

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

(22) Data de pedido: **2003.11.06**

(30) Prioridade(s): **2002.11.06 AU 2002952492**

(43) Data de publicação do pedido: **2005.09.07**

(45) Data e BPI da concessão: **2010.12.01**
239/2010

(73) Titular(es):

CBIO LIMITED
BRISBANE TECHNOLOGY PARK, 85 BRANDL
STREET EIGHT MILE PLAINS, QLD 4113 AU

(72) Inventor(es):

HALLE MORTON AU
GEOFFREY R. HILL AU
TATJANA BANOVIC AU
ALICE CHRISTINA CAVANAGH AU

(74) Mandatário:

MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA
RUA CASTILHO, N.º 50, 5º - ANDAR 1269-163 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **IMUNOSSUPRESSÃO COM CHAPERONINA 10**

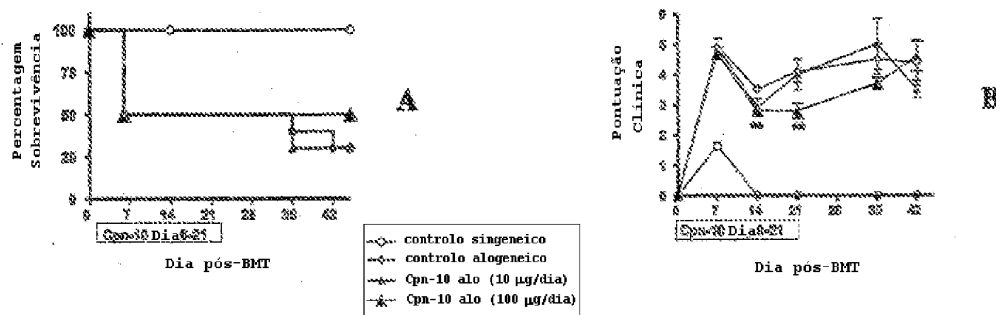
(57) Resumo:

A INVENÇÃO É DIRIGIDA À UTILIZAÇÃO DE CPN10 EM TRANSPLANTAÇÃO E PARTICULARMENTE AO TRATAMENTO E/OU PREVENÇÃO DE DOENÇA DE ENXERTO VERSUS HOSPEDEIRO. A INVENÇÃO PROPORCIONA UM MÉTODO DE ADMINISTRAÇÃO DE CPN10 A UM ANIMAL DADOR E/OU RECEPTOR, OU CÉLULAS, TECIDOS OU ÓRGÃOS DERIVADOS DO DADOR, APESAR DE, NUMA FORMA PARTICULARMENTE VANTAJOSA, TRATAMENTO DOS ANIMAIS DADOR E RECEPTOR. O MÉTODO PODE INCLUIR ADICIONALMENTE A ADMINISTRAÇÃO AO ANIMAL DADOR E/OU RECEPTOR DE PELO MENOS OUTRO AGENTE IMUNOSSUPRESSOR PARA PREVENIR OU ALIVIAR DOENÇA DE ENXERTO VERSUS HOSPEDEIRO.

RESUMO

"IMUNOSSUPRESSÃO COM CHAPERONINA 10"

A invenção é dirigida à utilização de cpn10 em transplantação e particularmente ao tratamento e/ou prevenção de doença de enxerto versus hospedeiro. A invenção proporciona um método de administração de cpn10 a um animal dador e/ou receptor, ou células, tecidos ou órgãos derivados do dador, apesar de, numa forma particularmente vantajosa, tratamento dos animais dador e receptor. O método pode incluir adicionalmente a administração ao animal dador e/ou receptor de pelo menos outro agente imunossupressor para prevenir ou aliviar doença de enxerto versus hospedeiro.



DESCRIÇÃO

"IMUNOSSUPRESSÃO COM CHAPERONINA 10"

DOMÍNIO DA INVENÇÃO

Esta invenção refere-se a uma composição farmacêutica compreendendo: uma quantidade farmacêuticamente eficaz de chaperonina 10 com a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 1 e um transportador, excipiente ou diluente farmacêuticamente aceitável.

CONTEXTO DA INVENÇÃO

A doença enxerto *versus* hospedeiro (GVHD) é um estado que se pode desenvolver quando células imunologicamente competentes foram introduzidas num indivíduo, por exemplo, durante transplantação de medula óssea ou células estaminais. A GVHD refere-se ao processo imunológico pelo qual as células transplantadas de novo montam uma resposta de rejeição contra tecido-hospedeiro. A GVHD pode desenvolver-se após a transplantação ou transfusão de tecido da medula óssea, células estaminais hematopoiéticas, produtos sanguíneos não irradiados e órgãos sólidos contendo tecido linfóide.

Há dois tipos de GVHD, agudo e crónico. A GVHD aguda desenvolve-se nos primeiros três meses após a transplantação, e sintomas clínicos incluem dermatite, enterite e hepatite. A GVHD crónica desenvolve-se habitualmente três meses após a transplantação e é uma síndrome autoimune que afecta múltiplos órgãos e tecidos, como a pele, tracto GI e fígado.

Células T dadoras são responsáveis pelo desencadeamento do desenvolvimento de GVHD. Células T dadoras reconhecem os antígenos de células-hospedeiro como estranhos e respondem por proliferação e libertação de citocinas, que, por sua vez, podem activar células do sistema imunológico inato.

A transplantação de medula óssea ou transplantação de células hematopoiéticas alogeneicas continua a ser a terapia curativa mais eficaz para o tratamento de malignidades hematológicas, como leucemia, mieloma, linfoma e anemia aplástica. A GVHD aguda grave é a causa principal de mortalidade e morbidez durante transplantação de medula óssea. A GVHD crónica também pode conduzir à morte, e os sobreviventes ficam muitas vezes gravemente incapacitados.

Os fármacos imunossupressores desempenham um grande papel na prevenção, tratamento terapêutico e gestão de GVHD aguda e crónica. Os fármacos podem ser administrados ao paciente antes e após o transplante. Fármacos correntes usados no tratamento terapêutico de GVHD incluem ciclosporina, metotrexato, tacrolimus, sirolimus, micofenolato de mofetil e esteróides. Os regimes de imunossupressão envolvem muitas vezes a administração de uma combinação de fármacos para se obter um efeito máximo.

A chaperonina 10 (cpn10) está presente numa variedade de organismos, desde bactérias até humanos, e é um membro da família de proteínas de choque térmico ("chaperones") que se encontram entre as proteínas mais estáveis do ponto de vista evolutivo que existem. As moléculas de "chaperones" estão envolvidas no dobramento pós-tradução, direccionamento e reunião de outras proteínas (Hartman et

al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 3394-8), mas em si mesmas não fazem parte da estrutura reunida final (Ellis *et al.*, 1991, *Annu. Rev. Biochem.* 60, 321-47). Estas proteínas desempenham papéis essenciais em células normais, mas a sua produção é regulada de modo positivo durante "stress" celular (por exemplo, destruição metabólica, infecção, inflamação, transformação).

Foi inesperadamente descoberto que a chaperonina 10 tem a mesma sequência de aminoácidos do Factor do Início da Gravidez (EPF) (Morton *et al.*, Publicação Internacional WO 95/15338). O EPF é uma substância associada à gravidez que aparece no soro materno num período de 6-24 horas da fertilização (Morton *et al.*, 1974, *Nature*, 249; 459-460, e Morton *et al.*, 1976, *Proc. R. Soc. Lond.*, 193; 413-9). Está presente durante pelo menos a primeira metade da gravidez e é essencial para o crescimento e sobrevivência embrionários continuados (Morton *et al.*, 1987, *Current Topics in Developmental Biology* 23; 73-92). É agora claro que o EPF tem muitas funções fisiológicas e a sua produção não está confinada à gravidez.

Foi relatado que o EPF pode actuar como imunossupressor, libertar factores supressores de linfócitos (Rolfe *et al.*, 1988, *Clin. Exp. Immunol.* 73, 219-225) e aumentar as propriedades inibidoras de rosetas de um soro antilinfocitário imunossupressor (Morton *et al.*, 1974 e 1976, *supra*). O EPF pode suprimir a reacção de hipersensibilidade do tipo retardado ao trinitroclorobenzeno em ratinhos (Noonan *et al.*, 1979, *Nature*, 278, 649-51), suprimir a proliferação de linfócitos induzida por mitógenos (Athanasas-Platsis, 1993, tese de Doutoramento,

The University of Queensland) e suprimir a produção de IFN- γ por células T CD4+.

No entanto, não houve nenhuma evidência directa de o EPF ou cpn10 poderem ter potencial como agente imunossupressor em transplantação e, em particular, na prevenção de GVHD. Não foi mostrado que a chaperonina 60, uma proteína de choque térmico relacionada, que também pode actuar como imunossupressor, possua quaisquer efeitos terapêuticos em GVHD. De facto, a técnica anterior ensina que proteínas de choque térmico podem ter efeitos adversos em transplantação (Ogita *et al.*, 2000, *Transplantation*, 69, 2273-2277).

O documento WO 95/15338 divulga uma Chaperonina 10 recombinante e a sua utilização no tratamento de enxertos de pele em ratos e ratinhos *in vivo*, de modo a prolongar a sobrevivência dos enxertos e reduzir a rejeição dos enxertos transplantados.

Morton H *et al.* apresentam a utilização de cpn10 recombinante (factor do início da gravidez (EPF)) *in vivo* como medicamento testado em ratos pelo seu papel no prolongamento de tempos de sobrevivência de enxertos de pele alogénicos (Morton H *et al.*, "Production of a recombinant form of early pregnancy factor that can prolong allogeneic skin graft survival time in rats". IMMUNOLOGY AND CELL BIOLOGY, volume 78, nº 6, Dezembro de 2000 (12-2000), páginas 603-607).

OBJECTIVO DA INVENÇÃO

Os presentes inventores aperceberam-se de que os fármacos imunossupressores presentemente utilizados no tratamento

terapêutico e gestão de GVHD têm as seguintes desvantagens importantes:

- (i) induzem efeitos secundários graves, por exemplo, hipertensão que pode requerer medicação adicional para controlo, nefrotoxicidade que ocorre em até 40% dos pacientes e frequentemente força o médico a administrar doses sub-óptimas do fármaco, para limitar a toxicidade, efeitos no SNC, como tremuras, dores de cabeça, depressão, parestesia, visão embaçada e crises, risco aumentado de infecções bacterianas, fúngicas ou virais, risco aumentado de cancro, particularmente cancro da pele, perda de apetite, náuseas e crescimento aumentado de pelos;
- (ii) a GVHD é resistente aos fármacos numa percentagem significativa de pacientes, sendo requerida terapia de combinação de fármacos;
- (iii) os fármacos são muito dispendiosos, e
- (iv) os fármacos demonstraram interações adversas com outros fármacos terapêuticos, como antibióticos, NSAIDs, antiepilépticos e antifúngicos, imunizações, como contra rubéola e poliomielite, e alimentos naturais, como toranja (no caso da ciclosporina).

Em consequência, é muito necessário o desenvolvimento de um novo fármaco para tratar e gerir GVHD com menos efeitos secundários do que os tratamentos correntemente disponíveis e que seja mais eficaz em pacientes que exibem resistência aos fármacos presentemente comercializados.

Os presentes inventores descobriram inesperadamente que a cpn10 possui enorme potencial clínico como nova terapia no tratamento e gestão de GVHD.

RESUMO DA INVENÇÃO

É descrita aqui a utilização de cpn10 em transplantação e, em particular, no tratamento e/ou prevenção de doença de enxerto *versus* hospedeiro.

Também é descrita a administração de cpn10 a um animal dador e/ou receptor, ou a células, tecidos ou órgãos derivados do dador, bem como o tratamento do animal dador e do receptor.

Em consequência, num primeiro aspecto, um método de tratamento terapêutico ou profilático de doença de enxerto *versus* hospedeiro (GVHD) inclui os passos seguintes:

- (i) administrar uma quantidade farmacologicamente eficaz de chaperonina 10 (cpn10), ou um derivado da cpn10, a um animal dador ou célula, órgão ou tecido dele obtido, e
- (ii) administrar a um animal receptor uma quantidade farmacologicamente eficaz de cpn10, ou derivado da cpn10, para desse modo retardar, melhorar, suprimir ou então reduzir um ou mais sintomas de GVHD após transplantação de uma ou mais células, tecidos ou órgãos para o animal receptor.

Preferivelmente, a quantidade farmacologicamente eficaz de cpn10, ou um derivado da cpn10, é administrada a um animal receptor antes e após o passo (ii).

Preferivelmente, a quantidade farmacologicamente eficaz de cpn10, ou um derivado da cpn10, administrada a um animal situa-se no intervalo de 0,1-100 mg por kg/peso do corpo. Mais preferivelmente, situa-se no intervalo de 0,1-10 mg por kg/peso do corpo.

Preferivelmente, o animal é um mamífero.

Preferivelmente, o mamífero é um humano.

Adequadamente, a célula, tecido ou órgão consiste em medula óssea ou é derivado de medula óssea.

Adequadamente, o método de tratamento terapêutico ou profilático de GVHD também inclui o passo de administrar a esse animal dador e/ou a esse animal receptor pelo menos outro agente imunossupressor seleccionado do grupo que consiste em ciclosporina, tacrolimus, sirolimus, micofenolato de mofetil e metotrexato.

Adequadamente, o método de tratamento terapêutico ou profilático de GVHD também inclui o passo de administrar um esteróide a esse animal dador e/ou a esse animal receptor.

Num segundo aspecto, um método para inibir, suprimir ou então reduzir a produção de $\text{TNF}\alpha$ num animal inclui o passo de administrar a esse animal uma quantidade farmacologicamente eficaz de cpn10, ou derivado da cpn10, para assim inibir, suprimir ou então reduzir a produção de $\text{TNF}\alpha$ no referido mamífero.

Preferivelmente, o animal é um mamífero.

Preferivelmente, o mamífero é um humano.

De acordo com este aspecto, também é descrito um método para inibir, suprimir ou então reduzir a produção de $\text{TNF}\alpha$ por uma ou mais células, tecidos ou órgãos obtidos de um animal, que inclui o passo de administrar a essas células, tecidos ou órgãos uma quantidade farmacologicamente eficaz de cpn10, ou derivado da cpn10, para assim inibir a produção de $\text{TNF}\alpha$ pelo referido animal.

Num terceiro aspecto, é descrito aqui um método para induzir, ampliar ou então aumentar a produção de IL-10 num animal, que inclui o passo de administrar ao referido animal uma quantidade farmacologicamente eficaz de cpn10, ou derivado da cpn10, para assim induzir, ampliar ou então aumentar a produção de IL-10 nesse animal.

Preferivelmente, o animal é um mamífero.

Preferivelmente, o mamífero é um humano.

De acordo com este aspecto, um método para induzir, ampliar ou então aumentar a produção de $\text{TNF}\alpha$ por uma ou mais células, tecidos ou órgãos obtidos de um animal inclui o passo de administrar a essas células, tecidos ou órgãos uma quantidade farmacologicamente eficaz de cpn10, ou derivado da cpn10, para assim induzir a produção de IL-10 por esse animal.

A presente invenção refere-se a uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade farmacologicamente eficaz de chaperonina 10 (cpn10) com a sequência de aminoácidos

apresentada na SEQ ID NO: 1 e um transportador, excipiente ou diluente farmacêuticamente aceitável.

O pelo menos um outro agente imunossupressor é um fármaco imunossupressor ou um anticorpo específico dirigido contra linfócitos B ou T, ou receptores da superfície que medeiam a sua activação.

Preferivelmente, o fármaco imunossupressor é qualquer um de entre ciclosporina, tacrolimus, sirolimus, micofenolato de mofetil e metotrexato.

Noutro aspecto é descrita uma composição farmacêutica do quarto aspecto que também compreende um esteróide.

Preferivelmente, essa proteína cpn10 tem uma sequência de aminoácidos apresentada na FIG. 1 (SEQ ID NO: 1).

Ao longo desta especificação, “compreendem”, “compreende” e “compreendendo” são usados de modo inclusivo e não exclusivo, entendendo-se que implicam a inclusão de um inteiro ou grupo de inteiros relatados mas não a exclusão de qualquer outro inteiro ou grupo de inteiros.

DESCRIÇÃO BREVE DAS FIGURAS

FIG. 1: A sequência de aminoácidos da proteína cpn10 (SEQ ID NO: 1).

FIG. 2: O efeito do tratamento com cpn10 *in vivo* em respostas pró-inflamatórias induzidas por LPS e aloantigenes de macrófagos peritoneais de ratinhos e na diferenciação de células T.

FIG. 3: Sobrevivência de ratinhos após transplantação de medula óssea e tratamento pós-transplante com cpn10. No período pós-transplante (dia 0 até 21), os animais foram injectados subcutaneamente com veículo (singeneico, n=8, e grupo de controlo alogeneico, n=10) ou cpn10 (10 e 100 µg/animal/dia: cpn10 10 µg/dia alogeneico, n=10, e cpn10 100 µg/dia alogeneico, n=10). **B.** Pontuações clínicas de GVHD em ratinhos representadas graficamente ao longo do tempo (0-45 dias; **P <0,01).

FIG. 4: Sobrevivência de ratinhos após transplantação de medula óssea e tratamento pré-transplante com cpn10. Ratinhos receptores e dadores foram tratados durante 5 dias pré-transplante com injeções subcutâneas de cpn10 (100 µg/dia) ou diluente de controlo. Formaram-se então cinco grupos de animais: Grupo 1: Controlo singeneico (n=8) representou B6D2F1 transplantado com medula óssea B6D2F1 e células T singeneicas; Grupo 2: Controlo alogeneico (n=10) consistiu em receptores B6D2F1 pré-tratados com diluente transplantados com células de dadores B6 pré-tratados com diluente; Grupo 3: Receptor alogeneico pré-tratado (n=10), ratinhos B6D2F1 receptores foram tratados pré-transplante com cpn10 e foram transplantados com células dadoras B6 pré-tratadas com veículo; Grupo 4: Ratinhos B6D2F1 receptores pré-tratados apenas com diluente que receberam transplante de dadores B6 pré-tratados com cpn10 (alogeneico: dador pré-

tratado, n=10), e Grupo 5: Ratinhos receptores B6D2F1 e dadores B6 foram pré-tratados com cpn10 antes da transplantação (alogeneico: receptor e dador pré-tratados, n=10). (*P <0,01 versus controlo alogeneico.) **B.** Pontuações clínicas de GVHD em ratinhos representadas graficamente ao longo do tempo (0-30 dias; ***P <0,001).

DESCRIÇÃO PORMENORIZADA

Os inventores demonstraram que a cpn10 tem actividade imunossupressora significativa num modelo de transplantação de ratinho *in vivo* e que o tratamento com cpn10 aumenta a taxa de sobrevivência de ratinhos que sofrem de GVHD. Esta é a primeira demonstração dos efeitos imunossupressores benéficos da cpn10 e taxas de sobrevivência aumentadas num modelo de GVHD *in vivo*.

A eficácia do tratamento com cpn10 é aumentada se ambos os animais dador e receptor forem tratados com cpn10 antes do procedimento de transplantação. Também é demonstrado que a cpn10 inibe a secreção de TNF α mediada por lipopolissacárido e promove a produção de IL-10 em macrófagos de ratinho. A IL-10 é uma citocina imunossupressora potente que é um inibidor poderoso de respostas imunológicas adaptáveis e inatas a LPS.

A GVHD aguda após transplantação de medula óssea (BMT) alogeneica é uma doença mediada por células T na qual células T dadoras reconhecem antígenos díspares do hospedeiro e diferenciam-se de um modo dominante Th1. As citocinas Th1 resultantes derivadas de células T induzem células mononucleares dadoras que libertam quantidades

citopáticas de citocinas inflamatórias (por exemplo, $\text{TNF}\alpha$) quando entram em contacto com lipopolissacárido (LPS). O LPS sofre fugas através da mucosa gastrointestinal que está danificada pela GVHD e pela radiação precedente. Em consequência, o $\text{TNF}\alpha$, em conjunto com a produção desregulada de citocinas citotóxicas, induz apoptose em tecido-hospedeiro. A mortalidade devida a GVHD em modelos de BMT é prevenida por imunossupressão dirigida a células T, particularmente por agentes que inibem a geração de IL-2.

A presente divulgação é exemplificada relativamente a transplantação de medula óssea. No entanto, será apreciado que o conceito é aplicável a outras células, tecidos e órgãos que incluem células imunocompetentes capazes de iniciar uma resposta imunológica no hospedeiro. Exemplos não limitadores dessas células, tecidos e órgãos incluem fígado, pulmão, coração, rim e células estaminais e progenitoras.

A divulgação descrita aqui pode ser amplamente aplicável a qualquer animal, mas é particularmente dirigida a mamíferos e preferivelmente humanos. Por exemplo, pode ser dirigida a uma transplantação em gado, animais domésticos, animais de laboratório e animais de competição (por exemplo, cavalos de corrida e camelos).

Para fins desta especificação, por "*isolado*" pretende-se significar material que foi removido do seu estado natural ou então foi sujeito a manipulação humana. O material isolado pode estar substancial ou essencialmente livre de componentes que normalmente o acompanham no seu estado natural, ou pode ser manipulado de modo a estar num estado

artificial juntamente com componentes que normalmente o acompanham no seu estado natural. Material isolado pode estar em forma nativa, de síntese química ou recombinante.

Por “*proteína*” pretende-se significar um polímero de aminoácidos. Os aminoácidos podem ser aminoácidos naturais ou não naturais, D- e L-aminoácidos, como é bem entendido na área.

Um “*péptido*” é uma proteína com não mais de cinquenta (50) aminoácidos.

Um “*polipéptido*” é uma proteína com mais de cinquenta (50) aminoácidos.

O termo “*ácido nucleico*”, tal como é usado aqui, designa mRNA, RNA, cRNA, RNAi e DNA de filamentação simples ou dupla, inclusive cDNA e DNA genómico.

Por “*agente imunossupressor*” pretende-se designar um agente que pode suprimir, de modo profiláctico ou terapêutico, uma resposta autoimune ou imunológica contra uma célula, tecido ou órgão transplantado alogeneico ou xenogeneico, ou para suprimir doença de enxerto *versus* hospedeiro.

Preferivelmente, a quantidade farmacologicamente eficaz de cpn10 administrada a um indivíduo situa-se no intervalo de 0,1-100 mg.

Mais preferivelmente, a quantidade farmacologicamente eficaz de cpn10 administrada a um indivíduo situa-se no intervalo de 0,1-10 mg.

O profissional apreciará que as quantidades farmacologicamente eficazes acima mencionadas são calculadas em termos de um ser humano típico de 70 kg. Em conformidade, as doses podem variar, dependendo do peso, idade, sexo, estado geral de saúde e boa condição física do indivíduo e quaisquer outros tratamentos a que o indivíduo esteja a ser sujeito. Além disso, a quantidade de cpn10 administrada será interdependente da frequência e calendarização da administração.

Também será apreciado que as quantidades farmacologicamente eficazes acima mencionadas de cpn10 podem ser administradas a animais, por exemplo, animais domésticos e gado. As doses irão variar, dependendo do peso e tipo de animal, como será claro para os profissionais.

A cpn10 administrada a um humano ou outro animal pode ser qualquer forma de cpn10 isolada, incluindo mas não se limitando a cpn10 recombinante (SEQ ID NO: 1), cpn10 nativa, cpn10 peguila, cpn10-GSM recombinante ou qualquer outra proteína derivada da cpn10.

Sequências de nucleótidos e aminoácidos adequadas da cpn10 são bem conhecidas na área, apesar de se referir, por conveniência e para o profissional, as seguintes sequências cpn10 de mamífero:

- (i) cpn10 humana (Nº de Acesso do NCBI *Entrez* U07550; Chen *et al.*, 1994, *Biochim. Biophys. Acta*, 1219, 189-190);
- (ii) cpn10 de ratinho (Nº de Acesso do NCBI *Entrez* U09659; Dickson *et al.*, 1994, *J. Biol. Chem.*, 269, 26858-864), e

(iii) cpn10 de rato (Nº de Acesso do NCBI *Entrez* X71429; Ryan et al., 1994, *FEBS Lett.*, 337, 152-156).

O dador e o receptor podem ser tratados com cpn10 antes do procedimento de transplantação.

Preferivelmente, o dador é submetido a tratamento com cpn10 durante não mais do que 7 dias antes do procedimento de transplantação. Mais preferivelmente, o dador é submetido a tratamento com cpn10 durante 2 até 5 dias antes do procedimento de transplantação.

Preferivelmente, o receptor é submetido a tratamento com cpn10 durante não mais do que 7 dias antes do procedimento de transplantação e não mais do que 90 dias após o procedimento. Mais preferivelmente, o receptor é submetido a tratamento com cpn10 durante 2 até 5 dias antes do procedimento de transplantação e não mais do que 60 dias após o procedimento. Ainda mais preferivelmente, o receptor é submetido a tratamento com cpn10 durante 2 até 5 dias antes do procedimento de transplantação e 10 até 30 dias após o procedimento.

Tal como usado aqui, proteínas “*derivadas*” da especificação são proteínas, como proteínas cpn10, que foram alteradas, por exemplo, por conjugação ou complexação com outras fracções químicas ou por técnicas de modificação pós-tradução, como será entendido na área, inclusive proteínas parceiras de fusão.

Outros derivados contemplados pela divulgação incluem mas não estão limitados a peguilação, modificação de cadeias

laterais, incorporação de aminoácidos não naturais e/ou seus derivados durante a síntese de péptidos, polipéptidos ou proteínas e a utilização de agentes de reticulação e outros métodos que impõem restrições conformacionais nos polipéptidos, fragmentos e variantes da divulgação. Exemplos de modificações de cadeias laterais contempladas pela presente divulgação incluem modificações de grupos amino, tais como por acilação com anidrido acético; acilação de grupos amino com anidrido succínico e anidrido tetra-hidroftálico; amidinação com acetimidato de metilo; carbamoilação de grupos amina com cianato; piridoxilação de lisina com piridoxal-5-fosfato seguida de redução com NaBH_4 ; alquilação redutora por reacção com um aldeído seguida de redução com NaBH_4 , e trinitrobenzilação de grupos amino com ácido 2,4,6-trinitrobenzenossulfónico (TNBS).

O grupo carboxilo pode ser modificado por activação por carbodiimida via formação de O-acilisourea seguida de derivatização subsequente, a título exemplificativo, numa amida correspondente.

O grupo guanidina de resíduos arginina pode ser modificado por formação de produtos de condensação heterocíclicos com reagentes tais como 2,3-butanodiona, fenilglioxal e glioxal.

Grupos sulfidrilos podem ser modificados por métodos tais como oxidação de ácido perfórmico em ácido cisteico; formação de derivados mercuriais usando ácido 4-cloromercurifenilsulfónico, 4-cloromercuribenzoato; 2-cloromercuri-4-nitrofenol, cloreto de fenilmercúrio e outros compostos mercuriais; formação de dissulfuretos

mistos com outros compostos tiol; reacção com maleimida, anidrido maleico ou outra maleimida substituída; carboximetilação com ácido iodoacético ou iodoacetamida, e carbamoilação com cianato a pH alcalino.

Resíduos triptofano podem ser modificados, por exemplo, por alquilação do anel indolo com brometo de 2-hidroxi-5-nitrobenzilo ou haletos de sulfonilo, ou por oxidação com N-bromossuccinimida.

Resíduos tirosina podem ser modificados por nitração com tetranitrometano para formar um derivado 3-nitrotirosina.

O anel imidazolo de um resíduo histidina pode ser modificado por N-carbetoxilação com pirocarbonato de dietilo ou por alquilação com derivados do ácido iodoacético.

Exemplos de incorporação de aminoácidos não naturais e derivados durante a síntese peptídica incluem mas não estão limitados à utilização de ácido 4-aminobutírico, ácido 6-amino-hexanóico, ácido 4-amino-3-hidroxi-5-fenilpentanóico, ácido 4-amino-3-hidroxi-6-metil-heptanóico, t-butilglicina, norleucina, norvalina, fenilglicina, ornitina, sarcosina, 2-tienilalanina e/ou D-isómeros de aminoácidos.

Derivados também podem incluir parceiros de fusão e caudas de epítomos. Exemplos bem conhecidos de parceiros de fusão incluem mas não estão limitados a glutathione-S-transferase (GST), porção Fc de IgG humana, proteína de ligação a maltose (MBP) e hexa-histidina (HIS₆), que são particularmente úteis para o isolamento da proteína de fusão por cromatografia de afinidade. Para a finalidade de

purificação de polipéptidos de fusão por cromatografia de afinidade, matrizes relevantes para cromatografia de afinidade são resinas conjugadas a glutationa, amilose e níquel ou cobalto, respectivamente. Muitas dessas matrizes estão disponíveis em forma de “estojo”, como o sistema QIAexpress™ (Qiagen), útil com parceiros de fusão (HIS₆), e o sistema de purificação com GST da Pharmacia.

Um exemplo particular de um parceiro de fusão é GST, como descrito em Ryan et al. (*supra*). Nalguns casos, os parceiros de fusão também têm sítios de clivagem de proteases, como para Factor X_a ou Trombina, que permitem que a protease relevante digira parcialmente o polipéptido de fusão da invenção e, desse modo, daí liberte o polipéptido recombinante da invenção. O polipéptido libertado pode então ser isolado do parceiro de fusão por separação cromatográfica subsequente. Por exemplo, por clivagem de GST-cpn10 é produzida a proteína derivada GSM-cpn10.

Parceiros de fusão de acordo com a especificação também incluem no seu âmbito “*caudas de epítomos*”, que habitualmente são pequenas sequências peptídicas para as quais está disponível um anticorpo específico. Exemplos bem conhecidos de caudas de epítomos para as quais estão disponíveis anticorpos monoclonais específicos estão prontamente disponíveis e incluem caudas de c-myc, hemaglutinina e FLAG.

Proteínas cpn10 da especificação (inclusive fragmentos, variantes, derivados e homólogos) podem ser preparadas por qualquer procedimento adequado conhecido dos profissionais, incluindo síntese química e expressão recombinante.

Preferivelmente, a cpn10 é cpn10 recombinante.

Por exemplo, a proteína cpn10 recombinante pode ser preparada por um procedimento que inclui os passos seguintes:

- (i) preparar uma construção de expressão que compreende um ácido nucleico isolado que codifica a cpn10 operativamente ligado a uma ou mais sequências de nucleótidos reguladoras num vector de expressão;
- (ii) transfectar ou transformar uma célula-hospedeiro adequada com a construção de expressão, e
- (iii) expressar a proteína recombinante nessa célula-hospedeiro.

Um “vector de expressão” pode ser um vector extra-cromossómico de auto-replicação, como um plasmídeo, ou um vector que é integrado no genoma de um hospedeiro.

Por “operativamente ligado” pretende-se significar que essa(s) sequência(s) de nucleótidos reguladora(s) está/estão posicionada(s), relativamente ao ácido nucleico recombinante da invenção, de modo a iniciar, regular ou então controlar a transcrição.

Sequências de nucleótidos reguladoras serão geralmente apropriadas para a célula-hospedeiro utilizada para expressão. Numerosos tipos de vectores de expressão apropriados e sequências reguladoras adequadas são conhecidos na área para uma variedade de células-hospedeiro. Tipicamente, a referida uma ou mais sequências de nucleótidos reguladoras podem incluir mas não estão

limitadas a sequências promotoras, sequências líder ou de sinal, sítios de ligação de ribossomas, sequências de início e terminação da transcrição, sequências de início e terminação da tradução, sequências dadoras/aceitadoras de processamento e sequências intensificadoras ou activadoras.

Promotores constitutivos ou indutíveis, como conhecidos na área, são contemplados pela invenção e incluem, por exemplo, promotores repressíveis por tetraciclina e indutíveis por metalotioneína. Os promotores podem ser promotores de ocorrência natural ou promotores híbridos que combinam elementos de mais do que um promotor.

Numa forma de realização preferida, o vector de expressão contém um gene marcador seleccionável para permitir a selecção de células-hospedeiro transformadas. Genes marcadores seleccionáveis são bem conhecidos na área e irão variar com a célula-hospedeiro utilizada.

Células-hospedeiro adequadas para expressão podem ser procarióticas ou eucarióticas, como *Escherichia coli* (DH5 α , por exemplo), células de levedura, células SF9 utilizadas com um sistema de expressão de baculovírus, células CHO, COS, CV-1 e células 293, sem limitação.

A proteína cpn10 recombinante pode ser convenientemente preparada pelo profissional usando protocolos comuns como descritos, por exemplo, em Sambrook *et al.*, "MOLECULAR CLONING. A Laboratory Manual" (Cold Spring Harbor Press, 1989), em particular as Secções 16 e 17; "CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY" Editores Ausubel *et al.*, (John Wiley & Sons, Inc. 1995-1999), em particular os Capítulos 10 e 16, e "CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE" Editores

Coligan *et al.*, (John Wiley & Sons, Inc. 1995-1999), em particular os Capítulos 1, 5 e 6.

Um exemplo de produção e purificação de cpn10 sintética recombinante utilizando o sistema pGEX é apresentado em WO 95/15338. Um sistema de expressão bacteriano de alto rendimento que se sabe produzir cpn10 activa (Ryan *et al.*, *supra*) foi utilizado para produzir a cpn10 (SEQ ID NO: 1) utilizada nas experiências descritas aqui.

Composições farmacêuticas

A especificação proporciona uma utilização de cpn10 para o tratamento terapêutico de doenças ou estados clínicos causados por transplantação de células, tecidos ou órgãos, em particular GVHD.

A invenção proporciona composições farmacêuticas que compreendem cpn10 com a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 1.

De modo adequado, a composição farmacêutica compreende um transportador, diluente ou excipiente apropriado farmaceuticamente aceitável.

De modo adequado, a composição farmacêutica compreende cpn10, um transportador, diluente ou excipiente farmaceuticamente aceitável e pelo menos outro agente imunossupressor. Preferivelmente, o outro agente imunossupressor é um fármaco imunossupressor ou um anticorpo específico dirigido contra linfócitos B ou T, ou receptores da superfície que medeiam a sua activação. Mais preferivelmente, o agente imunossupressor é qualquer um de

entre ciclosporina, tacrolimus, sirolimus, micofenolato de mofetil e metotrexato. A composição farmacêutica também pode compreender um esteróide.

Por “transportador, diluente ou excipiente farmacêuticamente aceitável” pretende-se designar um agente de enchimento, diluente ou substância de encapsulação sólida ou líquida que possa ser utilizada de modo seguro em administração sistêmica. Dependendo da via de administração particular, pode ser utilizada uma variedade de transportadores bem conhecidos na área. Estes transportadores podem ser seleccionados de um grupo que inclui açúcares, amidos, celulose e seus derivados, malte, gelatina, talco, sulfato de cálcio, óleos vegetais, óleos sintéticos, polióis, ácido algínico, soluções tamponadas com fosfato, emulsionantes, solução salina isotônica e sais, como sais de ácidos minerais, incluindo cloridratos, brometos e sulfatos, ácidos orgânicos, como acetatos, propionatos e malonatos, e água sem pirogénio.

Uma referência útil que descreve transportadores, diluentes e excipientes farmacêuticamente aceitáveis é “Remington’s Pharmaceutical Sciences” (Mack Publishing Co. N.J. E.U.A., 1991).

Pode ser empregue qualquer via de administração segura para proporcionar a um paciente a composição da divulgação. Por exemplo, pode ser empregue a via oral, rectal, parentérica, sublingual, bucal, intravenosa, intra-articular, intramuscular, intradérmica, subcutânea, por inalação, intra-ocular, intraperitoneal, intracerebroventricular, transdérmica e afins. Injecções intramusculares e subcutâneas são apropriadas, por exemplo, para

administração de composições imunogénicas, vacinas e vacinas de DNA.

Formas galénicas incluem comprimidos, dispersões, suspensões, injeções, soluções, xaropes, trociscos, cápsulas, supositórios, aerossóis, emplastos transdérmicos e afins. Estas formas galénicas também podem incluir a injeção ou implantação de dispositivos de libertação controlada concebidos especificamente para esta finalidade, ou outras formas de implantes modificadas para actuarem adicionalmente deste modo. A libertação controlada do agente terapêutico pode ser efectuada revestindo-o, por exemplo, com polímeros hidrófobos, incluindo resinas acrílicas, ceras, álcoois alifáticos de cadeia longa, ácidos polilácticos e poliglicólicos e certos derivados da celulose, como hidroxipropilmetilcelulose. Adicionalmente, a libertação controlada pode ser efectuada utilizando outras matrizes poliméricas, lipossomas e/ou microesferas.

As composições acima podem ser administradas de um modo compatível com a formulação galénica e numa quantidade tal que seja farmacologicamente eficaz. A dose administrada a um paciente, no contexto da presente invenção, deve ser suficiente para originar uma resposta benéfica num paciente durante um período de tempo apropriado. A quantidade do(s) agente(s) a ser(em) administrado(s) pode depender do sujeito a ser tratado, inclusive a sua idade, sexo, peso e estado geral de saúde, factores que dependerão da avaliação do médico.

De modo que a presente especificação possa ser mais facilmente entendida e implementada, referem-se ao profissional os seguintes exemplos não limitadores.

EXEMPLOS

Métodos

Transplantação

Ratinhos foram transplantados de acordo com um protocolo padrão como descrito em Hill et al., 1997, *Blood*, 90, 3204-3213, e Hill et al., 1999, *J. Clin. Invest.*, 104, 459-467. No dia 0, ratinhos B6D2F1 receberam 1400 cGy de irradiação total do corpo (TBI, fonte de ^{137}Cs) em duas doses separadas por três horas, para minimizar a toxicidade gastrointestinal. Cinco x 10^6 células de medula óssea e 2 x 10^6 células T esplênicas dadoras purificadas em lâ de “nylon” de ratinhos B6 (allogênicos) ou ratinhos B6D2F1 (singeneicos) foram novamente suspensas em 0,25 mL de meio L-15 de Leibovitz e injectadas intravenosamente nos receptores irradiados.

Preparação de cpn10 recombinante

Células de *E. coli* XL1-Blue foram transformadas com cpn10 utilizando o vector de expressão pPL550 e cresceram a 37°C. As células em crescimento exponencial foram induzidas a expressar proteína por aumento da temperatura para 42°C durante 4 horas. As células foram transformadas em grânulos, foram novamente suspensas em 30 mL de TrisHCl 0,025 M pH 8,0 e armazenadas a -30°C.

Um grânulo celular de uma cultura de 1 L foi descongelado, as células foram submetidas a lise com lisozima (100 µg/mL, 15 minutos a 37°C) seguida de sonicação (5 x 10 segundos,

4°C) e os detritos celulares foram removidos por centrifugação (30 minutos, 4°C, 48 384 x g).

A cpn10 foi purificada do lisato clarificado por cromatografia de permuta iónica e interacção hidrófoba. A proteína foi identificada em fracções da coluna na forma de uma banda de ~10 kDa utilizando SDS-PAGE em géis de Tris-Tricina 10-20% (100 x 100 x 1 mm; Novex).

O lisato foi aplicado numa coluna de 200 mL Macroprep HighQ (BIO-RAD) utilizando TrisHCl 0,025 M pH 8,0 como tampão de separação a uma taxa de fluxo de 8 mL/minuto. A fracção não ligada foi retida e o pH foi ajustado para 6,8. A amostra foi aplicada num cartucho de 5 mL EconoPac S (BIO-RAD) utilizando tampão de fosfato de sódio 0,025 M pH 6,8 como tampão de separação a uma taxa de fluxo de 2 mL/minuto. A coluna eluiu com um gradiente de NaCl 0 -> 1 M em tampão de fosfato de sódio 0,025 M pH 6,8, aplicado durante 30 minutos a 2 mL/minuto.

As fracções contendo cpn10 foram reunidas e adicionou-se um volume igual de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3 M em tampão de fosfato de sódio 0,05 M pH 6,8. A amostra foi aplicada num cartucho de 5 mL Econo-pac Methyl HIC, utilizando $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,5 M em tampão de fosfato de sódio 0,05 M pH 6,8 como tampão de separação, a uma taxa de fluxo de 2 mL/minuto. A coluna eluiu com um gradiente de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,5 -> 0 M em tampão de fosfato de sódio 0,05 M pH 6,8, aplicado durante 15 minutos a 2 mL/minuto.

As fracções contendo cpn10 foram reunidas, dializadas contra solução salina durante a noite, distribuídas em alíquotas apropriadas e armazenadas a -30°C.

Tratamento com cpn10

Cpn10 humana recombinante foi diluída em PBS antes da injeção. Ratinhos foram injectados subcutaneamente com cpn10 diariamente (10 µg/dose ou 100 µg/dose) antes ou após BMT, como descrito. Os ratinhos dos grupos de controlo receberam injeção só de diluente.

Avaliação de GVHD

O grau de GVHD sistémica foi avaliado por sobrevivência e por um sistema de pontuação que soma alterações em cinco parâmetros clínicos: perda de peso, postura (arqueada), actividade, textura do pêlo e integridade da pele (índice máximo = 10) (Cooke et al., 1996, *Blood*, 88, 3230-3239; Hill et al., 1999, *J. Clin. Invest.*, 104, 459-467). Os ratinhos individuais foram marcados na orelha e classificados semanalmente desde 0 até 2 para cada critério. Os animais com GVHD clínica grave (pontuações >6) foram sacrificados de acordo com directrizes éticas, e o dia da morte foi considerado o dia seguinte.

Análise estatística

As curvas de sobrevivência foram representadas graficamente utilizando estimativas de Kaplan-Meier e foram comparadas por análise de classificações logarítmicas. O Teste U de Mann Whitney foi utilizado para a análise estatística de pontuações clínicas. $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente diferente.

Exemplo 1 - Experiências com macrófagos de ratinho *in vitro*

Realizaram-se experiências *in vitro* para determinar o efeito da cpn10 numa população de células fisiológicas.

Ratinhos

Ratinhos fêmeas C57BL/6 (B6, H-2^b, Ly-5.2⁺), B6 Ptp^{rc} Ly-5^a (H-2^b, Ly-5.1⁺) e B6D2F1 (H-2^{b/d}, Ly-5.2⁺) foram adquiridos ao Australian Research Centre (Perth, Austrália Ocidental, Austrália). Ratinhos C57BL/6 IL-10^{-/-} (B6, H-2^b, Ly-5.2⁺) foram fornecidos pela Australian National University (Camberra, Austrália). A idade dos ratinhos usados como receptores de transplantes variou entre 8 e 14 semanas. Os ratinhos foram alojados em gaiolas micro-isoladoras esterilizadas e receberam água acidificada sujeita a autoclavagem (pH 2,5) e ração normal durante as primeiras duas semanas pós-transplantação.

Transplantação de medula óssea

Os ratinhos foram transplantados de acordo com um protocolo padrão (Hill et al., 1997 *supra*). Em resumo, no dia 1, ratinhos B6D2F1 receberam 1300 cGy de irradiação total do corpo (fonte de ¹³⁷Cs a 108 cGy/minuto) dividida em duas doses separadas por 3 horas, para minimizar a toxicidade gastrointestinal. Células de medula óssea de dadores (5 x 10⁶ por animal) e T esplénicas (3 x 10⁶ por animal) foram novamente suspensas em 0,25 mL de meio L-15 de Leibovitz (Gibco BRL, Gaithersburg MD) e foram injectadas intravenosamente nos receptores. A sobrevivência foi monitorizada diariamente e as pontuações clínicas de GVHD foram medidas semanalmente. Cpn10 ou diluente de controlo

foi injectado subcutaneamente a doses de 100 µg por animal. O grau de GVHD sistémica foi avaliado como descrito acima.

Culturas de células

O meio de cultura utilizado foi 10% FCS/IMDM (JRH Biosciences, Lenexa, KS) suplementado com 50 unidades/mL de penicilina, 50 µg/mL de estreptomicina, L-glutamina 2 mM, piruvato de sódio 1 mM, aminoácidos não essenciais 0,1 mM, β-mercaptoetanol 0,02 mM e HEPES 10 mM. As experiências foram realizadas a pH 7,75 e 37°C numa incubadora humidificada suplementada com 5% de CO₂.

Para experiências de estimulação com LPS *in vitro*, macrófagos peritoneais ou esplenócitos foram estimulados com concentrações definidas de LPS, TNFα e IL-10 determinadas em sobrenadantes de cultura às 5 horas e 48 horas, respectivamente. Para experiências com aloantigenes *in vitro*, células T C57BL/6 purificadas foram cultivadas em placas de 96 cavidades (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) com 10⁵ macrófagos peritoneais B6D2F1 irradiados (2000 cGy) (MLC primários) e os sobrenadantes foram recolhidos às 72 horas. Em seguida, as culturas foram pulsadas com ³H-timidina (1 µCi por cavidade) e a proliferação foi determinada 16 horas depois num leitor 1205 Betaplate (Wallac, Turku, Finlândia). Para estimulação com mitogenes *in vitro*, células T C57BL/6 purificadas foram cultivadas em placas de 96 cavidades de fundo plano, pré-revestidas com CD3 e CD28 monoclonais a concentrações finais de 10 µg/mL. Os sobrenadantes foram recolhidos às 48 horas e as culturas foram pulsadas com ³H-timidina (1 µCi por cavidade). A proliferação foi determinada 16 horas depois.

ELISAS de citocinas

Os anticorpos utilizados nos ensaios de IFN γ , IL-10, IL-4 e TNF α foram adquiridos à PharMingen (San Diego, CA) e os ensaios foram realizados de acordo com o protocolo do fabricante. Em resumo, amostras foram diluídas 1:3 até 1:24 e citocinas foram capturadas pelo anticorpo monoclonal primário específico (mAb) e detectadas por mAbs secundários etiquetados com biotina. Os ensaios etiquetados com biotina foram desenvolvidos com estreptavidina e substrato (Kirkegaard and Perry laboratories, Gaithersburg, MD). As placas foram lidas a 450 nm utilizando o leitor de microplacas Spectraflour Plus (Tecan, Durham, NC). Citoquinas recombinantes (PharMingen) foram utilizadas como padrões para ensaios ELISA. As amostras e padrões foram processados em duplicado, e a sensibilidade dos ensaios foi 0,063 U/mL para IFN γ e 15 pg/mL para IL-10, IL-4 e TNF α .

Resultados

A administração *in vivo* de cpn10 reduziu a capacidade de macrófagos peritoneais para produzir TNF α (FIG. 2A). Ratinhos B6 (n=3) foram tratados durante 5 dias com cpn10 (100 μ g, uma vez por dia) (cpn10+) ou diluente de controle (cpn10-). Os macrófagos peritoneais foram recolhidos por lavagem peritoneal no dia 6 e foram reunidos de animais individuais no grupo de tratamento. As células foram plaqueadas a 2×10^5 /cavidade na ausência (não mostrado) ou presença de LPS (1 μ g/mL). Os sobrenadantes de cultura foram recolhidos às 5 horas, e os níveis de TNF α (pg/mL) foram avaliados por ELISA. Os resultados estão normalizados para a produção por 10^5 macrófagos com base em coloração de CD11b. A FIG. 2A apresenta dados de duas experiências

idênticas. A secreção induzida por LPS de TNF α a partir destas células foi reduzida em 40%.

O tratamento *in vivo* com cpn10 aumentou a produção de IL-10 a partir de esplenócitos (FIG. 2B). Ratinhos B6 foram tratados com cpn10 ou diluente de controlo como descrito acima. Os esplenócitos foram recolhidos no dia 6 e foram reunidos de animais individuais num grupo de tratamento antes de cultura a 5×10^5 /cavidade na ausência (não mostrado) ou presença de LPS (10 μ g/mL). Os sobrenadantes de cultura foram recolhidos às 48 horas, e os níveis de IL-10 (pg/mL) foram determinados por ELISA. Os dados de duas experiências idênticas estão apresentados na FIG. 2B. Observou-se produção de IL-10 significativamente aumentada em comparação com animais de controlo.

O tratamento *in vivo* com cpn10 reduziu a produção de TNF α de macrófagos peritoneais IL10 $^{-/-}$ (FIG. 2C). Ratinhos B6 IL10 $^{-/-}$ foram tratados com cpn10 ou diluente de controlo, macrófagos peritoneais foram recolhidos por lavagem peritoneal no dia 6 e foram reunidos de animais individuais no grupo de tratamento. Após 5 horas de cultura na ausência (LPS 0) ou presença de LPS (0,1, 1 e 10 μ g/mL) determinou-se a quantidade de TNF α nos sobrenadantes de cultura. A redução mediada por cpn10 da produção de TNF α induzida por LPS (Fig. 2A) não requer IL-10, pois foram observadas reduções semelhantes na secreção de TNF α quando macrófagos peritoneais de ratinhos IL-10 $^{-/-}$ tratados com cpn10 foram estimulados com LPS *in vitro*. Assim, a secreção reduzida de TNF α e produção aumentada de IL-10 parecem ser consequências independentes do tratamento com cpn10.

O tratamento com cpn10 não aparentou afectar a secreção de IFN γ ou IL-4 por células T. Relatos anteriores sugeriram que a cpn10 pode inibir a proliferação de células T em resposta a mitógenos (Morton H. 1998 *Immunol. Cell Biol.*, 76, 483-496). As respostas imunológicas de Th1 são habitualmente caracterizadas por citocinas pró-inflamatórias, como TNF α e IFN γ . As respostas de Th2 envolvem secreção de IL-4 e IL-10, e as respostas de células T reguladoras (Treg) são caracterizadas por produção de IL-10 e TGF β . Uma vez que respostas de Th2 e Treg suprimem a proliferação e respostas de Th1 suprimem a produção de citocinas, investigou-se a capacidade da cpn10 para influenciar a diferenciação de células T.

A administração *in vivo* de cpn10 não afectou a resposta proliferativa de linfócitos T a aloantígenos (FIG. 2D). Ratinhos B6 (n=3) foram tratados com injeções diárias de cpn10 ou diluente de controlo. As populações de células T derivadas de esplenócitos foram estimuladas *in vitro* com esplenócitos alogénicos durante 7 dias numa cultura mista de linfócitos (MLC). Células T purificadas ($0,5 \times 10^5$, 1×10^5 e 2×10^5 /cavidade) foram estimuladas com macrófagos peritoneais B6D2F1 alogeneicos irradiados ($0,5 \times 10^5$ /cavidade), e mediu-se a proliferação às 72 horas via ensaio padrão de incorporação de $^3\text{[H]}$ Timidina. Os valores representados graficamente na FIG. 2D representam média \pm EP de cavidades em triplicado. A proliferação de células T nestas MLCs não diferiu significativamente entre animais tratados com cpn10 e de controlo, indicando que a cpn10 não é um regulador do crescimento de células T.

As FIGS. 2E-G mostram os efeitos da administração *in vivo* de cpn10 na diferenciação de células T. Animais B6 foram

tratados *in vivo* com cpn10 como descrito acima. Células T (2×10^6 /cavidade) de animais tratados com cpn10 e tratados com veículo foram estimuladas em cultura durante 7 dias com esplenócitos B6D2F1 alogeneicos irradiados (3×10^6 /cavidade) (cultura de linfócitos mistos primários). No dia 7, as células T foram recolhidas e estimuladas novamente com anticorpos ligados a placas para CD3 e CD28, que estimulam células T. Os sobrenadantes de cultura foram recolhidos às 24 horas e as concentrações de IFN γ , IL4 e IL-10 foram determinadas por ELISA. Os valores de concentrações nas FIGS 4E-G representam a média \pm EP de cavidades em triplicado.

Nem a secreção de IL-4 (FIG. 2E) nem a secreção de IFN γ (FIG. 2F) por células T diferiram significativamente entre animais tratados com cpn10 e de controlo, sugerindo que a cpn10 não influencia o equilíbrio Th1/Th2.

Em contraste, a secreção de IL-10 por células T foi significativamente aumentada (FIG. 2G). Também foi observado um aumento semelhante na secreção de IL-10 quando o tratamento com cpn10 foi efectuado *in vitro* durante a cultura de células (MLC), em vez de *in vivo*, e de novo a proliferação de IFN γ e IL-4 não foi afectada (dados não mostrados). Estes dados indicam que a cpn10 consegue aumentar a produção de IL-10 em resposta a estimulação com LPS e aloantigenes, e sugere que a produção de IL-10 aumentada por cpn10 pode dever-se em parte a IL-10 derivada de células T.

Exemplo 2 - Efeito de tratamento pré- e pós-transplante com cpn10 no modelo de GVHD *in vivo*

Conduziram-se experiências *in vivo* para investigar se a administração de cpn10 no período peri-transplante poderia prevenir a GVHD.

Administração de cpn10 pós-tratamento

Células de medula óssea (5×10^6 /animal) e células T purificadas (descritas acima) de ratinhos B6 dadores foram transplantadas para ratinhos receptores B6D2F1 irradiados de modo letal (1100 cGy) (grupos alogeneicos). Os receptores B6D2F1 do grupo de controlo singeneico receberam doses iguais de células da medula óssea e T B6D2F1. No período pós-transplante (dia 0 até 21), os animais foram injectados subcutaneamente com veículo (singeneico, n=8, e grupo de controlo alogeneico, n=10) ou cpn10 (10 e 100 µg/animal/dia: cpn10 10 µg/dia alogeneico, n=10, e cpn10 100 µg/dia alogeneico, n=10). As pontuações clínicas de GVHD (como descrito acima) foram determinadas como medida da gravidade da GVHD em animais sobreviventes. Foi observada GVHD clinicamente mais ligeira nos dias 14 e 21 em animais alogeneicos injectados com 100 µg/dia de cpn10 em comparação com o controlo alogeneico tratado com veículo (**P <0,01). Não houve uma diferença significativa na percentagem de sobrevivência entre grupos injectados com veículo e alogeneicos injectados com cpn10. A FIG. 3 mostra curvas de sobrevivência de ratinhos por análise de Kaplan-Meier.

A administração de cpn10 após transplantação de medula óssea (BMT) não conseguiu prevenir a mortalidade por GVHD e

só reduziu brevemente a morbidez, determinado por pontuações clínicas de GVHD (FIG: 3B). Foi observada GVHD clinicamente mais ligeira no dia 14 e dia 21 em animais allogeneicos injectados com 100 µg/dia de cpn10 em comparação com o controlo allogeneico tratado com veículo (**P <0,01).

Administração pré-tratamento de cpn10

Ratinhos B6D2F1 receptores e B6 dadores foram tratados durante 5 dias pré-transplante com cpn10 (100 µg/dia/subcutaneamente) ou diluente de controlo. Células de medula óssea (5×10^6 /animal) e T (3×10^6 /animal), recolhidas no dia 6 de ratinhos dadores B6, foram transplantadas para receptores B6D2F1 irradiados letalmente. Formaram-se cinco grupos de receptores:

Grupo 1: Controlo singeneico (n=8) representou B6D2F1 transplantados com células de medula óssea e T B6D2F1 singeneicas.

Grupo 2: Controlo allogeneico (n=10) consistiu em receptores B6D2F1 pré-tratados com diluente, transplantados com células de dadores B6 pré-tratados com diluente.

Grupo 3: Receptor allogeneico pré-tratado (n=10), ratinhos B6D2F1 receptores foram tratados pré-transplante com cpn10 e foram transplantados com células dadoras B6 pré-tratadas com veículo.

Grupo 4: Ratinhos B6D2F1 receptores pré-tratados só com diluente que receberam transplante de dadores B6 pré-tratados com cpn10 (dador allogeneico pré-tratado, n=10).

Grupo 5: Ratinhos receptores B6D2F1 e dadores B6 foram pré-tratados com cpn10 antes da transplantação (receptor e dador alogeneico pré-tratado, n=10).

Determinaram-se pontuações clínicas de GVHD como descrito acima como medida da gravidade da GVHD em animais sobreviventes.

Pontuações clínicas significativamente menores foram observadas no dia 7 no Grupo 5 (receptores e dadores pré-tratados com cpn10 antes da transplantação) em comparação com o grupo de controlo alogeneico (FIG. 4B; ***P <0,001). A FIG: 4 mostra curvas de sobrevivência de ratinhos por análise de Kaplan-Meier.

A administração de cpn10 a dadores e receptores de transplantes durante 5 dias antes do transplante retardou significativamente a mortalidade por GVHD (*P <0,01 versus controlo alogeneico). Adicionalmente, a gravidade da GVHD, determinada pela pontuação clínica, também foi reduzida logo após BMT. A capacidade da cpn10 para retardar a mortalidade por GVHD quando administrada antes de BMT é consistente com o efeito anti-inflamatório descrito aqui, isto é, uma limitação da produção de TNF α (Hill et al., 1998 *J. Clin. Invest.*, 102, 115-123; Hill et al., 1997, *supra*). O facto de a administração de cpn10 após BMT não ter conseguido prevenir o desenvolvimento de GVHD é consistente com a ausência de um efeito na activação e diferenciação de células T nas doses e calendarização utilizadas neste Exemplo, como foi caracterizado na FIG 3.

O condicionamento do transplante (irradiação letal) nestes modelos monta um processo de lesão progressiva no tracto GI, fuga de LPS e geração de citocinas inflamatórias, que por sua vez induz lesões adicionais no tracto GI, e assim o processo continua na forma de um circuito de realimentação positiva. O processo pode ser interrompido por agentes farmacológicos que protegem o tracto gastrointestinal de lesão por radiação (como IL-11 e Factor de Crescimento de Queratinócitos; Krijanovski *et al.*, 1999, *Blood*, 94, 825-831), antagonistas directos de LPS (Cooke *et al.*, 2001, *J. Clin. Invest.*, 107, 1581-1589) ou inibidores do próprio TNF α (Hill *et al.*, 1997 *supra*). No entanto, estes agentes tendem a retardar e não a prevenir GVHD a menos que o TNF α seja completamente neutralizado, ou que haja efeitos adicionais na activação e diferenciação de células T. Assim, o retardamento da mortalidade por GVHD pela administração de cpn10 é consistente com uma limitação da sinalização de LPS e subsequente produção de TNF α logo após BMT, mas também falha em exercer impacto na função subsequente de células T alo-reactivas.

Em consequência, a cpn10 tem potencial para se tornar num fármaco terapêutico importante no tratamento de GVHD. A eficácia aumentada do tratamento de GVHD observada quando dador e receptor recebem cpn10 antes do procedimento de transplantação é consistente com o facto de o TNF α ser originário de ambas as fontes de tecido ou órgão no período pós-transplante (Cooke *et al.*, 2000, *J. Immunol.*, 165, 6612-6619; Speiser *et al.*, 1997, *J. Immunol.*, 158, 5185-5190).

Além disso, a cpn10 pode ser útil no tratamento de GVHD em combinação com agentes imunossuppressores tradicionais, que limitam a resposta imunológica adaptável secundária.

Ao longo da especificação, o objectivo foi descrever as formas de realização preferidas sem limitar a especificação a qualquer forma de realização ou conjunto específico de características. Em consequência, os profissionais apreciarão que, à luz da presente divulgação, várias modificações e alterações podem ser feitas nas formas de realização particulares exemplificadas sem sair do âmbito da especificação.

Lisboa, 2 de Dezembro de 2010

REIVINDICAÇÕES

1. Composição farmacêutica compreendendo: uma quantidade farmacêuticamente eficaz de chaperonina 10 com a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 1 e um transportador, excipiente ou diluente farmacêuticamente aceitável.
2. Composição farmacêutica da reivindicação 1 compreendendo adicionalmente pelo menos outro agente imunossupressor.
3. Composição farmacêutica da reivindicação 2, em que o outro agente imunossupressor é seleccionado do grupo que consiste em ciclosporina, tacrolimus, sirolimus, micofenolato de mofetil e metotrexato.
4. Polipéptido isolado com a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 1.

Lisboa, 2 de Dezembro de 2010

AAGQAFRKFLPLFDRVLVERSAAEVTKGGIMLPEKSQGVLOATVVA
VGSGSKGKGGEIQPVSVKVGDKVLLPEYGGTKVLLDDKDYFLFRDGDIL
GKYVD

FIG. 1

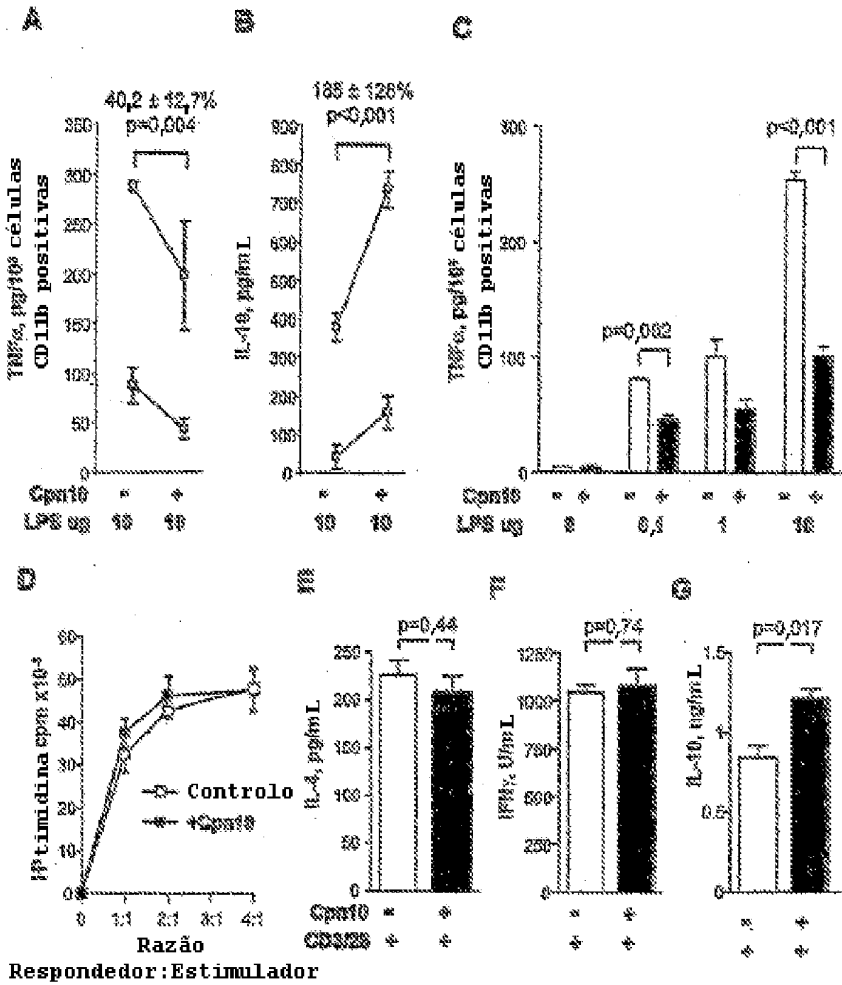


FIG. 2

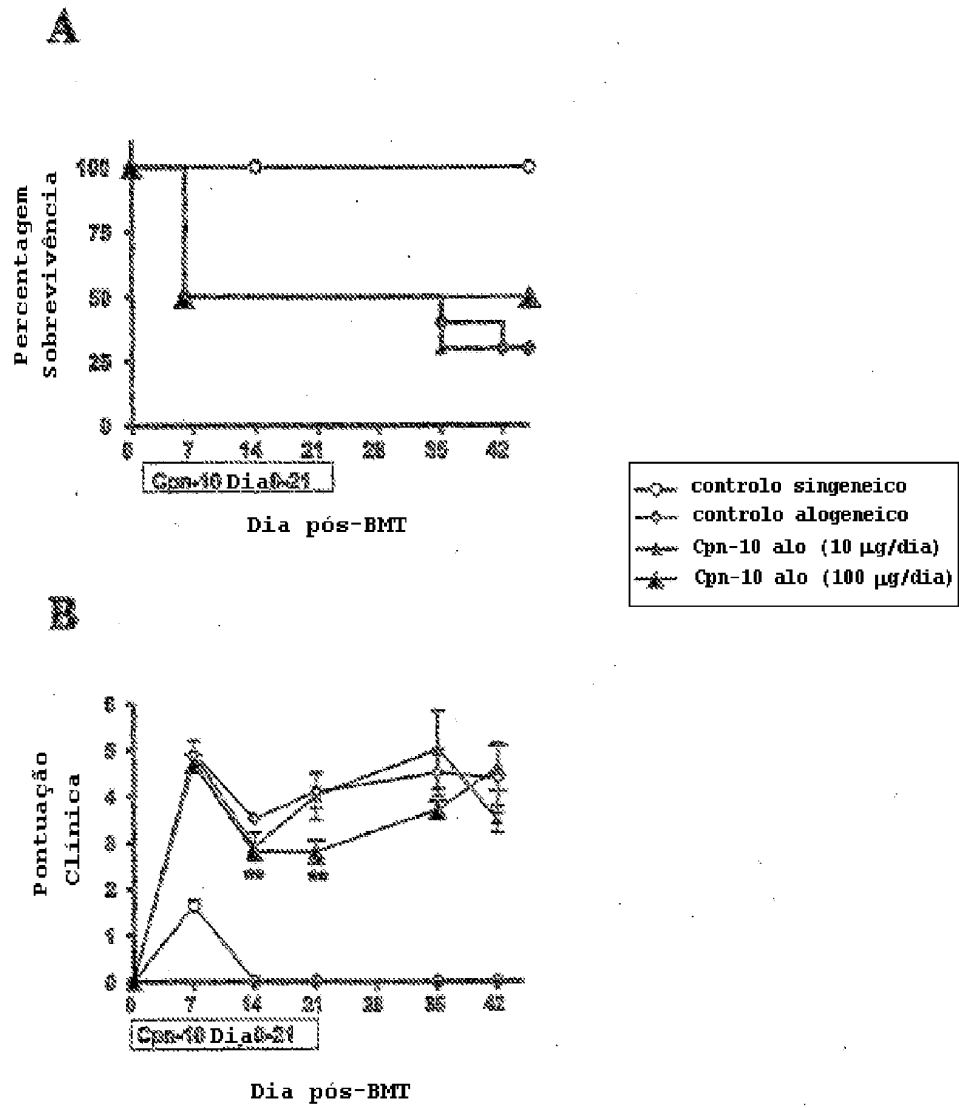


FIG. 3

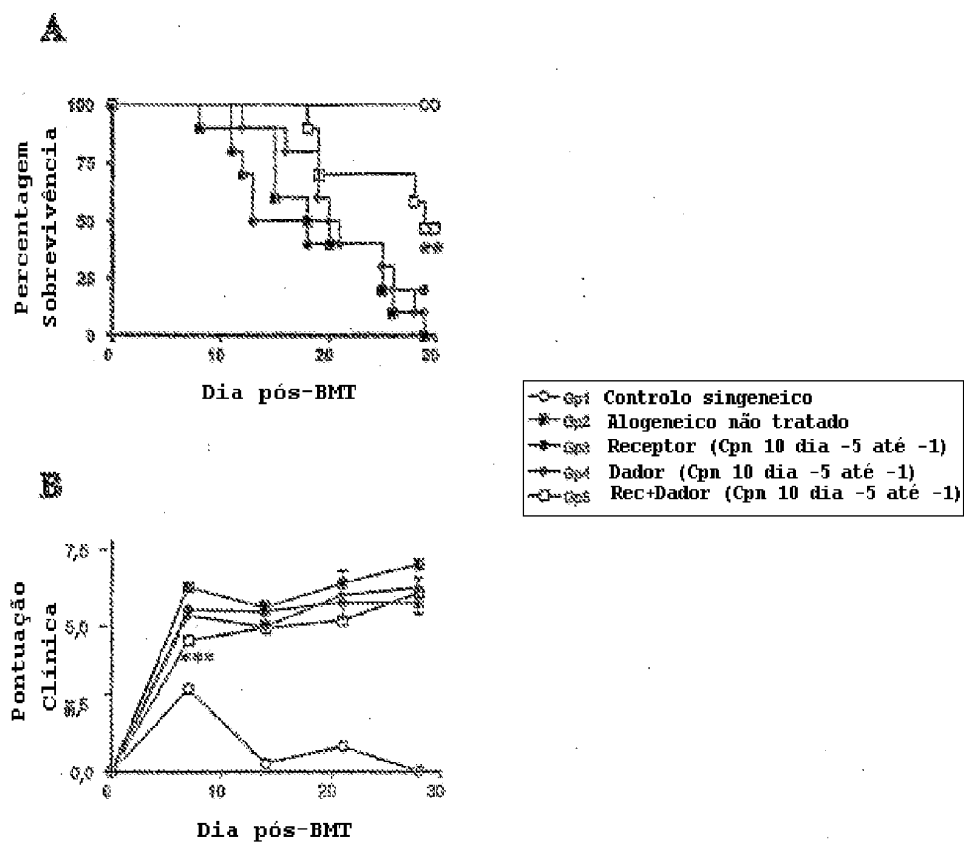


FIG. 4