitos (Czarniecki, C.W., e col J.Immunol. 140 4217-4223, 1988; Schlusener H.J. J.Neuroimmunol. 24 41-47, 1990; Zuber, P. e col. Eur.J.Immunol. 18 1623-1626, 1988). Contudo, a regulação da expressão de MHC-Classe II em células epiteliais no intestino por TGF- β ou MGF não foi até agora referido.

A regulação alterada de MHC-Classe II tem sido implicada em várias doenças gastro-intestinais. A presença da inflamação activa ao nível do intestino resulta geralmente num aumento da expressão de MHC-Classe II no epitélio do intestino humano e nas próprias lâminas (Mayer, L., e col. Gastroenterology 100 3-12, 1991). Este aumento é um componente importante da Doença Inflamatória do Baço (IBD), (Mayer, L., e col.). Na IBD, o dano aos tecidos é



devido quer ao ataque autoimune nos componentes celulares da mucosa intestinal do hospedeiro (Snook, J.A., e col. Gut 32 163-166, 1991), ou devido a uma doença na regulação imune da mucosa com sobre-reactividade para antigénios luminais no intestino, baseado numa regulação com defeito desta resposta (Challenges in IBD Research: Agenda for the 1990's. National Foundation for Ileitis and Colitis. Feb. 21, 1990. Washington D.C.). Ambas as possibilidades implicam a existência de uma desregulação da resposta imune da mucosa e realçam o papel imunológico na iniciação e na perpetuação da resposta inflamatória.

Objecto da Invenção

O objecto da presente invenção é proporcionar uma composição alimentar, uma composição entérica ou uma composição farmacêutica para a regulação das respostas imunes mediadas por MHC no tubo gastro-intestinal de mamíferos, e mais especificamente para o tratamento das Doenças Inflamatórias do Baço (por exemplo a doença de Crohn, Colite Ulcerativa) ou reacções de Enxerto-versus-Hospedeiro em seres humanos ou animais, para a prevenção da diarreia em seres humanos ou animais em desmama, ou para a prevenção de reacções alérgicas no sistema gastro-intestinal em seres humanos ou animais.

Resumo da Invenção

A composição alimentar, a composição entérica, e/ou a composição farmacêutica de acordo com a presente invenção contem uma quantidade de MGF de tipo TGF- β 2



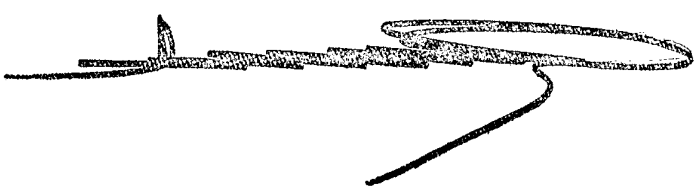
eficaz de leite de mamífero ou colostro derivado para a modulação da expressão de MHC no sistema gastro-intestinal de seres humanos ou animais, sendo a referida quantidade de preferência eficaz para o tratamento das Doenças Inflamatórias do Baço (por exemplo a doença de Crohn, Colite Ulcerativa) ou reacções de Enxerto-versus-Hospedeiro em seres humanos ou animais, para a prevenção da diarreia em seres humanos ou animais em desmama, ou para a prevenção de reacções alérgicas no sistema gastro-intestinal de seres humanos ou animais.

Descrição Detalhada da Invenção

Para preparar a composição alimentar ou a composição entérica, ou para realizar as utilizações de acordo com a presente invenção, pode ser preparado um componente bioactivo do leite, idêntico ou com uma homologia muito grande com o TGF- β 2 numa forma enriquecida a partir de produtos lácteos de mamíferos, especialmente produtos do leite de bovinos, tal como por exemplo referido em EP-A1-313515 (CIBA-GEIGY AG) pg 6 l. 11 a pg 7 l. 34 e Exemplos 1 a 3, e possuindo uma actividade do tipo TGF- β 2 na proliferação de células epiteliais do fígado de mamíferos e na expressão de MHC por células epiteliais do intestino de mamíferos. Daqui para a frente este factor bioactivo do leite é designado por MGF do tipo TGF- β 2.

Ensaio 1, TGF- β em Leites

Foram incorporadas células epiteliais do fígado de ratos normais (RLE) que revelaram previamente serem



sensíveis aos efeitos inibidores do crescimento de TGF- β (Hugget, A.C., e col. Cancer Res. 50 7468-7475, 1990) num bioensaio para a análise de TGF- β em leites e em fracções de leite tratadas com ácido e leites em pó. A medida da inibição da síntese de ADN por incorporação de ^3H -Timidina foi efectuada da forma descrita anteriormente (Hugget, A.C., e col.). Os anticorpos criados contra TGF- β (British Bio-technology Ltd.) foram co-incubados com padrões ou amostras antes da análise de bioensaio de modo a determinar a actividade inibidora específica para isoformas de TGF- β . Utilizando este ensaio, é obtida uma inibição de 50% na síntese do ADN das células RLE com 50 pg/ml de TGF- β 1 ou TGF- β 2.

Foi deslipidado leite humano e de bovino por centrifugação, que se dessalinizou em colunas PD-10 (Pharmacia) eluídas com PBS e em seguida se esterilizou por filtração através membranas de 0,2 μm (Milipore). O teor de proteínas foi monitorado utilizando o método de Smith e col (Smith P.K., e col. Anal. Biochem. 150: 76-85, 1985). Por análise dos TGF- β latente que activa ácido, foram ajustadas as amostras de leite a valores de pH 4 com HCl 1N, centrifugaram-se a 40000 g durante 60 min para separar as fracções de nata e de caseína que foram em seguida neutralizadas com NaOH 1N e dialisadas contra PBS. As diluições foram em seguida analisadas utilizando o bioensaio das células RLE juntamente com uma série de soluções padrão de TGF- β . Foi determinada uma estimativa da



quantidade de actividade de tipo TGF- β por meio de uma comparação do grau de inibição da síntese de ADN obtida com as amostras em função de curvas padrão de TGF- β . A identificação das isoformas específicas de TGF- β foi determinada examinando os efeitos dos anticorpos neutralizantes específicos das isoformas na actividade inibidora.

Este ensaio demonstra que o leite humano e de vaca contem MGF de tipo TGF- β 2 que activa ácidos e que está principalmente associado com a fracção da caseína (Tabela 1).

Tabela 1. Actividade de MGF de Tipo TGF- β em Leites

Amostra	MGF de tipo TGF- β 2 activo (μ g/g proteína)
Leite de Bovino	< 0,01
Caseína Ácida de Bovino	0,52
Leite Humano*	< 0,2
Caseína Ácida Humana	0,75

* Este valor está sobre-estimado devido às grandes quantidades de EGF nestas amostras que interferem com o ensaio.

Ensaio 2 e 3

Supressão da Expressão de MHC-Classe II por Células do



Epitélio Intestinal

A linha epitelial dos intestinos HT-29 derivada de células epiteliais de cólon humano (Fogh, J. e col. Em: Human Tumor Cells "in vitro". J.Fogh, ed. Plenum Publishing Corp., New York, pg. 115, 1975), foram mantidas num estado indiferenciado em meio contendo glicose (Zweibaum, A., e col. J.Cell.Physiol., 122: 21, 1985). Quando as células atingiam uma confluência de 70-80%, elas foram expostas, durante um período de 48 horas, a um dos seguintes tratamentos: -interferão gama recombinante humano (IFN- γ , 100 U/ml) isoladamente (Boehringer Mannheim); IFN- γ em combinação com TGF- β 2; IFN- γ seguido de por TGF- β 2; TGF- β 2 isolado seguido de IFN- γ ; ou, como controle, meio de cultura isolado. As células foram lavadas e retratadas após as primeiras 24 horas. O TGF- β 2 foi utilizado em doses que variavam de 0,05 ng a 4 ng por cada ml. Após o período de tratamento, as células foram lavadas, fixadas e as placas armazenadas por congelação a -20°C até serem necessárias.

Foi seguido o processo do complexo de avidina-biotina da imunoperoxidase com revelação (Cerf-Bensussan, N., e col. J.Immunol., 130: 2615, 1983) em monocamadas que utilizavam o anticorpo monoclonal de rato L234 (Becton Dickinson), que reconhece o antígeno HLA-DR da histocompatibilidade de MHC-Classe II humano. A proteína IgG do mieloma do rato (Zymed) servia como controle. Noutra série de experiências, foi cultivada até 50% de confluência uma linha de células intestinais dos ratos pequenos



normais, IEC-18 (Quaroni, A., e col. J.Cell Biology, 80 248, 1979) e foi submetida a IFN- γ e/ou TGF- β 2 nas combinações acima listadas. As células foram em seguida separadas dos pratos de cultura utilizando Versene (Life Technologies Ltd.) e depois revelado, em suspensão, utilizando uma técnica convencional de imunofluorescência directa. Resumidamente, foram lavadas as células, incubadas com soro normal durante 5 min e em seguida com anticorpo monoclonal de rato conjugado com FITC MRC OX-6 (Serotec) que reconhece o antigénio MHC da Classe II do rato. As células foram em seguida lavadas e fixadas durante pelo menos 1 hora com 1% de paraformaldeído antes da análise no FACScan (Becton Dickinson).

Durante a alergia alimentar e doenças inflamatórias, as células epiteliais intestinais expressam altos teores de antigénio da Classe II que se pensam ser mediadas, pelo menos parcialmente, por citocinas inflamatórias como por exemplo IFN- γ . As células não diferenciadas HT-29 utilizadas no ensaio descrito, não expressam constitutivamente moléculas da Classe II. Para simular parcialmente os acontecimentos que têm lugar durante o estabelecimento da inflamação intestinal, as células foram expostas a IFN- γ . O efeito de TGF- β 2 nesta reacção foi examinado em seguida. A exposição a IFN- γ induziu a expressão da Classe II nas células HT-29 mas este efeito foi eliminado pelo pré-tratamento com TGF- β 2 em todas doses ensaiadas (Tabela 2). Pelo contrário, as outras

combinações de citocinas ensaiadas resultaram em altos valores de expressão de Classe II. A maior parte das células IEC-18 já expressavam moléculas da Classe II mas revelavam maior expressão após o tratamento com IFN- γ (Tabela 3). De novo, o TGF- β 2 suprimia esta indução. Assim, no estabelecimento das reacções inflamatórias intestinais, o TGF- β 2 pode modular a expressão local de antigénios de Classe II.

Tabela 2. Efeito de TGF- β 2 na expressão de MHC-Classe II pelas células epiteliais do intestino humano (HT-29).

Tratamento		Expressão de MHC-II
(0-24 h)	(24-48 h)	
nenhum	nenhum	-
nenhum	IFN- γ	++
IFN- γ	nenhum	++
IFN- γ	IFN- γ	+++
TGF- β 2	nenhum	-
TGF- β 2	TGF- β 2	-
TGF- β 2	IFN- γ	-
IFN- γ	TGF- β 2	++
TGF- β 2+IFN- γ	TGF- β 2+IFN- γ	++

Revelação: - negativa

+ fraca

++ forte

+++ muito forte

Tabela 3. Efeito de TGF- β 2 na expressão de MHC-Classe II por células epiteliais do intestino de rato (IEC-18).

Tratamento		Expressão de MHC-II
(0-24 h)	(24-48 h)	(% positiva de células)
nenhum	nenhum	73,6 $\pm$ 1,5
nenhum	IFN- γ	85,3 $\pm$ 5,3
IFN- γ	IFN- γ	95,8 $\pm$ 0,6
TGF- β 2	nenhum	67,3 $\pm$ 1,8
TGF- β 2	IFN- γ	75,8 $\pm$ 0,3
TGF- β 2+IFN- γ	TGF- β 2+IFN- γ	86,9 $\pm$ 1,5

A demonstração dos antígenos de MHC-Classe II em células do intestino humano e de roedores apoia a noção de que estas células podem actuar como células que apresentam antígeno (Mayer, L., e col. J.Exp. Med. 166 1471-1483, 1987. A célula epitelial do intestino tem sido considerada como participante principal na etiopatogénese de IBD. Um aumento na sua expressão de MHC-Classe II podia conduzir a uma maior interacção de linfócitos com auxiliares T do epitélio e isto, por sua vez, podia ser uma causa primária em IBD ou um mecanismo de perpetuação. Os presentes estudos demonstram pela primeira vez a acção de TGF- β 2 (e MGF do tipo TGF- β 2) na supressão da expressão de MHC-Classe II em células epiteliais do intestino. De acordo com esta descoberta, a disponibilidade de um agente



imunossupressor que actua topicamente à superfície da mucosa intestinal pode oferecer uma nova ferramenta para interromper o mecanismo patogénico envolvido em IBD e outras condições imunes inflamatórias no intestino, nomeadamente a Doença de Coeliac e as reacções de Enxerto-versus-Hospedeiro.

Exemplo 1

Adiciona-se MGF do tipo TGF- β 2 preparado numa forma enriquecida a partir de leite de bovino tal como acima referido a um produto entérico nutricionalmente equilibrado compreendendo cerca de 10% de matéria seca numa quantidade tal que a composição entérica assim obtida compreende uma quantidade de cerca de 0,1 a 50, de preferência de 0,5 a 20 μ g de MGF do tipo TGF- β 2 por grama de matéria seca.

As composições entéricas preparadas desta forma são eficazes na supressão da expressão de MHC-Classe II por células epiteliais do intestino.

Exemplo 2

Adiciona-se MGF do tipo TGF- β 2 preparado numa forma enriquecida a partir de leite de bovino tal como acima referido a um produto alimentar equilibrado numa forma líquida ou em pó numa quantidade tal que a composição alimentar assim obtida compreende uma quantidade de cerca de 0,1 a 50, de preferência de 0,5 a 20 μ g de MGF do tipo TGF- β 2 por grama de matéria seca.

A composição alimentar preparada desta forma é



eficaz na supressão da expressão de MHC-Classe II pelas células epiteliais do intestino.

REIVINDICAÇÕES

- 1ª -

Composição alimentar caracterizada por conter uma quantidade eficaz de MGF do tipo TGF- β 2 derivado de leite de mamífero ou colostro para a modulação da expressão de MHC em seres humanos ou animais.

- 2ª -

Composição alimentar de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por o referido MGF do tipo TGF- β 2 derivado de leite de mamífero ou colostro ser eficaz para o tratamento das Doenças Inflamatórias do Baço ou das reacções de Enxerto-versus-Hospedeiro em seres humanos ou animais.

- 3ª -

Composição alimentar de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por a referida quantidade de MGF do tipo TGF- β 2 derivado de leite de mamífero ou colostro ser eficaz para a prevenção da diarreia em seres humanos ou animais em desmama.

- 4ª -

Composição alimentar de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por a referida quantidade de MGF do tipo TGF- β 2 derivado de leite de mamífero ou



colostro ser eficaz para a prevenção das reacções alérgicas no sistema gastro-intestinal em seres humanos ou animais.

- 5ª -

Utilização do MGF do tipo TGF- β 2 derivado de leite de mamífero ou colostro para a preparação de uma composição alimentar de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 4.

- 6ª -

Composição parentérica caracterizada por conter uma quantidade eficaz de MGF do tipo TGF- β 2 derivado de leite de mamífero ou colostro para a modulação da expressão de MHC em seres humanos ou animais.

- 7ª -

Composição parentérica de acordo com a reivindicação 6, caracterizada por o referido MGF do tipo TGF- β 2 derivado de leite de mamífero ou colostro ser eficaz para o tratamento das Doenças Inflamatórias do Baço ou das reacções de Enxerto-versus-Hospedeiro em seres humanos ou animais.

- 8ª -

Composição parentérica de acordo com a reivindicação 6, caracterizada por a referida quantidade de MGF do tipo TGF- β 2 derivado de leite de mamífero ou colostro ser eficaz para a prevenção da diarreia em seres humanos ou animais em desmama.

- 9ª -

Composição parentérica de acordo com a



reivindicação 6, caracterizada por a referida quantidade de MGF do tipo TGF- β 2 derivado de leite de mamífero ou colostro ser eficaz para a prevenção das reacções alérgicas no sistema gastro-intestinal em seres humanos ou animais.

- 10^a -

Utilização do MGF do tipo TGF- β 2 derivado de leite de mamífero ou colostro para a preparação de uma composição parentérica de acordo com qualquer das reivindicações 6 a 9.

- 11^a -

Utilização do MGF do tipo TGF- β 2 derivado de leite de mamífero ou colostro para a preparação de uma composição farmacêutica contendo uma quantidade eficaz de MGF do tipo TGF- β 2 derivado de leite de mamífero ou colostro para a modulação da expressão de MHC em seres humanos ou animais.

- 12^a -

Utilização de acordo com a reivindicação 11 caracterizada por a referida composição farmacêutica ser utilizada no tratamento das Doenças Inflamatórias do Baço ou das reacções de Enxerto-versus-Hospedeiro em seres humanos ou animais.

- 13^a -

Utilização de acordo com a reivindicação 11 caracterizada por a referida composição farmacêutica ser utilizada na prevenção da diarreia em seres humanos ou animais em desmama.

Utilização de acordo com a reivindicação 11 caracterizada por a referida composição farmacêutica ser utilizada na prevenção das reacções alérgicas no sistema gastro-intestinal em seres humanos ou animais.

A requerente reivindica a prioridade do pedido de patente europeia apresentado em 12 de Agosto de 1990, sob o nº 9181069.5.

Lisboa, 11 de Agosto de 1992
AGÊNCIA NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

A handwritten signature in black ink, consisting of a series of loops and a long horizontal stroke.

RESUMO

"COMPOSIÇÃO ALIMENTAR CONTENDO FACTOR DE CRESCIMENTO DO LEITE"

A invenção refere-se a composições alimentares, composições parentéricas e composições farmacêuticas contendo uma quantidade eficaz de MGF do tipo TGF- β 2 (factor de crescimento do leite) derivado de leite de mamífero ou colostro para a modulação de respostas imunes associadas com MHC (complexo principal da histocompatibilidade) no sistema gastro-intestinal em seres humanos ou animais.